



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE REGIONES
CONSERVADAS DEL VIRUS DEL DENGUE PARA
LA DETECCIÓN DEL GENOMA VIRAL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

DANIELA LOZANO AMADO

ASESORES

**DRA. MA. ISABEL SALAZAR SÁNCHEZ
DR. SALVADOR FONSECA CORONADO**



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 esta 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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO
UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán
DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**
Clonación y secuenciación de regiones conservadas del virus del dengue para la detección del genoma viral.

Que presenta la pasante: **Daniela Lozano Amado**
Con número de cuenta: **40700761-7** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de marzo de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Ricardo V. Santiago Díaz	
VOCAL	M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er SUPLENTE	QFB. Leticia Cubillo Carrillo	
2do SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

DEDICATORIAS

- A Dios, por guiar mi camino, por darme la sabiduría y fortaleza para cumplir esta gran meta a pesar de todos los obstáculos que tuve.
- A mis padres Verónica y Rigoberto, que gracias a su gran ejemplo, apoyo, esfuerzo y comprensión hicieron posible lograr esta gran meta. Valieron la pena estos 6 años y éste es solo uno de todos los logros que de ahora en adelante tendré. Los amo!
- A mis hermanos Cristobal y Nazareli por su apoyo incondicional y por creer en mí. Ya les puse la muestra de que sí se puede lograr lo que se propongan, ahora les toca a ustedes lograr sus metas y saben que estaré ahí para apoyarlos siempre.
- A mi tía Josefina por el apoyo, consejos, atenciones y afecto recibido durante todos estos años. Gracias por dejarme vivir con usted y por ser mi segunda mamá, la quiero muchísimo!
- A mi prima Luxi por ser mi segunda hermana, confidente y consejera durante todos estos años. Y también a mi niña Jessy por dejarme ser su “mamá Dany”. Saben que cuentan conmigo siempre y que las quiero muchísimo!
- A mi tía Naty, que ya no está físicamente conmigo, pero siempre estará presente en mi mente y en mi corazón. Gracias por la gran lección de vida que me dejaste!
- A mis miwuis Fer, Lulú y Marianita por esa gran amistad que hemos formado a lo largo de los años, por todos los momentos compartidos, los cuales siempre estarán presentes en mi vida. Saben que cuentan conmigo siempre y que los quiero mucho!
- A “Los Vilchis”: Cristhian, Jannine, Luisa, Jaz y Yes, así como a “Las Chikitinas”: Mimi, Gina, Zayu y Mony; gracias por aceptarme y apoyarme, por la amistad tan fuerte que hemos formado y por esos excelentes momentos que hemos compartido, gracias por contagiarme de su entusiasmo y también de sus conocimientos. Siempre podrán contar conmigo y deseo que sigamos siendo grandes amigos para toda la vida. Los quiero un montón!
- A mis amigos de Acapulco que a pesar de la distancia hemos mantenido el contacto y me han apoyado durante estos años. Es muy grato visitar Acapulco y saber que sigue esa gran amistad con el paso de los años. Muchísimas gracias!

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Ma. Isabel Salazar Sánchez, por permitirme realizar mi proyecto dentro de su laboratorio, por todas las atenciones, el tiempo dedicado, su interés, apoyo y conocimientos adquiridos que son pilares importantes en mi formación profesional.
- Al Dr. Salvador Fonseca Coronado, por proponerme este proyecto y darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por la asesoría, apoyo y tiempo dedicado a esta tesis.
- Al Dr. Gilberto Vaughan, que a pesar de la distancia siguió paso a paso el desarrollo de este trabajo; por su asesoría, tiempo y apoyo constante, así como las atenciones personales recibidas de su parte, lo cual aprecio y agradezco infinitamente.
- A la M. en C. Pilar Rivera Osorio, por el apoyo en la parte inicial de este trabajo, lo cual marcó la pauta para el desarrollo satisfactorio del mismo.
- A la M. en C. Karina Ruiz Tovar, por las facilidades para trabajar dentro del Laboratorio de Inmunología Especial del InDRE, ya que, además de su ayuda y tiempo, aprecio mucho la amistad que me ha brindado.
- A mis sinodales: Dr. Ricardo Víctor Santiago Díaz, M. en C. María Guadalupe Avilés Robles, QFB Leticia Cubillo Carrillo y M. en C. Maritere Domínguez Rojas, por los comentarios recibidos y el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.
- A la Dra. Ma. Eugenia Castro Mussot y a la M. en C. Antonina Oltra, por permitirme ser parte del Laboratorio de Inmunología Celular e Inmunopatogénesis; por todas las atenciones y el apoyo recibido, los consejos y los momentos compartidos.
- A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología Celular e Inmunopatogénesis: Daniel, Marisol, David, Nataly, Sonia, Mónica y Luis Miguel, por hacer bastante agradable e inolvidable mi estancia, por los conocimientos compartidos así como por la amistad que me han brindado, lo cual aprecio muchísimo. Mucha suerte y éxito con sus respectivos proyectos!

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Celular e Inmunopatogénesis, perteneciente al Departamento de Inmunología en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, en colaboración con los Laboratorios de Inmunología Especial del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) y con el Laboratorio de Inmunobiología de Enfermedades Infecciosas de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Para la realización de la tesis se contó con el apoyo de la beca S0008–10–01–139542–01–027 del proyecto CONACyT Salud–2010–01–139542: “Análisis de la genética de poblaciones virales, marcadores moleculares del genoma viral y factores inmunológicos del hospedero relacionados con virulencia y la presentación clínica de la enfermedad en casos graves y atípicos de dengue.” Y con el apoyo del proyecto CONACyT Salud 2011-01.161716: “Desarrollo de un modelo predictivo de cuadros hemorrágicos debidos al virus del dengue basado en el análisis de polimorfismos de nucleótidos únicos presentes en el promotor de DC-SIGN y TNF-alfa y en la secuenciación completa del gen E viral.”

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ABREVIATURAS	IV
INTRODUCCIÓN	1
Definición y aspectos clínicos de la enfermedad	1
Epidemiología	2
Agente etiológico	3
Replicación viral	7
Métodos de diagnóstico	9
ANTECEDENTES	12
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	17
Objetivo General	17
Objetivos Particulares	17
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
RESULTADOS	28
Análisis bioinformático para el diseño de oligonucleótidos	28
Infección de cultivos celulares C6/36 con cepas prototipo del DENV	31
Inmunofluorescencia Indirecta	31
Obtención de RNA viral	33
RT-PCR	34
Selección y purificación de los productos para clonación	36
Clonación de amplicones	36
Obtención de DNA plasmídico y Restricción Enzimática con la enzima EcoRI	37
PCR a partir de colonias bacterianas	39
Secuenciación de Sanger	40
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	48
PERSPECTIVAS	48
REFERENCIAS	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Vector del DENV, el mosquito <i>Aedes aegypti</i> .	1
2	Zonas en riesgo de transmisión de dengue a nivel mundial, 2011.	2
3	Riesgo de transmisión de dengue en México.	3
4	Estructura y genoma del DENV.	4
5	Procesamiento de la poliproteína del DENV.	8
6	Replicación del DENV.	9
7	Línea de tiempo aproximada de las infecciones primarias y secundarias por el DENV y los métodos de diagnóstico que se utilizan para detectar la infección.	12
8	Esquema representativo de la reacción de ligación en un vector T.	23
9	Mapa del vector de clonación pCR 2.1 TOPO.	24
10	Gráfica del análisis de π para la determinación de las regiones conservadas entre los diferentes serotipos del DENV.	28
11	Gráfica del análisis de Entropía de Shannon para la determinación de la variabilidad nucleotídica en la región 3'UTR.	29
12	Alineamiento de las cepas prototipo del DENV.	30
13	Efecto citopático del DENV en células C6/36.	32
14	Inmunofluorescencia indirecta en células C6/36 sin infección e infectadas con DENV-2 Nueva Guinea C.	33
15	Análisis de la obtención de RNA viral.	33
16	Análisis de los productos de la RT-PCR.	35
17	Verificación de la pureza de fragmentos de DNA obtenidos de la RT-PCR.	36
18	Análisis del DNA plasmídico extraído por el método de lisis alcalina de las clonas obtenidas de la región NS5 y análisis de la restricción enzimática del DNA plasmídico utilizando la enzima EcoRI.	37

Figura		Página
19	Análisis del DNA plasmídico extraído por el método de lisis alcalina de las colonias obtenidas de la región 3'UTR y análisis de la restricción enzimática del DNA plasmídico utilizando la enzima EcoRI.	38
20	Análisis de la PCR a partir de colonias bacterianas.	39
21	Secuenciación de Sanger del producto de PCR de la clona 5 de la región 3'UTR.	41
22	Secuenciación de Sanger del producto de PCR de la clona 2 de la región NS5.	42
23	Secuenciación de Sanger del DNA plasmídico extraído de la clona 5 de la región 3'UTR.	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Ventajas y desventajas de los métodos de diagnóstico de dengue.	13
2	Métodos de RT-PCR en tiempo real para la detección y cuantificación del DENV.	14
3	Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones 3'UTR y NS5.	31

ABREVIATURAS

Br–Et	Bromuro de etidio
C	Proteína de cápside viral
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CENAVECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
CS	Secuencia de ciclación
DENV	Virus del dengue
DC–SIGN	Dendritic Cell–Specific ICAM–3 Grabbing Nonintegrin
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpi	Días post–infección
E	Proteína de envoltura viral
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme–Linked Immunosorbent Assay
FD	Fiebre por dengue
FHD	Fiebre hemorrágica por dengue
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FWD	Forward o Sentido
Hsp	Proteína de choque térmico
IFN	Interferón
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
LB	Medio Luria Bertoni
M	Proteína de membrana viral
MEM	Medio Esencial Mínimo
mM	Milimolar
NS	Proteína no estructural
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de Lectura Abierto (<i>del inglés Open Reading Frame</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PIPES	1,4–Piperazinediethanesulfonic acid.
pmol	Picomol
prM	Proteína precursora de membrana
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RT–PCR	Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa

RVS	Reverse o Antisentido
SDS	Dodecilsulfato sódico
SCD	Síndrome de choque por dengue
SFB	Suero Fetal Bovino
SL	Stem–Loop
SLA	Large Stem–Loop
SLB	Short Stem – Loop
sNS1	Proteína NS1 secretada
UTR	Región no traducida (<i>del inglés Untranslated Region</i>)
xg	Veces la fuerza de gravedad

INTRODUCCIÓN

Definición y aspectos clínicos de la enfermedad

El dengue es una enfermedad febril aguda causada por el virus del dengue (DENV), del cual existen 4 serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4). La enfermedad es transmitida por la picadura de la hembra hematófaga de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005; Velandia y Castellanos, 2011).



Figura 1. Vector del DENV, el mosquito *Aedes aegypti*.
(Tomada de http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Aedes_aegypti_during_blood_meal.jpg)

Independientemente del serotipo, el dengue puede presentarse de manera asintomática en la mayoría de los casos, o bien, puede presentarse bajo tres formas clínicas denominadas Fiebre por Dengue (FD), Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) y Síndrome de Choque por Dengue (SCD) (OMS, 2009).

La FD se caracteriza por un aumento súbito de la temperatura mayor a 38°C, acompañada de dos o más de los siguientes síntomas: cefalea aguda, dolor retro-orbitario, mialgias, artralgias, exantema y presencia de petequias (Singhi y cols., 2007; OMS, 2009).

La FHD por lo general comienza con la misma sintomatología de la FD en combinación con manifestaciones hemorrágicas como la prueba del torniquete positiva a causa de micro hemorragias de los capilares de la piel, trombocitopenia ($\leq 100,000$ plaquetas/ μL). Adicionalmente hay disminución en el hematocrito, petequias, púrpura, hematuria, melena, sangrado de encías, sangrado gastrointestinal y aumento en la permeabilidad vascular (Singhi y cols., 2007; OMS, 2009).

La FHD puede progresar a SCD, caracterizado por un choque hipovolémico debido a la extravasación del plasma, por lo que el paciente requiere hospitalización ya que si no recibe un rápido y adecuado tratamiento, puede iniciarse una etapa de choque profundo.

En esta etapa, el sistema circulatorio se ve muy comprometido, aparecen signos de insuficiencia circulatoria, la piel se torna fría, a menudo hay cianosis, el pulso y la presión arterial bajan considerablemente (≤ 20 mm Hg), resultando en la muerte dentro de 12 a 36 horas después del inicio del choque (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005; Singhi y cols., 2007; OMS, 2009).

Epidemiología

El dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos de mayor importancia de salud pública en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que este virus constituye una amenaza para el 40% de la población mundial (aproximadamente 2,500 millones de personas) que habitan en los más de 100 países ubicados en las regiones tropicales y subtropicales expuestos al dengue (Guzmán y cols., 2010; Halstead, 2007; OMS, 2009).

La prevalencia a nivel mundial del dengue se ha incrementado drásticamente. En los últimos 50 años, su incidencia ha aumentado 30 veces con la creciente expansión geográfica hacia nuevos países y, en la actual década, de áreas rurales a urbanas. Los continentes más afectados por la presencia de epidemias de FHD han sido el asiático y el americano. La FHD continúa siendo un problema de salud importante, manteniendo elevada incidencia en niños, los cuales son la población más susceptible (Halstead, 2007; OMS, 2009).

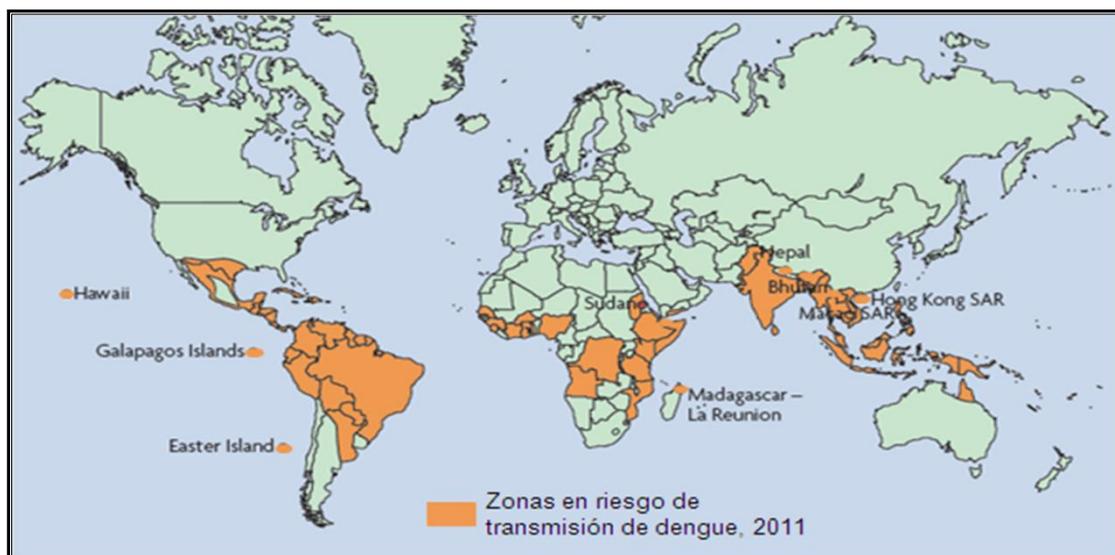


Figura 2. Zonas en riesgo de transmisión de dengue a nivel mundial, 2011.

(Adaptada de Guzmán y cols., 2010 y <http://www.cdc.gov/dengue/>)

En México como en otras partes del mundo, la presencia del dengue está condicionada a la existencia del vector y son las regiones tropicales y subtropicales las áreas de mayor riesgo por reunir las condiciones climáticas y geográficas para su sobrevivencia.

En 2011, el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) de la Secretaría de Salud reportó 15,578 casos confirmados de dengue, de los cuales 10,970 fueron FD y 4,608 casos de FHD con 36 defunciones. Los principales serotipos circulantes fueron DENV-1 y DENV-2, aunque se reportó la presencia de los otros dos serotipos en proporciones bajas. El estado de Yucatán presentó el mayor número de casos reportados ([http:// www.cenave.gob.mx/dengue](http://www.cenave.gob.mx/dengue), 10/02/2012).

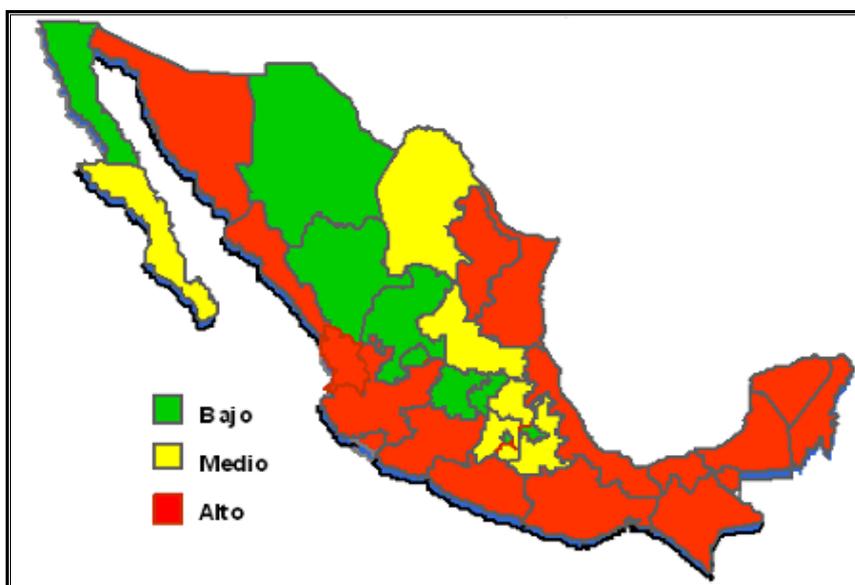


Figura 3. Riesgo de transmisión de dengue en México.

(Tomada de <http://www.cenave.gob.mx/dengue/default.asp?id=32>)

Agente etiológico

El DENV pertenece a la familia *Flaviviridae*, género flavivirus. Es un virus icosaédrico que tiene un diámetro entre 40–50 nm y está envuelto por una membrana lipídica, sobre la cual se insertan la proteína precursora de membrana (prM) y la proteína de envoltura (E) (Figura 4A) (Bartenschlager y Miller, 2008; Velandia y Castellanos, 2011).

El genoma del DENV está constituido por una molécula de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 10.7 Kb, que inicia con una región 5'UTR, de aproximadamente 100 nucleótidos y en ella se localiza una estructura “cap” tipo I 7–metil guanosina. Después se localiza el marco de lectura abierto (ORF), el cual codifica para la única poliproteína viral de aproximadamente 3400 aminoácidos, la cual después de ser procesada co y post traduccionalmente, da origen a 3 proteínas estructurales (C, prM y E)

y a 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) y finalmente se encuentra la región 3'UTR, de aproximadamente 450 nucleótidos y que carece de poli A. (Figura 4B) (Bartenschlager y Miller, 2008; Rodenhuis-Zybert y cols., 2010; Velandia y Castellanos, 2011).

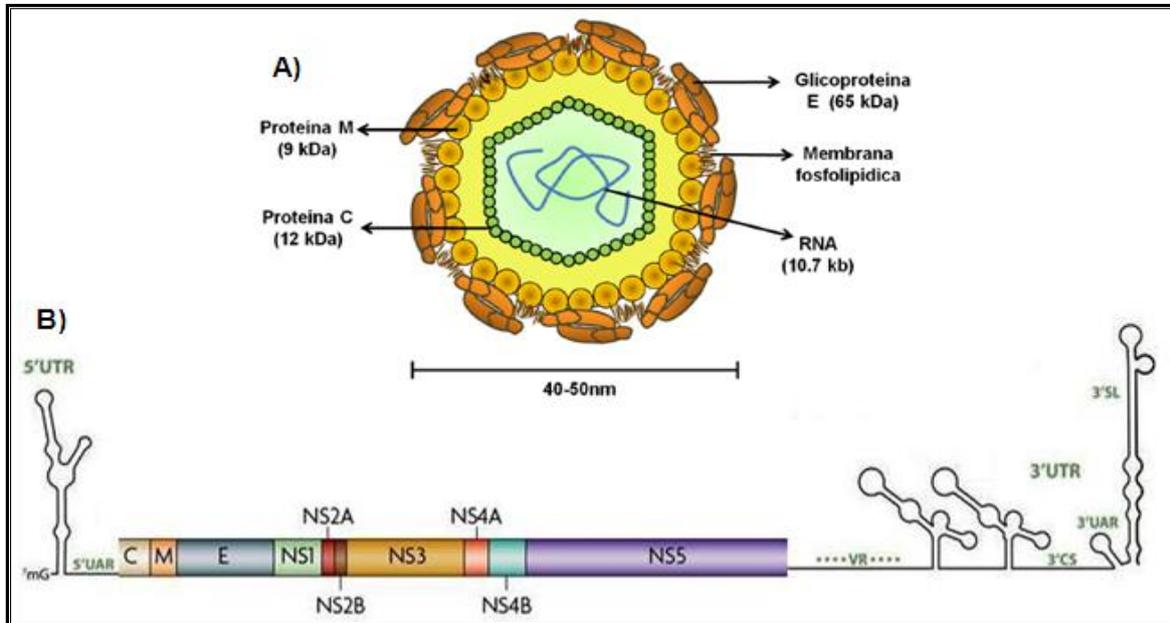


Figura 4. A) Estructura y B) Genoma del DENV.
(Adaptada de Clyde y cols., 2006; Guzmán y cols., 2010; Ruiz, K. 2010)

5'UTR

Esta región, de aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, muestra una alta secuencia de conservación entre los diferentes serotipos del DENV. Contiene dos dominios importantes para la replicación viral. El primer dominio de 70 nucleótidos se pliega en una estructura llamada tallo burbuja largo o “*large stem-loop*” (SLA) y se ha propuesto que actúa como promotor para la proteína NS5 (Bartenschlager y Miller, 2008; Lodeiro y cols., 2009).

El segundo dominio forma un tallo burbuja corto o “*short stem-loop*” (SLB); este dominio contiene una secuencia de 16 nucleótidos de longitud, conocida como 5'UAR, que es complementaria a una región presente en el extremo 3' del genoma viral (3'UAR) (Lodeiro y cols., 2009).

Proteína de Cápside (C)

Es el primer polipéptido viral sintetizado durante la traducción; tiene un peso molecular de 9 a 12 kDa y posee numerosos residuos de lisina y arginina, los cuales le confieren un carácter altamente básico que le permite la interacción con el RNA viral recién sintetizado para formar la nucleocápside que lo protege de la degradación y promueve su organización

en el interior de la partícula viral en formación. Además posee un sitio hidrofóbico que interviene en el proceso de ensamblaje (*Acosta–Bas y Gómez–Cordero, 2005; Lindenbach y cols., 2007; Velandia y Castellanos, 2011*).

Proteína precursora de membrana (prM)

Es el precursor glicosilado de la proteína M. Tiene un peso de 18–19 kDa y en los viriones intracelulares inmaduros forma heterodímeros con la proteína E para permitir su correcto plegamiento y evitar la exposición del péptido fusogénico durante el transporte en las vesículas ácidas. La proteína M madura, que tiene un peso de 7–9 kDa, se origina del corte proteolítico que realiza una furin–proteasa en la porción amino terminal de prM justo antes de la liberación del virión y está relacionada con la maduración de éste (*Lindenbach y cols., 2007; Rodenhuis–Zybert y cols., 2010; Velandia y Castellanos, 2011*).

Proteína de Envoltura (E)

Es una glicoproteína que tiene un peso molecular de 65 kDa y se encuentra de forma homodimérica en la superficie del virión e intracelularmente se puede encontrar como un heterodímero junto a la proteína prM (*Velandia y Castellanos, 2011*).

Esta proteína es el principal inmunógeno del virus. Posee 3 dominios: I, II y III. El dominio I presenta estructura de barril β , el dominio II está compuesto por una región de dimerización y el péptido fusogénico, el cual es el encargado de mediar la fusión de las membranas viral y celular, mientras que el dominio III tiene la función del reconocimiento del virus con su receptor en la superficie de la célula blanco (*Clyde y cols., 2006; Lindenbach y cols., 2007; Rodenhuis–Zybert y cols., 2010*).

NS1

Es una proteína altamente conservada entre los flavivirus; tiene un peso molecular de 42 a 50 kDa. No forma parte del virión pero pueden encontrarse de 3 formas distintas: como residente en el retículo endoplásmico, como dímero en la membrana de la célula hospedera y en su forma secretada. Aun no es del todo claro su papel en la replicación, pero se supone que la NS1 actúa en una etapa temprana de ésta (*Acosta–Bas y Gómez–Cordero, 2005; Clyde y cols., 2006; Lindenbach y cols., 2007*).

NS2A y NS2B

Ambas son proteínas hidrofóbicas que se encuentran asociadas a la membrana del retículo endoplásmico durante la replicación viral. NS2A tiene un peso molecular de 22 kDa y es capaz de bloquear la síntesis de IFN tipo I debido al bloqueo de las rutas de señalización

que dan lugar a esta citocina. NS2B tiene un peso de 12 kDa y forma un complejo estable con la proteína NS3 funcionando como cofactor para la actividad de serin proteasa de uno de los dominios de NS3 (*Clyde y cols., 2006; Lindenbach y cols., 2007; Velandia y Castellanos, 2011*).

NS3

Tiene un peso molecular de 68 kDa y es trifuncional, ya que se caracteriza por tener actividad de proteasa, helicasa y trifosfatasa de RNA. La actividad de proteasa se encuentra en asociación con la proteína NS2B para el procesamiento de la poliproteína viral. La actividad de helicasa ha sido implicada principalmente en el desdoblamiento del RNA genómico durante la replicación, mientras que la actividad de trifosfatasa podría requerirse para la formación del “cap” en la región 5'UTR (*Bartenschlager y Miller, 2008; Clyde y cols., 2006; Lindenbach y cols., 2007; Perera y Kuhn, 2008*).

NS4A y NS4B

Ambas son proteínas de naturaleza hidrofóbica con un peso molecular de 16 y 27 kDa, respectivamente. Se sabe muy poco acerca de la función de estas proteínas, pero se ha sugerido que NS4A puede servir para la inducción de alteraciones en la membrana de las células infectadas, y tanto NS4A como NS4B actúan en la inhibición del IFN tipo I (*Bartenschlager y Miller, 2008; Clyde y cols., 2006; Velandia y Castellanos, 2011*).

NS5

Es la proteína más conservada; se sabe que el 67% de la secuencia de dicha proteína es idéntica entre los cuatro serotipos. Tiene un peso molecular de 104–106 kDa y es bifuncional, ya que en el extremo N-terminal posee actividad de metiltransferasa y guanidiltransferasa, en donde existe una región altamente conservada (YF NS5 666–668) que se sabe está involucrada en la formación del “cap” 5' y su metilación, mientras que en el extremo C-terminal se encuentra el dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), por lo que NS5 actúa como la única polimerasa durante la replicación y transcripción virales (*Bartenschlager y Miller, 2008; Clyde y cols., 2006; Lindenbach y cols., 2007; Perera y Kuhn, 2008*).

3'UTR

Esta región es de aproximadamente 450 nucleótidos y comprende de tres regiones: 1) una región variable que se encuentra después del codón de paro del marco de lectura abierto; 2) una región central que se localiza “downstream” respecto a la región variable y 3) una región terminal, en la cual se encuentran las estructuras llamadas 3'SL o “stem-loops”,

que son necesarias para la replicación, y una secuencia de ciclación (CS) justo “upstream” de las estructuras 3'SL. Estas estructuras están implicadas en la circularización del genoma a través de interacciones con la región 5'UTR (*Bartenschlager y Miller, 2008; Lodeiro y cols., 2009; Romero y cols., 2006*).

Replicación Viral

La entrada del virus a células de mamífero y en las del mosquito transmisor se inicia con el contacto de la proteína E con su receptor localizado en las células blanco; entre estas células se encuentran células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T, monocitos, hepatocitos y células neuronales. Hasta el momento se han identificado varios receptores para el virus, entre ellos DC-SIGN, del inglés *Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin*, heparán sulfato, CD14, las proteínas de choque térmico (Hsp) de 70 y 90 kDa (Hsp70 y Hsp 90), el receptor de alta afinidad de laminina de 37/67 kDa y a la proteína GRP78/BiP (*Clyde y cols., 2006; Del Ángel, 2006*).

Tras la unión, el virus es internalizado por endocitosis mediada por receptores. Luego, la vesícula endocítica se transforma en un endosoma temprano y posteriormente en un endosoma tardío, el cual se fusiona con un lisosoma que acidifica el pH de la vesícula. Esto induce una trimerización irreversible del dominio II de la proteína E, que favorece la exposición del péptido fusogénico y su anclaje a la membrana de la vesícula, es decir, se realiza la fusión de las membranas viral y celular, lo que conlleva finalmente a la liberación de la nucleocápside al citoplasma (*Bartenschlager y Miller, 2008; Mukhopadhyay y cols., 2005*)

Una vez que el genoma viral es liberado en el citoplasma de las células infectadas, es traducido en el retículo endoplásmico rugoso, debido a que el RNA viral actúa como RNA mensajero, dando lugar a la única poliproteína viral, la cual es procesada co y post traduccionalmente por la acción de proteasas virales y proteasas de la célula huésped, dando lugar a 3 proteínas estructurales (C, prM y E), que son las encargadas del ensamblaje viral, y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5), que son las encargadas de la replicación del genoma (*Bartenschlager y Miller, 2008; Perera y Kuhn, 2008; Rodenhuis-Zybert y cols., 2010*).

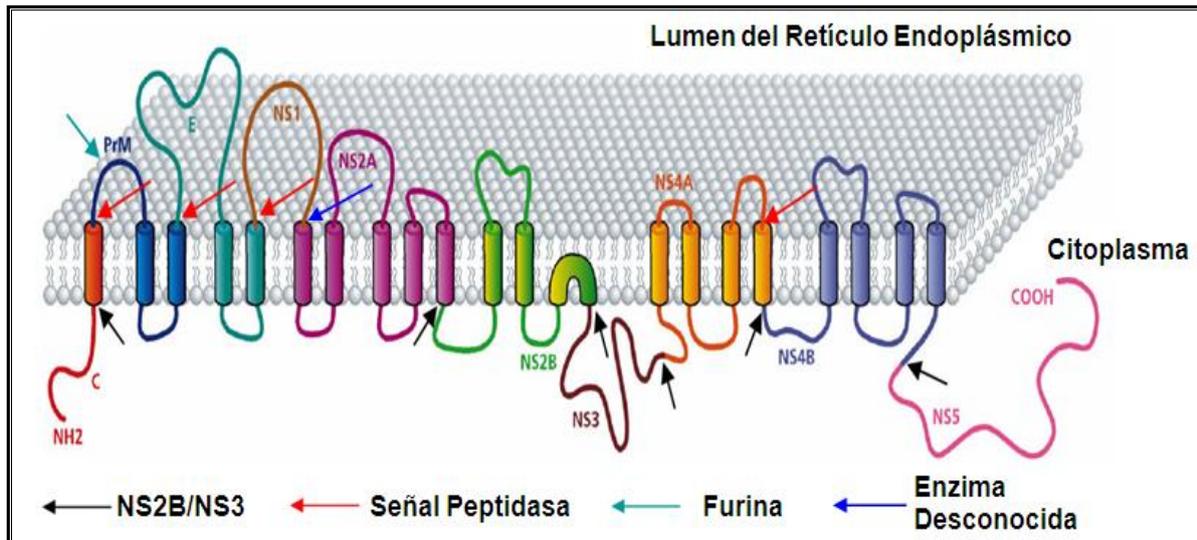


Figura 5. Procesamiento de la poliproteína del DENV
(Adaptada de Umareddy y cols., 2007).

La replicación viral se lleva a cabo en el citoplasma y se inicia con la generación de la cadena de RNA (-), que es llamado Intermediario Replicativo, el cual se sincroniza con la plantilla de RNA (+) dando lugar a la formación de la denominada Forma Replicativa. La nueva producción de RNA (+) puede unirse a los ribosomas para iniciar un nuevo ciclo de traducción o bien, ir directamente al proceso de ensamblaje, el cual se sugiere se lleva a cabo en el retículo endoplásmico (Bartenschlager y Miller, 2008; Velandia y Castellanos, 2011).

El ensamblaje comienza con la formación de la nucleocápside viral debido a la interacción del RNA y la proteína C en presencia de pequeñas gotas de lípidos; sobre esta nueva estructura formada se asocian las proteínas prM y E que quedan inmersas en el lumen del retículo endoplásmico. Posteriormente suceden dos etapas de maduración de la partícula viral: primero se organizan de forma heterodimérica las proteínas prM y E en donde la primera recubre a la segunda; en la segunda etapa, esta partícula inmadura transita hasta la región *trans* del aparato de Golgi, donde se lleva a cabo la glicosilación, además de que ocurren cambios de conformación y de rotación de la proteína E que generan homotrímeros antiparalelos entre sí. Por último, un nuevo procesamiento proteolítico sobre la proteína prM por la proteasa furina libera a la proteína M. Esta nueva modificación estabiliza los homotrímeros de la proteína E y mantiene unida a la región pr (Bartenschlager y Miller, 2008; Mukhopadhyay y cols., 2005; Velandia y Castellanos, 2011).

Finalmente, cuando el virus es liberado por exocitosis, el pH neutro del espacio extracitoplasmático induce el desprendimiento del péptido pr, y la proteína E adquiere la conformación final que puede ser reconocida por las moléculas receptoras de la célula blanco e iniciar un nuevo ciclo de infección en otra célula (Bartenschlager y Miller, 2008; Mukhopadhyay y cols., 2005; Rodenhuis–Zybert y cols., 2010).

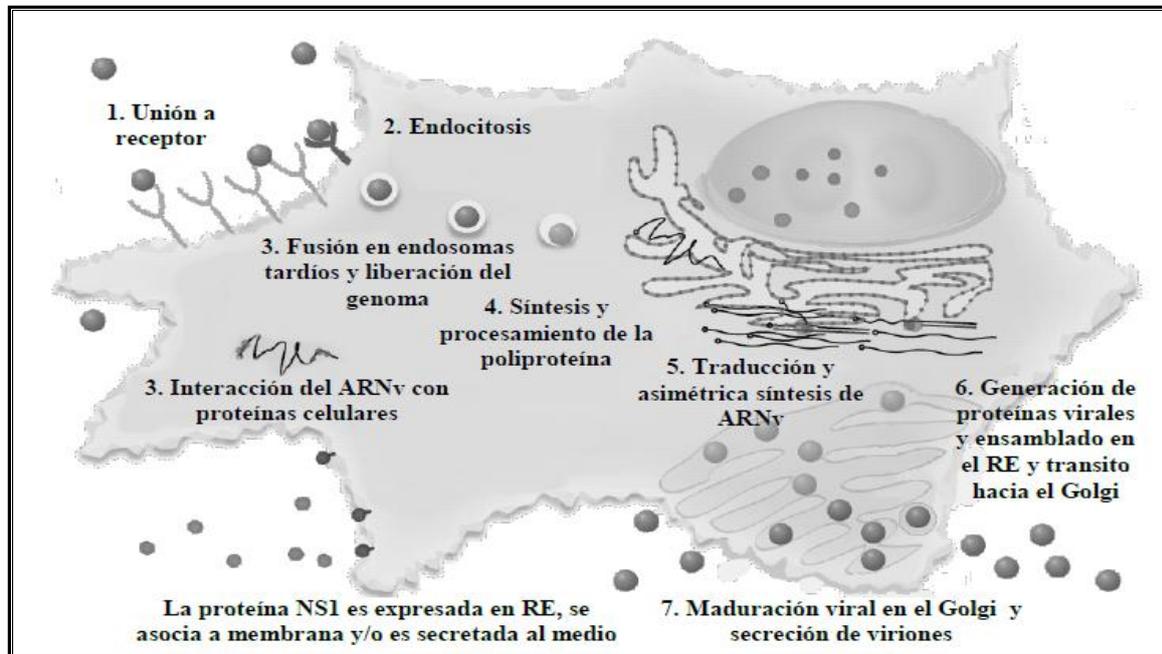


Figura 6. Replicación del DENV.

(Adaptada de Clyde y cols., 2006)

Métodos de Diagnóstico

El diagnóstico eficiente y preciso del dengue es fundamental para la detección temprana y confirmación de casos, el diagnóstico diferencial con otras enfermedades infecciosas, actividades de vigilancia, control de brotes, patogénesis, investigación académica, desarrollo de vacunas y pruebas clínicas.

El diagnóstico debe estar basado, tanto en síntomas clínicos, como en la confirmación por estudios de laboratorio, ya que la mayoría de los individuos infectados o son asintomáticos o padecen solamente un cuadro febril indiferenciado.

Hasta el momento, los métodos empleados en el laboratorio para el diagnóstico de dengue son: 1) la detección la proteína viral sNS1, 2) la detección de anticuerpos específicos, 3) el aislamiento viral, y 4) la detección molecular del genoma (Oliveira y Lopes da Fonseca, 2004; InDRE, 2008; Peeling y cols., 2010; OMS, 2009).

1) *Detección de la proteína viral sNS1*

Actualmente, el algoritmo de diagnóstico de dengue implementado por la Secretaría de Salud en México, indica como primera opción la detección de la proteína viral sNS1 en los sueros de los pacientes, ya que es la única proteína viral que es secretada por las células infectadas; además se puede detectar en el suero desde el día 1 posterior al inicio de la fiebre y hasta el día 9, por lo que es considerada como marcador de la fase aguda de la infección. Por todo lo anterior, se han desarrollado diferentes métodos para la detección del antígeno viral sNS1, que van desde pruebas rápidas de inmunocromatografía hasta procedimientos más complejos como el ELISA de captura; este último método se realiza en poco tiempo pero tiene la desventaja de no ser serotipo-específica y un resultado negativo en la misma no es totalmente excluyente de infección viral (*InDRE, 2008; Peeling y cols., 2010*).

2) *Detección de anticuerpos específicos*

La respuesta inmune adquirida por la infección del DENV consiste en la producción de anticuerpos (IgM e IgG) que son principalmente específicos para la proteína E. Los anticuerpos de tipo IgM pueden ser detectables desde los días 4–6 después del inicio de los síntomas con títulos más altos en infecciones primarias que en infecciones secundarias, por lo que en un pequeño porcentaje de los pacientes no se detectan anticuerpos IgM en la fase aguda de la enfermedad, pero sí se pueden encontrar IgG al igual que en los pacientes convalecientes con infección primaria. En la actualidad, ambas clases de anticuerpos son detectados mediante ELISA con altos valores de sensibilidad y especificidad, sin embargo, es un método indirecto para confirmar la infección por el virus y, por lo tanto, no es posible la serotipificación del mismo (*Oliveira y Lopes da Fonseca, 2004; Peeling y cols., 2010; Shu y Huang, 2004*).

3) *Aislamiento viral*

El aislamiento viral es considerado el “estándar de oro” para el diagnóstico y serotipificación de las infecciones por DENV y se realiza en muestras de pacientes que cursan la fase aguda de la infección. Existen cuatro sistemas de aislamiento: 1) la inoculación intracerebral en ratones lactantes, en donde se produce parálisis y otros signos de afectación del sistema nervioso central; 2) la inoculación intratorácica en mosquitos, en donde se emplean las especies *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Toxorhynchites amboinensis* y *Toxorhynchites spedens*; 3) la inoculación en cultivos de líneas celulares de mamíferos como Vero, LLCMK2, BHK21; y 4) la inoculación en cultivos de líneas celulares de mosquito como son C6/36, AP61 y TRA–284, para la identificación del serotipo viral mediante inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos de cada serotipo;

los resultados se obtienen en un periodo de 6 a 10 días post-inoculación (*Oliveira y Lopes da Fonseca, 2004; Peeling y cols., 2010; Shu y Huang, 2004*).

4) *Detección molecular del genoma viral*

El método empleado es la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa o RT-PCR, del inglés *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*. Desde la década de los 90's se han desarrollado diversas metodologías las cuales ofrecen mayor sensibilidad en comparación con el aislamiento viral, en un tiempo mucho más corto (*OMS, 2009*).

Recientemente se ha desarrollado la técnica de RT-PCR en tiempo real, la cual es una técnica de un solo paso que se utiliza para detectar y cuantificar el RNA viral en muestras de diversos orígenes y que emplea pares de oligonucleótidos, que pueden ser universales para detectar a todos los serotipos o específicos para cada uno de los serotipos. Dicha técnica tiene muchas ventajas sobre el método convencional, como la rapidez, una mayor sensibilidad y especificidad, la reducción de la tasa de contaminación y fácil estandarización. Por lo tanto, la RT-PCR en tiempo real ha ido sustituyendo progresivamente a la RT-PCR convencional como el nuevo estándar de oro para el diagnóstico rápido de infección por el DENV en muestras de suero en fase aguda (*OMS, 2009; Peeling y cols., 2010; Shu y Huang, 2004*).

ANTECEDENTES

La ventana óptima para la detección de una infección por dengue es aproximadamente desde el inicio de la fiebre hasta 10 días post-infección. (Peeling y cols., 2010).

El virus se puede detectar durante cuatro a cinco días en el suero, el plasma, las células sanguíneas circulantes y otros tejidos. Después del día 5, aparecen los anticuerpos específicos de la clase IgM, mientras que la proteína NS1 puede ser detectada hasta 9 días después del inicio de la enfermedad (Figura 7).

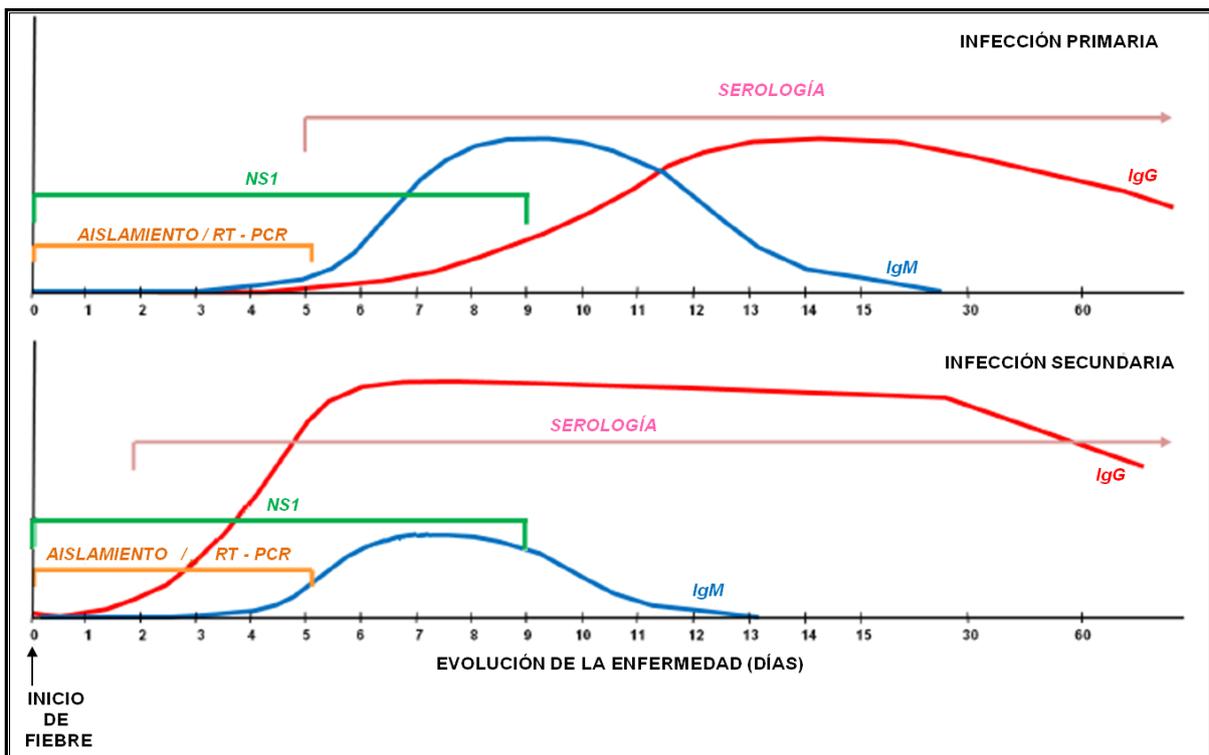


Figura 7. Línea de tiempo aproximada de las infecciones primarias y secundarias por el DENV y los métodos de diagnóstico que se utilizan para detectar la infección. (Adaptada de OMS, 2009; Peeling y cols., 2010; Ruiz, K., 2010)

La selección del método de detección depende del propósito para el cual se realizan las pruebas (por ejemplo, diagnóstico clínico, estudios epidemiológicos, investigación, desarrollo de vacunas, etc.), del tipo de laboratorio y la experiencia y conocimientos técnicos disponibles, de los costos y del tiempo de recolección de las muestras.

En general, las pruebas con gran sensibilidad y especificidad requieren experiencia y conocimientos técnicos y tecnologías más complejas, en tanto que las pruebas rápidas pueden sacrificar la sensibilidad y especificidad por la facilidad de su realización y la velocidad de su práctica. Las técnicas de aislamiento viral y detección del RNA son más laboriosas y más costosas, pero también, son más específicas que la detección de

anticuerpos mediante métodos serológicos. En la tabla 1 se muestran las ventajas y desventajas de cada método de identificación viral.

Tabla 1: Ventajas y desventajas de los métodos de diagnóstico de dengue.

Método de Diagnóstico	Ventajas	Desventajas
Aislamiento Viral	<ul style="list-style-type: none"> • Confirmatoria de la infección. • Identifica serotipos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere muestras de 0–5 días después del inicio de la fiebre. • Toma más de 1 semana en su realización. • Requiere de experiencia e instalaciones adecuadas. • No permite diferenciar entre una infección primaria y secundaria.
Detección de NS1	<ul style="list-style-type: none"> • Confirmatoria de la infección. • Económico comparada con el aislamiento viral y detección molecular del genoma. • Fácil de realizar y los resultados se obtienen en menos de 1 día. • Se puede detectar hasta 9 días después del inicio de los síntomas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Menos sensible que el aislamiento viral o la detección del RNA. • No permite la serotipificación.
Detección de Anticuerpos (IgM e IgG)	<ul style="list-style-type: none"> • Confirmatoria de la infección. • Económico comparada con el aislamiento viral y detección molecular del genoma. • Fácil de realizar. • La muestra puede ser tomada después de 5 días después del inicio de la infección. • Permite distinguir entre una infección primara e infección secundaria. 	<ul style="list-style-type: none"> • Niveles de IgM pueden ser bajos o no ser detectados en una infección secundaria. • La confirmación requiere de 2 o más muestras.
Detección del genoma viral	<ul style="list-style-type: none"> • Confirmación de la infección. • Sensible y específica • Puede identificar al serotipo • Resultados en menos de 24 hrs 	<ul style="list-style-type: none"> • Posibles falsos positivos debido a la contaminación. • Requiere experiencia y el equipo de laboratorio es costoso. • No es posible diferenciar entre una infección primaria y una secundaria.

(Adaptada de Guzmán y Vázquez, 2002; OMS, 2009; Peeling y cols., 2010; Shu y Huang, 2004)

Respecto a la detección del genoma viral como método de diagnóstico y de identificación de la carga viral, la cuantificación es de gran importancia como un marcador de gravedad de la enfermedad o para identificar las tasas de replicación en experimentos *in vitro*. Para ello se han desarrollado múltiples protocolos de RT–PCR en tiempo real, cuyas variaciones radican en la región del genoma viral utilizada como blanco para la detección, como lo son

la región 5'UTR, la proteína de cápside, la proteína de envoltura, la proteína NS5 y la región 3'UTR. También varían en la química que utilizan que puede ser SYBR Green o TaqMan; otra diferencia es la secuencia de oligonucleótidos que se emplean, los cuales pueden ser diseñados para detectar con un solo par de oligonucleótidos a los cuatro serotipos o un par de nucleótidos para cada serotipo y el caso de que se emplee el sistema TaqMan, las sondas también pueden ser diseñadas para que con una sonda se detecten los cuatro serotipos o que sea específica para cada serotipo. En la tabla 2 se muestran métodos de RT-PCR en tiempo real para la detección y cuantificación del DENV.

Tabla 2: Métodos de RT-PCR en tiempo real para la detección y cuantificación del DENV.

Autor y Año	Especificidad de los oligonucleótidos	Química	Región blanco (posiciones)
Laue y cols., 1999	DENV-1, -2, -3 y -4	TaqMan	NS5 (9959-10119)
Callahan y cols., 2001	DENV-1, -2, -3 y -4 DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4	TaqMan	3' UTR (10589-10699) NS5 (8586-8692) C (237-305) C (118-241) C (187-293)
Houng y cols., 2001	DENV-1, -2, -3 y -4	TaqMan	3' UTR (N/M)
Drosten y cols., 2002	DENV-1, -2, -3 y -4	TaqMan	3' UTR (10615-10694)
Warrilow y cols., 2002	DENV-1, -2, -3 y -4	TaqMan	3' UTR (10578-10685)
Shu y cols., 2003	DENV-1, -2, -3 y -4 DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4	SYBR Green	C (135-305) C (135-325) C (135-338) C (135-336) C (135-268)
Chitinimitkul y cols., 2005	DENV-1, -2, -3 y -4	SYBR Green	3'UTR (N/M)
Kong y cols., 2006	DENV-1, -2, -3 y -4	TaqMan	NS5 (9091-9195)
Dos Santos y cols., 2008	DENV-1, -2, -3 y -4	SYBR Green	5'UTR (1-149)
Sadon y cols., 2008	DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4	TaqMan	C (93-157) C (208-275) C (398-465) C (92-164)
Gurukumar y cols., 2009	DENV-1, -2, -3 y -4	TaqMan	3'UTR (10635-10682)
Leparc – Goffart y cols., 2009	DENV-1, -2, -3 y -4 DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4	TaqMan	3'UTR (10576-10664) C (255-384) C (16-200) C (113-176) C (271-364)
Conceição y cols., 2010	DENV-1, -2 y -3	TaqMan	5'UTR (N/M)
Hue y cols., 2011	DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4	TaqMan	NS5 (9865-9964) NS5 (9859-9983) NS5 (9591-9708) NS5 (9587-9764)

N/M: No Mencionado

El genoma del DENV presenta una homología entre los cuatro serotipos del 65 al 70% (*Upanan y cols., 2006; Perera y cols., 2008*), por ello varios protocolos se han basado en la detección específica de cada serotipo, pero a su vez, se sabe que la región 3'UTR es la más conservada entre los cuatro serotipos virales (*Callahan y cols., 2001; Drosten y cols., 2002; Gurukumar y cols., 2009; Leparc–Goffart y cols., 2009*), y por esta razón ha sido empleada como blanco para la detección molecular del virus mediante RT–PCR en tiempo real, independientemente del serotipo al que pertenezca (*Warrillow y cols., 2002; Chitinimitkul y cols., 2005; Leparc–Goffart y cols., 2009*).

Como ya se mencionó, la detección y cuantificación del genoma viral con fines de investigación ha permitido correlacionar la carga viral con la gravedad de la enfermedad. En el 2000, Vaughn y colaboradores, demostraron por primera vez una correlación directa entre la carga viral en sangre y la FHD, abriendo de esta forma la posibilidad de generalizar el fenómeno, creando una respuesta mucho más abarcadora al problema: la gravedad de la enfermedad depende de la carga viral que se alcanza. Posteriormente, Libraty y colaboradores, así como Wang y colaboradores, también reportaron dicha correlación y demostraron además la presencia de un aumento de la carga viral en individuos con FHD con respecto a los de FD en la etapa de defervescencia. En el 2010, Hoang y colaboradores encontraron un aumento en los niveles de viremia entre los 2 y 3 días después del inicio de la fiebre, lo cual asociaron con las formas clínicas más graves, lo que sugiere que la cuantificación de la carga viral en etapas tempranas tiene un valor pronóstico. El aumento de la carga viral en sangre puede explicarse por diferentes eventos moleculares no excluyentes entre sí, algunos de ellos debidos a eventos inmunopatogénicos y otros a la patogénesis viral (*Gurukumar y cols., 2009; Marcos y López, 2009; Prada y Castellanos, 2011*).

JUSTIFICACIÓN

Los métodos utilizados para la detección y cuantificación del DENV son diversos y las demandas de infraestructura y tiempo varían de acuerdo al método que se realiza.

Las técnicas de RT-PCR en tiempo real facilitan la cuantificación viral en muestras de cultivo celular, suero, plasma e inclusive en saliva y orina con mayor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad que el aislamiento viral. De los ensayos en uso a la fecha, pocos son los que permiten la evaluación de los cuatro serotipos virales en una misma reacción de RT-PCR.

En el genoma del DENV existen regiones altamente conservadas entre los cuatro serotipos virales que pueden ser blanco para el diseño de oligonucleótidos que permitan la generación de una molécula que sea representativa de los cuatro serotipos virales. Dicha molécula puede ser utilizada como estándar para la implementación un ensayo de RT-PCR en tiempo real que permita realizar la detección y cuantificación del DENV en muestras clínicas así como muestras originadas de diversos cultivos celulares, independientemente del serotipo al que pertenezcan.

HIPÓTESIS

La identificación mediante análisis bioinformático de las regiones altamente conservadas entre los serotipos del DENV, el diseño de oligonucleótidos específicos para dichas regiones, así como la amplificación y clonación de las mismas, nos permitirá la generación de una molécula que sea utilizada como estándar para la detección y cuantificación de los cuatro serotipos virales del dengue mediante RT-PCR en tiempo real.

OBJETIVOS

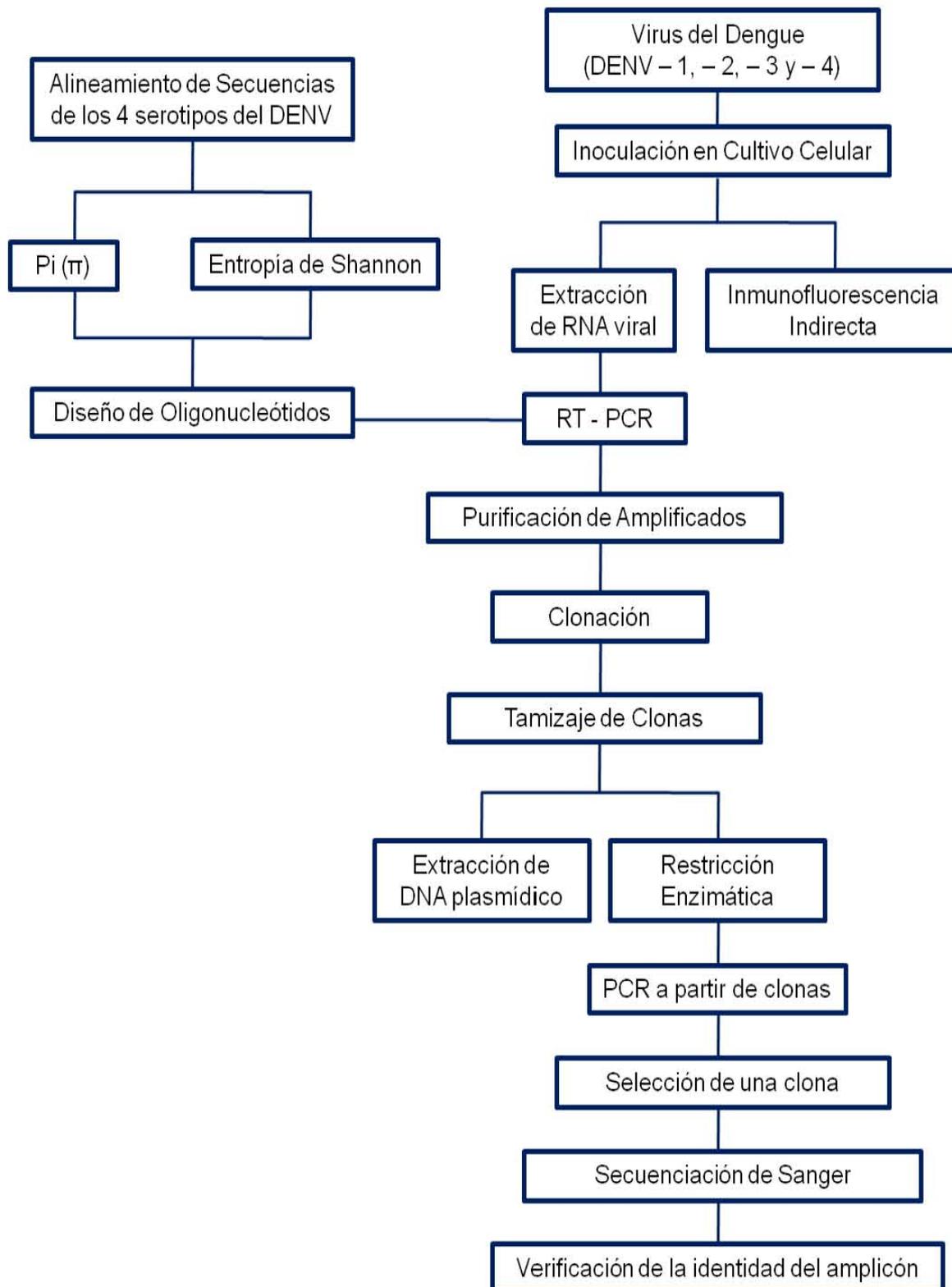
OBJETIVO GENERAL

- Realizar el diseño de oligonucleótidos específicos que reconozcan regiones altamente conservadas del DENV con la finalidad de obtener por clonación una molécula que sea utilizada como estándar en la implementación de un ensayo de RT-PCR en tiempo real.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar el análisis bioinformático de secuencias del DENV que permita identificar las regiones altamente conservadas entre los diferentes serotipos virales.
- Establecer la infección de cultivos de la línea celular C6/36 con cepas prototipo de DENV y verificar por inmunofluorescencia indirecta el serotipo viral.
- Obtener por RT-PCR dos amplicones, uno de 170 pb correspondiente a la región 3'UTR y otro de 238 pb correspondiente a la región NS5.
- Clonar los amplicones en el vector pCR2.1 TOPO.
- Verificar la identidad de los amplicones por secuenciación de Sanger.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis bioinformático para el diseño de oligonucleótidos

Se llevó a cabo un alineamiento múltiple con un total de 156 secuencias de genomas completos del DENV reportadas a la base de datos del GenBank para los cuatro serotipos virales utilizando el programa MEGA 5.05. Lo anterior, con la finalidad de realizar un análisis de Π (π) o diversidad nucleotídica, el cual es una medida de la variabilidad genética que permite conocer estimar el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar así como la frecuencia de un nucleótido en determinada posición; entre menor sea el valor obtenido, menor es la variabilidad. A partir de dicho análisis se obtendría el gráfico correspondiente que permitiera verificar que la región 3'UTR es la más conservada entre los cuatro serotipos. Para ello se utilizó el programa DNA SP Version 5.10, específicamente utilizando la función *Analysis/Polymorphism and Divergence*.

Una vez ubicada dicha región, se realizó el análisis de Entropía de Shannon o variabilidad nucleotídica, el cual es una medida cuantitativa que permite predecir la probabilidad de posibles cambios de un conjunto de elementos aleatoriamente distribuidos, es decir permite determinar en qué posiciones nucleotídicas existe menor probabilidad de cambios entre los alineamientos de los cuatro serotipos virales; entre menor sea el valor obtenido, menor es la variabilidad. Dicho análisis se realizó ingresando a la página web <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy.html>

Identificadas dichas posiciones se realizó un alineamiento de las cepas prototipo del DENV reportadas a la base de datos del GenBank (Números de Acceso DENV-1 EU848545, DENV-2 HM582102, DENV-3 M93130 y DENV-4 AY947539) y se identificaron las bases nitrogenadas que constituirían los oligonucleótidos correspondientes, los cuales fueron designados como 3'UTR FWD y 3'UTR RVS.

Respecto a la región NS5, se emplearon los oligonucleótidos reportados por Richardson y colaboradores en el año 2006; (NS5-FWD y NS5-RVS), los cuales fueron diseñados para reconocer únicamente la secuencia del DENV-2. Estos oligonucleótidos se alinearon con las secuencias reportadas a la base de datos del GenBank (Números de Acceso HM582102 y HM582103) para confirmar su reconocimiento con el DENV-2.

Para los futuros ensayos de transcripción *in vitro*, en el extremo 5' a los oligonucleótidos 3'UTR FWD y NS5 FWD, se les incorporó la secuencia nucleotídica correspondiente al

promotor del bacteriófago T7 (CAGTAATACGACTCACTATAGGG) y 8 nucleótidos (AGAAGGCT) para incrementar la actividad de la enzima y por consiguiente, hacer más eficiente el proceso de transcripción *in vitro*, mientras que en el mismo extremo pero a los oligonucleótidos 3'UTR RVS y NS5 RVS se les incorporó la secuencia nucleotídica del promotor del fago SP6 (CGATTTAGGTGACACTATAGAA) y 8 nucleótidos (GAGAGGCT) con la finalidad de incrementar la actividad de dicha enzima y por consiguiente, hacer más eficiente el proceso de transcripción *in vitro*.

Células C6/36

Esta línea celular proviene de células del mosquito *Aedes albopictus*, las cuales crecen a 28°C sin CO₂. Para el crecimiento de las células C6/36 se utilizó medio MEM (Minimum Essential Medium) suplementando con SFB (Suero Fetal Bovino) al 6% con vitaminas, aminoácidos no esenciales, L-glutamina al 1%. Después de 24 hrs se realizó el cambio a medio de mantenimiento utilizando MEM suplementado con SFB al 2.5%, vitaminas, aminoácidos esenciales, L-glutamina al 1%, y antibiótico-antimicótico penicilina-estreptomicina al 0.2%.

Infección de los cultivos celulares con el virus dengue

Se emplearon las cuatro cepas prototipo del DENV (DENV-1 Hawaii, DENV-2 Nueva Guinea C, DENV-3 H87 y DENV-4 H241), proporcionadas por el CDC. A partir de una botella de cultivo de 25 cm² con una monocapa confluyente de células C6/36, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 5 mL de medio de mantenimiento y 50 µL del inóculo del virus. Se incubó a 28°C durante 7 días y posteriormente se cosechó el sobrenadante y la monocapa celular se desprendió mecánicamente con un raspador de células. Se almacenó a -70°C hasta el momento de su uso para la extracción del RNA viral.

Inmunofluorescencia Indirecta

Se desprendió parte de la monocapa celular junto con 500 µL de sobrenadante y se colectó en un tubo Eppendorf. Se fijaron las células en portaobjetos limpios con PBS-acetona durante 10 minutos. Posteriormente las células fueron bloqueadas con PBS-leche a 5% durante 45 minutos. Se realizaron 2 lavados con PBS-Tween al 0.05% durante 5 minutos cada uno. Después se incubó con el anticuerpo primario específico para la proteína E (anti E) dilución 1:50 con PBS-leche al 3%. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween al 0.05% de 5 minutos cada uno. Posteriormente se incubó en oscuridad durante 45 minutos con el anticuerpo secundario Anti IgG de ratón marcado con FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) dilución 1:50 con PBS-leche al 3%. Finalmente se realizaron 5 lavados con PBS-Tween al 0.05% durante 5 minutos cada uno.

y la laminilla fue montada para posteriormente ser observada en el microscopio confocal de fluorescencia.

Extracción de RNA viral

Se realizó la extracción de RNA viral de los cuatro serotipos con el kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN 52906). En un tubo Eppendorf se colocaron 560 μL de buffer AVL–acarreador de RNA y posteriormente se adicionaron 140 μL del sobrenadante de los cultivos infectados y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, se adicionaron 560 μL de etanol absoluto y se mezcló por 15 segundos. Se agregaron 630 μL de la mezcla anterior a columnas con tubos colectores y se centrifugó a 6,000 $\times g$ durante 1 minuto. Se agregó el resto de la mezcla y se centrifugó nuevamente a 6,000 $\times g$ durante 1 minuto. Se colocó la columna en un tubo nuevo y se adicionaron 500 μL de buffer AW1 y se centrifugó a 6,000 $\times g$ durante 1 minuto a 4°C. Se adicionaron 500 μL de buffer AW2 y se centrifugó a 20,000 $\times g$ por 3 minutos a 4°C. Se colocó la columna en un tubo nuevo y se adicionaron 60 μL de buffer AVE. Se centrifugó a 6,000 $\times g$ durante 1 minuto a 4°C y finalmente se obtuvo el RNA viral purificado, el cual fue almacenado a -70°C hasta su uso.

RT–PCR

La síntesis de cDNA y amplificación por PCR de un fragmento de la región 3'UTR y otro fragmento de la región NS5 para cada serotipo, se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito para el kit SuperScript One–Step RT–PCR (Invitrogen 10928–042). Se realizó la mezcla de reacción colocando 12.5 μL de buffer 2x, 1 μL del oligonucleótido 3'UTR FWD, 1 μL del oligonucleótido 3'UTR RVS, ambos a una concentración inicial de 10pmol/ μL , 0.5 μL de RT/Taq, 2 μL de RNA viral y H_2O grado PCR para completar un volumen final de reacción de 25 μL . El mismo procedimiento se realizó para amplificar la región NS5 pero se emplearon los oligonucleótidos NS5 FWD y NS5 RVS, ambos a una concentración de 10 pmol/ μL .

Se programó el termociclador para realizar un ciclo inicial de 50°C durante 15 minutos, seguido de un ciclo de 94°C durante 2 minutos y 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 15 segundos, 72°C durante 30 segundos, con una extensión final de 72°C durante 7 minutos y enfriamiento a 4°C. Los productos de las amplificaciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% al que se aplicó una corriente de 80 Volts (V) durante 45 minutos y se tiñó con Bromuro de Etidio (Br–Et). La separación de bandas se observó en un transiluminador con luz ultravioleta (UV).

Purificación de fragmentos de DNA obtenidos de la reacción de RT-PCR.

A partir del gel de agarosa, para la región 3'UTR se purificó el amplicón correspondiente a DENV-1 y para la región NS5 se purificó el correspondiente a DENV-2 utilizando el kit Purelink Quick Gel Extraction (Invitrogen K2100-12). Se realizó el corte del fragmento del gel con materiales libres de DNAsas para evitar la degradación del amplicón y se colocó en un tubo Eppendorf, el cual fue previamente pesado. El peso del fragmento del gel se obtuvo de la diferencia del peso inicial del tubo y el peso del tubo con el gel, con este dato y con la concentración del gel, se determinó el volumen necesario de solubilizador de gel (L3). Para el fragmento de 3'UTR se agregaron 360 μL y para el fragmento de NS5 se agregaron 300 μL . Dichos tubos se colocaron en un baño maría a 50°C durante 20 minutos mezclando periódicamente por inversión. Se montó la columna de extracción dentro de un tubo Eppendorf y se colocó dentro de la columna el gel disuelto. Se centrifugó a 17,500 xg durante 1 minuto y se desechó el líquido colectado. Después se adicionaron 600 μL de buffer W1 y se centrifugó a 17,000 xg durante 1 minuto y se desechó el líquido colectado en el tubo. Nuevamente se centrifugó a 17,000 xg durante 3 minutos para remover los residuos de buffer. La columna se colocó en un nuevo tubo Eppendorf y se le adicionaron 50 μL de buffer E5; se dejó incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 17,000 xg durante 1 minuto. Finalmente el líquido colectado contenía el fragmento de DNA purificado. La pureza de los fragmentos se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% al que se aplicó una corriente de 80 V durante 45 minutos y se tiñó con Br-Et. Las bandas se observaron en un transiluminador con luz UV y el resto del purificado se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

Preparación de células competentes

Se empleó la cepa *Escherichia coli* TOP10, la cual fue tratada con CaCl_2 , con la finalidad de facilitar la entrada del vector. Esta cepa fue sembrada en 3 mL de medio LB (Luria Bertani) líquido e incubada durante toda la noche a 37°C con agitación vigorosa. Al día siguiente este pre-inóculo fue agregado a 100 mL de medio LB líquido, el cual se incubó a 37°C con agitación vigorosa hasta obtener una lectura de absorbancia a 600nm entre 0.25-0.4, tomando como blanco medio de cultivo. Una vez obtenida la absorbancia deseada, el cultivo fue transferido a tubos de centrifuga estériles, los cuales se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. Posteriormente fueron centrifugados a 2,700 xg durante 10 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida por pipeteo ligero con 10 mL de solución A (CaCl_2 60mM, PIPES 10mM, Glicerol 15%), estéril y fría. Nuevamente se centrifugaron a 2,700 xg durante 10 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida con 10 mL de la solución A y se dejaron los tubos en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 2,700 xg durante 10

minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida con 4 mL de la solución A y se colocaron alícuotas de 200 µL en tubos estériles, las cuales se almacenaron a -70°C hasta el momento de su uso.

Clonación de amplicones

El proceso de clonación se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito para el kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen K4500-01), el cual utiliza como vector de clonación al plásmido pCR2.1 TOPO.

Este plásmido se encuentra en forma linealizada, y se caracteriza por tener incorporada una DNA Topoisomerasa I, que dentro del plásmido funciona como una enzima de restricción que reconoce la secuencia 5'CCCTT y forma una unión covalente con el grupo fosfato de la Timina (T) en el extremo 3', y a su vez actúa como una ligasa que posibilita la directa unión de secuencias de DNA. Además, el sistema incluye una Taq Polimerasa que posee actividad de transferasa terminal que permite la adición de adeninas (A) a los extremos 3' del producto de PCR. Finalmente se lleva a cabo la unión de los extremos T del vector con los extremos A del producto de PCR, lo que ocasiona la liberación de la Topoisomerasa I y la obtención del plásmido recombinante (Figura 8).

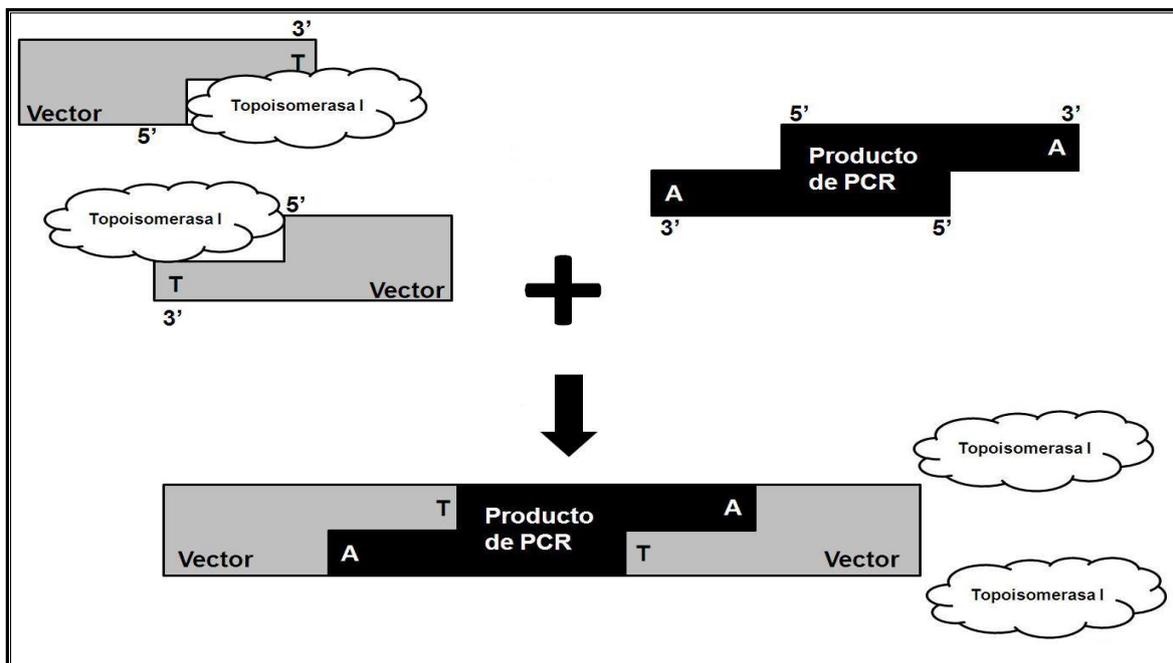


Figura 8: Esquema representativo de la reacción de ligación en un vector T.
(Adaptado de http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf)

Las características más destacadas del vector pCR 2.1 TOPO son: la presencia de los sitios de reconocimiento para EcoRI que flanquean el sitio de inserción del producto de PCR para una fácil remoción del inserto; para la selección de las clonas de *Escherichia coli*, el plásmido presenta los genes que codifican para la resistencia a los antibióticos kanamicina y ampicilina; el sitio/promotor T7 iniciador para transcripción *in vitro* así como un sitio para oligonucleótidos iniciadores M13 Forward y M13 Reverse, que son útiles para secuenciación (Figura 9).

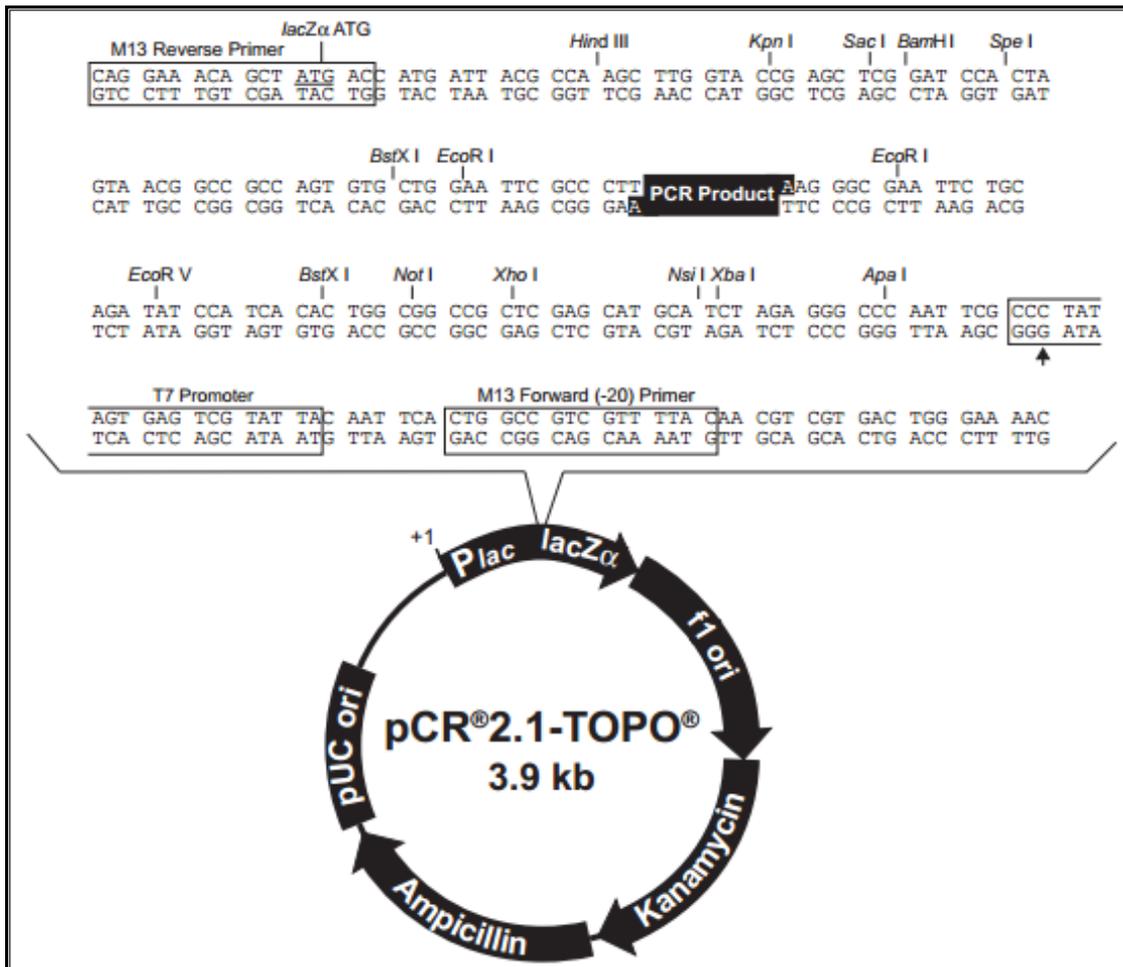


Figura 9. Mapa del vector de clonación pCR 2.1 TOPO

(Tomado de http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1_topo_map.pdf)

Se preparó la mezcla de ligación colocando en un tubo Eppendorf 4 μ L del fragmento de DNA purificado, 1 μ L de Salt Solution y 1 μ L del vector pCR2.1 TOPO. Se mezcló perfectamente y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó la mezcla de ligación a una alícuota de 200 μ L de células competentes, se mezclaron suavemente y se incubó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se realizó un choque térmico incubando la reacción a 42°C durante 90 segundos y transfiriendo inmediatamente los tubos al hielo. Se les agregó 1 mL de medio LB líquido y se colocaron

en agitación vigorosa durante 1 hora para favorecer el crecimiento bacteriano. Finalmente se plaquearon 350 μ L de la reacción en cajas Petri con medio sólido LB con un antibiótico selectivo, en este caso se empleó ampicilina a una concentración de 100 μ g/mL, ya que las células que tuvieron la capacidad de introducir el vector, el cual posee el gen de resistencia a este antibiótico, crecerán en el medio de cultivo. Las cajas se incubaron a 37°C durante toda la noche y se observó si hubo o no crecimiento bacteriano.

Se empleó como control positivo el plásmido pRSET A y como control negativo únicamente células competentes para verificar la efectividad del antibiótico de resistencia.

Las colonias resultantes fueron perfectamente identificadas y sembradas por estriado sobre cajas Petri con medio sólido LB con ampicilina 100 μ g/mL, las cuales fueron incubadas a 37°C durante toda la noche para tener una suficiente cantidad de bacterias para los posteriores experimentos de tamizaje.

Extracción de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina

Cada colonia bacteriana fue sembrada en 3 mL de medio líquido LB con ampicilina 100 μ g/mL en tubos de cultivo, los cuales se mantuvieron durante toda la noche a 37°C con agitación vigorosa. El cultivo se transfirió a tubos Eppendorf estériles y se cosecharon las células por centrifugación a 17,000 xg durante 2 minutos. La pastilla bacteriana fue resuspendida utilizando un vortex en 500 μ L de solución amortiguadora salina fría (NaCl 0.1 M, Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM pH 8.0). Se centrifugó a 2,700 xg durante 5 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida utilizando un vortex en 100 μ L de solución amortiguadora glucosada (Glucosa 50mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10mM pH 8.0). Posteriormente se adicionaron 200 μ L de solución de lisis (NaOH 0.2 N, SDS 1%) preparada en el momento de su uso. El tubo se mezcló por inversión suave varias veces y se dejó reposar en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron 150 μ L de la solución de acetato de potasio (acetato de potasio 3M y 11.5% de ácido acético glacial pH final 4.6), se mezcló de forma suave y se dejó reposar por 5 minutos en hielo. Se centrifugó a 17,000 xg durante 5 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante sin ningún resto celular a un tubo nuevo. Se agregaron 900 μ L de etanol absoluto y se mezcló por inversión varias veces. Se dejó reposar en hielo durante 10 minutos para facilitar la precipitación del DNA. Se centrifugó a 17,000 xg durante 15 minutos a 4°C para compactar el DNA plasmídico. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 70% para resuspender la pastilla. Nuevamente se centrifugó a 15,700 xg durante 5 minutos a 4°C y se eliminó la mayor cantidad posible de sobrenadante y se dejó secar al aire la pastilla de DNA, la cual fue resuspendida en 50 μ L de H₂O Milli Q estéril, se

tomaron 5 μL del DNA para analizarlo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% al que se le aplicó una corriente de 80V durante 45 minutos y se tiñó con Br–Et. Las bandas se observaron en un transiluminador con luz UV y el resto del DNA plasmídico se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

Restricción Enzimática con EcoRI

Se procedió a realizar la restricción enzimática del DNA plasmídico utilizando la enzima EcoRI, ya que en base al mapa del vector de clonación (Figura 9), dicha enzima al realizar su corte en el DNA plasmídico libera el fragmento de PCR clonado. Se utilizaron 20 μL de DNA plasmídico, 0.5 μL de enzima EcoRI (Invitrogen 15202013), 5 μL de buffer REact®3 10X y 24.5 μL de H₂O Milli Q estéril. La reacción se mezcló y se incubó a 37°C durante 1 hora y media. Posteriormente se realizó la inactivación de la enzima colocando la reacción a -20°C durante 15 minutos. El control negativo consistió en la misma mezcla de reacción, pero el DNA plasmídico fue sustituido por H₂O Milli Q estéril. Se tomaron 5 μL de cada reacción para analizar los fragmentos de la restricción mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% al que se le aplicó una corriente de 80V durante 45 minutos y se tiñó con Br–Et. Las bandas se observaron en un transiluminador con luz UV y el resto de la reacción se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

PCR a partir de colonias bacterianas

Las clonas seleccionadas por restricción enzimática fueron sometidas a PCR para reconfirmar la presencia del inserto correspondiente. Se realizó la mezcla de reacción con 12.5 μL de PCR Master Mix (Roche 11636103001), 1 μL del oligonucleótido 3'UTR FWD o NS5 FWD, 1 μL del oligonucleótido 3'UTR RVS o NS5 RVS, todos a una concentración inicial de 10pmol/ μL y H₂O Milli Q estéril para completar un volumen final de reacción de 20 μL . Posteriormente, con ayuda de un palillo estéril se tomó una pequeña cantidad de la colonia que fue colocada dentro de cada tubo que contenía la mezcla de reacción. Se realizó un ciclo inicial de 94°C durante 10 minutos y la reacción se paró para agregar 0.5 μL de Taq Polimerasa (1U). Posteriormente, se programó un ciclo de 94°C durante 2 minutos y 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 15 segundos, 72°C durante 30 segundos, con una extensión final de 72°C durante 7 minutos y enfriamiento a 4°C .

Los productos de la reacción de PCR se analizaron mediante electroforesis en un E– Gel® SizeSelect 2% Agarose (Invitrogen G6610–02), el cual se programó por 30 minutos y la separación de bandas se observó en un transiluminador con luz UV. Los amplificados se almacenaron a 4°C .

Secuenciación de Sanger

Se eligió al azar una clona positiva para cada región clonada (3'UTR y NS5). El producto de PCR correspondiente a dichas clonas se envió a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM. El amplificado de la región 3'UTR se envió a secuenciar con el oligonucleótido 3'UTR FWD, mientras que correspondiente a NS5 se envió a secuenciar con el oligonucleótido NS5 FWD. A su vez, el DNA plasmídico correspondiente a la clona de 3'UTR se envió a secuenciar con el primer universal M13 (-20) Forward, que viene incluido en el kit de clonación. En todos los casos se siguieron las indicaciones que dicha institución pide para el envío de muestras. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con los oligonucleótidos diseñados para cada región, con la finalidad de comprobar la identidad del inserto de PCR clonado.

Almacenaje de Clonas

Una vez que se verificó que las clonas poseen el inserto de interés se procedió a su almacenaje para conservarse por largo tiempo. Cada clona se resembró en cajas Petri con medio sólido LB con ampicilina 100 µg/mL y se incubó a 37°C durante toda la noche. De esta caja se tomaron las colonias, las cuales fueron sembradas por picadura en viales con medio LB con agar al 0.7% e incubadas a 37°C durante toda la noche y posteriormente se almacenaron a 4°C.

A su vez se prepararon stocks con glicerol; para ello cada colonia bacteriana fue sembrada en 10 mL de medio LB líquido con ampicilina 100 µg/mL e incubada a 37°C durante toda la noche. Posteriormente en tubos estériles se colocaron 150 µL de glicerol estéril y se agregaron 850 µL del cultivo líquido, se agitaron vigorosamente y se almacenaron a -70°C.

Purificación del DNA

A partir de la mezcla de la restricción enzimática de las clonas secuenciadas, se precipitó el DNA digerido. Para ello, la reacción se llevó a un volumen de 50 µL con H₂O Milli Q estéril y se adicionaron 2 µL de NaCl 5M y 104 µL de etanol absoluto. Se mezcló perfectamente y se dejó reposar durante toda la noche a -20°C para facilitar la precipitación del DNA. Se centrifugó a 17,000 xg durante 15 minutos a 4°C para compactar el DNA. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 500 µL de etanol al 70%. Nuevamente se centrifugó a 15,700 xg durante 5 minutos a 4°C y se eliminó la mayor cantidad posible de sobrenadante y se dejó secar al aire la pastilla de DNA, la cual fue resuspendida en 50 µL de H₂O Milli Q estéril y se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

RESULTADOS

Análisis bioinformático para el diseño de oligonucleótidos

Inicialmente se llevó a cabo el análisis bioinformático para identificar las regiones candidatas en el genoma viral para el diseño de oligonucleótidos capaces de reconocer a los cuatro serotipos virales. Dicho análisis consistió en un alineamiento múltiple de secuencias de genomas completos de los cuatro serotipos virales y por medio de un análisis de π (π) o diversidad nucleotídica, se verificó lo reportado en la literatura respecto a que la región 3'UTR, que se encuentra en el extremo final del genoma, es la más conservada entre los serotipos virales (Figura 10).

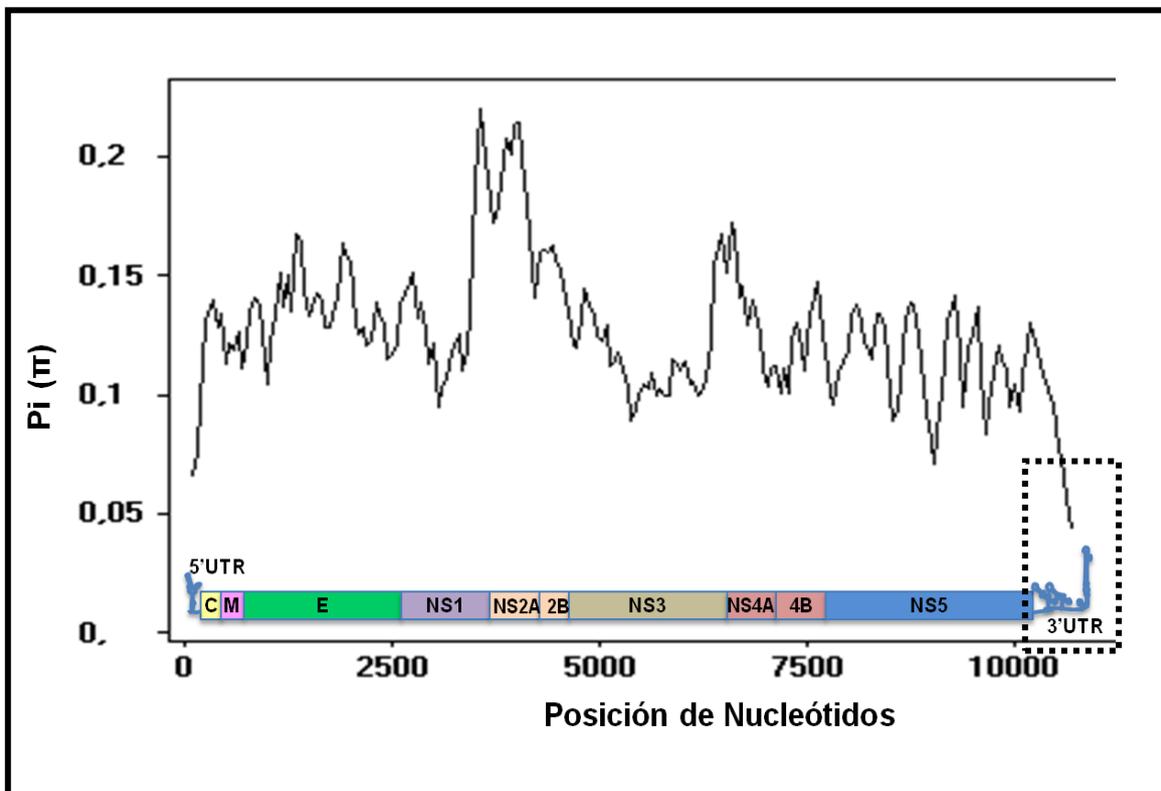


Figura 10. Gráfica del análisis de π para la determinación de las regiones conservadas entre los diferentes serotipos del DENV. Se aprecia que la región 3'UTR, ubicada en el extremo final de la gráfica y que se encuentra señalada dentro del recuadro punteado, es la más conservada entre los serotipos virales debido a que los valores de π son los más bajos dentro del genoma del DENV.

Posteriormente, con el cálculo de la Entropía de Shannon se obtuvo el gráfico mediante el cual se determinó que los nucleótidos comprendidos entre la posición 10500 a la 10700 son los menos variables entre los serotipos del DENV, y por lo tanto, los oligonucleótidos se diseñaron sobre dichas posiciones (Figura 11).

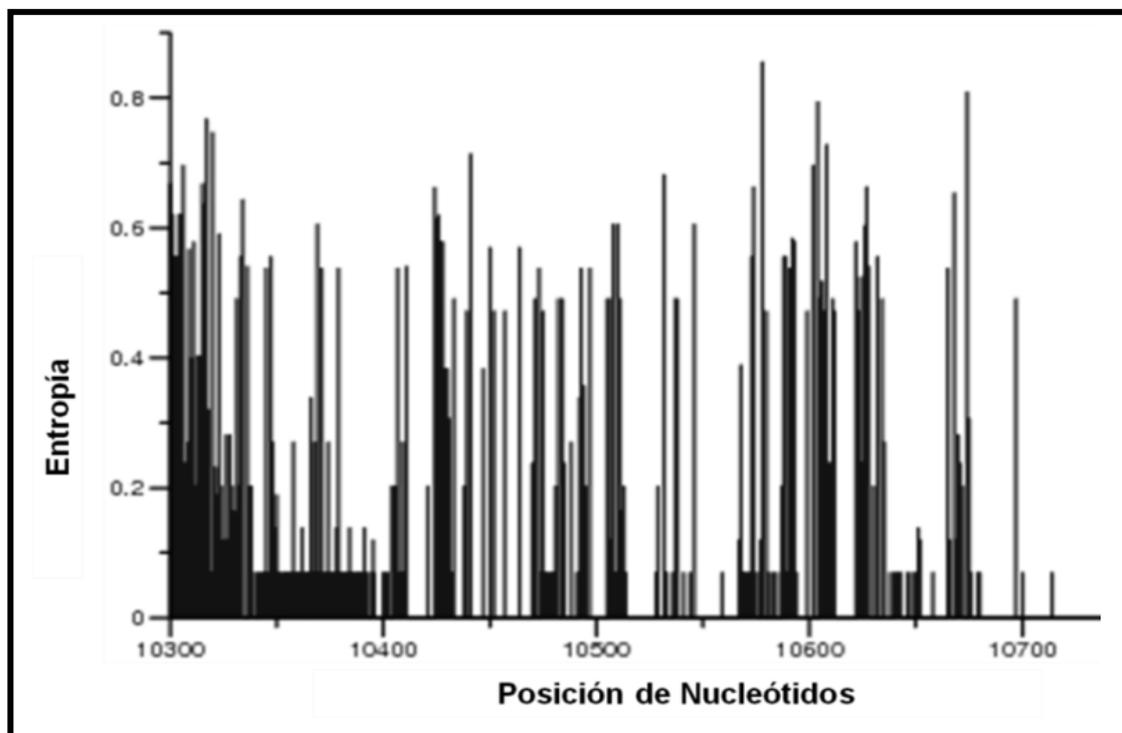


Figura 11. Gráfica del análisis de Entropía de Shannon para la determinación de la variabilidad nucleotídica en la región 3'UTR. Se observa que las posiciones comprendidas entre los nucleótidos 10500 al 10700 presentan menor variabilidad.

En la figura 12, se observan los alineamientos realizados para la selección de la secuencia de los oligonucleótidos. En la figura 12 A) se observa que, con el alineamiento de las cepas prototipo (DENV-1 EU848545, DENV-2 HM582102, DENV-3 M93130 Y DENV-4 AY947539) se definieron las secuencias de los oligonucleótidos para la región 3'UTR que reconocen a los cuatro serotipos virales.

Respecto a los oligonucleótidos para la región NS5, se realizó el alineamiento de los mismos con las cepas prototipo (HM582102 y HM582103) y se verificó que reconocieran la secuencia de DENV-2, tal y como se observa en la figura 12 B).

Finalmente, a estos oligonucleótidos, se les añadió la secuencia nucleotídica conteniendo los promotores para el bacteriófago T7 y SP6 para permitir el proceso de transcripción *in vitro*, obteniéndose las secuencias finales que se muestran en la Tabla 3.

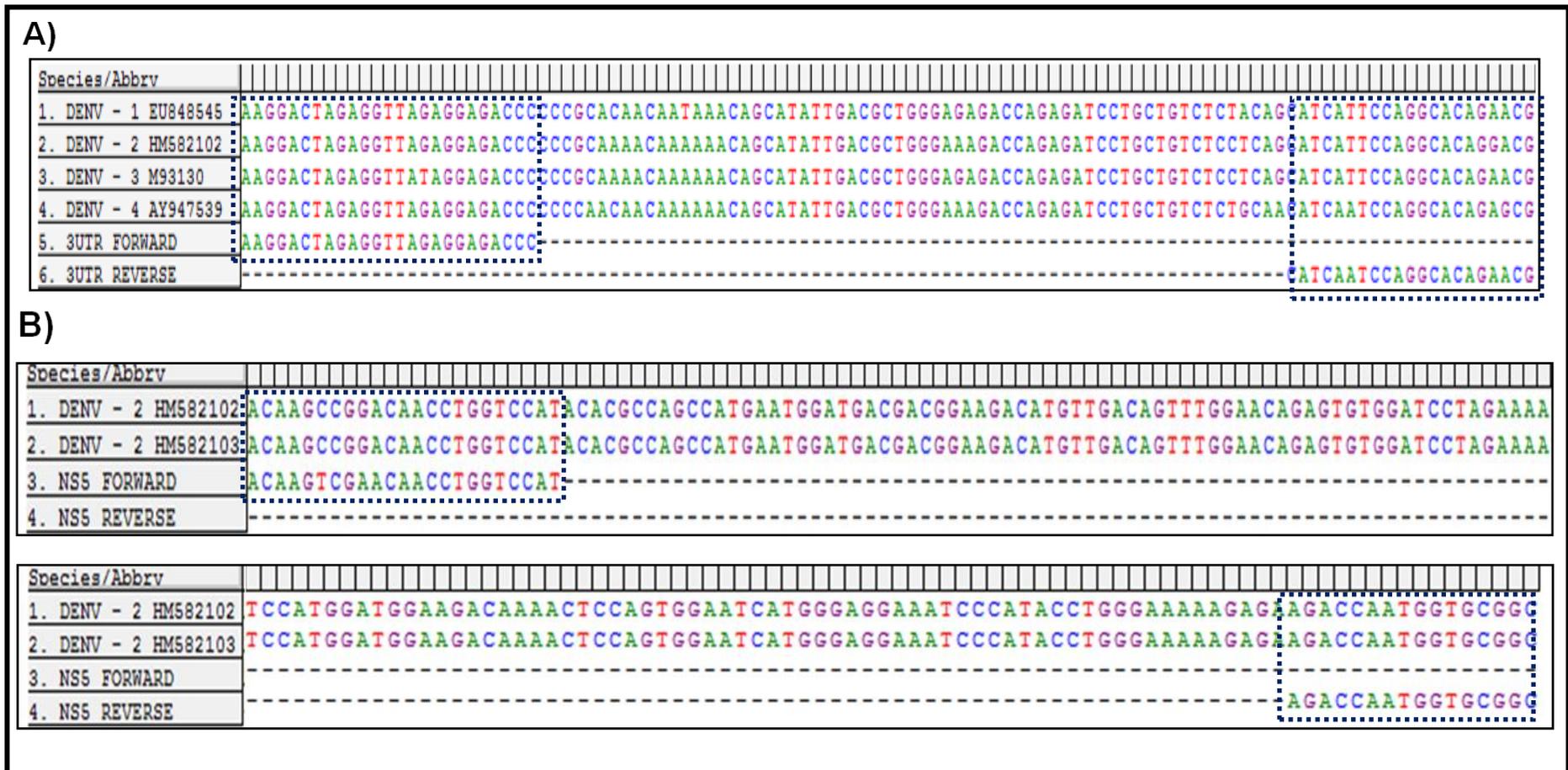


Figura 12. Alineamiento de las cepas prototipo del DENV. A) Secuencias del DENV-1 EU848545, DENV-2 HM582102, DENV-3 M93130 y DENV-4 AY947539 reportadas a la base de datos del GenBank para el diseño de los oligonucleótidos de la región 3'UTR. B) Secuencias de DENV-2 HM582102 y HM582103 reportadas a la base de datos del GenBank para la verificación del reconocimiento de los oligonucleótidos diseñados para la región NS5 de DENV-2. Las posiciones en las que alinean los oligonucleótidos con las cepas prototipo se encuentran señaladas dentro del recuadro punteado.

Tabla 3: Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones 3'UTR y NS5

NOMBRE	SECUENCIA
3'UTR FWD	5'- CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCC-3'
3'UTR RVS	5'- CGATTTAGGTGACACTATAGAAGAGAGGCTCGTTCTGTGCCTGGATTGATG - 3'
NS5 FWD	5'- CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTACAAGTCGAACAACCTGGTCCAT - 3'
NS5 RVS	5'- CGATTTAGGTGACACTATAGAAGAGAGGCTGCCGCACCATTGGTCTTCTC - 3'

Secuencia nucleotídica correspondiente al promotor T7

Secuencia nucleotídica correspondiente al promotor SP6

Secuencia nucleotídica que incrementa la actividad de la enzima T7 polimerasa

Secuencia nucleotídica que incrementa la actividad de la enzima SP6 polimerasa

Secuencia nucleotídica específica para reconocimiento del DENV

Infección de cultivos celulares C6/36 con cepas prototipo de DENV

Se obtuvo un abasto viral propagando los virus DENV-1 Hawaii, DENV-2 Nueva Guinea C, DENV-3 H87 y DENV-4 H241 en células C6/36 las cuales mostraron un efecto citopático que fue evidente a los 7 días post-infección al observarse la destrucción de la monocapa celular, así como la formación de sincicios (Figura 13).

Inmunofluorescencia Indirecta

Con la finalidad de comprobar el serotipo viral, se realizó una inmunofluorescencia indirecta en células C6/36 infectadas con DENV-2 Nueva Guinea C. Se eligió sólo a este serotipo ya que el efecto citopático observado fue más evidente en comparación con los demás serotipos. Se utilizó el anticuerpo primario específico para la proteína E (Anti E) y como anticuerpo secundario Anti IgG de ratón marcado con FITC (Figura 14).

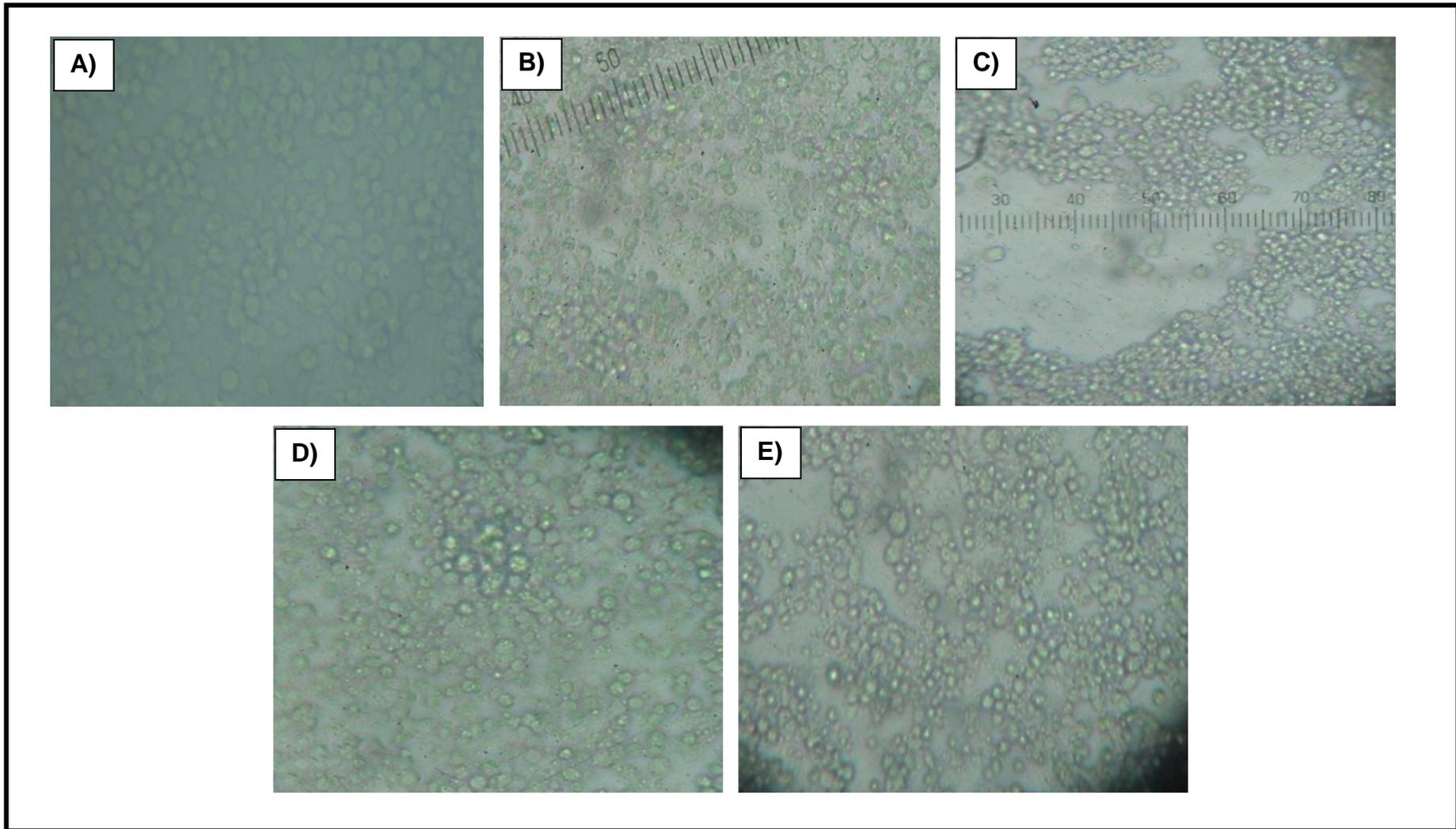


Figura 13. Efecto citopático del DENV en células C6/36. A) Células sin infección y células infectadas con B) DENV-1 Hawaii; C) DENV-2 Nueva Guinea C; D) DENV-3 H87 y E) DENV-4 H241 (7 dpi).

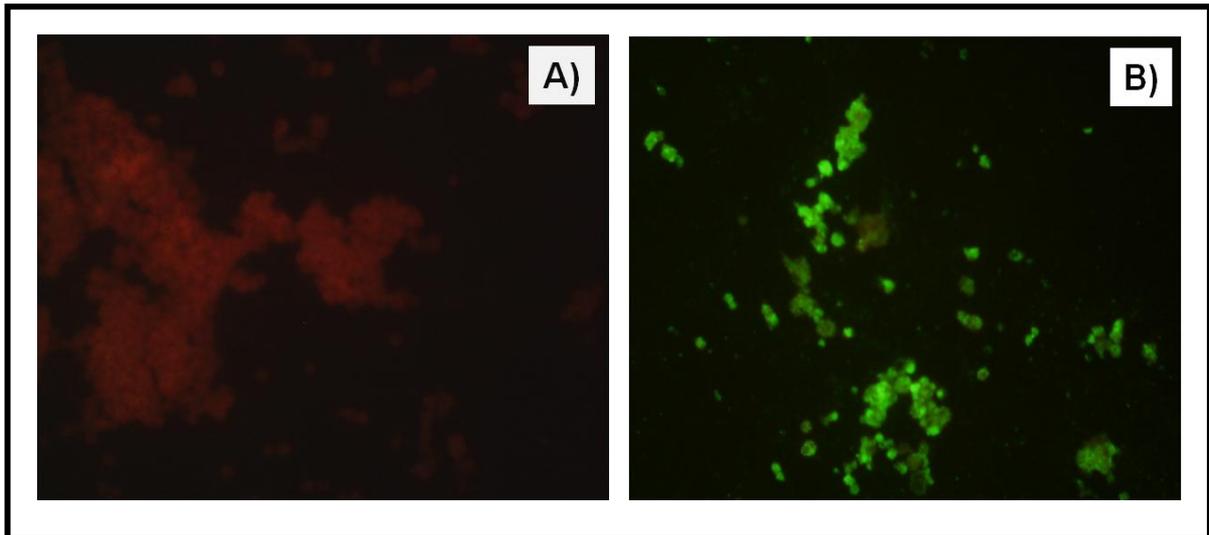


Figura 14. Inmunofluorescencia indirecta en células C6/36: A) Células sin infección y B) Células infectadas con DENV-2 Nueva Guinea C (7 dpi).

Obtención de RNA viral

La extracción de RNA viral a partir de los cultivos celulares infectados se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos, y se comprobó su presencia mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Br-Et (Figura 15). En todas las muestras se observa la banda de 11 kb, correspondiente al genoma viral.

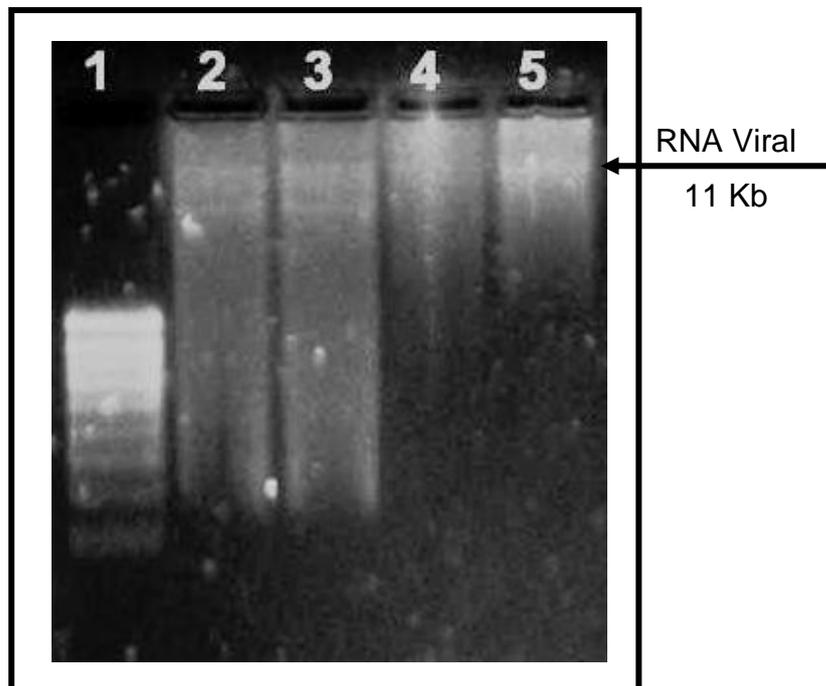


Figura 15. Análisis de la obtención de RNA viral. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con Br-Et del RNA viral extraído con el kit QIAamp Viral RNA de QIAGEN. En el carril 1 se colocó el marcador de DNA 100 pb mientras que en los carriles 2, 3, 4 y 5 se colocaron las muestras extraídas del DENV-1, -2, -3 y -4, respectivamente. La flecha indica el tamaño del fragmento esperado y en todas las muestras se observa la banda de 11 kb, correspondiente al genoma viral.

RT-PCR

El RNA viral obtenido se sometió a una RT-PCR en un solo paso para obtener el cDNA correspondiente y realizar la amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos para cada región.

Cabe mencionar que en el caso de los amplificados para la región 3'UTR, el tamaño del amplicón dependía del serotipo y se encontraba entre 168–170 pb, mientras que para la región NS5 se esperaba un amplificado de 238 pb. Una vez obtenidos los productos de PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con Br-Et, con la finalidad de visualizar las bandas resultantes de cada reacción (Figura 16).

Respecto a las reacciones para la región 3'UTR, se observa en la figura 16 A) que se obtuvo el fragmento esperado para cada serotipo viral, mientras que para las reacciones de la región NS5, se observa en la figura 16 B) el único fragmento esperado para DENV-2.

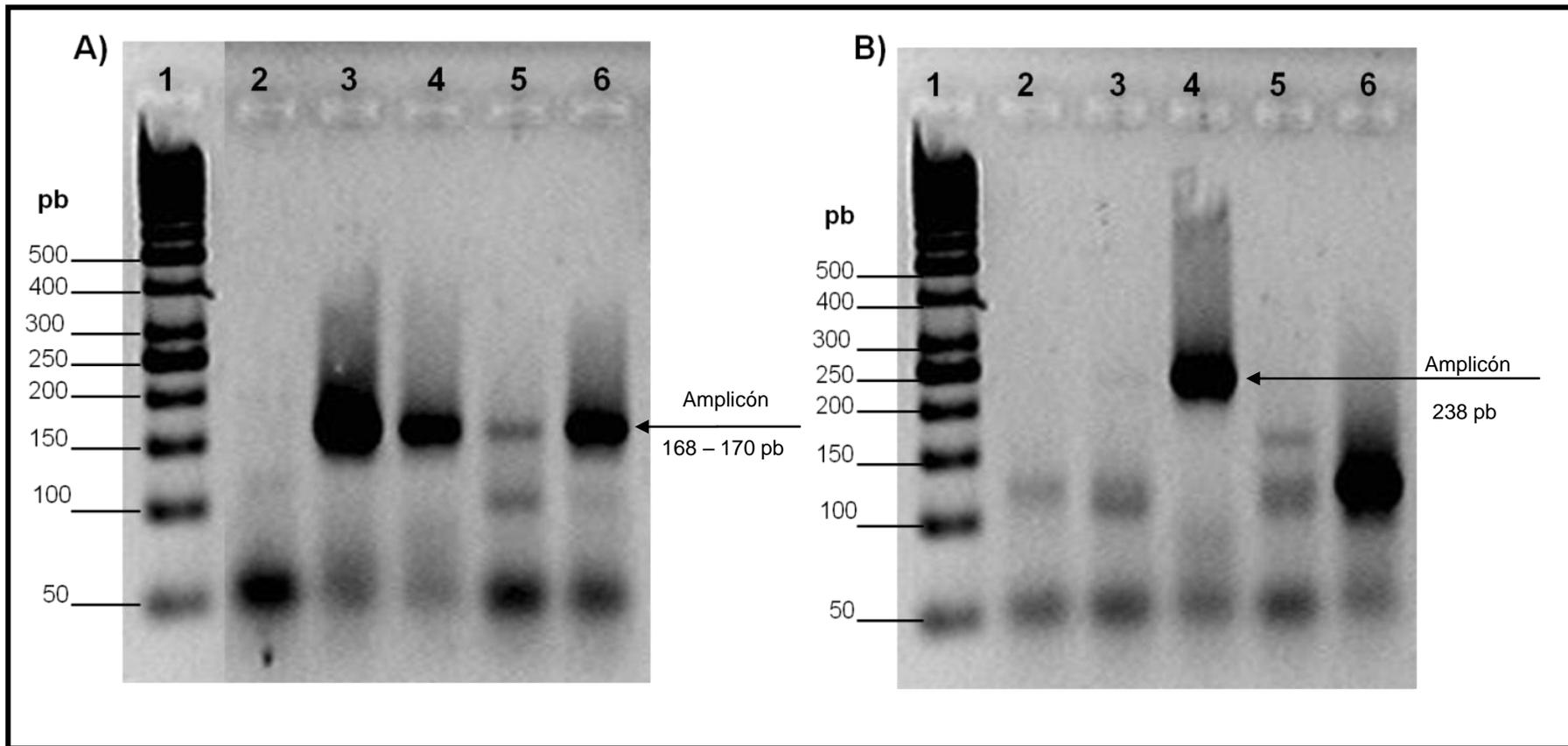


Figura 16. Análisis de los productos de la RT-PCR. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con Br-Et. A) Gel correspondiente a las reacciones realizadas con los oligonucleótidos diseñados para la región 3'UTR; en el carril 1 se muestra el marcador de DNA 50 pb, en el carril 2 se muestra el control negativo, en el carril 3 se muestra el fragmento de DENV-1 de 170 pb, en el carril 4 se muestra el fragmento de DENV-2 de 169 pb, en el carril 5 se muestra el fragmento de DENV-3 de 168 pb y en el carril 6 se muestra el fragmento correspondiente a DENV-4 de 168 pb. B) Gel correspondiente a las reacciones realizadas con los oligonucleótidos diseñados para la región NS5; en el carril 1 se muestra el marcador de DNA 50 pb, en el carril 2 se muestra el control negativo, en el carril 4 se muestra el fragmento correspondiente a DENV-2 de 238 pb, mientras que en los carriles 3, 5, 6 y 7 se muestra que no hay amplificación para DENV -1, -3 y -4, respectivamente.

Selección y purificación de los productos para clonación

El DNA puro obtenido a partir del gel de agarosa con los productos de RT-PCR purificados con el kit Purelink Quick Gel Extraction, se verificó también en gel. Para la purificación del producto de la región 3'UTR se seleccionó el fragmento de 170 pb proveniente de DENV-1 y para la región NS5 el único fragmento obtenido de DENV-2. En la figura 17 se muestran ambos fragmentos de DNA puros después de someterlos a electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y teñirlos con Br-Et. Se muestra que el procedimiento de purificación fue exitoso ya que se observaron las bandas del tamaño esperado.

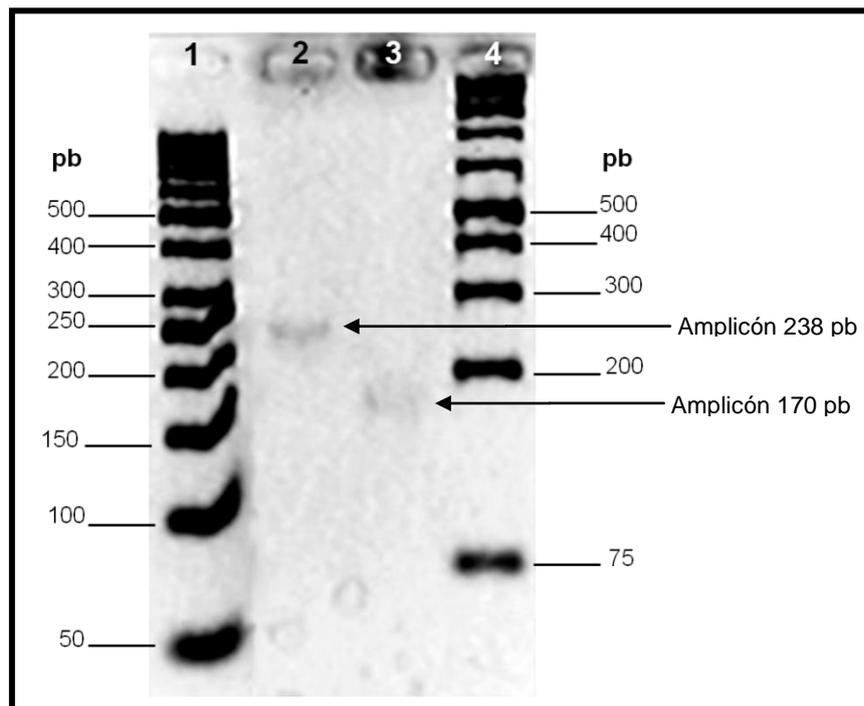


Figura 17. Verificación de la pureza de fragmentos de DNA obtenidos de la RT-PCR. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con Br-Et. En el carril 1 se colocó el marcador de DNA 50 pb, en el carril 2 se colocó la muestra del fragmento de DENV-2 correspondiente a la región NS5, en el carril 3 se colocó la muestra del fragmento de DENV-1 correspondiente a la región 3'UTR y el carril 4 se colocó el marcador de DNA 1Kb plus. En ambos casos se observan las bandas esperadas (170 y 238 pb, respectivamente) para cada muestra.

Clonación de amplicones

El producto de PCR que, por la acción de transferasa terminal de la DNA polimerasa incorpora adeninas en los extremos 3', se ligó a un vector T (con timinas en sus extremos 3') y la reacción resultante se transformó por choque térmico en células químicamente competentes de *Escherichia coli* TOP10. De la transformación se obtuvieron 16 colonias para la región 3'UTR, mientras que para la región NS5 se obtuvieron 4 clonas en el medio selectivo con antibiótico. Todas fueron sembradas por estriado en cajas Petri con medio LB sólido con ampicilina 100 µg/mL con la finalidad de tener suficiente abasto de dichas

clonas para los ensayos posteriores. A partir de cada una de estas colonias se extrajeron los plásmidos respectivos y se verificó si habían incorporado el amplicón correspondiente.

Obtención de DNA plasmídico y Restricción Enzimática con la enzima *EcoRI*

El tamizaje o selección de las clonas positivas, tanto para 3'UTR como NS5, se inició con la extracción de DNA plasmídico por método de lisis alcalina y su posterior análisis electroforético en gel de agarosa al 1% teñido con Br-Et. En las figuras 18 A) y 19 A), se observa el DNA plasmídico de todas las clonas, tanto para NS5 como para 3'UTR. Ya que la presencia del plásmido no garantiza la presencia del inserto de PCR, se realizó una restricción enzimática utilizando la enzima *EcoRI* para verificar las clonas en las que hubiera la liberación de dicho inserto. La restricción se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con Br-Et. Como se muestra en la figura 19 B), todas las clonas obtenidas para la región NS5 presentaron el inserto de PCR correspondiente. En el caso de la región 3'UTR, se observa en la figura 20B) que únicamente las clonas 2, 5, 7, 10, 11 y 13 presentaron el inserto de PCR correspondiente.

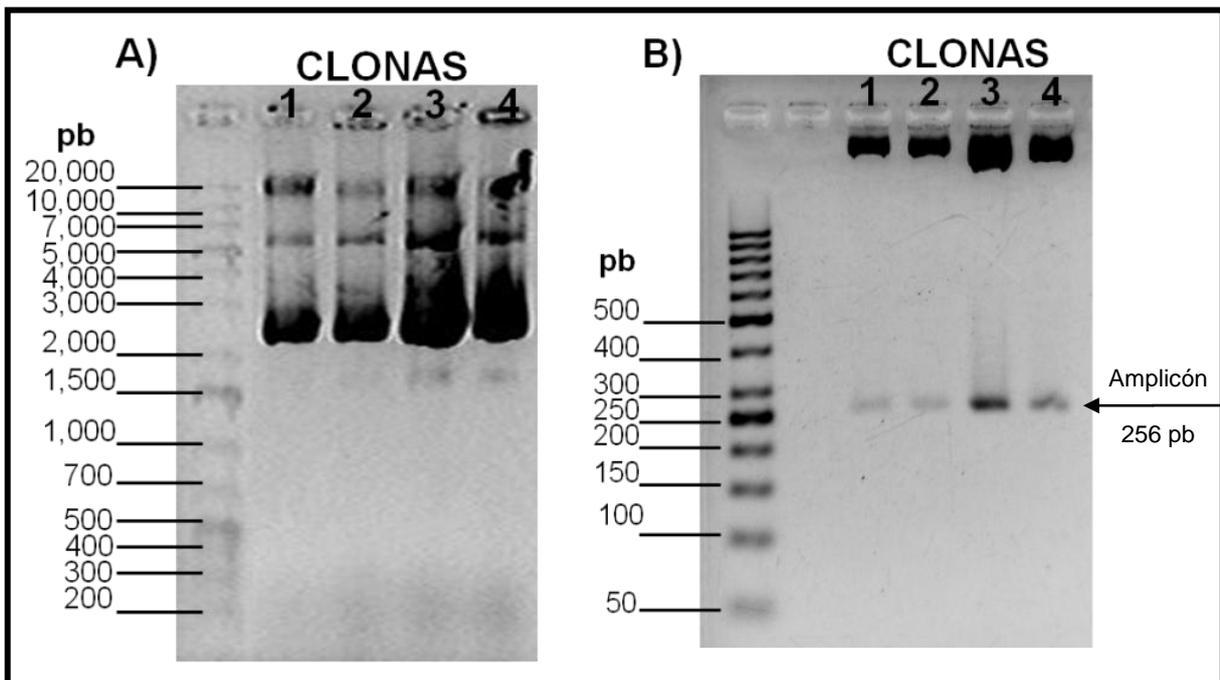


Figura 18. A) Análisis del DNA plasmídico extraído por el método de lisis alcalina de las clonas obtenidas de la región NS5. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Br-Et; en el carril 1 se colocó el marcador de DNA 1Kb plus y del carril 2 al 5 se colocó una muestra de DNA plasmídico obtenido de las 4 clonas resultantes para la región NS5. En todas las muestras se observó la presencia de DNA plasmídico. **B) Análisis de la restricción enzimática del DNA plasmídico utilizando la enzima *EcoRI*.** Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con Br-Et; en el carril 1 se colocó el marcador de DNA 50 pb, en el carril 2 se colocó el control negativo, y del carril 3 al 6 se colocó una muestra del DNA plasmídico digerido con la enzima *EcoRI*. Todas las clonas de la región NS5 presentaron el inserto de PCR.

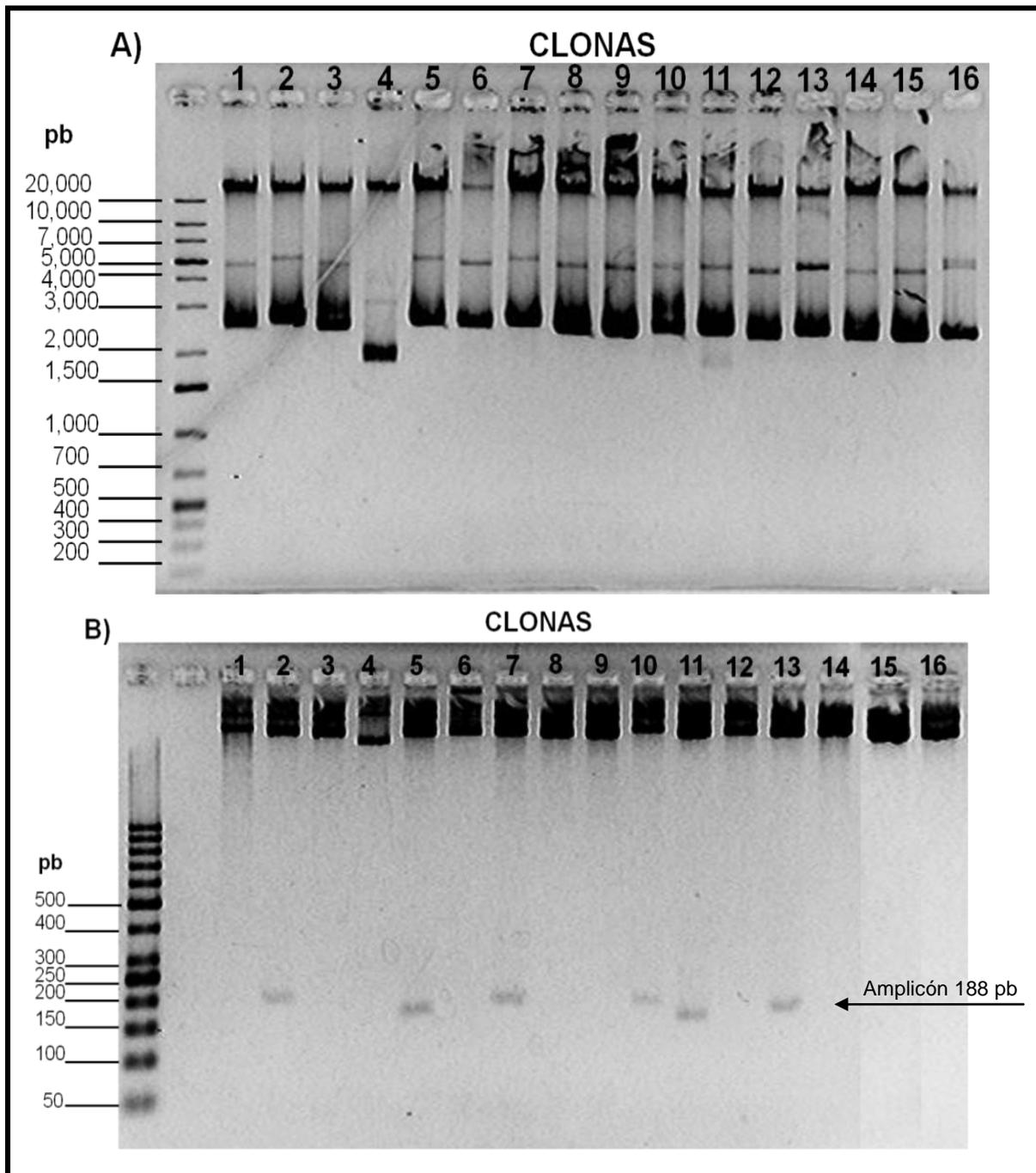


Figura 19. A) Análisis del DNA plasmídico extraído por el método de lisis alcalina de las colonias obtenidas de la región 3'UTR. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Br-Et; en el carril 1 se colocó el marcador de DNA 1Kb plus y del carril 2 al 17 se colocó una muestra de DNA plasmídico obtenido de las 16 clonas resultantes para la región 3'UTR. En todas las muestras se observó la presencia de DNA plasmídico. **B) Análisis de la restricción enzimática del DNA plasmídico obtenido de cada una de las colonias utilizando la enzima EcoRI.** Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con Br-Et; en el carril 1 se colocó el marcador de DNA 50 pb, en el carril 2 se colocó el control negativo, y del carril 3 al 18 se colocó una muestra del DNA plasmídico digerido con la enzima EcoRI. Las clonas 2, 5, 7, 10, 11 y 13 presentaron el inserto de PCR.

PCR a partir de colonias bacterianas

Las clonas seleccionadas por restricción enzimática: 2, 5, 7, 10, 11 y 13 obtenidas para la región 3'UTR y las cuatro clonas para la región NS5, se sometieron a una PCR a partir de clonas bacterianas utilizando los mismos oligonucleótidos de RT-PCR, con la finalidad de reconfirmar la amplificación del inserto correspondiente.

Los amplificados obtenidos se analizaron mediante una electroforesis en un E-gel Agarose 2%, de Invitrogen, pre teñido con Br-Et (Figura 20).

Como se muestra en la figura 20 A) y B), se logró la amplificación del inserto de PCR en todas las clonas que fueron seleccionadas por restricción enzimática, tanto para 3'UTR como para NS5, con lo que se comprueba que el proceso de clonación resultó eficiente.

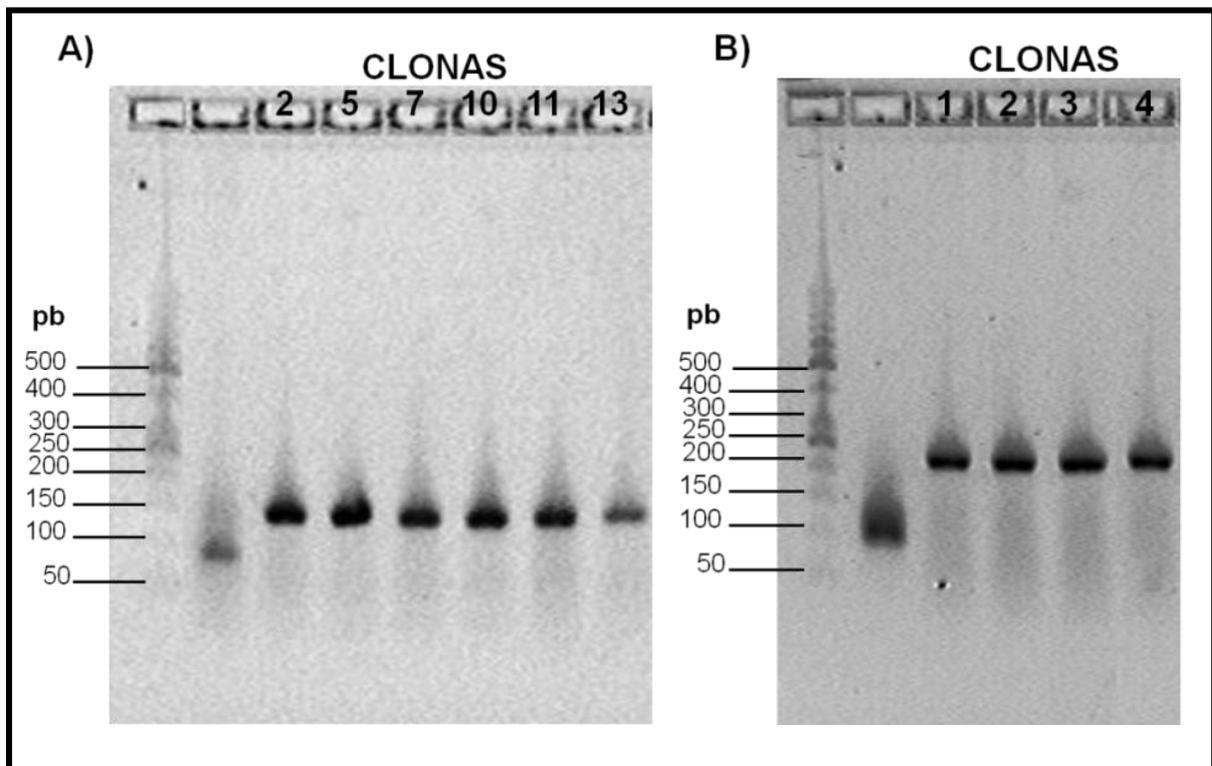


Figura 20. Análisis de la PCR a partir de colonias bacterianas. Se realizó una electroforesis en E-gel de agarosa al 2% pre teñido con Br-Et de la PCR a partir de colonias bacterianas obtenidas para la región 3'UTR como para la región NS5 que demostraron por medio de restricción enzimática con EcoRI la presencia del inserto de PCR clonado en el vector pCR 2.1 TOPO. **A)** Gel correspondiente a las clonas de la región 3'UTR; en el carril 1 se colocó el marcador de DNA 50 pb, en el carril 2 se colocó el control negativo, y del carril 3 al 8 se colocó una muestra de la PCR de las clonas 2, 5, 7, 10, 11 y 13, respectivamente. Se logró la amplificación del inserto de PCR en todas las clonas. **B)** Gel correspondiente a las clonas de la región NS5; en el carril 1 se colocó el marcador de DNA 50 pb, en el carril 2 se colocó el control negativo, y del carril 3 al 6 se colocó una muestra de la PCR de las 4 clonas, en este caso también se logró la amplificación del inserto de PCR en todas las clonas.

Secuenciación de Sanger

Para la confirmación final por secuenciación de las clonas positivas, se seleccionó la clona 5 para la región 3'UTR y la clona 2 de la región NS5. Se obtuvieron los productos de PCR correspondiente con los oligonucleótidos específicos y se purificaron con el kit Wizard DNA Clean-Up System; se cuantificaron y se obtuvo una concentración de 999 ng/μL para el producto de 3'UTR y de 920 ng/μL para el producto de NS5. Se adicionó el volumen necesario de cada producto para tener en un volumen de 16 μL una concentración final de 112 ng/μL del producto de 3'UTR y 115 ng/μL del producto de NS5. Se les agregó 1 μL del oligonucleótido FWD correspondiente, a una concentración de 10pmol/μL y se completó el volumen con H₂O Milli Q estéril. La secuenciación de Sanger la realizó el Instituto de Biotecnología de la UNAM quien entregó los resultados posteriormente.

En la figura 21 se muestra la secuencia obtenida para la clona 5 de la región 3'UTR, mientras que en la figura 22 se observa la secuencia obtenida para la clona 2 de la región NS5. El inciso A) de ambas figuras muestra el electroferograma obtenido. La secuencia de la clona 5 se alineó con el oligonucleótido 3'UTR RVS ya que se envió a secuenciar con el 3'UTR FWD, mientras que la de la clona 2 se alineó con el oligonucleótido NS5 RVS. El inciso B) de ambas figuras muestra el respectivo alineamiento para cada clona y en ambos casos se observa que el alineamiento entre la secuencia clonada y el oligonucleótido correspondiente es correcto y con ello se confirma la identidad del fragmento clonado.

La figura 23 corresponde a los resultados de la secuenciación del DNA plasmídico de la clona 5 de la región 3'UTR. El inciso A) muestra el electroferograma de la secuencia obtenida, mientras que en el inciso B) se muestra el alineamiento de la secuencia del DNA plasmídico con los oligonucleótidos 3'UTR FWD y 3'UTR RVS; dicho alineamiento es correcto y con ello se comprobó la identidad del DNA clonado dentro del plásmido pCR 2.1 TOPO, el cual puede ser perfectamente amplificado con los oligonucleótidos diseñados para la detección del DENV y ser transcrito *in vitro* para obtener el RNA que servirá para realizar las curvas de referencia para los ensayos de RT-PCR en tiempo real.

Respecto al inserto de PCR clonado para la región NS5 al ser específico para DENV-2, solo permitirá la detección de muestras de dicho serotipo. Sin embargo, esta construcción puede ser empleada si se desea implementar un método que permita la diferenciación entre serotipos virales, aunque para ello, deben generarse fragmentos clonados específicos para cada serotipo viral.

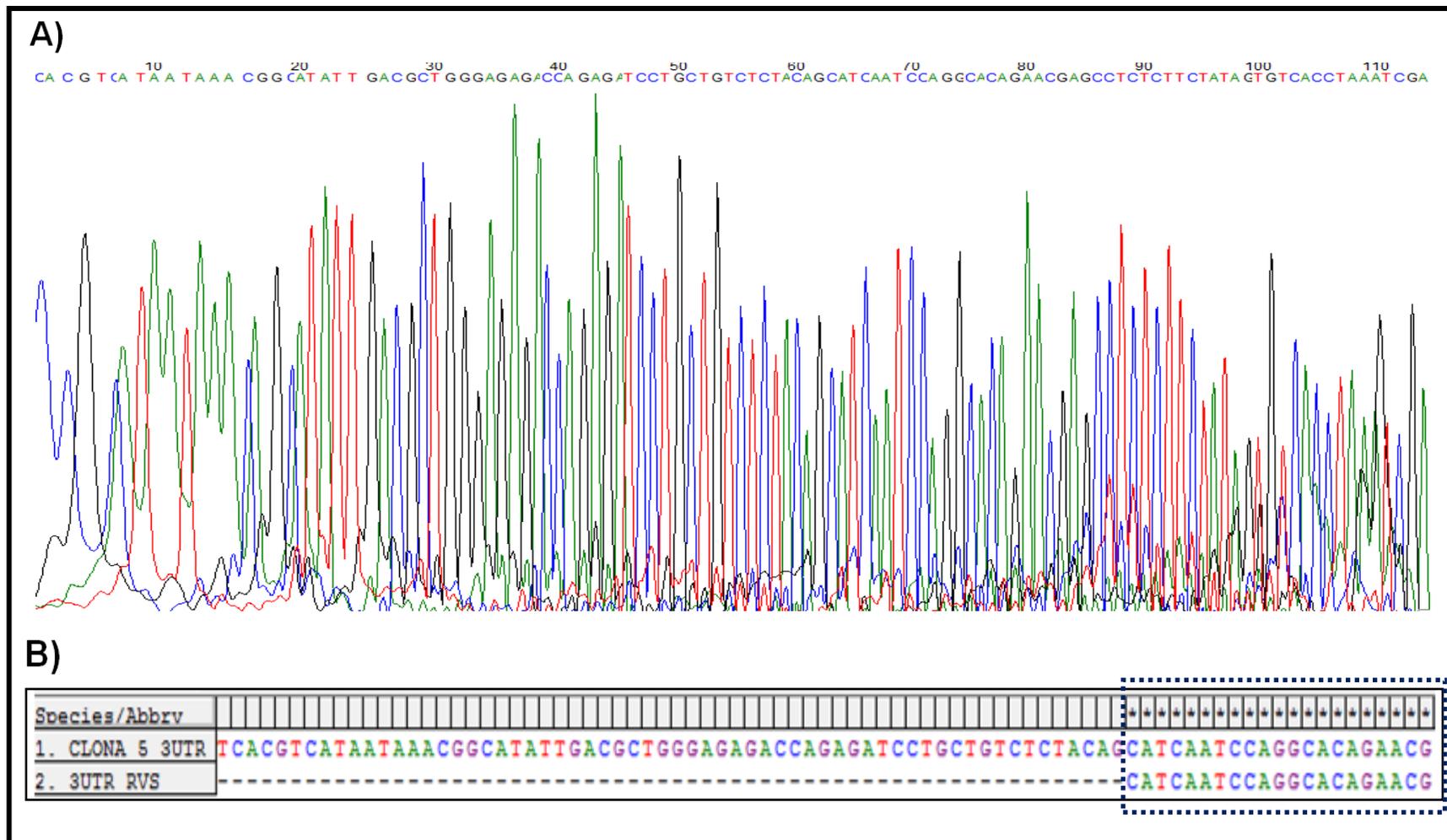


Figura 21 Secuenciación de Sanger del producto de PCR de la clona 5 de la región 3'UTR. A) Electroferograma obtenido de la secuenciación de Sanger para el producto de PCR obtenido de dicha clona. B) Alineamiento de la secuencia obtenida para dicha clona con el oligonucleótido 3'UTR RVS. Se observa que el alineamiento entre la secuencia clonada y el oligonucleótido es correcto y con ello se confirma la identidad del fragmento clonado.

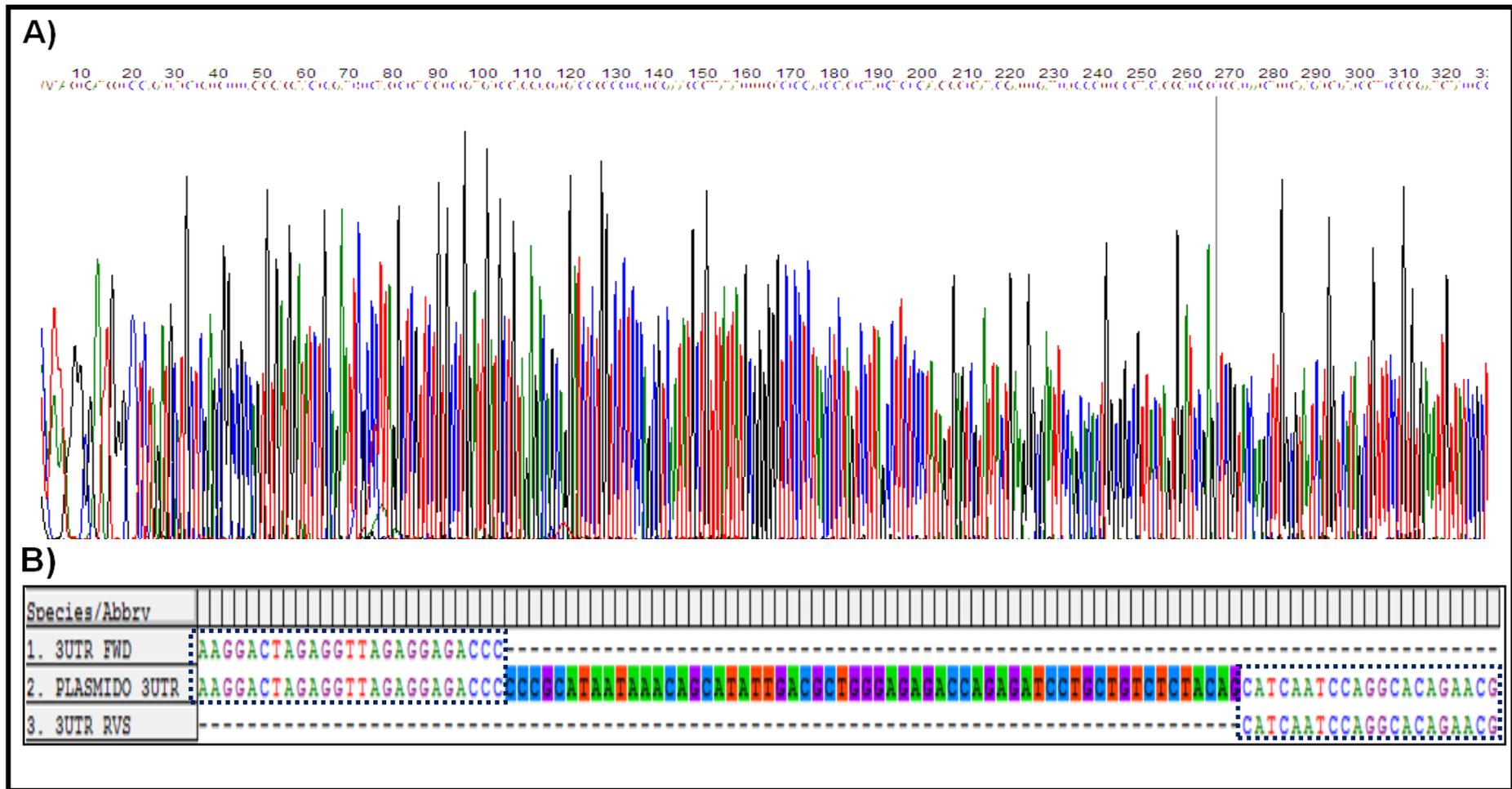


Figura 23. Secuenciación de Sanger del DNA plasmídico extraído de la clona 5 de la región 3'UTR A) Electroferograma obtenido para dicha clona y B) Alineamiento de la secuencia obtenida para dicha clona con los oligonucleótidos diseñados para amplificar la región 3'UTR. Se observa el sitio en donde los oligonucleótidos reconocen la secuencia clonada y con ello se confirma la identidad de fragmento clonado en el plásmido pCR 2.1 TOPO.

DISCUSIÓN

A nivel clínico, el dengue en sus primeras etapas presenta sintomatología muy indiferenciada y puede confundirse con varias enfermedades, especialmente en situaciones no epidémicas; por ello se deben descartar otras causas, incluyendo infecciones por flavivirus como lo es la fiebre amarilla, encefalitis japonesa, encefalitis de Saint Louis, Zika y Nilo Occidental, alfavirus (tales como Sinbis y Chikungunya), y otras causas de fiebre tales como malaria, leptospirosis, fiebre tifoidea, enfermedades por rickettsias, sarampión, enterovirus, influenza y enfermedades con síntomas similares a la influenza y fiebres hemorrágicas (Arenaviridae: Junin, etc.; *Filoviridae*: Marburg, Ébola; *Bunyaviridae*: hantavirus, fiebre hemorrágica de Crimea–Congo, etc.) (OMS, 2009). Esto da pie a contar con métodos de diagnóstico y de identificación viral, rápidos, sensibles y específicos que permitan la diferenciación entre estos padecimientos y el dengue.

Desde la década de los 90's se han planteado diferentes protocolos de RT–PCR para la detección de los cuatro serotipos virales; uno de ellos, que hasta la fecha es la referencia para varios ensayos es el desarrollado por Lanciotti y colaboradores, que en 1992 implementaron un ensayo de PCR anidado en el que generaron un amplicón que sirvió de molde para las amplificaciones con oligonucleótidos específicos para cada uno de los cuatro serotipos virales.

Este tipo de PCR tiene la ventaja de brindar alta sensibilidad y especificidad. La sensibilidad se debe a que la segunda PCR está basada en un amplificado generado con anterioridad, mientras que la especificidad aumenta debido a que el amplicón generado se emplea como molde en el cual, los oligonucleótidos sólo se alinean en un sitio específico dentro de dicho amplicón y el resultado será una única banda. La desventaja de ésta técnica es que no permite la cuantificación de la muestra, además de que se requiere el uso de varios oligonucleótidos y existe el riesgo de contaminación cruzada.

Otro de los ensayos que se han desarrollado es la RT–PCR multiplex en el cual se amplifica más de una secuencia en una misma reacción. Emplea dos o más pares de oligonucleótidos en un único tubo con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de DNA. Entre sus ventajas se encuentran la obtención de varios amplificados en una sola reacción, el mínimo riesgo de contaminación cruzada debido a que se realiza en un mismo tubo todas las reacciones, pero presenta la desventaja de trabajar con muchos juegos de

oligonucleótidos lo que incrementa el costo del ensayo, además de que los oligonucleótidos deben de ser perfectamente diseñados para evitar uniones inespecíficas.

Actualmente, los métodos utilizados para la detección y cuantificación del DENV son diversos en cuanto a las demandas de infraestructura y tiempo de procesamiento. Así mismo varían significativamente en su sensibilidad y especificidad. Las técnicas de RT-PCR en tiempo real son ensayos rápidos que facilitan la cuantificación viral en muestras biológicas de orígenes diversos con una mayor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad que el aislamiento viral. Adicionalmente, cabe destacar que, de los ensayos en uso a la fecha pocos son los que permiten la evaluación simultánea de los cuatro serotipos virales en una misma reacción.

Todos los ensayos de RT-PCR en tiempo real deben ser validados por medio de la utilización de estándares bien caracterizados; para la generación de estos estándares, algunos investigadores han optado por titular al virus mediante ensayos de formación de placas en diferentes líneas celulares (*Callahan y cols., 2001; Shu y cols., 2003; Dos Santos y cols., 2008*); otros han generado sus estándares a partir de productos de PCR, los cuales posteriormente son transcritos a RNA (*Houng y cols., 2001; Leparç-Goffart y cols., 2009; Sadon y cols., 2008; Kong y cols., 2006*). Algunos más han optado por utilizar técnicas de biología molecular como la clonación; respecto a este último método existen dos variantes, ya que en algunos casos se utiliza directamente al plásmido recombinante (*Chitinimitkul y cols., 2005; Richardson y cols., 2006; Lai y cols., 2007; Conceição y cols., 2010; Hue y cols., 2011*) y en otros, el plásmido es transcrito *in vitro* a RNA (*Laue y cols., 1999; Drosten y cols., 2002; Gurukumar y cols., 2009*).

Respecto a este último punto, es importante mencionar que el plásmido recombinante es estable y puede almacenarse durante largos períodos de tiempo sin riesgo de degradación, pero en la realización de los ensayos en tiempo real, el RNA viral extraído de las muestras tendría que ser sometido a RT para sintetizar cDNA y de esta manera utilizar al plásmido como estándar, es decir, la reacción se realizaría en dos pasos y esto aumenta el riesgo de contaminación en el proceso.

Por su parte, el RNA presenta la desventaja de ser inestable y no se puede almacenar durante largos períodos de tiempo, pero entre sus ventajas están el permitir la realización del ensayo en un solo paso lo que disminuye el riesgo de contaminación cruzada, además de que el uso del RNA ha sido uno de los métodos más empleados para determinar la

sensibilidad analítica en los ensayos de PCR. (Drosten y cols., 2002; Conceição y cols., 2010).

Recientemente, la detección de la proteína NS1 ha sido considerada un biomarcador importante en la detección temprana de la infección por el DENV. Esta prueba se realiza en poco tiempo (3–4 hrs), además de que la proteína se puede detectar hasta 9 días después del inicio de la enfermedad (Kassim y cols., 2011; Peeling y cols., 2010), pero tiene la desventaja de no ser serotipo–específica, no permite la cuantificación viral y además un resultado negativo en la misma no es totalmente excluyente de infección viral, ya que en varios estudios realizados, se ha detectado resultados negativos para dicha proteína pero un resultado positivo mediante RT–PCR en tiempo real y aislamiento viral. Estos resultados se han atribuido a que existen diferencias de sensibilidad entre los diferentes ensayos comerciales para la detección de sNS1, pero también a que existen diferencias en la antigenemia, la cual se ha observado es dependiente del serotipo. (Duyen y cols., 2011; Tricou y cols., 2010) o puede depender de la variación individual en la secreción de dicha proteína (Huhtamo y cols., 2010). En el caso de la RT–PCR, esta técnica también se realiza en poco tiempo, pero el genoma viral solo es detectable en más del 90% de los casos si la muestra se toma entre los días 0–5 después del inicio de los síntomas y disminuye drásticamente a partir del día 6 (inicio de la fase convaleciente).

Como ya se mencionó en los antecedentes, se han desarrollado diferentes métodos de RT–PCR en tiempo real. Entre ellos se encuentra el realizado por Gurukumar y colaboradores en 2009, en este trabajo, se realizó un alineamiento múltiple empleando secuencias de aislados virales de la India y secuencias reportadas a la base de datos del GenBank con la finalidad de determinar las regiones conservadas en los cuatro serotipos virales; dicha región fue la 3'UTR en base a la cual realizaron el diseño de oligonucleótidos y de la sonda TaqMan para desarrollar un ensayo de RT–PCR en tiempo real. Para validar el método desarrollado, generaron estándares de RNA mediante la clonación de un fragmento de la región 3'UTR en el vector TEasy. La presencia y orientación del vector fue confirmada por secuenciación. El plásmido recombinante fue linearizado mediante la digestión con la enzima Apa I y el DNA fue transcrito *in vitro* a RNA. El RNA obtenido fue purificado y cuantificado, y a partir del número de copias se realizaron diluciones seriadas con la finalidad de generar una curva estándar que les permitió la cuantificación de carga viral en muestras de suero. A su vez, realizaron ensayos con otros flavivirus y enfermedades relacionadas como leptospirosis, infecciones por rickettsias, entre otras, en donde no hubo amplificación, confirmando de esta manera la especificidad del método. Con el desarrollo de dicha metodología consiguieron un método rápido, altamente sensible y específico para la

cuantificación de carga viral, el cual es una herramienta muy útil para el diagnóstico diferencial del dengue en una situación en la que esta enfermedad co-existe con otras que presentan un cuadro clínico similar.

En el presente trabajo de tesis, se confirmó que el juego de oligonucleótidos diseñados es capaz de detectar a los cuatro serotipos virales, y puede ser empleado para implementar un ensayo de RT-PCR en tiempo real que se puede estandarizar tanto para un sistema SYBR Green o para una plataforma TaqMan. Mediante este ensayo sería posible realizar la cuantificación de carga viral, pero tendría la desventaja de no serotipificar las muestras.

Finalmente el inserto de PCR clonado para la región 3'UTR es representativo de todos los serotipos virales, por lo que se puede considerar una molécula estándar, mientras que el inserto de PCR clonado para la región NS5, solo es representativo del serotipo 2, por lo cual no muestra gran utilidad para implementar una técnica de detección y cuantificación molecular en la que se requiera detectar a todos los serotipos, pero si puede ser empleada si se desea implementar un ensayo que permita la diferenciación entre serotipos virales, aunque para ello, deben generarse fragmentos clonados para cada serotipo viral.

La sensibilidad del ensayo que se desea implementar debe validarse mediante la realización de la transcripción *in vitro* para estandarizar las condiciones de RT-PCR en tiempo real, mientras que la especificidad debe validarse mediante la utilización de muestras de RNA de otros flavivirus como el Virus del Oeste de Nilo, Chikungunya, Virus de la encefalitis japonesa, Virus de la encefalitis de Saint Louis, entre otros.

Finalmente, es importante destacar el uso del ensayo de RT-PCR en tiempo real con diversas aplicaciones en el campo de la investigación, entre las que se encuentran la cuantificación de carga viral, la cual permite el estudio del papel de la viremia en la patogénesis del dengue en diferentes tipos celulares, así como la evaluación de la dinámica de la progresión de la enfermedad, entre otras aplicaciones como la genotipificación y la determinación de polimorfismos y mutaciones, lo que la proyecta como una herramienta de gran utilidad en la realización de estudios epidemiológicos, así como el análisis de variantes virales.

CONCLUSIONES

- Mediante el uso de herramientas bioinformáticas se identificó que la región 3'UTR es la más conservada entre los serotipos del DENV y en base a ello se diseñaron los oligonucleótidos específicos para dicha región.
- El fragmento de DNA clonado correspondiente a la región 3'UTR puede ser utilizado como estándar en la implementación de un ensayo de RT-PCR en tiempo real que permita la detección del DENV y la cuantificación de carga viral en muestras de diferentes orígenes, independientemente del serotipo al que pertenezcan.

PERSPECTIVAS

- Validar la sensibilidad del ensayo realizando la transcripción *in vitro* para estandarizar las condiciones de los ensayos de RT-PCR en tiempo real.
- Validar la especificidad del ensayo realizando experimentos de RT-PCR en tiempo real utilizando otros flavivirus.
- Realizar cuantificación de RNA viral en muestras biológicas de diferentes orígenes.

REFERENCIAS

1. Acosta–Bas C, Gómez–Cordero I. (2005). Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Revista Biomédica*. 16:113–137.
2. Bartenschlager, R., Miller, S. (2008). Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiology*. 3(2):155–165.
3. Callahan, J., Wu, S., Dion–Schultz, A., Mangold, B., Peruski, L., Watts, D., Porter, K., Murphy, G., Suharyono, W., King, C., Hayes, C., Temenak, J. (2001). Development and Evaluation of Serotype–and Group–Specific Fluorogenic Reverse Transcriptase PCR (TaqMan) Assays for Dengue Virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(11):4119–4124.
4. Chien, L., Liao, T., Shu, P., Huang, J., Gubler, D., Chang, G. (2006). Development of Real–Time Reverse Transcriptase PCR Assays To Detect and Serotype Dengue Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(4):1295–1304.
5. Chutinimitkul, S., Payungporn, S., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y. (2005). Dengue typing assay based on real–time PCR using SYBR Green I. *Journal of Virological Methods*. 129:8–15.
6. Clyde, K., Kyle, J., Harris, E. (2006). Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *Journal of Virology*. 80(23):11418–11431.
7. Conceição, T., Da Poian, A., Sorgine, M. (2010). A real–time PCR procedure for detection of dengue virus serotypes 1, 2, and 3, and their quantitation in clinical and laboratory samples. *Journal of Virological Methods*. 163:1–9.
8. Del Ángel, R. (2006). Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogenia viral. *Cinvestav Julio–Septiembre*. 38–43.
9. Dos Santos, H., Poloni, T., Souza, K., Muller, V., Tremeschin, F., Nali, L., Fantinatti, L., Amarilla, A., Castro, H., Nunes, M., Casseb, S., Vasconcelos, P., Badra, S., Figueiredo, L., Aquino, V. (2008). A Simple One–Step Real–Time RT–PCR for Diagnosis of Dengue Virus Infection. *Journal of Medical Virology*. 80:1426–1433.

10. Drosten, C., Götting, S., Schilling, S., Asper, M., Panning, M., Schmitz, H., Günther, S. (2002). Rapid Detection and Quantification of RNA of Ebola and Marburg Viruses, Lassa Virus, Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus, Rift Valley Fever Virus, Dengue Virus, and Yellow Fever Virus by Real–Time Reverse Transcription–PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(7):2323–2330.
11. Duyen, H., Ngoc, T., Ha, D., Hang, V., Kieu, N., Young, P., Farrar, J., Simmons, C., Wolbers, M., Wills, B. (2011). Kinetics of Plasma Viremia and Soluble Nonstructural Protein 1 Concentrations in Dengue: Differential Effects According to Serotype and Immune Status. *The Journal of Infectious Diseases*. 203:1292–1300.
12. Dyer, J., Chisenhall, D., Mores, C. (2007). A multiplexed TaqMan assay for the detection of arthropod–borne flaviviruses. *Journal of Virological Methods*. 145:9–13.
13. Gomes, A., Silva, A., Cordeiro, M., Guimarães, G., Marques Jr, E., Abath, F. (2007). Single–tube nested PCR using immobilized internal primers for the identification of dengue virus serotypes. *Journal of Virological Methods*. 145:76–79
14. Goffart, I., Baragatti, M., Temmam, S., Tuiskunen, A., Moureau, G., Charrel, R., Lamballerie, X. (2009). Development and validation of real–time one–step reverse transcription–PCR for the detection and typing of dengue viruses. *Journal of Clinical Virology*. 45:61–66.
15. Gurukumar, K., Priyadarshini, D., Patil, J., Bhagat, A., Singh, A., Shah, P., Cecilia, D. (2009). Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virology Journal*. 6:1–8.
16. Guzmán, M., Halstead, S., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H., Martínez, E., Nathan, M., Pelegrino, J., Simmons, C., Yoksan, S., Peeling, R. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*. S7–S16.
17. Guzmán, M., Vázquez, S. (2002). Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 54(3):180–188.
18. Halstead, S. (2007). Dengue. *Lancet*. 370:1644–1652.

19. Houg, H., Chen, R., Vaughn, D., Kanesa–thasan, N. (2001). Development of a fluorogenic RT–PCR system for quantitative identification of dengue virus serotypes 1–4 using conserved and serotype–specific 3' noncoding sequences. *Journal of Virological Methods*. 95:19–32
20. Hue, K., Tuan, T., Thi, H., Bich, C., Le Anh, H., Wills, B., Simmons, C. (2011). Validation of an internally controlled one–step real–time multiplex RT–PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma. *Journal of Virological Methods*. 177:168–173.
21. Huhtamo, E., Hasu, E., Uzcátegui, N., Erra, E., Nikkari, S., Kantele, A., Vapalahtu, O., Piiparinen, H. (2010). Early diagnosis of dengue in travelers: Comparison of a novel real–time RT–PCR, NS1 antigen detection and serology. *Journal of Clinical Virology*. 47:49–53
22. Ito, M., Takasaki, T., Yamada, K., Nerome, R., Tajima, S., Kurane, I. (2004). Development and Evaluation of Fluorogenic TaqMan Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection of Dengue Virus Types 1 to 4. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(12):5935–5937.
23. Johnson, B., Russell, B., Lanciotti, R. (2005). Serotype–Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real–Time Reverse Transcriptase PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(10):4977–4983.
24. Kao, C., King, C., Chao, D., Wu, H., Chang, G. (2005). Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 38:5–16.
25. Kassim, F., Izati, M., TgRogayah, T., Apandi, Y., Saat, Z. (2011). Use of dengue NS1 antigen for early diagnosis of dengue virus infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 42(3):562–569.
26. Kong, Y., Thay, C., Tin, T., Devi, S. (2006). Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real–time one–step RT–PCR. *Journal of Virological Methods*. 138:123–130.
27. Lai, Y., Chung, Y., Tan, H., Yap, H., Yap, G., Ooi, E., Ng, L. (2007). Cost–Effective Real–Time Reverse Transcriptase PCR (RT–PCR) To Screen for Dengue Virus

followed by Rapid Single-Tube Multiplex RT-PCR for Serotyping of the Virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(3):935–941.

28. Lanciotti, R., Calisher, C., Gubler, D., Chang, G., Vorndam, A. (1992). Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 30(3):545–551.
29. Laue, T., Emmerich, P., Schmitz, H. (1999). Detection of Dengue Virus RNA in Patients after Primary or Secondary Dengue Infection by Using the TaqMan Automated Amplification System. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(8):2543–2547.
30. Lindenbach, B., Thiel, H., Rice, C. (2007). Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. Chapter 33 *Fields Virology, 5th Edition*. Pp. 1101–1113.
31. Lodeiro, M., Filomatori, C., Gamarnik, A. (2009). Structural and Functional Studies of the Promoter Element for Dengue Virus RNA Replication. *Journal of Virology*. 83(2):993–1008.
32. Marcos, E., López, C. (2009). Dengue: patogénesis y estado actual del desarrollo de vacunas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 40(3):203–213.
33. Mukhopadhyay, S., Kuhn, R., Rossmann, M. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*. 3:13–22.
34. Oliveira, S., Lopes da Fonseca, B. (2004). Dengue: A Review of the Laboratory Tests a Clinician Must Know to Achieve a Correct Diagnosis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 8(6):390–398.
35. Organización Mundial de la Salud. (2009). Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Geneva, Switzerland.
36. Peeling, R., Artsob, H., Pelegrino, J., Buchy, P., Cardoso M., , Devi, S., Enria, D., Farrar, J., Gubler, D., Guzman, M., Scott B. Halstead, S., Hunsperger, E., Kliks, S., Harold S. Margolis, H., Nathanson, C., Nguyen, V., Rizzo, N., Vázquez, S., Yoksan, S. (2010). Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews Microbiology*. S30–S37.

37. Perera, R., Kuhn, R. (2008). Structural Proteomics of Dengue Virus. *Current Opinion in Microbiology*. 11(4):369–377.
38. Prada, J., Castellanos, J. (2011). Real time PCR. Application in dengue studies. *Colombia Médica*. 42(2):243–258.
39. Richardson, J., Molina, A., Salazar, M., Black, W. (2006). Quantitative analysis of dengue-2 virus maturing the extrinsic incubation period in individual *Aedes aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 74(1):132–141.
40. Rodenhuis-Zybert, I., Wilschut, J., Smith, J. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67:2773–2786.
41. Ruiz, K. (2010). Detección de casos de dengue mediante la determinación temprana de la proteína NS1 viral por citometría de flujo. Tesis de Maestría, ENCB-IPN. México, D.F.
42. Sadon, N., Delers, A., Jarman, R., Klungthong, C., Nisalak, A., Gibbons, R., Vassilev, V. (2008). A new quantitative RT-PCR method for sensitive detection of dengue virus in serum samples. *Journal of Virological Methods*. 153:1–6.
43. Singhi, S., Kisson, N., Bansal, A. (2007). Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. *Journal de Pediatria*. 83(2):S22–S35.
44. Shu, P., Huang, J. (2004). Current Advances in Dengue Diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 11(4):642–650.
45. Shu, P., Chang, S., Kuo, Y., Yueh, Y., Chien, L., Sue, C., Lin, T., Huang, J. (2003). Development of Group- and Serotype-Specific One-Step SYBR Green I-Based Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Dengue Virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(6):2408–2416.
46. Sudiro, T., Ishiko, H., Green, S., Vaughn, W., Nisalak, A., Kalayanarooj, S., Rothman, A., Raengsakulrach, B., Janus, J., Kurane, I., Ennis, F. (1997). Rapid diagnosis of dengue viremia by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using 3'-noncoding region universal primers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 56(4):424–429.

47. Tricou, V., Vu, H., Quynh, N., Nguyen, C., Tran, H., Farrar, J., Wills, B., Simmons, C. (2010). Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BMC Infectious Diseases*. 10(142):1–8.
48. Umareddy, I., Pluquet, O., Wang, Q., Vasudevan, S., Cheve, E., Gu, F. (2007). Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virology Journal*. 4:91.
49. Upanan, S., Cabrera–Hernández, A., Ekkapongpisit, M., Smith, D. (2006). A Simplified PCR Methodology for Semiquantitatively Analyzing Dengue Viruses. *Jpn J Infect Dis*. 59:383–387.
50. Vaughn, D., Green, S., Kalayanarooj, S., Innis, B., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Endy, T., Raengsakulrach, B., Rothman, A., Ennis, F., Nisalak, A. (2000). Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. *The Journal of Infectious Diseases* 181:2–9.
51. Velandia, M., Castellanos, J. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. 15(1):33–43.
52. Warrilow, D., Northill, J., Pyke, A., Smith, G. (2002). Single Rapid TaqMan Fluorogenic Probes Based PCR That Detects All Four Dengue Serotypes. *Journal of Medical Virology*. 66:524–528.
53. Yong, Y., Thayan, R., Chong, H., Tan, C., Sekaran, S. (2007). Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT–PCR and real–time SYBR green RT–PCR. *Singapore Med J*. 48:662–668.
54. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1topo_map.pdf
55. <http://www.cenave.gob.mx/dengue/default.asp?id=32>
56. http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_dengue.html
57. <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy.html>