



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN**

**“Diseño y optimización de
estrategias de detección y
tipificación de aislados de virus de
Dengue y Zika”**

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciado en Bioquímica Diagnostica

P R E S E N T A

Héctor Alejandro Contreras García

ASESOR

Dr. José Bustos Arriaga

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2020



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.

Para mi familia, mis padres Jorge Contreras Romero y Elvia García Navarrete y mi herma Myrna Cecilia Contreras García porque son y siempre serán mi principal apoyo.

El siguiente proyecto fue realizado gracias al apoyo financiero de PAPIIT, DGAPA, UNAM

Proyectos: IA209017 e IA204119 y del Programa de Desarrollo Científico para atender

Problemas Nacionales, CONACYT con el Proyecto PN2029.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Diseño y optimización de estrategias de detección y tipificación de aislados de virus de Dengue y Zika.

Que presenta el pasante: **Héctor Alejandro Contreras García**
Con número de cuenta: 309039390 para obtener el título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Octubre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
VOCAL	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Dr. José Bustos Arriaga	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cgr*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Diseño y optimización de estrategias de detección y tipificación de aislados de virus de Dengue y Zika.

Que presenta el pasante: **Héctor Alejandro Contreras García**
Con número de cuenta: 309039390 para obtener el título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Octubre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	_____
VOCAL	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
SECRETARIO	Dr. José Bustos Arriaga	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	_____
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Diseño y optimización de estrategias de detección y tipificación de aislados de virus de Dengue y Zika.

Que presenta el pasante: Héctor Alejandro Contreras García
Con número de cuenta: 309039390 para obtener el título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcallí, Méx. a 07 de Octubre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira</u>	_____
VOCAL	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	_____
SECRETARIO	<u>Dr. José Bustos Arriaga</u>	_____
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Paola Edith Briseño Lugo</u>	
2do. SUPLENTE	<u>L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Diseño y optimización de estrategias de detección y tipificación de aislados de virus de Dengue y Zika.

Que presenta el pasante: Héctor Alejandro Contreras García
Con número de cuenta: 309039390 para obtener el título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Octubre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira</u>	_____
VOCAL	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	_____
SECRETARIO	<u>Dr. José Bustos Arriaga</u>	_____
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Paola Edith Briseño Lugo</u>	_____
2do. SUPLENTE	<u>L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo</u>	<u>Larisa Salcedo</u>

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

ÍNDICE.

	Página
Abreviaturas.....	I
Índice de figuras.....	III
Índice de tablas.....	IV
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1 Generalidades de los <i>Flavivirus</i>	3
2.2 Estructura de los <i>Flavivirus</i>	4
2.2.1 Virión.....	4
2.2.2 Genoma de los <i>Flavivirus</i>	6
2.2.2.1 Región terminal 5´.....	6
2.2.2.1.1 Cap de tipo I.....	6
2.2.2.1.2 Región 5´ no traducida.....	7
2.2.2.2 Región 3´ no traducida.....	8
2.2.2.3 Marco de lectura abierto (ORF).....	10
2.2.3 Proteínas virales.....	10
2.2.3.1 Proteínas No Estructurales.....	11
2.2.3.2 Proteínas Estructurales.....	13
2.3 Ciclo de replicación.....	16
2.4 Variabilidad genética de los <i>Flavivirus</i>	18
2.5 Ciclos de transmisión de DENV y ZIKV.....	18
2.6 Virus del dengue.....	19
2.7 Virus de Zika.....	21
2.8 Presentación clínica de los <i>Flavivirus</i>	22
2.9 Diagnóstico.....	25
2.10 Epidemiología y vigilancia del DENV y ZIKV en México.....	26
3. Antecedentes y Justificación.....	28
4. Objetivos.....	29
4.1 Objetivo general.....	29

4.2 Objetivos particulares.....	29
5. Hipótesis.....	30
6. Materiales y métodos.....	30
6.1 Virus aislados.....	30
6.2 Virus referencia.....	30
6.3 Línea celular Vero.....	31
6.4 Anticuerpos.....	31
6.5 Inmunocitoquímica para la determinación de Unidades Formadoras de Placa.....	32
6.6 Inmunofluorescencia Intracelular Indirecta.....	32
6.7 Tipificación por RT-PCR.....	33
6.7.1 PCR Anidada.....	35
6.7.2 PCR multiplex.....	36
6.8 Electroforesis.....	37
7. Resultados.....	38
7.1 Inmunofluorescencia como estrategia de tamizaje para <i>Flavivirus</i> . 7.1.1 Inmunofluorescencia usando el anticuerpo 4G2..... 7.1.2 Inmunofluorescencia usando los anticuerpos de hibridoma..... 7.1.3 Inmunofluorescencia para detectar proteínas flavivirales en los aislados virales.....	38 38 40 42
7.2 Tipificación.....	45
7.2.1 PCR anidada.....	45
7.2.1.1 PCR anidada con gradiente de temperatura.....	46
7.2.2 PCR multiplex.....	46
8. Discusión.....	49
9. Conclusiones.....	54
10. Perspectivas.....	55
11. Referencias.....	56
12. Anexos.....	64

Abreviaturas

C	Proteína de cápside de los <i>Flavivirus</i>
Cap	Casquete de un RNA, consiste en un 7-metilguanilato unido al primer nucleótido del RNA por un enlace 5'-5' trifosfato
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Control y prevención de Enfermedades EE.UU.)
cDNA	DNA complementario
CHIKV	Virus de Chikungunya
CPE	<i>Citopathic effect</i> (efecto citopático)
DENV	Virus dengue
DENV- 1 WP	Virus dengue Serotipo 1 <i>Western Pacific</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ds-RNA	RNA de doble cadena
E	Proteína de envoltura flaviviral
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i> (Reticulo endoplasmico)
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
kDa	Kilo Daltons
M	Proteína de membrana de los <i>Flavivirus</i>
prM	Proteína de membrana de los <i>Flavivirus</i> inmadura
mAb	Anticuerpo monoclonal
MOI	Multiplicidad de Infección
nm	Nanómetros
NS	Proteína viral no estructural
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Marco de lectura abierto)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reacción en cadena de la Polimerasa)
PFU	<i>Plaques Forming Units</i> (Unidades Formadoras de Placa)
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i> (RNA polimerasa dependiente de RNA)
RC	Complejo replicativo
RER	<i>Rough Endoplasmic Reticulum</i> (Reticulo endoplasmico rugoso)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucleico)
RPMI	Medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription Polymerase chain reaction</i> (PCR con transcriptasa inversa)
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SLA	<i>Stem Loop A, B</i> (estructura secundaria en el extremo 5' del genoma de los
SLB	<i>Flavivirus</i>)
ss-RNA	RNA de cadena sencilla
UTR	<i>UnTranslated Region</i> (Regiones no codificantes del genoma viral)
YFV	Virus de la Fiebre Amarilla
ZIKV	Virus Zika
ZIKV PR	Virus Zika aislado Puerto Rico

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Representación esquemática en un árbol filogenético de los cuatro grupos ecológicos de Flavivirus y la cercanía entre estos.....	3
Figura 2. Imágenes por Crio-microscopía electrónica.....	4
Figura 3. Representación esquemática de la organización de las proteínas de superficie durante la maduración de virión.....	5
Figura 4. Genoma de los <i>Flavivirus</i>	6
Figura 5. Representación esquemática de las estructuras secundarias del RNA viral en el extremo 5´.....	8
Figura 6. Representación esquemática de las estructuras secundarias del RNA viral en el extremo 3´.....	9
Figura 7. Representación esquemática de la conformación circular del genoma de los <i>Flavivirus</i>	9
Figura 8. Representación esquemática de la poliproteína flaviviral en asociación con la membrana lipídica del retículo endoplásmico.....	10
Figura 9. Estructura del homodímero de la proteína E en un virión maduro.....	14
Figura 10. Ciclo replicativo de los <i>Flavivirus</i>	17
Figura 11. Ciclos selvático y urbano de transmisión de los <i>Flavivirus</i>	19
Figura 12. Predicción de las zonas con las condiciones ambientales adecuadas para la ocurrencia de brotes de dengue alrededor del mundo para el año 2020.	20
Figura 13. Zonas endémicas del virus Zika desde su descubrimiento en Uganda.	21
Figura 14. Clasificación de los casos de dengue según su gravedad.....	22
Figura 15. Curso temporal de la enfermedad causada por DENV.....	24
Figura 16. Gráfica de casos probables y confirmados de dengue en México desde el año 2004 al 2019.....	26
Figura 17. Casos de dengue en el continente americano desde 1980 a 2019....	27
Figura 18. Mapa de la incidencia del dengue en México.....	27
Figura 19. Imágenes por microscopía de epifluorescencia usando el anticuerpo 4G2 en células infectadas con DENV 1 WP.....	40
Figura 20. Imágenes por microscopía de epifluorescencia de los empalmes usando anticuerpos producidos en hibridomas.....	42
Figura 21. Fotografías por microscopía confocal de una tinción doble para detectar la proteína de envoltura y la polimerasa de los <i>Flavivirus</i>	42
Figura 22. Fotografías por microscopía confocal de una inmunofluorescencia de células infectadas con los aislados virales y virus de referencia.....	44
Figura 23. Resultados de las reacciones de PCR anidada.....	45
Figura 24. Gradiente de temperatura para los oligonucleótidos de la PCR anidada....	46

Figura 25. Patrones de amplificación usando los oligonucleótidos de la PCR multiplex por separado.....	47
Figura 26. Patrones de amplificación de los virus aislados de Yucatán y Oaxaca usando los oligonucleótidos específicos para ZIKV.....	48
Figura 27. Patrones de amplificación resultantes de las reacciones con la mezcla de oligonucleótidos del diseño PCR multiplex.....	48

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Receptores celulares involucrados en la entrada de DENV en células de mamíferos.....	13
Tabla 2. Clasificación del dengue según su gravedad y los síntomas característicos.	23
Tabla 3. Signos, síntomas y complicaciones de la enfermedad por ZIKV.....	25
Tabla 4. Casos confirmados de infección por ZIKV desde el 2015 hasta el final del año 2019.	28
Tabla 5. Condiciones de temperatura y tiempo en el termociclador para la retrotranscripción de RNA viral.	34
Tabla 6. Preparación de las reacciones de PCR.....	35
Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos usados para detección de DENV.....	35
Tabla 8. Secuencia de los oligonucleótidos serotipo específicos para DENV.....	36
Tabla 9. Condiciones de temperatura y tiempo usados en la PCR anidada.....	36
Tabla 10. Características de los oligonucleótidos del diseño multiplex.....	37
Tabla 11. Condiciones de temperatura y tiempo para la reacción de PCR multiplex.....	37
Tabla 12. Concentraciones y combinaciones de los anticuerpos usados en la prueba con 4G2.....	38
Tabla 13. Concentraciones y combinaciones de los anticuerpos usadas para probar los anticuerpos de hibridomas.....	40
Tabla 14. Recomendaciones en el diseño de oligonucleótidos.....	52
Tabla 15. Posibles fuentes de error durante los ensayos de PCR y las medidas tomadas para procurar resolverlos.....	53

1. Introducción

El virus del dengue (DENV) y el virus de Zika (ZIKV) son virus patógenos de la familia *Flaviviridae* del género *Flavivirus*, que en años recientes han adquirido una gran importancia debido al impacto sobre la salud en la población humana mundial. Se estima que en el mundo ocurren alrededor de 390 millones de casos de infección por DENV al año y más de un tercio de la población mundial se encuentra en riesgo de infección (Bhatt et al., 2013).

Estos virus son transmitidos por la picadura del mosquito hembra hematófago de la especie *Aedes aegypti* y, en menor grado, de *Aedes albopictus*. Estos vectores están ampliamente distribuidos en las regiones tropicales y subtropicales y en las últimas décadas ha aumentado su distribución en el mundo (Kraemer et al., 2015; Mayer, Tesh, & Vasilakis, 2017).

En México, el dengue es la enfermedad viral transmitida por vector de mayor importancia y su presencia obedece a la conjunción de diversos factores: circulación viral cíclica de los cuatro serotipos, altas densidades vectoriales y fenómenos asociados al cambio climático (cambios en la intensidad y duración de la temporada de lluvias y frecuencia de huracanes) (Dirección General de Epidemiología, 2016). En el caso de enfermedad por ZIKV, se tiene registro del primer caso autóctono en el año 2015 y hasta la semana 18 del 2020 se tiene confirmados 12933 casos confirmados (SINAVE, 2020).

La co-circulación de los cuatro serotipos de DENV, ZIKV y algunos otros arbovirus (como el virus chikungunya [CHIKV]) en la región tropical y subtropical de América y por lo tanto en nuestro país (Díaz et al., 2006; Leta et al., 2018; SINAVE, 2019b), obliga a los laboratorios que trabajan con estos virus a utilizar técnicas de aislamiento, identificación y tipificación confiables y específicas, debido a que todos estos patógenos generan cuadros clínicos parecidos que dificultan la confirmación del diagnóstico clínico.

Durante este trabajo se optimizó el ensayo de inmunofluorescencia intracelular indirecta como un método de identificación y confirmación de identidad, a nivel de género *Flavivirus*, de aislados provenientes de muestras clínicas obtenidas de pacientes con diagnóstico clínico de infección por arbovirus y que habitan en regiones endémicas para estos patógenos en México. Dichos aislados fueron obtenidos en el laboratorio de Biología Molecular e Inmunología de arbovirus de la Unidad de Biomedicina de la FES Iztacala, UNAM. El diseño consiste en el uso de un anticuerpo monoclonal comercial generado en ratón dirigido contra la región del péptido fusogénico de la proteína de envoltura (E), una región conservada dentro del género de los *Flavivirus*.

También se probaron con el ensayo de inmunofluorescencia intracelular indirecta cuatro anticuerpos monoclonales, como anticuerpos primarios, uno dirigido contra la proteína E, dos más contra proteínas no estructurales (NS1 y NS3) producidos en hibridomas de ratón y un anticuerpo dirigido contra la proteína no estructural 5 (NS5) producido en hibridoma de rata, que fueron desarrollados en el Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV por el equipo de la doctora Leticia Cedillo Barrón como una alternativa al anticuerpo comercial (García-Cordero et al., 2014; León-Juárez et al., 2013).

La estrategia de tipificación y confirmación de la especie y serotipo de los virus aislados se realizó por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con un paso previo de Retro-Transcripción (RT-PCR) ya que esta es la metodología recomendada en los protocolos de diagnóstico de la OMS y de la Dirección General de Epidemiología (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2019; World Health organization, 2009).

Durante este trabajo se evaluaron dos estrategias distintas de RT-PCR las cuales se diseñaron como métodos de tipificación específicos para los *Flavivirus* circulantes en el territorio mexicano, con la idea de tener un método confiable que identifique las variantes circulantes en nuestro país ya que, al ser virus RNA, la nube de mutantes originada durante su replicación permite la aparición y selección constante de variantes que genera la posibilidad de una pérdida de complementariedad con sondas y oligonucleótidos diseñados con base en secuencias virales circulantes en otras regiones endémicas y que en algún momento los métodos de identificación (comerciales o los recomendados por los laboratorios de referencia) presenten falsos negativos.

Se probó un diseño de RT-PCR anidada para la identificación y tipificación de los 4 serotipos de dengue usando un oligonucleótido sentido común y oligonucleótidos antisentido específicos para identificar cada serotipo. De manera complementaria se realizó un diseño multiplex capaz de detectar los 4 serotipos de DENV y el ZIKV en una misma reacción utilizando pares de oligonucleótidos específicos y compatibles.

2.2 Estructura de los *Flavivirus*

2.2.1 Virión

Los *Flavivirus* comparten una estructura común del virión, y dentro de este género, los virus DENV y ZIKV están particularmente bien caracterizados. El virión maduro es una partícula aproximadamente esférica de alrededor de 50nm de diámetro (Figura 2) (Lindenbach & Rice, 2007).

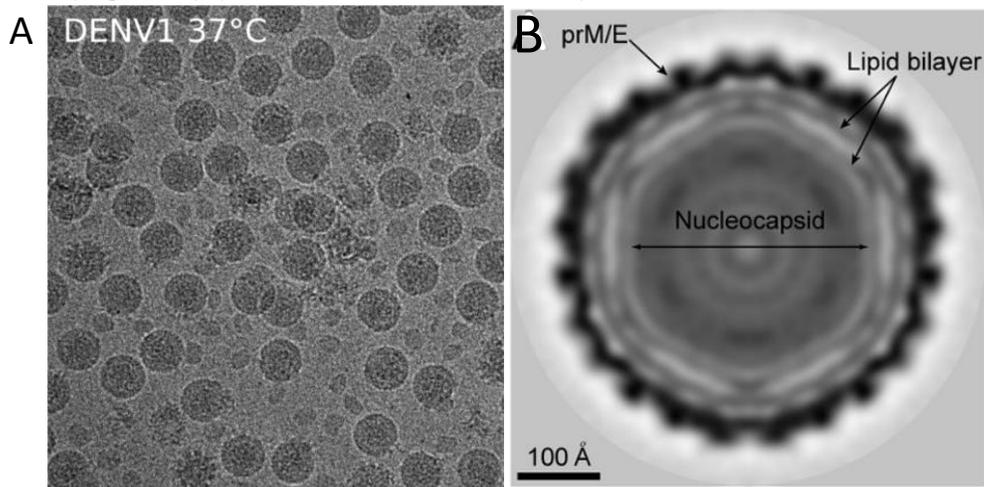


Figura 2. Imágenes por Criomicroscopía electrónica. (A) Partículas maduras de DENV1 PVP159b previa incubación a 37°C por 30 min (Kostyuchenko, Chew, Ng, & Lok, 2014). (B) Sección central de una partícula viral donde se puede observar la conformación icosaédrica y las estructuras virales de una partícula inmadura de DENV (Yu et al., 2009).

El exterior de la partícula viral está compuesta por una estructura compacta de glicoproteínas. Estas proteínas están insertadas en una bicapa lipídica adquirida de la última célula infectada. La composición lipídica de esta bicapa puede variar dependiendo del hospedero y del linaje celular (Lindenbach & Rice, 2007).

Estas glicoproteínas forman una estructura regular icosaédrica altamente simétrica (Rey, Stiasny, & Heinz, 2017) estas son: la proteína de envoltura (E), que es el principal determinante antigénico, se encarga del reconocimiento del receptor y de la fusión de la partícula durante el proceso de infección; y la proteína viral de membrana (M) (Barrows et al., 2018; Kuhn et al., 2002; Lindenbach & Rice, 2007).

Estas dos proteínas se organizan en heterodímeros durante la formación del virión en el lumen del retículo endoplásmico (ER) siendo 180 heterodímeros prM/E que se asocian a su vez en 60 trímeros (prM/E)₃ que forman proyecciones tipo espícula formando la partícula inmadura (Rey et al., 2017; Y. Zhang, Kaufmann, Chipman, Kuhn, & Rossmann, 2007). En este arreglo la proteína prM está posicionada cerca de la zona del péptido de fusión de la proteína E, lo que previene la fusión prematura

y reentrada del virus en la célula infectada (Kuhn, Dowd, Beth Post, & Pierson, 2015; Yu et al., 2009).

El paso de la partícula inmadura, por la vía secretoria a través del medio ácido que prevalece en los compartimentos del aparato de Golgi resulta en la reorganización de las proteínas E y prM (Figura 3). Los 60 trímeros se disocian, rotan y se reordenan en 90 dímeros anti paralelos de proteína E que se organizan paralelos a la bicapa lipídica, este reordenamiento deja al descubierto la zona pr de la proteína M que es procesada por la proteasa furina celular en el *trans* Golgi, esta fracción pr es soluble y se mantiene asociada a la proteína E hasta la salida del virión al medio extracelular de pH neutro donde se libera (Kuhn et al., 2015; Lindenbach & Rice, 2007; Pierson & Diamond, 2012; Rey et al., 2017) Esto completa la maduración del virión.

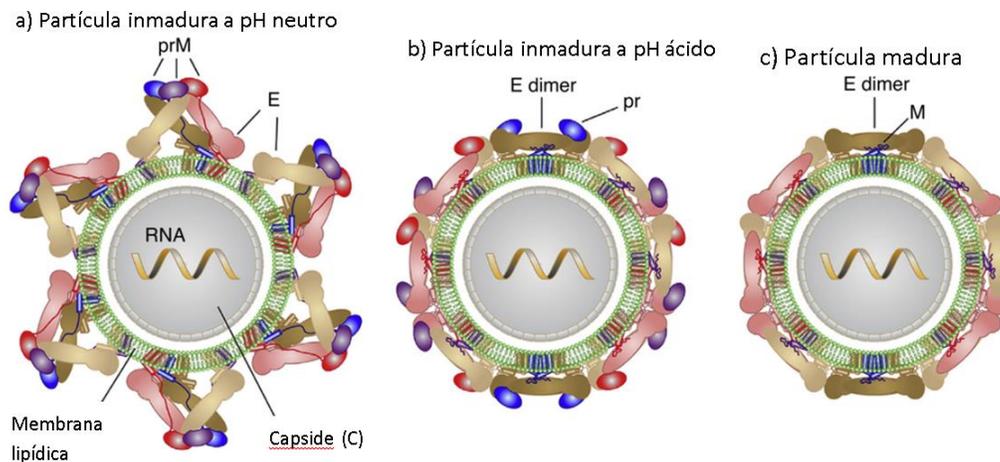


Figura 3. Representación esquemática de la organización de las proteínas de superficie durante la maduración de virión. Modificado de (Rey et al., 2017).

En el interior del virión se encuentra el genoma viral asociado a la proteína de capsido (C), esta asociación es conocida como ribonucleoproteína viral, la partícula contiene una copia del genoma viral y una gran cantidad de copias de proteína C, la conformación de esta proteína tiene una distribución asimétrica de cargas por lo que los residuos cargados positivamente interactúan y se asocian con el genoma viral, de carga negativa, y la otra parte que tiene características no polares con la membrana lipídica (Barrows et al., 2018; Ma, Jones, Groesch, Kuhn, & Post, 2004).

2.2.2 Genoma de los *Flavivirus*

El genoma de los *Flavivirus* (Figura 4) consiste en una cadena sencilla de RNA con polaridad positiva de entre 10 y 12 kb, dependiendo de la especie. Contiene en su extremo terminal 5' un cap de tipo I y no presenta cola poli A en el extremo 3'. Ambos extremos el 5' y 3' tienen regiones no traducidas (UTR) que están altamente estructuradas y tienen roles esenciales en la replicación viral, transcripción y posiblemente en la adaptación y patogénesis en el hospedero que infecta. El genoma cuenta con un único marco de lectura abierto que codifica para la poliproteína viral. (Gebhard, Filomatori, & Gamarnik, 2011; Liu & Qin, 2019; Villordo et al., 2016).

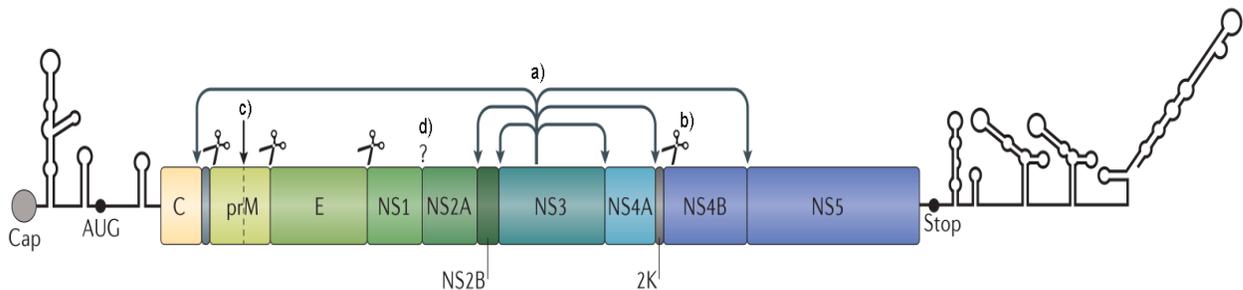


Figura 4. Genoma de los *Flavivirus*. Se muestra las estructuras de las regiones no traducidas de los extremos terminales y en el centro el marco de lectura abierto con las zonas que codifican para cada una de las proteínas virales. a) Las flechas salientes de la proteína NS3 indican los sitios de corte para esta proteasa viral, b) las imágenes de tijera muestran los sitios de corte por proteasas celulares c) zona de modificación por la furina del aparato de Golgi y d) un sitio de corte proteolítico para el cual se desconoce aún la enzima responsable de la modificación (Modificado de Neufeldt, Cortese, Acosta, & Bartenschlager, 2018).

2.2.2.1 Región terminal 5'

2.2.2.1.1 Cap de tipo I

La estructura cap tipo I de los *Flavivirus* consiste en una guanosina metilada en la posición N7, unida de forma invertida con respecto al orden común de la cadena de nucleótidos al primer nucleótido de la cadena de RNA por un enlace fosfodiéster que forma un puente trifosfato entre estos (Ray et al., 2006) y contiene una metilación más en la posición 2'OH del primer nucleótido del genoma que regularmente consiste en un dinucleótido conservado 5'-AG-3' (Tilgner & Shi, 2004; Villordo et al., 2016). Esta modificación es muy importante para el inicio de la traducción del RNA viral ya que la ausencia de este cap I representa una diferencia estructural con los RNAs mensajeros celulares (Cowling, 2010).

Debido a que las enzimas celulares capaces de realizar esta modificación en el RNA se encuentran en el núcleo, las proteínas virales tienen las actividades necesarias para esta modificación y se identifican 4 pasos: 1) la actividad de

ATPasa de NS3 que hidroliza el fosfato terminal del extremo 5', 2) por otra parte la NS5 reacciona con un guanósín trifosfato (GTP) formando un intermediario GTP-NS5, 3) la actividad de guanililtransferasa de la NS5 permite la transferencia del nucleótido en forma de guanósín monofosfato hacia el extremo difosfatado 5' del RNA (Issur et al., 2009) y finalmente 4) la NS5 metila la guanina añadida en la posición N7 y también el primer nucleótido de la cadena en la posición 2'OH de la ribosa. (Dong et al., 2007; Klema, Padmanabhan, & Choi, 2015).

2.2.2.1.2 Región 5' no traducida

Esta fracción del genoma (Figura 5) de entre 95 a 101 nucleótidos consta de dos dominios con funciones distintas. En la fracción inicial, que se ha observado conservada dentro del género *Flavivirus*, se encuentra la región denominada SLA (*Stem Loop A*). Este elemento, de alrededor de 70 bases, funciona como un promotor de la replicación del genoma viral ya que presenta afinidad a la polimerasa viral NS5 (Gebhard et al., 2011; Liu & Qin, 2019).

La siguiente región es una estructura llamada SLB (*Stem Loop B*) que está separada del SLA por una secuencia repetitiva de uracilos, denominada espaciador poli-U, y que se extiende hasta la zona codificante de la proteína C, dentro del marco abierto de lectura. Este SLB contiene: secuencias que interaccionan con el extremo 3', se les denomina UAR (*Upstream AUG Regions*) río arriba y DAR (*Downstream AUG Regions*) río abajo del codón iniciador AUG de la replicación; una porción posterior al ORF dentro de la región codificante de la proteína C formando una estructura de *Hairpin* (cHP), que se ha demostrado tiene una función muy importante en el reconocimiento del codón de inicio, proponiéndose que esta estructura favorece por impedimento estérico al ribosoma el inicio de la traducción en el codón de inicio auténtico (Clyde & Harris, 2006); y la secuencia de circularización (5'CS) (Alcaraz-Estrada, Yocupicio-Monroy, & Del Angel, 2010; Barrows et al., 2018; Gebhard et al., 2011).

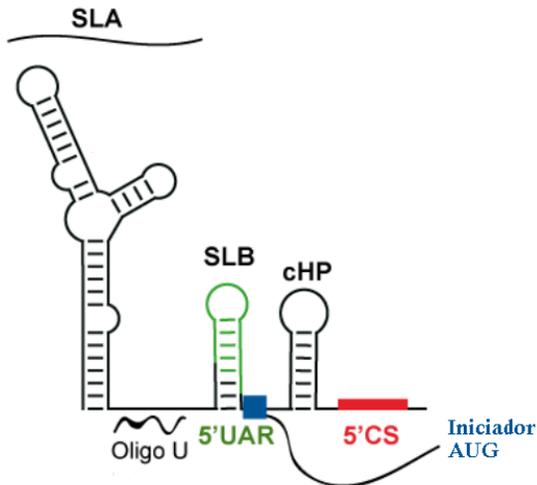


Figura 5. Representación esquemática de las estructuras secundarias del RNA viral en el extremo 5'. Se muestran en color verde y rojo las secuencias que interactúan con el extremo 3' y en color azul la zona del codón de inicio de la replicación (Modificado de Gebhard et al., 2011).

2.2.2.2 Región 3' no traducida

En la parte final del genoma viral se encuentra la región no traducida 3' que incluye aproximadamente los últimos 450 nucleótidos del genoma y se divide en 3 dominios (Figura 6), el primero se ubica inmediatamente después del codón de término y se denomina región variable. Se denomina así por la gran variabilidad en secuencia y longitud entre los serotipos del DENV existiendo secuencias de más de 120 nucleótidos y otras menores a 50 en este dominio (Gebhard et al., 2011; Shurtleff et al., 2001).

Este dominio contiene dos estructuras secundarias en forma de *stem loop* (SLI y SLII), esta conformación le confiere resistencia a la exonucleasa celular 5'-3' XRN1, por lo que estas dos estructuras son importantes para la formación de fragmentos subgenómicos flavivirales o sfRNAs (*subgenomic flaviviral RNA*) a los que se les atribuyen funciones importantes durante la infección como la evasión de la respuesta inmunológica innata del hospedero (Barrows et al., 2018; Funk et al., 2010).

El dominio II contiene estructuras tipo *Dumbbell* necesarias para la replicación y traducción del genoma, mientras que en el dominio III se encuentran las secuencias 3'DAR, 3'CS y 3'UAR las cuales interactúan con sus correspondientes secuencias complementarias en el extremo 5' para circularizar el genoma. (Barrows et al., 2018; Gebhard et al., 2011).

Finalmente existe en el extremo 3' un dinucleótido final conservado 5'-CU-3' que se ha demostrado que tiene un papel fundamental en la replicación de *Flavivirus* como DENV y WNV, posiblemente por su participación en el ensamblaje del complejo replicativo (RC) (Alcaraz-Estrada et al., 2010).

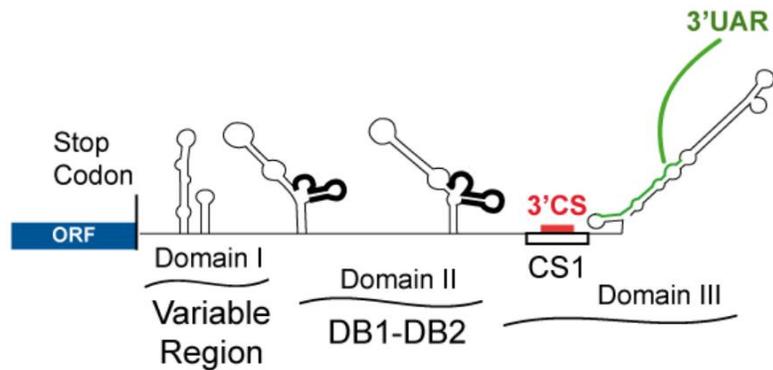


Figura 6. Representación esquemática de las estructuras secundarias del RNA viral en el extremo 3'. Se muestran en color verde y rojo las secuencias que interactúan con el extremo 5 (Gebhard et al., 2011).

La presencia de secuencias complementarias en ambos extremos del genoma de los *Flavivirus* (Figura 5 y 6) y la interacción entre estas resulta en una circularización no covalente de la cadena de RNA (Figura 7), con implicaciones esenciales en el inicio y la regulación de la replicación viral ya que esta conformación inhibe la traducción dependiente de Cap y favorece la interacción con la proteína NS5 encargada de la replicación del genoma viral (Liu & Qin, 2019; Villordo & Gamarnik, 2009).

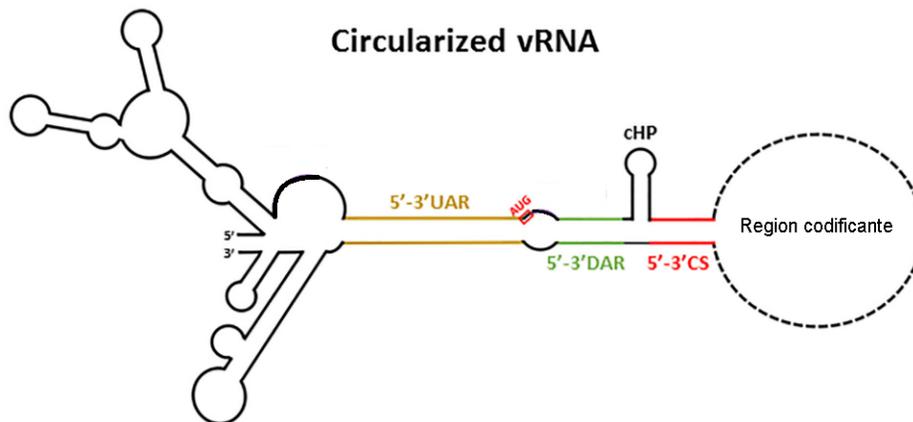


Figura 7. Representación esquemática de la conformación circular del genoma de los *Flavivirus*. Se marcan en colores las regiones complementarias de interacción entre los extremos que generan la circularización, en verde DAR (5'-3' downstream AUG regions) en dorado UAR (5'-3' upstream AUG regions) y en rojo CS (cyclization sequence) (Modificado de Mazeaud, Freppel, & Chatel-Chaix, 2018).

2.2.2.4 Marco de Lectura Abierto

El genoma de los *Flavivirus* contiene un único marco abierto de lectura (ORF) traducido por los ribosomas celulares que codifica para una poliproteína precursora que es modificada co- y post- traduccionalmente dando origen a 10 proteínas virales. Contiene un codón de inicio localizado en el inicio de la secuencia de la proteína de cápside, aunque no es el único ya que Clyde y Harris en 2006 demostraron que esta región es traducida desde múltiples codones de inicio, generando isoformas de la proteína C (Lindenbach & Rice, 2007).

2.2.3 Proteínas Virales

La poliproteína resultante de la traducción (Figura 8) está conformada por una cadena de alrededor de 3400 aminoácidos que se mantiene unida a la membrana del retículo endoplásmico por la presencia de varios dominios transmembranales. Esta poliproteína es procesada por proteasas celulares y la proteasa viral NS3 durante y después del proceso de traducción (Figura 4). En el extremo N-terminal de la poliproteína se encuentra la secuencia de aminoácidos correspondiente a las 3 proteínas estructurales que conforman el virión (C-prM-E) y la región posterior contiene las siguientes 7 que se conocen como proteínas no estructurales, que están involucradas en los procesos de replicación viral y evasión de la respuesta inmunológica (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Figura 4 y 8) (Lindenbach & Rice, 2007; Mukhopadhyay, Kuhn, & Rossmann, 2005; Neufeldt et al., 2018; Uchil & Satchidanandam, 2003).

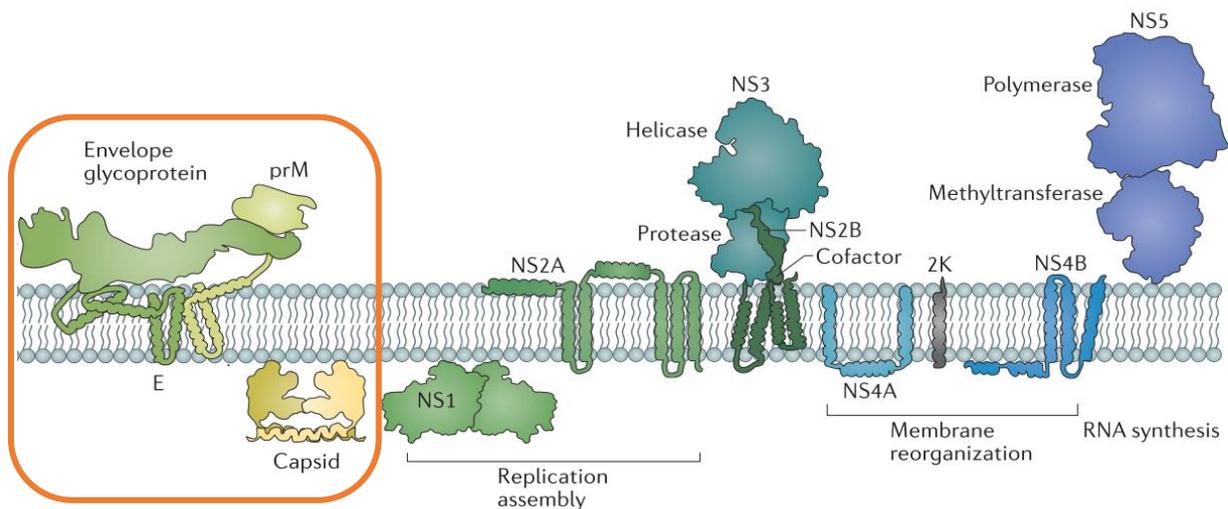


Figura 8. Representación esquemática de la poliproteína flaviviral en asociación con la membrana lipídica del retículo endoplásmico. Se enmarcan en color naranja las proteínas estructurales y se nombran las funciones de las proteínas no estructurales en el ciclo de replicación (Modificado de Neufeldt et al., 2018).

2.2.3.1 Proteínas No Estructurales

Estas proteínas son responsables de la replicación del genoma ya que durante el proceso de replicación se organizan para formar el RC; se ha observado que todas las proteínas NS de los *Flavivirus* forman parte de este complejo, donde se sintetiza el genoma viral, se agrega la estructura Cap en el extremo 5' y se metila para originar el Cap tipo I y dar origen al genoma viral maduro (Klema et al., 2015).

NS1

Es una proteína con una estructura altamente conservada, tiene un peso molecular de entre 46-55 kDa dependiendo de la glicosilación que presente y existe en diversos arreglos oligoméricos, principalmente en hexámero soluble secretado por las células infectadas, además de estar distribuida en distintos compartimentos celulares: asociada a la membrana, en vesículas y su forma asociada al complejo replicativo (Muller & Young, 2013; Rastogi, Sharma, & Singh, 2016).

Posterior a la traducción, esta proteína es translocada hacia el lumen del retículo endoplásmico y es separada de la proteína E en el extremo amino terminal por una peptidasa residente del ER y en el extremo carboxilo terminal es separada de la proteína NS2A por una enzima celular aún no identificada (Muller & Young, 2013).

Se ha demostrado su capacidad de unión a TLRs y a las proteínas del complemento modulando su funcionamiento, por lo que se propone como un factor de virulencia (Rastogi et al., 2016). Se conoce la co-localización de esta proteína con cadenas dobles de RNA viral y con las otras proteínas NS del complejo replicativo lo que sugieren una función importante en las fases tempranas de la replicación pero la función específica de esta proteína en la replicación no está totalmente caracterizada (Scaturro, Cortese, Chatel-Chaix, Fischl, & Bartenschlager, 2015).

NS2

La región del genoma de NS2 codifica para dos proteínas: NS2A y NS2B, la proteína NS2A es una proteína pequeña de 231 aa de naturaleza hidrofóbica asociada a membranas celulares, se ha evidenciado una fuerte interacción de esta proteína con la región 3'UTR del genoma viral y con la proteína NS3 y NS2B formando parte del complejo replicativo, por lo que Leung y colaboradores en , 2008 sugieren que esta proteína tiene una función transportadora del complejo replicativo a los sitios de replicación del genoma viral o de este RNA hacia los sitios de ensamblaje de la partícula actuando como una viroporina y tiene un papel importante en la remodelación de las membranas celulares (Shrivastava et al., 2017).

Esta proteína forma un complejo estable con la NS3 y actúa como cofactor en el complejo NS2B-NS3 serina proteasa. Además de ser cofactor, los dominios TMDs de la NS2B anclan el complejo enzimático a la membrana del ER para una activación eficiente de esta proteasa viral (X.-D. Li et al., 2016; Lindenbach & Rice, 2007).

NS3

Es una proteína de aproximadamente 618aa con diversas funciones y que se encuentra dividida en dos dominios funcionales unidos por un *linker* flexible de alrededor de 10aa (Luo, Vasudevan, & Lescar, 2015). El dominio ubicado en el extremo amino terminal se encuentra en asociación con la NS2B y es este complejo NS2B-NS3 el que presenta la actividad de serina proteasa con sitios de corte distribuidos en varios puntos de la poliproteína viral (Figura 4). El dominio ubicado en el extremo carboxilo terminal tiene actividad de nucleótido trifosfatasa y RNA trifosfatasa, necesaria para la adición del Cap I durante el procesamiento del genoma viral posterior a la replicación, además de una función de helicasa dependiente de RNA que se cree es necesaria para separar la doble hebra de RNA generada como intermediario durante la replicación del genoma viral (K. Li, Phoo, & Luo, 2014; Z. Li, Zhang, & Li, 2017; Luo et al., 2015).

NS4

Esta zona de la poliproteína se divide en dos proteínas: NS4A y NS4B existiendo entre estas dos un péptido llamado 2K, la separación del péptido 2K de la proteína NS4A se lleva a cabo por la proteasa viral y es un prerrequisito para la posterior separación de este péptido de la NS2B por proteasas celulares (Zou et al., 2015). Estas proteínas tienen dominios transmembranales que las asocian a las membranas y son las responsables de inducir los re-arreglos en las membranas del retículo endoplasmático con los que se forman las invaginaciones membranosas en las que se ensambla el complejo replicativo, además se sugiere que organizan y estabilizan la estructura del RC (Barrows et al., 2018; Lindenbach & Rice, 2007; Zou et al., 2015).

NS5

Esta es una proteína grande y altamente conservada en los *Flavivirus* con actividad metiltransferasa (MTasa), guanilil transferasa (Issur et al., 2009) y RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) siendo esta proteína la encargada de la síntesis de las nuevas cadenas de RNA virales. Se ha descrito que la actividad de esta RdRp en los *Flavivirus* presenta una baja fidelidad en el proceso de replicación lo que resulta en la producción de copias del genoma viral con mutaciones y una población con secuencias genéticas heterogéneas conocida como nube de mutantes, esto se ha descrito en una gran variedad de virus de RNA y se considera

una estrategia de adaptación al ambiente cambiante y a la respuesta inmunológica de los hospederos (Crotty & Andino, 2002; Domingo, Sheldon, & Perales, 2012).

La región amino terminal de la NS5 contiene la actividad MTasa encargada de la metilación del genoma que resulta en el Cap tipo I necesario en la maduración del genoma viral, la región carboxilo terminal se encuentra el dominio RdRp, esta proteína necesita asociarse a la NS3 para un correcto funcionamiento durante la replicación (Barrows et al., 2018).

2.2.3.2 Proteínas Estructurales

Proteína de Envoltura (E)

Es la proteína que recubre la parte exterior del virión (Figura 9) por lo que se le considera el mayor determinante antigénico de los *Flavivirus*. Se ha descrito su interacción con diversos receptores celulares como las Lectinas tipo C (moléculas de adhesión intercelular específicas de células dendríticas no integrinas DC-SIGN), Glicosaminoglicanos (Heparán sulfato), el marcador de diferenciación CD14, el receptor de manosa (CD206) y más receptores reportados que se muestran en la Tabla 1. Esta amplia gama de interacción le otorga a los *Flavivirus* un tropismo celular diverso que incluye células epiteliales, hepatocitos, células del sistema inmunológico (monocitos y macrófagos) e incluso células del sistema nervioso, siendo así la proteína E la involucrada en la entrada de la partícula viral a la célula a través de la endocitosis mediada por estos receptores (Cruz-Oliveira et al., 2015; Rey et al., 2017).

Tabla 1. Receptores celulares involucrados en la entrada de DENV en células de mamíferos (modificado de Cruz-Oliveira et al., 2015).

Molécula	Tipo	Célula en la que se identificó la interacción	Virus
Heparán sulfato	GAG	Vero CHO K1	DENV 2
CD14	Proteína	Monocitos Macrófagos	DENV 2
DC-SIGN	Lecitina tipo C	THP-1 Células dendríticas derivadas de monocitos	DENV 1,2,3 y 4
Receptor de manosa	Proteína	Monocitos Macrófagos	DENV 1,2,3 y 4
AXL (receptor tirosina-quinasa)	Proteína	Cultivo de células epiteliales de riñón humano Cultivo de astrocitos humanos	DENV 2 y 3
Receptor de alta afinidad de laminina	Proteína	HepG2 PS Clone D	DENV 1,2 y 3

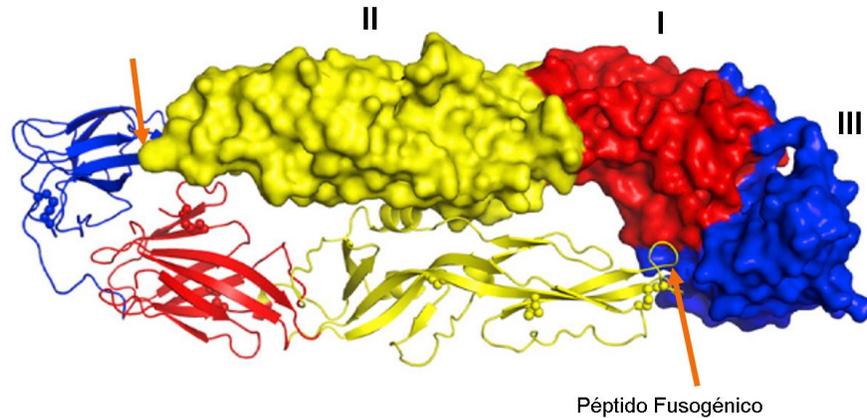


Figura 9. Estructura del homodímero de la proteína E en un virión maduro. Las flechas naranjas indican la zona donde se encuentra el péptido fusogénico en el extremo final del dominio II (Dai et al., 2016).

Esta proteína está compuesta por 3 dominios:

- El dominio I en la parte central de la proteína y que contiene los dominios transmembranales que la anclan a la envoltura del virión.
- El dominio II que se coloca horizontalmente a la superficie del virus, con la ayuda de las regiones transmembranales del dominio I, y que contiene en su extremo amino terminal el péptido fusogénico, este péptido es una región hidrofóbica de 11 a 13 aminoácidos altamente conservada en toda la familia *Flaviviridae*, y tiene un papel central en la fusión de la envoltura viral y la membrana del endosoma permitiendo la liberación del genoma viral al citoplasma.
- El dominio III del que se ha descrito un plegamiento parecido a las inmunoglobulinas y que se cree que es la zona responsable de la interacción con los receptores celulares que permiten la entrada del virus.

La conformación madura de esta proteína consiste en 90 homodímeros antiparalelos que recubren al virión e interactúan con los receptores celulares para permitir la entrada del virus. Posterior a la entrada se genera la acidificación del endosoma, lo que provoca la disociación de estos dímeros y un cambio conformacional de la proteína E además de un rearrreglo en trímeros de la unidad estructural, pasando de un alineamiento horizontal (con respecto a la partícula viral) a una forma semivertical exponiendo el péptido fusogénico que, en esta forma, puede interactuar con la membrana del endosoma (Figura 3. a) (Bressanelli et al., 2004; Lindenbach & Rice, 2007; Modis, Ogata, Clements, & Harrison, 2004; W. Zhang et al., 2003).

Durante la maduración de la partícula viral esta proteína también se encuentra sometida a los cambios estructurales y de organización dependientes de pH. Posterior a su síntesis y modificación postraduccionales proteolíticas se organiza en trímeros con forma de espículas en las que el péptido fusogénico se encuentra cubierto por la prM por lo que no interactúa con las membranas celulares. Durante el trayecto de la partícula viral a través del aparato de Golgi estos trímeros se disocian y se separa el fragmento *pr* de la proteína M (manteniéndose aun sobre la zona del péptido fusogénico) lo que permite la formación de los dímeros con alineación horizontal que conforman la partícula madura (Figura 3. c) (Bressanelli et al., 2004; Mukhopadhyay et al., 2005; Rey et al., 2017).

Proteína de Membrana (prM)

Se le denomina precursor de la proteína de membrana ya que contiene un fragmento pequeño de aminoácidos (*pr*) que es separado de la proteína M por la furina del aparato de Golgi que permanece adherido por interacciones electrostáticas con el péptido fusogénico, y que posteriormente en el medio extracelular es liberado por ser soluble a pH neutro (Yu et al., 2009).

La proteína M se encuentra asociada a la proteína E y se cree que participa durante el plegamiento y organización de los dímeros, pero la principal función que se le atribuye es la de prevenir el cambio conformacional de la proteína E hacia su forma fusogénica durante su paso por el medio ácido de la red *trans* Golgi, esto se logra debido a la localización del péptido *pr* sobre la zona del péptido fusogénico de la proteína E, que impide su cambio conformacional (Heinz et al., 1994; Lindenbach & Rice, 2007).

Proteína de Cápside (C)

Es una proteína de alrededor de 12 kDa plegada en forma de cuatro α -hélices, de la cual se sabe que contiene en el extremo carboxilo terminal residuos de naturaleza básica con cargas netas positivas, también se ha identificado otra región con características hidrofóbicas (Ma et al., 2004).

Esta proteína forma una asociación dimérica que se estabiliza con la interacción de sus zonas hidrofóbicas y se cree que la zona de cargas netas positivas de este dímero interactúa con el genoma viral y que la zona hidrofóbica interacciona a su vez con la envoltura lipídica, además de con las otras proteínas estructurales, confiriéndole con estas asociaciones estabilidad a la partícula viral (Lindenbach & Rice, 2007; Ma et al., 2004).

2.3 Ciclo de Replicación

El proceso inicia con la interacción de la proteína E con moléculas presentes en la superficie celular (Figura 10a) como receptores celulares (receptores de manosa, DC-SIGN), heparán sulfato o marcadores de diferenciación (Tabla 1) y la interacción con estas moléculas induce endocitosis (Cruz-Oliveira et al., 2015; Rey et al., 2017). Esta variedad de interacciones provoca que las células susceptibles a la infección sean variadas como: monocitos, células dendríticas, neuronas y células de tejido ocular entre otras (Neufeldt et al., 2018).

Los *Flavivirus* ingresan a la célula (Figura 10 b) regularmente por endocitosis mediada por receptor principalmente por la vía dependiente de clatrina, esta proteína se polimeriza por señales en la membrana y genera una curvatura que da origen a una vesícula endocítica, la acidificación de este endosoma provoca el cambio de conformación de la proteína E exponiendo el péptido fusogénico. La interacción de este péptido con la membrana del endosoma provoca la fusión de la membrana endosomal con la envoltura del virus (Figura 10 c) liberando el genoma viral hacia el citoplasma (Neufeldt et al., 2018).

El material genético de los *Flavivirus* por sus características de RNA polaridad positiva (+) y su cap I es reconocido como un RNAm y tiene la posibilidad de ser traducido inmediatamente por los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso (RER), generando la poliproteína viral. Esta poliproteína es procesada por la NS3 y diversas proteasas celulares generando las proteínas virales funcionales (estructurales y no estructurales) que se mantienen asociadas al RER provocando una rápida acumulación de proteínas virales en esta zona. Garcia-Blanco y colaboradores (2016) proponen que esta acumulación, principalmente de proteínas NS5 y NS3 que tienen interacción con el extremo 5' del RNA, provoca una primera señal de cambio en el ciclo viral iniciando el proceso de replicación (Barrows et al., 2018; Garcia-Blanco et al., 2016).

Las proteínas NS sintetizadas se asocian formando el complejo replicativo, estas proteínas inducen cambios en la conformación de la membrana del retículo endoplásmico lo que genera invaginaciones y la formación de compartimentos membranosos dentro de los cuales se lleva a cabo la replicación del genoma viral (Klema et al., 2015; Uchil & Satchidanandam, 2003).

Dentro de estos compartimentos la polimerasa viral NS5 en asociación con la NS3 llevan a cabo el proceso de replicación, el RNA (+) sirve como molde para la síntesis de una cadena complementaria de RNA polaridad negativa (-), estas dos cadenas se mantienen asociadas en una doble cadena de RNA que funciona como el intermediario replicativo, el RNA (-) de esta doble cadena es usada como molde

para la generación de una nueva cadena de RNA (+), esta cadena naciente sustituye a la anterior en el proceso de síntesis por la RdRp liberando nuevamente al intermediario replicativo lo que permite la producción de múltiples copias de RNA (+), estas cadenas son modificadas subsecuentemente por proteínas virales para añadir el cap I y son utilizadas en el ensamblaje de la partícula viral (Klema et al., 2015).

Este RNA con cap se asocia, por interacciones electrostáticas, con las zonas del dímero de proteína C que presentan cargas netas positivas formando la nucleocápside (Ma et al., 2004), esta nucleocápside a través de las zonas hidrofóbicas de la proteína C interacciona con las proteínas estructurales E/prM que se encuentran (formando un heterodímero) ancladas a la membrana en el lumen del retículo endoplásmico con lo que inicia la formación de las partículas virales inmaduras (Samsa et al., 2009; Welsch et al., 2009).

La partícula inmadura viaja a través de la vía secretora donde las proteínas estructurales E/prM son modificadas por la furina del aparato de Golgi, está separa el fragmento *pr* de la proteína M y el medio ácido de este organelo genera un cambio en el arreglo de la proteína E generando los dímeros de posición horizontal característicos del virión maduro. La partícula continúa su trayecto por el aparato de Golgi hacia vesículas de transporte hasta ser secretada fuera de la membrana celular, donde el fragmento *pr* pierde su asociación con la proteína E dando paso a la partícula viral madura. (Lindenbach & Rice, 2007; Mukhopadhyay et al., 2005; Neufeldt et al., 2018).

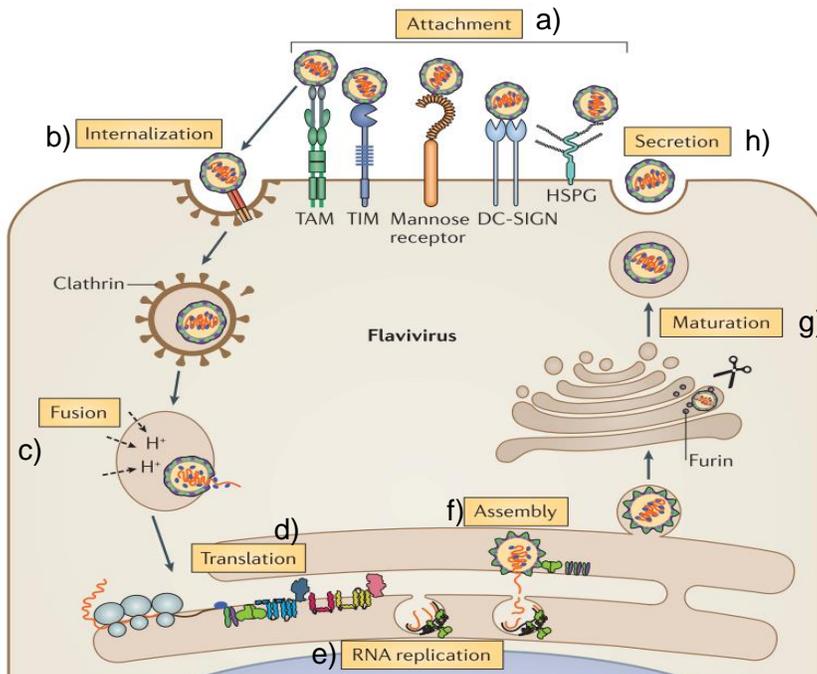


Figura 10. Ciclo replicativo de los *Flavivirus* (Neufeldt et al., 2018).

2.4 Variabilidad genética de los *Flavivirus*

A diferencia de las DNA polimerasas las RdRp virales presentan una mayor cantidad de errores durante la replicación y carecen de una actividad correctiva durante o después de la transcripción lo que resulta en rangos de error altos, estimados de 10^{-3} a 10^{-5} mutaciones por nucleótido por ciclo de replicación. Teniendo en cuenta el tamaño del genoma de los *Flavivirus* (aproximadamente 11Kb) y que un organismo infectado puede generar 10^9 a 10^{10} partículas virales, la posibilidad de que cada partícula viral contenga en su genoma una o más mutaciones es posible (Kurosu, 2011; Selisko, Papageorgiou, Ferron, & Canard, 2018).

Debido a esta baja fidelidad de la RdRp viral NS5 durante el proceso de replicación viral se generan miles de copias del genoma cercanamente relacionados pero sujetos a un continuo proceso de variación, esta población heterogénea de variantes generadas por intercalación de nucleótidos no complementarios se conocen como nube de mutantes o cuasiespecies. (Andino & Domingo, 2015; Domingo et al., 2012). Esta nube de mutantes generada durante la replicación probablemente incluye muchas mutaciones defectuosas, es decir, que pueden derivar en viriones incapaces de establecer una infección, pero la diversidad generada aumenta la capacidad de adaptación de los viriones infecciosos y por lo tanto las posibilidades de establecer una infección productiva y de completar la replicación viral (a esta capacidad de producir progenie infecciosa en un hospedero se le denomina *fitness*) generando variantes posiblemente capaces de evadir la respuesta inmunológica, con una mayor transmisibilidad o con un amplio tropismo celular (Lauring & Andino, 2010; Wargo & Kurath, 2012).

En el caso particular de los *Flavivirus*, una de las fuentes de diversidad genética es la alternancia natural entre el hospedero invertebrado y los hospederos vertebrados, lo que impone diferentes presiones selectivas en la población viral resultando en una circulación cíclica de variantes que generan brotes epidémicos de intensidad y severidad variables (Filomatori et al., 2017).

2.5 Ciclos de transmisión de DENV y ZIKV

El DENV y el ZIKV son transmitidos por la picadura de mosquitos infectados a hospederos primates susceptibles y en ambos casos se han documentado dos ciclos de transmisión ecológicamente distintos (Figura 11): uno enzoótico (denominado ciclo selvático) donde el virus circula entre primates no humanos de distintas especies dependiendo de la región geográfica. Este ciclo depende de diversas especies arbóreas de mosquitos del género *Aedes* como vector.

Por otro lado existe un ciclo urbano en el que el virus se transmite entre humanos y mosquitos antropofílicos principalmente *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Vasilakis & Weaver, 2017).

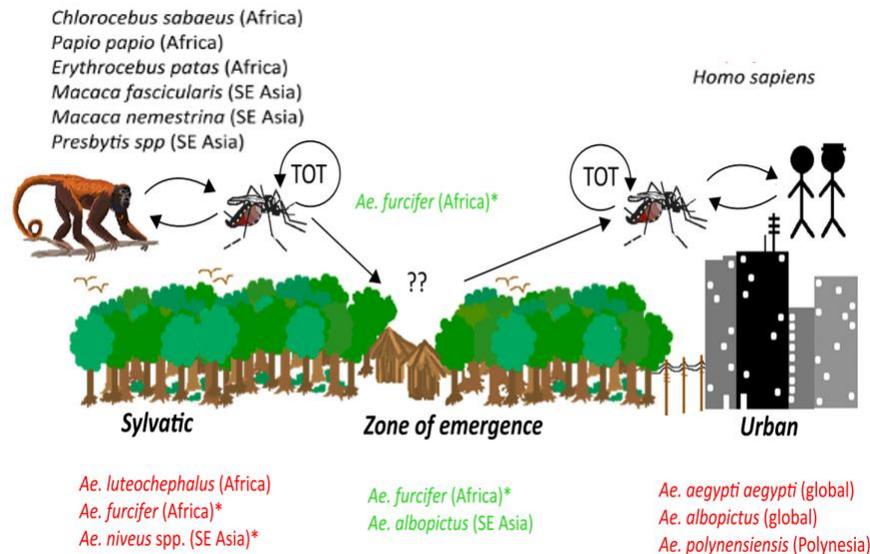


Figura 11. Ciclos selvático y urbano de transmisión de los *Flavivirus*. Las especies de primates y su región geográfica se muestran arriba en color negro, en color rojo y verde se enlistan las especies de mosquitos que se han identificado como vectores en cada ciclo de transmisión. TOT son las siglas de transmisión trans oval, en la que un mosquito hembra infectado con un *Flavivirus* lo transmite a su descendencia (Vasilakis & Weaver, 2017).

2.6 Virus del dengue

El virus del dengue contiene una subclasificación en 4 serotipos (1 al 4), antigénicamente relacionados pero filogenéticamente distintos, tanto que los análisis filogenéticos de las secuencias completas o parciales del genoma de los cuatro serotipos muestran el mismo grado de divergencia entre ellas como la existente entre especies distintas dentro del género *Flavivirus* (Holmes & Twiddy, 2003; Katzelnick et al., 2015).

El sitio geográfico del origen del DENV es aún un tema de intensa especulación, se cree que pudo haberse originado en África debido al origen de su principal vector el *Aedes Aegypti*, aunque la mayor diversidad selvática del DENV (con presencia de los 4 serotipos) se ha encontrado en Malasia, lo que sugiere que el ancestro selvático de los serotipos actuales de DENV tiene su origen en la región tropical Asia-Oceanía. Asimismo se tiene evidencia de que este virus fue originalmente un patógeno de primates simiiformes y que posiblemente los eventos de transmisión inter-especie ocurrieron independientemente para los 4 serotipos (Holmes & Twiddy, 2003; Vasilakis & Weaver, 2008; Wang et al., 2000).

Las descripciones más antiguas sobre enfermedades parecidas al dengue se encuentran en la literatura china (siglos II y III), posteriormente en reportes en el continente americano en 1635 (islas de Martinica y Guadalupe) y 1699 (Panamá) en los que se describen enfermedades febriles con características parecidas al dengue. Posterior a estas evidencias, existen reportes más detallados en los que se describe más claramente el dengue. Durante el siglo 19 los brotes de dengue eran comunes en ciudades portuarias del Caribe, Centro y Suramérica (Dick et al., 2012; Vasiliakis & Weaver, 2008).

En México los primeros brotes registrados de esta enfermedad datan del año 1941, con un descenso importante desde 1957 debido a una amplia campaña de erradicación del vector (lograda en 1963 cuando la OPS declaró su erradicación del país). Pero esta campaña de erradicación no se mantuvo y durante los años 80 inició la reinfestación paulatina con el vector y la reaparición de reportes de dengue en México (Fajardo Dolci, Meijem Moctezuma, Vicente Gonzales, Venegas Páez, & Mazón Gonzales, 2013; Narro Robles & Gómez Dantés, 1995). Esta enfermedad ha presentado importantes aumentos en su incidencia en años recientes y las zonas con condiciones ambientales favorables para el vector (Figura 12) abarcan una zona geográfica tan amplia que se estima que un tercio de la población humana se encuentra en riesgo de infectarse (Messina et al., 2019).

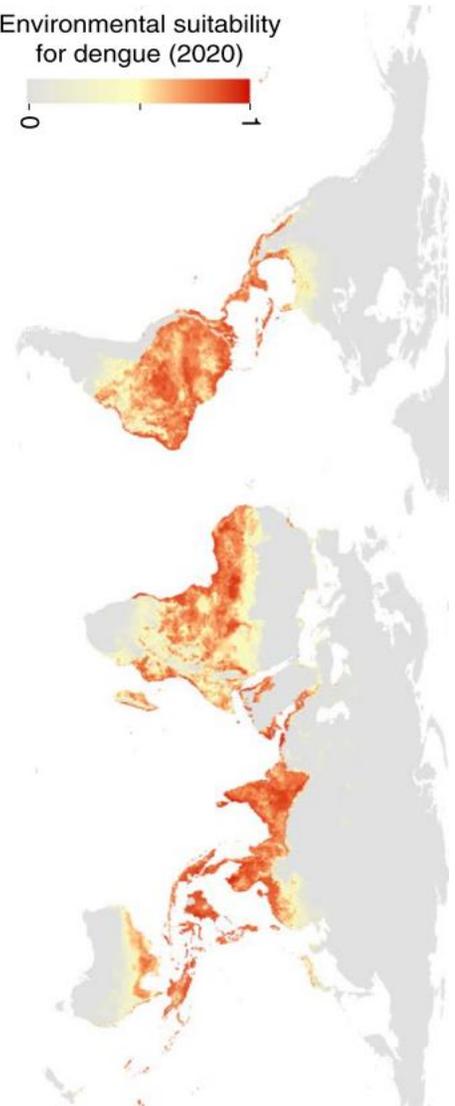


Figura 12. Predicción de las zonas con las condiciones ambientales adecuadas para la ocurrencia de brotes de dengue alrededor del mundo para el año 2020. Se muestran en color rojo las zonas con mayores probabilidades de ocurrencia y en escala decreciente las zonas con condiciones ambientales poco o nada favorables (Messina et al., 2019).

2.7 Virus Zika

El ZIKV fue descubierto en el bosque de Zika (Uganda) durante una investigación sobre el ciclo selvático del virus de la Fiebre amarilla y otros arbovirus. En abril de 1947 un macaco *Rhesus* fue colocado como centinela en una plataforma en el dosel del bosque y desarrolló fiebre y viremia, a partir de la inoculación de su sangre en un ratón se logró el aislamiento del nuevo virus, con posteriores aislamientos en mosquitos tanto en África como en el sureste de Asia (Weaver et al., 2016).

En el 2014 Faye O. y colaboradores apoyados en análisis filogenéticos de secuencias de ZIKV proponen que existieron dos eventos de dispersión del ZIKV desde la región este de África hacia el oeste del continente, y posteriormente una propagación más desde este continente hacia la región asiática originando los 3 genotipos en los que actualmente se categoriza a este virus: linaje africano occidental, linaje africano del este y linaje asiático (Faye et al., 2014).

El primer caso confirmado de infección por ZIKV en humanos ocurrió en Uganda en 1962 y posteriormente en Asia (Indonesia) en 1977 (Figura 13), además hubo estudios serológicos que sugerían una amplia distribución de este virus en las zonas tropicales de África y Asia (Musso & Gubler, 2016). El primer reporte epidémico confirmado por el virus Zika ocurrió en la isla Yap en 2007 y se reportaron más epidemias en los años subsiguientes en la misma área del sur del Pacífico y siendo confirmada una epidemia en Brasil en 2014 con la posterior diseminación en el continente americano (Gubler, Vasilakis, & Musso, 2017).

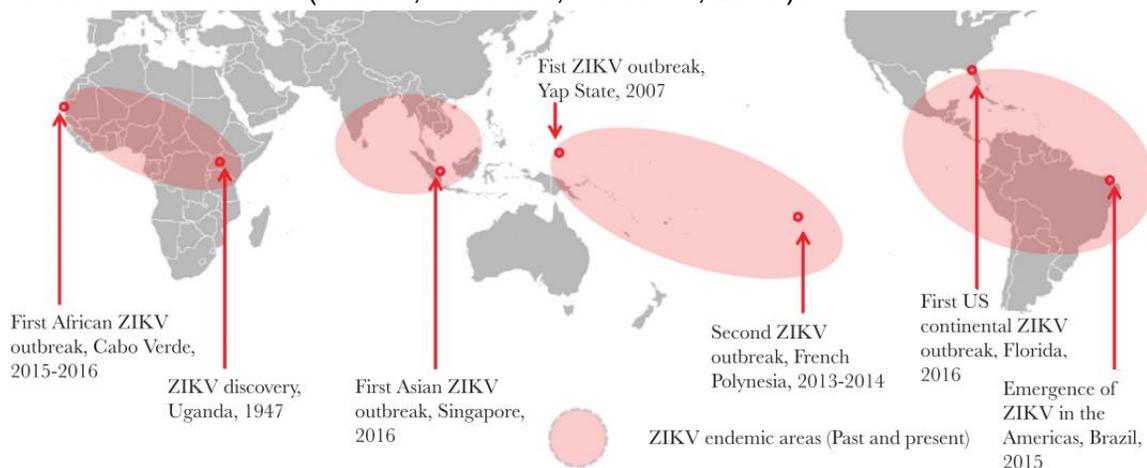


Figura 13. Zonas endémicas del virus Zika desde su descubrimiento en Uganda. Se marcan con puntos y fechas las zonas donde se reportaron las primeras epidemias por este virus (Gubler et al., 2017).

En México los primeros casos de infecciones endémicas por ZIKV ocurrieron en 2015 poco tiempo después del brote epidémico en Brasil y desde ese año es un patógeno que se mantiene circulante en el territorio mexicano (Dirección General de Epidemiología, 2015).

2.8 Presentación clínica de la infección por *Flavivirus* DENV y ZIKV

Las infecciones en humanos con *Flavivirus* son agudas y en la mayoría de los casos auto limitantes, regularmente se presentan con síntomas febriles, malestar y dolor. Existe riesgo de que la infección se complique originando una presentación clínica severa con síntomas como: hemorragias, extravasación de plasma o complicaciones neurológicas entre otras (Neufeldt et al., 2018).

Enfermedad por DENV

La presentación clínica de la infección por DENV es variable, y se estima que hasta un 70% del total de casos son de curso asintomático o subclínico y por lo tanto son subdiagnosticadas o no contabilizadas (Bhatt et al., 2013).

En el caso de las presentaciones sintomáticas la Organización Mundial de la Salud publicó en 2009 las guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control del dengue en el que sugiere el uso generalizado de una nueva definición de los casos de dengue de acuerdo a su severidad, y establece los signos y síntomas característicos (World Health organization, 2009).

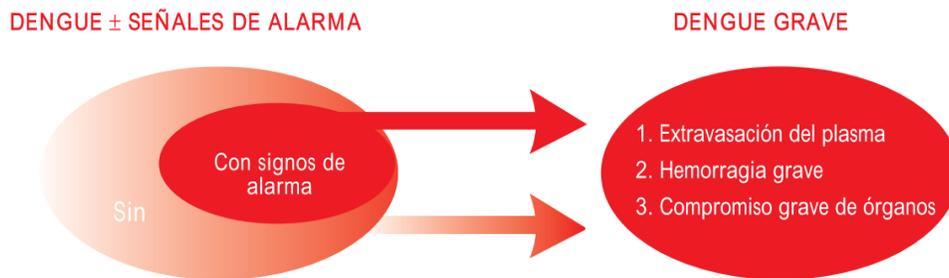


Figura 14. Clasificación de los casos de dengue según su gravedad (World Health organization, 2009).

La clasificación divide las presentaciones clínicas (Figura 14) en:

1. dengue no grave (DNG) considerada la presentación más común (en México en el año 2019 el 67% de los casos confirmados fueron diagnosticados como DNG [SINAVE, 2019b]) tiene una evolución y resolución favorable aunque temporalmente incapacitante.
2. dengue con signos de alarma (DGSA), una presentación que provoca síntomas más severos como vómitos, dolor intenso o acumulación clínica de líquidos (la Tabla 2 muestra los signos y síntomas de cada clasificación con más detalle) y que necesariamente necesita de vigilancia y atención médica (en México en el año 2019 el 25% de los casos confirmados fueron clasificados como DCSA [SINAVE, 2019b]).

3. dengue grave (DG) la presentación clínica más complicada ya que el sangrado, la extravasación de plasma y el daño orgánico representan un riesgo grave para la salud del paciente (el porcentaje de DG en México en el 2019 fue de 8% de los casos confirmados [SINAVE, 2019b]) (Fajardo Dolci et al., 2013; World Health organization, 2009).

Tabla 2. Clasificación del dengue según su gravedad y los signos y síntomas característicos (World Health organization, 2009).

Dengue probable: vivir en áreas endémicas para el DENV o haber viajado a estas. Presentar fiebre abrupta y dos o más de los siguientes síntomas		
<p>Dengue No Grave (DNG)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Náuseas, vómito • Erupción cutánea • Molestia y dolor • Prueba de torniquete positiva • Leucopenia 	<p>Dengue Con Signos de Alarma (DCSA)*</p> <p>Presentar dos o más síntomas de DNG y alguno de los signos de alarma</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dolor abdominal intenso, dolor a la palpación • Vómito persistente • Acumulación clínica de líquidos • Sangrado de mucosas • Letargia, agitación • Hepatomegalia • Aumento del hematocrito • Rápida disminución del número de plaquetas <p>*Requiere estricta observación y vigilancia médica</p>	<p>Dengue grave (DG)*</p> <p>Presentar dos o más síntomas característicos de dengue y también</p> <ul style="list-style-type: none"> • Extravasación grave de plasma que conduce a <ul style="list-style-type: none"> ○ Síndrome de choque por dengue ○ Acumulación de líquidos con insuficiencia respiratoria • Sangrado intenso • Compromiso orgánico grave <ul style="list-style-type: none"> ○ Enzimas hepáticas AST o ALT >1000 ○ Alteración de conciencia

En la enfermedad provocada por DENV se han definido 3 fases de desarrollo (Figura 15):

- **Fase febril.** Caracterizada por un aumento abrupto de temperatura (hasta 40°C) que determina el inicio de la enfermedad y con una duración de 2-7 días acompañada de dos o más síntomas característicos (mostrados en la Tabla 2). El inicio de esta fase está relacionada con el aumento de partículas virales presentes en la circulación sanguínea (viremia) alcanzando su máximo durante esta fase y con una posterior disminución conforme se inicia la siguiente fase (como se muestra en la Figura 14) es por lo tanto la fase más conveniente para la toma de muestra necesaria para diagnóstico molecular (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2019; Tricou, Minh, Farrar, Tran, & Simmons, 2011; World Health organization, 2009)

- **Fase crítica.** Se observa reducción de la temperatura corporal (alrededor de 38°C) que se mantiene, se presenta entre los días 3-7 del curso de la enfermedad. Durante esta fase se observa la disminución del conteo de leucocitos y el aumento del hematocrito, también se puede presentar extravasación del plasma, sangrado de mucosas y el deterioro de órganos que indicaría la evolución a dengue grave o con signos de alarma (Tabla 2) (World Health organization, 2009).
- **Fase de convalecencia.** Alrededor del día 5-10 de inicio de la fiebre, los síntomas de pacientes con diagnóstico de DNG disminuyen y el estado general del individuo mejora recuperando los valores normales de hematocrito y leucocitos, en el caso de los pacientes con síntomas de DCSA y DG la fase de convalecencia y recuperación puede retrasarse dependiendo de la gravedad de los síntomas y del curso clínico que presente (World Health organization, 2009).

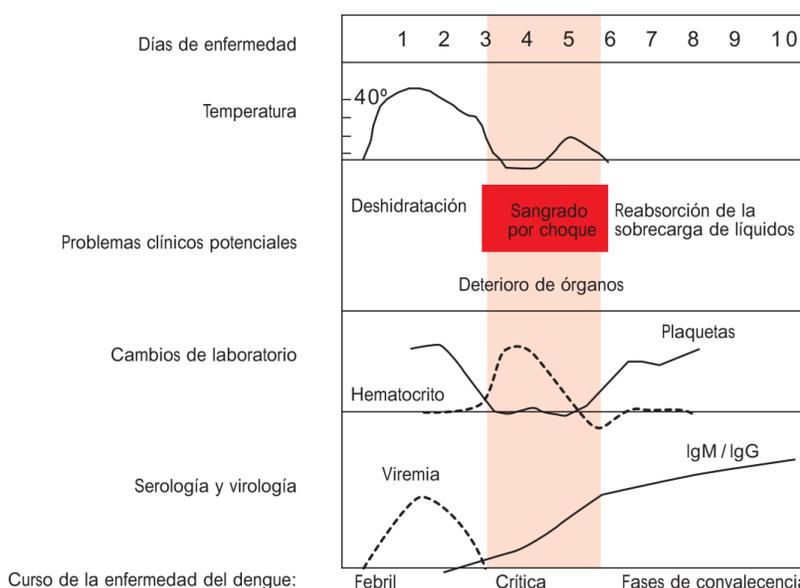


Figura 15. Curso temporal de la enfermedad causada por DENV (World Health organization, 2009).

Enfermedad por el ZIKV

La enfermedad provocada por el ZIKV tiene un inicio súbito y se presenta en la mayor parte de los casos con exantema (regularmente de tipo maculopapular) acompañado de fiebre de baja intensidad (<38.5°C) e hiperemia conjuntival no purulenta (Organización Panamericana de la Salud, 2016).

Este virus puede generar signos y síntomas menos frecuentes y existen además complicaciones principalmente neurológicas como se muestra en la Tabla 3, que pueden presentarse durante la fase aguda de la enfermedad o después de ésta (Organización Panamericana de la Salud, 2016). Aunque durante los brotes en la

Isla Yap (2007), Camboya (2010) y Filipinas (2012) no hubo reportes iniciales de complicaciones neurológicas, éstas si se reportaron en brotes posteriores en la Polinesia Francesa en 2013 (Wikan & Smith, 2016) y en el 2015 durante el brote de ZIKV en Brasil cuando se registró un aumento inusual en los casos de microcefalia (Organización Panamericana de la Salud, 2015) que posteriormente fueron relacionados a neonatos hijos de mujeres infectadas en el trimestre inicial de la gestación (Musso & Gubler, 2016; Wikan & Smith, 2016).

Tabla 3. Signos, síntomas y complicaciones de la enfermedad por ZIKV (Musso & Gubler, 2016; Organización Panamericana de la Salud, 2016).

Signos y Síntomas de la infección por ZIKV	Fiebre, malestar general, hiperemia conjuntival, cefaleas, dolor muscular, periartralgia, náusea diarrea y vómito.
Complicaciones neurológicas en adultos	Síndrome de Guillain-Barré (la complicación más frecuente), mielopatía inflamatoria, encefalitis.
Complicaciones en neonatos	Síndrome congénito asociado a ZIK que se manifiesta como: microcefalia, malformaciones del sistema nervioso central, anomalías auditivas y oculares.

2.9 Diagnóstico de las enfermedades producidas por ZIKV y DENV

En México, el Laboratorio de Arbovirus y virus Hemorrágicos, del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), es el rector normativo para el diagnóstico del DENV y ZIKV (Dirección General de Epidemiología, 2016) y en Noviembre de 2019 publicó los lineamientos para la vigilancia por laboratorio del dengue y otras arbovirosis (InDRE, 2019).

En este documento el InDRE establece como único método autorizado para la confirmación de infección por DENV y ZIKV la metodología de RT-qPCR, en muestras de fase aguda, usando oligonucleótidos y sondas autorizadas por el CDC (Triplex que detecta genoma del DENV, ZIKV y CHIKV [CDC, 2017]) y por el InDRE. Y solo en el caso de DCSA y DG, cuando no existe una muestra durante la fase febril, es aceptada una muestra en fase convaleciente para determinación de IgG específico contra *Flavivirus* (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2019).

2.10 Epidemiología y vigilancia del DENV y ZIKV en México

La vigilancia epidemiológica en México se lleva a cabo a través del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) y el procesamiento de las muestras para diagnóstico de DENV y ZIKV lo realizan los laboratorios estatales de salud pública (Secretaría de Salud, 2012, 2015) apegados al documento; Lineamientos de vigilancia por laboratorio del dengue y otras arbovirosis. En este se establece que todos los casos probables de dengue deben ser reportados, y confirmados por RT-qPCR. La tipificación de los serotipos circulantes de DENV se determina en el 100% de los casos de DCSA y DG y el 10% de los casos de DNG (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2019).

Los casos de dengue en México han tenido, desde su reemergencia en la década de los 80, una tendencia creciente con variaciones anuales (Figura 16) y se considera la enfermedad transmitida por vector más importante en nuestro país (Fajardo Dolci et al., 2013).

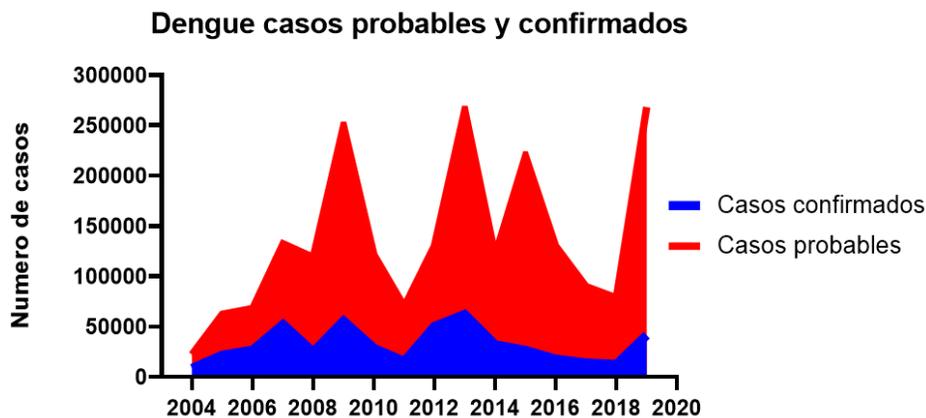


Figura 16. Gráfica de casos probables y confirmados de dengue en México desde el año 2004 al 2019. Durante este periodo el año 2013 ha sido el que presenta la mayor cantidad de casos confirmados con una posterior disminución hasta el año 2019 en el que se observó un repunte. Datos obtenidos del archivo histórico del SINAVE (Boletines epidemiológicos semana de cierre de cada año).

En la figura 16 se nota que durante el periodo 2014-2018 los casos confirmados se mantuvieron con una ligera tendencia a la baja, pero en el año 2019 se registró de nuevo un aumento, duplicando el número de casos confirmados en comparación con el año 2018. Esta tendencia no solo se observó en México, la Organización Panamericana de la Salud reportó un aumento de casos en general en el continente americano (Figura 17) (OPS & OMS, 2019).

Región	Total	Confirmados	D. Grave	Muertes
Las Américas	3,140,649	1,367,369	28,173	1,534

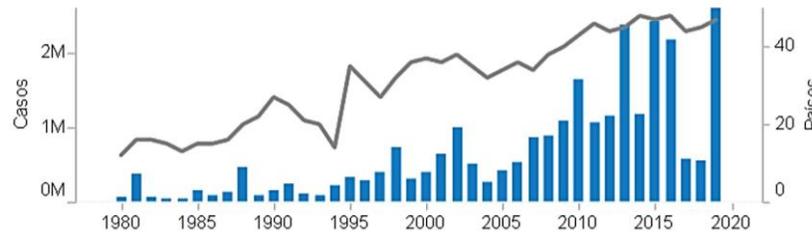


Figura 17. Casos reportados de dengue en el continente americano desde el año 1980 hasta 2019. Se observa el aumento constante de los casos de dengue y especialmente durante la última década siendo el año 2019 el año en el que se ha reportado la mayor cantidad de casos en el continente americano (OPS & OMS, 2019).

Durante el año 2019, en todos los estados con casos confirmados de infección por DENV se detectaron 2 o más serotipos circulantes (Figura 18) y en los estados de Veracruz y Chiapas se detectó la circulación de los 4 serotipos de DENV (SINAVE, 2019b).

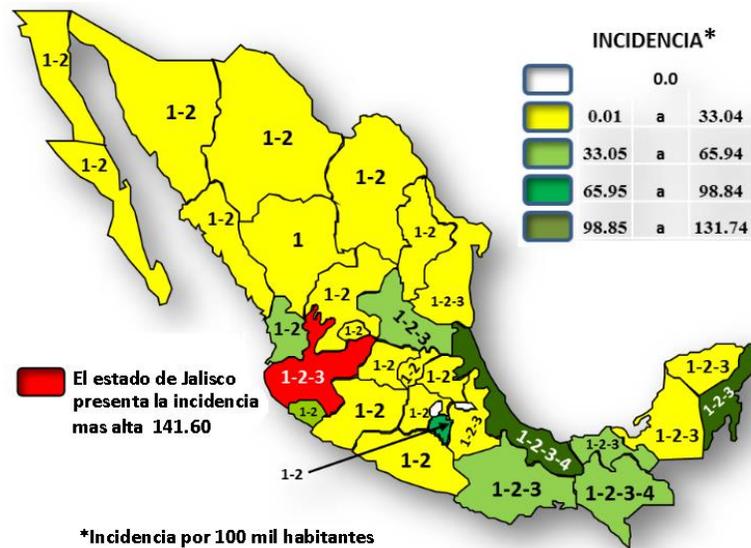


Figura 18. Mapa de la incidencia del dengue en México. La zona centro/sur de México representa la zona de mayor riesgo de infección por DENV y en la que se reporta mayor variedad en los serotipos circulantes durante el año 2019 (SINAVE, 2019b).

La vigilancia epidemiológica para el ZIKV inició en el año 2015 posterior a la confirmación del primer caso autóctono en México. La confirmación se lleva a cabo con el resultado positivo de la prueba de RT-qPCR triplex y se reportan todos los casos sospechosos de Zika (Dirección General de Epidemiología, 2015).

Durante el año 2016, posterior a su introducción al país, hubo un primer brote con casi 8000 casos confirmados y con presencia en 24 estados del país (Tabla 4). En los años posteriores el número de casos confirmados por año ha disminuido

gradualmente, pero esté virus aún co-circula con DENV y CHIKV en México (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2019).

Tabla 4. Casos confirmados de infección por ZIKV desde el 2015 hasta el final del año 2019. Se muestran además los estados en los que se detectaron casos confirmados, con lo que se observa la rápida diseminación del ZIKV en México en los siguientes dos años a su detección en el país. Datos obtenidos del (SINAVE, 2019a).

Año	Casos confirmados	Estados afectados
2015	15	Chiapas, Nuevo León, Jalisco
2016	7560	24 estados, donde los estados de Veracruz, Yucatán y Nuevo León acumulaban el 46% de los casos confirmados
2017	3260	26 estados con Nayarit, San Luis Potosí y Tamaulipas que acumulaban el 52% de los casos
2018	860	19 estados, la mayor incidencia se encontró en Sonora
2019	138	11 estados

3. Antecedentes y justificación.

En los virus de RNA se ha observado una rápida capacidad de adaptación a las presiones de selección que impone el sistema inmunológico del hospedero y/o los tratamientos antivirales. Esta adaptabilidad se le ha atribuido a su existencia como una población compuesta por cuasiespecies producto de la replicación propensa a errores de las RdRp virales (Sessions et al., 2015).

Los *Flavivirus* DENV y ZIKV presentan esta adaptabilidad influenciada por las presiones de selección que imponen los diferentes hospederos involucrados en su ciclo de replicación: humanos y mosquitos (*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*) en ciclos urbanos y primates no humanos con mosquitos arbóreos de diversas especies en ciclos selváticos (Figura 11) (Vasilakis & Weaver, 2017). Al estar involucradas varias especies, tanto de primates como de mosquitos, el genoma de los *Flavivirus* debe mantener un alto grado de plasticidad que le permita la adaptación a estas especies (Sessions et al., 2015). Además, durante un trabajo experimental de Sessions y colaboradores (2015) se encontraron, usando análisis filogenéticos en DENV (proveniente de pacientes humanos e inoculado en mosquitos), variantes específicas que dependían de la especie de mosquito del que se aisló y estas variantes aparecían de forma recurrente por lo que los investigadores sugieren que esto es un nuevo indicio de como los distintos vectores intervienen en la evolución del DENV (Sessions et al., 2015).

En México existe una amplia diversidad genética compuesta por poblaciones grupos originarios, que representa aproximadamente el 21% de la población mexicana, distribuidas por todo el territorio mexicano (que por sí mismas presentan claras

divergencias genéticas entre ellas) y por otra parte, la población de individuos mestizos resultado de un complejo y continuo proceso de mestizaje que involucra nativos americanos, europeos y una aportación de poblaciones africanas (Moreno-Estrada et al., 2014; Romero-Hidalgo et al., 2017). Esta diversidad tiene el potencial de influir en la selección de variantes de *Flavivirus* con características fenotípicas y genotípicas adaptadas a la población mexicana resultando en variantes de circulación específica en México.

Todos estos factores en conjunto pueden originar una población de cuasiespecies de DENV y ZIKV con un comportamiento dinámico, que involucre la selección y el desplazamiento entre variantes con un mayor *fitness*, por lo que el diseño de estrategias de detección específicas para las variantes que circulan en el territorio mexicano y su constante actualización es de gran importancia y puede ser utilizada como base para el estudio de la adaptación a la población, los factores de virulencia y la variabilidad adquiridos por los virus DENV y ZIKV en México.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Establecer una metodología para la detección por Inmunofluorescencia y tipificación por RT-PCR de aislados de *Flavivirus* a partir de muestras clínicas de pacientes mexicanos con infecciones por DENV o ZIKV.

4.2 Objetivos particulares

- Optimizar la técnica de inmunofluorescencia intracelular indirecta para detección de *Flavivirus* con un anticuerpo comercial monoclonal dirigido contra el péptido fusogénico de la proteína de envoltura.
- Comparar la sensibilidad de detección de *Flavivirus* por inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos producidos en hibridomas de ratón y rata, dirigidos contra la proteína E, NS1, NS3 y NS5.
- Validar dos estrategias de RT-PCR diseñadas a partir de secuencias de aislados mexicanos disponibles en GenBank, para la tipificación de muestras de pacientes mexicanos con diagnóstico clínico o serológico de DENV y ZIKV.

5. Hipótesis

La técnica de inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos monoclonales contra antígenos conservados entre *Flavivirus*, puede ser utilizada como técnica de tamizaje para la identificación a nivel de género, mientras que las estrategias de tipificación por RT-PCR para DENV y ZIKV, diseñadas a partir de secuencias completas de aislados de circulantes en México, permitirán la tipificación de la especie en *Flavivirus* del banco de aislados de la Unidad de Biomedicina de la FES Iztacala, UNAM.

6. Materiales y Métodos.

6.1 Línea celular Vero

Para la propagación y cultivo de los virus durante este proyecto se utilizó la línea celular Vero, esta es una línea celular que fue establecida a partir de tejido de riñón de un mono verde africano (*Chlorocebus sabaeus*). Estas células son altamente susceptibles y permisivas a la infección por diversos virus incluyendo a los *Flavivirus*, se ha demostrado la incapacidad de estas células para producir interferones de tipo I en respuesta a infecciones virales debido a una delección homóloga de los genes del interferón α y $\beta 1$ (aunque mantienen su capacidad de responder a los estímulos de estos interferones y entrar en un estado antiviral) lo que podría ser la causa de esta susceptibilidad. Esto convierte a esta línea celular en la herramienta de elección para el cultivo de virus (Chew, Noyce, Collins, Hancock, & Mossman, 2009; Naoki et al., 2014).

Estas células fueron cultivadas en el medio *Roswel Park Memorial Institute* (RPMI) suplementado con L-glutamina (1%), antibiótico y antimicótico (1%), suero fetal bovino (3%) y mantenidas en incubación a 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂. En estas condiciones las células presentan una forma poligonal y ligeramente alargada formando una monocapa adherida al fondo del frasco de cultivo.

6.2 Aislados de *Flavivirus*

Para este trabajo se utilizaron *Flavivirus* que fueron aislados por el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Arbovirus, a partir de muestras de suero de pacientes con diagnóstico clínico o serológico de infección por *Flavivirus*.

El primer grupo de muestras proceden de pacientes de la ciudad de Mérida, Yucatán en el año 2016 con diagnóstico clínico o serológico de infección por *Flavivirus* de las que se obtuvieron 4 aislados denominados: Yuc-47, Yuc-76, Yuc-96 y Yuc-100.

El segundo grupo de *Flavivirus* se aislaron en el 2016 a partir de muestras de pacientes con diagnóstico clínico o serológico de infección por *Flavivirus* residentes

del estado de Oaxaca y de estas se obtuvieron 2 aislados denominados: Oax-1 y Oax-2.

El proceso de aislamiento se realizó a través de pases ciegos en la línea celular Vero. Estos aislados fueron seleccionados debido a la observación de cambios morfológicos, aumento de lisis y muerte celular en los cultivos celulares aproximadamente 5 días después de la inoculación. Este conjunto de cambios en la estructura de la monocapa celular se denomina efecto citopático (CPE) y se considera un indicativo de la replicación viral en un cultivo celular (Cheng, Lau, Chan, Toh, & Chow, 2015).

6.3 Virus referencia

Se utilizaron aislados virales históricos y virus de referencia como controles positivos de las técnicas usadas. Se utilizó: el aislado de DENV 1 Western Pacific (GenBank AY145121.1), DENV 4 Dominica 1981 (GenBank AY648301.1) y el ZIKV Puerto Rico 2015 (GenBank KX377337.1), (Donados por el Dr. Stephen Whitehead, National Institutes of Health, Maryland, USA).

6.4 Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal comercial usado para la técnica de inmunofluorescencia es el denominado clona 4G2. Este anticuerpo reconoce un epítipo que consiste en 6 aminoácidos componentes del péptido fusogénico, una zona altamente conservada dentro del grupo de los *Flavivirus*, está localizado en el dominio II de la proteína de envoltura y es accesible en su conformación terciaria (Crill & Chang, 2004). Adicionalmente se utilizaron anticuerpos monoclonales contra la proteína de envoltura (mAb- α E), la proteína NS1 (mAb- α NS1) y NS3 (mAb- α NS3) producidos por hibridomas de ratón así como el anticuerpo monoclonal contra NS5 (mAb- α NS5) producido por hibridoma de rata, donados y desarrollados por el equipo de la Dra. Leticia Cedillo Barrón investigadora del Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN (García-Cordero et al., 2014, 2005; León-Juárez et al., 2013).

Anticuerpos Secundarios Se utilizaron 3 anticuerpos secundarios diferentes, todos estos están conjugados a fluorocromos del grupo Alexa Fluor (AF). Los dos primeros contienen el fluorocromo AF-488 conjugado con una IgG anti cadena pesada y cadena ligera de la inmunoglobulina, uno de rata y otro de ratón dependiendo del anticuerpo primario utilizado. Así mismo se usó un IgG conjugado con AF-546 contra las cadenas pesada y ligera de anticuerpos de ratón. Se evaluaron diferentes anticuerpos secundarios con el mismo primario con la intención de comparar el rendimiento de ambos fluorocromos.

6.5 Inmunocitoquímica para la determinación de Unidades Formadoras de Placa (PFU)

Todos los aislados y virus referencia usados en este proyecto fueron previamente titulados por inmunocitoquímica. Para esto, se cultivaron células Vero en placas de 24 pozos en medio RPMI suplementado al 3% de suero fetal bovino. Para la infección se tomó el sobrenadante de pases ciegos (en los que se observa efecto citopático) y se realizaron diluciones decimales desde la muestra concentrada hasta una dilución 10^{-5} , con estas diluciones se inocularon los pozos por duplicado dejando incubar durante 1 hora. Cada pozo se cubre con medio RPMI semisólido (para favorecer la formación de placas al evitar la dispersión de las partículas virales liberadas en todo el pozo) preparado con; metilcelulosa (1.5%), suero fetal bovino (1%) y antibiótico/antimicótico (1%). Se mantiene en incubación durante 4 días.

Posterior a este tiempo la monocapa de células se lava y se fija con metanol al 85%, Se realiza un bloqueo usando buffer de bloqueo (leche descremada 0.6% en PBS), se lava nuevamente y se incuba con el anticuerpo monoclonal comercial 4G2, después con un anticuerpo secundario anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP). Las placas se revelaron con el sustrato de peroxidasa precipitable 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno (*KLP TrueBlue Sera Care*). La precipitación de este reactivo genera placas coloreadas azules visibles que son contabilizadas manualmente, el conteo se realiza en los pozos correspondientes a la última dilución en la que se observa un número de entre 3 y 30 placas.

El resultado se expresa en escala logarítmica usando la fórmula

$$PFU = \text{Log}(x \text{ placas} \times 10^{\text{dilucion}+1})$$

Donde x es el promedio de placas visibles en los dos pozos infectados y dilución+1 hace referencia al valor de dilución en el que se realiza el conteo más una unidad para contemplar la primera dilución realizada y obtener el resultado por mL. El resultado se expresa como un exponencial de base 10.

6.6 Inmunofluorescencia Intracelular Indirecta

Se sembraron aproximadamente 100000 células Vero en placas de 24 pozos, que contenían un cubreobjetos de vidrio estéril en el fondo de cada pozo, en medio RPMI suplementado y se mantuvieron 24 h para permitir la adhesión de las células al cubreobjetos.

Cada pozo fue infectado a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 con cada virus utilizado y manteniendo un volumen de íntimo contacto entre las partículas virales y las células susceptibles. Este volumen se mantuvo durante 1 h y posteriormente se

completó el medio de cultivo para que las células se mantuvieran 24 horas más en incubación, pasado el tiempo se eliminó el medio de cultivo y se lava con PBS 1x para agregar *p*-Formaldehído al 4% como fijador durante 30 minutos. Se realizó otro lavado y se añadió una solución de suero bovino al 1% en PBS 1x, con la intención de saturar los receptores de Fc de la superficie celular que podrían interferir y originar falsos positivos.

Para la permeabilización de la membrana se utilizó una solución de permeabilización en PBS durante 30 min compuesta por el detergente Tritón (0.1%), un detergente suave que genera poros en la membrana celular sin comprometer la integridad de ésta, y gelatina (0.2%) que se intercala en los poros formados dándoles estabilidad y manteniéndolos abiertos. Los anticuerpos se diluyeron en la solución de permeabilización y se mantuvieron en contacto con la monocapa de células durante 1 hora y se lavó por duplicado con PBS para poder añadir el anticuerpo conjugado (que se diluyó en solución permeabilizadora) y se incubaron las células en oscuridad durante 1 hora.

El cubreobjetos con la monocapa celular se sacó del pozo y se colocó boca abajo sobre un portaobjetos que contiene una gota de medio de montaje y colorante de contraste DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) un colorante altamente afín a la adenina y timina que aumenta exponencialmente su fluorescencia al ser excitado con radiación ultravioleta resultando en emisión de luz en una longitud de onda máxima de 461nm (azul).

Las muestras fueron analizadas y fotografiadas en un microscopio de epifluorescencia Axio Vert A1 (Zeiss) y en un microscopio confocal TCS SP8 (Leica).

6.7 Tipificación por RT-PCR

Cultivo de virus. Se utilizaron botellas de cultivo de 25 cm³ en las que se sembraron 1000000 de células Vero con medio RPMI suplementado, 24 horas después se infectaron a 1 MOI con los aislados y virus referencia y se mantuvieron en incubación durante 48-72 horas hasta ver efecto citopático en aproximadamente un 50% de la monocapa. Este efecto citopático corresponde con cualquier alteración morfológica en las células aunque principalmente se observa su desprendimiento de la monocapa.

Extracción de RNA. Se llevó a cabo mediante la técnica de extracción con el reactivo Trizol, agregando 1 mL del reactivo sobre la monocapa celular, esta mezcla se transfiere a un tubo de 1.5 mL y se le agregan 200 µL de cloroformo y se agitó, la mezcla se centrifugó y posteriormente fue separada la fase acuosa en donde se encuentra el RNA.

Esta fase acuosa separada se le agregó isopropanol para precipitar al RNA, se centrifugó para generar un pellet que es lavado posteriormente con etanol al 70%. Después del lavado el RNA fue resuspendido en agua libre de nucleasas y se cuantificó para determina la pureza y concentración con el equipo Nano Photometer NP80 (IMPLEN)

Síntesis de DNA complementario (cDNA). El RNA obtenido su utilizó para sintetizar una cadena de cDNA que tiene una mayor estabilidad y que es usado para las reacciones posteriores.

En un microtubo se agregó 4 µL de RNA de la muestra, 10.1 µL de agua libre de nucleasas, 0.6 µL de oligonucleótidos degenerados (hexámeros aleatorios) y 1 µL de mezcla de nucleósidos trifosfatados. Esta primera mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos para desnaturalizar las estructuras secundarias del RNA extraído y permitir la alineación de los hexámeros. Después de esta incubación inmediatamente se agregaron a los tubos 4 µL de buffer para retrotranscriptasa y 0.3 µL de enzima retrotranscriptasa recombinante de Leucemia Múrida de Maloney (RevertAid Thermofisher) y se colocó de nuevo en el termociclador con las condiciones enlistadas en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones para la Retrotranscripción.

Etapa	Temperatura	Tiempo
<i>1° Desnaturalización</i>	65°C	5 minutos
<i>2° Retrotranscripción</i>	25°C	10 minutos
	42°C	60 minutos
	70°C	10 minutos
<i>3° Mantenimiento</i>	4°C	

El cDNA producto de esta reacción se cuantificó, se determinó su pureza por espectrofotometría y se utilizó para la tipificación por PCR punto final.

Tipificación por PCR. El diseño de ambas técnicas se llevó a cabo usando secuencias completas de virus aislados de pacientes mexicanos disponibles en el GenBank. Se realizó un alineamiento múltiple de genomas virales de DENV1, DENV2 y DENV3 provenientes de aislados mexicanos y en el caso de DENV4 se utilizaron secuencias referencia de aislados de diferentes regiones del mundo ya que, a la fecha no se cuenta con algún aislado secuenciado de este serotipo. Las secuencias de ZIKV también fueron cepas aisladas de pacientes mexicanos. Los detalles de las secuencias se pueden consultar en el Anexo 1.

Para la preparación de las reacciones se utilizó el reactivo *GoTaq Green Master Mix* 2X (Promega), agua, los oligonucleótidos diseñados y un volumen de cDNA necesario para agregar a la reacción 900 ng, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Preparación de las reacciones de PCR.

Reactivo	Cantidad	Concentración
Agua*	0.4 - 4.1 µL	NA
<i>Primer F</i>	0.3 µL	10 nM
<i>Primer R</i>	0.3 µL	10 nM
cDNA muestra	900 ng	NA
<i>GoTaq Green Master Mix</i>	5 µL	2x
<i>total</i>	10 µL	

6.7.1 PCR anidada

Se diseñaron oligonucleótidos que amplifican una zona conservada del genoma viral entre los 4 serotipos de DENV, de aproximadamente 841 bases, correspondiente a la secuencia que codifica la proteína C y una pequeña porción de la que codifica para el péptido *pr*. En los nucleótidos donde no existe homología, se utilizaron nucleótidos degenerados. Este diseño está basado en el realizado por Lanciotti y colaboradores (1992) pero usando secuencias actualizadas y de variantes circulantes en México (Lanciotti, Calisher, Gubler, Chang, & Vorndam, 1992).

Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos usados para detección de DENV.

Identificación	Secuencia de nucleótidos	Posición y región genómica	Tamaño	T°m*
dDENV-F	ATATGCTGAAACGCGHGA	Aprox.120-961 Proteína C, pr/M	841 b	61°C
dDENV-R	CCTTCHACRAARTCTCTRTT			61°C

*Reportada por el fabricante

Código IUPAC para nucleótidos degenerados: H= A, C, T R= A, G

Además de este par de oligonucleótidos se diseñaron 4 más, cada uno de estos funciona como un oligonucleótido anti-sentido específico para cada serotipo del DENV y el dDENV-F funciona como oligonucleótido sentido general para los 4. Este diseño contempla una primera reacción de identificación de DENV y una segunda reacción para la tipificación del serotipo del virus aislado.

Tabla 8. Secuencia de los oligonucleótidos serotipo específicos para DENV.

Identificación	Secuencia de nucleótidos	Posición y región genómica	Tamaño	T ^o m
DMex1-R	AACGTTTGTCTCGTCGGT	127-703 Proteína C, pr/M	576 b	61°C
DMex2-R	GTTGGTGGGATTGTTAGGAAA	126-271 Proteína C	145 b	61°C
DMex3-R	TGAAGTCAAGTGGAAAGCAAG	113-430 Proteína C	317 b	61°C
DMex4-R	GTATCCAGCTTTCCACTCTCT	139-823 Proteína C, pr/M	684 b	61°C

En este proyecto se variaron las temperaturas de alineamiento (T_A) de los oligonucleótidos para encontrar la óptima, partiendo de la temperatura de fusión (T_m) teórica reportada por el fabricante, usando un gradiente de temperatura para la T_A como se detalla en la Figura 23.

Tabla 9. Condiciones de temperatura y tiempo usados en la PCR anidada

Ciclos	Etapas	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95 °C	5 min
35	Desnaturalización	95°C	20 seg
	Alineamiento	61° ±1°	20 seg
	Amplificación	68°C	30 seg
1	Amplificación final	68°C	7 min
1	Mantenimiento	4°C	

6.7.2 PCR multiplex

Para este diseño se generaron un par de oligonucleótidos por cada virus que se pretende identificar usando las secuencias de virus circulantes en México usadas para el diseño de la PCR anidada, resultando en 5 pares de oligonucleótidos que detectan los cuatro serotipos de DENV y al ZIKV.

Los oligonucleótidos se planean para amplificar zonas con homología característica para cada serotipo y en regiones distintas del genoma en cada serotipo lo que aumenta su especificidad, además el diseño contempla el uso de este grupo de oligonucleótidos en conjunto por lo que sus secuencias deben tener baja complementariedad entre ellas para evitar amplificaciones inespecíficas o formación de heterodímeros.

Tabla 10. Características de los oligonucleótidos del diseño multiplex.

Identificación	Secuencia de nucleótidos	T°m	Posición y región genómica	Tamaño
mZK-F	GACCCTAATAGTGGCCATCA	61°C	7235-8520 NS4B hasta NS5	1286 b
mZK-R	TCCTTTCAATGCGGTTACCA	61°C		
mDENV1-F	AAGATCCGTGACCATGCTT	61°C	384-3656 Proteína C, pr/M, E y parte de NS1	3273 b
mDENV1-R	TTAGCTCCAACCATGATGCA	61°C		
mDENV2-F	GCTATTTTCGTGTGTCCCAA	61°C	3918-7674 NS2A-B, NS3 y NS4A-B	3757 b
mDENV2-R	TTCTATCCACTTCCTGGATTCC	61°C		
mDENV3-F	GCAGCTATGGGAGTTCAAC	61°C	4037-6688 NS2A-B, NS3 y NS4A	2652 b
mDENV3-R	AAACTCCAGGACTATAGCCG	61°C		
mDENV4-F	GGAGGAGTTGTGACATGTG	61°C	1270-4359 Proteína E, NS1 y NS2A-B	3090 b
mDENV4-R	TTCTATGATTGGGCTTGAGC	61°C		

Las condiciones para las reacciones multiplex se establecieron basándose en los resultados de la PCR anidada, quedando como se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de temperatura y tiempo para la reacción de PCR multiplex

Ciclos	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95 °C	5 min
35	Desnaturalización	95°C	20 seg
	Alineamiento	52° (variable)	20 seg
	Amplificación	72°C	3 min
1	Amplificación final	72°C	5 min
1	Mantenimiento	4°C	

6.8 Electroforesis

Los productos de las reacciones de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, se cargaron los pozos con 9 µL del producto de reacción y se aplicó una corriente de 55 V durante 45 min y se aumentó a 75 por 15 min más.

Los geles se revelaron con 1 µL de Bromuro de Etidio durante 10 min, y se fotodocumentaron por transiluminación con luz ultravioleta en un equipo GelDoc EZ Documentation System (Bio-Rad).

7. Resultados

7.1 Inmunofluorescencia como estrategia de tamizaje para la identificación de *Flavivirus*

7.1.1 Inmunofluorescencia usando el anticuerpo 4G2

Para determinar la capacidad y utilidad del anticuerpo monoclonal 4G2 en esta técnica, se evaluó simultáneamente con dos anticuerpos secundarios marcados con los fluorocromos AF-488 y AF-546, utilizando variaciones en las concentraciones partiendo de las recomendadas por el fabricante y por las utilizadas en otras técnicas ya estandarizadas en nuestro laboratorio (Tabla 12).

Para cada uno de los experimentos realizados se incluyeron controles

- Positivos. Células infectadas con virus de referencia en los que se aplican anticuerpo primario y secundario para establecer la capacidad de la técnica para identificar *Flavivirus*.
- Negativos. Células infectadas con virus de referencia y que siguen el procedimiento exceptuando la adición del anticuerpo primario para establecer la especificidad del Ab secundario. Y también células sin infectar a las que se somete al proceso completo para observar la señal de fondo del procedimiento.

Tabla 12. Concentraciones y combinaciones de los anticuerpos usados en la prueba con 4G2. También se muestran los resultados obtenidos de los controles y de las muestras usadas.

Virus utilizado	Concentración del mAb 4G2	Concentración del Ab secundario		Resultados
		AF-546	AF-488	
Sin infección	1:500	4µg/ml*	1µg/ml*	negativo
DENV 1 WP	No añadido	4µg/ml*	1µg/ml*	negativo
	1:500	4µg/ml*	1µg/ml*	positivo
	1:500	2µg/ml	0.5µg/ml	positivo
	1:1000 ⁺	2µg/ml	0.25µg/ml	positivo
	1:1200	2µg/ml	0.25µg/ml	positivo

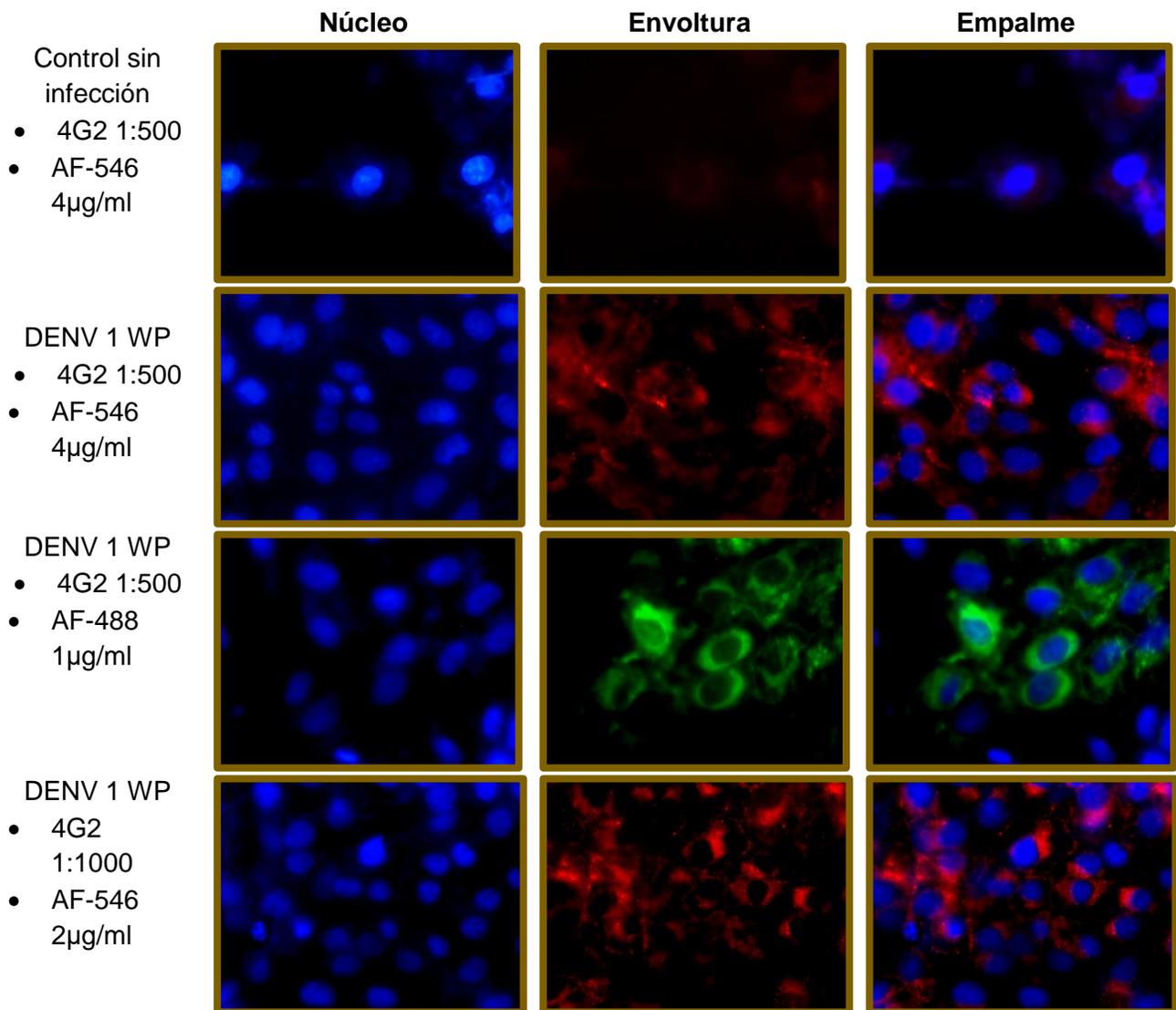
* Concentración recomendada por el fabricante

⁺Concentración utilizada en la técnica de Inmunocitoquímica

El control negativo sin infección (primer cuadro de la Figura 19) permite observar la fluorescencia producida por uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios, la baja fluorescencia observada con AF-488 y AF-546 en los controles negativos

nos permitió descartar estas uniones inespecíficas como fuentes de error en las demás preparaciones.

Como se observa en la Figura 19 la fluorescencia apreciada en las muestras fue clara y pudimos comprobar la capacidad y especificidad de los anticuerpos usados, tanto el 4G2 como marcador de la proteína de envoltura flaviviral como de los anticuerpos secundarios para reconocer a este anticuerpo primario. Además, al no observar diferencias en cuanto a la intensidad de fluorescencia entre las concentraciones recomendadas y las concentraciones más diluidas que se probaron, se pudieron establecer las concentraciones: 1:1000 de 4G2, 2µg/ml de AF-456 y 0. 25µg/ml de AF-488 como concentraciones óptimas para las tinciones.



DENV 1 WP

- 4G2
1:1000
- AF-488
0.25µg/ml

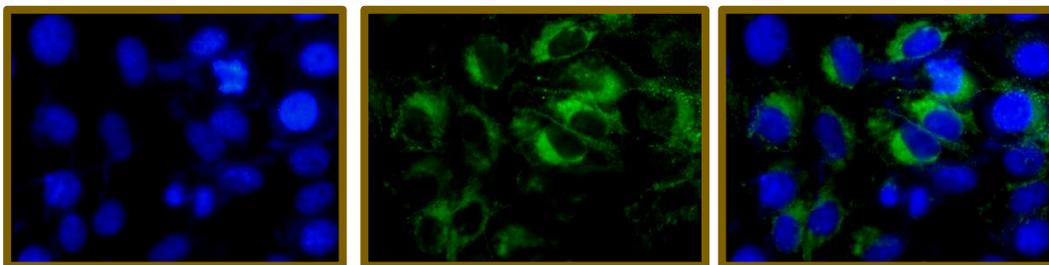


Figura 19. Imágenes por microscopía de epifluorescencia utilizando el anticuerpo 4G2 en células infectadas con DENV 1 WP. Este cuadro muestra una parte representativa de los resultados obtenidos usando el anticuerpo 4G2. El control negativo muestra pequeñas regiones con fluorescencia pero siempre fueron considerablemente bajas, en todas las preparaciones positivas hubo fluorescencia claramente visible observándose en color rojo para el AF-546 y color verde para AF-488, al contrastar esta fluorescencia con la del núcleo (en el empalme) se puede ver una distribución de la fluorescencia en las zonas cercanas al núcleo. A simple vista no existieron diferencias significativas con la variación de las concentraciones.

7.1.2 Inmunofluorescencia indirecta usando los anticuerpos producidos en hibridomas

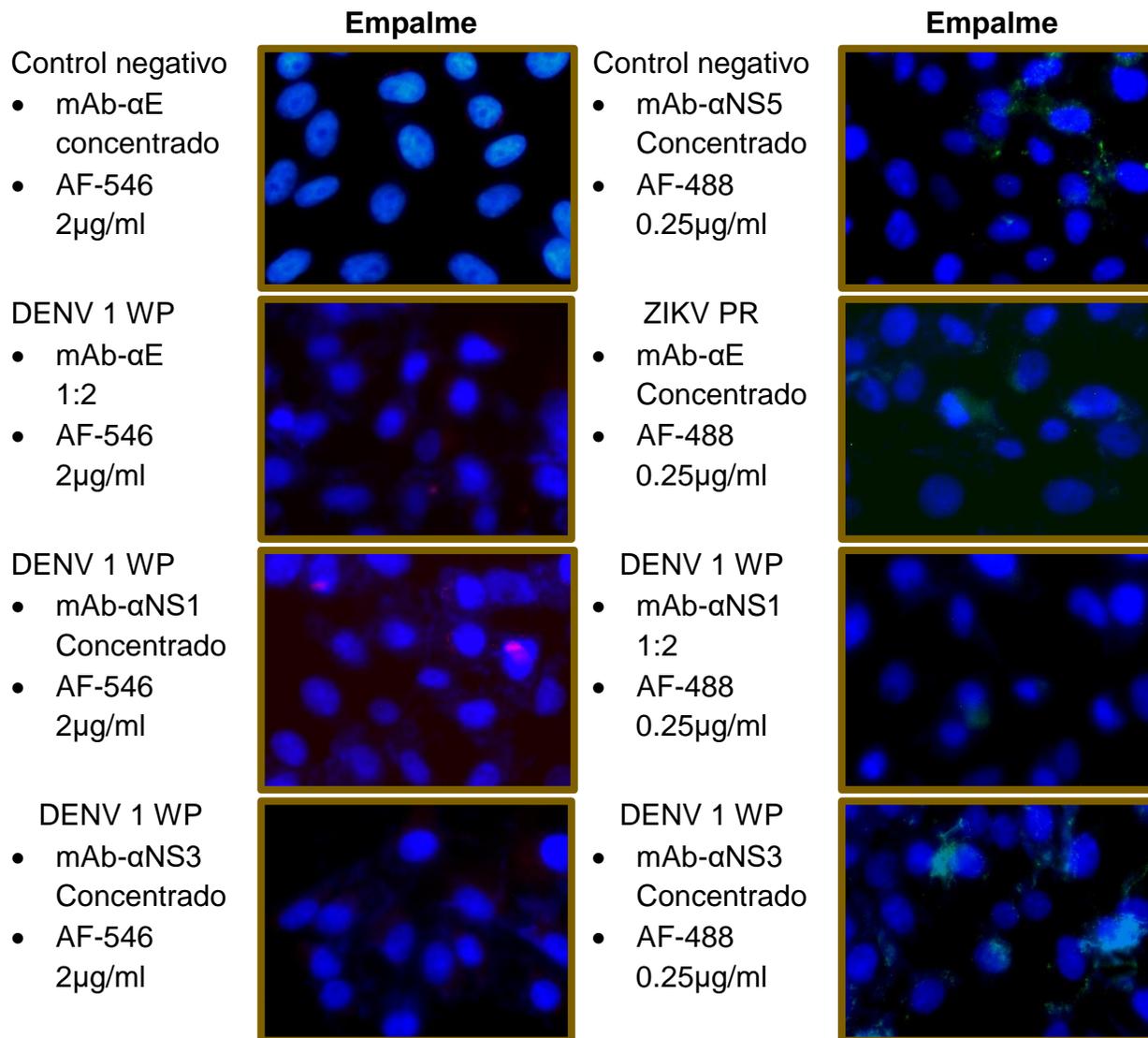
Usando los mismos anticuerpos secundarios se probaron estos anticuerpos provenientes de hibridomas, al no conocer las concentraciones de estos anticuerpos se decidió utilizar directamente el sobrenadante y diluciones 1:2 y 1:5 como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Concentraciones y combinaciones de los anticuerpos usadas para probar los anticuerpos de hibridomas.

Virus	Anticuerpo 1° usado	Dilución del Ab 1°	Concentración del Ab secundario		Resultados
			AF-546	AF-488	
Sin infección	mAb-αE, αNS1, αNS3 αNS5.	1:2	2µg/ml	0.25µg/ml	Negativo
DENV 1 WP	mAb-αE	Concentrado, 1:2, 1:5	2µg/ml	0.25µg/ml	Negativo
ZIKV PR		Concentrado, 1:2, 1:5			
DENV 1 WP	mAb-αNS1	Concentrado, 1:2	2µg/ml	0.25µg/ml	Negativo
DENV 1 WP	mAb-αNS3	Concentrado, 1:5	2µg/ml	0.25µg/ml	Negativo
DENV 1 WP	mAb-αNS5*	Concentrado, 1:2, 1:5		0.25µg/ml*	Positivo
ZIKV PR					

* Este Ab esta producido en hibridoma proveniente de una rata, por lo que el Ab secundario es producido contra IgG de rata pero conjugado igualmente con el fluorocromo AF-488 por lo que se usó la misma concentración.

Las imágenes en la Figura 20 muestran una baja capacidad de los anticuerpos contra: E, NS1 y NS3 para reconocer proteínas del DENV 1 WP y ZIKV PR, únicamente el mAb- α NS5 muestra resultados positivos al reconocer proteínas tanto del DENV 1 WP como del ZIKV PR. Este anticuerpo se usó entonces para realizar un experimento de doble tinción (Figura 21), en el que se detecta la proteína E (usando el anticuerpo 4G2) y la proteína NS5 de los *Flavivirus*, usando las concentraciones que se han definido como óptimas. Este experimento nos permitió ver la colocalización de las proteínas virales en células infectadas.



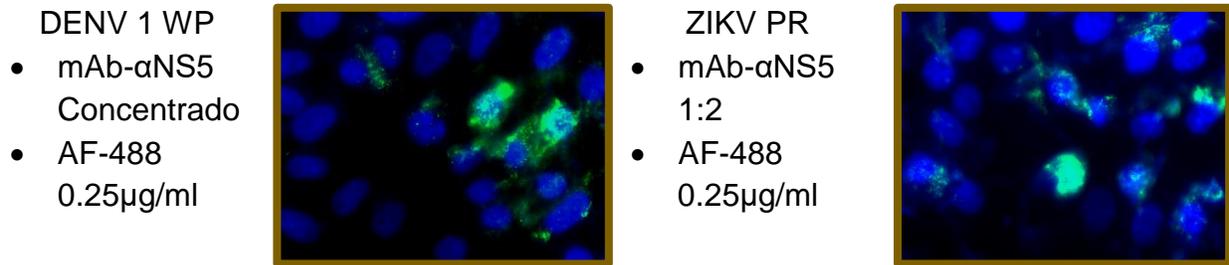


Figura 20. Imágenes por microscopía de epifluorescencia de los empalmes usando anticuerpos producidos en hibridomas. Se muestran en los dos primeros cuadros los controles negativos para poder compararlos con los resultados usando los anticuerpos contra proteínas recombinantes, la fluorescencia que se observó fue muy baja y en todos los casos no pudo diferenciarse visualmente de los controles negativos. El anticuerpo contra la proteína NS5 fue el único que mostro fluorescencia visualmente detectable y a diferencia del 4G2 las zonas predominantes de esta fluorescencia tuvieron una tendencia a estar sobre el núcleo.

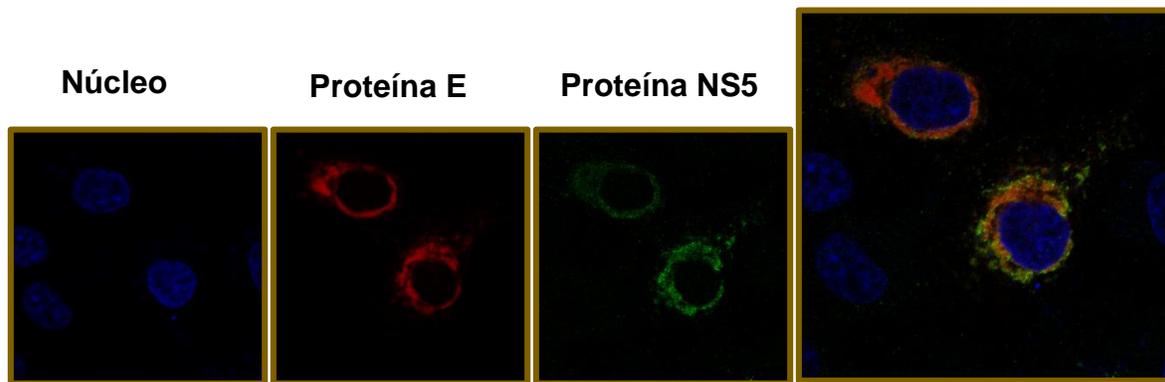


Figura 21. Fotografías por microscopía confocal de una tinción doble para detectar la proteína de envoltura y la polimerasa de los *Flavivirus*. Células infectadas con DENV1 WP, usando como anticuerpos 1°: 4G2 1:100 y mAb- α NS5 concentrado y como anticuerpos 2°: mAb- α IgG de ratón AF-546 y mAb- α IgG de rata AF-488. El campo muestra dos células con fluorescencia de ambos fluorocromos y se observa una localización muy similar de esta fluorescencia.

7.1.3 Inmunofluorescencia como método de detección de proteínas flavivirales en los aislados virales

Una vez confirmada la capacidad de detección por inmunofluorescencia de *Flavivirus* referencia, se procedió a la validación de la estrategia como método de detección de aislados mexicanos obtenidos de muestras de suero de pacientes con diagnóstico clínico o serológico de infección con DENV o ZIKV y que forman parte del Banco de Aislados de *Flavivirus* Mexicanos de la UBIMED, FES Iztacala.

Se realizó la infección a la misma multiplicidad de infección en células Vero como se describió anteriormente. Se utilizaron los aislados del estado de Yucatán: Yuc-

47, Yuc-76, Yuc-96 y Yuc-100. Estos aislados muestran efecto citopático en la monocapa de células vero aproximadamente a los 4 días de infección (el aislado Yuc-100 presenta efectos citopáticos un poco antes desde el día 3), además los aislados Yuc-47 y Yuc-96 ya habían sido sometidos previamente a una técnica de inmunofluorescencia en la que se determinó que pertenecen al género *Flavivirus*, la tipificación de estos mismos aislados no dio resultados concluyentes sobre su especie.

En los aislados del estado de Oaxaca: Oax-1 y Oax-2 también se observa efecto citopático a los 4 días de infección y éstos fueron previamente identificados en este laboratorio como DENV y ZIKV respectivamente usando el diseño de PCR de Lanciotti y colaboradores (Lanciotti et al., 1992).

Durante la revisión al microscopio de las preparaciones infectadas con los aislados virales se observó una mayor cantidad de células infectadas en la mayoría de los campos revisados en la preparación del aislado Yuc-100, en comparación con las otras preparaciones (como se nota en el recuadro inferior izquierdo de la Figura 22), lo que parece consistente con el desarrollo de efecto citopático en las células infectadas antes que los demás aislados.

Con las fotografías de la Figura 22 se pudo establecer que todos los aislados probados durante el proyecto pertenecen al género *Flavivirus* y que las condiciones de la inmunofluorescencia funcionan adecuadamente para su detección confirmando las observaciones previas en los aislados: Yuc-47, Yuc-96, Oax-1 y Oax-2 y ahora estableciendo los aislados Yuc-76 y Yuc-100 como *Flavivirus*.

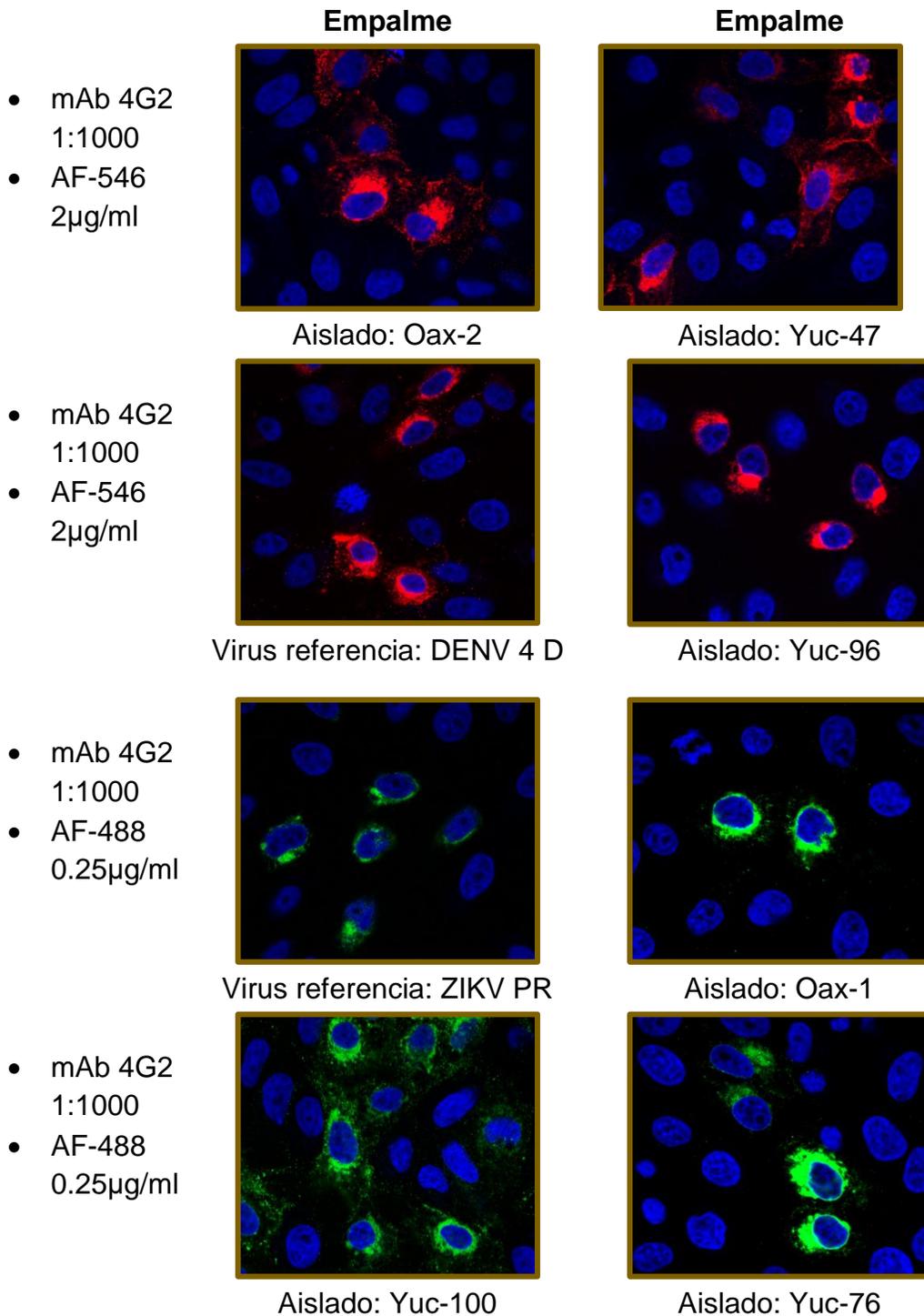


Figura 22. Fotografías por microscopía confocal de la inmunofluorescencia de células infectadas con los aislados virales y virus de referencia. Todas las células infectadas con los aislados virales presentaron fluorescencia visible muy cercana a la región del núcleo celular, también se realizó una infección con DENV 4 D que no se había probado hasta ese momento.

7.2 Tipificación

7.2.1 PCR anidada

Después de confirmar que los aislados virales pertenecen al género *Flavivirus*, se realizaron los experimentos de RT-PCR con la intención de definir su especie y tipificarlos.

Durante los ensayos de tipificación se utilizó como control constitutivo un par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 264 bases correspondiente al gen de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La amplificación de este gen sirve como un control positivo de todo el proceso desde la extracción, la retrotranscripción y el funcionamiento de la Taq polimerasa durante la PCR.

Se usaron los oligonucleótidos del diseño de PCR anidada para detectar al virus DENV (detallados en la Tabla 7) utilizando como controles positivos cDNA de los virus referencia DENV 1 WP y DENV 4 Dominica 89, con un tamaño de amplicón esperado de 841pb, como control negativo se incluyó cDNA del virus referencia ZIKV PR y finalmente el cDNA de los aislados mexicanos. Se utilizó el programa de amplificación que se muestra en la Tabla 8 usando una $T^{\circ}m = 61^{\circ}C$.

En los dos primeros ensayos usando los oligonucleótidos del diseño de PCR anidada no se logró observar ninguna banda de amplificación como se nota en la Figura 23, pero si se obtuvieron bandas de un tamaño menor a 300 bases que corresponden a la amplificación del gen GAPDH. Esto indicó que durante el proceso de extracción como en el de retrotranscripción se mantuvo la integridad de la secuencia, por lo tanto, las modificaciones que realizamos para el siguiente ensayo fueron dirigidas a la T_A de los oligonucleótidos.

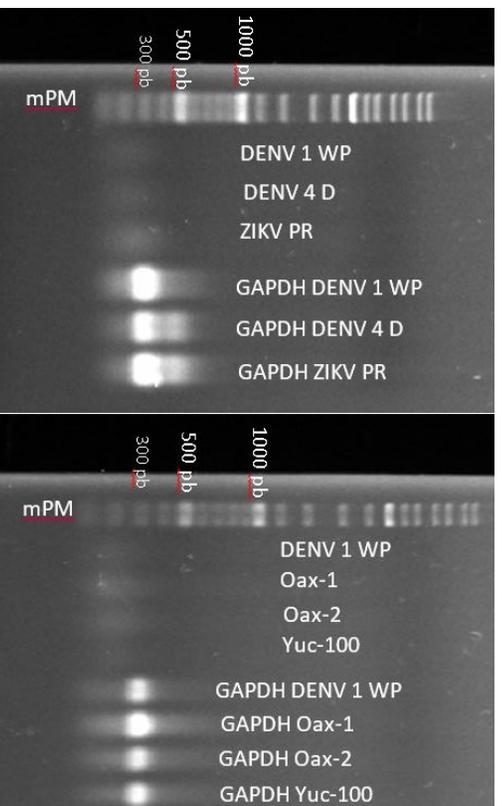


Figura 23. Resultados de las reacciones de PCR anidada. No se logra observar ninguna banda de amplificación en las reacciones usando los oligonucleótidos de la PCR anidada. Se identificaron los amplicones de aproximadamente 264b que evidencian la presencia del gen GAPDH.

7.2.1.1 PCR anidada con gradiente de temperatura

Ya que la temperatura de alineamiento es un parámetro importante en la eficiencia de las reacciones de PCR se realizó una prueba con diferentes temperaturas para intentar definir la T_a experimental de los oligonucleótidos del diseño PCR anidada. Para esto se usó cDNA del virus DENV1 WP y 6 temperaturas diferentes entre 45° a 56°C (Figura 24) en las mismas condiciones de amplificación que el ensayo anterior.

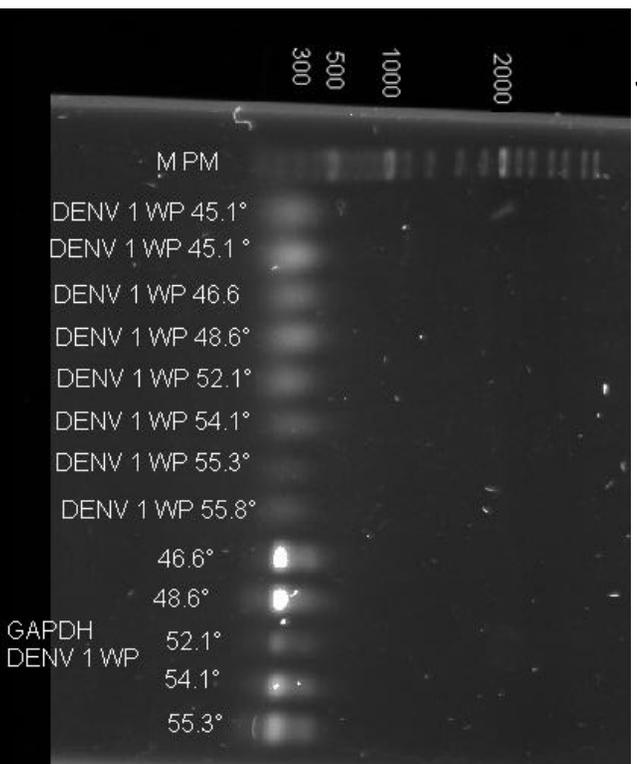


Figura 24. Gradiente de temperatura para los oligonucleótidos de la PCR anidada. No se observan patrones de amplificación más que en los controles de GAPDH con variaciones en la intensidad de la banda dependiendo de las temperaturas de alineamiento utilizadas.

Se realizaron más pruebas usando estos oligonucleótidos con variaciones en la temperatura desde 45° hasta los 61°C que reporta el fabricante como T_m teórica pero no ninguna se obtuvo una amplificación por lo que se inició el ensayo con el diseño de PCR multiplex.

7.2.2 PCR multiplex

Durante los primeros experimentos con este diseño los oligonucleótidos se probaron por separado, usando virus de referencia.

La forma en que se probaron fue: Usando oligonucleótidos para DENV1 (Figura 25a), con oligonucleótidos para DENV 4 (Figura 25b) y con oligonucleótidos para ZIKV (Figura 25c). En cada una de estas pruebas se utilizó cDNA de los 3 virus de referencia de los que se dispone para que funcionen como controles negativos y positivos del experimento. Se esperan bandas de amplificación de alrededor de 3000 bases como se muestra en la Tabla 10 y las condiciones a las que se realizaron las reacciones son las mostradas en la Tabla 11.

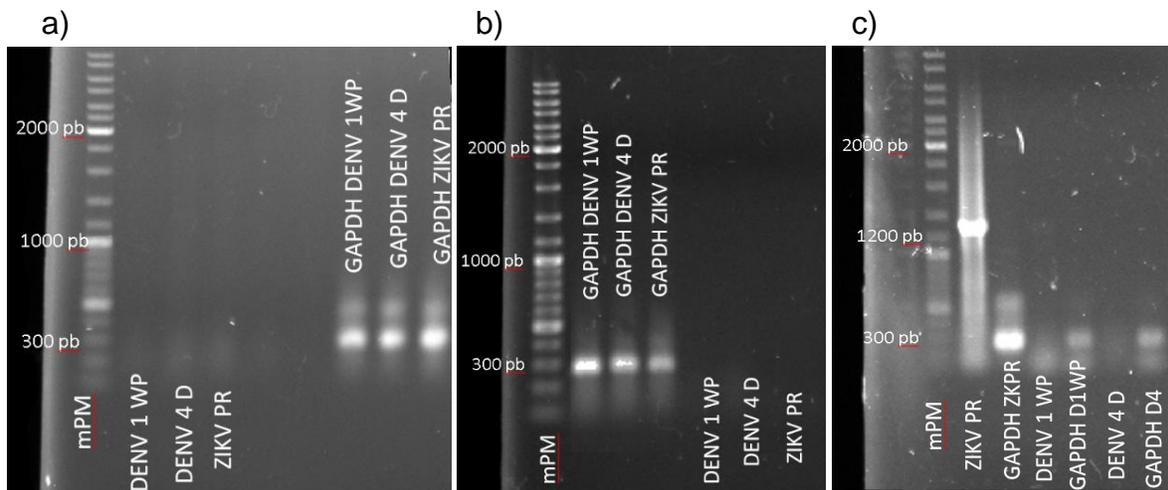


Figura 25. Patrones de amplificación usando los oligonucleótidos de la PCR multiplex por separado. Los resultados de los experimentos a) y b) son negativos pues se esperaba una banda de amplificación de alrededor de 3000b para DENV 4 y de alrededor de 3200b para DENV 1, mientras que los oligonucleótidos diseñados para detectar ZIKV generaron una banda por encima de la marca de 1200b, que concuerda con lo esperado de 1286b lo que nos indica un resultado positivo.

Los resultados con el diseño multiplex presentaron características parecidas a la del diseño PCR anidada en el que la amplificación del gen constitutivo era positiva pero no se observaba ningún amplicón en las muestras, para descartar que este problema estuviera relacionado con el proceso de extracción de RNA se utilizó el kit comercial *Axyprep body fluid viral DNA/RNA Miniprep* de la marca Axygen. El RNA obtenido nos dio valores de pureza mayores a los obtenidos con la extracción con TRIzol pero los resultados de la PCR se mantuvieron negativos.

Con el resultado positivo en la detección de ZIKV (Figura 25c) se probaron por separado los oligonucleótidos para ZIKV usando los aislados virales a las mismas condiciones en las que se obtuvo amplificación para el ZIKV PR.

Los resultados del aislado Oax 2 concuerdan con resultados previos en los que se le tipificó como ZIKV, en el caso del aislado Yuc-100 este resultado positivo se observa en varios experimentos. Como se puede ver en la Figura 26 los aislados Oax 2 y Yuc-100 muestran resultados positivos en comparación con los aislados Yuc-76 y Yuc-96.

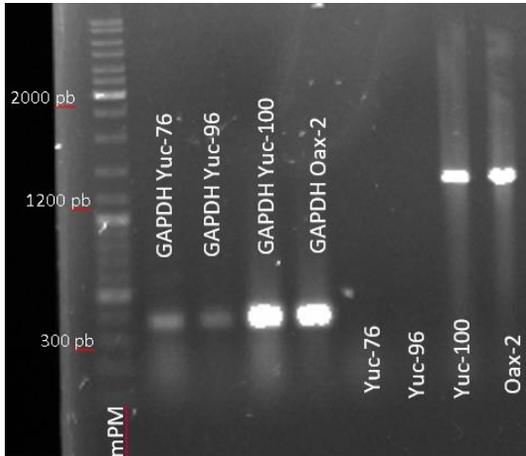


Figura 26. Patrones de amplificación de los virus aislados de Yucatán y Oaxaca usando los oligonucleótidos específicos para ZIKV. El aislado Oax-2 y el Yuc-100 muestran una banda de amplificación que concuerda con las 1286b esperadas, estos resultados fueron positivos y reiterativos para ambos en la tipificación como virus ZIKV.

Finalmente se probó el diseño de PCR multiplex usando la mezcla de oligonucleótidos y todos los aislados virales y virus de referencia de los que se disponen, con la intención de comprobar su compatibilidad y si existen amplificaciones inespecíficas.

Esta mezcla de oligonucleótidos mostró resultados positivos únicamente para ZIKV (ZIKV PR, Yuc-100 y Oax-2) consistentes con las pruebas de los oligonucleótidos por separado y como se ve en la Figura 27 obtuvimos un patrón de bandas en las muestras de los demás aislados, este patrón es muy parecido entre las muestras y presenta bandas de diferentes intensidades (aunque poco definidas) que incluyen tamaños de alrededor de: 400, 500, 1200 y 1400pb siendo las que se aprecian mejor y más comúnmente, estos resultados se repitieron siempre que se utilizó la mezcla de oligonucleótidos del diseño PCR multiplex.

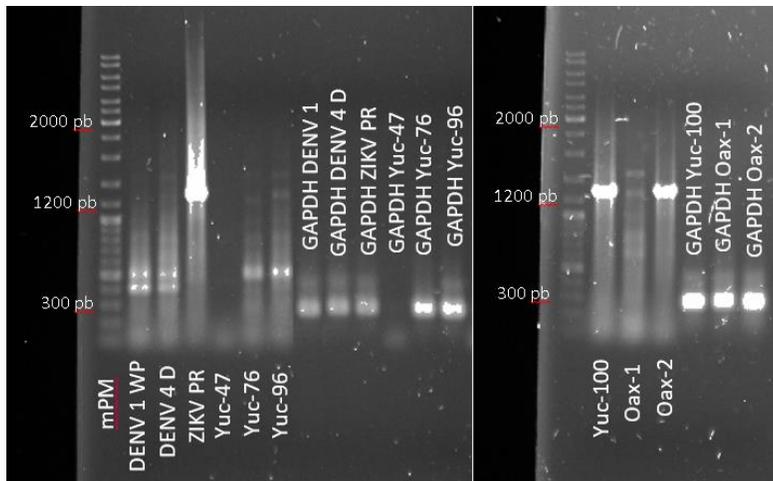


Figura 27. Patrones de amplificación resultantes de las reacciones con la mezcla de oligonucleótidos del diseño PCR multiplex. Las bandas correspondientes a ZIKV se presentan a la altura de 1286b como se espera. La mezcla de primers cuando el virus utilizado no es Zika genera un patrón de varias bandas de distintos tamaños y es un patrón que se repite en todas las muestras.

8. Discusión

Las enfermedades producidas por los virus DENV y ZIKV son enfermedades transmitidas por mosquitos que en años recientes han tomado una gran importancia en la salud pública mundial. Existen estimaciones de que aproximadamente el 50% de la población mundial está en riesgo de infectarse con el virus DENV (OPS & OMS, 2019).

Esta alta tasa de riesgo aumenta la importancia del estudio a profundidad de los virus que causan estas enfermedades, ya que los métodos de diagnóstico deben irse actualizando constantemente a medida que se reportan las variantes circulantes. Además, en el caso del DENV, se sabe que la co-circulación de los serotipos en una misma región geográfica mantiene una relación con el aumento de la severidad de los casos (Bhatt et al., 2013), por lo que mantener una vigilancia de las variantes circulantes y sus serotipos puede permitir el desarrollo de estrategias de acción en casos de brotes epidémicos.

Otra de las razones importantes para el estudio de estos virus es su capacidad de adaptarse, con cambios paulatinos que mejoran sus posibilidades de replicación y adquisición de factores de virulencia como la capacidad de evasión de la respuesta inmunitaria o citotoxicidad que en conjunto conforman la respuesta de estos organismos a las presiones de selección a las que son sometidos. Estos cambios podrían originar variantes más virulentas o con mayor capacidad de transmisibilidad para la población.

Este trabajo se enfoca en el desarrollo de un protocolo para confirmar, por técnicas inmunológicas y moleculares, el éxito en el aislamiento de virus provenientes de muestras de pacientes con sospecha de infección por *Flavivirus*. Pues este aislamiento sería el primer paso para el estudio del virus.

La estandarización de la inmunofluorescencia intracelular indirecta usando el anticuerpo comercial 4G2 puede facilitar en posteriores trabajos la toma de decisiones sobre un posible aislamiento viral, pues un resultado positivo en esta técnica (claramente visible como se muestra en los resultados de los aislados virales en la Figura 22) indicaría la presencia de un *Flavivirus* y facilitaría el proceso de aislamiento por pases ciegos además de que representa poco tiempo de inversión.

En los experimentos donde se utilizaron los anticuerpos donados por la Dra. Leticia Cedillo Barrón, no logramos ver señal positiva por inmunofluorescencia (Figura 20). Esto puede deberse a que fueron generados a partir de proteínas recombinantes procedentes de un aislado de DENV 2 y los virus con los que se probaron en el presente proyecto pertenecen a los serotipos 1 y 4. En el artículo sobre el diseño del anticuerpo NS3 los investigadores reportan un número bajo de anticuerpos

producidos por el ratón inoculado con la proteína recombinante NS3 y explican que esto pudo deberse a que esta proteína, expresada en *E. coli*, solo contiene una parte de la secuencia completa que codifica para la proteína NS3, pero finalmente con un anticuerpo monoclonal demuestran la capacidad de este para detectar la proteína NS3 en su conformación nativa (García-Cordero et al., 2005), aunque no prueban la reactividad cruzada con otros serotipos por lo que existe la posibilidad de que estos anticuerpos reconozcan epítomos conservados del serotipo 2 sin reactividad cruzada interserotipo.

El grupo que generó y caracterizó el anticuerpo usado reportó, en el artículo que describe el diseño del anticuerpo monoclonal αE , que éste reconoce un epítomo ubicado en el dominio II de la proteína E que se encuentra conservado entre los 4 serotipos del DENV y en ensayos de inmunofluorescencia demostraron su capacidad para reconocer los 4 serotipos del DENV (León-Juárez et al., 2013). Los resultados con este anticuerpo era una fluorescencia visible pero muy tenue. Antes de usar este anticuerpo no realizamos ningún ensayo para determinar su concentración en el sobrenadante por lo que creemos que la concentración de éste fue muy baja y por lo tanto no fue suficiente para utilizarlo en esta técnica.

En el caso de los resultados positivos usando el Ab $\alpha NS5$ se pueden atribuir a que esta proteína, al ser la polimerasa viral, está codificada por la región genómica más conservada dentro del género de los *Flavivirus* (Barrows et al., 2018) por lo que las probabilidades de que el epítomo que reconoce este anticuerpo sea un epítomo conservado entre los serotipos es muy alta y por lo tanto genere resultados positivos para DENV 1 WP y ZIKV.

La combinación del anticuerpo 4G2 con el anticuerpo producido en hibridoma de rata $\alpha NS5$ mostró un adecuado funcionamiento y la presencia de ambas proteínas en la misma región celular periférica al núcleo (Figura 21) sugiere zonas de acumulación de la actividad replicativa del virus en el retículo endoplásmico, lo que concuerda con diversas referencias que han reportado la formación del complejo replicativo característico de los *Flavivirus* en compartimientos membranosos inducidos por las proteínas no estructurales en el lumen de este organelo (Neufeldt et al., 2018; Uchil & Satchidanandam, 2003; Yi, Yuan, Rice, & MacDonald, 2012).

El proceso de tipificación con el diseño de PCR anidada no generó ningún resultado positivo, el funcionamiento de los controles de GAPDH sugieren que el problema no está en el proceso de extracción de RNA o en la retrotranscripción (aunque no puede descartarse) por lo que se realizó un análisis bioinformático de los oligonucleótidos para buscar una explicación.

Se realizaron alineamientos contra la base de datos del GenBank usando la aplicación BLAST para los oligonucleótidos del diseño PCR anidada incluyendo en los alineamientos los nucleótidos degenerados. Los resultados para el oligonucleótido sentido muestran alineamientos completos con secuencias de DENV de los serotipos 1 y 2 principalmente, en el caso del oligonucleótido antisentido los alineamientos son completos pero la mayor parte de los resultados corresponden a secuencias de DENV 3. Esto abre la posibilidad de que estos oligonucleótidos no sean tan específicos al detectar todos los serotipos del DENV y que al no haber usado virus de referencia correspondientes al DENV 3 y DENV 2 nuestros resultados hayan sido negativos. Los resultados del análisis con BLAST pueden verse en el anexo 2.

En cuanto a la tipificación del DENV por PCR multiplex ésta generó problemas parecidos al diseño PCR anidada, pues no se conseguían resultados positivos cuando se usaban los oligonucleótidos para DENV. Los pares de oligonucleótidos se sometieron al mismo proceso de análisis bioinformático con la herramienta BLAST para identificar algún error, pero no se encontró ningún dato que sugiriera una baja especificidad de estos por los virus que detectan, por lo que la posible explicación a estos resultados se encuentre en la abundancia y disponibilidad del RNA viral al momento de la extracción.

Con esta falta de amplificación con los oligonucleótidos para DENV en ambos diseños se realizó una revisión de posibles fallas en el procedimiento. La primera revisión fue sobre el diseño de los oligonucleótidos, pues se sabe que las altas concentraciones de los oligonucleótidos favorecen las interacciones entre estos y pueden dar origen por complementariedad a homo y heterodímeros que afectan el rendimiento y la especificidad de la reacción (Brownie et al., 1997). Por lo tanto, todos los oligonucleótidos fueron analizados por separado y también en su interacción con los demás oligonucleótidos usando el programa Oligoanalyzer 3.0 pero tanto la formación de estructuras secundarias en los oligonucleótidos como la interacción entre éstos en forma de dímeros presentan una baja estabilidad por lo que a las temperaturas de alineamiento que se usaron no representan una interferencia en el alineamiento con la secuencia blanco.

Siguiendo con este análisis se revisa el diseño de los oligonucleótidos usando las recomendaciones de Nitsche (2009) que define algunas normas básicas en el diseño de oligonucleótidos (Nitsche, 2009), estas recomendaciones y los resultados del análisis de nuestros oligonucleótidos se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Recomendaciones en el diseño de oligonucleótidos. Esta tabla muestra si los oligonucleótidos usados en los dos diseños cumplen con las normas que recomienda Nitshe A. (2009). Todos los análisis se llevaron a cabo usando el programa Oligoanalyzer 3.0.

Recomendación	Resultado
Tamaño deseable entre 20 a 25 nucleótidos	Todos los oligonucleótidos usados tienen tamaños entre 18 a 22 nucleótidos
Evitar la formación de estructuras secundarias	Ninguno de los oligonucleótidos usados presenta estructuras en forma de horquilla lo suficientemente estables como para interferir con la reacción
Evitar la formación de dímeros	Los dímeros formados tienen una baja estabilidad y a las temperaturas usadas en la reacción no se encuentran presentes
Usar secuencias balanceadas	Todas las secuencias tienen un porcentaje de GC de entre 39.9 a 52.6% (ver el anexo 3) considerado un valor adecuado
Evitar secuencias ricas en guanina	
Evitar secuencias repetitivas	Ninguno de los oligonucleótidos presenta más de 4 nucleótidos repetidos en posiciones sucesivas
Ajustar temperaturas de alineamiento	Para las pruebas con ambos diseños se probaron varias temperaturas de alineamiento (Figura 24)

Los resultados de la Tabla 14 muestran que el diseño de los oligonucleótidos usados siguió un buen proceso y por lo tanto no hay razones claras para dudar del funcionamiento de estos oligonucleótidos en la técnica.

Otro problema surge con la mezcla de los oligonucleótidos en el diseño multiplex que genera un patrón inespecífico de bandas cuando la muestra no corresponde a ZIKV. Los análisis bioinformáticos sobre los alineamientos con secuencias de DENV (de la base de datos de GenBank) muestran porcentajes de especificidad altos (correspondientes al 100% con secuencias de genoma completo de los 4 serotipos de DENV) pero también se observan alineamientos incompletos con algunas secuencias, por lo que es probable que esta mezcla de oligonucleótidos tenga hibridación incompleta en más de una zona del genoma del DENV lo que genera amplificaciones desde distintos puntos dando lugar al patrón de bandas de entre 500 y 1400 bases que imposibilitan la tipificación de DENV con esta técnica. Otra de las observaciones es que los amplicones que se esperan en este diseño para la detección de DENV son de entre 2652 y 3757 bases por lo que se necesitan fragmentos grandes de RNA viral. Durante el proceso de extracción se llevaron a cabo los cuidados necesarios para mantener la integridad del genoma viral, una característica fundamental cualquier experimento que involucre RNA (Schroeder et

al., 2006) pero existe la posibilidad de que la extracción dé como resultado un RNA fragmentado del que no se puedan amplificar fragmentos de esos tamaños y esto de origen al patrón de bandas.

Posteriormente se intentaron identificar errores durante la preparación y la ejecución de los ensayos de PCR, para esto se hizo una revisión siguiendo las pautas que usaron Schrick y Nitsche (2016) (Tabla 15) al intentar explicar el fallo en la identificación de virus de Lassa usando un diseño propio, de RT-qPCR en un solo paso, que previamente habían optimizado y usado con buenos resultados (Schrick & Nitsche, 2016).

Tabla 15. Posibles fuentes de error durante los ensayos de PCR y las medidas tomadas para procurar resolverlos.

Posible error	Medidas tomadas
Error humano	Las reacciones fueron repetidas en varias ocasiones con previa revisión del procedimiento para minimizar los fallos
Fallo del control positivo	En todas las reacciones se agregó la detección del gen GAPDH como control de la extracción de RNA, retrotranscripción y funcionamiento de la polimerasa.
Fallo de los oligonucleótidos	Como se ve en la Tabla 14 el diseño de los oligonucleótidos parece robusto y con bajas probabilidades de fallo.
Contaminación o degradación de los reactivos	Para la retrotranscripción se usaron dos diferentes enzimas para descartar que este paso fuera parte del problema: <i>RevertAid</i> y la <i>SuperScript IV</i> ambas de la marca Thermofisher
	Se probaron alícuotas nuevas de oligonucleótidos para evitar fallos por degradación o contaminación de estos
	La reacción de polimerización de DNA se lleva a cabo usando el <i>GoTaq master mix 2x</i> de Promega. Se probaron dos alícuotas distintas pertenecientes a diferentes lotes
	El agua usada en la reacción fue agua libre de nucleasas y se probaron alícuotas nuevas
Problemas con el termociclador	El aparato no presentó indicios de fallas o deficiencias en su funcionamiento
Problemas con el funcionamiento conjunto del ensayo para DENV	No tuvimos la posibilidad de realizar otro ensayo probando la amplificación de otras regiones del genoma del DENV como comparación con el nuestro, o usando un diseño que amplifique una zona más pequeña

El último punto de la Tabla 15 es, al parecer, la mejor línea a seguir para establecer si la falta de amplificación es provocada por fallos en alguna parte del ensayo de detección y tipificación de DENV o si en algún caso los aislados virales no correspondieran a DENV y esta es la razón de los resultados negativos.

En el caso de la tipificación de ZIKV con el diseño PCR multiplex se obtuvieron buenos resultados logrando la identificación de dos aislados, uno de Yucatán y otro de Oaxaca, como ZIKV y con resultados concordantes al amplificar el virus de referencia ZIKVPR. El aislado Oax-2 ya se encontraba tipificado como ZIKV usando un par de oligonucleótidos que amplificaban la zona del genoma que codifica para la proteína E diseñados por la Dra. Leticia Cedillo (CINVESTAV, IPN, México)

Tanto el aislado Oax-2 como el Yuc-100 fueron obtenidos en el año 2016 que, según los datos disponibles en el boletín epidemiológico de la semana 52 de ese año, ha sido (hasta el momento) el año en que se han reportado más casos confirmados de infección por ZIKV con un total de 7560 (Tabla 4). Justamente en el año 2016 el estado de Yucatán fue el segundo estado más afectado del país por esta enfermedad reportando 820 casos confirmados, en el estado de Oaxaca se reportaron 488 casos y fue uno de los 3 primeros estados en reportar casos iniciando los reportes desde la tercera semana de enero de 2016 (Secretaría de Salud (México), 2016b, 2016a). Por lo que la tipificación de estos aislados como ZIKV concuerda con la distribución y prevalencia de este virus en esas regiones del país.

9. Conclusiones

El presente proyecto permitió la identificación de aislados mexicanos como pertenecientes al género *Flavivirus* por la técnica de inmunofluorescencia lo que aporta información relevante sobre el seguimiento que se le puede dar a estos aislados y se genera un protocolo de tamizaje que permitiría la identificación de virus provenientes de muestras clínicas desde fases tempranas. Esto resultaría ventajoso ya que el aislamiento de estos virus por el método de pase ciego implica una gran inversión en material y tiempo y al poderlos identificar de forma temprana se pueden descartar las muestras negativas evitando esa inversión innecesaria con la posibilidad de aumentar la cantidad de muestras que se pueden procesar.

La estandarización de las concentraciones óptimas para esta técnica de inmunofluorescencia sirvió también como base para la estandarización de un ensayo de citometría de flujo que ya está en desarrollo en el laboratorio, ya que usa los mismos anticuerpos, y que puede en algún momento ofrecer una mayor sensibilidad para la identificación de aislados virales.

Aunque no hubo resultados satisfactorios con ninguno de los dos diseños de PCR para la tipificación de DENV, si se logró la tipificación del aislado viral Yuc-100 como ZIKV por la técnica de PCR multiplex y la confirmación de Oax-2 también como ZIKV lo que concuerda con experimentos anteriores realizados por otros miembros del grupo de trabajo. Estos datos se aportan al Banco de Aislados de Flavivirus de la UBIMED en la FES Iztacala, UNAM.

El desarrollo de estos proyectos de identificación diseñados a partir de variantes de *Flavivirus* que circulan en México es necesario para mantener actualizados estos métodos ya que la selección y el desplazamiento entre variantes, particularmente en el caso de DENV, mantiene un comportamiento dinámico y México representa una zona endémica no solo para este virus, sino también para el ZIKV originando la necesidad de métodos de tipificación adecuados para la vigilancia epidemiológica de estos. Además, la tipificación puede considerarse el primer paso en el estudio y entendimiento de los factores de virulencia y mecanismos de evasión del sistema inmunológico que presentan los *Flavivirus*.

10. Perspectivas

Realizar un diseño de tipificación basado en la región que codifica las proteínas estructurales de DENV usando secuencias de variantes circulantes en México.

Secuenciar las librerías de cDNA de aislados virales como método de tipificación tanto de serotipo como del genotipo, lo que aportaría aún más información relevante sobre los virus con los que se está trabajando.

11. Referencias

- Alcaraz-Estrada, S. L., Yocupicio-Monroy, M., & Del Angel, R. M. (2010). Insights into dengue virus genome replication. *Future Virology*, 5(5), 575–592. <https://doi.org/10.2217/fvl.10.49>
- Andino, R., & Domingo, E. (2015). Viral Quasi Species. *Virology*, 344(6188), 1173–1178. <https://doi.org/10.1126/science.1249098>
- Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K. C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S. C., ... Garcia-Blanco, M. A. (2018). Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chemical Reviews*, 118(8), 4448–4482. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., ... Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S. L., Stura, E. A., Duquerroy, S., Lescar, J., ... Rey, F. A. (2004). Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO Journal*, 23(4), 728–738. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600064>
- Brownie, J., Shawcross, S., Theaker, J., Whitcombe, D., Ferrie, R., Newton, C., & Little, S. (1997). The elimination of primerdimer. *Nucleic Acids Research*, 25(16), 3235–3241.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2017). *Prueba Triplex RCP-TR en tiempo real*. Retrieved from <https://www.cdc.gov/zika/pdfs/spanish/trioplex-real-time-rt-pcr-assay-instructions-for-use-sp.pdf>
- Cheng, M. S., Lau, S. H., Chan, K. P., Toh, C. S., & Chow, V. T. (2015). Impedimetric cell-based biosensor for real-time monitoring of cytopathic effects induced by dengue viruses. *Biosensors and Bioelectronics*, 70, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.018>
- Chew, T., Noyce, R., Collins, S. E., Hancock, M. H., & Mossman, K. L. (2009). Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. *Molecular Immunology*, 46(3), 393–399. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.10.010>
- Clyde, K., & Harris, E. (2006). RNA Secondary Structure in the Coding Region of Dengue Virus Type 2 Directs Translation Start Codon Selection and Is Required for Viral Replication. *Journal of Virology*, 80(5), 2170–2182. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.5.2170-2182.2006>
- Cowling, V. H. (2010). Regulation of mRNA cap methylation. *Biochemical Journal*, 425(2), 295–302. <https://doi.org/10.1042/BJ20091352>
- Crill, W. D., & Chang, G. J. (2004). Localization and Characterization of Flavivirus Envelope Glycoprotein. *Journal of Virology*, 78(24), 13975–13986. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.24.13975>
- Crotty, S., & Andino, R. (2002). Implications of high RNA virus mutation rates: Lethal mutagenesis and the antiviral drug ribavirin. *Microbes and Infection*, 4(13), 1301–1307. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)00008-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)00008-4)
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A. R. B., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS*

- Microbiology Reviews*, 39(2), 155–170. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>
- Dai, L., Song, J., Lu, X., Deng, Y. Q., Musyoki, A. M., Cheng, H., ... Gao, G. F. (2016). Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host and Microbe*, 19(5), 696–704. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.013>
- Díaz, F. J., Black IV, W. C., Farfán-Ale, J. A., Loroño-Pino, M. A., Olson, K. E., & Beaty, B. J. (2006). Dengue Virus Circulation and Evolution in Mexico: A Phylogenetic Perspective. *Archives of Medical Research*, 37(6), 760–773. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2006.02.004>
- Dick, O. B., San Martín, J. L., Montoya, R. H., Del Diego, J., Zambrano, B., & Dayan, G. H. (2012). Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4), 584–593. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0770>
- Dirección General de Epidemiología. (2015). *Lineamientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica y diagnóstico por laboratorio de infección por virus Zika*. 2015(August), 17. <https://doi.org/10.1002/pros.20017>
- Dirección General de Epidemiología. (2016). *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por vectores*. 3292.
- Domingo, E., Sheldon, J., & Perales, C. (2012). Viral Quasispecies Evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 159–216. <https://doi.org/10.1128/mmbr.05023-11>
- Dong, H., Ray, D., Ren, S., Zhang, B., Puig-Basagoiti, F., Takagi, Y., ... Shi, P.-Y. (2007). Distinct RNA Elements Confer Specificity to Flavivirus RNA Cap Methylation Events. *Journal of Virology*, 81(9), 4412–4421. <https://doi.org/10.1128/jvi.02455-06>
- Fajardo Dolci, G., Meljem Moctezuma, J., Vicente Gonzales, E., Venegas Páez, F. V., & Mazón Gonzales, B. (2013). Dengue en México. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 18(4), 285–286.
- Faye, O., Freire, C. C. M., Iamarino, A., Faye, O., de Oliveira, J. V. C., Diallo, M., ... Sall, A. A. (2014). Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), 36. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636>
- Filomatori, C. V., Carballeda, J. M., Villordo, S. M., Aguirre, S., Pallarés, H. M., Maestre, A. M., ... Gamarnik, A. V. (2017). Dengue virus genomic variation associated with mosquito adaptation defines the pattern of viral non-coding RNAs and fitness in human cells. *PLoS Pathogens*, 13(3), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006265>
- Funk, A., Truong, K., Nagasaki, T., Torres, S., Floden, N., Balmori Melian, E., ... Khromykh, A. A. (2010). RNA Structures Required for Production of Subgenomic Flavivirus RNA. *Journal of Virology*, 84(21), 11407–11417. <https://doi.org/10.1128/jvi.01159-10>
- García-Blanco, M. A., Vasudevan, S. G., Bradrick, S. S., & Nicchitta, C. (2016). Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. *Antiviral Research*, 134, 244–249. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2016.09.010>
- García-Cordero, J., Carrillo-Halfon, S., León-Juárez, M., Romero-Ramírez, H., Valenzuela-León, P., López-González, M., ... Cedillo-Barrón, L. (2014). Generation and characterization of a rat monoclonal antibody against the RNA polymerase protein from Dengue Virus-2. *Immunological Investigations*, 43(1), 28–40.

<https://doi.org/10.3109/08820139.2013.833622>

- García-Cordero, J., Ramirez, H. R., Vazquez-Ochoa, M., Gutierrez-Castañeda, B., Santos-Argumedo, L., Villegas-Sepúlveda, N., & Cedillo-Barrón, L. (2005). Production and characterization of a monoclonal antibody specific for NS3 protease and the ATPase region of dengue-2 virus. *Hybridoma*, *24*(3), 160–164. <https://doi.org/10.1089/hyb.2005.24.160>
- Gebhard, L. G., Filomatori, C. V., & Gamarnik, A. V. (2011). Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses*, *3*(9), 1739–1756. <https://doi.org/10.3390/v3091739>
- Gubler, D. J., Vasilakis, N., & Musso, D. (2017). History and Emergence of Zika Virus. *Journal of Infectious Diseases*, *216*(Suppl 10), S860–S867. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix451>
- Heinz, F. X., Stiasny, K., Auer, G. P., Holzmann, H., Allison, S. L., Mandl, C. W., & Kunz, C. (1994). Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology*, *198*(1), 109–117. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1013>
- Holmes, E. C., & Twiddy, S. S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, Genetics and Evolution*, *3*(1), 19–28. [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(03\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(03)00004-2)
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. (2019). *Lineamientos de vigilancia por Laboratorio del Dengue y otras arbovirosis*.
- Issur, M., Geiss, B. J., Bougie, I., Picard-Jean, F., Despins, S., Mayette, J., ... Bisailon, M. (2009). The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *Rna*, *15*(12), 2340–2350. <https://doi.org/10.1261/rna.1609709>
- Katzelnick, L. C., Fonville, J. M., Gromowski, G. D., Arriaga, J. B., Green, A., James, S. L., ... Smith, D. J. (2015). Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science*, *349*(6254), 1338–1343. <https://doi.org/10.1126/science.aac5017>
- Klema, V. J., Padmanabhan, R., & Choi, K. H. (2015). Flaviviral replication complex: Coordination between RNA synthesis and 5'-RNA capping. *Viruses*, *7*(8), 4640–4656. <https://doi.org/10.3390/v7082837>
- Kostyuchenko, V. A., Chew, P. L., Ng, T.-S., & Lok, S.-M. (2014). Near-Atomic Resolution Cryo-Electron Microscopic Structure of Dengue Serotype 4 Virus. *Journal of Virology*, *88*(1), 477–482. <https://doi.org/10.1128/jvi.02641-13>
- Kraemer, M. U. G., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q. N., Shearer, F. M., Barker, C. M., ... Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *ELife*, *4*(JUNE2015), 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Kuhn, R. J., Dowd, K. A., Beth Post, C., & Pierson, T. C. (2015). Shake, rattle, and roll: Impact of the dynamics of flavivirus particles on their interactions with the host. *Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.025>
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., ... Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, *108*(5), 717–725. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00660-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00660-8)
- Kurosu, T. (2011). Quasispecies of dengue virus. *Tropical Medicine and Health*, *39*(4 SUPPL.),

29–36. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S02>

- Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., & Vorndam, A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*(3), 545–551.
- Lauring, A. S., & Andino, R. (2010). Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathogens*, *6*(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001005>
- León-Juárez, M., García-Cordero, J., Santos-Argumedo, L., Romero-Ramírez, H., García-Machorro, J., Bustos-Arriaga, J., ... Cedillo-Barrón, L. (2013). Generation and characterization of a monoclonal antibody that cross-reacts with the envelope protein from the four dengue virus serotypes. *Apmis*, *121*(9), 848–858. <https://doi.org/10.1111/apm.12044>
- Leta, S., Beyene, T. J., De Clercq, E. M., Amenu, K., Kraemer, M. U. G., & Revie, C. W. (2018). Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, *67*, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.11.026>
- Leung, J. Y., Pijlman, G. P., Kondratieva, N., Hyde, J., Mackenzie, J. M., & Khromykh, A. A. (2008). Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. *Journal of Virology*, *82*(10), 4731–4741. <https://doi.org/10.1128/jvi.00002-08>
- Li, K., Phoo, W. W., & Luo, D. (2014). Functional interplay among the flavivirus NS3 protease, helicase, and cofactors. *Virologica Sinica*, *29*(2), 74–85. <https://doi.org/10.1007/s12250-014-3438-6>
- Li, X.-D., Deng, C.-L., Ye, H.-Q., Zhang, H.-L., Zhang, Q.-Y., Chen, D.-D., ... Zhang, B. (2016). Transmembrane Domains of NS2B Contribute to both Viral RNA Replication and Particle Formation in Japanese Encephalitis Virus. *Journal of Virology*, *90*(12), 5735–5749. <https://doi.org/10.1128/jvi.00340-16>
- Li, Z., Zhang, J., & Li, H. (2017). Flavivirus NS2B/NS3 protease: Structure, function, and inhibition. In *Viral Proteases and Their Inhibitors*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809712-0.00007-1>
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2007). Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virology*, 1101–1151.
- Liu, Z.-Y., & Qin, C.-F. (2019). Structure and function of cis-acting RNA elements of flavivirus. *Reviews in Medical Virology*, (October), e2092. <https://doi.org/10.1002/rmv.2092>
- Luo, D., Vasudevan, S. G., & Lescar, J. (2015). The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Research*, *118*(October 2018), 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.014>
- Ma, L., Jones, C. T., Groesch, T. D., Kuhn, R. J., & Post, C. B. (2004). Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(10), 3414–3419. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305892101>
- Marklewitz, M., & Junglen, S. (2019). Evolutionary and ecological insights into the emergence of arthropod-borne viruses. *Acta Tropica*, *190*, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.10.006>

- Mayer, S. V., Tesh, R. B., & Vasilakis, N. (2017). The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Tropica*, 166, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.020>
- Mazeaud, C., Freppel, W., & Chatel-Chaix, L. (2018). The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Frontiers in Genetics*, 9(December), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00595>
- Messina, J. P., Brady, O. J., Golding, N., Kraemer, M. U. G., Wint, G. R. W., Ray, S. E., ... Hay, S. I. (2019). The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nature Microbiology*, 4(9), 1508–1515. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0476-8>
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 427(6972), 313–319. <https://doi.org/10.1038/nature02165>
- Moreno-Estrada, A., Gignoux, C. R., Fernández-López, J. C., Zakharia, F., Sikora, M., Contreras, A. V., ... Bustamante, C. D. (2014). The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science*, 344(6189), 1280–1285. <https://doi.org/10.1126/science.1251688>
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the Flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>
- Muller, D. A., & Young, P. R. (2013). The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Research*, 98(2), 192–208. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008>
- Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika Virus. *WPRO Fact Sheets*, 29(3), 1-. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15.Address>
- Naoki, O., Arihiro, K., Toshiyuki, Y., Noriko, H., Fumio, K., Suyoshi, S., ... Hattori, M. (2014). The genome landscape of the African Green Monkey kidney-derived vero cell line. *DNA Research*, 21(6), 673–683. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu029>
- Narro Robles, J., & Gómez Dantés, H. (1995). El dengue en México: un problema prioritario de salud pública. *Salud Pública Méx*, 37(supl), 12–20.
- Neufeldt, C. J., Cortese, M., Acosta, E. G., & Bartenschlager, R. (2018). Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 125–142. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170>
- Nitsche, A. (2009). Oligonucleotide design for in-house real-time PCR applications in microbiology. In *Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization* (pp. 41–69). https://doi.org/10.1007/978-3-642-00479-7_6
- OPS, & OMS. (2019). *PAHO | Dengue*. Retrieved from https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=1&Itemid=40734&lang=es
- Organización Panamericana de la Salud. (2015). Increase of microcephaly in the northeast of Brazil. *Paho*, (November), 3–4.
- Organización Panamericana de la Salud. (2016). *Guía para la vigilancia de la enfermedad por*

el virus del Zika y sus complicaciones.

- Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2012). Degrees of maturity: The complex structure and biology of flaviviruses. *Current Opinion in Virology*, 2(2), 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.02.011>
- Rastogi, M., Sharma, N., & Singh, S. K. (2016). Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>
- Ray, D., Shah, A., Tilgner, M., Guo, Y., Zhao, Y., Dong, H., ... Shi, P.-Y. (2006). West Nile Virus 5'-Cap Structure Is Formed by Sequential Guanine N-7 and Ribose 2'-O Methylations by Nonstructural Protein 5. *Journal of Virology*, 80(17), 8362–8370. <https://doi.org/10.1128/jvi.00814-06>
- Rey, F. A., Stiasny, K., & Heinz, F. X. (2017). Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. *Current Opinion in Virology*, 24, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.06.009>
- Romero-Hidalgo, S., Ochoa-Leyva, A., Garcíarrubio, A., Acuña-Alonzo, V., Antúnez-Argüelles, E., Balcazar-Quintero, M., ... Soberón, X. (2017). Demographic history and biologically relevant genetic variation of Native Mexicans inferred from whole-genome sequencing. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01194-z>
- Samsa, M. M., Mondotte, J. A., Iglesias, N. G., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A. T., ... Gamarnik, A. V. (2009). Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathogens*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000632>
- Scaturro, P., Cortese, M., Chatel-Chaix, L., Fischl, W., & Bartenschlager, R. (2015). Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLoS Pathogens*, 11(11), 1–32. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005277>
- Schrack, L., & Nitsche, A. (2016). Pitfalls in PCR troubleshooting: Expect the unexpected? *Biomolecular Detection and Quantification*, 6, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.11.001>
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., ... Ragg, T. (2006). The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>
- Secretaría de Salud (México). (2016a). *Boletín Epidemiológico. Vigilancia Epidemiológica Semana 3 México, 2016*. (4).
- Secretaría de Salud (México). (2016b). *Boletín Epidemiológico. Vigilancia Epidemiológica Semana 52 México, 2016. Boletín Epidemiológico*, 34, 1–64. Retrieved from <http://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-141143>
- Secretaría de Salud, M. (2012). NORMA Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica. *Diario Oficial de La Federación*, 85(1), 2071–2079. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.06.007>
- Secretaría de Salud, M. (2015). NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. *Diario Oficial de La Federación*, 1–43. Retrieved from

http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/NOM_032_SSA2_2014.pdf

- Selisko, B., Papageorgiou, N., Ferron, F., & Canard, B. (2018). Structural and functional basis of the fidelity of nucleotide selection by flavivirus RNA-dependent RNA polymerases. *Viruses*, *10*(2). <https://doi.org/10.3390/v10020059>
- Sessions, O. M., Wilm, A., Kamaraj, U. S., Choy, M. M., Chow, A., Chong, Y., ... Ooi, E. E. (2015). Analysis of Dengue Virus Genetic Diversity during Human and Mosquito Infection Reveals Genetic Constraints. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004044>
- Shrivastava, G., García-Cordero, J., León-Juárez, M., Oza, G., Tapia-Ramírez, J., Villegas-Sepulveda, N., & Cedillo-Barrón, L. (2017). NS2A comprises a putative viroporin of Dengue virus 2. *Virulence*, *8*(7), 1450–1456. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1356540>
- Shurtleff, A. C., Beasley, D. W. C., Chen, J. J. Y., Ni, H., Suderman, M. T., Wang, H., ... Barrett, A. D. T. (2001). Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses. *Virology*, *281*(1), 75–87. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0748>
- SINAVE. (2019a). Casos Confirmados de Infección por Virus Zika 2019 | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx. Retrieved November 27, 2019, from <https://www.gob.mx/salud/documentos/casos-confirmados-de-infeccion-por-virus-zika-2019>
- SINAVE. (2019b). *Panorama Epidemiológico de Dengue*, 2019. 52.
- SINAVE. (2020). Boletín epidemiológico Número 18. *Secretaría de Salud Gob.Mx*.
- Tilgner, M., & Shi, P.-Y. (2004). Structure and Function of the 3' Terminal Six Nucleotides of the West Nile Virus Genome in Viral Replication. *Journal of Virology*, *78*(15), 8159–8171. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.15.8159-8171.2004>
- Tricou, V., Minh, N. N., Farrar, J., Tran, H. T., & Simmons, C. P. (2011). Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *5*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001309>
- Uchil, P. D., & Satchidanandam, V. (2003). Architecture of the flaviviral replication complex: Protease, nuclease, and detergents reveal encasement within double-layered membrane compartments. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(27), 24388–24398. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301717200>
- Vasilakis, N., & Weaver, S. C. (2008). Chapter 1 The History and Evolution of Human Dengue Emergence. *Advances in Virus Research*, Vol. 72, pp. 1–76. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)00401-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00401-6)
- Vasilakis, N., & Weaver, S. C. (2017). Flavivirus transmission focusing on Zika. *Current Opinion in Virology*, *22*, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.11.007>
- Villordo, S. M., Carballeda, J. M., Filomatori, C. V., & Gamarnik, A. V. (2016). RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation. *Trends in Microbiology*, *24*(4), 270–283. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.002>
- Villordo, S. M., & Gamarnik, A. V. (2009). Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Research*, *139*(2), 230–239.

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.016>

- Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A. D. T., Watowich, S. J., Gubler, D. J., & Weaver, S. C. (2000). Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. *Journal of Virology*, *74*(7), 3227–3234. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3227-3234.2000>
- Wargo, A. R., & Kurath, G. (2012). Viral fitness: Definitions, measurement, and current insights. *Current Opinion in Virology*, *2*(5), 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.07.007>
- Weaver, S. C., Costa, F., Garcia-Blanco, M. A., Ko, A. I., Ribeiro, G. S., Saade, G., ... Vasilakis, N. (2016). Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Research*, Vol. 130, pp. 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.010>
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., ... Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host and Microbe*, *5*(4), 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>
- Wikan, N., & Smith, D. R. (2016). Zika virus: History of a newly emerging arbovirus. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(7), e119–e126. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30010-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30010-X)
- World Health organization. (2009). *DENGUE GUIAS PARA EL DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL*.
- Yi, Z., Yuan, Z., Rice, C. M., & MacDonald, M. R. (2012). Flavivirus Replication Complex Assembly Revealed by DNAJC14 Functional Mapping. *Journal of Virology*, *86*(21), 11815–11832. <https://doi.org/10.1128/jvi.01022-12>
- Yu, I.-M., Holdaway, H. A., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G., & Chen, J. (2009). Association of the pr Peptides with Dengue Virus at Acidic pH Blocks Membrane Fusion. *Journal of Virology*, *83*(23), 12101–12107. <https://doi.org/10.1128/jvi.01637-09>
- Zhang, W., Chipman, P. R., Corver, J., Johnson, P. R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., ... Kuhn, R. J. (2003). Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature Structural Biology*, *10*(11), 907–912. <https://doi.org/10.1038/nsb990>
- Zhang, Y., Kaufmann, B., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2007). Structure of Immature West Nile Virus. *Journal of Virology*, *81*(11), 6141–6145. <https://doi.org/10.1128/jvi.00037-07>
- Zou, J., Xie, X., Wang, Q.-Y., Dong, H., Lee, M. Y., Kang, C., ... Shi, P.-Y. (2015). Characterization of Dengue Virus NS4A and NS4B Protein Interaction. *Journal of Virology*, *89*(7), 3455–3470. <https://doi.org/10.1128/jvi.03453-14>

12 Anexos.

Anexo 1. Detalles de las secuencias utilizadas en el diseño de los oligonucleótidos usados para este experimento.

Virus	Código de acceso GenBank	Detalles
DENV 1	GU131956.1	Aislado del estado de Yucatán, México en 2006 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
	GU131979.1	Aislado del estado de Yucatán, México en 2007 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
	GU131983.1	Aislado del estado de Yucatán, México en 2008 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
	KJ189346.1	Aislado del estado de Yucatán, México en 2009 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
	KJ189347.1	Aislado del estado de Yucatán, México en 2009 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
	KJ189368.1	Aislado de México en 2012 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
	KJ189369.1	Aislado de México en 2011 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
	KJ189349.1	Aislado del estado de Yucatán, México en 2011 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
DENV 2	GQ199894.1	Aislado del estado de Hidalgo, México en 2005 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
	GQ199893.1	Aislado del estado de Oaxaca, México en 2002 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
	KJ189309.1	Aislado del estado de Yucatán, México en 2010 por cultivo de macerado de mosquitos en células C6-36
	KJ189308.1	Aislado del estado de Yucatán, México en 2009 por cultivo de macerado de mosquitos en células C6-36
	KJ189311.1	Aislado del estado de Yucatán, México en 2007 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
	GU131959.1	Aislado del estado de Yucatán, México en 2006 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
	KJ189370.1	Aislado de México en 2011 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
DENV 3	FJ898441.1	Aislado de México en 2006 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
	FJ898442.1	Aislado del estado de Puebla, México en 2007 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
	FJ898440.1	Aislado del estado de Morelos, México en 2003 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
DENV 4	KY672960.1	Virus secuenciado con Sanger del suero de paciente en China en el 2015
	MG601754.1	Virus secuenciado con Illumina del suero de paciente en China en el 2013
	MK506266.1	Aislado de Thailandia en 2007 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
	KU523871.1	Virus secuenciado con Sanger en Filipinas en el 2014
	MH382789.1	Aislado de Australia en 2016 por cultivo de suero de paciente en células C6-36
ZIKV	KU922960.1	Secuencia de virus a partir de saliva de paciente del estado de Chiapas, México en 2016
	KU922923.1	Secuencia de virus a partir de fluido cerebroespinal de paciente del estado de Chiapas, México en 2016
	KY120349.1	Secuencia de virus a partir suero de paciente del estado de Oaxaca, México en 2016
	KY631493.1	Secuencia de virus a partir de suero de paciente del estado de Chiapas, México en 2015
	KY631494.1	Secuencia de virus a partir de suero de paciente del estado de Chiapas, México en 2015

Anexo 2. Detalles de los alineamientos de los oligonucleótidos de la PCR anidada.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 1 isolate DV1-HNSB-P4 polyprotein (POLY) gene, partial cds	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MT072293.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate human polyprotein (POLY) gene, partial cds	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MT072221.1
<input type="checkbox"/>	Epinephelus fuscoguttatus DNA, LG6, complete sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	AP022680.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate AFI_MDH_232 polyprotein (POLY) gene, partial cds	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN335247.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate AFI_MDH_244 polyprotein (POLY) gene, partial cds	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN335246.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate AFI_MDH_240 polyprotein (POLY) gene, partial cds	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN335245.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate AFI_MDH_243 polyprotein (POLY) gene, partial cds	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN335244.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate 19XN28959F polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN964274.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate 19XN27399F polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN964273.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 1 isolate 19XN29819F polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN960677.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 1 isolate 19XN28258F polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN960676.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 1 isolate 19XN29818F DENV-1 polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN945984.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Japanese encephalitis virus polyprotein gene, complete cds	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MK541529.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate 2014/FR/CNR_25865 polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN720746.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Japanese encephalitis virus isolate JEV1805M, complete genome	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN639770.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 1 isolate DV111503 polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA (POLY) gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN639769.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 1 isolate DV101702 polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA (POLY) gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN639768.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 1 isolate DV061606 polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA (POLY) gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN639767.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 1 isolate DV061601 polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA (POLY) gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN639766.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 1 isolate DV09231 polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA (POLY) gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN639765.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 1 isolate DV09123 polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA (POLY) gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN639764.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 1 isolate 2012/TH/8425 polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN621141.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 1 isolate 2013/NC/0566 polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, complete sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN621140.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 1 isolate 2019/BJ/9943 polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN600714.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate 136denv2_BR_Rj polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN589884.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate 135denv2_BR_Rj polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN589883.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate 134denv2_BR_Rj polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN589882.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate 133denv2_BR_Rj polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN589881.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate 132denv2_BR_Rj polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN589880.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate 131denv2_BR_Rj polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN589879.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate 159denv2_BR_Rj polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN589878.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate 158denv2_BR_Rj polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN589877.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate 157denv2_BR_Rj polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN589876.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate 156denv2_BR_Rj polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN589875.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate 155denv2_BR_Rj polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN589874.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate 154denv2_BR_Rj polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence	31.4	31.4	83%	182	100.00%	MN589873.1

Figura A2.1 Alineamientos del oligonucleótido sentido con la base de datos del NCBI

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Dengue virus 3 isolate D17641 .complete genome	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MN018388.1
✓	Dengue virus 3 isolate D17139 .complete genome	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MN018387.1
✓	Dengue virus 3 isolate D16021 .complete genome	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MN018382.1
✓	Dengue virus 3 isolate D151660 .complete genome	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MN018377.1
✓	Dengue virus 3 isolate D16006 .complete genome	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MN018373.1
✓	Dengue virus 3 isolate D15037 .complete genome	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MN018370.1
✓	Dengue virus 3 isolate 19XN50685 polyprotein (POLY) gene .complete cds; and sIRNA1 lncRNA gene .partial sequence	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MN922041.1
✓	Dengue virus 3 isolate 19XN50674 polyprotein (POLY) gene .complete cds; and sIRNA1 lncRNA gene .partial sequence	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MN922040.1
✓	Dengue virus 3 isolate 19XN50670 polyprotein (POLY) gene .complete cds; and sIRNA1 lncRNA gene .partial sequence	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MN922039.1
✓	Dengue virus 3 isolate 19XN15780 polyprotein (POLY) gene .complete cds; and sIRNA1 lncRNA gene .partial sequence	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MN922035.1
✓	Dengue virus 3 isolate 19XN14065 polyprotein (POLY) gene .complete cds; and sIRNA1 lncRNA gene .partial sequence	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MN922034.1
✓	Dengue virus 3 isolate 19XN13542 polyprotein (POLY) gene .complete cds; and sIRNA1 lncRNA gene .partial sequence	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MN922033.1
✓	Dengue virus 3 isolate D3/China/GDsz/D16028/2016(Indonesia) envelope protein (E) gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MG840508.1
✓	Dengue virus 3 isolate D3/China/GDsz/D16021/2016(Bali_Indonesia) envelope protein (E) gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MG840507.1
✓	Dengue virus 3 isolate D3/China/GDjm/D151680/2015(Malaysia) envelope protein (E) gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MG840504.1
✓	Dengue virus 3 isolate D3/China/GDgz/D15310/2015(Indonesia) envelope protein (E) gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MG840493.1
✓	Dengue virus 3 isolate D3/China/GDsg/D15037/2015(Indonesia) envelope protein (E) gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MG840488.1
✓	Dengue virus 1 isolate INMI1/DRC-2019 polyprotein (POLY) gene .complete cds; and sIRNA1 lncRNA gene .partial sequence	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MN577472.1
✓	Synthetic construct envelope protein (ZIKV-E) gene .complete cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MK890246.1
✓	Dengue virus 3 22e-S1471 E gene for envelope glycoprotein .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	LC436665.1
✓	Dengue virus 3 24e-S1566 E gene for envelope glycoprotein .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	LC436661.1
✓	Dengue virus 3 23e-S1479 E gene for envelope glycoprotein .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	LC436660.1
✓	Dengue virus 3 isolate B101510111712 polyprotein .envelope protein E region .(POLY) gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MK629483.1
✓	Dengue virus 3 isolate B101520105312 polyprotein .envelope protein E region .(POLY) gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MK629481.1
✓	Dengue virus 3 isolate B101520104612 polyprotein .envelope protein E region .(POLY) gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MK629480.1
✓	Dengue virus 3 isolate B101520206212 polyprotein .envelope protein E region .(POLY) gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MK629479.1
✓	Dengue virus 3 isolate B101580100612 polyprotein .envelope protein E region .(POLY) gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MK629477.1
✓	Dengue virus 3 isolate B101570213512 polyprotein .envelope protein E region .(POLY) gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MK629476.1
✓	Dengue virus 3 isolate B101550213912 polyprotein .envelope protein E region .(POLY) gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MK629475.1
✓	Dengue virus 3 isolate 16DGR58 polyprotein gene .complete cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MF682970.1
✓	Dengue virus 3 isolate 16DGR45 polyprotein gene .complete cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MF682969.1
✓	Dengue virus 3 isolate 16DGR41 polyprotein gene .complete cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MF682968.1
✓	Dengue virus 3 isolate 16DGR40 polyprotein gene .complete cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MF682967.1
✓	Dengue virus 3 isolate 16DGR39 polyprotein gene .complete cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MF682966.1
✓	Dengue virus 3 isolate HN201705 envelope protein gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MG778911.1
✓	Dengue virus isolate D3-487_2017 envelope protein gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MG933850.1
✓	Dengue virus 3 isolate BALI-TRV-037 envelope protein gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MH178417.1
✓	Dengue virus 3 isolate BALI-TRV-036 envelope protein gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MH178416.1
✓	Dengue virus 3 isolate BALI-TRV-022 envelope protein gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MH173173.1
✓	Dengue virus 3 isolate BALI-TRV-017 envelope protein gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MH173172.1
✓	Dengue virus 3 isolate BALI-TRV-008 envelope protein gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MH173171.1
✓	Dengue virus 3 isolate BALI-TRV-007 envelope protein gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MH173170.1
✓	Dengue virus 3 isolate BALI-TRV-003 envelope protein gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MH173168.1
✓	Dengue virus 3 isolate BALI-TRV-002 envelope protein gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MH173167.1
✓	Dengue virus 3 isolate SMD-031 .complete genome	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MH823209.1
✓	Dengue virus 3 isolate 0245.2018 envelope protein gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MH594462.1
✓	Dengue virus 3 isolate 16DGR58 envelope protein gene .partial cds	32.4	32.4	100%	94	90.00%	MF598868.1

Figura A2.1 Alineamientos del oligonucleótido antisentido con la base de datos del NCBI

Anexo 3. Análisis bioinformático de los oligonucleótidos usados. Se muestran sus características y la formación de homo y heterodímeros entre los oligonucleótidos con el programa Oligoanalyzer.

Código de identificación	Secuencia	Tamaño	% GC	Tm	Peso molecular
dDENV-F	ATA TGC TGA AAC GCG HGA	18	46.3	52.8	5545.7
dDENV-R	CCT TCH ACR AAR TCT CTR TT	20	39.2	49.1	6008
DMex1-R	AAC GTT TGT CTC GTC GGT	18	50	54.2	5496.6
DMex2-R	GTT GGT GGG ATT GTT AGG AAA	21	42.9	52.9	6596.3
DMex3-R	TGA AGT CAA GTG GAA AGC AAG	21	42.9	53.2	6552.3
DMex4-R	GTA TCC AGC TTT CCA CTC TCT	21	47.6	53.8	6283.1
mZK-F	GAC CCT AAT AGT GGC CAT CA	20	50	53.9	6086
mZK-R	TCC TTT CAA TGC GGT TAC CA	20	45	54.4	6043
mDENV1-F	AAG ATC CGT GAC CAT GCT T	19	47.4	54.1	5787.8
mDENV1-R	TTA GCT CCA ACC ATG ATG CA	20	45	54.3	6061
mDENV2-F	GCT ATT TCG TGT GTC CCA AA	20	45	53.2	6083
mDENV2-R	TTC TAT CCA CTT CCT GGA TTC C	22	45.5	53.8	6587.3
mDENV3-F	GCA GCT ATG GGA GTT CAA C	19	52.6	53.4	5852.8
mDENV3-R	AAA CTC CAG GAC TAT AGC CG	20	50	53.7	6095
mDENV4-F	GGA GGA GTT GTG ACA TGT G	19	52.6	53	5963.9
mDENV4-R	TTC TAT GAT TGG GCT TGA GC	20	45	52.6	6154

Delta G: -8.02 kcal/mole Base Pairs: 4 5' ATATGCTGAAACGCGHGA dDENV-F : : 3' TTTCCTCTRAARCAHCTTCC dDENV-R	Delta G: -9.59 kcal/mole Base Pairs: 5 5' ATATGCTGAAACGCGHGA dDENV-F : 3' TGGCTGCTCTGTTTGCAA dMex1-R	Delta G: -3.29 kcal/mole Base Pairs: 3 5' ATATGCTGAAACGCGHGA dDENV-F : : 3' AAAGGATTGTTAGGGTGGTTG dMex2-R
Delta G: -6.69 kcal/mole Base Pairs: 4 5' ATATGCTGAAACGCGHGA dDENV-F 3' GAACGAAAGGTGAACTGAAGT dMex3-R	Delta G: -6.69 kcal/mole Base Pairs: 4 5' ATATGCTGAAACGCGHGA dDENV-F : : 3' TCTCTCACCTTTCGACCTATG dMex4-R	

Heterodímeros formados entre el oligonucleótido sentido general y cada uno de los oligonucleótidos antisentido del diseño PCR anidada.