

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM.

FACULTAD DE MEDICINA

ESTRUCTURA PRIMARIA Y PREDICCIÓN DE LA SECUNDARIA  
DE LAS PROTEINAS ESTRUCTURALES DEL VIRUS DEL DENGUE,  
GENOTIPO-2 MEXICANO

Tesis para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

AREA INMUNOLOGIA

presenta

BLANCA HAYDE RUIZ ORDAZ

MEXICO D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1991

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

11281

5<sup>2eg.</sup>



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	Pág.
Resumen	i
Introducción	1
Planteamiento del Problema	15
Objetivos	18
Diseño Experimental	19
Material y Métodos	21
Resultados	51
Discusión	99
Bibliografía	108

## RESUMEN

El dengue nos preocupa en México porque ha causado grandes epidemias que han incapacitado temporalmente a miles de individuos, porque existe la amenaza de que se presenten epidemias de síndromes graves y porque puede volverse endémico con altas tasas de mortalidad.

Actualmente existe una controversia acerca de los planteamiento que intentan explicar el establecimiento de los casos hemorrágicos de la enfermedad y en donde se postula la variación antigénica versus la facilitación de la infección mediada por anticuerpos heterotípicos no neutralizantes. Sin embargo, existen casos de dengue hemorrágico en el curso de una infección primaria a los cuales hasta la fecha no se les ha encontrado una explicación.

Este trabajo pretende apoyar la hipótesis relacionada con la facilitación de la infección, en aquellos casos de dengue hemorrágico que se presentan en el curso de una infección primaria. En consecuencia se analizó el grado de conservación de la estructura secundaria de la glicoproteína de envoltura de los flavivirus secuenciados a la fecha (ya que esta proteína tiene un papel biológico central en en esta familia los cuales tienen una distribución geográfica dife-

rente y pertenecen a grupos serológicos distintos, además de analizar y caracterizar a nivel primario, una cepa de dengue-2 que causó problemas epidemiológicas en nuestro país.

La cepa mexicana de dengue-2 mostró ser antigénicamente única ya que difiere de otras cepas en un número importante de epítopes. Al analizar la organización del genoma viral, encontramos que la región estructural es similar a la de otros Flavivirus, con una homología en secuencia nucleotídica del 71.9 al 74.6% entre distintos serotipos y 90 a 96% para el mismo serotipo. De la misma manera, en la secuencia de aminoácidos se observó una homología del 63.37 al 70.55% entre los diferentes serotipos y de un 92.86 a 96.91% en el mismo serotipo. Observamos que las variaciones en la secuencia de aminoácidos aparentemente no se encuentran distribuidos uniformemente a lo largo de las proteínas, sino que existen dominios con mayor variabilidad y otros muy conservados.

Por otra parte, se determinó la composición y distribución de los motivos estructurales para las proteínas de nucleocápside, membrana y envoltura viral basados en diferentes principios fisicoquímicos, heurísticos y estadísticos utilizando el método conjunto de predicción (77), lo que nos permitió analizar e identificar estas proteínas en las diferentes fa-

milias estructurales.

En el análisis estructural de la glicoproteína de envoltura de 10 diferentes flavivirus se muestra que aunque existe una divergencia importante a nivel de estructura primaria (29 al 70% de homología en secuencia de aminoácidos) se observa una gran homología y conservación tanto en la proporción como en la distribución de los motivos estructurales de la misma. Un hallazgo importante es la conservación de 12 cisteínas capaces de formar enlaces disulfuro que podrían estar relacionados con la estabilidad de la estructura tridimensional, cuyas posiciones, a han sido previamente establecidas (81), denotando que todos los miembros de esta familia tienen una arquitectura común para la glicoproteína de superficie, hecho que podría ser de gran importancia en la relación huésped-parásito en el curso de una infección primaria y/o secundaria por el virus del dengue.

## INTRODUCCION.

La palabra dengue es el homónimo castellano del vocablo suawili "dengua" que significa calambre súbito (1). El dengue es una infección aguda y sistémica ocasionada por alguno de los cuatro serotipos de este virus (Cuadro I), que se transmite al hombre por la picadura de la hembra hematófaga del mosquito Aedes aegypty y que afecta preferencialmente a las células del sistema fagocítico mononuclear (1,2).

CUADRO I

ALGUNAS PROPIEDADES DE LOS 4 PROTOTIPOS DEL VIRUS DEL DENGUE

	Dengue 1 (Hawaii)	Dengue 2 Nueva Guinea C	Dengue 3 (H-87)	Dengue 4 (H-341)
Fecha de colección	1944	1944	1956	1956
Lugar de colección	Hawaii	Nueva Guinea	Filipinas	Filipinas
Origen	Suero/plasma (humano)	Suero/plasma (humano)	Suero/plasma (humano)	Suero/plasma (humano)
Forma del virus	Esférica	Esférica	Esférica	Esférica
Diámetro	50 - 55 nm	50 - 55 nm	45 - 50 nm	45 - 50 nm
Hemaglutinación de eritrocitos de ganso (pH óptimo)	6.2	6.4	6.4	7.0
Neurotropismo (ratón)	-	-	+	+
Métodos serológicos de detección	Inhibición de la hemaglutinación, fijación de complemento, neutralización, inmunofluorescencia.			

La enfermedad se consideró durante muchos años como limitada a regiones de Asia, Africa y Australia. Sin embargo, ya durante la segunda guerra mundial se aislaron los serotipos 1 y 2 en el Continente Americano (3). En 1957, debido a la existencia de fiebre amarilla en América, la Organización Panamericana de la Salud auspició una campaña de erradicación

del Aedes, y es así que el 20 de septiembre de 1963 se declara erradicado el mosquito (4), por lo que en nuestro país no se tuvo notificación de dengue de 1963 a 1978. Posteriormente se descuidó la vigilancia epidemiológica y en 1978 reaparece la enfermedad en el Sur de México. En 1980 alcanza su morbilidad máxima (51,506 casos) ocupando el sexto lugar dentro de las enfermedades notificables. En los años siguientes invade por la costa del Golfo hasta el norte del país, afectando 23 estados (Fig. 1) (5). Actualmente circulan 3 de los 4 serotipos y las principales áreas endémicas son: Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Yucatán, Puebla y Veracruz. En la población mundial se ha estimado que ocurren arriba de 100 millones de casos anuales (6,7).

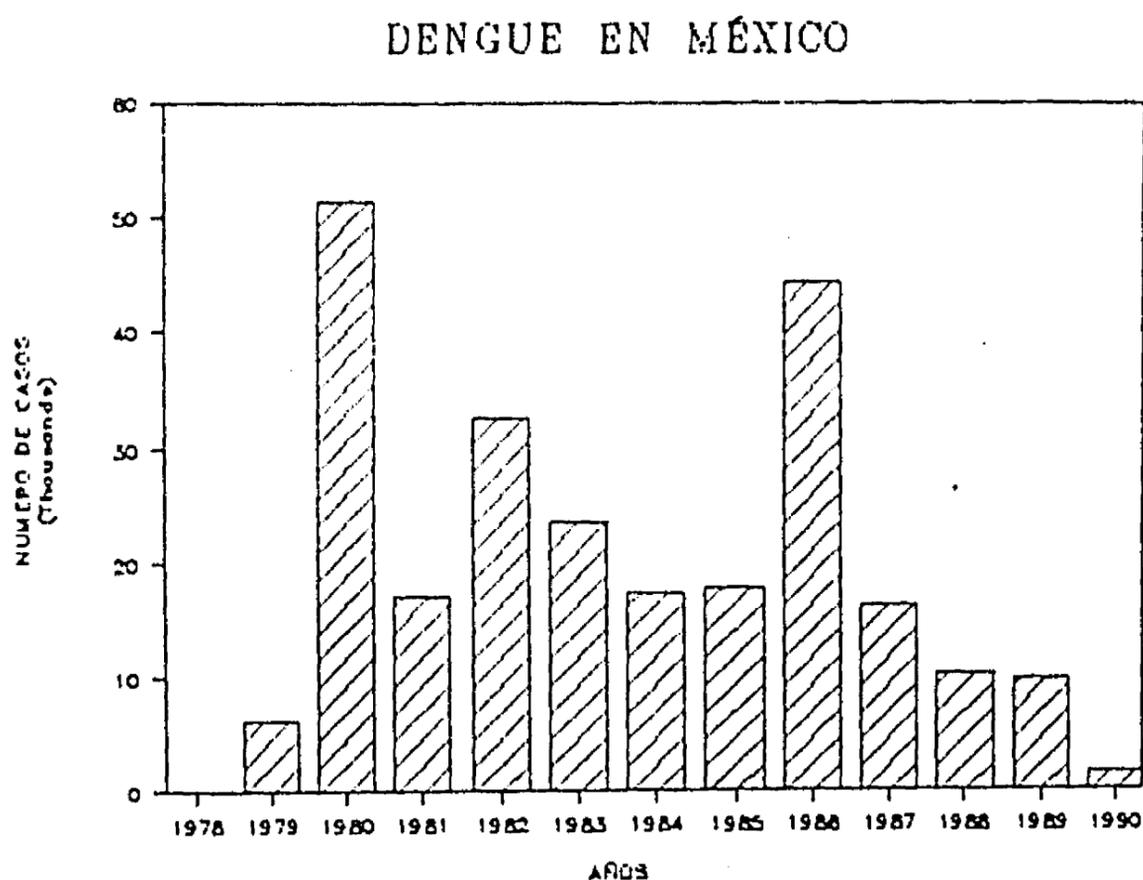


Fig. 1

El dengue nos preocupa en México porque ha causado grandes epidemias que han incapacitado temporalmente a miles de individuos, porque existe la amenaza de que se presenten epidemias de síndromes graves (actualmente solo tenemos notificación en forma aislada) y porque puede volverse endémico con altas tasas de mortalidad.

Hallazgos clínicos y de laboratorio de un caso típico de fiebre por dengue<sup>1</sup>

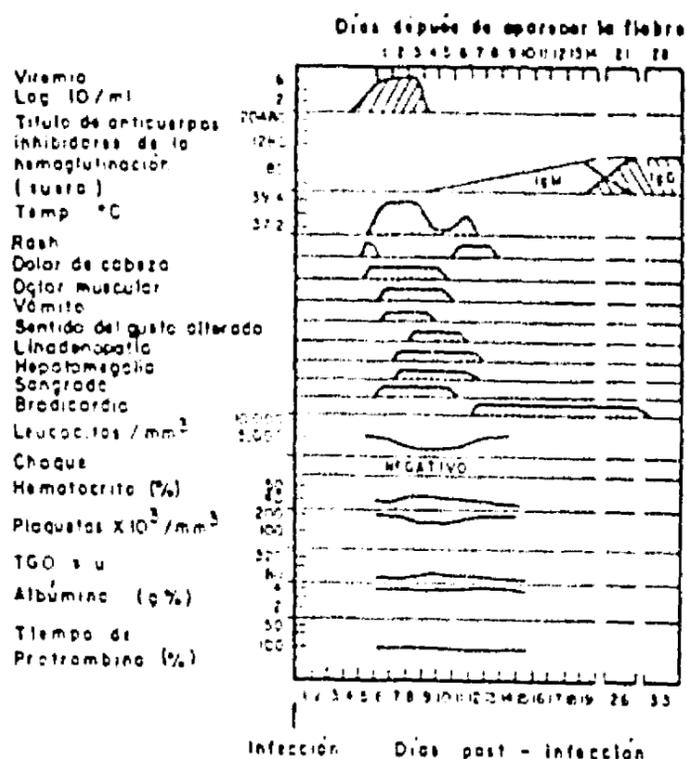


Fig. 2

Hallazgos clínicos y de laboratorio de un caso típico de Síndrome de Choque por Dengue (SCD)<sup>1</sup>

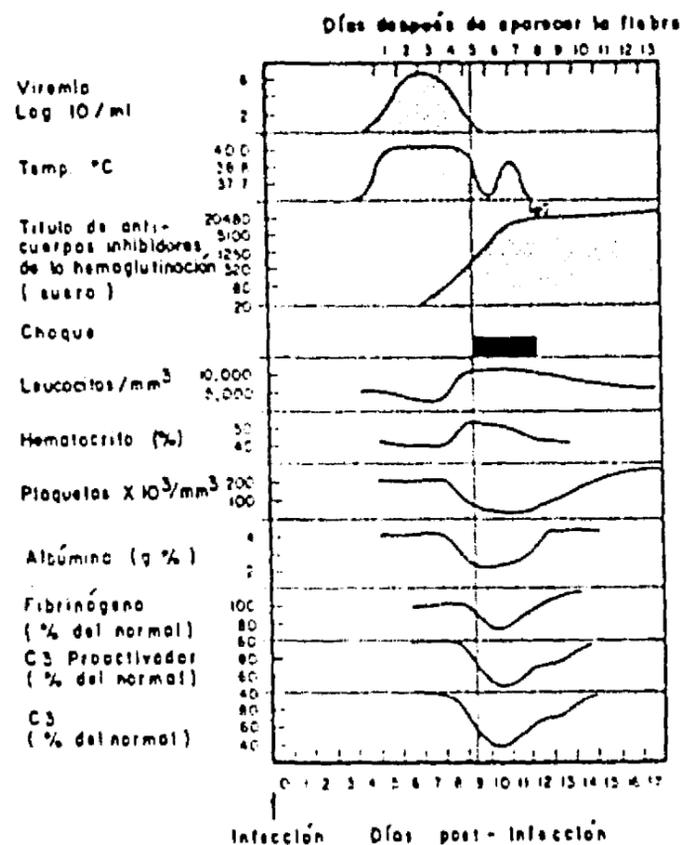


Fig. 3

El virus afecta principalmente a personas jóvenes y el espectro clínico varía desde un cuadro febril hasta las formas graves que pueden manifestarse como fiebre hemorrágica (FHD) o síndrome de choque (DSS), con una letalidad de un 10-40%. En la forma clásica o dengue primario, después de un período de incubación de 2 a 8 días, el cuadro clínico se expresa

bruscamente con fiebre intermitente bifásica, escalofríos, cefalea, mialgias, artralgias, dolor retro-orbitario, exantema máculo-papular en el tronco y extremidades, náuseas y/o vómito (1) (Fig. 2). En el dengue hemorrágico el inicio se presenta como en la forma clásica con fiebre muy elevada que al remitir, el estado general se agrava bruscamente, los pacientes entran en letargo presentando taquicardia, hipotensión, déficit en la perfusión tisular periférica con manifestaciones hemorrágicas que incluyen por lo menos una prueba de torniquete positiva y cualquiera de los siguientes signos: petequias, púrpura, equimosis, epistaxis, hematemesis, gingivorragia o melena (Fig. 3 y Cuadro II). Hay hepatomegalia en

CUADRO II

CRITERIOS DE LA OMS PARA EL DIAGNOSTICO DE FHD Y SCD

---

<u>Hallazgos clínicos</u>	
<u>Fiebre</u> - aparición aguda, continua y con duración de 2 - 7 días.	
<u>Manifestaciones hemorrágicas</u> - prueba de torniquete positiva, petequias, -- púrpura, equimosis, epistaxis, sangrado de encías, hematemesis y/o melena.	
<u>Choque</u> - manifestado por pulso rápido y débil, con $\leq 20$ mm Hg de presión o hipotensión, escalofrío, cansancio.	
<u>Hallazgos de laboratorio</u>	
<u>Trombocitopenia</u> - $\leq 100,000/mm^3$	
<u>Hemoconcentración</u> - Incremento de hematocrito ( $\geq 20\%$ )	
<u>Grado de severidad</u>	
FHD SCD	Grado I - fiebre, prueba de torniquete positiva
	Grado II - manifestaciones de grado I y sangrado espontáneo
	Grado III - falla circulatoria manifestada por pulso rápido y débil, con $\leq 20$ mm Hg o hipertensión, escalofrío, cansancio.
	Grado IV - Choque profundo, no se puede detectar presión sanguínea y pulso

---

el 90% de los casos, y en los exámenes de laboratorio se encuentra el hematocrito elevado, leucocitosis moderada, hipoalbuminemia, disminución del fibrinógeno, depresión de

más del 50% de los niveles de C3, del proactivador de C3, y menos de 100,000 plaquetas/mm<sup>3</sup> (1).

Se han propuesto dos hipótesis para tratar de explicar la presentación de las formas graves de la enfermedad: a) la posible variación antigénica de las cepas virales mientras circulan en la naturaleza y b) la infección secuencial por dos diferentes serotipos del virus. La primera posibilidad fue sugerida por León Rosen en 1974, con base en las observaciones hechas en 1972 durante un brote de dengue en la isla Nieu asociado con casos fatales causados por dengue-2 en el curso de una infección primaria (8). La variación antigénica y biológica en Flavivirus ha sido demostrada con cepas de virus que causan la encefalitis japonesa (9), cepas africanas y americanas de fiebre amarilla (10) y encefalitis de San Luis (11), y aunque parece ser un mecanismo general en Flavivirus, ha sido poco estudiado. Trent y col. (12) analizaron aislados de serotipo 2 del dengue procedentes de diferentes regiones geográficas, por huellas ("fingerprint") de RNA, pudiendo observar una variación intratípica importante para las diferentes áreas geográficas. La segunda hipótesis es más aceptada en general, particularmente por el número elevado de casos de dengue hemorrágico ocurrido durante las epidemias por serotipo 2 en países asiáticos y del Caribe, en individuos previamente expuestos al serotipo 1 (13,14). En este sentido Halstead (15,16) postula que si la secuencia infectante es 1-2, 3-2 ó 4-2, se presenta el fenómeno de

facilitación inmunológica por la acción de anticuerpos heterotípicos no neutralizantes "facilitadores", con activación de macrófagos que conduce a la liberación de factores que degradan a C3, tromboplastina leucocitaria y otras sustancias vasoactivas, lo cual predispone el establecimiento de la coagulopatía de consumo con estado de choque y/o manifestaciones hemorrágicas (Fig. 4).

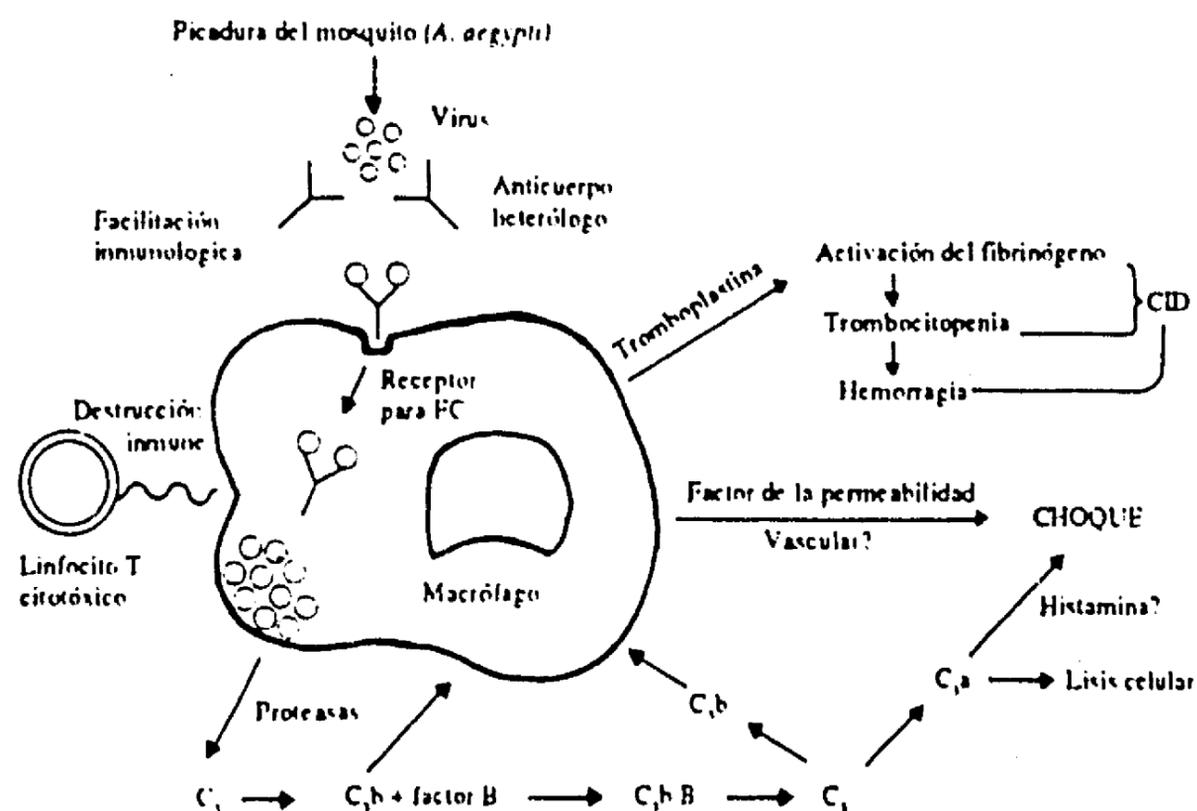


Fig. 4

La epidemia ocurrida en Cuba en 1981 es uno de los mejores apoyos a la infección secuencial, ya que en este país no se habían reportado casos de dengue desde la segunda guerra mundial, hasta que en 1977-78 se presentó una epidemia por dengue 1 que afectó al 40% de la población total; la forma predominante de la enfermedad fué benigna. En 1981 se in-

trodujo en Cuba el serotipo 2 y los sueros obtenidos de pacientes con FHD/DSS mostraron una respuesta secundaria de anticuerpos. Los niños de 1-2 años de edad no presentaron FHD/DSS, ya que nacieron después de la epidemia por dengue 1 (17); de 124 niños con DSS solo el 14% era de raza negra, resultando más afectados los sujetos de raza blanca y presentándose una mayor proporción de muertes en mujeres. Las tasas generales de mortalidad fueron 5 veces más elevadas en niños que en adultos (17).

Los datos epidemiológicos sugieren que la severidad de la enfermedad puede estar relacionada principalmente con la raza, edad, sexo, estado nutricional, un intervalo menor de cinco años entre la primoinfección y la infección secundaria, la secuencia de infección, la cepa viral, el estado inmune del huésped, la densidad del vector, y la conjunción de varios de estos factores.

Aunque los datos epidemiológicos sugieren que el fenómeno de facilitación de la infección viral, mediada por anticuerpos, puede ser un factor predisponente en el establecimiento del choque hemorrágico (15,16), el hecho de que existan casos auténticos de dengue hemorrágico en el curso de una infección primaria, sugiere que otros factores, probablemente virales, además de los mecanismos inmunológicos, pueden estar jugando un papel importante en la relación huésped-parásito (18).

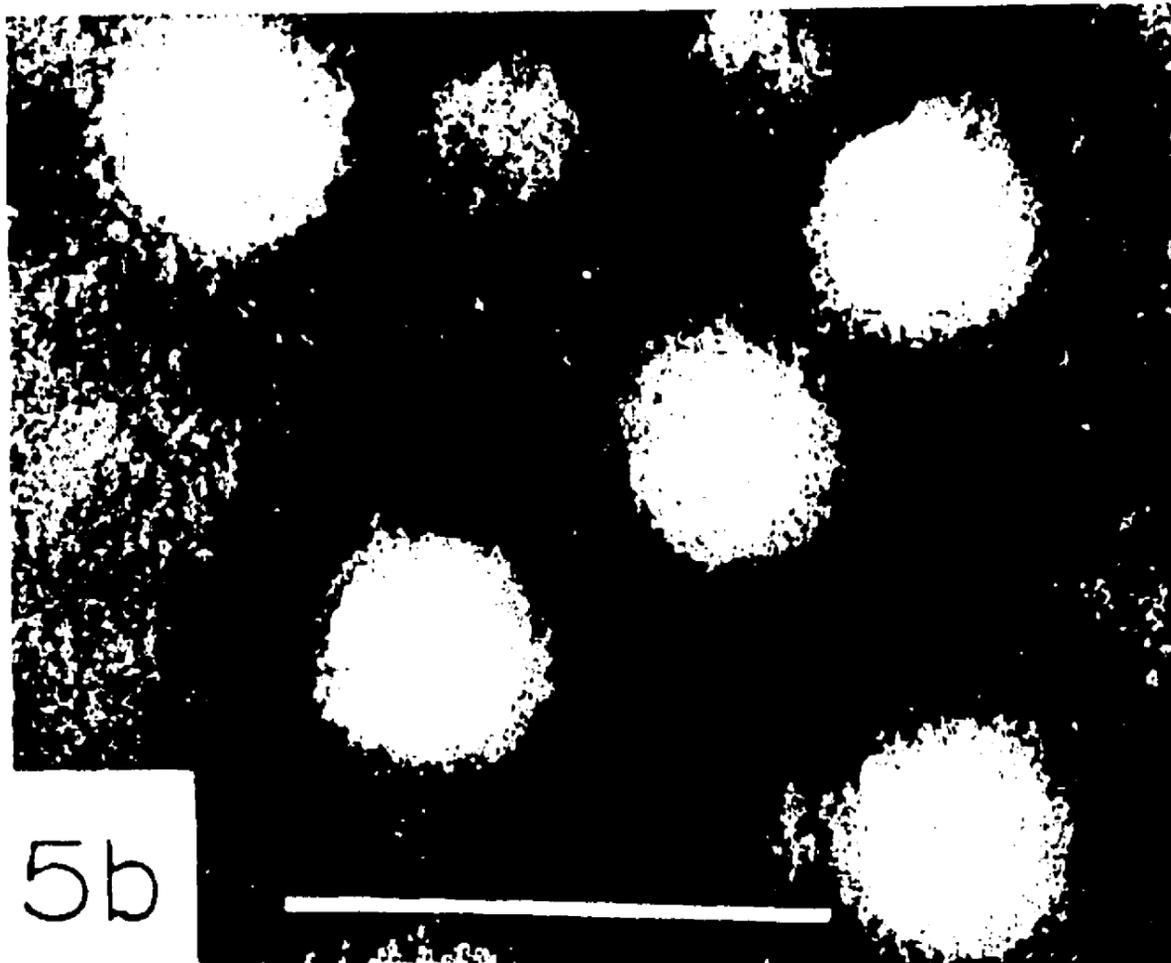
El virus del dengue que anteriormente formaba parte de la familia Togaviridae ha sido reclasificado recientemente, junto con los otros miembros del género Flavivirus, en la familia Flaviviridae (19), ya que presentan tanto características estructurales como propiedades biológicas diferentes a los alfavirus entre las que se encuentran: tamaño, forma, estructura, secuencia genómica y estrategias de replicación (19). Esta familia esta compuesta de aproximadamente 66 especies de virus divididos en 3 grupos dependiendo de su forma de transmisión (mosquito, garrapata o sin vector conocido) y 8 subgrupos antigénicamente definidos (ver tabla I) (19).

DIVISION DE LOS FLAVIVIRUS: POR VECTOR Y COMPLEJO ANTIGENICO		
VECTOR		
GARRAPATA	MOSQUITO	SIN VECTOR
COMPLEJO ANTIGENICO		
ENCEFALITIS TRANSMITIDA POR GARRAPATA.  TYULENIY.	ENCEFALITIS JAPONESA.  NTAYA  UGANDA S  DENGUE	RIO BRAVO  MODOC

[ TABLA 1] Complejos antigénicos de los Flavivirus definidos por ensayos de neutralización cruzada con antisueros policlonales

El virus presenta forma esférica de aproximadamente 50 nm de diámetro, con un centro denso de 30 nm y una cubierta con

proyecciones finas alrededor de 2-5 nm (Fig. 5). El virión esta constituido, de más o menos 6% de RNA, 66% de proteínas, 9% de carbohidratos y 17% de lípidos (21,22). El genoma



viral dentro de la nucleocápside consiste de RNA monocatenario de polaridad positiva con un coeficiente de sedimentación de 45S que contiene 10.7 Kb (22). En su extremo 5' presenta una estructura  $m^7GppAmp$  (Cap Tipo I) (23) y carece de una secuencia de poli A en el extremo 3' (23). En la región no traducible de ambos extremos existen secuencias conservadas entre los distintos Flavivirus que se organizan en forma de tallos y asas dando una estructura secundaria estable en cuanto a su energía libre, por lo que han sido relacionadas con señales importantes tanto en transcripción como

con señales importantes tanto en transcripción como traducción del genoma viral (22,24,25). Asimismo, se han reportado secuencias cortas y repetidas muy conservadas en Flavivirus, de las cuales una región de 8 nucleótidos en el extremo 5' es complementaria de 8 nucleótidos en el extremo 3'. Estas secuencias son importantes en la replicación de los alfavirus, durante la ciclización del RNA (26), sin embargo en Flavivirus su función es desconocida. El mRNA viral es monocistrónico y posee un marco abierto de lectura de aproximadamente 10,720 nucleótidos que codifica un precursor poliprotéico de 3,391 aminoácidos que es procesado post-transcripcionalmente dando lugar a tres proteínas estructurales y siete no estructurales, cuyas propiedades biológicas empiezan a conocerse y que se encuentran en el siguiente orden:

5' C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'

La proteína de la cápside, también llamada V2, es un péptido básico, no glicosilado con un peso molecular de 14,000 el cual forma un complejo infeccioso con el RNA dando lugar a la nucleocápside Fig. 6 (27). Se propone que su carácter

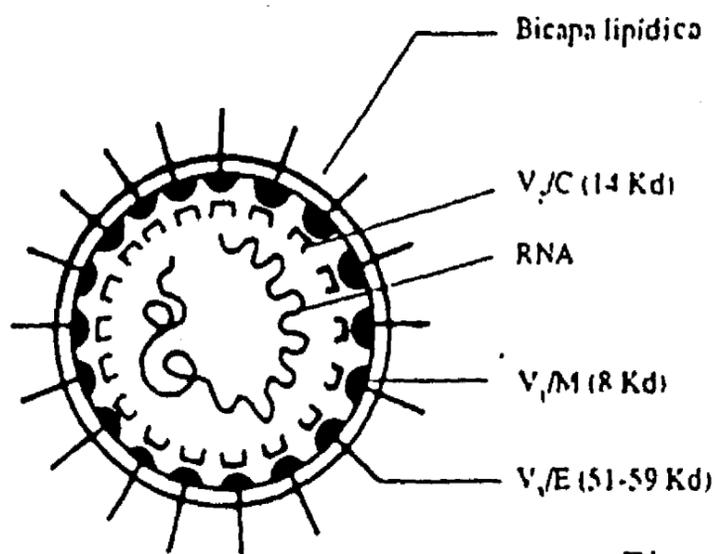


Fig. 6

básico este relacionado con la neutralización parcial de cargas del RNA. Esta proteína contiene una región muy conservada rica en aminoácidos a polares (38-59) que ha sido asociada con interacciones proteína-proteína ó RNA-proteína. En el extremo carboxilo terminal la proteína C presenta una región hidrofóbica de aproximadamente 14 aminoácidos, que ha sido asociada con la secuencia señal para la translocación del precursor de la proteína de membrana, al retículo endoplasmático (28) (Fig. 28a).

El precursor de la proteína de membrana es un péptido glicosilado de 11,400 daltones que se ha encontrado principalmente en células infectadas y ocasionalmente en el virión maduro (29). Se ha observado que en los virus donde se encuentra la proteína prM, la capacidad infectiva esta disminuida lo cual ha sido relacionado con alteraciones en la desnudación viral, durante la penetración celular (30).

El procesamiento enzimático de prM da lugar a la proteína de membrana o M (30) que es un péptido no glicosilado de 8 000 daltones. La localización de la misma en el virión no es clara pero se postula que es una proteína integral de membrana que interactúa específicamente tanto con la proteína de envoltura como con el complejo RNA-C (ó nucleocápside) durante el ensamblaje del virus (22). Rodeando la nucleocápside viral se encuentra una bicapa de lípidos con los que interactúa una glicoproteína transmembranal con un peso molecular

de 60,000 daltones también denominada E, V3 o Gp60. En esta proteína residen las principales actividades biológicas del virus como son: neutralización, hemaglutinación, unión a receptores celulares, fijación del complemento, neurotropismo, facilitación de la infección, y otras (31). Trent y col. (32) demostraron que la gp60 tiene una estructura antigénica compleja en la que se han identificado determinantes antigénicos de grupo (Flavivirus) de subgrupo (dengue) o complejo, de tipo (dengue 1-2 - 3-4) y subtipo (dengue-2 Jamaica, Puerto Rico, etc.). Heinz y col. (33) localizaron topográficamente 19 epitopes en cuatro dominios utilizando tanto ensayos de competencia con anticuerpos monoclonales como de actividad biológica y especificidad serológica (34). Con objeto de conocer el arreglo de estos epitopes en la superficie del virión, recientemente se ha establecido un modelo estructural para la proteína E del Flavivirus TBE, ("tick borne encephalitis virus") en el que se propone el posible plegamiento de esta glicoproteína, y la localización de estos epitopes en 3 dominios globulares. Asimismo se ha propuesto la existencia de motivos estructurales relacionados tanto con la neurovirulencia de las cepas virales, como con otras funciones biológicas importantes mediadas por esta proteína (35). Hasta la fecha existen pocos trabajos referentes a la caracterización estructural y funcional de las proteínas virales no estructurales, sin embargo, mencionaremos algunas de sus propiedades en la replicación viral.

CICLO LITICO Y REPLICACION DEL VIRUS DEL DENGUE. La adsorción de los viriones a las células permisivas del sistema retículo endotelial se lleva a cabo por la interacción de la glicoproteína de capa externa con receptores para los componentes del sistema inmune, como los Fc de inmunoglobulinas ó componentes del complemento, que funcionan como receptores virales accesorios y cuya especificidad de unión esta mediada por la naturaleza del virus infectante, la especificidad de los anticuerpos antivirales y por las condiciones bajo las cuales las células, el virus y los anticuerpos interaccionan juntos (36 ). Una vez que se ha unido el virión ó el complejo virus-anticuerpo al receptor, se lleva a cabo la penetración y el desnudamiento del RNA, eventos que parecen ser simultáneos y dependientes de pH, mediante la fusión de la membrana viral con la membrana celular después de cambios conformacionales en la proteína E, al parecer inducidos por un pH bajo (37). El desnudamiento viral ocurre en pocos minutos seguido por un periodo de latencia de 12 a 16 horas durante el cual se lleva a cabo la síntesis de RNA y de las proteínas virales (37), sin que exista bloqueo aparente de la biosíntesis macromolecular de la célula huésped. El RNA es sintetizado asimétricamente en forma semiconservativa, implicando la producción inicial de moléculas de RNA de polaridad negativa, las que a su vez sirven de molde para la síntesis de múltiples cadenas de polaridad positiva, formando un complejo replicativo intermedio de doble cadena.

Aunque no existen datos previos de las enzimas involucradas en este proceso, las proteínas virales NS4 y NS5 han sido asociadas con actividad de polimerasas dependientes de RNA (38). La traducción del mRNA (+) se inicia en el nucleótido 97 y termina en el 10,720 aproximadamente, produciendo una poliproteína que se procesa co-postranscripcionalmente en por lo menos 10 proteínas virales maduras. La poliproteína viral nunca se obtiene completa, ya que se procesa durante el estadio de polipéptido naciente, por lo que puede dar lugar a proteínas precursoras y productos finales (39). El análisis de las secuencias de los Flavivirus y, los experimentos de expresión de proteínas in vitro han implicado el procesamiento de las proteínas prM, E, NS1 (antígeno soluble de fijación del complemento) y probablemente NS2A y NS4B por medio de signalasas de la célula huésped (38), las cuales cortan a nivel del extremo carboxilo terminal de la región hidrofóbica asociada con la secuencia señal para la translocación de estas proteínas. Por otro lado, recientemente dos grupos han propuesto a la proteína viral NS3 como proteasa que presenta actividad parecida a la tripsina, como responsable de los eventos de procesamiento en la generación del amino terminal de las proteínas NS2B, NS3, NS4A y NS5 y posiblemente en el extremo carboxilo terminal de la proteína de la capsida viral (39). La traducción de las proteínas virales esta asociada al retículo endoplásmico. La replicación del RNA se lleva a cabo en la región perinuclear y ha sido asociada con membranas celulares (38), y los procesos

de ensamblaje y maduración viral aún no han sido esclarecidos.

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente existe una controversia acerca de los planteamientos que intentan explicar el establecimiento de los casos hemorrágicos de la enfermedad y en donde se postula la variación antigénica versus la facilitación de la infección mediada por anticuerpos. Sin embargo existen casos de dengue hemorrágico en el curso de una infección primaria a los cuales hasta la fecha no se les ha encontrado una explicación. Cualquiera que sea el resultado de esta controversia, la situación en la que se encuentra México no es favorable. Si la secuencia es la importante, tenemos entonces millones de habitantes en muy alto riesgo, tanto por haber sufrido una infección inicial por serotipo 1 como por vivir en condiciones donde se ha demostrado que el dengue se transmite fácilmente. Si la variación del virus es importante, nos encontramos en una situación igualmente desfavorable pues basta con la introducción de un virus específico, como el que azotó a Cuba (17), para que suframos consecuencias graves.

Este trabajo pretende apoyar la hipótesis relacionada con la facilitación de la infección por medio de anticuerpo, en aquellos casos de dengue hemorrágico que se presentan en el curso de una infección primaria. En ausencia de estudios que

apoyen, a nivel de estructura, la variación de las cepas virales mientras circulan en la naturaleza, estos casos podrían ser explicados si se produjeran anticuerpos contra estructuras biológicamente importantes muy conservadas entre los diferentes Flavivirus. Estos anticuerpos al reconocer epítopes conservados podrían unirse con diferentes afinidades sin neutralizar la actividad viral. En las infecciones causadas por el virus del dengue los anticuerpos podrían funcionar como heterotípicos "facilitadores" y no neutralizantes. Por ejemplo, en el caso de la fiebre amarilla y el dengue, el vector trasmisor es el mismo y ambos virus coexisten en el área; si una persona es primoinfectada por fiebre amarilla, y luego primoinfectada con dengue, los anticuerpos preformados contra fiebre amarilla podrían reconocer epítopes de grupo y unirse a dengue sin neutralizar su actividad viral, pero predisponiendo al individuo a presentar dengue hemorrágico, mimetizando una infección secundaria.

En consecuencia se decidió analizar el grado de conservación de la estructura secundaria de la glicoproteína de capa externa de los Flavivirus secuenciados hasta la fecha, los cuales tienen una distribución geográfica diferente y pertenecen a grupos serológicos distintos, además de analizar y caracterizar a nivel primario, una cepa viral que causó problemas epidemiológicos en nuestro país.

El interés particular de trabajar y caracterizar una cepa aislada en México, es porque parece ser una variante antigénica de dengue-2 (comunicación personal, Dr. Duane Gubler, Center for Disease Control, Puerto Rico), ya que tanto por "fingerprint" de RNA como utilizando anticuerpos monoclonales tipo específicos, la cepa fué claramente identificada como dengue-2; sin embargo, anticuerpos de líquido ascítico hiperinmune dirigido contra la cepa prototipo de referencia para este serotipo (Nueva Guinea C) no neutralizaban o lo hacían débilmente.

## OBJETIVOS

1. Aislar, identificar y caracterizar una cepa viral colectada durante un brote epidémico en la República Mexicana (1983), a partir de un caso de dengue clásico.
2. Establecer un banco de DNA complementario (DNAC) al genoma de dengue-2 mexicano.
3. Aislar y caracterizar clonas que contengan secuencias de proteínas de membrana (M), nucleocápside (C) y envoltura (E) de este aislado viral.
4. Caracterizar las proteínas estructurales del dengue 2 mexicano a partir de la secuencia primaria.
5. Predicción de la estructura secundaria de estas proteínas utilizando principios fisicoquímicos, estadísticos y eurísticos.
6. Predicción y análisis de la estructura secundaria de la glicoproteína de capa externa de 11 diferentes Flavivirus los cuales pertenecen a grupos serológicos distintos y aislados en diferentes regiones geográficas.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

AISLAMIENTO Y PROPAGACION DEL VIRUS DEL DENGUE  
 EN CELULAS TRA-284

IDENTIFICACION DEL VIRUS POR INMUNOFLUORESCENCIA  
 Y POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

CLONACION Y TITULACION DEL VIRUS POR ENSAYO DE  
 PLACA LITICA EN CELULAS VERO

PURIFICACION DEL mRNA (+) POR COLUMNA DE  
 INMUNOADSORBENTE

SINTESIS DEL DNA COMPLEMENTARIO (DNac) AL mRNA(+)   
 DEL VIRUS SIGUIENDO LA TECNICA DE LOS PRIMEROS  
 AL AZAR "RANDOM PRIMER"

ESTABLECIMIENTO DEL BANCO DE DNac EN MC1061 UTILIZANDO  
 COMO VECTOR EL PLASMIDO PUC18

IDENTIFICACION DE CLONAS QUE CONTENGAN SECUENCIAS  
 HOMOLOGAS A LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS  
 PROTEINAS ESTRUCTURALES (C, PrM, M Y E)

SECUENCIACION DE NUCLEOTIDOS DE GENES QUE CODIFICAN  
 PARA ESTAS PROTEINAS

ANALISIS DE SECUENCIA NUCLEOTIDICA Y PREDICION DE  
 ESTRUCTURA SECUNDARIA UTILIZANDO LOS PROGRAMAS PUSTELL  
 PC/GENE, SEQANAL Y PREDICT-7 (ver diagrama 1)

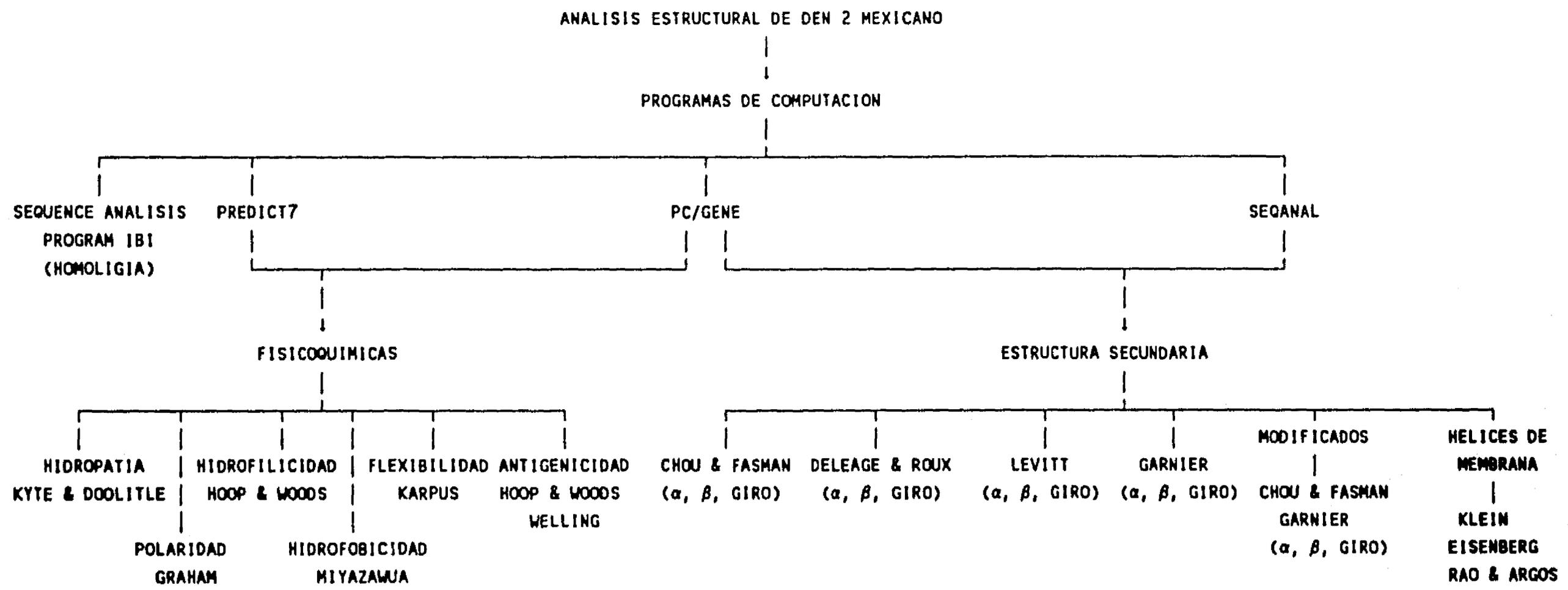


Diagrama 1

## MATERIAL Y METODOS.

### I. AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y CLONACION DE LA CEPA VIRAL

El virus se obtuvo a partir de mosquitos infectados obtenidos de los Laboratorios San Juan del CDC en San Juan de Puerto Rico. La cepa viral se aisló de un caso de dengue clásico durante un brote epidémico en el estado de Guerrero en 1983. La recuperación se hizo a partir de las cabezas de los moscos, las cuales se machacaron en un mortero estéril con solución salina de fosfatos (PBS, pH 7.2) más suero fetal bovino al 50%; la suspensión se clarificó a 2,000 g durante 30 min a 4°C, el sobrenadante se filtró con membrana Millipore y se guardó a -70°C como solución madre. El virus se propagó en la línea celular TRA-284, proveniente de la larva del mosquito Toxorhynchites amboinensis la cual se creció en ausencia de suero fetal de ternera (SFT) a 28°C, utilizando el medio de cultivo Leibovitz's-15 (L-15), enriquecido con caldo de triptosa fosfato (40). La detección del virus se llevó a cabo por inmunofluorescencia directa, y la identificación del serotipo por medio de inmunofluorescencia indirecta, de la manera siguiente:

Se infectaron células TRA-284 mantenidas en tubo de ensaye formando una monocapa con 10  $\mu$ l del concentrado viral, y se mantuvieron en cultivo a 28°C hasta observar efecto citopático. La monocapa desintegrada se desprendió y se centrifugó a 650 g por 10 min; el botón celular se resuspendió en 1 ml de

medio L-15 y se "goteo" en portaobjetos de teflón de 12 hoyos en donde se fijaron con acetona fría. Estas preparaciones se trataron con anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) dirigidos contra todos los serotipos del dengue y otros Flavivirus.

Los cultivos positivos se procesaron para la identificación del serotipo con anticuerpos monoclonales (Mab) específicos preparados en ratón y se revelaron con un anticuerpo de cabra anti-gamma globulina de ratón marcado con FITC; los Mab fueron proporcionados gentilmente por el CDC (Atlanta, GO,), preparados por Henchal y col. (41) y son los siguientes: Mab anti-dengue-1 (15F3), Mab anti-dengue-2 (3HS) Mab anti-dengue-3 (5D4) y Mab anti-dengue 4' (1H10).

La titulación y clonación de la población viral se llevó a cabo por ensayo de placa lítica (42) para lo cual se inocularon diferentes diluciones del virus ( $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ ,  $10^{-1}$  a  $-7$ ) en monocapas de células VERO y/o LLCMK2 provenientes de riñón de mono, las cuales se mantuvieron en cultivo a  $37^\circ\text{C}$  en medio 199 que contenía SFT al 10%. Los cultivos se cubrieron con una capa de agar suplementado con SFT, medio 199, DEAE-Dextran, vitaminas, aminoácidos no esenciales y antibióticos. Posteriormente se incubaron durante 7 días a  $37^\circ\text{C}$  y el octavo día se añadió una segunda capa de agar con solución de rojo neutro, para hacer visible y contar el número de unidades formadores de placas líticas

(UFP). Con las clonas virales más homogéneas que daban placas de mediano tamaño, se volvieron a infectar cultivos de células VERO en tres ocasiones consecutivas hasta obtener una población viral homogénea en la formación de placa lítica.

## II. AMPLIFICACION Y PURIFICACION DEL VIRUS

La cepa clonada en agar de la manera anteriormente descrita, se mantuvo durante 8 pases sucesivos en cultivo de células TRA-284 para aumentar su título y para su posterior amplificación. La purificación del virion se hizo de la manera siguiente (diagrama 2):

1. Se infectaron 15 cajas de cultivo F-150 de células TRA-284 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1, y a los sobrenadantes de cada uno de los cultivos se les midió diariamente el título viral por hemaglutinación directa para lo cual, en una placa de microtitulación se agregaron 50  $\mu$ l de solución de albúmina bovina al 0.4% en boratos salina (ABBS) por pozo y se hicieron diluciones seriadas al doble de los sobrenadantes; a todos los pozos se les agregó 50  $\mu$ l de eritrocitos de ganso (GRBC) a una dilución 1:24 en amortiguador de barbituratos (DGV) a pH 6.1, el que previamente mostró ser el pH óptimo. La placa se incubó 60 min a temperatura ambiente y se determinó la dilución máxima que es capaz de aglutinar GRBC. Los sobrenadantes se cosecharon cuando se observaba un título viral elevado, 80 a 90% de efecto citopático y

antes de que se presentara desprendimiento de la monocapa celular.

2. Las muestras colectadas se clarificaron de detritus celulares a 12,500 g durante 20 min a 4°C. El virus presente en la fase acuosa se concentró con polietilenglicol (PEG) al 7% (peso/volumen) por 18 h a 4°C y se precipitó a 12,500 g por 30 min a 4°C. El paquete viral se resuspendió en TNE (50 mM Tris, pH 8; 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA) y se centrifugó 6 h a través de un gradiente lineal preformado de CsCl (densidad: 1.19 a 1.24 g/cm<sup>3</sup>) en TNE a 400,000 g. La banda correspondiente al virus se colectó por punción lateral y posteriormente el CsCl se eliminó por dilución con TNE y centrifugación a 230,000 g por 60 min a 4°C. Este material se guardó a -70°C con 30% de SFT.

### III. EXTRACCION DEL mRNA VIRAL

La extracción del material genómico del virus del dengue se llevó a cabo por dos métodos diferentes. En el primero, los virus purificados por gradiente de CsCl se trataron con una solución lítica (proteínasa K 100 µg/ml, SDS al 0.1% y EDTA 0.01 M, pH 8) durante 60 min a temperatura ambiente; posteriormente el RNA se extrajo dos veces con fenol previamente equilibrado con Tris 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5 que contenía hidroxiquinoleína 0.1% y β-mercaptoetanol 0.2%; dos veces con una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico

en proporción 25:24:1 y dos veces con cloroformo-isoamílico (24:1); finalmente se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol frío y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M, pH 5 y se congeló en hielo seco 15 min. El RNA se conservó en etanol hasta su uso. La concentración del mismo se estimó por densidad óptica a 260 nm (1 D.O. = 42  $\mu$ g/ml) y por electroforesis en gel de agarosa. El gel se tiñó con bromuro de etidio (1  $\mu$ g/ml en agua) y se observó con luz ultravioleta de onda larga.

En el segundo método, el RNA se obtuvo por columna de inmunoadsorción a partir del concentrado viral, de la manera siguiente:

1. Una mezcla de suero humano con anticuerpos anti-dengue con títulos de 1:12,800 se absorbieron con una suspensión de proteína A-Sepharosa 4B al 10% durante 18 h a 4°C, por inversión lenta; el exceso de anticuerpos se retiró por centrifugación sucesiva y se midió eficiencia de pegado por inhibición de la hemaglutinación (42).
2. El virus se pegó al conjugado por inversión lenta durante 18 h a 4°C, posteriormente se lavó cinco veces con TNE a 4°C y se midió eficiencia de adsorción por hemaglutinación.
3. Con la suspensión anterior se montó una columna en una jeringa de 3 ml, la cual se eluyó con TNE que contenía SDS al 1%. Las fracciones se colectaron en tubos Eppendorf

que contenían un volumen igual de fenol. A partir de estas muestras se hizo la extracción con solventes orgánicos de igual manera que en el procedimiento anterior.

#### IV. ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE DNA COMPLEMENTARIO (DNAC) AL GENOMA DE DENGUE-2 GENOTIPO MEXICANO

Se clonó el genoma viral en un vehículo de expresión, siguiendo una estrategia general que se resume en cinco puntos:

- A. Síntesis de DNAC de doble cadena mediante la técnica de los primeros "al azar" (inserto).
- B. Preparación del vector de clonación (el plásmido PUC18).
- C. Preparación del DNA recombinante (inserto + vector).
- D. Transformación de las moléculas recombinantes en células permisibles (cepa MC1061 de Escherichia coli).
- E. Establecimiento del banco de genes.

#### IV. A. SINTESIS DEL DNAC

En una reacción que incluye diversos pasos enzimáticos, se llevó a cabo la síntesis del DNAC de doble cadena (dcDNAC) al genoma del virus del dengue genotipo 2 mexicano. Para la síntesis de la primera cadena se utilizaron 3  $\mu\text{g}$  de RNA monocatenario en un volumen de reacción de 25  $\mu\text{l}$  en so-

lución de Tris-HCl 100 mM pH 8, ditioneitol (DTT) 4mM, 30 U de inhibidor de ribonucleasas de placenta humana (HPRI), una mezcla 20 mM de cada uno de los 4 desoxiribonucleótidos trifosfatos (dATP, dGTP, dTTP y dCTP), 45 ng de hexanucleótidos sintetizados al azar (Amersham) como iniciadores, 10  $\mu$ Ci de [ $^{32}$ P]-dATP (3,000 Ci/mM) y 40 U de transcriptasa reversa del virus que ocasiona la mieloblastosis aviaria (AMVRT). La reacción se incubó a 42°C durante 60 min, se pasó a hielo/agua (0°C) y se tomaron alicuotas de 1  $\mu$ l para determinar la cantidad de DNA de cadena sencilla (csDNAC) polimerizada. Con este propósito se fijaron estas muestras y las que se tomaron al tiempo 0 de reacción en filtros de papel Whatman (DEAE-81), los cuales se lavaron de marca no incorporada con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5M, seis veces durante 5 min, con agua dos veces 1 min y con etanol absoluto 2 veces 1 min. Posteriormente se estimó la radiactividad incorporada en cada una de las muestras utilizando tolueno-PPO como sistema de centelleo líquido.

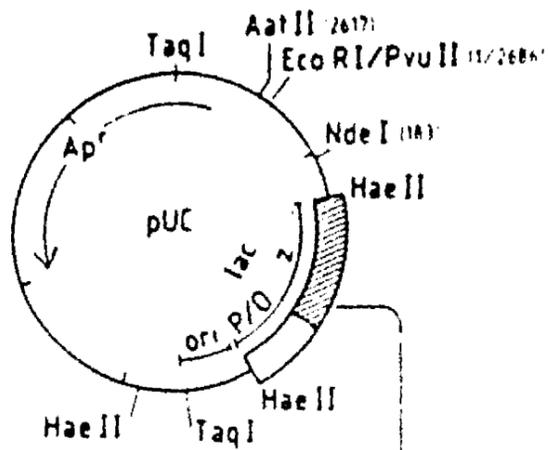
En la síntesis de la segunda cadena se utilizó como templado la molécula híbrida (mRNA + csDNAC) resultante de la reacción de síntesis de cadena sencilla y la enzima RNasa H (E. coli), para digerir parcialmente el RNA, el cual funcionó como iniciador y fué reemplazado eficientemente utilizando la enzima DNA polimerasa I (E. coli). Consecutivamente se incorporó a la reacción la enzima T4 DNA polimerasa, con actividad de exonucleosa 3'-5' con objeto de remover cualquier residuo

remanente 3' de la reacción de la primera cadena y de esta forma corregir posibles errores en la síntesis de la doble cadena. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 125  $\mu$ l en una solución que contenía: Tris-HCl 100 mM pH8, DTT 2mM, 2-mercaptoetanol 5mM, KCl 60mM, Hepes 35 mM, MgCl<sub>2</sub> 7 mM, una mezcla de dATP, dCTP, dGTP y dTTP 0.4 mM, csDNAC 60 ng/ $\mu$ l, RNasa H 2 U, DNA polimerasa I 57 U y [<sup>32</sup>P]-dATP 15  $\mu$ Ci (3000 Ci/mmol); la reacción se incubó consecutivamente a 12°C durante 60 min, 22°C por 60 min, 70°C 10 min y hielo/agua (0°C); finalmente se agregaron 5 U de T4 DNA polimerasa, se incubó 10 min a 37°C y se paró añadiendo 4  $\mu$ l de EDTA 0.25 M, pH 8.

Se estimó el rendimiento de síntesis de dcDNAC de igual forma que en la reacción anterior, tomando alícuotas de 1  $\mu$ l al inicio y término de la misma. El dcDNAC se extrajo con solventes orgánicos (fenol/cloroformo-isoamilico) de la manera ya descrita y se purificó mediante cromatografía en Sephadex G50. Posteriormente se midió la radiactividad de cada una de las fracciones y el material del pico radiactivo se precipitó con 5 volúmenes de etanol y 1 volumen de acetato de sodio 3M pH5, conservándose así hasta su uso.

#### IV.B. PREPARACION DEL VECTOR DE CLONACION

En la construcción del banco de DNAC de dengue 2 mexicano, se utilizó el plásmido PUC 18 como vector de clonación (Fig. 7),



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18  
 thr met ile thr asn ser pro asp pro ser thr cys arg ser thr asp pro gln asn ser leu ala  
 pUC 7 ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCC CCG GAT CCG TCG ACC TGC AGG TCG ACG GAT CCG GGG AAT TCA CTG GCC ---  
 EcoRI BamHI SalI PstI BamHI EcoRI HaeIII  
 SalI AccI HincII SalI AccI HincII

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18  
 thr met ile thr asn ser arg gly ser val asp leu gln pro ser leu ala leu ala  
 pUC 8 ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCC CCG GGA TCC GTC GAC CTG CAG CCA AGC TTG GCA CTG GCC ---  
 EcoRI BamHI PstI HindIII HaeIII  
 SmaI SalI  
 XmaI AccI HincII

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18  
 thr met ile thr pro ser leu ala ala gly arg arg ile pro gly asn ser leu ala  
 pUC 9 ATG ACC ATG ATT ACG GCA AGC TTG GCT GCA GGT CGA CCG ATC CCC GGG AAT TCA CTG GCC ---  
 HindIII PstI BamHI EcoRI HaeIII  
 SalI SmaI  
 AccI XmaI HincII

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28  
 thr met ile thr asn ser ser ser pro gly asp pro leu glu ser thr cys ser pro ser leu ala leu ala  
 pUC 12 ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCG ACG TCG CCC GGG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGC CCA AGC TTG GCA CTG GCC ---  
 EcoRI SstI BamHI XbaI SalI PstI HindIII HaeIII  
 XmaI SmaI AccI HincII

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28  
 thr met ile thr pro ser leu gly cys arg ser thr leu glu asp pro arg ala ser ser asn ser leu ala  
 pUC 13 ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG GGC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CCG GCG AGC TCG AAT TCA CTG GCC ---  
 HindIII PstI SalI XbaI BamHI SstI EcoRI HaeIII  
 AccI XmaI SmaI HincII

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28  
 thr met ile thr asn ser ser ser val pro gly asn pro leu glu ser thr cys arg his ala lys leu ala leu ala  
 pUC 18 ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCG AGC TCG GTA CCC GGG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGG CAT GCA AGC TTG GCA CTG GCC ---  
 EcoRI SacI KpnI BamHI XbaI SalI PstI SphI HindIII  
 SmaI AccI  
 XmaI HincII

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28  
 thr met ile thr pro ser leu his ala cys arg ser thr leu glu asp pro arg val pro ser ser asn ser leu  
 pUC 19 ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CCG GTA CCG AGC TCG AAT TCA CTG ---  
 HindIII SphI PstI SalI XbaI BamHI KpnI SacI EcoRI  
 AccI SmaI  
 HincII XmaI

el cual es derivado del plásmido PBR 322 (fragmento Pvu II-EcoRI), que tiene un tamaño de 2.69 kb, cuenta con un origen de replicación y en la posición 2352 presenta un fragmento de 433 pares de bases que contiene elementos reguladores del operon Lac [promotor (P) y operador (O)] junto al cual se encuentra el gen que codifica para 59 aminoácidos de la porción amino terminal de la  $\beta$ -galactosidasa (Lac Z). Dentro de éste se encuentra insertada la región del enlazador múltiple ("polylinker") con 10 sitios únicos de reconocimiento para las siguientes endonucleasas de restricción: EcoRI, SacI, KpnI, SmaI/XmaI, BamH, XbaI, SalI/AccI/HincII, PstI, SphI y HindIII. El sitio de PstI presente en el gen de la  $\beta$ -lactamasa ( $\text{amp}^r$ ) en PBR 322, no se encuentra en PUC 18.

La purificación y amplificación del plásmido se llevó a cabo a partir de cultivo bacteriano Fig. 8; como cepa receptora se utilizó a E. coli MC1061 [hsdR2, hsdM<sup>+</sup> hsdS<sup>+</sup> araD139 (ara-leu) 7697 (Lac)x 74, gal E15, galk 16, rpsH (Str<sup>r</sup> mcra mcB1)], la cual se hizo competente para su transformación de la siguiente manera: un volumen de medio Luria (LB: triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%) se inoculó con 1/10 de volumen de cultivo bacteriano crecido hasta su fase estacionaria. El cultivo se mantuvo a 37°C con agitación media hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.5 a 550 nm; una vez que el cultivo alcanzó la densidad adecuada se centrifugó y con el objeto de permeabilizar su membrana se resuspendió en la mitad del volumen original con una solución

de  $\text{CaCl}_2$  100 mM . Las células se incubaron 15 min a  $4^\circ\text{C}$  y se recuperaron por centrifugación a 3000 g durante 5 min; posteriormente se resuspendieron en 1/15 del volumen original. A 200  $\mu\text{l}$  de células competentes se les añadieron de 100 a 200 ng de DNA a transformar, y se incubaron 30 min a  $4^\circ\text{C}$ ; a continuación se dió un choque térmico a  $42^\circ\text{C}$  por 2 min y se colocaron en hielo/agua a  $0^\circ\text{C}$  1 min; finalmente se restableció el cultivo con 0.8 ml de LB a  $37^\circ\text{C}$  durante 45 min. Las células transformantes se seleccionaron en cajas Petri con medio LB que contiene 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina (LA); a partir de estas muestras se estimó el índice de transformación.

#### IV.C PREPARACION DEL DNA RECOMBINANTE

En la obtención de plasmidos recombinantes se utilizaron dos estrategias (Fig. 8 y 9). Para la primera se generaron extremos cohesivos tanto en PUC 18 como en de DNAC, y en la segunda se obtuvieron extremos rasos en ambas moléculas, con objeto de determinar con cual de estas se observaba el mayor índice de transformación.

Inserto. En ambos casos se alinearon las moléculas de dcdNAC, polimerizando los extremos 5' ó 3' protruyentes, con ayuda del fragmento mayor de la DNA polimerasa I (Klenow, 12 U) en presencia de Tris-HCl 100 mM, pH 7.5  $\text{MgCl}_2$  40 mM, DTT 1.5 mM, dCTP, dGTP, dTTP, y dATP a 35 mM cada uno; la reacción se incubó 60 min a temperatura ambiente, posteriormente el

dcDNAC se extrajo con solventes orgánicos de la forma ya descrita y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol y 1/10 de volumen de NaCl 2M. Una vez generados los extremos rasos en

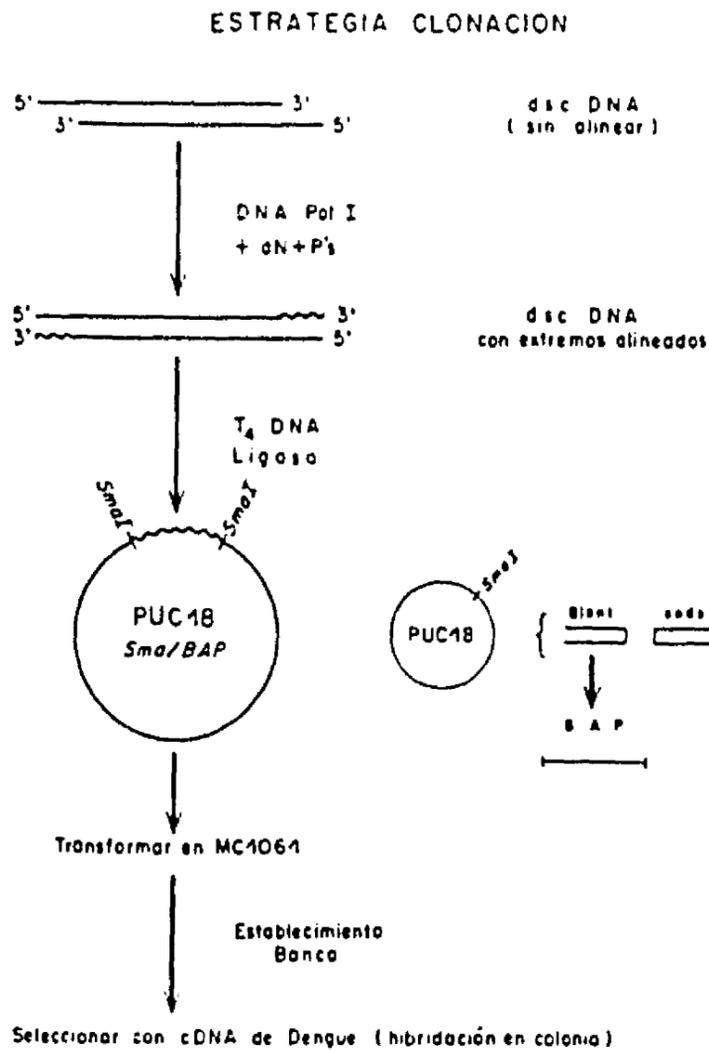


Fig. 8

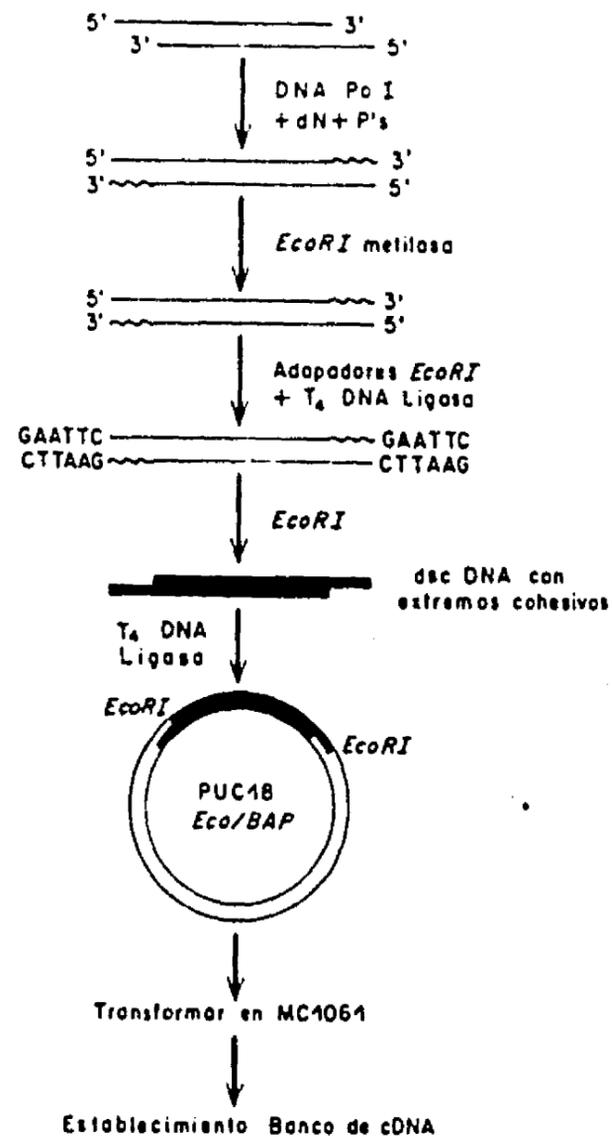


Fig. 9

toda la muestra de DNA (120 ng), se tomó la mitad de la misma y se protegieron los sitios internos EcoRI con ayuda de la enzima EcoRI metilasa (20 U) en presencia de una solución de NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 y de 2-mercaptoetanol 1 mM. La reacción se incubó a 37°C por 60 min y posteriormente la enzima se inactivó a 70°C durante 10 min. Al DNA metilado y con extremos rasos se ligaron adaptadores para EcoRI [5'd(pGGAATTCC)5'] usando T4 DNA ligasa (5 U) en presencia de un amortiguador de Tris-HCl 50 mM, pH 7.8

que contenía DTT 15mM, MgCl<sub>2</sub> 8mM, y ATP 2mM. La reacción se incubó a 15°C por 16 h y la enzima se inactivó a 70°C por 10 min. Posteriormente se generaron extremos cohesivos y complementarios en el DNAC mediante digestión con 60 U de la enzima EcoRI en una solución de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 durante 5 h a 37°C y 10 min a 70°C. El exceso de moléculas oligoméricas se limpio mediante cromatografía de exclusión en BioGel A5M. La muestra se precipitó con 4 volúmenes de etanol y 1 volumen de NaCl 2M.

Vector. Se digirieron 10 µg del PUC 18 con 50 U de la enzima SmaI a 25°C por 4 h y 10 µg de este plásmido con 50 µg de EcoRI durante 4 h a 37°C; para evitar la recircularización del vector linearizado se utilizaron 150 U de la enzima fosfatasa alcalina bacteriana (BAP de BRL) en Tris-HCl 100 mM, pH 8 a 37° por 30 min y 60°C durante una hora. Para limpiar el PUC 18 de BAP se extrajo dos veces con fenol, una vez con cloroformo y se precipitó con etanol y acetato de sodio 3M, pH 8. El plásmido digerido se separó del no digerido mediante electroelución, de la siguiente manera: a partir del gel de agarosa (0.8%) se cortó la banda del plásmido linearizado y se colocó en una bolsa de diálisis (previamente hervida 10 min con bicarbonato de sodio al 2% y 1 mM de EDTA, lavada con agua destilada y hervida en agua megapura) que contenía 200 µl de solución de Tris ácido bórico-EDTA (TBE) diluido 10 veces la cual se cerró en sus extremos, se colocó en una cámara horizontal de electroforesis para eluirla a 150

volts durante 30 min; transcurrido este tiempo para despegar el DNA de la membrana de diálisis se cambio el sentido de la polaridad, durante 40 segundos y se paró la corrida. La muestra se recuperó del amortiguador por precipitación con etanol y acetato de sodio 3M pH 5.

Reacción de Ligasa. Tanto en las muestras con extremos rasos como con extremos cohesivos se utilizaron 60 ng de inserto y 720 ng de vector digerido y desfosforilado en la reacción de ligasa, se incubó a 14°C por 16 h en presencia de una solución Tris-HCl 50 mM pH 7.8 que contenía ATP 2 mM, DTT 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, y 6 U de la enzima T4 DNA ligasa.

#### IV. D. TRANSFORMACION DE E. coli MC1061 CON LOS PLASMIDOS RECOMBINANTES Y ESTABLECIMIENTO DE LA GENOTECA

La cepa de E. coli MC1061 se hizo competente para su transformación con los plásmidos recombinantes de acuerdo al procedimiento que se describe en la sección IV.B. Las células transformantes se seleccionaron en cajas Petri conteniendo medio LA, ya que el PUC 18 porta el gen que codifica para la resistencia a la ampicilina. Cada una de las clonas que crecieron en forma aislada se picaron en viales con LA y se sellaron con parafina. Con las clonas que no estaban aisladas se hizo una preparación general de plásmido para su almacenaje y uso posterior.

#### V. IDENTIFICACION DE CLONAS POSITIVAS

Las clonas que contenían secuencias homólogas a las proteínas de nucleocápside (C), membrana (M) y de la glicoproteína de envoltura (E) se identificaron por hibridación homóloga a partir del banco de DNAc de dengue 2 mexicano, utilizando inicialmente como sondas dos clonas de DNAc de la región estructural (C38) y no estructural (C5) de dengue 2S1 (cepa vacunal serotipo-2), ambas están clonadas en el sitio para EcoRI del plásmido pGEMI; C38 contiene los nucleótidos 16 al 2103 que cubre la información para las proteínas C, prM, M y parte de la proteína E. La clona 5 contiene los nucleótidos 4635 a 7947 que corresponden a proteínas no estructurales

NS3, NS4a, NS4b y el extremo amino de NS5, donadas gentilmente por el Dr. Young S. Hahn del Tecnológico de California, Pasadena, CA.

El escrutinio inicial del banco se hizo por hibridación en colonia al 70% de homología, bajo el siguiente protocolo: Se sembraron 1,200 colonias tomadas al azar sobre filtros de nitrocelulosa contenidos en medio LA sólido hasta que el desarrollo de la misma fué de aproximadamente 2 mm de extensión (12 h) a 37°C. Posteriormente se lisaron las bacterias con NaOH 0.5M y NaCl 1.5M durante 5 min; los filtros se neutralizaron con Tris HCl 0.5 M y NaCl 1.5M dos veces durante 5 minutos y se fijó el DNA a 80°C con vacío durante 2 h. Los restos celulares se eliminaron por lavado sucesivo, 3 veces con NaCl 0.36 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 2mM pH 7.2 (SSPE) durante 5 minutos.

Los filtros se prehibridizaron a 42°C durante 3 h en 8 ml de mezcla de hibridación [amortiguador de citratos 9 mM, pH 7.4, que contenía 0.9 M NaCl, 0.1% SDS, 100 µg/ml de DNA de espermatozoos de salmón desnaturalizado en solución Denhardt's (0.1% ficoll, 0.1% BSA, 0.1% PVP)]; transcurrido este tiempo se hizo un pequeño corte en la esquina superior de la bolsa y con ayuda de una pipeta Pasteur se retiró esta solución y se agregaron 4 ml de la misma mezcla que contenía 200 ng de la sonda previamente desnaturalizada por ebullición durante 10 min y marcada radiactivamente por el método conocido como "nick-translation" (43), con ayuda de las enzimas DNAsa I y

DNA polimerasa I en presencia de Tris NaCl 50mM, que contenía MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1mM, gelatina 0.1 mg/ml, dCTP, dGTP, dTTP 20 μM cada uno y 15 μCi de [<sup>32</sup>P]-dATP 15 μCi (3000 Ci/mM). La reacción de marcado se hizo a 14°C durante 2 horas y se paró a 70°C durante 10 min. La marca libre se eliminó por cromatografía en Sephadex G-50. Una vez que se agregó la sonda radiactiva, los filtros se incubaron a 42°C durante un tiempo equivalente a 3 veces el Cot 1/2 [que determina el tiempo medio de renaturación del DNA = (1/X) (y/5) (Z/10) (2), donde X = concentración en μg sonda, y = complejidad en kb y Z = volumen de reacción en ml]. A continuación los filtros se lavaron una vez con SSPE (15 min cada una) y cuatro veces con SSPE diluido 10 veces (15 min cada vez), luego se envolvieron con papel plástico (Ega-Pack) y se expusieron a una película Kodak (X-Omat) durante toda la noche a -70°C; al día siguiente se revelaron los films. Algunas clonas que dieron señal positiva se utilizaron como sondas en una segunda e incluso una tercera hibridación en el banco de DNAC para identificar clonas de los extremos 5' y 3' de los genes analizados.

#### VI. PURIFICACION DE PLASMIDOS Y ANALISIS DEL TAMAÑO DE LOS INSERTOS

Los plásmidos se purificaron a partir de las clonas que dieron señal positiva para las proteínas estructurales y se digirieron con enzimas de restricción, con objeto de analizar el tamaño de los insertos por electroforesis en gel de agarosa.

La preparación de plásmido se hizo de la siguiente manera. Se sembró una asa de cada una de las colonias bacterianas en 5 ml de medio LA y se creció con agitación rápida a 37°C hasta su fase estacionaria; a continuación se inocularon 500 ml de medio LA con los 5 ml del cultivo anterior y se incubaron a 37°C hasta que se obtuvo una densidad óptica de 0.5 a 500 nm; en ese momento se agregó cloranfenicol (150 µg/ml) para favorecer el enriquecimiento de los plásmidos, dejándose en agitación durante 18 h a 37°C. Posteriormente las células se colectaron por centrifugación a 2,500 g durante 20 minutos, retirándose el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 30 ml de solución TES (50 mM Tris pH 7.5, 80 mM EDTA y 10% de sacarosa) más 10 mg/ml de lisozima, manteniéndose a temperatura ambiente durante 10 min. Para lisar las células se congelaron (con hielo seco y etanol) y descongelaron 3 veces y se centrifugaron a 120,000 g por 45 min. A continuación se hizo una precipitación diferencial a partir de los sobrenadantes con medio volumen de cloruro de litio al 20% y un volumen de isopropanol al 100%, los cuáles se congelaron a -70°C, y descongelaron dos veces y se centrifugaron a 15,000 g durante 10 min. El precipitado, se resuspendió en 500 µl de solución TE (10-1) (Tris HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM), con 30 µl de RNasa A 1 mg/ml previamente hervida a 37°C por 1 h y el material insoluble se precipitó por centrifugación a 17,000 g durante 5 min. Los plásmidos se recuperaron del sobrenadante por extracción con solventes

orgánicos (fenol/cloroformo) y se precipitaron con etanol y acetato de sodio 3M, pH 5. Con objeto de analizar el tamaño de los insertos, se hizo una doble digestión de los plásmidos (10  $\mu$ g) con Eco/Hind III para los que tenían insertos en el sitio para SmaI, y con EcoRI (10 U) para los que estaban clonados en el adaptador de EcoRI. Los insertos se separaron del vector por electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión (Sea-plaque al 2%), con voltaje constante (100 volts); en el gel se incluyó como marcador de peso molecular al fago

X 174 digerido con HaeIII. Al amortiguador de corrida (TBE1X) se le agregó bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/100 ml) y al finalizar la corrida las bandas se observaron con luz ultravioleta de onda larga y se cortaron con bisturí. La agarosa se pasó a un tubo Eppendorf con 10 volúmenes de agua megapura estéril por 2 h a 4°C para permitir que difunda el bromuro de etidio y el amortiguador de corrida; luego se retiró el líquido agregándose un volumen de TE (10-.1) y recuperando el DNA de los insertos por fusión de la agarosa a 60°C durante 10 min; a continuación el DNA se extrajo con fenol cloroformo. Para retirar los restos de bromuro de etidio de la muestra, antes de precipitarse se hizo una extracción con isopropanol saturado con TNE (NaCl 5M Tris 100 mM, EDTA 1 mM).

## VII. SECUENCIACION NUCLEOTIDICA

La secuenciación del DNA se llevó a cabo empleando el método de la cadena terminal inicialmente descrito por Sanger (44) y

modificado por Tabor y Richardson (45). Este método se basa en la síntesis in vitro de una cadena de DNA con DNA polimerasa del bacteriofago T7, la cual tiene alta procesividad y baja actividad de exonucleasa 3'-5', utilizando como templado DNA de cadena sencilla. Cuando se usa una mezcla apropiada de 5' desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), incluyendo uno marcado radiactivamente y uno de los cuatro didesoxinucleótidos (ddNTPs), la enzima cataliza la polimerización de la cadena hasta que un ddNTP análogo es incorporado. En reacciones individuales para cada 2'-3'ddNTP se complementa la información de la secuencia, y las cadenas marcadas de diferentes tamaños se resuelven por electroforesis en gel de acrilamida, revelándose por autorradiografía. La secuencia se obtiene por lectura directa del film.

#### A. Purificación del Templado

La purificación del csDNA puede ser sencilla si se prepara a partir de vectores filamentosos como es el caso del bacteriofago M13, por lo que en este caso los insertos a secuenciar se subclonaron en bacteriofago M13 mp18 en el sitio de SmaI. Con este propósito se alinearon los extremos protruyentes de la manera ya descrita en la sección IV.C y se ligaron con T4 DNA ligasa; los fagos recombinantes se transfectaron en la cepa JM 101 de E. coli [F' tra D36, ProA<sup>+</sup> proB, lacI<sup>q</sup>, Lac ZAM 151, Sup E thi (lac-proAB)] que se hizo competente con

CaCl<sub>2</sub> para su transfección (sección IVB).

Por cada 50-100 ng de DNA recombinante se agregaron 0.3 ml de células competentes y se incubaron 40 min en hielo-agua (0°); se dió un shock térmico a 42°C por 2 min y luego a 0°C, durante 5 min. A cada uno de los tubos se les agregó 20 µl de isopropil β-D tiogalactopiranosido (IPTG) 100 mM, 50 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D galactopiranosido (X-gal) al 2% en dimetil formamida (DMF), 200 µl de células JM101 en crecimiento exponencial y 3 ml agar líquido en medio mínimo esencial. La mezcla se homogenizó y se vertió en cajas Petri con agar sólido en medio mínimo. Se permitió que el gel solidificara y se incubaron a 37°C hasta observar el desarrollo de placas blancas de crecimiento lento (12-18 h). Estas placas se "picaron" con la punta de un palillo estéril, se sembraron en 3 ml de bacterias JM101 previamente diluidas 1:100 en medio fresco, y se incubaron a 37°C durante 6 h; estas se centrifugaron en tubos Eppendorf y se recuperó el sobrenadante guardándose a 4°C toda la noche. Al día siguiente se añadieron 220 µl de PEG al 20% en NaCl 2.5 M, se dejó 30 min a temperatura ambiente, se centrifugó en microfuga durante 15 min y se resuspendió en 100 µl de Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM. Finalmente el DNA se extrajo con solventes orgánicos (fenol-cloroformo) y se precipitó con etanol y NaCl 2M. El csDNA se resuspendió en agua megapura estéril y se observó en mini-gel de agarosa al 1%.

B. REACCIONES DE SECUENCIA: ALINEACION DEL "PRIMER" CON EL  
TEMPLADO, REACCION DE MARCAJE, ELONGACION DE LA CADENA Y  
Y TERMINACION DE LA SINTESIS

La alineación del iniciador de M13 con el templado se llevó a cabo en un solo tubo de reacción utilizando 0.5 pmoles de "primer" universal (5' GTAAAACGACGGCCAGT-3'), 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM NaCl y 2 µg de DNA en un volumen de 10 µl; la mezcla se incubó en el multibloque a 65°C por 2 min y se dejó que la temperatura descendiera lentamente hasta 35°C (no menos de 30 min). Cuando la temperatura es menor de 35°C y la alineación es completa, se procede a la reacción de marcado. A la reacción anterior (10 µl) se agregó una mezcla de 7.5 µM de dGTP, dCTP y dTTP, 19 µCi/µl [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-dATP (1000-1500 Ci/mmol), 0.1 M de DTT y 10 U de T7DNA polimerasa en un volumen de 15.5 µl; la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Para la terminación de la reacción, se transfirieron 3.5 µl de esta mezcla a 4 tubos Eppendorff marcados para cada nucleótido A, C, G y T; a cada uno de estos tubos se agregó la mezcla de terminación con cada uno de los análogos, de la manera siguiente:

Para G: 80 µM dGTP, 80 µM dATP, 80 µM dTTP, 80 µM  
ddGTP, 50 mM NaCl.

Para A: 80 µM dGTP, 80 µM dATP, 80 µM dCTP, 80 µM dTTP, 8 µM  
ddATP, 50 mM NaCl.

Para T: 80  $\mu$ M dGTP, 80  $\mu$ M dATP, 80  $\mu$ M dCTP, 80  $\mu$ M dTTP, 8  $\mu$ M ddTTP, 50 mM NaCl, y

Para C: 80  $\mu$ M dGTP, 80  $\mu$ M dATP, 80  $\mu$ M dCTP, 80  $\mu$ M dTTP, 80  $\mu$ M ddCTP, 50 mM NaCl.

Se incubó la reacción a 37°C durante 5 min y se agregaron 4  $\mu$ l de solución para detener la reacción compuesta de 95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% de azul de bromofenol y 0.05% de xilencianol. Los fragmentos del DNA obtenidos se separaron en un gel de acrilamida/bisacrilamida (19:1) al 6% con urea 7M de 80 cm de largo y 0.4 cm de espesor; el vidrio chico se trato previamente con  $\gamma$ -metacriloxi-propiltrimetoxilano al 2% en etanol y el vidrio grande se siliconizó con sigmacote.

El gel se precorrió una hora en amortiguador de TBE pH 8.3 a 1600 volts y 40-50 watts, hasta que el gel alcanzó una temperatura entre 50 y 55°C. Las muestras se desnaturalizaron a 80°C durante 2 min, inmediatamente antes de cargarlas en el gel. En cada corrida se permitió que el xilencianol presente en la muestra migrara 90 cm, o llegara al frente de la corrida; al término de la misma se fijaron en solución de ácido acético al 10% con metanol al 12% durante 1 h, posteriormente se hornearon a 80°C toda la noche y al día siguiente se sometieron a autorradiografía con película Kodak X-Omat a temperatura ambiente durante 18 h.

## VIII. AMPLIFICACION DEL DNAC POR REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Las secuencias que no estaban representadas en el banco de DNAC y de los genes en estudio, ya fuera en el extremo 5' ó 3' se sintetizaron directamente a partir de mRNA con oligonucleótidos sintéticos específicos de diferentes tamaños (no menos de 12 nt), utilizando transcriptasa reversa (AMVRT). La reacción se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito en la sección IV.A.

El DNAC sintetizado de esta manera se amplificó para su posterior utilización en la síntesis de templado en análisis de secuenciación, mediante el método de PCR, descrito originalmente por Mullis (46), el cual permite la amplificación in vitro de segmentos de DNA a través de una serie de reacciones a diferentes temperaturas, en las cuales primero hay una temperatura que permite la desnaturalización del DNA otra que favorece la alineación de los "primeros" y una adicional que ayuda a la polimerización de la cadena sintetizada; estos tres pasos consecutivos se refieren a un ciclo y la reacción esta basada en la repetición de estos ciclos amplificando el segmento de  $10^5$  a  $10^9$  veces. Se utilizó una DNA polimerasa de 94 KDa termoestable que posee una alta procesividad (taq DNA polimerasa). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100  $\mu$ l que contenía 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% de gelatina

(peso/vol) una mezcla de 200  $\mu$ M de cada uno de los dNTP's, 1 $\mu$ M el "primer" ó iniciador 5-3', 1 $\mu$ M del iniciador en sentido 3'-5', 1 ng de DNA templado y 2.5 U de taq DNA polimerasa. Si la muestra contiene proteasas, se calienta a 95°C durante 5 min y después se agrega la enzima; para evitar la evaporación de la muestra a cada uno de los tubos se les agregó de 50 a 100  $\mu$ l de aceite mineral. La programación del multibloque se hizo con el siguiente protocolo: el primer ciclo se llevó a cabo una sola vez a 94°C 2 min, 50°C 3 min y 72°C 2 min. El segundo ciclo se repitió 28 veces a 94°C 1 min, 50°C 2 min y 72°C durante 2 min. El último ciclo se hizo solamente una vez a 94°C 1 min, 50°C 5 min, 72°C 5 min y 4°C 8 horas. Al término de la amplificación las muestras se limpiaron del aceite mineral con cloroformo, y se analizaron tanto por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% como por Southern blot, de la siguiente manera: los geles se sumergieron en NaCl 1.5 M con NaOH 0.5M 60 min a temperatura ambiente para desnaturalizar el DNA, luego se neutralizaron en una solución de Tris-HCl 1M pH 8.0 y NaCl 1.5M durante 1 h a temperatura ambiente, con inversión lenta; a continuación el gel se saturó con una solución de SSPE 10X durante 30 min y se colocó sobre un papel filtro Whatman de 3 mm que hacía contacto con el amortiguador de transferencia (SSPE 15X); éste se cubrió con un filtro de nitrocelulosa previamente puesto en SSC 2X y otro papel Whatman; para favorecer el flujo se colocó encima una capa de 8 cm de papel absorbente (sanitas), un vidrio y un peso de aproximadamente 400 g, se

cubrió con plástico Kleen-pack y se dejó transferir 18 h a temperatura ambiente. Al día siguiente se recuperó la nitrocelulosa y se sumergió en SSC 6X 5 min a temperatura ambiente; posteriormente se retiró el exceso de SSC y se dejó secar en una hoja de papel filtro; ya seco el DNA se fijó por calor a 80°C con vacío durante 2 h y se guardó en papel Whatman hasta su uso.

La reacción de marcaje de los oligonucleótidos sintéticos específicos se llevó a cabo en un volumen de 100  $\mu$ l con 50mM de Tris HCl pH 7.6, 1 mM de espermidina, 0.1M  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA, 50 mM DTT, 300 ng de oligonucleótido, 20  $\mu$ Ci de 5'  $\gamma$   $^{32}P$ -ATP (3000 Ci/mmol) y 10 U de la enzima polinucleotido cinasa. La reacción se incubó a 37°C por 30 min y posteriormente se paró con 0.5M EDTA. Finalmente se hizo una extracción con fenol, otra con cloroformo y se precipitó con etanol y NaCl 0.5M. La hibridación se llevó a cabo bajo el procedimiento de la sección V utilizando como solución hibridizadora 2 X SSC, 0.2% SDS (w/v), 1mM EDTA, 50% de formamida y 2 X solución Denhardt's. Las muestras positivas se subclonaron en bacteriófago M13mp18, para el análisis de secuencia nucleotídica de la manera descrita en la sección VII.

#### IX. PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA

La predicción de estructura secundaria de las proteínas estructurales del virus del dengue se basó en los métodos de

Chou y Fasman (47), Garnier et al. (48), Gascuel y Goldmar (49), Deleage y Roux (50) y Levitt (51); para proteínas de membranas se usaron las modificaciones de Chou/Fasman y Garnier (52). En la predicción de hélices de membrana se utilizaron los programas de Rao y Argos (53), Klein (54) y Eisenberg (55).

La predicción conjunta se llevó a cabo analizando las regiones concenso para cada motivo estructural, complementando con los siguientes parámetros fisicoquímicos: hidrofiliidad de Hoop y Woods, (56) hidrofobicidad de Miyazawa (57), hidropatía de Kyte y Doolittle (58), flexibilidad de Karplus (59), antigenicidad de Hoop y Woods (56), y polaridad de Graham (60). En el cálculo y análisis de la estructura secundaria se utilizaron los programas Predict 7 de. Carmenes (61), Seqanal de Crofts (62) versión 1.03, Universidad de Illinois, U.S.A. y PC/Gene (83 Intelligenetics, Ver. 6.01.

En los métodos de Chou y Fasman (47), Deleage y Roux (50) y Levitt (51), se utilizó una ventana de 7 residuos de aminoácidos para calcular los valores de  $P_{\alpha}$  y  $P_{\beta}$  en la proteína de nucleocápside y la proteína precursora de membrana. En las proteínas de membrana y de envoltura se utilizó una ventana de 11 residuos de aminoácidos en los cálculos de  $P_{\alpha}$ ,  $P_{\beta}$  y  $P_t$ . Para los métodos modificados de Chou, Fasman y Garnier (47 y 62), así como en los programas de Rao y Argos, (53) Eisenberg y Klein (54 y 55) se utilizó una ventana de 19 aminoácidos. En todas las proteínas se usó inicialmente la constante de

decisión (CD) más simple y al observar los porcentajes de  $\alpha + \beta$  mayores del 50% se cambió la  $CD = 0$ ,  $CDB = 20$ ,  $n = 1$ . En el método de Gascuel y Goldmar (49) se utilizaron las siguientes constantes:

$$N[S]\alpha = 1.10; N[S]\beta = 1.545 \text{ y } N[S] \text{ coil } 0 \text{ } 1.00.$$

La predicción de la estructura para cada proteína se llevó a cabo tomando en cuenta los siguientes parámetros:

1. Predicción independiente por cada uno de los métodos.
2. Asignación de alfa hélices con requerimiento mínimo de 6 aminoácidos formadores de hélices alfa consecutivos, para  $\beta$  plegada 4 aminoácidos consecutivos con alta probabilidad de formar esta estructura y para giro  $\beta$  de 3 aminoácidos con las mismas características que los anteriores.
3. Cada residuo de  $\alpha$  hélice asignado por una conformación consenso fué corregido los parámetros estadísticos propuestos por Richardson (84) de la discrepancia en la longitud dada por los diferentes métodos, tomando en cuenta la preferencia de los aminoácidos por los extremos de la hélice, tomando en cuenta.
4. Corrección de las estructuras asignadas utilizando índices fisicoquímicos. Los índices de flexibilidad de cadena e hidropatía se tomaron como indicadores recíprocos complementarios de la posición de segmentos polipeptídicos con respecto al interior hidrofóbico de las

proteínas (85).

Los segmentos con alta hidropatía y baja flexibilidad fueron considerados como estructuras  $\beta$ -plegadas, mientras que los segmentos con baja hidropatía y alta flexibilidad fueron tomados como estructuras no definidas "al azar", denominadas estructura no repetida (ENR) (72).

5. Predicción de hélices anfipáticas tomando en cuenta un promedio de hidrofobicidad de 0 - .2, con un momento hidrofóbico de 0.3 - 0.4, usando un ángulo de 100 grados. Los datos positivos se correlacionaron con la probabilidad de superficie e hidrofiliidad.
6. En la localización externa de los segmentos se tomaron en cuenta los índices de hidrofiliidad (antigenicidad), probabilidad de superficie y polaridad, y en la localización interna los índices de hidropatía e hidrofobicidad.

## RESULTADOS

### I. OBTENCION DE LA CEPA VIRAL Y DEL mRNA(+)

El aislado viral se identificó como dengue serotipo-2 por medio de anticuerpos monoclonales tipo específicos; sin embargo, los anticuerpos provenientes de líquido ascítico de ratón dirigido contra la cepa prototipo de referencia para este serotipo (Nueva Guinea C), neutralizaron en muy bajo título. Una vez identificada la cepa viral, se llevó a cabo la titulación y la clonación de la misma. Se observó que se tenía una población con un título muy bajo ( $1.4 \times 10^3$  UFP/ml), de crecimiento lento, que presentaba un efecto citopático tardío, la cual, después de 12 días de infección presentaba una fluorescencia positiva en un 80% (Fig. 10),

#### IDENTIFICACION DEL VIRUS (Den 2M) POR INMUNOFUORESCENCIA EN CELULAS TRA-284

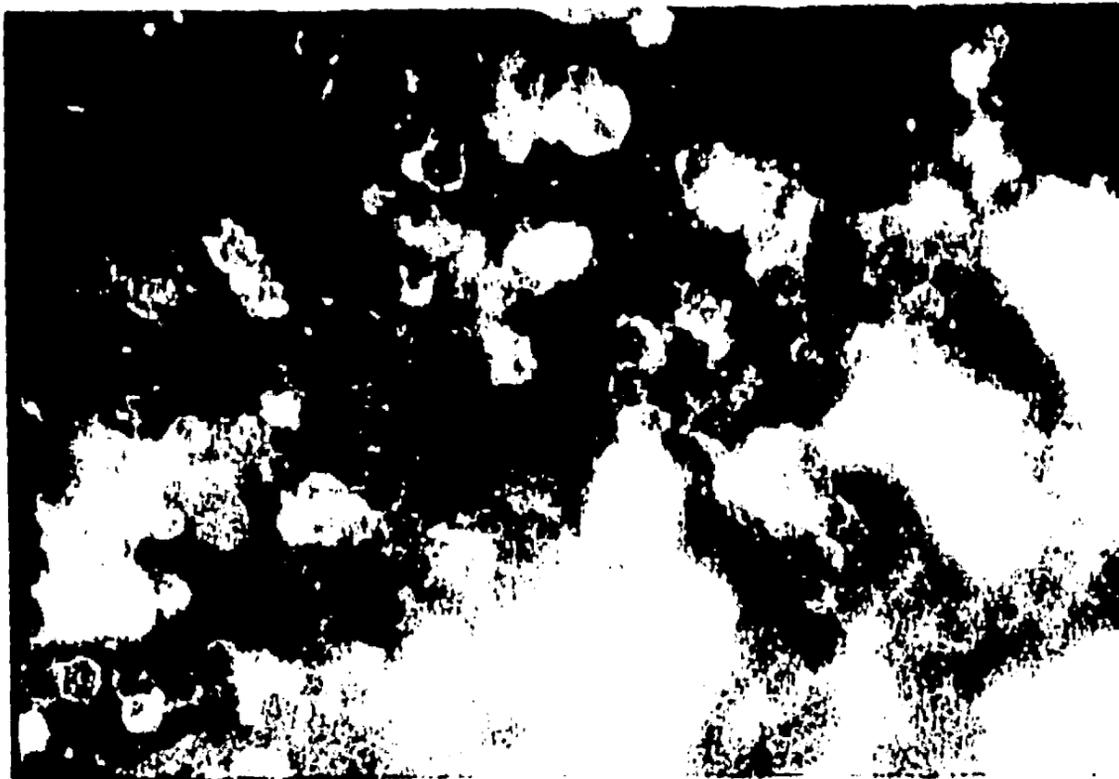
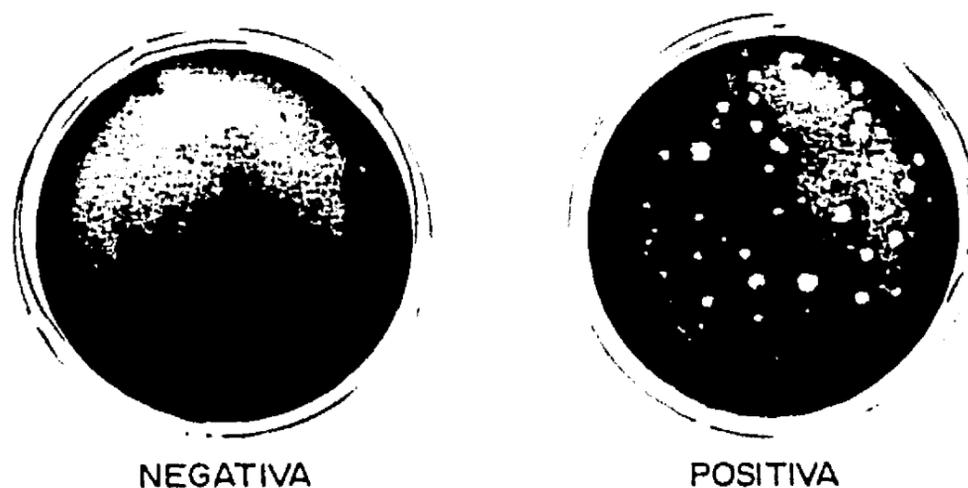


Fig. 10

con una formación de placa lítica muy heterogénea (Fig. 11). Por lo anterior, se escogieron las poblaciones virales que daban placas de mediano tamaño y se clonaron en agar de la manera ya descrita, hasta que se obtuvo una población homogénea. Esta se mantuvo durante 8 pases sucesivos en cultivos de células TRA-284, con lo que se logró aumentar el título a  $1 \times 10^8$  UFP/ml; el tiempo en el que se observó el efecto citopático se redujo a 6 días post infección, y una fluorescencia positiva en un 90% al octavo día de infección. Esta prepara-



CLONACION Y TITULACION DEL VIRUS POR  
ENSAYO DE PLACA LITICA EN CELULAS VERO.

Fig. 11

ción se observó por microscopía electrónica, lográndose identificar el virión en el citoplasma celular (Fig. 12).

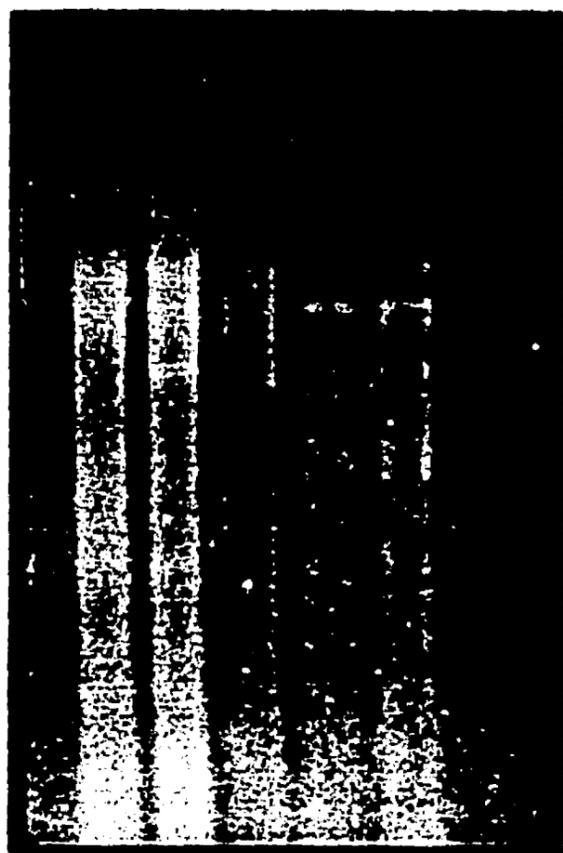
Posteriormente la cepa viral se propagó en células TRA-284 con el objeto de llevar a cabo la extracción del mRNA(+) a partir del sobrenadante de los cultivos infectados según los procedimientos descritos en la sección II. El rendimiento de



IDENTIFICACION DEL VIRUS DEL DENGUE A PARTIR DE CELULAS DE  
MOSCO (TRA-284) POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

mRNA(+) obtenido por ambos métodos fue bajo (1%), ya que no se logró tener una concentración adecuada de virus. Sin embargo, se obtuvo una muestra más pura de mRNA a partir de la columna de inmunoadsorción (Fig. 13). Al tratar esta

Purificación de RNA por columna de Inmunoadsorción



1 2 3 4 5  
Adsorbido No adsorbido

Fig. 13



1 2 3 4  
1 ADSORBIDO CON RNAsa  
2 NO ADSORBIDO CON RNAsa  
3 ADSORBIDO SIN RNAsa  
4 ADSORBIDO SIN RNAsa

Fig. 14

muestra con la enzima RNAsa A y analizarla mediante electroforesis en gel de agarosa, se apreció una degradación total de la misma, lo que nos sugirió que se trataba de RNA (Fig. 14). La concentración del mRNA estimada por densidad óptica a 260 nm fué 2.8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

## II. CONSTRUCCION DEL BANCO DE DNAC

SINTESIS DE dcDNAC. En la figura 15 se muestra la estrategia utilizada para la síntesis del DNAC del virus del dengue, genotipo 2 mexicano. Para la primera cadena se utilizaron 3  $\mu\text{g}$  de RNA. El rendimiento de la síntesis en esta reacción fué del 40% ya que se obtuvieron 1.2  $\mu\text{g}$  de csDNAC estimado por la incorporación de [ $^{32}\text{P}$ ]-dATP. Para la síntesis de la

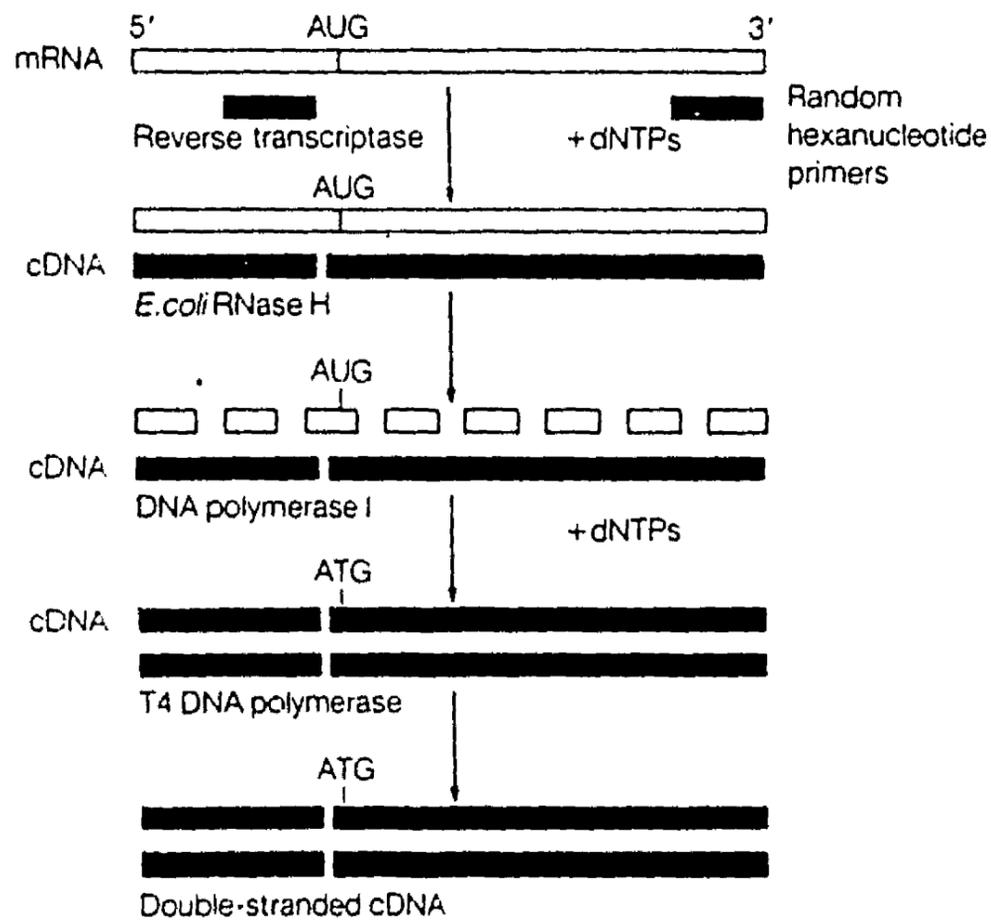


Fig. 15

segunda cadena, con el método aquí utilizado, no se necesitó hidrolizar el RNA del heteroduplex RNA-csDNAC, sino que se usó como templado esta molécula híbrida y la enzima RNAasa H con la cual se digirió parcialmente el RNA para que funcionara como iniciador. El RNA se reemplazó utilizando las enzimas DNA pol I, y T4 DNA polimerasa. Esta reacción se llevó a

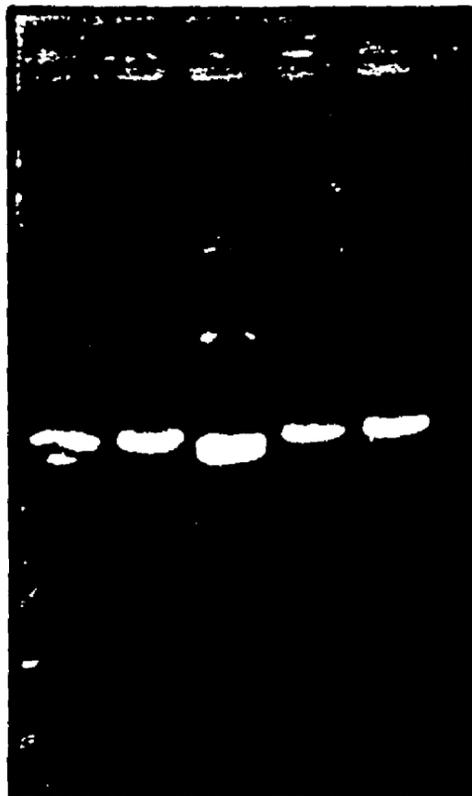
cabo con 600 ng de csDNAC igualmente determinados por incorporación de [<sup>32</sup>P]-dATP. De esta manera se obtuvo un DNA de doble cadena sin estructura de horquilla. Esta muestra se separó de los nucleótidos libres por cromatografía en Sephadex G-50, recuperando el 70.22% de la misma (625 ng).

METILACION Y ALINEAMIENTO DEL DNAC. Se modificó el DNAC con objeto de obtener moléculas tanto con extremos cohesivos como con extremos rasos. En ambos casos primero se alinearon 250 ng de la muestra total, polimerizando los extremos 5' o 3' protruyentes con la enzima Klenow; una vez generados los extremos rasos, se tomó la mitad de la muestra (aproximadamente 125 ng) y se protegieron los sitios internos EcoRI con la enzima EcoRI metilasa. Al DNA metilado se ligaron 500 ng de adaptadores para EcoRI con T4 DNA ligasa, y posteriormente, con objeto de tener moléculas susceptibles de ser ligadas con el vector de clonación (PUC18), se generaron extremos cohesivos y complementarios en el cDNA mediante digestión con EcoRI. El exceso de moléculas oligoméricas se eliminaron de la preparación utilizando cromatografía de exclusión molecular Bio Gel A5M. Se recuperó el 76% de la muestra (95 ng).

LIGADO DEL cDNA AL PLASMIDO VECTOR. Para ligar el inserto con el vector se utilizó un exceso de vector con respecto al DNAC, en una proporción molar aproximada de 3:1. Previamente se digirieron 10 µg de PUC18 con SmaI y 10 µg del plásmi-

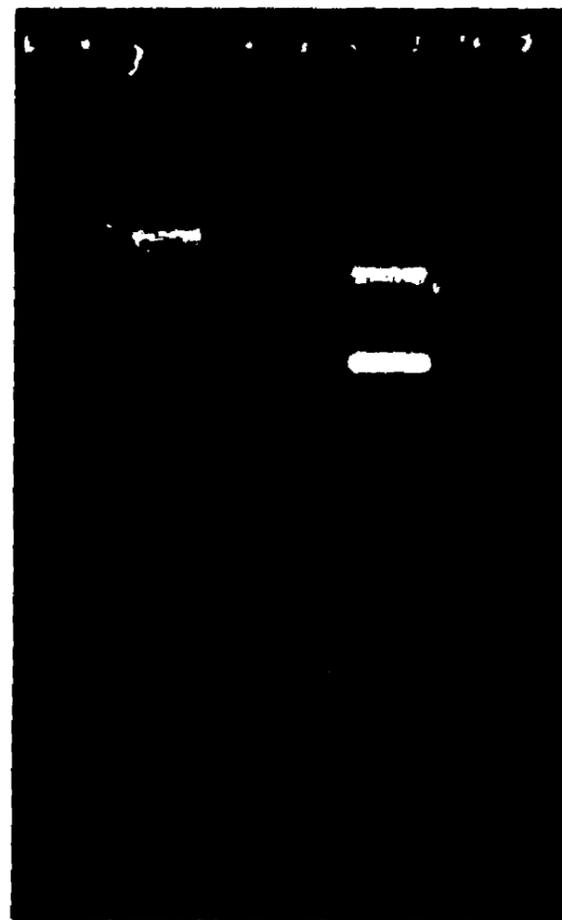
do con EcoRI y una vez linearizado tanto en extremos rasos (SmaI) como cohesivos (EcoRI) se desfosfataron con BAP para evitar su recircularización (Fig. 16 y 17). La muestra se limpió de BAP con solventes orgánicos recuperando aproximadamente 8.5  $\mu$ g de cada preparación. El plásmido digerido se separó del no digerido por electroelución en gel de agarosa, logrando recuperar el 70% de la muestra, o sea 5.95  $\mu$ g de PUC18.

Purificación del Vector



- 1 PUC/Sma I
- 2 PUC Eco RI
- 3 PUC 18
- 4 PUC/Sma I/BAP
- 5 PUC/Eco RI/BAP

Fig. 16



- 1 PUC + cDNA TOTAL
- 2 PUC 18

Fig. 17

TRANSFORMACION DE E. coli MC1061 CON LOS PLASMIDOS RECOMBINANTES. La cepa competente para su transformación con los plásmidos recombinantes se utilizó cuando tenía una eficien-

cia para transformar PUC18 super helicoidal (control) de aproximadamente  $\geq 1 \times 10^7$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de plásmido. Las bacterias transformantes se seleccionaron en presencia de ampicilina, obteniéndose un banco de DNAc del virus del dengue con aproximadamente 3,000 clonas. Cada una de las clonas que crecieron en forma aislada (aproximadamente 2,000) se guardaron en viales con LA y se sellaron con parafina. La mejor estrategia de clonación se obtuvo generando extremos rasos y clonando en el sitio para SmaI, ya que se observó un índice de transformación más elevado que aquel utilizando la clonación en EcoRI (Fig. 18).

BANCO DE DNAc DEL GENOMA DEL VIRUS DEL DENGUE 2 MEXICANO

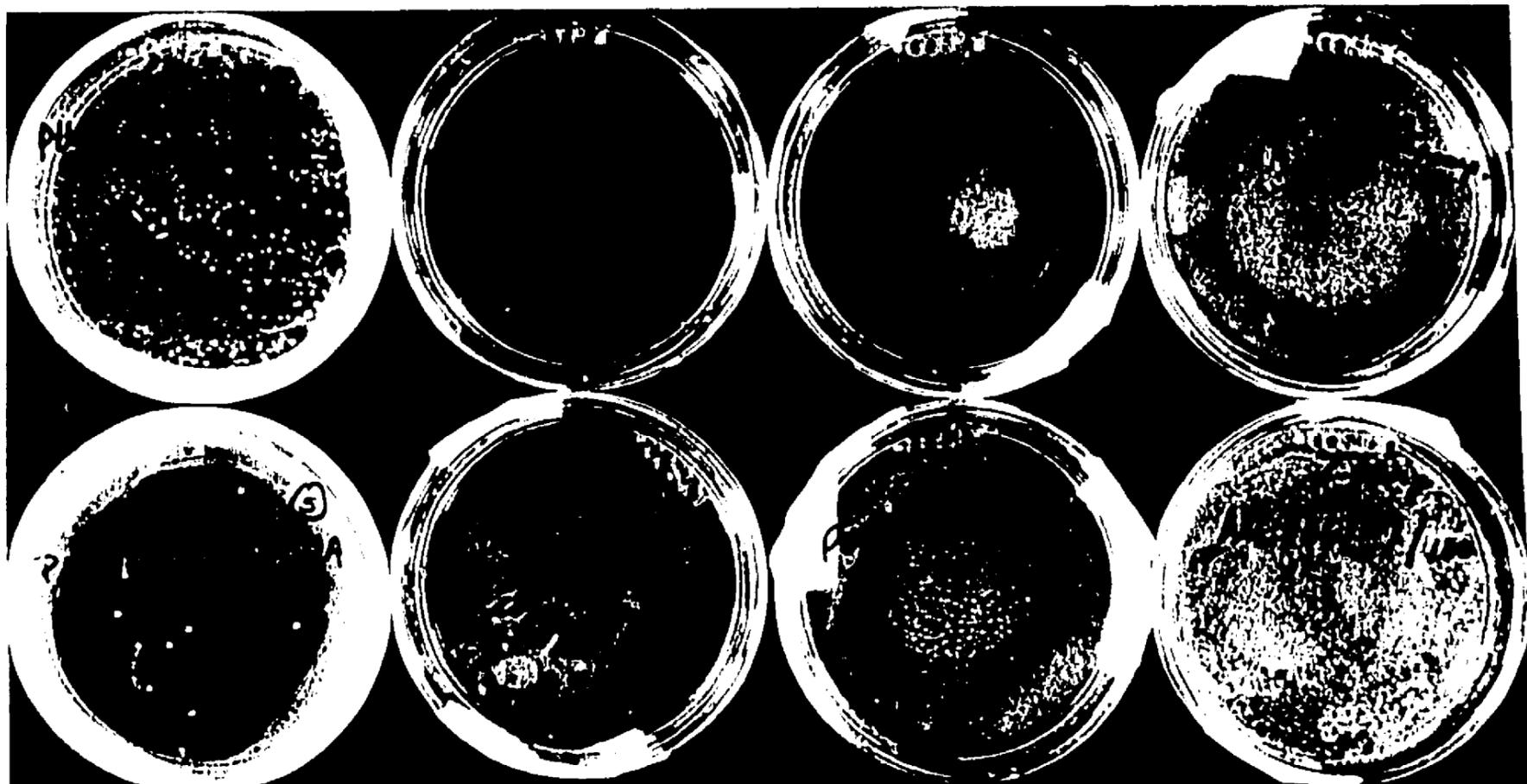


Fig. 18

TAMAÑO DEL BANCO DE DNAC. La probabilidad de obtener una secuencia de DNA específica representada en una biblioteca genómica puede calcularse por medio de la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\ln (1-P)}{\ln (1-f)}$$

en donde:

P = Probabilidad deseada

f = Proporción fraccional del genoma en una sola recombinante.

N = Número de recombinantes necesarios.

Considerando que el genoma del virus del dengue tiene un tamaño aproximado de 11 kb y que el tamaño promedio de los insertos en el banco de DNAC es de 500 pares de bases, tenemos que:

$$N = \frac{\ln (1 - 0.99)}{\ln \left( 1 - \frac{5 \times 10^2}{1.1 \times 10^4} \right)} = 99 \text{ recombinantes}$$

Es importante considerar que la probabilidad de clonar los extremos de los segmentos génicos es menor que la de clonar regiones centrales. Sin embargo, esperábamos que el banco estuviese bien representado, ya que evitamos el tratamiento del DNAC con nucleasa S1, la cual elimina el DNA de una sola cadena presente en ambos extremos del dcDNAC.

IDENTIFICACION DE CLONAS RECOMBINANTES. Uno de los objetivos de construir un banco de DNAC de dengue-2 mexicano, fue obtener clonas con regiones homólogas a las proteínas de nucleocapside, membrana y de capa externa viral. La primera búsqueda de recombinantes se hizo en 1200 colonias, utilizando sondas homólogas C38 y C5 (Fig. 19a y 19b) del virus del dengue S1 (cepa vacunal). En la sonda C38 se encuentran

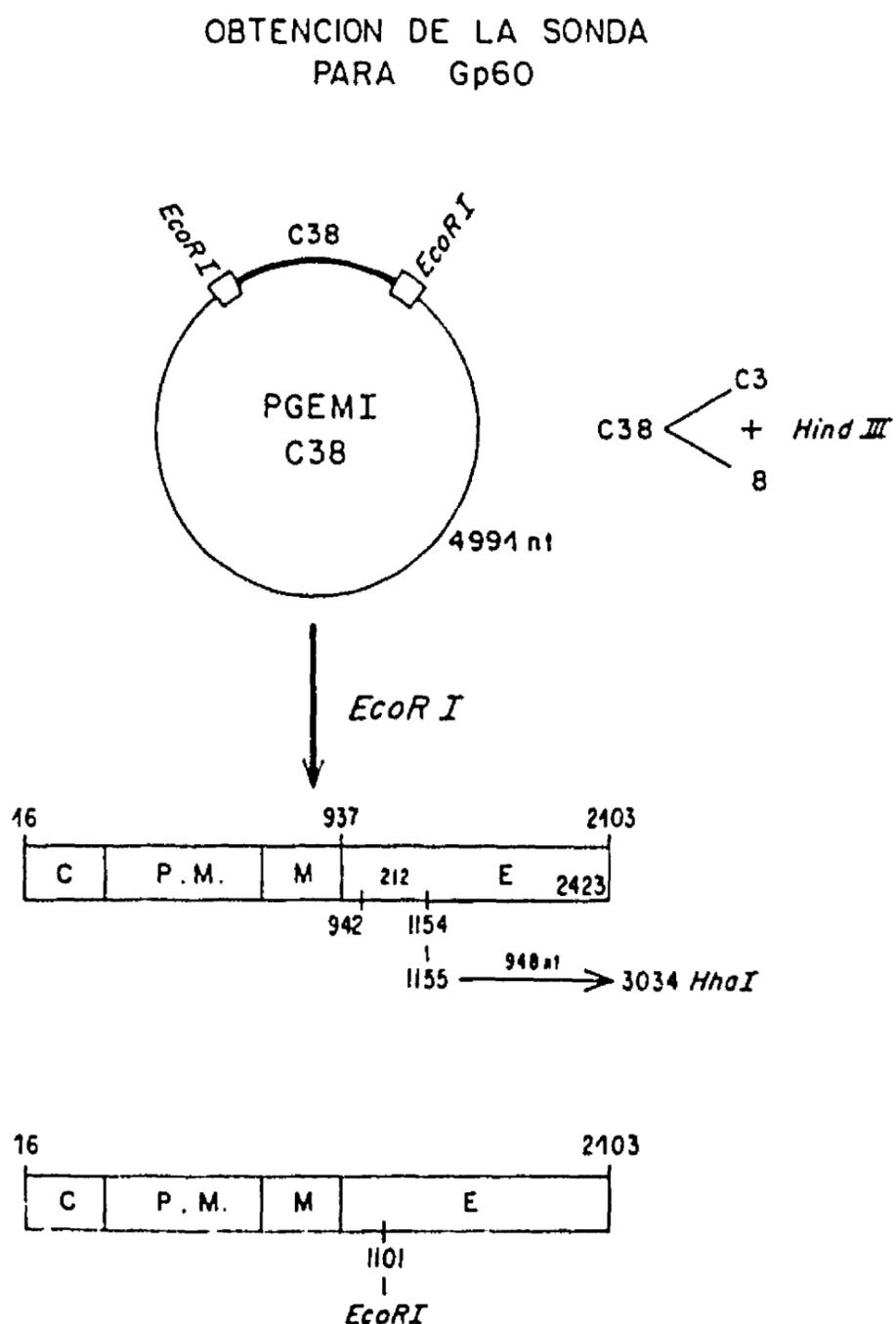
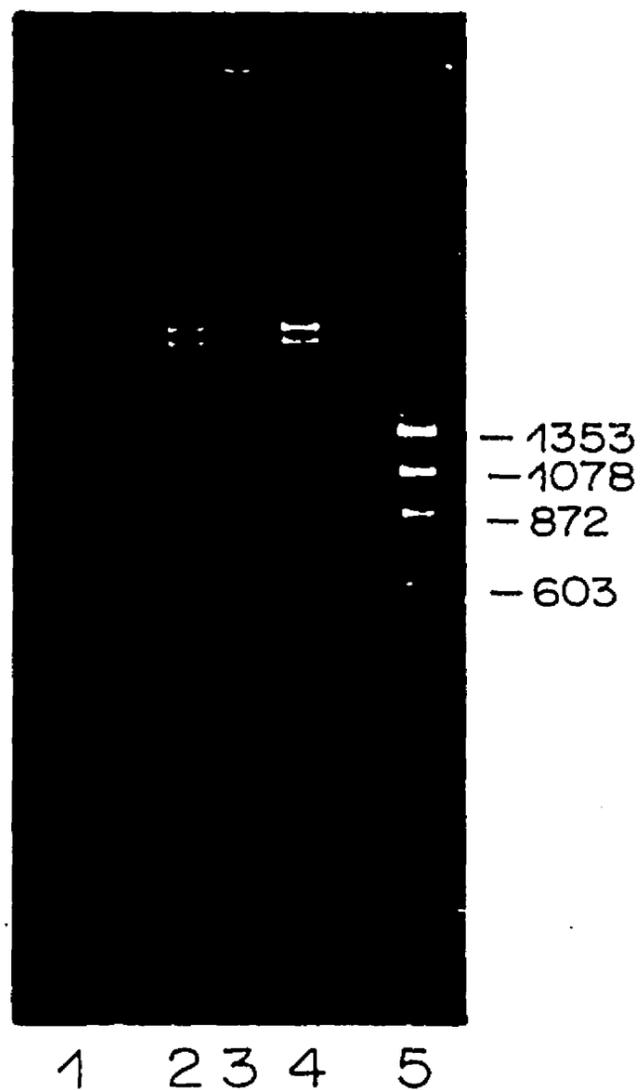


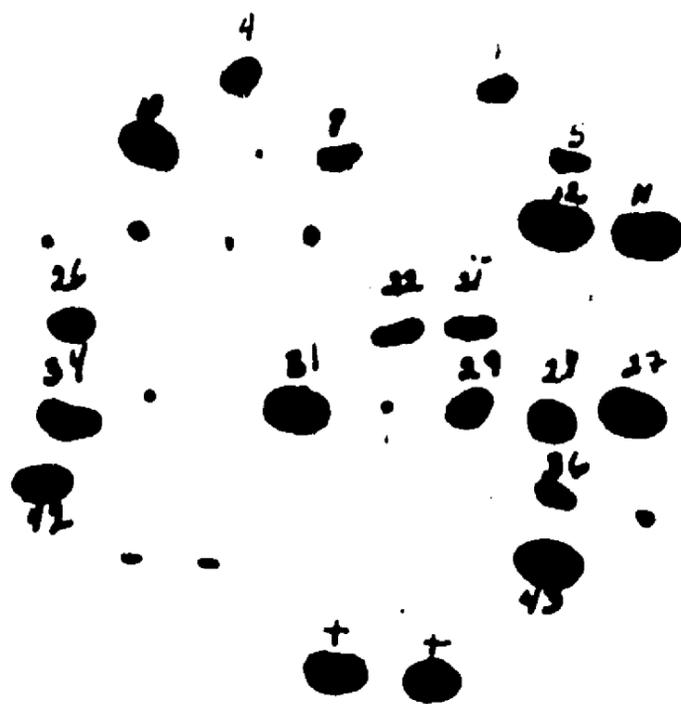
Fig. 19a.



1 PGEM1-C38  
2 CM  
3 E  
4 CM  
5  $\phi$ X/Hae III

Fig. 19b.

representados, casi en su totalidad, los genes que codifican las proteínas estructurales, y en C5 se halla representado casi el 60% de la información para proteínas no estructurales. La hibridación se efectuó en condiciones que permitieran un 70% de homología, o sea, un 30% de bases erróneas durante la reasociación de la doble cadena. Se lograron identificar 102 clonas positivas para proteínas estructurales, a las cuales se les hizo una segunda hibridación con la sonda para la región no estructural, descartando 57 clonas que presentaban una señal que no podía distinguirse del fondo. En esta forma con la sonda C38 se ratificaron 45 clonas (Fig. 20).



CLONAS POSITIVAS PARA PROTEINAS  
ESTRUCTURALES DEL VIRUS DEL DENGUE

Fig. 20

ANÁLISIS DE LAS CLONAS POSITIVAS. El tamaño de los insertos de DNAC contenido en las 45 clonas que dieron señal para proteínas estructurales se determinaron mediante electroforesis de los productos de digestión de sus plásmidos con las enzimas de restricción EcoRI/Hind III, lo que permitió proteger el sitio de SmaI; los resultados indican que el tamaño varía entre 300 y 1000 pares de bases (Fig. 21). Con el propósito de identificar clonas específicas para cada una de las proteínas virales, los geles se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se hibridaron con oligonucleótidos sintéticos específicos para cada proteína, marcados con 5'  $\gamma$ [ $^{32}$ P-ATP) y la enzima polinucleótidocinasa.

### Análisis del tamaño de los Insertos

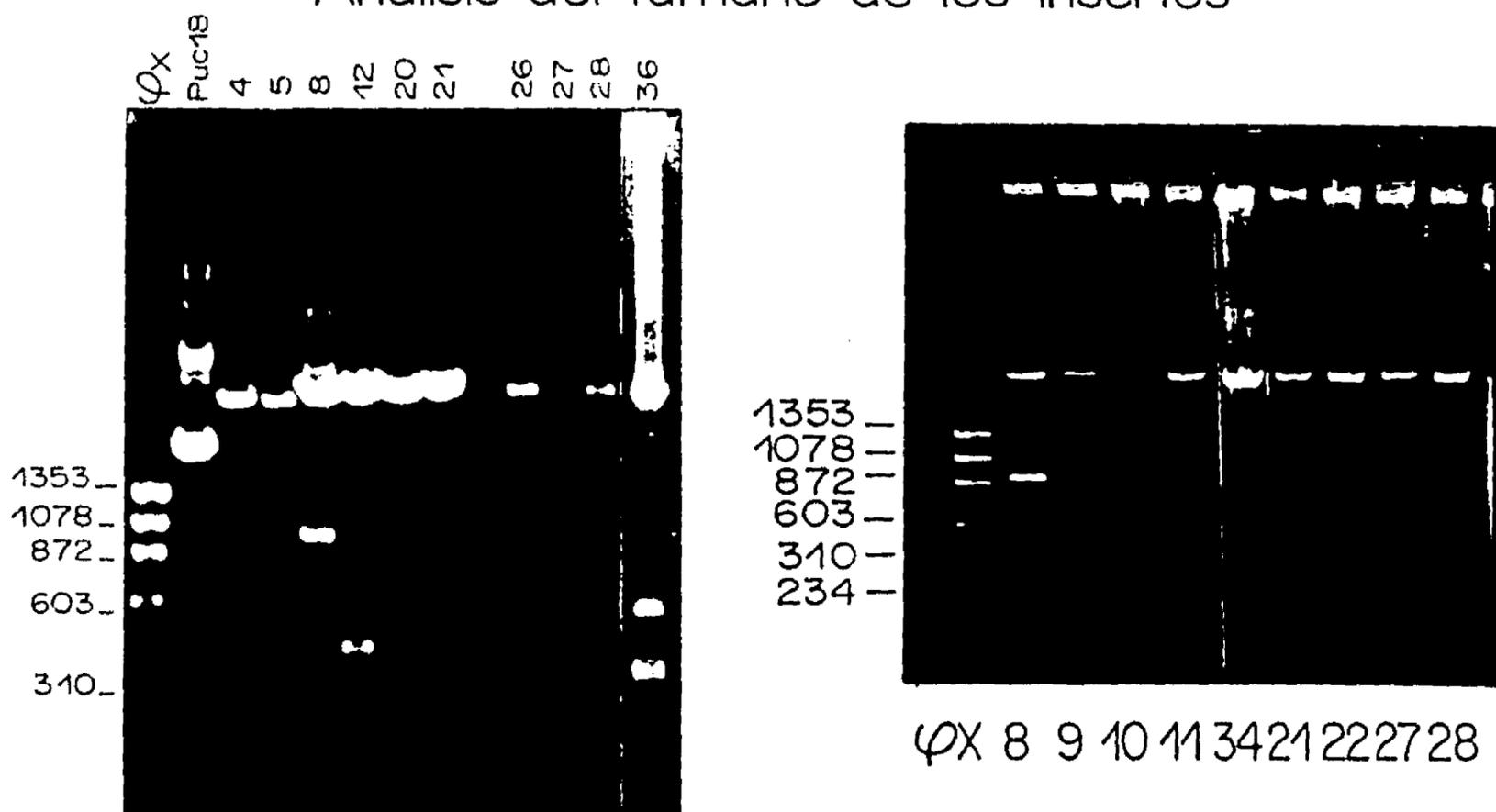


Fig. 21

CARACTERIZACION DE LOS INSERTOS POR SECUENCIACION NUCLEOTIDI-  
CA. El análisis de la secuencia nucleotídica se llevó a cabo  
por el método de la cadena terminal (45), para lo cual los  
insertos de las clonas (+) para proteínas estructurales se  
recupieron por electroelución y se subclonaron en bacteriófago  
M13mp18 y M13mp19 (Fig. 22). La ubicación de las regiones

SUBCLONACION DE INSERTOS EN M13 MP18

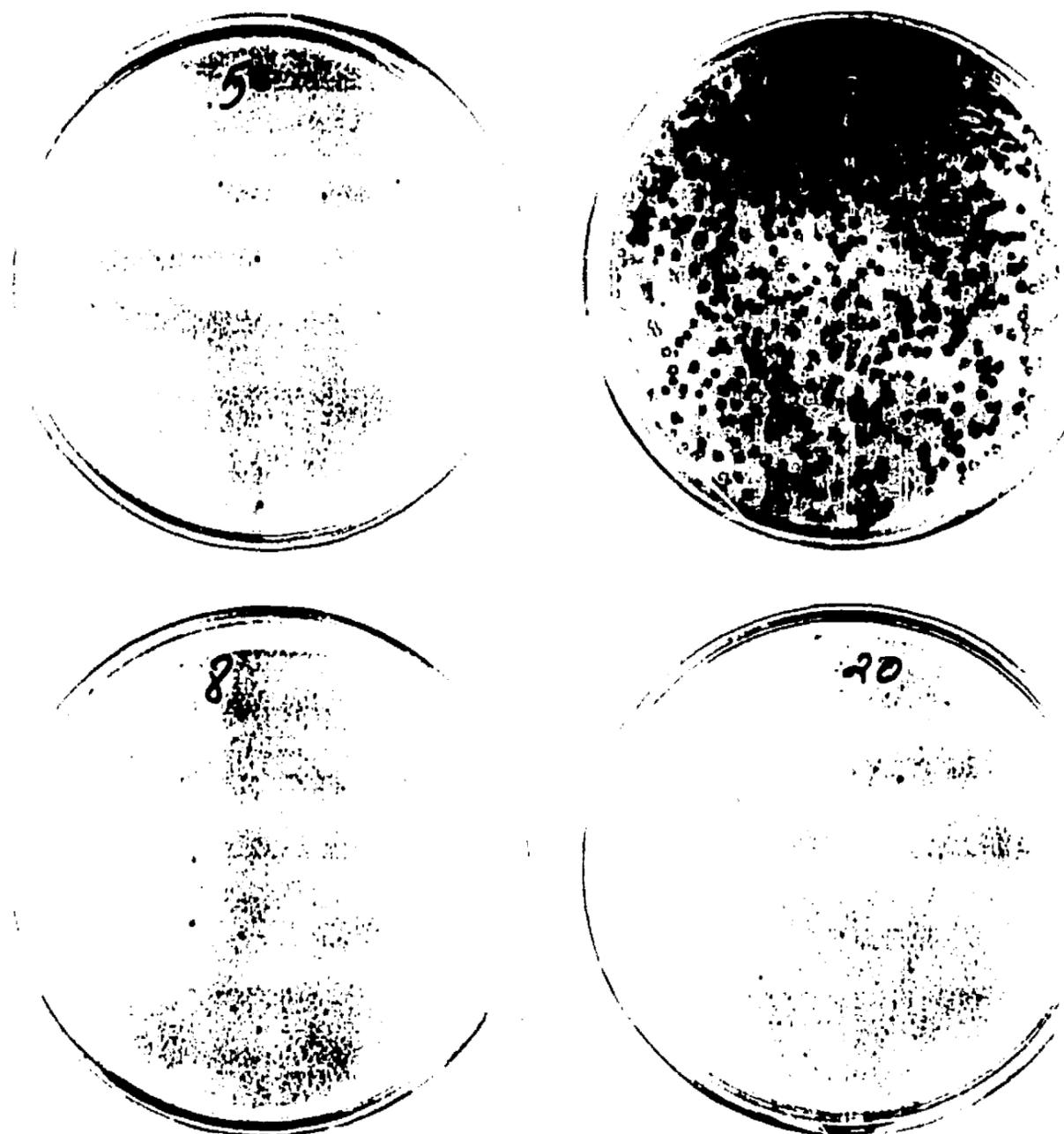


Fig. 22

secuenciadas se hizo por analogía con la secuencia reportada  
previamente para la cepa prototipo de dengue-2 (Nueva Guinea

C) (Fig. 23). En ocasiones para tratar de identificar clonas de los extremos 5' y 3', hubo que hacer una segunda e incluso una tercera hibridación en el banco genómico.

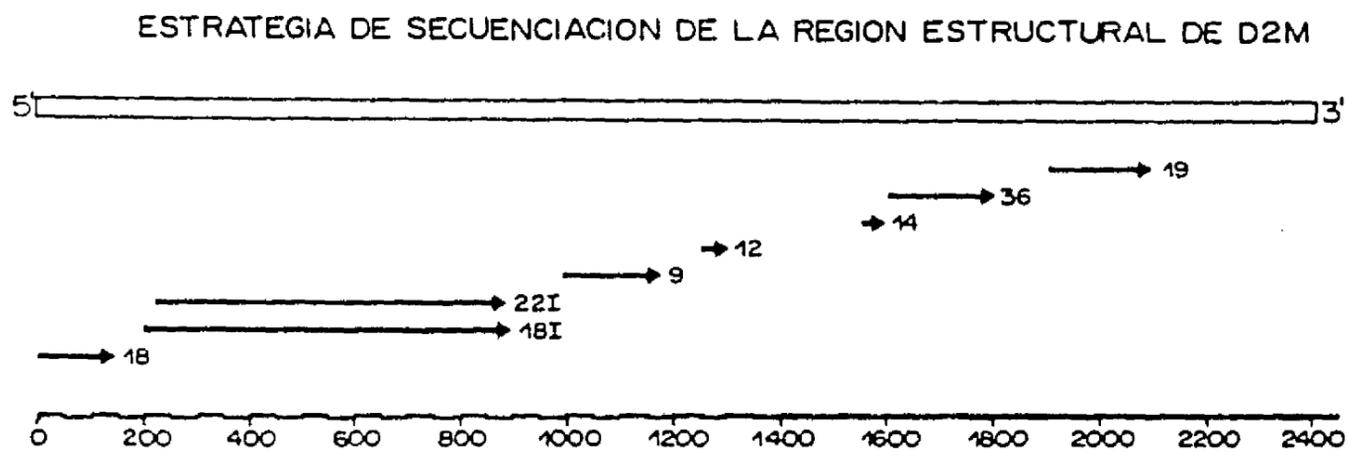


Fig. 23

SINTESIS Y AMPLIFICACION DE REGIONES 5' Y 3' NO REPRESENTADAS. Las secuencias de los genes en estudio, que no estaban representadas en el banco, se sintetizaron directamente a partir de mRNA(+) con oligonucleótidos sintéticos específicos. El material sintetizado se amplificó por PCR para su posterior utilización en la obtención de templado para análisis de secuenciación (Fig. 24a y 24b). El DNAc amplificado se

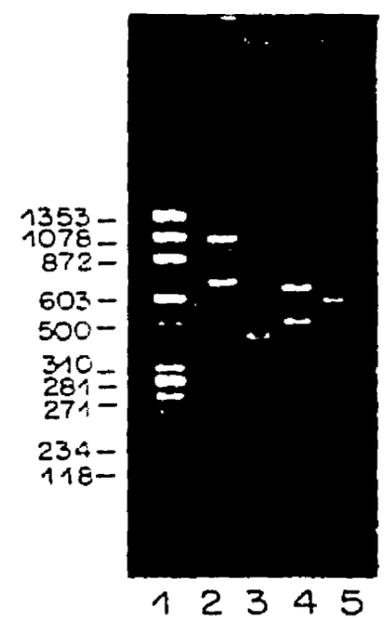
Amplificación cDNA por PCR



- 1  $\phi$ X/Hae III
- 2 cDNA (PCR) E/CM
- 3 cDNA (PCR) E
- 4 cDNA SIN AMPLIFICAR (Random Primer)
- 5 CONTROL (+) $\lambda$

Fig. 24a

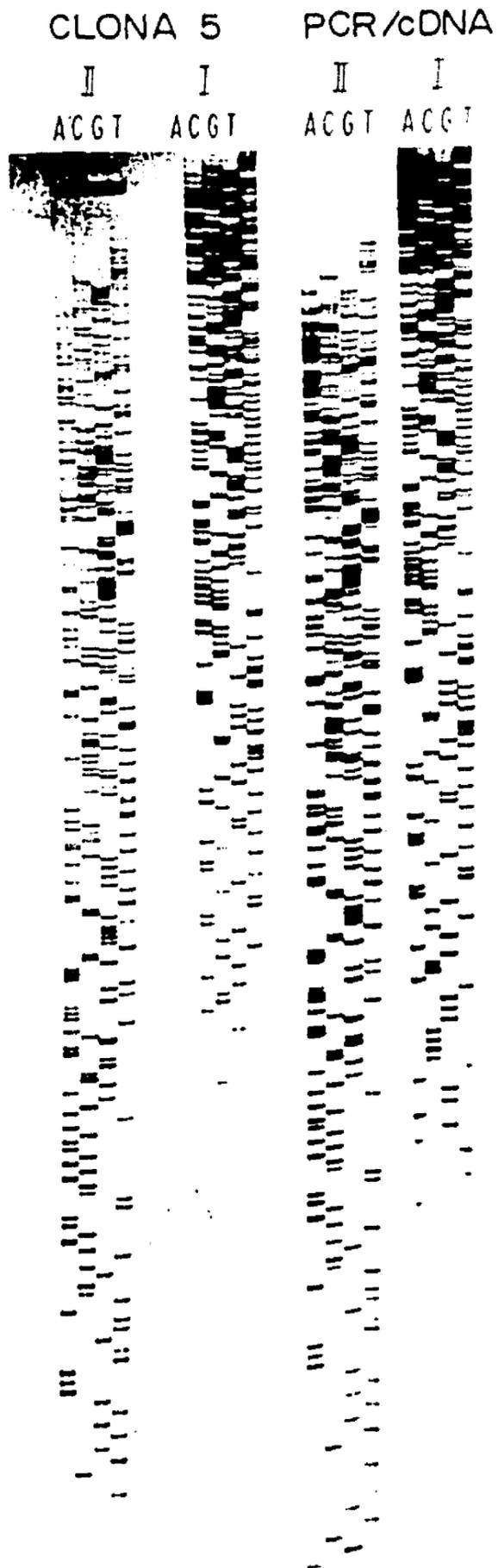
Mapa de restricción enzimática de cDNA



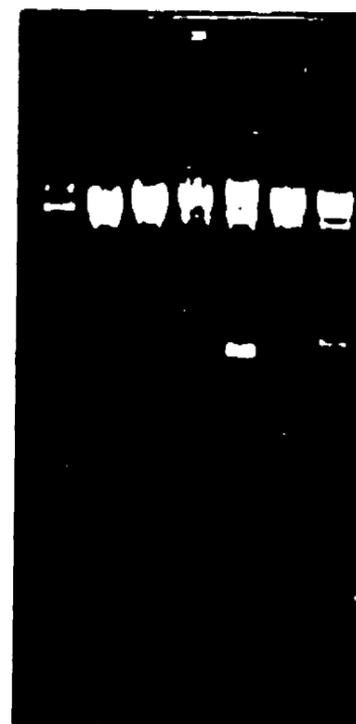
- 1  $\phi$ X/Hae III
- 2 cDNA SIN DIGERIR
- 3 cDNA/Hha I
- 4 cDNA/Hae III
- 5 cDNA/Sau 3A

Fig. 24b

analizó mediante electroforesis en gel de agarosa y se confirmó por Southern blot utilizando los mismos oligonucleótidos sintéticos marcados radiactivamente. Para el análisis posterior de la secuencia nucleotídica, las muestras positivas se subclonaron en bacteriófago M13mp18 (Fig. 24c y 24d).



cDNA amplificado por PCR  
 y clonado en bacteriófago M13



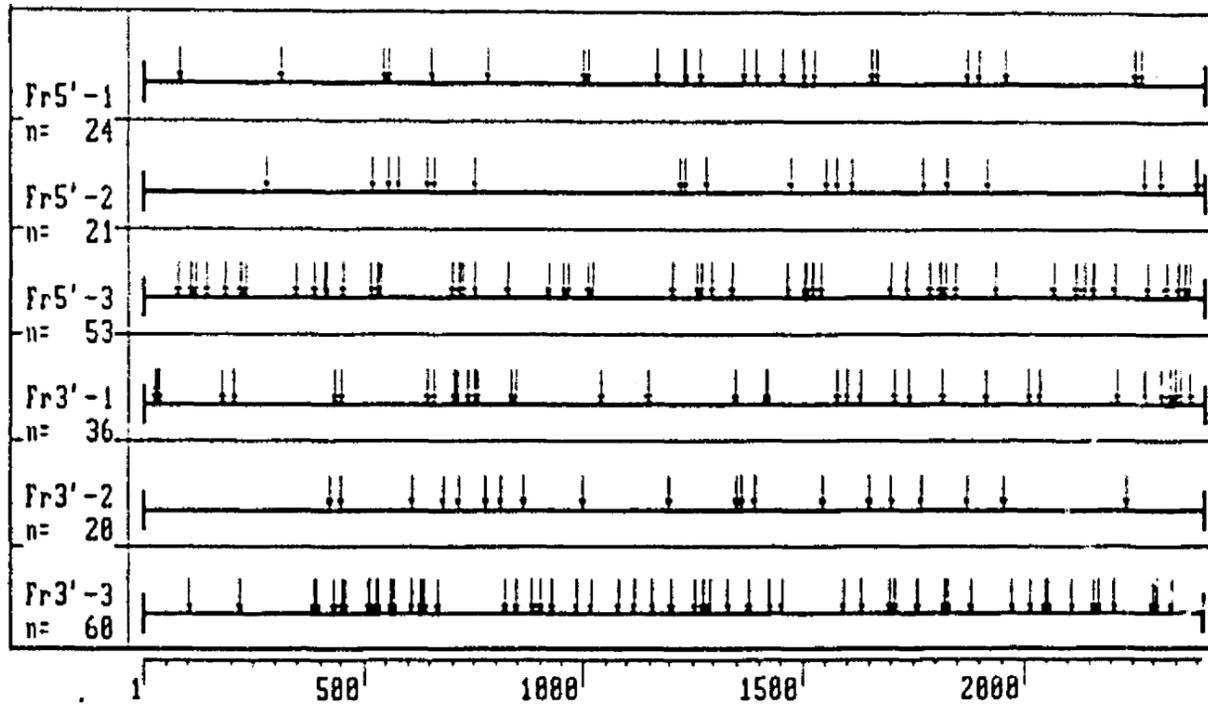
1 2 3 4 5 6 7  
 1 M13 R.F.  
 2-7 DIFERENTES CLONAS  
 RECOMBINANTES DE M13

Fig. 24d

Fig. 24c



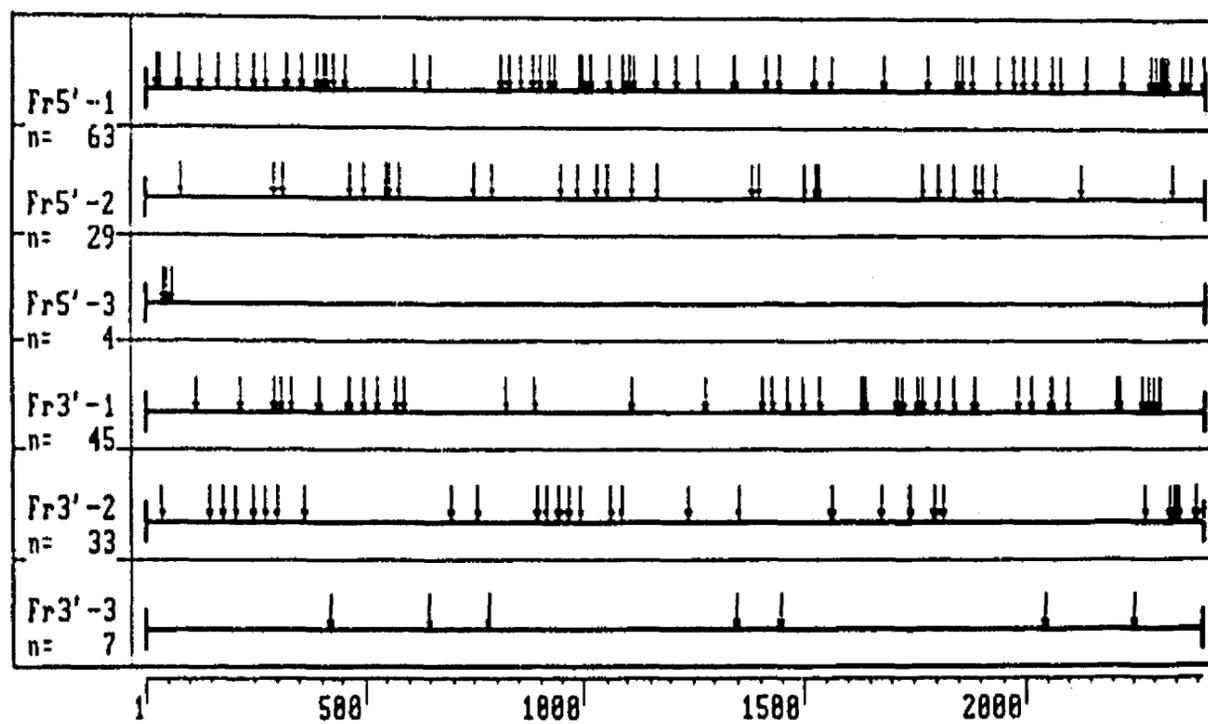
CODONES DE INICIO



Displaying the Initiation codons: ATG, GTG.  
 On the complete sequence ( 2486 bases).  
 Using the Universal genetic code.

Fig. 25b

CODONES DE TERMINO



Displaying the Stop codons: TAA, TGA, TAG.  
 On the complete sequence ( 2486 bases).  
 Using the Universal genetic code.

Fig. 25a

M N D O R K K A R N 10

1 GCA ACA CAA AGA CAG ATT CTT TCA GCG CAC TGA GCT CAC CGT AAT TCT CAC CTT TTT CAT AAG ACA GCA GAT CTC TCA TCA ATG AAT GAC CAA CGG AAA AAG GCG ACA AAC 107

11 M P F N M L K R E R I R V S T V O O L T K R F C L G M L O G R G P L K L F 47  
 108 ATG CCT TTC AAT ATG CTC AAA CGC CAG AGA ATC CGC GTC TCA ACT GTA CAA CAG TTG ACA AAG AGA TTC TCA CTT GGA ATG CTG CAG GGA CCA GGT CCA CTA AAA TTG TTC 218

48 M S L V A I L R F L T I P P I E G I L K R W G T I K K S K A I N V L R G F 84  
 219 ATG TCC CTG GTC GCG TTC CTT CGT TTE CTA ACA AAT CCT CCA ACA GAA GCG ATA TTA AAA AGA TCG GGA ACA AIT AAA AAA TCA AAG GCT AIT AAT CTT CTG ACA GCG TTC 329

85 R K E I G R M L N I L Y R R R I T A G M I I I L I P I V M P F N L I T R M 121  
 330 AGG AAA GAG AIT GGA AGG ATG CTG AAT ATC TTA TAC AGG AGA CGT ACA ACT GCA GCG ATG ATC ATC ATC CTG AIT CCA ACA GTG ATG CCG TTT CAT CTG ACC ACA GCG AAC 440

122 G E P N M I V I R E E K G K S L L F K T K D G T N M C I L M A M D L G E L 158  
 441 GGA GAA CCA CAC ATG ATC GTC AIT AGA GAA GAA AAA GGA AAA AGC CTT CTG TTT AAG ACA AAG GAC GCG ACC AAC ATG TGT ACC CTC ATG GCG AIG GAC CTT GGT GAG TTC 551

159 C E D T I I T Y K C P F L K O N E P E H I D C W S N S T S T W V I Y G T C T 195  
 552 TGT GAA GAC ACA ATC ACC TAT AAA TGT CCC TTT CTC AAG CAG AAC GAA CCA GAA CAC ATA GAT TGT TCG TCC AAC TCC ACC TCC ACA TCG CTA ACT TAT GGG ACA TGT ACC 662

196 T T G E H R R E K R S V A L V P H V G M G L E T P T E T W M S S E G A W K 232  
 663 ACC ACA GGA GAG CAC AGA AGA GAA AAA AGA TCA CTG GCA CTT GGT CCA CAC GTG GGA ATG GCA TTG CAG ACA CCA ACT GAA ACA TGG ATG TCA TCA GAA GCG CCC TCG AAA 773

233 H V O R I E I W I L R H P G F I I M A A F L A Y T I G T T H F O R V L I F 268  
 774 CAT GTT CAG AGA AIT GAA ACT TGG ATC TTG AGA CAT CCT GCG TTT ACC ATA ATG GCA CCA TTC CTG GCA TAC ACC ATA GGA ACC ACC CAT TTC CAA AGA CTC CTG AIT TTC 884

269 I L L T A I A P S M T M R C I G I S M R D F V E G V S G G S W V D I V L E 306  
 885 ATC CTA CTG ACA GCC ATC GCT CCT TCA ATG ACA ATG CCG TGC ATA GGA ATA TCA AAT AGG GAC TTT GTG GAA GGA GTG TCA GGA GCG AGT TGG GTT GAC ATA GTT TTA GAA 995

307 H G S C V I T M A K N K P T L D F E L I K S E A K Q P A T L R K Y C I E A 344  
 996 CAT GGA AGT TGT GTG ACC ACC ATG GCA AAA AAT AAA CCA ACA CTG GAC TTT GAA CTG ATA AAA TCA GAA GCC AAA CAA CCC GCC ACC TTA AGG AAG TAC TGT ATA GAG GCT 1106

345 K L T M T I T D S R C P I Q G E P I L W E E O D K R F V C K M S M V D R G 380  
 1107 AAA CTG ACC AAC ACC ACA ACA GAC TCG CCG TGC CCA ACA CAA GCG GAA CCC ACC CTG AAT GAA GAG CAG GAC AAA AGG TTT GTC TGC AAA CAT TCC ATG GTA GAC AGA GAA 1217

381 M G N G C G L F G K G C I V I C A M F I C K K N M E G K V V O K E M W K Y 417  
 1218 TGG GGA AAT GGA TGT GGA TTA TTT GGA AAA GGA GCG ATC GTG ACC TGT GCG ATG TTC ATA TCG AAA AAG AAC ATG GAG GGA AAA GTC CTC CAG AAA GAA AAT TGG AAA TAC 1328

418 T I V I T P H S G E E H A V G I D T G K M G K E V K I T P O S S I T D A E 454  
 1329 ACC ATC GTG ATA ACA CCT CAC TCA GCG GAA GAA CAT GCA CTC GGA AIT GAC ACA GGA AAA CAT GGT AAA GAA GTC AAG ATA ACA CCA CAG ACC TCC ATC ACA GAC CCG GAA 1439

455 L I G Y G I V T M E C S P R I G L D F W E H V L L O M N D K A R L V H R O 491  
 1440 CTG ACA GCG TAT GCG ACT GTT ACC ATG GAG TCG TCT CCA AGA ACC GCG CTC GAC TTC AAT CAG ATC GTG TTG CTG CAA ATG AAT GAC AAA GGT AGG CTG GTG CAC AGA CAA 1550

492 W F L D L P L P W L P G A D I O G R E W I O K E I L V T F K M R H A K K O 528  
 1551 TGG TTC CTA GAC CTA CCG TTG CCA TCG CTG CCC GGA GCA GAC ACA CAA GGA AGA AAG TGG ATA CAG AAA GAG ACA CTG GTC ACC TTC AAA AAT CCG CAT CCG AAA AAA CAG 1661

529 D V V V L G S O E C T M H I A L T G A T E I O M S S G N L L F T G H L K C 565  
 1662 CAT GTT GTT GTC TTA GGT TCC CAA GAG GCG ACC ATG CAT ACA GCA CTC ACA GCG GGT ACC GAA ATC CAC ATG TCA TCA GGA AAC CTG CTG TTC ACA GGA CAT CTT AAG TCG 1772

566 R L E M D K L O L K G M S Y S M C T G K F E V V K E I A E K Q M G T I V I 602  
 1773 AGG CTG AAG ATG GAC AAA TTA CAA CTT AAA GCG ATG TCA TAC TCC ATG TCG ACA GGA AAG TTT AAA CTT GTG AAG GAA ATA GCA GAA AAA CAA CAT GGA ACA ATA GTC AIT 1883

603 R V O Y E G D G S P C K I P F E I M D L E K R H V L G R L I I V N P I V T 639  
 1884 AGA GTA CAA TAT GAA GGA GAC GCG TCT CCA TCG AAG ACC CCT TTT GAG ATA ATG GAT CTG GAA AAA ACA CAT CTT TTG GCG CCG CTG ACC ACA GTC AAC CCA AIT GTA ACA 1994

640 E K D S P L N I E A E P P I G D S Y I I I G V E P G O L K L D W F K K A S 676  
 1995 GAA AAG GAC AGT CCA CTC AAC ATA GAA CCA GAA CCT CCA TTC GGA CAG ACC TAC ATC ATC ATA GGA GTG GAA CCA GCA CAA TTG AAG CTG GAC TGG TTC AAG AAA GCA AGT 2105

677 S I G O M F E T T M R G A R R K M A I L G D T A W D F G S L G C V F T S I 713  
 2106 TCC ATC GCG CAA ATG TTT GAG ACA ACA ATG AGA GCG GCT CCG AAG AGA ATG GCC AIT TTG GCG GAC ACA GCC TGG CAT TTT GGA TCT CTG GGA GCA GTG TTC ACA TCT ATA 2216

714 G K A L N O V F G A I Y G A A F S G V S W T M K I L I G V I I T W I G M H 750  
 2217 GCA AAG GCT CTC CAC CAG GGT TTT GGA GCA ATC TAT GCG GCG GCG TTC AGT GCG GTC TCA TGG ACT ATG AAG ATC CTC ATA GGA GTC ATC ATA ACA TGG ATA GCA ATG AAT 2327

751 S N S T S L S V S L V L V G V V T L Y L G V M O A L 775  
 2328 TCA CGT ACC ACC TCA CTG TCT GTG TCA CTA GTA TTG GTG GGA GTC GTG ACA CTG TAC CTG GAG GTC ATG CTG CAG GCC CA 2406

° SITIOS PROBABLES DE GLUCOSILACION  
 ° SITIOS PROBABLES DE AMIDACION

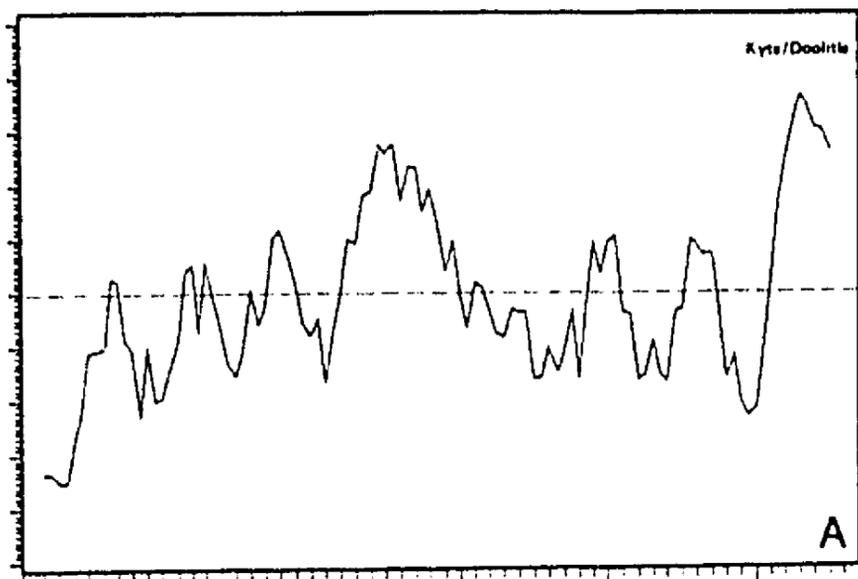
SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS Y AMINOACIDOS DE LAS PROTEINAS ESTRUCTURALES DE DENGUE-2 MEXICANO

Fig. 26

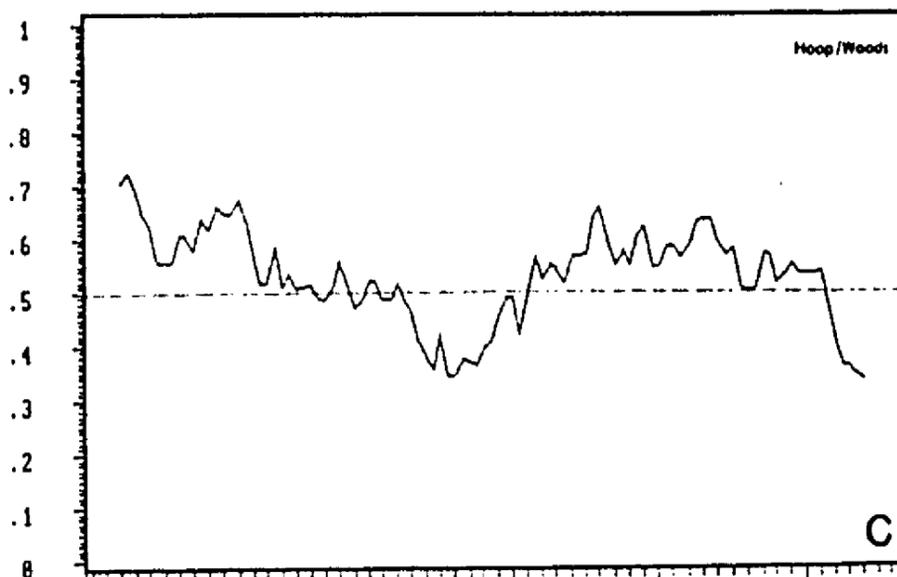




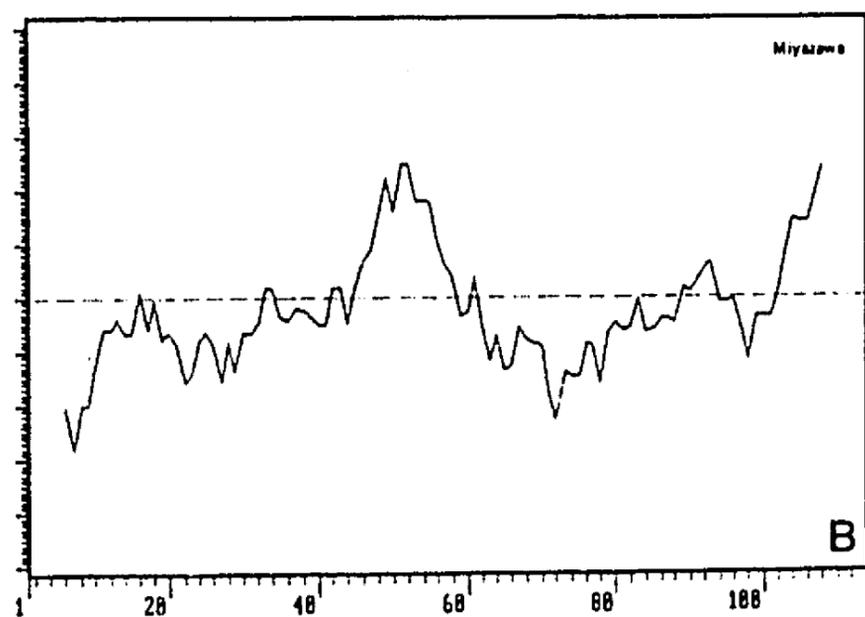
HIDROPATIA C



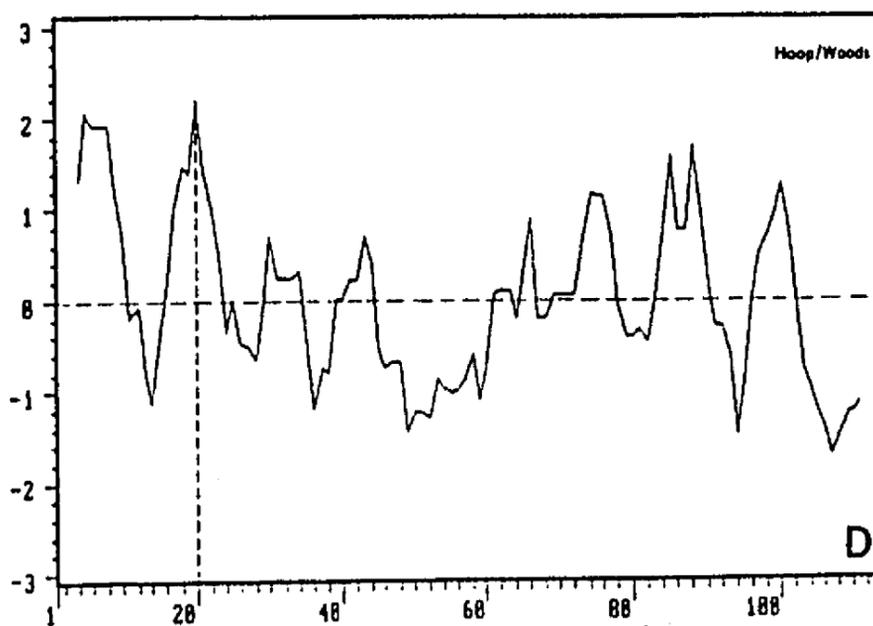
HIDROFILICIDAD C



HIDROFOBICIDAD C



ANTIGENICIDAD C



FLEXIBILIDAD C

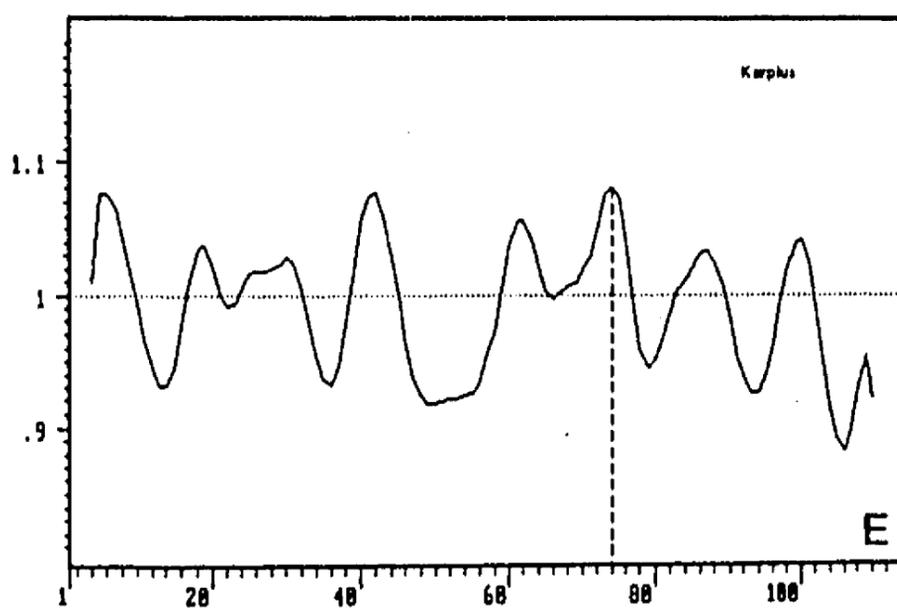


Fig. 28

## SECUENCIA DE LA PROTEINA DE MEMBRANA DENGUE-2M

<sup>rprM</sup>  
 1 F H L T T R N G E P H M I V I R E E K G K S L L F K T K D G T N M C T L M 37  
 1 UUU CAU CUG ACC ACA CGC AAC GGA GAA CCA CAC AUG AUC GUC AUU AGA GAA GAA AAA GGA AAA AGC CUU CUG UUU AAG ACA AAG GAC GGC ACG AAC AUG UGU ACC CUC AUG 111

38 A M D L G E L C E D T I T Y K C P F L K Q N E P E H I D C W S N S T S T W 74  
 112 GCC AUG GAC CUU GGU GAG UUG UGU GAA GAC ACA AUC ACG UAU AAA UGU CCC UUU CUC AAG CAG AAC GAA CCA GAA CAC AUA GAU UGU UGG UCC AAC UCC ACG UCC ACA UGG 222

<sup>rM</sup>  
 \*

75 V T Y G T C T T T G E H R R E K R S V A L V P H V G M G L E T R T E T W M 111  
 223 GUA ACU UAU GGG ACA UGU ACG ACC ACA GGA GAG CAC AGA AGA GAA AAA AGA UCA GUG GCA CUU GUU CCA CAC GUG GGA AUG GGA UUG GAG ACA CGA ACU GAA ACA UGG AUG 333

112 S S E G A W K H V Q R I E T W I L R H P G F T I M A A F L A Y T I G T T H 148  
 334 UCA UCA GAA GGG GCC UGG AAA CAU GUU CAG AGA AUU GAA ACU UGG AUC UUG AGA CAU CCU GGC UUU ACC AUA AUG GCA GCA UUC CUG GCA UAC ACC AUA GGA ACG ACG CAU 444

149 F Q R V L I F I L L T A I A P S H T 166  
 445 UUC CAA AGA GUC CUG AUU UUC AUC CUA CUG ACA GCC AUC GCU CCU UCA ATG ACA 498

S N T S SITIO PROBABLE DE GLUCOSILACION

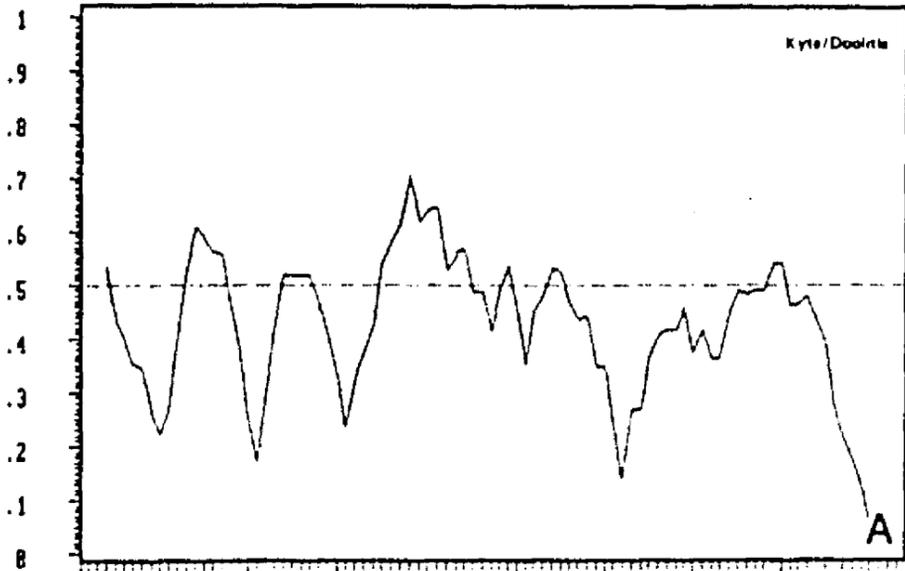
-----

\* SITIO PROBABLE DE CORTE

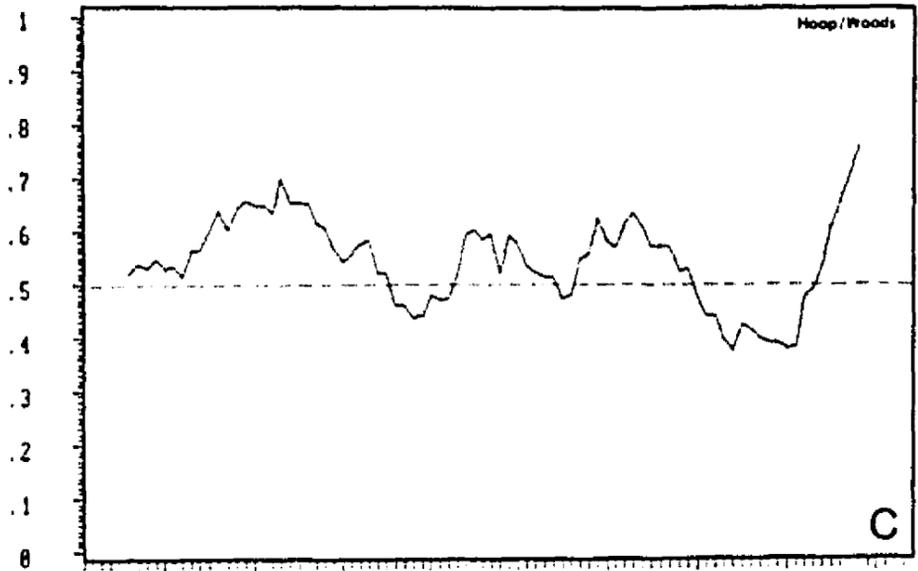
Fig. 29a



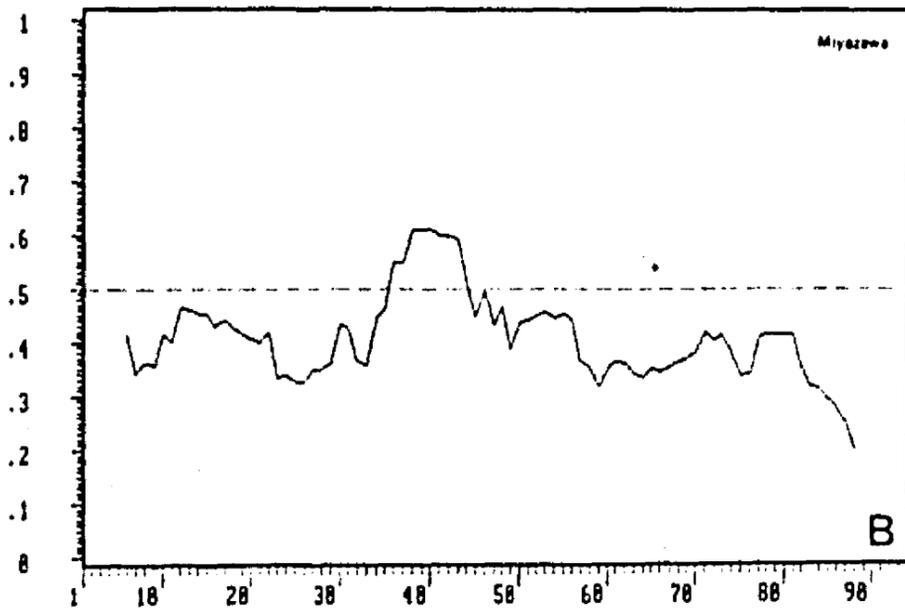
HIDROPATIA P r M



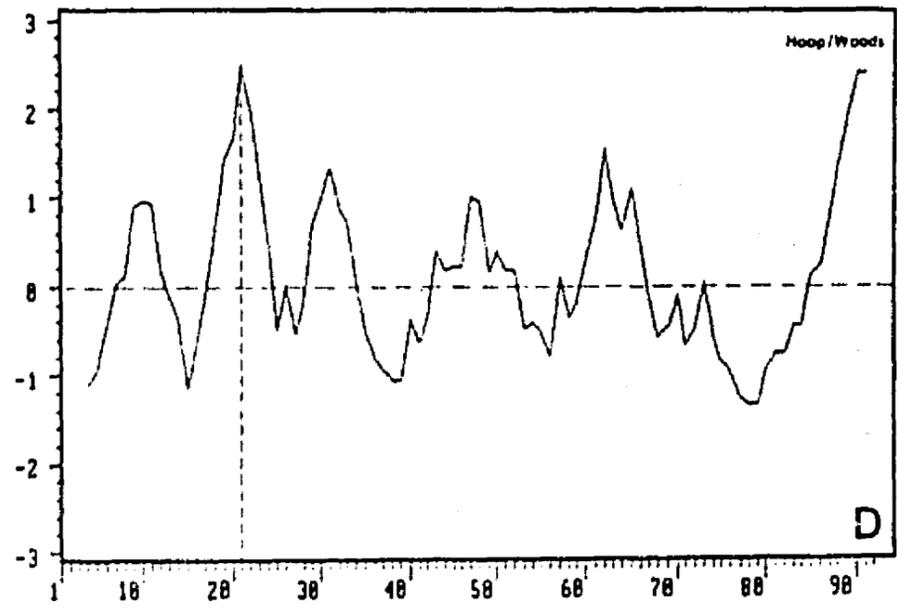
HIDROFILICIDAD P r M



HIDROFOBICIDAD P r M



ANTIGENICIDAD P r M



FLEXIBILIDAD P r M

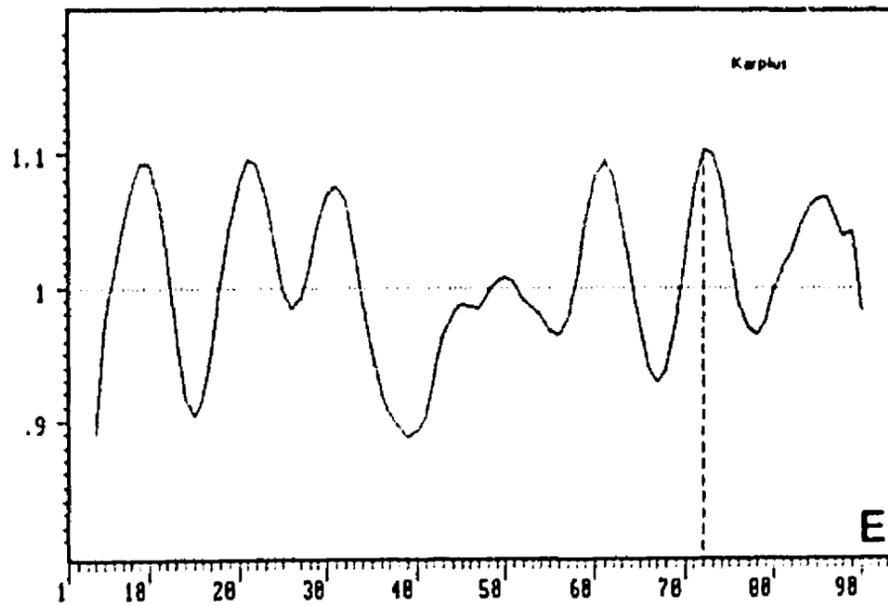


Fig. 30

ta proteína inicia con un segmento hidrofóbico corto, que ha sido propuesto como señal de traslocación al retículo endoplásmico, seguido de cinco regiones altamente hidrofílicas (6-9, 10-25, 26-32, 49-55, y 63-67), que podrían conferirle a la una alta solubilidad (fig. 30). En la posición 66 de esta proteína se localiza un sitio probable de glicosilación con la siguiente composición: Ser-Asn-Ser-Thr. Hacia el extremo carboxilo de prM se encuentra la secuencia Lis-Arg-Ser-Val que podría ser el sitio de corte de esta proteína precursora para producir M (Fig. 29a y 31) la cual es una proteína inte-

#### MAPA DE RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA DE LA PROTEÍNA M

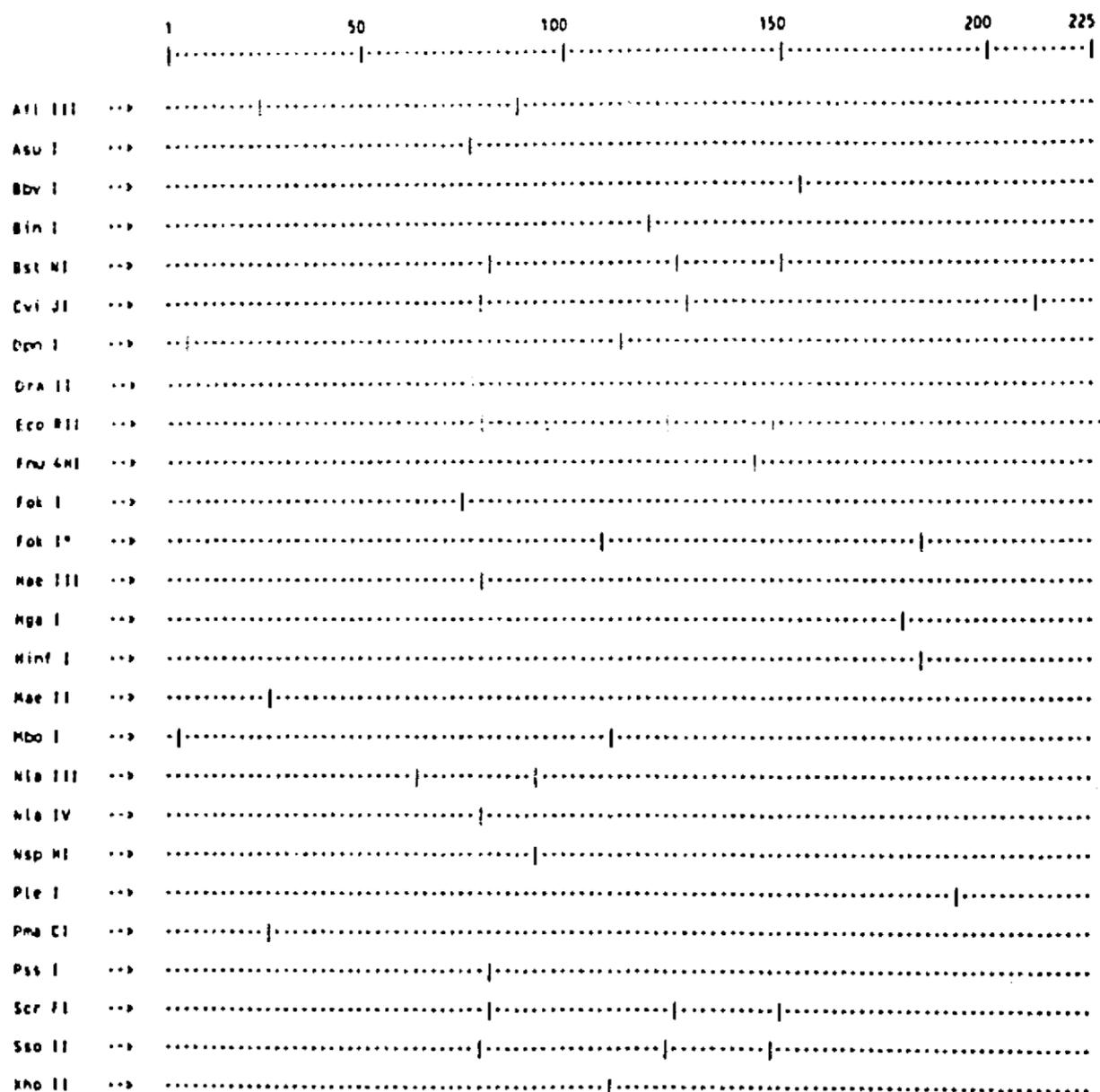


Fig. 31

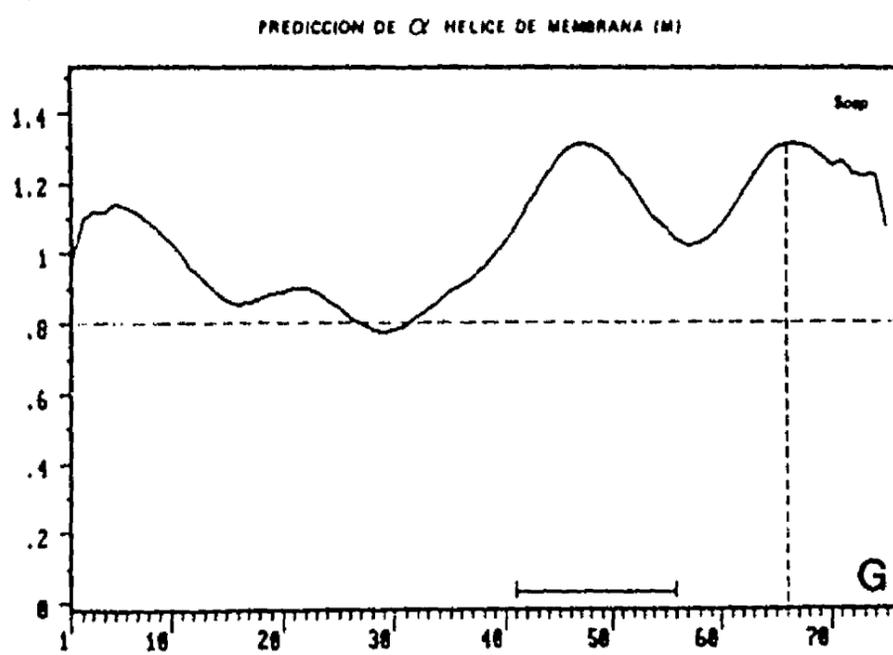
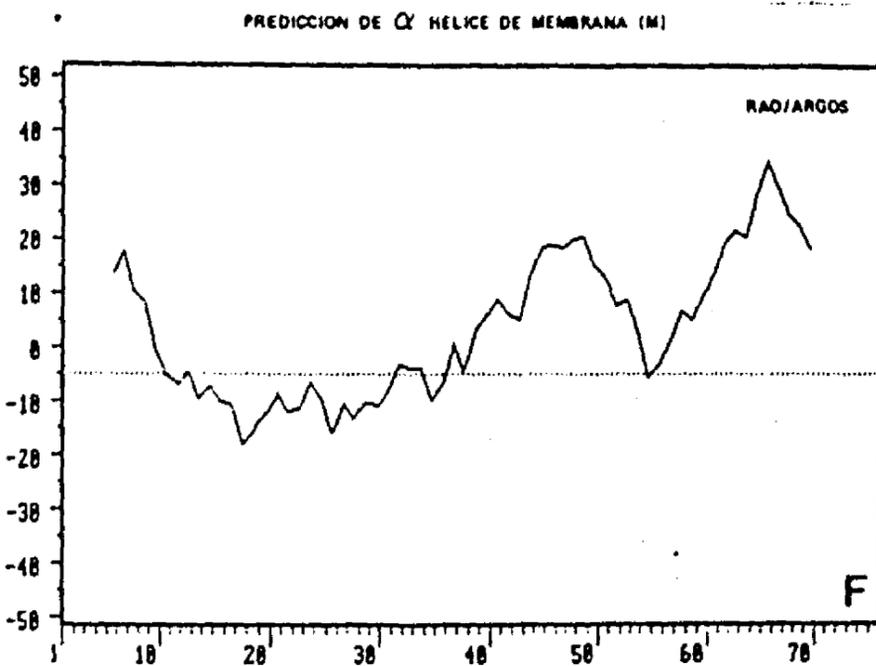
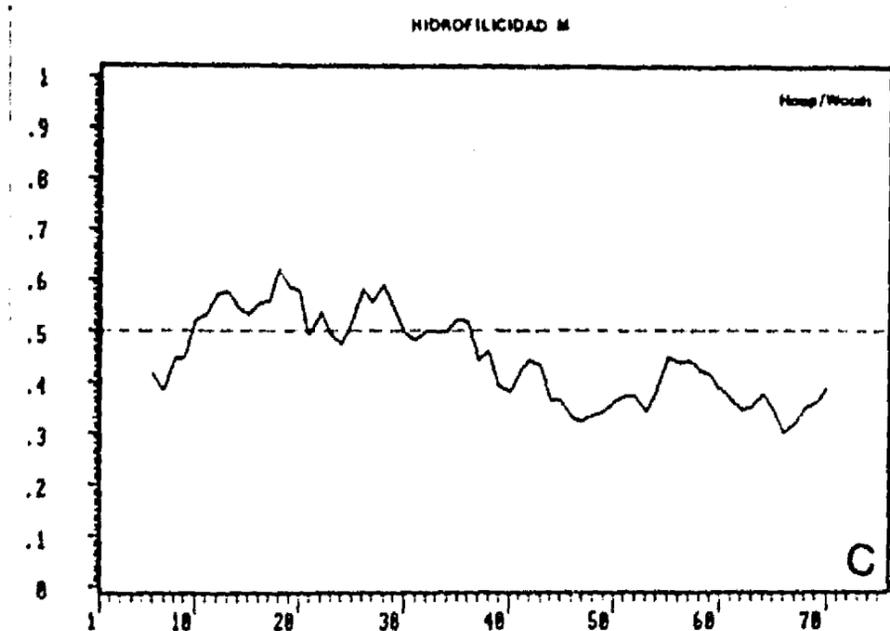
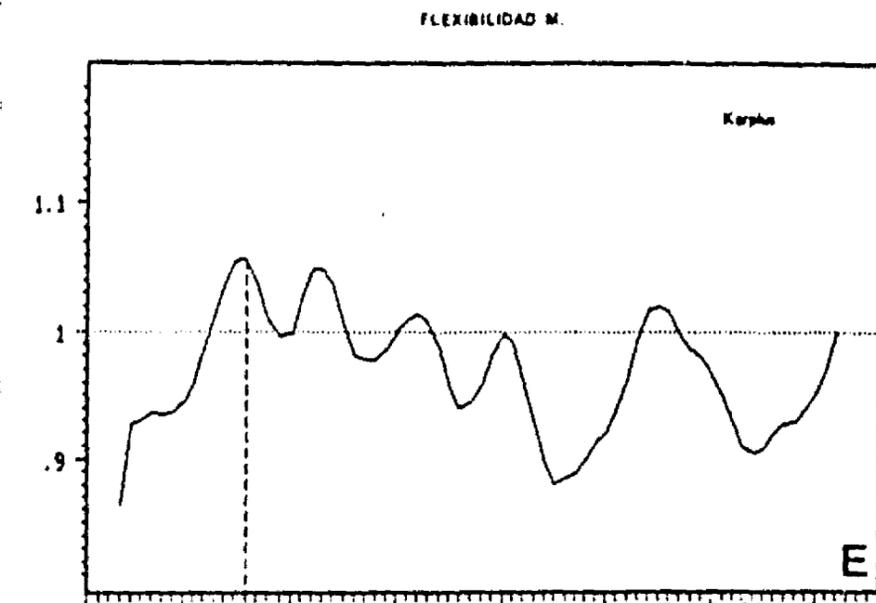
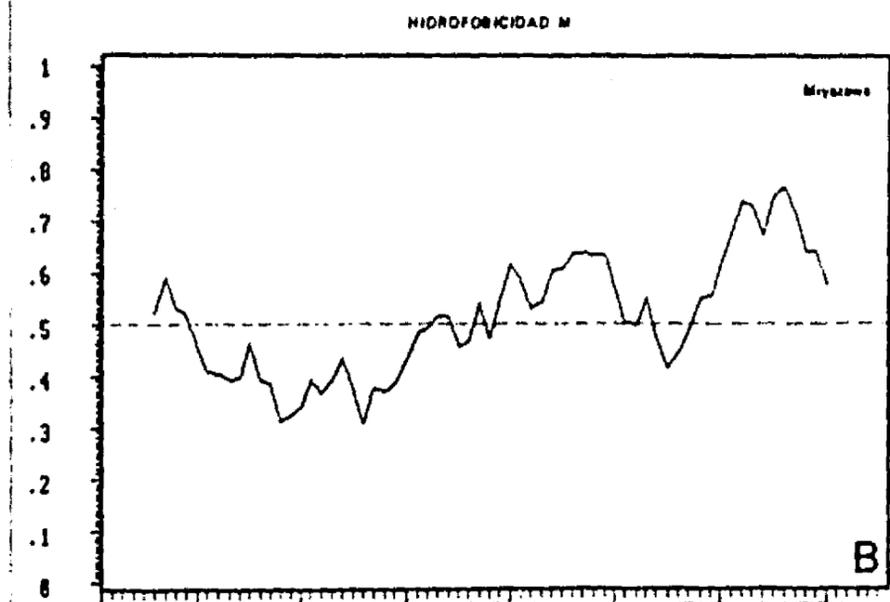
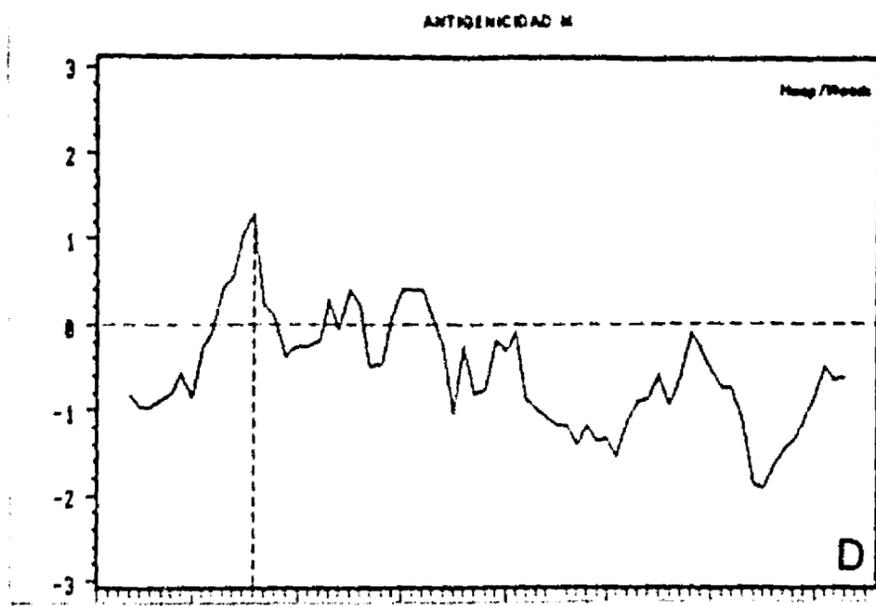
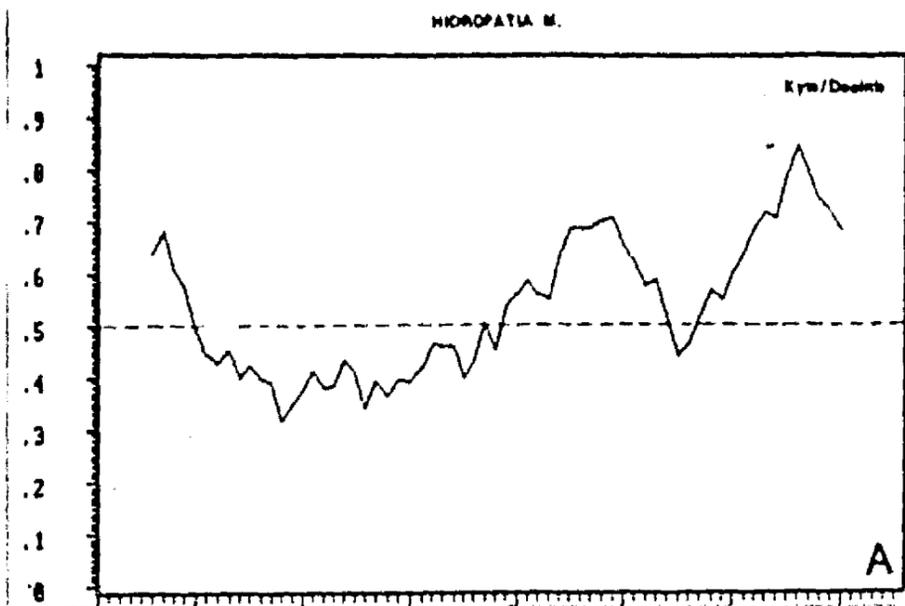


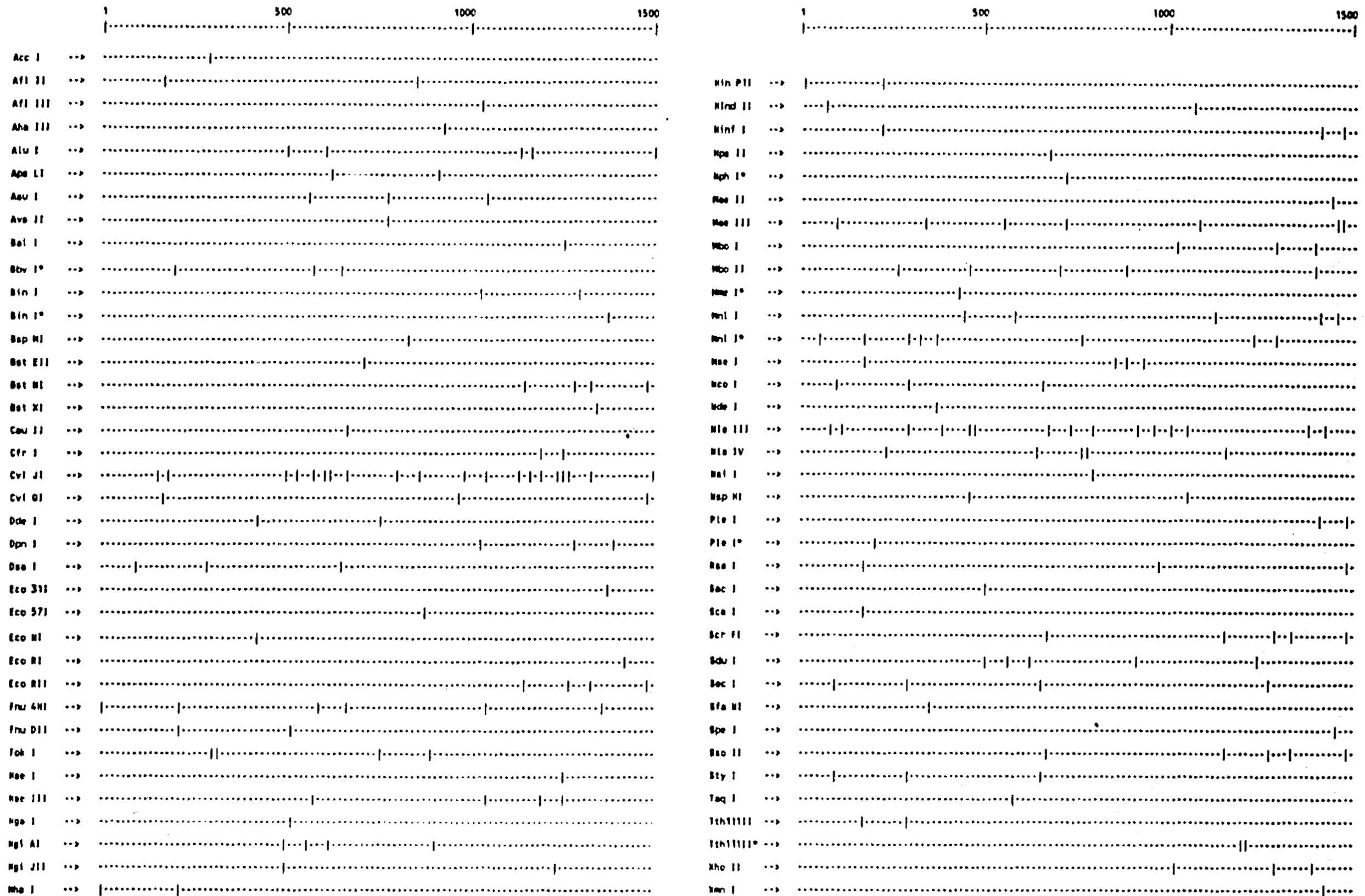
Fig. 32

gral de membrana que contiene regiones tanto hidrofílicas (9-29, 54-56) (Fig. 32) como hidrofóbicas (37-42), que pueden interaccionar ya sea con la nucleocapside viral ó con la proteína de capa externa. A la proteína M no se le ha podido dar una ubicación exacta en el virión, pero se piensa que es una proteína importante en el ensamblaje del mismo. En su extremo carboxilo encontramos un dominio altamente hidrofóbico (57-75) que podría funcionar como señal en la traslocación de la proteína E al retículo endoplásmico. La proteólisis entre M y E podría ocurrir pasando la Thr que se encuentra en la posición 75.

A continuación de la proteína M en el genoma se encuentra la proteína de envoltura ó E, la cual contiene 495 aminoácidos que corresponden a 1485 nucleótidos (Fig. 33a y 33b). En la posición 67 se encuentra la secuencia Leu-Thr-Asn-Thr-Thr propuesta como sitio probable de glicosilación. Esta proteína contiene aproximadamente 10 regiones ricas en aminoácidos hidrofílicos, que están en las posiciones 1-14, 30-109, 126-176, 185-191, 201-253, 259-273, 288-318, 326-371, 383-424 y 405-475, que podrían representar sitios inmunoreactivos. (Fig. 34). Aunque es una proteína predominantemente hidrofílica, en su extremo carboxilo presenta tres regiones altamente hidrofóbicas que podrían servir como sitios de anclaje en la membrana viral. Estos dominios transmembranales se encuentran en las posiciones 425-435, 440-476 y 476-495. Un hallazgo importante en esta proteína es la existencia de 12



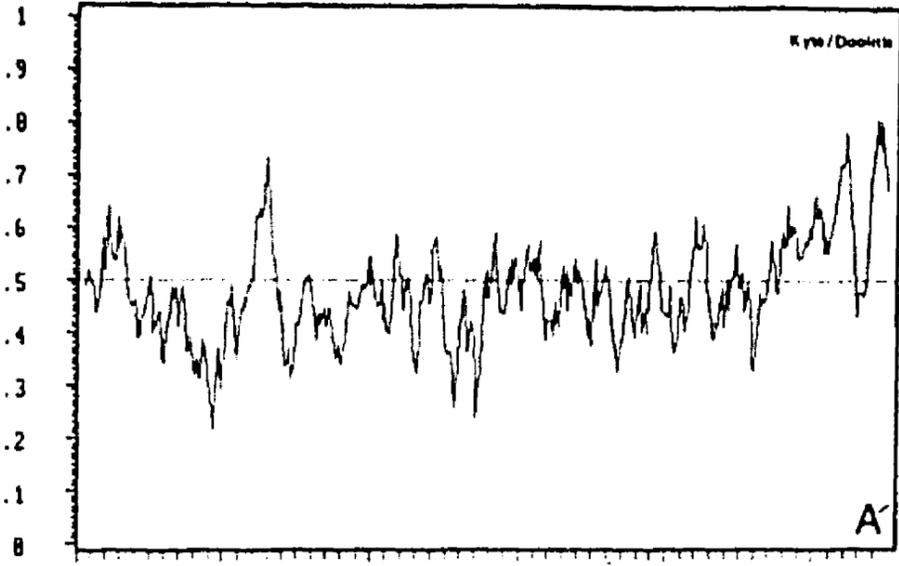
MAPA DE RESTRICCIÓN DE LA FRECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS ED2NEX.



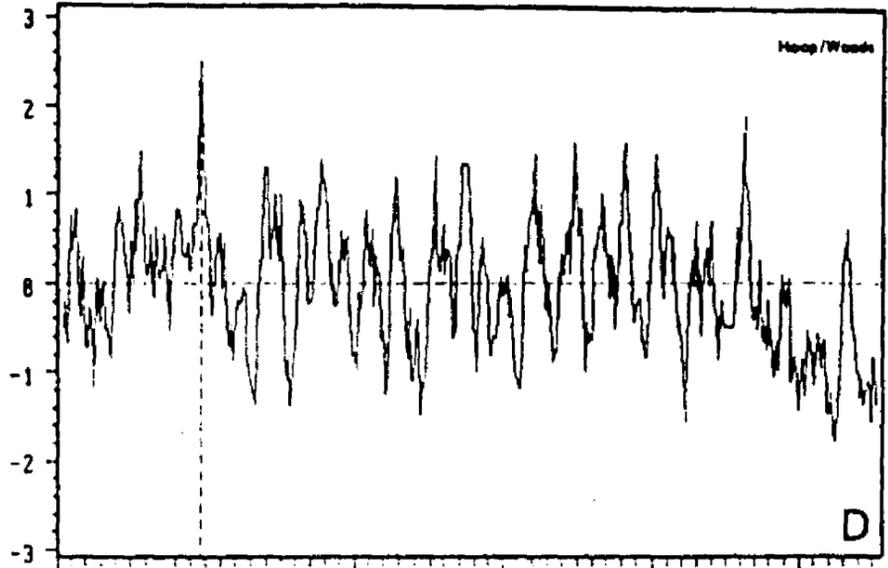
79  
 ESTA TESIS NO DEBE  
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

Fig. 33b

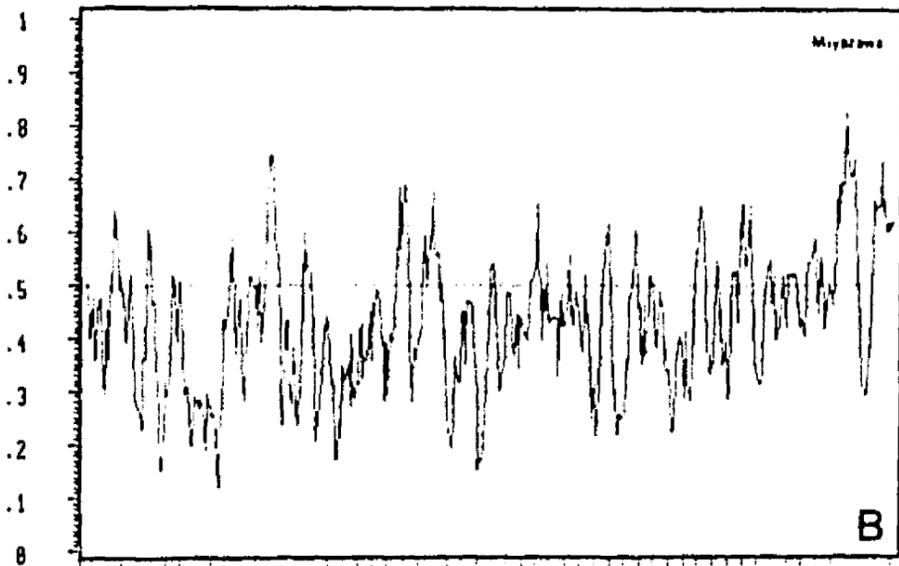
HIDROPATIA E



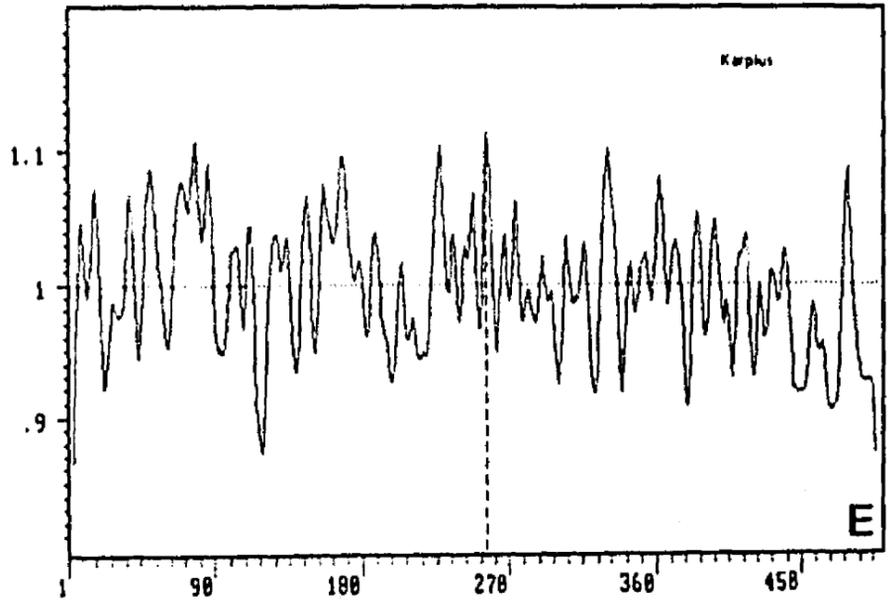
ANTIGENICIDAD E



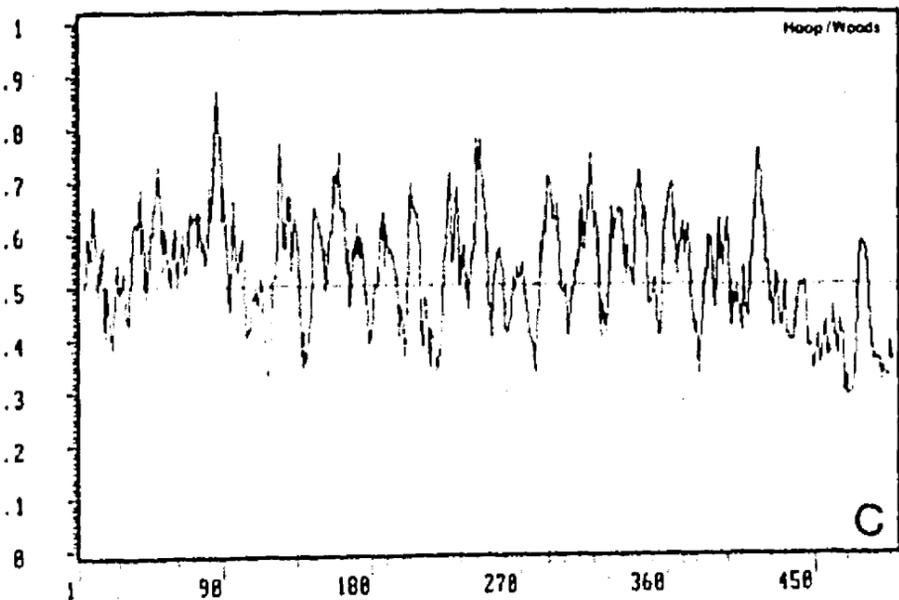
HIDROFOBICIDAD E



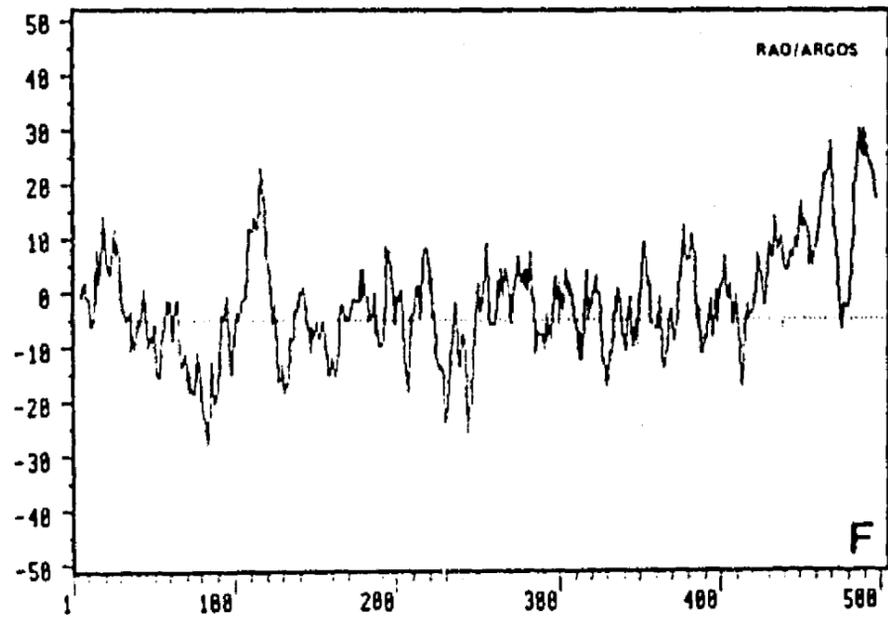
FLEXIBILIDAD E



HIDROFILICIDAD E



PREDICION DE  $\alpha$  HELICE DE MEMBRANA (E)



PREDICION DE  $\alpha$  HELICE DE MEMBRANA (E)

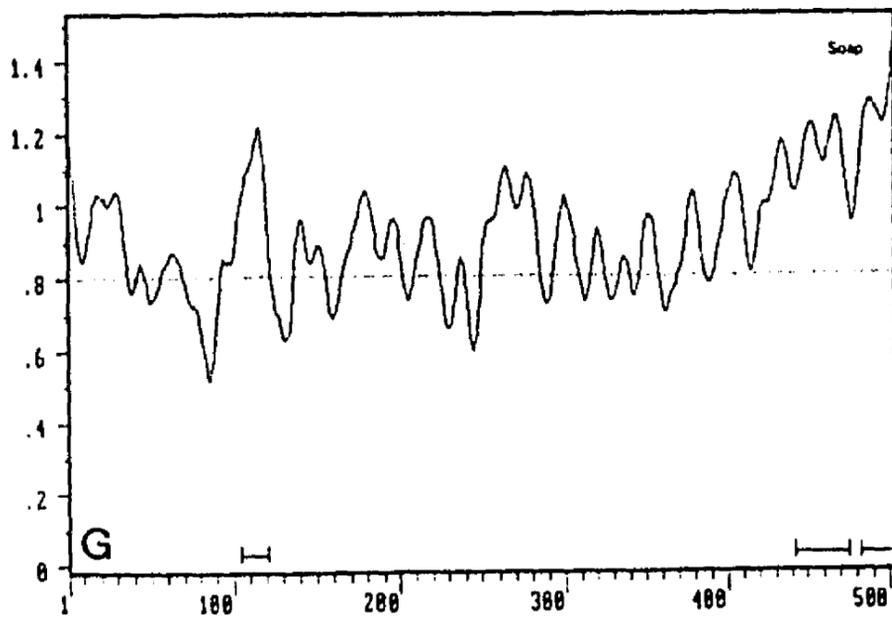


Fig. 34

residuos de cisteína localizados en las posiciones 3, 30, 60, 74, 92, 205, 116, 121, 185, 285, 302, 333, capaces de formar enlaces disulfuro, y probablemente estabilizar el patrón de plegamiento de la misma. Ya que esta proteína está involucrada con funciones biológicas importantes, como la interacción tanto con el sistema inmune como con receptores celulares del huésped, se propone que uno o más cambios en su estructura pueden afectar estas funciones, por lo que decidimos llevar a cabo un análisis comparativo tanto de nucleótidos como de aminoácidos de la misma, con la proteína E de 10 diferentes Flavivirus (62-71), las cuales fueron alineadas para máxima homología según el algoritmo de Myers y Miller, utilizando cuatro espacios libres (72) (Fig. 35). Encontramos que la homología para nucleótidos va del 51.8% al 96.9%, y para la secuencia de aminoácidos del 25.8% al 97%, tomando en cuenta únicamente los aminoácidos idénticos (Tabla II y Fig. 36).

Los resultados indican que existe una región de máxima homología en los aminoácidos que van de la posición 98 a 110; de hecho la posición 100 es 100% conservada en Flavivirus. (Fig. 35) De manera similar en la proteína E existen otras regiones significativamente conservadas localizadas tanto en el extremo amino (1-42) como en el carboxilo (410-445). También observamos dos regiones hipervariables, una del residuo 145 al 170 y otra del 200 al 215. La proteína E de estos 10 Flavivirus muestra una conservación de 12 residuos de cistei-

PROPORCION DE AMINOACIDOS Y NUCLEOTIDOS DE LA PROTEINA E EN  
DIFERENTES FLAVIVIRUS

PE1	I	100																				
	S	000																				
	N	100																				
PEJAM	I	67.87	100																			
	S	24.44	000																			
	N	73.5	100																			
PEPR	I	68.69	96.36	100																		
	S	23.84	2.83	000																		
	N	74.1	90.8	100																		
PEGUI	I	67.07	96.97	66.46	100																	
	S	25.25	2.42	25.85	000																	
	N	73.7	95.4	91.8	100																	
PEMEX	I	64.65	96.36	87.68	91.72	100																
	S	24.24	2.83	3.64	3.63	000																
	N	74	90.6	96.9	91.2	100																
PE3	I	74.14	65.66	66.67	65.66	64.85	100															
	S	18.18	25.86	25.05	25.66	26.46	000															
	N	74.6	72	72.1	71.7	72.7	100															
PE4	I	60.80	61.29	61.82	60.00	59.19	56.65	100														
	S	28.50	24.80	30.10	32.73	27.67	24.22	000														
	N	72.8	73.6	73.5	73.3	73.1	71.9	100														
PEFA	I	40.80	37.92	38.72	42.34	41.39	39.16	36.98	100													
	S	29.00	29.94	32.73	31.01	26.93	33.94	31.21	000													
	N	52.3	52.9	52.4	52.9	52.4	63.2	57.1	100													
PEEJ	I	49.60	45.83	25.79	44.93	46.03	46.52	43.85	43.25	100												
	S	30.35	35.71	33.73	29.82	32.14	41.35	34.52	35.12	000												
	N	59.2	59.4	59.5	60.3	52.9	54	57.8	54.2	100												
PEEAG	I	38.31	29.08	36.93	35.47	36.67	36.38	36.74	40.63	38.23	100											
	S	30.25	29.50	33.59	32.16	30.00	29.96	33.20	34.71	37.45	000											
	N	52.2	52.7	51.8	55.7	51.8	52.3	52.4	60.2	66.8	100											
PESL	I	49.00	45.04	46.23	46.82	46.73	47.13	45.24	44.27	70.46	40.98	100										
	S	34.72	35.91	32.94	25.00	27.52	27.32	35.52	29.64	17.96	28.81	000										
	N	53.9	59.7	60.9	59.6	54.2	54.3	61.4	54	72.8	67.9	100										
		PE1	PEJAM	PEPR	PEGUI	PEMEX	PE3	PE4	PEFA	PEEJ	PEEAG	PESL										

Tabla II

HOMOLOGIA DE AMINOACIDOS DE DIFERENTES SEROTIPOS DEL VIRUS DEL DENGUE

	rC																	rPM	
D2	NGC	1	MHWKRRKARN	TPFNMLKRER	NRVSTVOOLT	KRFSLGMLOG	RGPLKLFMAL	VAFRLFLTIP	PTAGILKRWG	TIKKSRAINW	LRGFRKEIGR	MLNMLKRRRR	TAGMIHMLIP	TYMAFHLLTR	120				
D2	JAM		.....S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....V.....	.....A.....					
D2	P.R		..D.....	.....	.....	.....	.....	.....H.....	.....	.....	.....	.....	.....H.....	.....					
D2	MEX		..D.....	M.....	DK I.....	.....	.....S.....	.....E.....	.....	.....	.....	.....	.....Y...T	.....I.....	.....P.....				
D1			.....TGR	PS.....	A.....	S...A	...K.L.S	Q..M..V..F	I.....	A.....	A.....	SF..NG..K	...K...SN	...M...K	SVT.LL..L	..AL.....			
D3			.....IGK	PSI.....	V.....	GS..A	...R.L.N	Q..M..V..F	I.....	A.....	V.A...	F...G..K	..K..K...SN	..S.I.K.KK	..SLCLM.ML	..ATL.....	..S.....		
D4			...VVR	P.....	.....	P.G.V	...T.LFS	K...RMVL.F	IT...V.S..	.....	OL..N...KI	..I.....	.....G.K	..STITLLC...	.....S.S..				
D2	NGC	121	NGEPHMIYSR	DEKGSLLFK	TEDGVNMCIL	MAMOLGELCE	DTITYKCPFL	KONEPEDIDC	WCHNSTSTWVT	YGTCTTTGEH	RREKRSVALV	PHVGMGLETR	TEIWMSEGA	WKHAORIETW	240				
D2	JAM		.....G	.....	.....	.....	.....L	R.....	.....	A.....	.....	.....	.....	.....V.....					
D2	P.R		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....					
D2	MEX		.....I	E.....	.....	.....	.....	.....H...	S.....	.....	.....	.....	.....	.....V.....					
D1			G.....	K	..R.....	SA.....	I.....	M.....	RI	TET..D.V..	..A.E...	..SQ..Q	..D.....	A.....	L..Q..	.....	..GI.KV...		
D3			D...R...	GK	N.R.....	AS.I.....	I.....	MCD	..V.....	HI	TEV.....	..L.....	..NOA...	..D.....	A.....	..D...	..Q...A...	..ROVEKV...	
D4			D...L...	AK	N.R.RP....	TE.I.K...	I.....	M...	..V.....	L	VNT.....	..L.....	M	..QS..R	.....	T	..S.....	A.....	.....V.S.
D2	NGC	241	ILRHMPGFTM	AAILAYTIGT	THFORALIFI	LLTAVAPSMT	MRCIGISNRO	FVEGVSGGSW	VDIVLEHGSC	VTTMRKNKPT	LDFEVIETEA	KOPATLRKYC	IEAKLTNTTT	DSRCPTOGEF	360				
D2	JAM		.....F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A.....	.....L.K...	.....S.....	.....	.....E.....					
D2	P.R		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A.....	.....L.K...	.....	.....	.....					
D2	MEX		.....F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A.....	.....L.KS...	.....	.....	.....					
D1			A.....	VI	..LF..HA...	SIT.KGI...	..ML.T...A	..V..G...	..L..AT	..V.....	..A.D...	..I.LLK..V	TH..VV..L	.....IS...	.....T				
D3			A.....	L	..LF..HY...	SLT.KVV...	..ML.T...	..V.VG...	..OGL..AT	..V.....	G	..A.....	..I.LOK...	T.L.....	L	..OG.I..I..	.....A		
D4			Q..N.R.	ALL	..CFM..M..O	GI..TVF.V	..MML...YG	..V.VG...	.....A	..L.....	G	..AOG.A	.....LTK.T	..EV.L..T..	..SIS.I..	..AT.....			
D2	NGC	361	SLNEEOOKRF	VCKHSMVDRG	WCHGCGLFK	GGIVTCAMFT	CKXNMKGKVV	OPENLEYTIV	ITPHSGEEHA	VGNDTGKHK	EIKITPOSSI	TEAELTGYGT	VTMECSPTIG	LDFNEMVLLQ	480				
D2	JAM		.....L	.....	.....	.....	.....E...	L.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....					
D2	P.R		T.....	.....	.....	.....	.....E..I	.....V.	.....	.....	.....V.....	.....	.....	.....					
D2	MEX		T.....	.....	.....	.....	.....E...	K..WK...	.....	.....	.....V.....	.....D.....	.....	.....					
D1			T.V....	TH	..RRTF....	.....	SLI...K.K	VIKLE..I	..Y...K.SVI	V.V.T.DQ.Q	..E.HE..T	TAT...APT	S..IO..D..A	L.LD.....	.....T				
D3			I.P....	OHY	.....TY....	..A.....	SL...K.O	..LESIE....	..H...K..VI	..V.T.DQ.Q	..E.OGVTA	..S.A.T	EA.I.PE...	LGL.....	..H...I..T				
D4			T.K....	OOY	I.RRDV....	.....	V...K.S	..SGKIT.ML	RI.....V.	V.V.N.DT..	.....SN.AV	TAM...R.PS	V.VK.PD..E	L.LD.E..LE	..Y...I.MK				
D2	NGC	481	MENKAWLVHR	QWFLDLPLPW	LPGADTOGSM	WIKKETLVTF	KNPXAKKQOV	VVLGSOEGAM	HTALTGATEI	OMSSGNLLFT	GHKCRLRMD	KLOLKGMSYS	HCTGKFKVVK	EIAETOHGTI	600				
D2	JAM		..D.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....					
D2	P.R		..KD.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....					
D2	MEX		..ND...R...	.....	.....	.....	.....R.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....K.....	.....	.....K.....					
D1			T..K.S...	K.....	TS..S.SOE	T.NROOL...	..TA.....E	.....	.....	.....	T.GTTI.A	.....K...	..T.....V	..S..LE..	..V.....V				
D3			..K...M...	..F.....	TS..T.KTPT	..NR..L...	..A.....E	.....	.....	.....	T.G.TSI.A	.....K...	..K.....A	..LNT.VLK	..VS.....				
D4			..KK.T...K	..N....	TA...SEVH	..NY..RM...	..V...R...	T..E.....	S..A...V	DSGD..HM.A	.....KV..E	..RI.....T	..S...SID	..M.....T					
D2	NGC	601	VIRVOYEGOG	SPCKIPFEIM	DLEKRVLGR	LITVNPVITE	KOSPVNIEAE	PPFGDSYIII	GVPEGOLKLN	WFKKGSISGO	MIETTHRGAK	RMAILGOTAW	HFGSLGGVFT	SIGKALHOVF	720				
D2	JAM		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....F.....	.....	.....D.....	.....					
D2	P.R		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....D	.....	.....F.....	.....D.....					
D2	MEX		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....D	.....A.....	.....F.....	.....D.....					
D1			LVO.K...	TD	A.....SSO	..EKGVIGN...	..A.....D	..EO.....	.....E...VV	..AGEKA...S	.....	..F.A.A...R	.....	..D...I.....	..V..L..I..				
D3			L.K.E.K.	ED	A.....STE	..GQKAKN...	..A..V..K	..EE.....O	.....E.N.V	..SGDKA..I	..YR.....K	..FOA.A...R	.....	..D...V...LN	..L..MV..I..				
D4			..VK.K...A	..A...V..I..R	..VW.EK.V..	..I.SST.LAEN	TH.VT...L	R.L...V.	..GNSA.T.N	..R.....K	..F.S.Y...	.....E...	..D...V...L..	..L...V..V.					
D2	NGC	721	GAITYGAAFSG	VSWINKILIG	VIIITWIGHMS	RSTLSVSLV	LVGVTLYLG	VMVOADSGCV	VSWKNKELKC	CSGIFITDNV	HWTEQYKFG	PESPSKLASA	IOKAHEEGIC	GIRSVTRLEN	840				
D2	JAM		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....					
D2	P.R		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....					
D2	MEX		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....					
D1			..A..VL...	..T...G..	ILL..L.L..	.....MTCI	A..M.....	.....	N..GR.....	.....V.NE.	.....	AD..KR.SA	..G..W...V.	.....A.....					
D3			..SAYT.L...	.....G..	LL...L..L..	KN..M.F.SI	AI..I.....	..V...	.....	.....	.....	.....	.....	.....					
D4			..SV.TTM.G.	..MIR...	FLVL...T..	..N..MAHTCI	A..GI..F..	FI...M.	.....	.....	.....	.....	.....	.....					

Fig. 36

na, los cuales son capaces de formar enlaces disulfuro, y pueden contribuir a la conservación de su estructura secundaria (Fig. 35).

El análisis de las regiones comparadas indica que las variaciones esperadas en la secuencia de aminoácidos aparentemente no se encuentran distribuidas uniformemente a lo largo de las proteínas, sino que existen dominios con mayor variabilidad y otros muy conservados.

PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA. En la Tabla III se muestran la composición de los motivos estructurales predichos para las 4 proteínas de dengue-2 mexicano obtenidas por diferentes métodos, así como la predicción conjunta.

#### Proteína "C".

En la predicción conjunta observamos que esta proteína está constituida por un 38% de hélice  $\alpha$ , 27% de  $\beta$ -plegada, 4% de giro  $\beta$  y 31% de ENR Tabla III. Distribuidas a lo largo de la secuencia hay 5 regiones para  $\alpha$ , 5 para  $\beta$ , 1 para giro  $\beta$  y 6 ENR. Las estructuras se encuentran divididas de acuerdo a sus características físico-químicas de la manera siguiente: (Fig. 37a, b y 38) una estructura  $\alpha$ , una hidrofóbica (49-55) y 4 hidrofílicas (1-7, 12-21, 64-72, 82-92). Estas tres últimas están predichas en una región polar y flexible. Las estructuras  $\beta$  se encontraron de la siguiente manera: una hidrofóbica (45-48) y 4 hidrofílicas (23-30, 78-81, 93-98, 103-

PORCENTAJE DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LAS PROTEINAS ESTRUCTURALES DE DENGUE 2 MEXICANO POR DIFERENTES METODOS DE PREDICCION

PROTEINA DE NUCLEOCAPSIDE C					
MET	% $\alpha$	% $\beta$	%GIROS	%ENR	% $\alpha+\beta$
Ch&F	22	31	19	28	53
D&R	45	13	4	38	58
L	42	18	5	35	60
G	34	39	6	21	73
G&G	31	23	46		54
MCF	44	42	12	2	86
GM	43	32	8	17	75

PROTEINA PRECURSORA DE M					
MET	% $\alpha$	% $\beta$	%GIROS	%ENR	% $\alpha+\beta$
Ch&F	14	22	41	23	36
D&R	13	14	32	41	27
L	16	14	3	67	30
G	34	14	30	22	48
G&G	19	16	65		35
MCF	33	16	23	28	49
GM	39	8	45	8	47

PROTEINA DE MEMBRANA M					
MET	% $\alpha$	% $\beta$	%GIROS	%ENR	% $\alpha+\beta$
Ch&F	12	53	24	11	65
D&R	31	25	0	44	56
L	28	37	0	35	65
G	19	24	9	48	43
G&G	19	19	62		38
MCF	52	39	7	2	91
GM	60	23	0	17	83

PROTEINA DE ENVOLTURA E					
MET	% $\alpha$	% $\beta$	%GIROS	%ENR	% $\alpha+\beta$
Ch&F	15	30	34	21	36
D&R	28	17	21	32	40
L	25	24	9	42	40
G	42	20	16	22	61
G&G	31	23	46		54
MCF	45	21	27	7	66
GM	53	17	13	17	70

PREDICCION CONJUNTA DE LAS PROTEINAS ESTRUCTURALES DE DENGUE 2 MEXICANO

	% $\alpha$	% $\beta$	%GIROS	%ENR	% $\alpha+\beta$
C	38	27	4	31	65
PrM	44	5	32	19	49
M	33	21	0	45	54
E	39	16	22	21	55

Tabla III

PREDICCIÓN ESTRUCTURA SECUNDARIA  
DE LA PROTEINA C

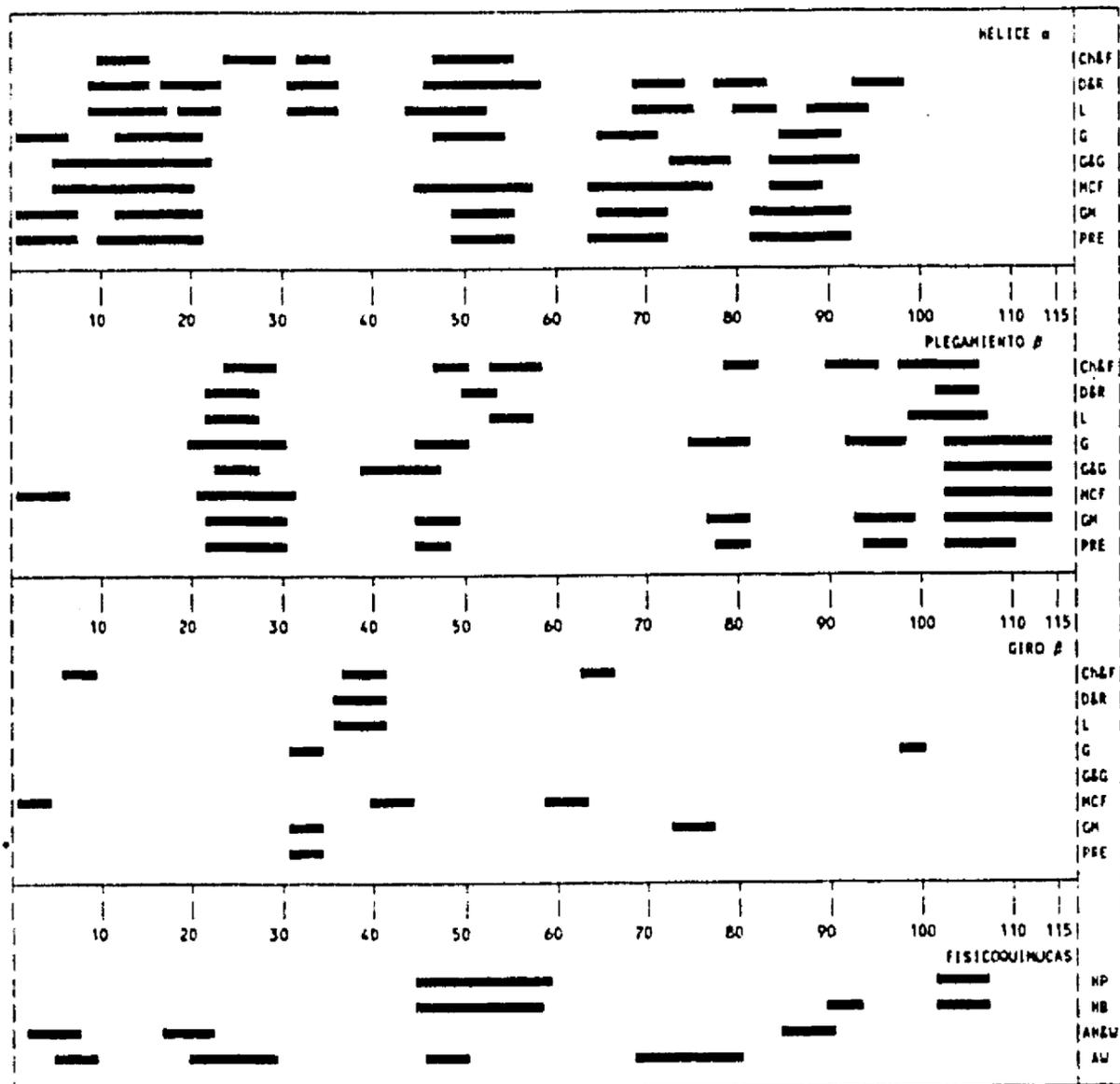


Fig. 37a

ESTRUCTURAS DE LA PROTEINA C

Numero de Residuo	Estructura Predicha	Longitud	Comentarios
1-7	$\alpha$	7	▲H1, ▲Po, ▲Flex
8-11	ENR	4	▲H1
12-21	$\alpha$	10	▲H1, †Po, ▲Flex
22-30	$\beta$	9	▲H1, †Flex
31-34	G	4	†H1, ▲Flex
35-44	ENR	10	†H1, ▲Flex
45-48	$\beta$	4	▲Hp
49-55	$\alpha$	7	▲Hp
56-63	ENR	8	▲Hp, ▲Flex
64-72	$\alpha$	9	▲H1
73-77	ENR	5	▲H1, ▲Flex(pico)
78-81	$\beta$	4	▲H1
82-92	$\alpha$	11	▲H1, ▲Flex
93-98	$\beta$	6	▲H1
99-102	ENR	4	▲H1, ▲Flex
103-110	$\beta$	8	▲Hp
111-114	ENR	4	▲Hp

Fig. 37b

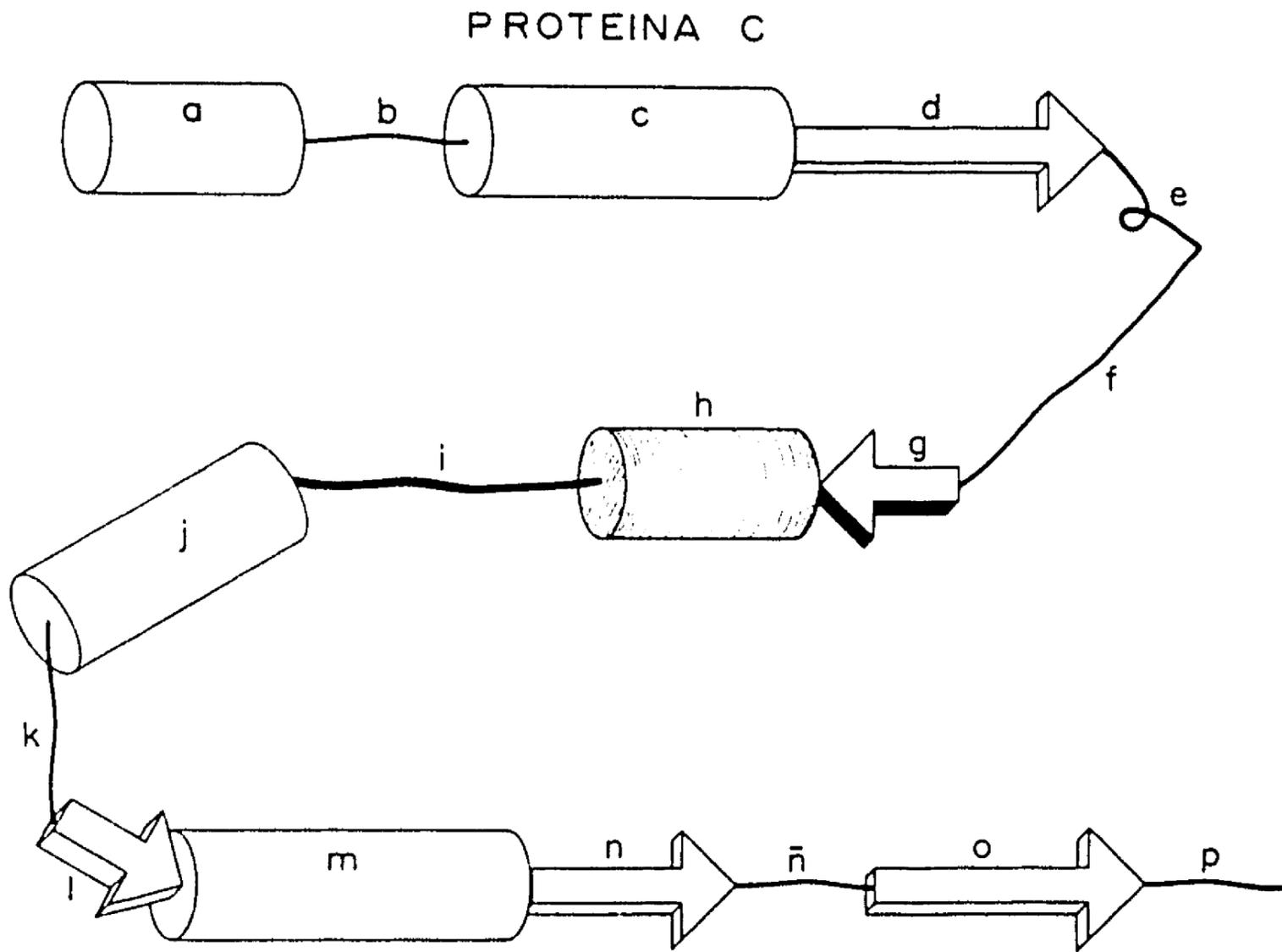


Fig. 38

110). El único giro es parcialmente hidrofílico y flexible (31-34). Es importante resaltar que de 9 picos de flexibilidad 3 son estructuras  $\alpha$ , uno es  $\beta$ , uno es giro  $\beta$  y 4 son estructuras al azar. En esta proteína existe una región muy conservada e hidrofóbica que va del residuo 45 al 63 (Figs. 28a y 28b) la cual proponemos sea la parte central de la misma sobre la cual puede plegarse la nucleoproteína. Según Hoop/Wood (Fig. 28d) se encuentran 8 regiones antigénicas que corresponden a los 8 picos de flexibilidad de acuerdo a Karplus (28c), encontrándose asociados a los principales picos hidrofílicos de esta proteína (Fig. 28c).

### Proteína PrM.

En la predicción conjunta (Tabla III) se observa que esta proteína contiene un 44% de hélices  $\alpha$ , 5% de plegamiento  $\beta$ , 32% de giros  $\beta$  y 19% de ENR. Distribuidos en la secuencia existen 4 segmentos de ENR. De acuerdo a sus características fisicoquímicas estas estructuras se distribuyen de la siguiente manera (Fig. 39a, b y 40): 3 hidrofílicas y una anfipática. El plegamiento  $\beta$  fue hidrofóbico. Los giros  $\beta$  fueron hidrofílicos; las ENR se clasificaron 3 como hidrofílicas y una como anfipática. De los 9 picos de flexibilidad 3 son hélice  $\alpha$ , 4 son giros  $\beta$  y dos son ENR. Esta proteína es principalmente hidrofílica (Fig. 30c) que cuenta con 6 regiones altamente antigénicas y flexibles (Figuras 30d y c), y cuenta solamente con una región hidrofóbica pequeña que puede funcionar como el centro de la proteína (Fig. 30a y b).

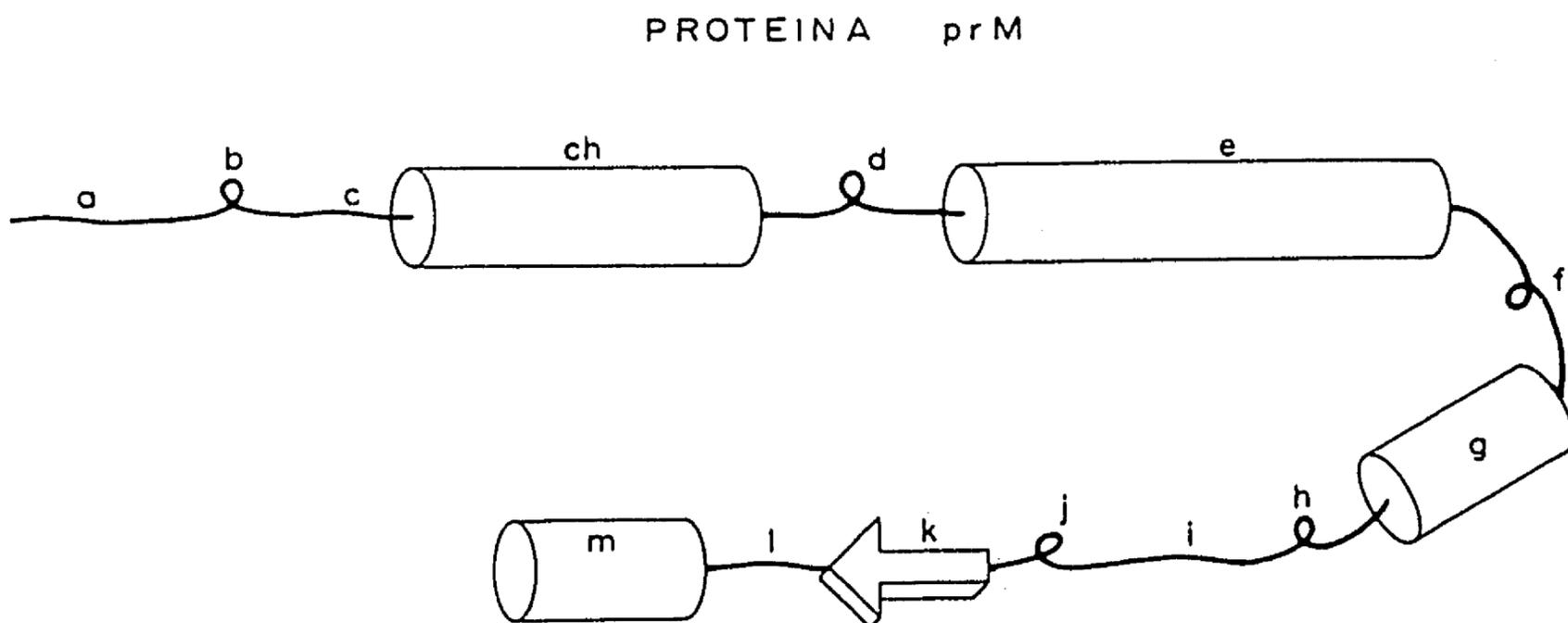


Fig. 40

PREDICION ESTRUCTURA SECUNDARIA  
PROTEINA PrM

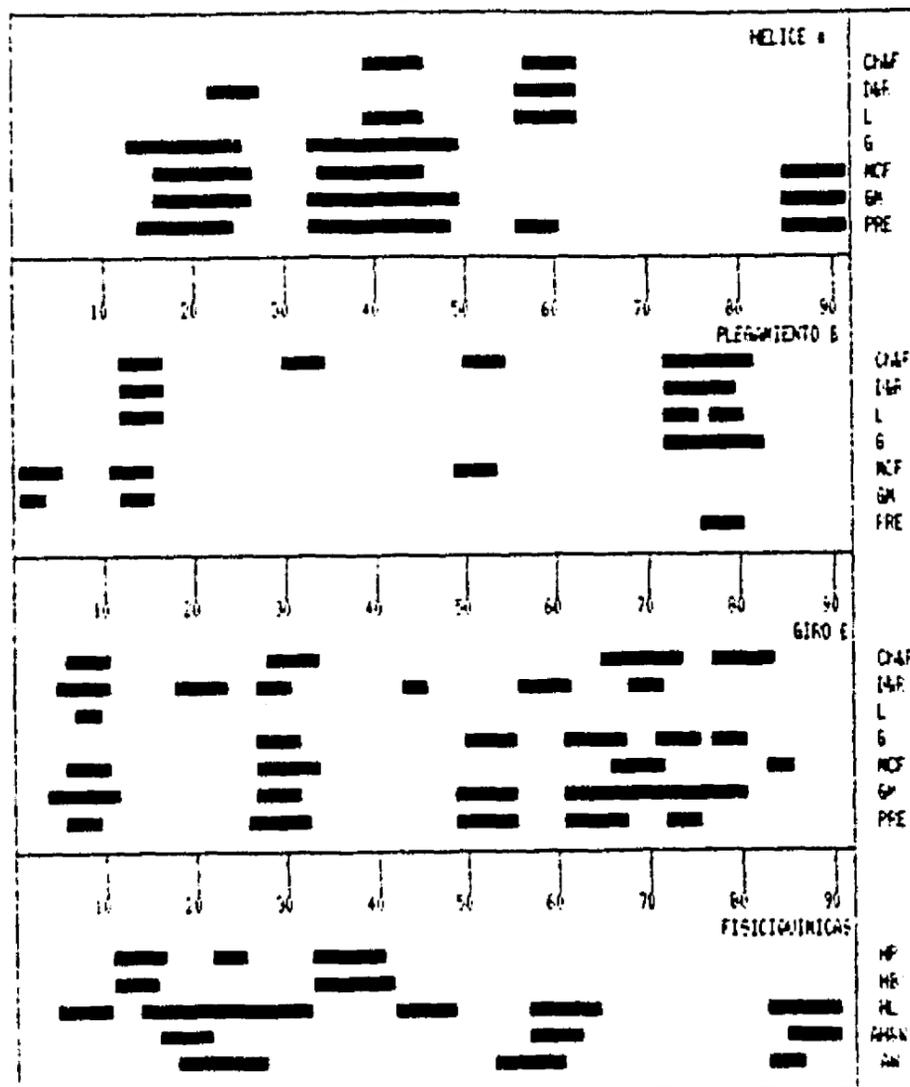


Fig. 39a

ESTRUCTURAS DE LA PROTEINA PrM

Numero de Residuo	Estructura Predicha	Longitud	Comentarios
1-5	ENR	5	▲H1, Hp
6-9	G	4	▲H1, ▲Flex
10-13	ENR	4	▲H1, ▲Flex
14-25	α	12	▲H1, ▲Po, ▲Flex
26-32	G	7	▲Flex
33-48	α	16	†H1, †Hp
49-55	G	7	▲H1, ▲Flex
56-62	α	7	▲H1, ▲Po, †Flex
63-67	G	5	▲H1
68-71	ENR	4	▲Flex(pico)
72-75	G	4	▲Flex
76-80	β	5	▲Hp
81-84	ENR	4	†Hp, H1
85-91	α	7	▲H1, ▲Po, ▲Flex

Fig. 39b

## Proteína M

La predicción de la proteína M (Tabla III) permite estimar un 33% de hélice  $\alpha$ , 21% de plegamiento  $\beta$ , 0% de giros  $\beta$  y 45% de ENR. A lo largo de la secuencia se encontraron (figuras 41a, b y 42) 3 estructuras de hélice  $\alpha$ , un plegamiento  $\beta$  y 4 ENR. Las 3 estructuras de hélice  $\alpha$  son hidrofóbicas; el plegamiento  $\beta$  es hidrofóbico y respecto a las ENR, dos son hidrofílicas y dos hidrofóbicas. Los tres picos de flexibilidad están repartidos en 3 ENR. La proteína M en su extremo amino terminal es principalmente hidrofílica (Fig. 32c) la cual contiene 3 regiones antigénicas y flexibles (Fig. 32d y c). El extremo carboxilo y no contiene regiones antigénicas ni flexibles, sin embargo en esta región se encuentra el segmento transmembranal de la molécula (Fig. 43a, b y 44).

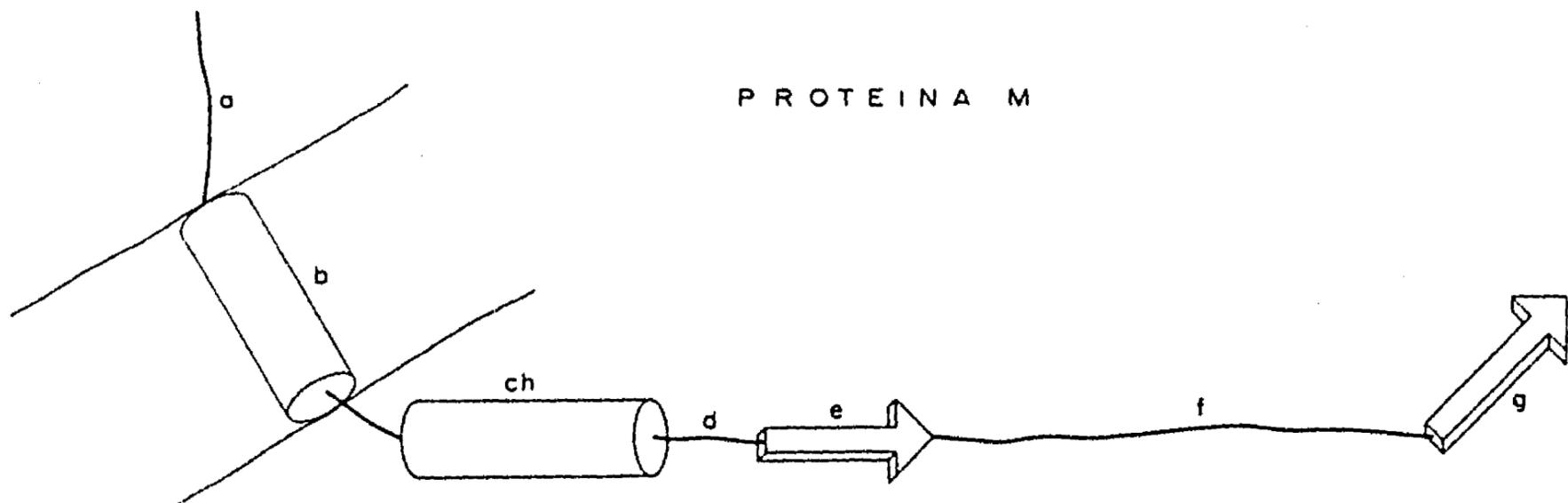


Fig. 42

PREDICCIÓN ESTRUCTURA SECUNDARIA  
DE LA PROTEINA M

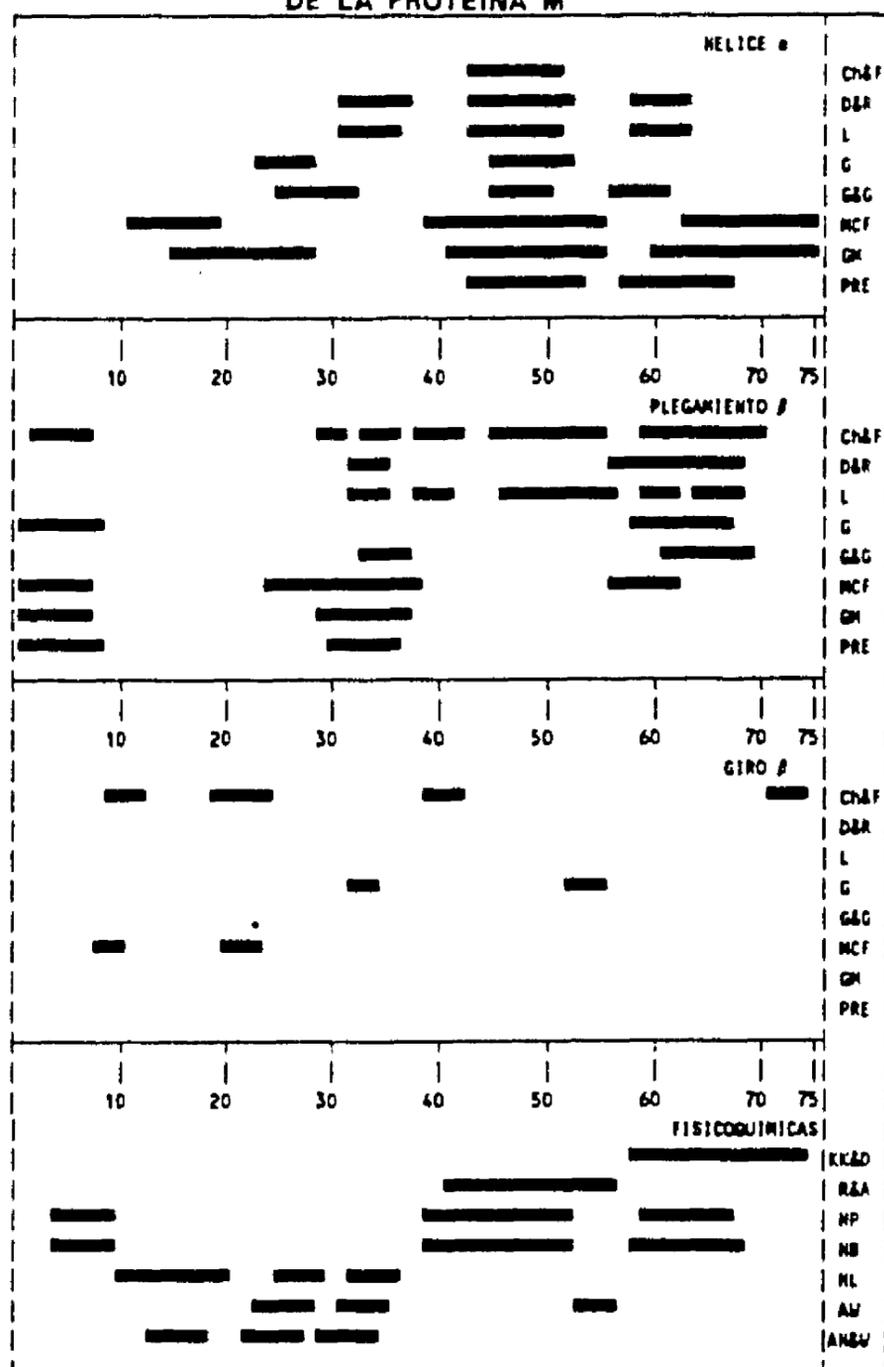


Fig. 41a

ESTRUCTURAS DE LA PROTEINA M

Numero de Residuo	Estructura Predicha	Longitud	Comentarios
1-8	$\alpha$	8	▲Hp
9-29	ENR	21	▲H1, †Po, ▲Flex(pico)
30-36	$\beta$	7	▲H1
37-42	ENR	5	▲Hp, ▲Flex
43-53	$\alpha$	11	▲Hp
54-56	ENR	3	▲Flex, †H1
57-67	$\alpha$	11	▲Hp
68-75	ENR	8	▲Hp

Fig. 41b

## Proteína E

De acuerdo a la predicción conjunta la proteína E (Tabla III) contiene un 39% de hélice  $\alpha$ , 16% de plegamiento  $\beta$ , 22% de giro  $\beta$  y 21% de ENR. A lo largo de la secuencia existen 18 regiones de hélice  $\alpha$  (8 hidrofílicas, 6 anfipáticas y 4 hidrofóbicas), 11 plegamientos  $\beta$  (4 hidrofílicos, 5 hidrofóbicos y 2 anfipáticos), 19 giros  $\beta$  (11 hidrofílicos, 5 hidrofóbicos y 3 anfipáticos) y 16 ENR (9 hidrofílicas, 2 hidrofóbicas y 4 anfipáticas) (Fig. 43a, b y 449). De los 10 picos de flexibilidad existentes en la molécula, 2 corresponden a estructuras  $\alpha$ , 7 A giros  $\beta$  y uno en ENR. De acuerdo a Hoop y Woods en esta proteína se encuentran aproximadamente 21 regiones antigénicas (Fig. 34d) relacionadas con los perfiles hidrofólicos (Fig. 34c) que corresponden a zonas flexibles (Fig. 34e). En la Fig. 34a se aprecian 2 regiones muy hidrofóbicas hacia el extremo amino terminal que podrían corresponder a la región central de la misma, alrededor del cual se podría estructurar esta glicoproteína y 2 regiones hacia el extremo carboxilo terminal que corresponden a las regiones transmembranales, de acuerdo a las predicciones para hélices de membrana que se aprecian en la Fig. 34f y 34g.

PREDICCIÓN CONJUNTA PARA LA PROTEÍNA E DE 10 DIFERENTES FLAVIVIRUS. Los resultados tanto de las predicciones individuales para cada flavivirus como de la predicción conjunta se encuentran resumidos en la Tabla IV, Figs. 45, 46 y 47.

## ESTRUCTURAS DE LA PROTEINA E DE DENGUE 2 MEXICANO

Numero de Residuo	Estructura Predicha	Longitud	Comentarios				
1-5	$\beta$	5		231-236	ENR	6	$\Delta$ HI, $\Delta$ Po
6-9	G	4	$\Delta$ HI	237-247	$\alpha$	11	$\Delta$ HI, 1Po
10-14	$\beta$	5	$\Delta$ HI	248-253	$\beta$	6	$\Delta$ HI
15-19	G	5	$\Delta$ Hp	254-258	G	5	$\Delta$ Hp, $\Delta$ Flex(pico)
20-25	$\beta$	6	$\Delta$ Hp	259-267	ENR	9	1HI, $\Delta$ Po
26-29	G	4	$\Delta$ Hp	268-273	$\alpha$	6	$\Delta$ HI
30-35	$\beta$	6	$\Delta$ HI	274-277	G	4	$\Delta$ Hp
36-39	G	4	$\Delta$ HI, $\Delta$ Po	278-287	ENR	10	$\Delta$ HI, 1Hp
40-44	ENR	5	$\Delta$ HI	288-294	$\alpha$	7	$\Delta$ HI
45-56	$\alpha$	12	$\Delta$ HI, $\Delta$ Po, $\Delta$ Flex	295-303	G	9	1HI, Hp
57-60	ENR	4	$\Delta$ HI	304-309	$\beta$	6	$\Delta$ HI
61-67	$\alpha$	7	$\Delta$ HI	310-318	$\alpha$	9	$\Delta$ HI, $\Delta$ Po
68-76	G	9	$\Delta$ HI, $\Delta$ Po, $\Delta$ Flex	319-325	$\beta$	7	$\Delta$ Hp
77-81	ENR	5	$\Delta$ HI, $\Delta$ Flex	326-335	G	10	$\Delta$ HI, $\Delta$ Po, $\Delta$ flex
82-88	$\alpha$	7	$\Delta$ HI(pico), $\Delta$ Po(pico), $\Delta$ Flex	336-345	$\alpha$	10	$\Delta$ HI, 1Po
89-96	ENR	8	$\Delta$ HI	346-349	ENR	4	$\Delta$ HI
97-109	G	13	1HI	350-360	$\beta$	11	1HI, 1Po
110-125	$\alpha$	16	1Hp, 1Po	361-365	G	5	$\Delta$ HI, $\Delta$ Po, $\Delta$ flex
126-135	ENR	10	$\Delta$ HI, $\Delta$ Po	366-371	$\alpha$	6	$\Delta$ HI
136-143	$\beta$	8	1HI, 1Hp	372-375	G	4	1HI, 1Hp
144-147	G	4	$\Delta$ HI, $\Delta$ Po	376-382	$\beta$	7	$\Delta$ Hp
148-153	$\alpha$	6	$\Delta$ HI, 1Po	383-386	ENR	4	$\Delta$ HI
154-158	G	5	$\Delta$ HI, $\Delta$ Po	387-394	$\alpha$	7	$\Delta$ HI
159-166	ENR	8	$\Delta$ HI, $\Delta$ Po	395-400	ENR	6	$\Delta$ HI
167-169	G	3	$\Delta$ HI, $\Delta$ flex	401-416	$\alpha$	16	$\Delta$ HI, 1Po
170-176	$\alpha$	7	$\Delta$ HI, 1Po	417-420	ENR	4	$\Delta$ HI, 1Hp
177-184	$\beta$	8	$\Delta$ Hp	421-424	G	4	$\Delta$ Hp
185-191	G	6	$\Delta$ HI	425-435	$\alpha$	11	$\Delta$ Hp
192-200	$\alpha$	9	$\Delta$ Hp	436-439	ENR	4	$\Delta$ Hp
201-207	ENR	17	$\Delta$ HI, $\Delta$ Po	440-470	$\alpha$	30	$\Delta$ Hp
208-213	$\beta$	6	$\Delta$ Hp	471-475	G	5	$\Delta$ HI, $\Delta$ Po, $\Delta$ flex
214-223	ENR	9	$\Delta$ Hp	476-495	$\alpha$	19	$\Delta$ Hp(pico)
224-230	G	7	$\Delta$ HI, $\Delta$ Po, $\Delta$ flex				

PROTEINA E

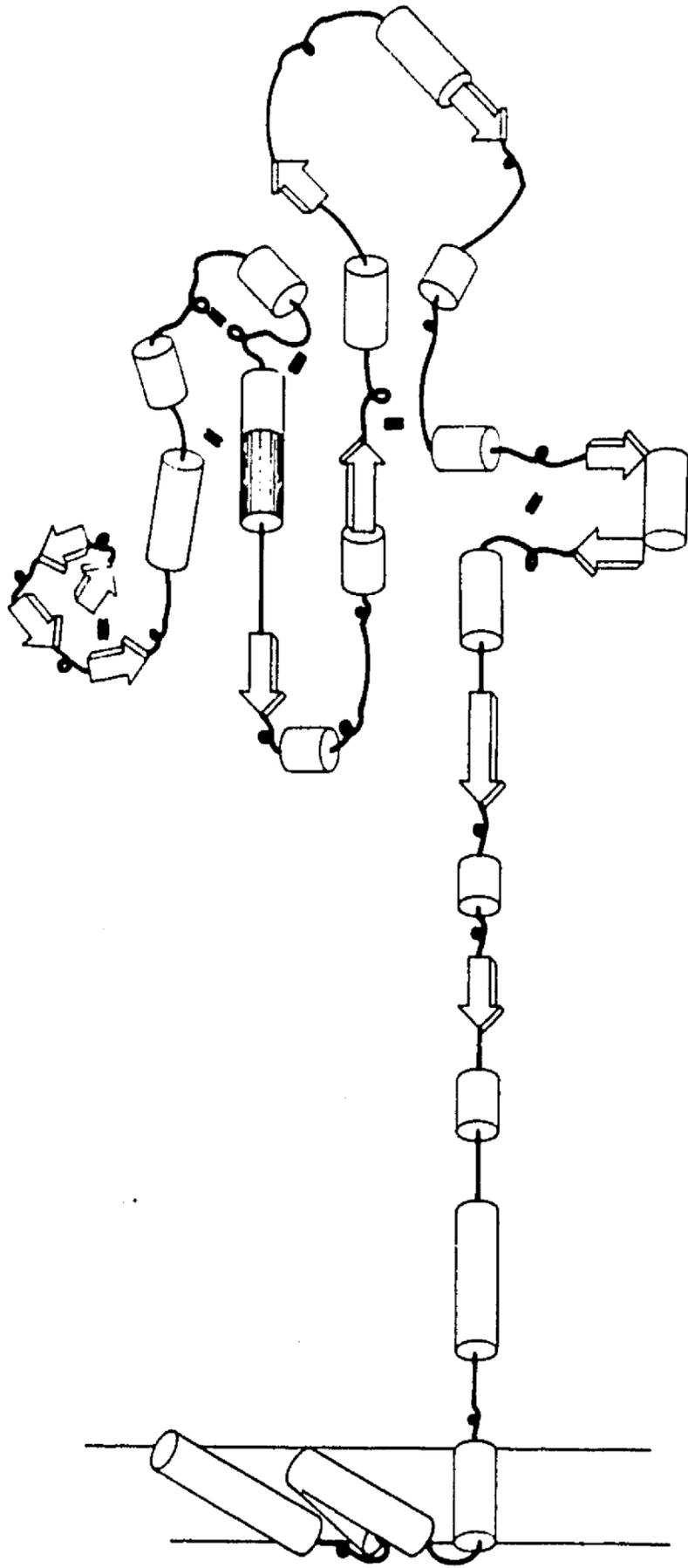


Fig. 44

PROTEINA DE ENVOLTURA E ENCEFALITIS ACARREADA POR GARRAPATA					
MET	$\alpha$	$\beta$	GIROS	ENR	$\alpha+\beta$
Ch&F	22	35	34	9	57
D&R	45	6	18	41	51
L	46	13	2	39	59
G	23	25	17	35	48
G&G	14	18	68		32
MCF	15	21	21	43	36
GM	20	16	13	55	38

PROTEINA DE ENVOLTURA E DENGUE 1					
MET	$\alpha$	$\beta$	GIROS	ENR	$\alpha+\beta$
Ch&F	30	42	26	2	72
D&R	35	20	14	31	55
L	50	19	3	28	69
G	30	23	13	34	53
G&G	17	22	61		39
MCF	16	31	21	32	47
GM	14	12	28	46	26

PROTEINA DE ENVOLTURA E DE FIEBRE AMARILLA					
MET	$\alpha$	$\beta$	GIROS	ENR	$\alpha+\beta$
Ch&F	30	36	32	2	68
D&R	49	10	19	22	59
L	56	29	2	13	85
G	23	27	7	43	50
G&G	13	25	62		38
MCF	26	18	23	20	58
GM	21	17	7	55	38

PROTEINA DE ENVOLTURA E DENGUE 2 JAMAICA					
MET	$\alpha$	$\beta$	GIROS	ENR	$\alpha+\beta$
Ch&F	25	32	35	8	57
D&R	44	11	18	27	55
L	50	21	6	77	71
G	22	32	11	35	54
G&G	25	14	61		39
MCF	32	14	16	40	46
GM	28	14	9	51	39

PROTEINA DE ENVOLTURA E DENGUE 4					
MET	$\alpha$	$\beta$	GIROS	ENR	$\alpha+\beta$
Ch&F	22	37	32	9	59
D&R	41	14	18	27	55
L	45	18	2	35	63
G	29	26	9	36	54
G&G	19	22	59		41
MCF	27	17	20	36	44
GM	28	21	12	39	49

PROTEINA DE ENVOLTURA E DENGUE 1					
MET	$\alpha$	$\beta$	GIROS	ENR	$\alpha+\beta$
Ch&F	32	35	32	1	67
D&R	43	14	25	18	57
L	46	15	1	38	61
G	28	24	10	38	52
G&G	17	18	65		35
MCF	30	17	16	37	47
GM	26	17	13	44	36

PROTEINA DE ENVOLTURA E DENGUE 2 DE PUERTO RICO					
MET	$\alpha$	$\beta$	GIROS	ENR	$\alpha+\beta$
Ch&F	21	35	32	11	57
D&R	43	12	23	22	55
L	48	26	7	19	74
G	28	22	11	39	50
G&G	18	19	63		37
MCF	28	14	20	38	42
GM	26	14	9	51	40

PROTEINA DE ENVOLTURA E DENGUE 2 NUEVA GUINEA					
MET	$\alpha$	$\beta$	GIROS	ENR	$\alpha+\beta$
Ch&F	23	38	34	5	61
D&R	43	11	23	23	54
L	46	20	7	27	66
G	24	25	13	38	49
G&G	19	21	60		40
MCF	29	17	20	51	46
GM	24	15	10	51	39

PROTEINA DE ENVOLTURA E ENCEFALITIS JAPONESA					
MET	$\alpha$	$\beta$	GIROS	ENR	$\alpha+\beta$
Ch&F	17	34	39	10	51
D&R	41	9	22	28	50
L	43	18	4	35	61
G	16	20	15	49	36
G&G	29	15	56		44
MCF	25	23	22	20	58
GM	14	20	14	52	34

PROTEINA DE ENVOLTURA E ENCEFALITIS DE SAN LUIS					
MET	$\alpha$	$\beta$	GIROS	ENR	$\alpha+\beta$
Ch&F	23	30	46	1	53
D&R	38	18	21	23	56
L	34	15	3	48	49
G	30	11	13	46	41
G&G	11	14	75		25
MCF	21	15	24	40	36
GM	28	11	12	49	39

	$\alpha$	$\beta$	G	ENR
PEJAM	13: 7 HL 4 Hp, 2 ANF	10: 4 HL 4 Hp, 2 ANF	10: 8 HL 2 Hp	19: 14 HL 4 Hp, 1 ANF
PEGUI	12: 6 HL 4 Hp, 2 ANF	10: 5 HL 4 Hp, 1 ANF	13: 10 HL 1 Hp, 2 ANF	13: 9 HL 4 Hp
PEPR	11: 6 HL 4 Hp, 1 ANF	9: 6 HL 3 Hp	10: 6 HL 3 Hp, 1 ANF	16: 14 HL 2 Hp
PE1	13: 9 HL 3 Hp, 1 ANF	9: 6 HL 3 Hp	12: 10 HL 2 Hp	23: 16 HL 6 Hp, 1 ANF
PE3	12: 4 HL 4 Hp, 4 ANF	8: 5 HL 2 Hp, 1 ANF	12: 9 HL 2 Hp, 1 ANF	22: 13 HL 5 Hp, 4 ANF
PE4	11: 5 HL 3 Hp, 3 ANF	12: 6 HL 3 Hp, 1 ANF	9: 5 HL 2 Hp, 2 ANF	25: 12 HL 4 Hp, 9 ANF
PEFA	12: 3 HL 2 Hp, 7 ANF	12: 5 HL 3 Hp, 4 ANF	10: 9 HL 1 ANF	18: 12 HL 2 Hp, 4 ANF
PEEAG	12: 6 HL 4 Hp, 2 ANF	10: 2 HL 4 Hp, 4 ANF	15: 10 HL 5 Hp	26: 12 HL 6 Hp, 8 ANF
PESL	10: 6 HL 3 Hp, 1 ANF	11: 5 HL 6 Hp	13: 10 HL 1 Hp, 2 ANF	11: 9 HL 2 Hp
PEEJ	11: 2 HL 7 Hp, 2 ANF	10: 9 Hp 1 ANF	15: 6 HL 9 Hp	19: 6 HL 13 Hp

PREDICCION CONJUNTA DE LAS PROTEINAS DE ENVOLTURA DE DISTINTOS FLAVIVIRUS					
PROT	$\alpha$	$\beta$	GIROS	ENR	$\alpha+\beta$
PEJAM	33	12	14	41	45
PEGUI	38	21	21	20	59
PEPR	39	13	18	30	52
PE1	39	14	11	36	53
PE3	32	14	16	38	46
PE4	38	13	6	43	51
PEFA	33	14	12	41	47
PEEAG	35	14	16	35	49
PESL	25	22	23	30	47
PEEJ	24	22	24	30	46

MET = METODO, Ch&F = CHOU Y FASMAN (30,31), D&R = DELEAGE Y ROUX (36) L = LEVITT (37), G = GARNIER (32), G&G = GASCUEL Y GOLMARD, MCF = CHOU Y FASMAN MODIFICADO, GM = GARNIER MODIFICADO. PROT = PROTEINA, PEJAM = PROT. E DENGUE 2 JAMAICA, PEGUI = PROT. E DEN-2 N. GUINEA, PEPR = PROT. E DEN-2 P. RICO, PEEX = PROT. E DEN-2 MEXICO, PE1 = PROT. E DEN-1, PE3 = PROT. E DEN-3, PE4 = PROT. E DEN-4 PEFA = PROT. E FIEBRE AMARILLA, PEEAG = PROT. E ENCEFALITIS ACARREADA POR GARRAPATA, PESL = PROT. E ENCEFALITIS DE SAN LUIS, PEEJ = PROT. E ENCEFALITIS JAPONESA. H1 = HIDROFILICIDAD. Hp = HIDROPATIA. ANF = ANFIPATICA.

Tabla IV

Fig. 45a

PE1	$\beta(1-5)$ HL	ENR(6-18)HL	$\beta(19-26)$ Hp	G(27-30)Hp	$\alpha(40-64)$ HL	G(65-73)HL	$\alpha(78-89)$ HL	G(99-105)HL	$\alpha(115-124)$ HL	$\beta(137-144)$ HL
PE3	$\beta(1-5)$ HL	ENR(6-14)HL	$\beta(15-25)$ Hp	G(26-30)HL	$\alpha(42-57)$ Anf	G(69-73)HL	$\alpha(78-89)$ HL	G(98-104)HL	$\alpha(117-134)$ HL	$\beta(135-145)$ Hp
PEGU1	$\beta(1-5)$ HL	ENR(6-11)HL	$\beta(20-29)$ Hp	G(26-30)Hp	$\alpha(38-54)$ HL	G(61-82)HL	$\alpha(83-93)$ HL	G(94-112)Hp	$\alpha(115-123)$ Hp	$\beta(136-142)$ Hp
PEJAM	$\beta(1-5)$ HL	ENR(6-14)HL	$\beta(20-25)$ Hp	G(26-30)Hp	$\alpha(40-52)$ HL	G(70-76)HL	$\alpha(83-90)$ HL	G(98-106)HL	$\alpha(116-123)$ Anf	$\beta(138-142)$ Hp
PEPR	$\beta(1-5)$ HL	ENR(6-11)HL	$\beta(20-25)$ Hp	G(26-30)Hp	$\alpha(38-52)$ HL	G(59-82)HL	$\alpha(83-95)$ HL	G(96-114)Hp	$\alpha(115-127)$ Hp	$\beta(137-142)$ Hp
PEMEX	$\beta(1-5)$ HL	.....	$\beta(20-25)$ Hp	G(26-29)Hp	$\alpha(44-57)$ HL	G(68-77)HL	$\alpha(81-89)$ HL	G(97-109)HL	$\alpha(109-125)$ Hp	$\beta(136-142)$ HL
PE4	$\beta(1-5)$ HL	ENR(6-20)Anf	$\beta(21-24)$ Hp	G(27-29)Hp	$\alpha(34-64)$ Anf	G(75-77)HL	$\alpha(78-89)$ HL	.....	.....	$\beta(138-143)$ Hp
PEEJ	.....	.....	$\beta(19-25)$ Hp	G(26-30)Hp	$\alpha(46-57)$ Hp	G(58-62)HL	$\alpha(79-86)$ HL	G(97-115)Hp	.....	$\beta(136-147)$ Anf
PEESL	.....	ENR(1-18)Anf	$\beta(19-25)$ Hp	G(26-29)Hp	$\alpha(40-58)$ HL	.....	.....	G(98-115)anf	$\alpha(116-126)$ HL	$\beta(139-147)$ Hp
PEFA	$\beta(1-6)$ HL	ENR(7-23)HL	.....	.....	$\alpha(44-58)$ Anf	G(72-77)HL	$\alpha(78-86)$ HL	G(97-106)HL	$\alpha(112-134)$ Anf	$\beta(135-141)$ Anf
PEEAG	.....	ENR(5-7)HL	$\beta(16-26)$ Hp	G(27-29)Hp	$\alpha(42-72)$ HL	.....	$\alpha(81-88)$ HL	G(96-105)HL	$\alpha(118-126)$ HL	$\beta(135-143)$ HL

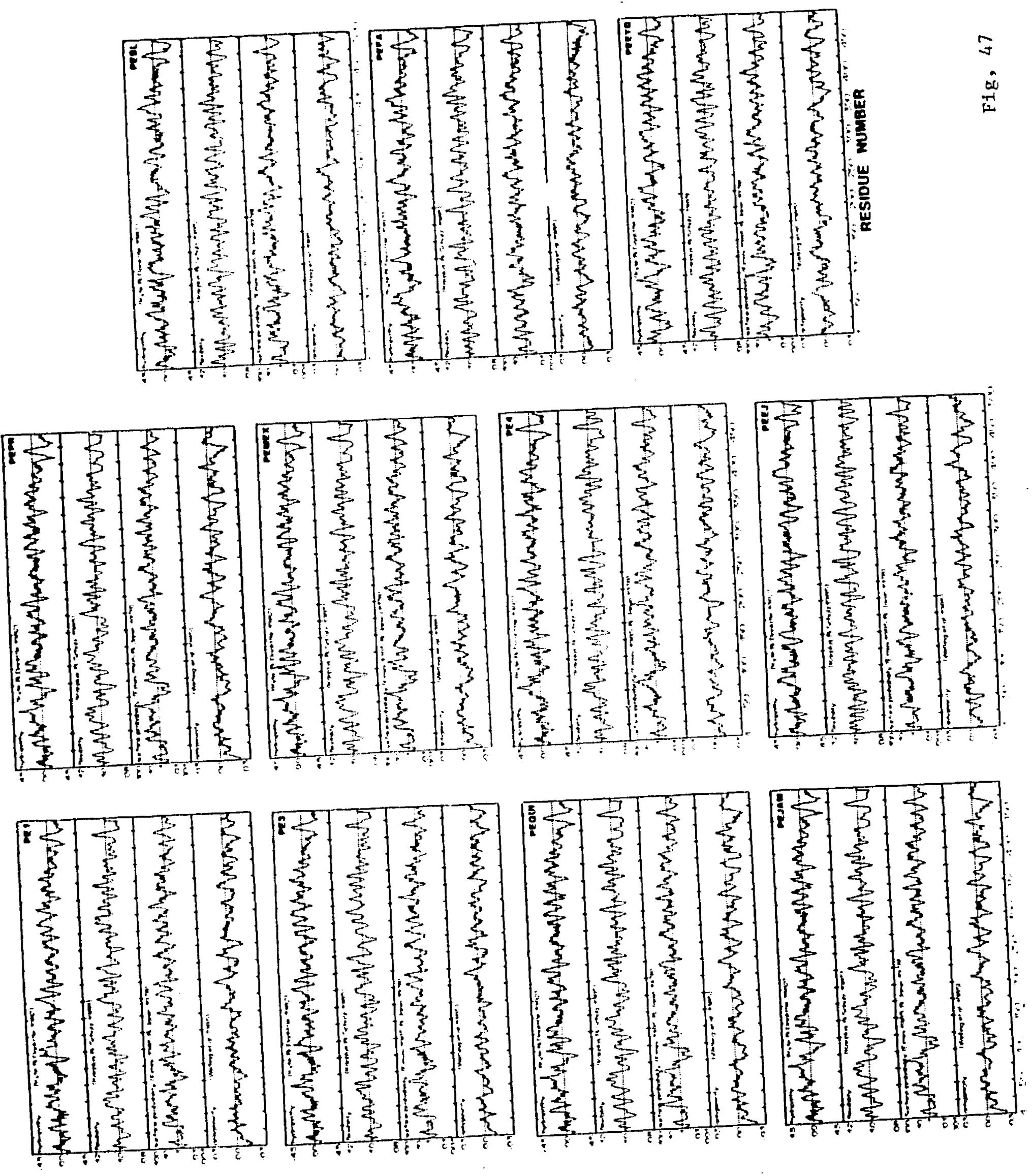
PE1	ENR(144-176)HL	$\alpha(190-210)$ Hp	$\alpha(255-266)$ Anf	ENR(267-276)HL	$\alpha(305-312)$ HL	$\beta(319-325)$ HL	G(328-333)HL	$\beta(352-356)$ Hp
PE3	.....	$\alpha(192-214)$ Hp	$\alpha(230-264)$ Anf	ENR(265-278)HL	$\alpha(302-311)$ Anf	$\beta(318-323)$ Anf	G(324-331)HL	$\beta(347-353)$ HL
PEGU1	ENR(162-177)HL	$\alpha(192-210)$ Anf	$\alpha(254-266)$ Hp	ENR(267-280)Hp	$\alpha(303-319)$ HL	$\beta(320-326)$ Hp	G(327-335)HL	$\beta(350-360)$ Anf
PEJAM	ENR(142-170)HL	$\alpha(190-205)$ HL	$\alpha(254-270)$ HL	ENR(271-286)Anf	$\alpha(306-318)$ HL	$\beta(319-325)$ Anf	G(326-336)HL	$\beta(349-357)$ Hp
PEPR	.....	.....	$\alpha(254-266)$ HL	ENR(267-278)HL	$\alpha(304-318)$ Anf	$\beta(319-325)$ HL	G(326-334)HL	$\beta(350-360)$ HL
PEMEX	ENR(163-176)HL	$\alpha(191-200)$ Hp	.....	.....	$\alpha(309-318)$ HL	$\beta(319-325)$ Hp	G(326-335)HL	$\beta(350-360)$ HL
PE4	ENR(144-153)HL	$\alpha(184-210)$ Anf	$\alpha(257-266)$ Hp	ENR(267-270)Anf	$\alpha(307-318)$ HL	$\beta(319-324)$ HL	G(332-334)Anf	$\beta(347-353)$ Anf
PEEJ	ENR(160-175)Hp	.....	$\alpha(261-268)$ Hp	.....	$\alpha(305-312)$ Anf	$\beta(320-327)$ Hp	G(328-336)Anf	$\beta(350-363)$ Hp
PEESL	ENR(154-183)HL	$\alpha(205-222)$ HL	.....	ENR(263-280)HL	.....	$\beta(321-329)$ Hp	G(330-337)HL	$\beta(350-363)$ Hp
PEFA	ENR(162-184)HL	$\alpha(193-206)$ HL	$\alpha(256-263)$ Anf	ENR(273-275)HL	.....	$\beta(315-323)$ Anf	G(324-328)Anf	.....
PEEAG	ENR(160-165)HL	$\alpha(193-224)$ Anf	$\alpha(262-270)$ Hp	ENR(271-281)Anf	.....	.....	G(327-338)Anf	$\beta(353-358)$ Hp

PE1	$\alpha(396-416)$ HL	ENR(417-421)Hp	$\alpha(422-467)$ Hp	$\alpha(474-495)$ Hp
PE3	$\alpha(397-416)$ HL	ENR(417-432)Hp	$\alpha(447-465)$ Hp	$\alpha(475-493)$ Hp
PEGU1	$\alpha(400-415)$ Anf	ENR(416-422)Hp	$\alpha(429-467)$ Hp	$\alpha(474-494)$ Hp
PEJAM	$\alpha(404-415)$ HL	ENR(416-432)Hp	$\alpha(452-467)$ Hp	$\alpha(475-495)$ Hp
PEPR	$\alpha(404-416)$ HL	ENR(417-426)Hp	$\alpha(427-467)$ Hp	$\alpha(474-495)$ Hp
PEMEX	$\alpha(401-416)$ HL	ENR(417-420)HL	$\alpha(439-470)$ Hp	$\alpha(475-495)$ Hp
PE4	$\alpha(404-418)$ HL	ENR(419-431)Hp	$\alpha(449-466)$ Hp	$\alpha(478-494)$ Hp
PEEJ	.....	ENR(422-431)Hp	$\alpha(459-475)$ Hp	$\alpha(480-500)$ Hp
PEESL	$\alpha(407-422)$ Anf	ENR(413-418)Anf	$\alpha(454-478)$ Hp	$\alpha(482-501)$ Hp
PEFA	$\alpha(406-414)$ Anf	ENR(415-443)Anf	$\alpha(444-465)$ Hp	$\alpha(474-493)$ Hp
PEEAG	.....	.....	$\alpha(444-468)$ Hp	$\alpha(478-496)$ Hp

Fig. 45b



FIG. 47



## DISCUSION

Se analizó el grado de conservación de la estructura secundaria de la glicoproteína de capa externa de los Flavivirus secuenciados hasta la fecha, los cuales tienen una distribución geográfica diferente y pertenecen a grupos serológicos distintos, además de analizar y caracterizar a nivel primario, una cepa viral de dengue-2 que causó problemas epidemiológicos en nuestro país.

En referencia al aislado viral analizado cabe mencionar que éste nos fué enviado como una cepa probablemente variante a nivel antigénica, con base en el antecedente de que aunque reaccionaba con anticuerpos monoclonales contra serotipo-2 no era neutralizado con anticuerpos provenientes de líquido ascítico de ratón, dirigidos contra la cepa prototipo de referencia para dengue-2 (Nueva Guinea C); en nuestras manos este aislado mostró las mismas características. Posteriormente Monath y col. (73) encontraron que esta cepa mexicana era antigénicamente única por radioinmunoanálisis utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epitopes para serotipo-2, analizando la curva de unión con un modelo matemático y con predicciones estadísticas que determinan si la cepa en estudio esta relacionada con una "firma" común, localizando además los epitopes diferentes. Los autores encontraron que tanto con Nueva Guinea C como con cepas aisladas en Puerto Rico y el Caribe difería por lo menos en 3

epitopes, y de todos los demás topotipos de dengue-2 por lo menos en 5 epitopes (comunicación personal) (anexo 1). Esta técnica fue comparada por estos mismos autores con análisis de huella digital de RNA ("finger print"), observando que este aislado presentaba un patrón genómico muy parecido a los aislados de dengue-2 antes mencionados. El hecho de que difiera el análisis de firma (antigénico) y de huella de RNA difiera, no es sorprendente, ya que los genes que codifican las proteínas estructurales (antígenos) comprenden el 15% del total del genoma y en la técnica de huella digital del RNA se examina sólo del 10 al 15% del RNA total, sin que quiera decir que es la misma región la que se analiza, además de que no revela diferencias a nivel nucleotídico/antigénico o de localización en el genoma. Por lo anterior resultaba interesante para nosotros analizar esta cepa a nivel genómico.

La localización de las proteínas estructurales se determinó por comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la cepa prototipo para el serotipo-2 de dengue (Nueva Guinea C). Los resultados obtenidos indican que la organización del genoma es la misma que para otros Flavivirus reportados a la fecha. El extremo 5' del RNA genómico analizado contiene un marco abierto de lectura que inicia después de la posición 96 y codifica para 3 proteínas estructurales, las cuales se traducen en un producto poliproteínico cuyo orden ha sido previamente establecido por Rice, (22), Dalgarno (78) y Castle (27) de la manera siguiente: 5'-C-prM (M)-E-NSI-3'.

En el procesamiento de esta poliproteína podrían estar involucradas la actividad de 3 diferentes proteasas: una proteasa necesaria para remover el primer residuo de metionina del amino terminal de la proteína de la cápside (74); una proteasa situada en el lumen del retículo endoplásmico (75), la cual podría romper la poliproteína en el extremo carboxilo terminal de C, M y E, y una proteasa del Golgi (76) la cual ha sido implicada en la proteólisis de numerosas glicoproteínas virales en el sitio: Arg-X-Arg/Lis-Arg y asociada en la maduración de prM a M (39).

Por análisis de similitud de la región estructural observamos que existe una homología de aminoácidos entre cepas de dengue serotipo-2 que alcanza de un 92.86 a un 96.91% y con los otros serotipos de un 63.37 a un 70.55%. A nivel de secuencia nucleotídica de 90.6 a 96.9% y entre los otros serotipos del 71.9 al 74.6%. Se utilizó el método conjunto de predicción (77) que combina algoritmos basados en diferentes principios fisicoquímicos, heurísticos y estadísticos, con el propósito de conocer la distribución de los motivos estructurales a lo largo de la secuencia de las proteínas de nucleocápside, membrana o su precursor, y de envoltura viral, los cuales nos dan una idea del patrón de plegamiento. El análisis de la estructura secundaria aquí propuesto, en correlación con los algoritmos tanto de Taylor (78) como de Nakashima y col. (79), los cuales utilizan los porcentajes y la composición de aminoácidos de los motivos estructurales pre-

dichos para identificar diferentes familias estructurales, nos permitió clasificar a estas proteínas virales de la siguiente manera:

**C:** Es una proteína soluble, con un índice (Gravy)<sup>1</sup> de hidropatía de -1, que pertenece a la familia de las proteínas  $\alpha/\beta$ , (Fig. 38) compartiendo algunas de las características que distinguen a este grupo: un porcentaje de estructura alfa+beta mayor del 50% (65% en esta proteína) (78), un grado de alternancia de segmentos alfa-beta. Con una distancia del centro de la proteína que corresponde a esta familia. Llama la atención el elevado porcentaje de ENR (31%), del cual el 25% corresponde a zonas muy hidrofóbicas, lo que sugiere la posibilidad de que se encuentren en el interior de la proteína.

**PrM:** Es una proteína soluble que pertenece a la familia  $\alpha/\alpha$  (Fig. 40) con índice Gravy de -7.17. Se observan grandes zonas hidrofílicas, (Fig. 39a y b) que forman diferentes tipos de giros y ENR lo que hace a la molécula particularmente muy flexible.

**PROTEINA M:** Proteína de membrana, que pertenece a la familia  $\alpha+\beta$  (Fig. 42) con un índice Gravy de + 4.5, con una  $\alpha$  hélice muy, hidrofóbica que corresponde al segmento transmembranal

---

<sup>1</sup> Los valores negativos del índice de hidropatía son valores hidrofílicos.

de la molécula y regiones hidrofílicas en ENR, con gran flexibilidad, lo que favorece su interacción con otras moléculas.

PROTEINA E: Clasificada dentro de las proteínas de membrana, con un índice hidropático de - 1.27, que pertenece al tipo de proteínas  $\alpha/\beta$  (Fig. 44); presenta 3 pasos transmembranales (429-439, 444-474, y 481-500), que tanto en la predicción conjunta como en los métodos modificados de Chou-Fasman y Garnier (52,48) se consideraron como estructura alfa. Sin embargo, con los métodos tradicionalmente empleados para proteínas globulares estas zonas habían sido predichas como estructuras  $\beta$  debido al carácter hidrofóbico de las  $\beta$  plegadas que constituyen el centro de la proteína en la familia  $\alpha/\beta$ . Sin embargo, para justificar un arreglo transmembranal  $\beta$  estable se requieren de 6 a 8 cadenas  $\beta$  (barril  $\beta$ ) para permitir interacciones en un ambiente lipídico, ya que sus uniones de hidrógeno están dadas por interacción intercate-maria mientras que la hélice alfa es estable en forma aislada en un ambiente lipídico, ya que sus uniones de hidrógeno son intracadena, dando una estructura ordenada y estable. Por lo anterior se corrigió esta predicción utilizando los métodos de Rao y Argos (53), Eisenberg (55) y Klein (54) para segmentos transmembranales.

El análisis de estructura secundaria para la glicoproteína de capa externa de Flavivirus con una distribución geográfica

diferente que pertenecen a grupos serológicos distintos, se llevó a cabo de acuerdo a Higgins y Sharp (80), por medio de un alineamiento múltiple para máxima homología de la secuencia de aminoácidos de estas estructuras, ponderando las propiedades fisicoquímicas de aminoácidos similares. Los resultados que aquí presentamos indican que existe una divergencia a nivel de secuencia nucleotídica entre cepas de dengue-2 en una proporción del 8.8%; entre diferentes serotipos del mismo en un 3.1 a un 9.4%, y en relación a otros Flavivirus de un 25.9 a un 28.3%. Por otra parte, a nivel de la secuencia de aminoácidos encontramos que existe una homología en la cepa de dengue-2 que varía del 91.5 al 96.97%, en otros serotipos del mismo del 56.65 al 74.14%, y en el caso de otros Flavivirus del 29.08 al 70.46% (Tabla II). En el análisis de alineamiento se observa una longitud consenso de 517 aminoácidos incluyendo los 4 espacios de libertad, en la cual existen 97 aminoácidos idénticos en las 11 proteínas, lo que representa un 18.8%, y 156 aminoácidos similares que representan el 30.2%. Se observó que el 50% de los aminoácidos (similares + idénticos) para esta glicoproteína están conservados, resultando por demás interesante la región que va del aminoácido 98 al 110, donde se aprecia un 100% de conservación, y cuya región ha sido propuesta como sitio de unión al receptor celular (35). Podemos observar que existen 12 cisteínas altamente conservadas, cuyas posiciones han sido previamente establecidas por Nowak (81), las cuales podrían estar relacionadas con la conservación y estabilización de la

estructura tridimensional. Al respecto Heinz y col. (35) han propuesto un modelo de estructura super secundaria para la glicoproteína del Flavivirus TBE, con base al cual podríamos sugerir que en esta proteína existe un dominio establecido por 5 enlaces disulfuro comprendidos en los primeros 285 aminoácidos, y que no incluya a los aminoácidos 130 al 178. Este dominio contiene regiones altamente hidrofílicas, expuestas, flexibles y por lo tanto probablemente antigénicas (Fig. 48). Otra región dependiente probablemente de enlace disulfuro va del aminoácido 300 al 400, en el que se presentan estructuras altamente conservadas, como  $\alpha$  hélices anfipáticas, que podrían representar determinantes antigénicos potenciales para células T (82). Existe la posibilidad de un tercer dominio que no presenta enlaces disulfuro, el cual comprende del aminoácido 130 al 178 y que contiene el sitio de glicosilación para Flavivirus. De igual forma se observa que hacia el extremo carboxilo de la proteína existe una región hidrofóbica altamente conservada que va del aminoácido 430 al 500 y que posee estructuras que podrían interactuar con la membrana lipídica de los Flavivirus.

Finalmente cabe mencionar que en el alineamiento múltiple de las predicciones conjuntas para estas 11 proteínas, se observa en general que la estructura secundaria propuesta es muy conservada (Fig. 46) y que existen regiones particularmente conservadas como son: una hélice  $\alpha$  con diferentes propiedades fisicoquímicas que aproximadamente va del aminoácido 38

al 72; una estructura  $\beta$  plegada del aminoácido 135 a 147; un giro hidrofílico del aminoácido 324 al 338, y dos hélices alfa hidrofóbicas que van del aminoácido 422 al 470 y del 474 al 501, las cuales proponemos puedan ser epítopes funcionalmente importantes para el virión. Por ejemplo, en MVE (virus que ocasiona la encefalitis del Valle de Murray) se han definido regiones antigénicas de la glicoproteína de capa externa, correlacionando la predicción de giros  $\beta$  (ya que es una estructura muy flexible en la molécula) con la determinación de hidrofilidad, flexibilidad y probabilidad de superficie, con el propósito de hacer péptidos sintéticos, de éstas regiones, que sean capaces de inducir inmunidad protectora en un modelo murino (87). Con este material se ha logrado inducir protección en la cual, la habilidad de los mismos para inducir una respuesta antipéptido en ratón esta claramente relacionada con la predicción de epítopes para células T en el péptido (88) y la presencia de moléculas HLA clase II.

En el caso del virus del dengue hemos visto que existen este tipo de estructuras (Figs. 43a y b), las cuales estan presentes en regiones altamente conservadas de la molécula, haciéndolos candidatos para la identificación de epítopes involucrados en los procesos de inducción de protección o de una respuesta inmunopatológica.

Ya que todas las cisteínas presentes en la glicoproteína de

envoltura estan altamente conservadas en los Flavivirus secuenciados a la fecha, es posible combinar los datos de análisis de secuencia, datos inmunoquímicos y fisicoquímicos para proponer un modelo estructural de esta proteína y hacer una correlación de sitios biológicamente importantes diferentes partes del péptido, ya que aunque exista un grado grado relativamente elevado de divergencia a nivel de la estructura primaria, se presenta una gran homología tanto en los perfiles fisicoquímicos (Fig. 47) como en proporción y distribución de los motivos estructurales, (Figs. 45a y b) sugiriendo que todos los miembros de esta familia tienen una arquitectura común para esta glicoproteína, hecho que podría ser importante en el contexto de la relación huésped-parásito en el curso de una infección primaria o secundaria por virus del dengue, puesto que la enfermedad ocurre por 4 serotipos antigénicamente relacionados.

Estos hallazgos podrían cobrar importancia para esos casos de dengue hemorrágico ocurridos en el curso de una infección primaria, en los que no se ha comprobado la existencia de variación antigénica de las cepas involucradas en el brote hemorrágico. Proponiendo que anticuerpos preformados contra epitopes conformacionales (biológicamente importantes) muy conservados, pudieran funcionar como anticuerpos heterotípicos "facilitadores" y no neutralizantes, predisponiendo al establecimiento de la manifestación hemorrágica de la enfermedad.

## BIBLIOGRAFIA

1. Kumate, J. y Gutiérrez G. 1985. Manual de Infectología. Edit. Méndez Cervantes. Undécima Ed. pp. 454-462.
2. Jack Colvard Jones. 1978. El comportamiento alimentario de los mosquitos. Investigación y ciencia. Sci. Amer. 86-92.
3. Sabin, A.B. 1952. Research and dengue during world war II. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1: 30-50.
4. Halstead, S.B. 1984. Strategies for control disease in the developing world XL. Dengue. Rev. Infect. Dis. 6: 251-259.
5. Boletín Mensual de Epidemiología del Sistema Nacional de Salud. 1989. 4: 37-42.
6. El Dengue en las Américas 1984. Reporte de la Organización Panamericana de la Salud. Boletín Epidemiológico 5 85-91.
7. Halstead, S.B. 1981. The pathogenesis of dengue. Molecular epidemiology in infectious disease. Amer. J. Epidem. 114: 632-635.

8. Bornes, W. y Rosen, L. 1974. Fatal hemorrhagic diseases and shock associated with primary dengue infection on Pacific Island. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23: 495-506.
9. Okuno, T., Okada, T., Kondo, A., Susuki, M. y Oya, A. 1968. Immunotyping of different strains of Japanese encephalitis virus by antibody absorption, hemagglutination-inhibition and the complement fixation tests. *Bull. WHO* 38: 547-563.
10. Clarke, D.H. 1960. Antigenic analysis of certain group B arthropod borne viruses by antibody absorption. *J. Exp. Med.* 111: 21-32.
11. Monath, T.P., Cropp, C.B., Bowen, G.S. y Gardner, B. 1980. Variation in virulence for mice and rhesus monkeys among St. Louis encephalitis strains of different origin. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 948-962.
12. Trent, D.W., Grant, J.A., Rosen, L. y Monath, T.P. 1983. Genetic variation among dengue-2 viruses of different geographical origins. *Virology* 128: 271-284.
13. Halstead, S.B. 1988. Pathogenesis of dengue. Challenges to molecular biology. *Science* 239: 476-481.
14. Dengue surveillance summary No. 5 September 1982.

15. Halstead, S.B. y Inc. 1977. Dengue viruses and mononuclear phagocytes I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J. Exp. Med.* 146: 201-206.
16. Halstead, S.B. y Inc. 1983. Comparision of p388 D1 mouse macrophage cell line and human monocytes for assay of dengue 2 infection enhancing antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 157-161.
17. Guzman, M.G., Kouri, M.G., y Bravo, J. 1990. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981-A retrospective sero-epidemiologic study. *Am. J. Trop. Med. Hug.* 42 (2): 179-184.
18. Gubler, D.J. 1987. Factors influencing the distribution and spread of epidemic dengue haemorrhagic fever. *Asian. J. Infect. Dis.* 2: 128-132.
19. Westaway, F.G., Brinton, M.A., y Gaidamovich, S.Y. 1985. Flaviviridae. *Intervirology* 24: 183-192.
20. Calisher, C.H., Karabatsos, D., y Dalrymple, J.M. 1989. Antigenic relationship among flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J. Gen. Virol.* 70: 37-43.
21. Vezza, A.C., Rosen L., Repik, P. y Bishop, D.H. 1980. Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 63-65.

22. Rice, C.M. 1986. Structure of the flavivirus genome. En, S. Schlesinger, M.J. Schlesinger. eds. The Togaviridae and Flaviviridae. Plenum Press, New York. Plenum Press. pp. 279-326.
23. Wengler, G. y Wengler, G. 1981. Terminal sequences of the genome and replicative-form RNA of the Flavivirus west nile virus. Virology 113: 544-555.
24. Brinton, M.A. y Disposito, J.H. 1988. Sequence and secondary structure analysis of the 5' terminal region of Flavivirus genome RNA. Virology 162: 290-299.
25. Brinton, M.A., Fernández, A.V. y Amato, J. 1986. The 3'-nucleotides of Flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. Virology 153: 113-121.
26. Hahn, C.S., Hahn, Y.S. y Rice, C.M. 1987. Conserved as element in the 3' untranslated region of Flavivirus RNA and potential cyclization sequences. J. Mol. Biol. 198: 33-41.
27. Castle, E., Nowak, T., Leidner, V., Wengler, G. y Wengler, G. 1985. Sequence analysis of the viral core protein and the membrane-associated proteins V1 and V2 of the Flavivirus west nile virus and of the genome sequence for these proteins. Virology 145: 227-236.

28. Rice, C.M., Lenches, E.M., Dalgarno, L., Eddy, S.R., Skin S.J., Sheets, R.L., Trent, D.W. y Strauss, J.S. 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for Flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229: 726-733.
29. Kaufman, B.M., Summer, P.L., Dubois, D.R., Houston-Cohen, W., Gentry, M.K., Timchak, R.L., Burke, D.S. y Eckels, K.H. 1989. Monoclonal antibodies for dengue virus prM glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41 (5): 576-580.
30. Markoff, L. 1989. *In vivo* processing of dengue virus structural proteins: Cleavage of the pre-membrane protein. *J. Virol.* 63: 3345-3352.
31. Monath, T.P. 1986. Pathobiology of the Flaviviruses. En: S. Schlesinger, M.J. Schlesinger eds. *The Togaviridae and Flaviviridae*. Plenum Press. New York. pp. 375-440.
32. Roehring, J.T., Mathews, J.H. y Trent, D.W. 1983. Identification of epitopes on the E glycoprotein of Saint Louis encephalitis virus using monoclonal antibodies. *Virology* 128: 118-126.

33. Heinz, F.X., Berger, R., Toma, W. y Kunz, C. 1983. A topological and functional model of epitopes on the structural glycoprotein of TBE virus defined by monoclonal antibodies. *Virology* 126: 525-537.
34. Heinz, F.X., Toma, W., Guirakhoo, F. y Kunz, C. 1986. A model study of the use of monoclonal antibodies in capture enzyme immunoassays for antigen quantification exploiting the epitope map of TBE virus. *J. Biol. Stand.* 14: 133-140.
35. Mandl, C. Heinz, F. y Kunz, C. 1989. Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using TBE virus as a model. *J. Virol.* 63: 564-571.
36. Porterfield, J.S. y Cardoso, J. 1984. Host range and tissue tropisms: antibody-dependent mechanisms. En: A. L. Notkins y M. B.A. Oldstone, eds. *Concepts in Viral Pathogenesis*. Springer-Verlag Press New York. pp. 117-123.
37. Brinton, M.A. 1986. Replication of Flaviviruses. En: S. Schlesinger, M.J. Schlesinger eds. *The Togaviridae and Flaviviridae*. Plenum Press, New York. pp. 327-374.

38. Strauss, J.H., Strauss, E.G., Hahn, Y.S., Han, C.S. Galler, R. y Rice, M. 1987. Replication of alphaviruses and flaviviruses: proteolytic processing of polyproteins. UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 49: 209-225.
39. Strauss, J.H., Strauss, E.G., Han, C.S. y Rice, C.M. 1987. The genomes of alphaviruses and Flaviviruses: organization and translation p 75-104. En, D.J. Rowlands, M.A. Mayan y B.W.J. Mahy, eds. The Molecular Biology of the Positive Strand RNA viruses. Academic Press, Inc., London. pp. 75-144.
40. Kuno, G. 1982. Dengue virus replication in a polyploid mosquito cell culture grown in serum-free medium. J. Clin. Microbiol. 16: 851-857.
41. Henchal, E.A. Inc. 1983. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32: 264-269.
42. CDC, 1981 Manual de Técnicas de Laboratorio para el diagnóstico del Dengue. San Juan, Puerto Rico: CDC, Organización Panamericana de la Salud, 1-59.
43. Molecular cloning. A Laboratory Manual. 1989. T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, eds. Cold Spring Harbor 2: 10.6-10.12.

44. Sanger, F., Miklen, S. y Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467.
45. Tabor, S. y Richardson, C.C. 1987. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 8: 4767-4771.
46. Mullis, K.B. y Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol. 155: 335-350.
47. Chou, P.Y. y Fasman, G.D. 1979. Prediction of  $\beta$  turns. Biophys. J. 26: 367-384.
48. Garnier, J., Osguthorpe, D.J. y Robson, B. 1978. Análisis of the accuracy and implications of simple methods for prediccting the secondary structure of globular proteins. J. Mol. Biol. 120: 97-120.
49. Gascuel, O. y Golmard, J.L. 1988. A simple method for predicting the secondary structure of globular proteins. CABIOS 4: 357-365.
50. Deleage, G. y Roux, B. 1987. An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. Protein. Engineering. 1: 289-294.

51. Levitt, M. 1978. Conformational preferences of amino-acids in globular proteins. *Biochem.* 17: 4277-4285.
52. Chou, P.Y. y Fasman, G.D. 1978. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.* 47: 45-148.
53. Rao, M.J.K. y Argos, P. 1986. A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane proteins. *Bioch. Biophys. Acta.* 869: 197-214.
54. Klein, P., Kanehisa, M., y DeLisi, D. 1985. The detection and classification of membrane-spanning proteins. *Bioch. Biophys. Acta.* 815: 468-476.
55. Eisenberg, D., Schwarz, E., Komarony, M. y Wall, R. 1984. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* 179: 125-142.
56. Hopp, T.P. y Woods, K.R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 78: 3824-3828.
57. Miyazawa, S. y Jernigen, R.L. 1985. Estimation of effective interresidue contact energies from protein crystal structures: Quasi-Chemical approximation. *Macromolecules* 18: 534-552.

58. Kyte, J., y Doolittle, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
59. Karplus, P.A., y Schulz, G.E. 1985. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* 72: 212-213.
60. Granham, R. 1974. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185: 862-864,
61. Carmenes, R.S. 1989. A program for protein structure prediction. M.M. Molina and J.M. Martin.
62. Sequence Analysis. 1987. A set of programs to aid in the prediction of protein structure from sequence data by anatomy crofts. Copyright, A.R. Crofts, University of Illinois.
63. Irie, K., Mohan, P.M., Sasaguri, Y., Putnak, R. y Padmanabhan, R. 1989. Sequence analysis of cloned dengue virus type 2 genome (New Guinea-C strain). 75: 197-211.
64. Sumiyoshi, H., Mori, C., Ilikuch, Y., Nagamoto, H. y Garashi, A. 1987. Complete nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome RNA. *Virology* 161: 497-510.

65. Coia, G. Parker, M.D. y Westaway, E.G. 1988. Nucleotide and complete amino acid sequences of kunjin virus. Definitive gene order and characteristics of the virus-specified proteins. *J. Gen. Virol.* 69: 1-21.
66. Yaegashi, T, Uakhari, V.N., Faighny, R. y Padmanabhan, R. 1986. Partial sequence analysis of cloned dengue virus type 2 genome. *Gene* 46: 257-267.
67. Deubel, V., Kinney, R.M., y Trent, D.W. 1986. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the structural proteins of dengue type 2 virus, Jamaica genotype. *Virology* 155: 365-377.
68. Trent, D.W., Kinney, R.M., Deubel, V., Rice, C.M. y Hahn, C. 1987. Partial nucleotide sequence of St. Louis encephalitis virus RNA: Structural proteins, NS1, NS2 and NS2b. *Virology* 156: 293-304.
69. Dalgarno, L., Trent, D.W., Strauss, J.H. y Rice, C.M. 1986. Partial nucleotide sequence of the Murray Valley Encephalitis virus genome. Comparison of the encoded polypeptides with yellow fever virus structural and non-structural proteins. *J. Mol. Biol.* 187: 309-323.
70. Mandl, C.W., Heinz, F.X. y Kunz, C. 1988. Sequence of the structural proteins of tick-born encephalitis virus (Western Subtype) and comparative analysis with other Flaviviruses. *Virology* 166: 197-205.

71. Mason, P.W., Phyllis, C., Mason, L. y Fournier, M.J. 1987. Sequence of the dengue-1 virus genoma in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural protein NS1. *Virology* 161: 262-267.
72. Myer, E.W. y Miller, W. 1988. Optimal alignment an linear space. *CABIOS* 4: 11-17.
73. Monath, T.P., Wands, J.R., Hill, L.J., Brown, N.V., Burke, D.S., Grant, J.A. y Trent, D.W. 1986. Geographic classification of dengue-2 virus strains by antigen signature analysis. *Virology* 154: 313-324.
74. Bell, J.R., Kinney, R.M., Trent, R.D., Lenches, E.M., Dalgardo, L., y Strauss, J.H. 1985. Amino-terminal aminoacid sequences of structural proteins of three Flaviviruses. *Virology* 143: 224-229.
75. Svitkin, Y.V., Lyapustin, N., Lashkevich, V.A. y Agol, V.I. 1984. Differences between translation products of TBE virus RNA in cell-free systems from Krebs-2 cells and rabbit reticulocytes. *Virology* 135: 99-105.
76. Garoff, H., y Melancon, Inc. 1986. Reinitiation of translocation in the semliki forest virus structural polyprotein: Identification of the signal for the E glycoprotein. *EMBO J.* 5: 1551-1560.77.

77. Altamirano, M., Plumbridge, J. y Calcagno, M. 1991. Secondary structure of Escherichia coli glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy. *Biochim. Biophys. Act.* 1076: 266-272.
78. Taylor, W.R., y Thornton, J.M. 1984. Recognition of super secondary structure in proteins. *J. Mol. Biol.* 173: 487-514.
79. Nakashima, H., Nishikawa, K., y Ooi, T. 1986. The folding type of a protein is relevant to the aminoacid composition. *J. Biochem.* 99: 153-162.
80. Higgins, D.G. y Sharp, P.M. 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comp. Appl. Bios.* 5: 151-153.
81. Nowak, T. y Wengler, G. 1987. Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the west Nile Flavivirus. *Virology* 156: 127-137.
82. Margalit, I.J., Kower, B., Good, L.H. y De Lisi, C. 1987. Protein antigenic structures recognized by T-cells: potential applications to vaccine design. *Immunol. Rev.* 98: 9-52.

83. Moore, J., Engelberg, A. y Barioch, A. 1988. Using pc/ gene for protein and nucleic acid analysis. *Biotechniques* 6: 566-572.
84. Richardson, J.S. y Richardson, D.C. 1988. Amino acid preferences of specific locations at the end of the  $\alpha$  helices. *Science* 240: 1648-1652.
85. Nakashima, H. y Nishikawa, K. 1986. The folding type of a protein is relevant to the aminoacid composition. *J. Biol. Chem.* 99: 153-162.
86. Myer, E..W. y Miller, W. 1988. Optimal alignment in linea space. *CABIOS* 4(1): 11-17.
87. Roehring, J., Hont, A.R. y Mathews, J:H: 1989. Synthetic peptide vaccine strategy for inducing Flavivirus immunity. In vaccines 89. Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS. Ed. F. Brown. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York. pp 347-350.
88. Lamb, M., Dalgamo, L. y Weir, R.C. 1987. Mapping of T cell epitopes using recombinant antigens and synthetic peptides. *EMBO.* 6: 1245-1251.