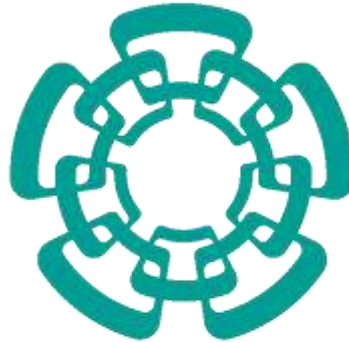


**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**



**Cinvestav**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

**DISEÑO DE UN BIOSENSOR DE DNA COMO POSIBLE  
MARCADOR DE LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD DEL  
DENGUE (CLÁSICO/HEMORRÁGICO)**

Tesis que presenta

Biólogo Elías Vera Murguía

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la Especialidad de la Genética y la Biología Molecular

Directoras de la Tesis: Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno

Ibtisam Elías Tohill (PhD.)

Asesores: Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y Dr. Alfonso Méndez

Tenorio

México, Distrito Federal Agosto 2015

## **Agradecimientos**

**A la Dra. MARIA DE LOURDES MUÑOZ MORENO por fomentar mi crecimiento profesional y personal, así como por la dirección de este proyecto.**

**A IBTISAM E. TOTHILL (PhD.) por la dirección de este proyecto y su entusiasmo en su desarrollo.**

**A la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y al Dr. Alfonso Méndez Tenorio por su asesoría en este proyecto.**

## **Agradecimientos**

**Al Dr. Gerardo Pérez y a Jon Ashley (PhD.) por transmitirme sus conocimientos, su tiempo y su paciencia.**

**Al MCs Adrián Cázares y al Biotecnólogo Eric Conchucos por su apoyo y asesoramiento en bioinformática.**

**A Hebert Cadena por su apoyo técnico en el laboratorio.**

## **Agradecimientos**

**A CONACYT por el apoyo económico, el cual permite se pueda estudiar un posgrado de excelencia en México.**

**A Cranfield University and Cinvestav Joint Research Projects por el Apoyo otorgado para el desarrollo de este Proyecto.**

## ***Dedicatoria***

*A mi hermana, Galleta, Keila, Bernardo, Renato y Alberto mis amigos*

*Por darme la fuerza en este viaje*

## Indice

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>2</b>
<b><i>Dedicatoria</i></b> .....	<b>5</b>
<b>Indice de figuras</b> .....	<b>11</b>
<b>Indice de tablas</b> .....	<b>16</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>17</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>18</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>1 El Dengue</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1 Características clínicas de la enfermedad y sintomatología</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2 Diagnóstico de la infección (pruebas de laboratorio y     coinfecciones)</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3 Mecanismos de patogénesis y patología (de DF a DHF) .....</b>	<b>29</b>
<b>2 Patrones epidémicos</b> .....	<b>35</b>
<b>2.1 Dengue en el mundo</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2 Dengue en América</b> .....	<b>42</b>
<b>2.3 Dengue en México</b> .....	<b>47</b>
<b>2.4 Descubrimiento del agente infeccioso e identificación del     vector</b> .....	<b>51</b>
<b>2.5 La filogenia como una herramienta de caracterización     epidemiológica-evolutiva</b> .....	<b>52</b>
<b>3 Factores generales que generan la infección del Dengue</b> ____	<b>63</b>
<b>3.1 El vector</b> .....	<b>63</b>
3.1.1 Taxonomía y Cepas .....	64
3.1.2 Biología- desarrollo.....	66

3.1.3	Proteínas del intestino medio.....	69
3.1.4	Comunidades parasito-bacterianas en el intestino de <i>A. aegypti</i> .....	72
<b>3.2</b>	<b>El hospedero humano.....</b>	<b>74</b>
3.2.1	Inmunidad innata .....	75
3.2.2	Inmunidad adaptativa.....	77
<b>3.3</b>	<b>El virus .....</b>	<b>80</b>
3.3.1	Estructura y composición.....	80
3.3.1.1	Propiedades físicas y químicas del virión .....	80
3.3.1.2	Genoma.....	81
3.3.1.3	Proteoma estructural y no estructural .....	84
3.3.1.4	Composición de la membrana viral.....	99
3.3.2	Recepción y penetración.....	100
3.3.3	Desencapsidación.....	103
3.3.4	Traducción y replicación (transcripción).....	105
3.3.4.1	Traducción .....	105
3.3.4.2	Proceso proteolítico de proteínas virales.....	105
3.3.4.3	Replicación temprana .....	108
3.3.4.4	Replicación tardía .....	109
3.3.5	Ensamblaje-maduración .....	109
3.3.6	Liberación .....	111
3.3.7	Relación del virus del Dengue con otros Flavivirus.....	112
3.3.8	Variantes virales (serotipos y genotipos) y mutantes .....	113
<b>4.</b>	<b>Interacción de los factores extrínsecos-intrínsecos _____</b>	<b>117</b>
<b>5</b>	<b>Tratamiento, desarrollo de vacunas y medicamentos</b>	
	<b>auxiliares _____</b>	<b>120</b>
<b>5.1</b>	<b>Tratamiento.....</b>	<b>120</b>
<b>5.2</b>	<b>Vacunas vivas atenuadas .....</b>	<b>121</b>
<b>5.3</b>	<b>Vacunas quiméricas vivas atenuadas .....</b>	<b>124</b>

5.4 Vacunas inactivas .....	125
5.5 Vacunas de DNA .....	125
5.6 PRODEN®.....	126
<b>6 Características biológicas _____</b>	<b>126</b>
6.1 Rango alimentación del mosquito y rango de hospederos del virus que presentan infección, ¿todos son sintomáticos?	127
6.2.1 Modelo de ratón.....	128
6.2.2 Modelo de primate no humano .....	131
6.3 Propagación en cultivos celulares .....	133
<b>7 Prevención y control _____</b>	<b>135</b>
<b>Antecedentes _____</b>	<b>141</b>
A) Reportes de regiones genómicas (determinantes genéticos) asociados a alteración de la virulencia.....	141
B) Microarreglo .....	145
B 1) ventajas de este método de detección .....	145
B 2) Construcción de un Microarreglo .....	145
B 3) Antecedentes del uso de Microarreglo para detección de flavivirus.....	146
<b>Justificación _____</b>	<b>148</b>
<b>Hipótesis _____</b>	<b>149</b>
<b>Objetivo general _____</b>	<b>150</b>
<b>Objetivos particulares _____</b>	<b>150</b>
<b>Materiales y Métodos. _____</b>	<b>151</b>
A. Materiales, reactivos y equipos .....	151
B. Virus .....	152
C. Muestras de los pacientes.....	152



Trabajo realizado en Cranfield University .....	157
Trabajo realizado en Cinvestav .....	159
Estrategia experimental general de trabajo _____	162
Información general de las sondas (Genes que hibridan con las sondas)_____	164
Resultados _____	165
Selección de sondas.....	¡Error! Marcador no definido.
Selección de sondas mediante análisis de mapeo en Geneious®, selección de región a amplificar en las muestras de los pacientes (diseño de primers), selección de sondas a emplear para el diagnóstico, análisis de diagnóstico <i>in silico</i> con secuencias de genomas completos de Dengue del continente Americano del periodo 2000-2009 y análisis de diagnóstico <i>in silico</i> con secuencias de genomas completos de Dengue del continente de Americana recientes.....	165
2 .....	199
Amplificación, concentración y desecación del DNA de los amplicones de DENV de los 4 serotipos, establecimiento de las condiciones óptimas de inmovilización de la neutravidina, adición de la biotina al amplicon del DENV para su captura por la neutravidina e hibridación de las sondas por la técnica de SPR para validar su especificidad.....	199
3 .....	206
Diseño del Microarreglo de diagnóstico (Posición de las sondas en localizaciones conocidas).....	206
4 .....	208
Establecer las condiciones de inmovilización de los amplicones del Dengue e hibridación de las sondas marcadas con	

<b>fluoróforo en el Microarreglo .....</b>	<b>208</b>
<b>Discusión _____</b>	<b>211</b>
<b>Conclusión _____</b>	<b>217</b>
<b>Perspectivas _____</b>	<b>219</b>
<b>Anexos _____</b>	<b>220</b>
<b>Referencias bibliográficas _____</b>	<b>231</b>

## Indice de figuras

<b>Figura 1 Opciones de diagnóstico de laboratorio y métodos de detección como pruebas confirmatorias en pacientes con posible infección por Dengue.</b> .....	27
<b>Figura 2. Riesgo global de Dengue.</b> .....	38
<b>Figura 3. Distribución espacial de Dengue en los últimos 70 años.</b> .....	42
<b>Figura 4. Representación de los desplazamientos de los serotipos en América desde 1980.</b> .....	45
<b>Figura 5. Cifras de casos de infección por Dengue en el periodo de 1980-2010 en América.</b> .....	46
<b>Figura 6. Mapa global de áreas donde es factible el desarrollo de Aedes aegypti en México.</b> .....	48
<b>Figura 7. Total de casos de DHF y DF en la república mexicana.</b>	50
<b>Figura 8. Ciclo del DENV en el humano y en el mosquito.</b> .....	69
<b>Figura 9. Respuesta innata generada ante la infección por DENV.</b> .....	77
<b>Figura 10. Propiedades Fisicoquímicas del Virión.</b> .....	80
<b>Figura 11. Predicción de estructura secundaria de RNA de la region nucleotídica 10430-10471 (Dominio 1 del 3'UTR).</b> .....	82
<b>Figura 12. Genoma (ORF) y RNA del Dengue virus.</b> .....	83
<b>Figura 13. Proteoma del Dengue virus.</b> .....	85
<b>Figura 14. Estructura obtenida en NMR del dímero de la proteína de la cápside.</b> .....	86
<b>Figura 15. Proteína prM tomada con rayos X [14].</b> .....	87
<b>Figura 16. Esquema de los cambios entre las proteínas pr, M y E ante el corte en viriones inmaduros.</b> .....	87
<b>Figura 17. Modelo de la proteína E.</b> .....	90
<b>Figura 18. Cambios conformacionales de la superficie viral de DENV en el proceso de maduración.</b> .....	91
<b>Figura 19. Representación de la NS1.</b> .....	94

<b>Figura 20. Modelo de la estructura de NS2A en la membrana. ....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 21. Representación de NS2B en la membrana del retículo endoplásmico. ....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 22. Estructura de listones del dominio de proteasa y helicasa de NS3. ....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 23. Representación lineal de NS4B. ....</b>	<b>98</b>
<b>Figura 24. Representación de listones de la metiltransfera y RdRp codificada en NS5. ....</b>	<b>99</b>
<b>Figura 25. Ciclo de replicación del Dengue y antígenos. ....</b>	<b>102</b>
<b>Figura 26. Proceso de desencapsidación del virión. ....</b>	<b>104</b>
<b>Figura 27. Clasificación del DENV [18]. ....</b>	<b>113</b>
<b>Figura 28. Resumen de los principales factores reportados extrínsecos-intrínsecos asociados a patogénesis severa en humanos. ....</b>	<b>119</b>
<b>Figura 29. Construcción de un Microarreglo. ....</b>	<b>146</b>
<b>Figura 30. Estrategia experimental. ....</b>	<b>162</b>
<b>Figura 31. Representación gráfica de construcción de los Biosensores para la selección de sondas específicas positivas de DF/DHF para la fabricación del Chip de diagnóstico. ....</b>	<b>163</b>
<b>Figura 32. Numero de sondas que se unen en cada gen ante la hibridación de las sondas contra genomas con diagnóstico DHF y DF de cada serotipo. ....</b>	<b>164</b>
<b>Figura 33. Esquema de hibridación de las sondas. ....</b>	<b>166</b>
<b>Figura 34. Sonda 4635 DENV-1 DHF. ....</b>	<b>166</b>
<b>Figura 35. Sonda 4635 DENV-1 DHF. ....</b>	<b>167</b>
<b>Figura 36. Distribución de los sets de sondas en el genoma. ...</b>	<b>184</b>
<b>Figura 37. Region seleccionada para amplificar en las muestras de los pacientes para el diagnóstico (gen NS3). ....</b>	<b>184</b>
<b>Figura 38. Distribución de las sondas depuradas seleccionadas. ....</b>	<b>185</b>
<b>Figura 39. Alineamiento de 10 secuencias del serotipo 1 region 5'</b>	

<i>gen NS3 por Seaview. ....</i>	185
<i>Figura 40. Análisis WebLogo para diseño de primer forward del serotipo 1. ....</i>	186
<i>Figura 41. Alineamiento de 10 secuencias del serotipo 1 region 3' gen NS3 por Seaview. ....</i>	187
<i>Figura 42. Análisis WebLogo para diseño de primer reverse del serotipo 1. ....</i>	187
<i>Figura 43. Localización de Primers del serotipo 1. ....</i>	188
<i>Figura 44. Análisis AmplifX para comparar las características de los primers del serotipo 1. ....</i>	188
<i>Figura 45. Alineamiento de 10 secuencias del serotipo 2 region 5' gen NS3 por Seaview. ....</i>	189
<i>Figura 46. Análisis WebLogo para diseño de primer forward del serotipo 1. ....</i>	189
<i>Figura 47. Alineamiento de 10 secuencias del serotipo 2 region 3' gen NS3 por Seaview. ....</i>	190
<i>Figura 48. Análisis WebLogo para diseño de primer reverse del serotipo 2. ....</i>	190
<i>Figura 49. Localización de Primers del serotipo 2. ....</i>	191
<i>Figura 50. Análisis AmplifX para comparar las características de los primers del serotipo 2. ....</i>	191
<i>Figura 51. Alineamiento de 10 secuencias del serotipo 3 region 5' gen NS3 por Seaview. ....</i>	192
<i>Figura 52. Análisis WebLogo para diseño de primer forward del serotipo 3. ....</i>	192
<i>Figura 53. Alineamiento de 10 secuencias del serotipo 3 region 3' gen NS3 por Seaview. ....</i>	193
<i>Figura 54. Análisis WebLogo para diseño de primer reverse del serotipo 3. ....</i>	193
<i>Figura 55. Localización de Primers del serotipo 2. ....</i>	194
<i>Figura 56. Análisis AmplifX para comparar las características de</i>	

<b>los primers del serotipo 3.....</b>	<b>194</b>
<b>Figura 57. Muestra la distribución de las 20 sondas seleccionadas en el gen NS3 del genoma viral. ....</b>	<b>195</b>
<b>Figura 58. Alineamiento entre todas las secuencias (9) de DENV-1 DHF contra todas las sondas de DENV-1 DHF (3). ....</b>	<b>196</b>
<b>Figura 59. Alineamiento entre todas las secuencias (27) de DENV-2 DHF contra todas las sondas de DENV-2 DHF (9). ....</b>	<b>196</b>
<b>Figura 60. Alineamiento entre secuencias de DENV-3 DF del 2010 (10) contra todas las sondas del DENV-3 DF (5). ....</b>	<b>197</b>
<b>Figura 61. Alineamiento entre secuencias de DENV-3 DF del 2010 (10) contra todas las sondas del DENV-3 DF (5). ....</b>	<b>198</b>
<b>Figura 62. Amplificación del fragmento DV1-DV3 del DENV de los 4 serotipos utilizando dos enzimas diferentes. ....</b>	<b>199</b>
<b>Figura 63. Optimización en las condiciones de inmovilización mediante exploración en el pH en la neutravidina. ....</b>	<b>201</b>
<b>Figura 64. Optimización en las condiciones de inmovilización mediante exploración de la concentración de neutravidina. ....</b>	<b>201</b>
<b>Figura 65. Condiciones finales ya establecidas de inmovilización de la neutravidina. ....</b>	<b>202</b>
<b>Figura 66. Amplificación del serotipo 3 del DENV (resuspensión del amplicon previamente precipitado) con primers DV1-DV3 que añaden la biotina al 5' para fijar el amplicon a la capa de neutravidina en el Biosensor. ....</b>	<b>203</b>
<b>Figura 67. Captura del amplicon del DENV-3 con biotina por la neutravidina y establecimiento de condiciones para la apertura de la cadena con hidróxido de sodio. ....</b>	<b>204</b>
<b>Figura 68. Establecimiento de las condiciones de hibridación de las sondas y apertura de la cadena mediante hidróxido de sodio. ....</b>	<b>204</b>
<b>Figura 69. Representación esquemática del diseño del Microarreglo de diagnóstico. ....</b>	<b>206</b>

<b>Figura 70. Representación esquemática del diseño del Microarreglo de diagnóstico para más pacientes. ....</b>	<b>206</b>
<b>Figura 71. Diseño de acomodo de la solución de impresión en la placa de 384 pozos.....</b>	<b>208</b>
<b>Figura 72. Hibridación de las sondas marcadas con el fluoróforo contra los amplicones del Dengue impresos en el Microarreglo. ....</b>	<b>209</b>
<b>Figura 73. Genoma estándar del Dengue.....</b>	<b>220</b>
<b>Figura 74. Serotipo 1 DHF.....</b>	<b>222</b>
<b>Figura 75. Serotipo 1 DF.....</b>	<b>223</b>
<b>Figura 76. Serotipo 2 DHF.....</b>	<b>224</b>
<b>Figura 77. Serotipo 2 DF.....</b>	<b>225</b>
<b>Figura 78. Serotipo 3 DHF.....</b>	<b>226</b>
<b>Figura 79. Serotipo 3 DF.....</b>	<b>227</b>

## Indice de tablas

<b>Tabla 1. Criterios de clasificación de reconocimiento de DHF y DSS en pacientes según la OMS [1, 30].</b>	<b>28</b>
<b>Tabla 2. Proteínas del Dengue: formación y función [1].</b>	<b>106</b>
<b>Tabla 3. Endemicidad-distribución u orden de aparición de los genotipos.</b>	<b>116</b>
<b>Tabla 4. Lista de sondas depuradas de DENV-1 DHF.</b>	<b>168</b>
<b>Tabla 5. Lista de sondas de DENV-1 DHF que alinean en otra secuencia.</b>	<b>170</b>
<b>Tabla 6. Lista de sondas depuradas de DENV-1 DF.</b>	<b>171</b>
<b>Tabla 7. Lista de sondas de DENV-1 DF que alinean en otra secuencia.</b>	<b>172</b>
<b>Tabla 8. Lista de sondas depuradas de DENV-2 DHF.</b>	<b>172</b>
<b>Tabla 9. Lista de sondas de DENV-2 DHF que alinean en otra secuencia.</b>	<b>174</b>
<b>Tabla 10. Lista de sondas depuradas de DENV-2 DF.</b>	<b>175</b>
<b>Tabla 11. Lista de sondas de DENV-2 DF que alinean en otra secuencia.</b>	<b>176</b>
<b>Tabla 12. Lista de sondas depuradas de DENV-3 DHF.</b>	<b>178</b>
<b>Tabla 13. Lista de sondas de DENV-3 DHF que alinean en otra secuencia.</b>	<b>180</b>
<b>Tabla 14. Lista de sondas depuradas de DENV-3 DF.</b>	<b>180</b>
<b>Tabla 15. Lista de sondas de DENV-3 DF que alinean en otra secuencia.</b>	<b>182</b>
<b>Tabla 16. Genomas de los 3 serotipos y de los 2 diagnósticos (6), mostrando region con más sondas alineadas.</b>	<b>183</b>
<b>Tabla 17. Concentración, medición por Nanodrop y precipitación de los amplicones del DENV.</b>	<b>200</b>
<b>Tabla 18. Descripción de alineamiento de las sondas.</b>	<b>227</b>
<b>Tabla 19. Descripción de alineamiento de las sondas.</b>	<b>228</b>
<b>Tabla 20. Descripción de alineamiento de las sondas.</b>	<b>229</b>



## Resumen

La interacción de virus-vector-hospedero, dan como resultado que se produzca una infección con determinado grado de virulencia por dengue virus (DENV), dependiendo de su patogenicidad. Ésta se han determinado que se asocia a ciertas regiones en el genoma del DENV que se han asociados a la alteración de los signos y síntomas en modelos de animales; aunado a esto y con los estudios de los brotes epidemiológicos se han determinado mediante la secuenciación de genomas completos, la existencia de genotipos asociados con un incremento del número de casos con diagnóstico de fiebre hemorrágica. Esto sugiere que el virus posee propiedades genéticas y proteínas específicas que afectan drásticamente el resultado de una infección por DENV, lo que seguramente le conferirle a este una mayor virulencia. Este conocimiento además de tener importancia en el entendimiento de la patogénesis de DHF, concibe un camino para el diseño de herramientas de diagnóstico altamente eficaces. La fabricación de un Biosensor de DNA puede ayudarnos en dicho diagnóstico ya que además de conferirnos la ventaja de detección del DENV en un gran número de muestras de pacientes y el mosquitos vector en un corto periodo de tiempo y con una alta sensibilidad, reproducibilidad y especificidad por un determinado serotipo. Asimismo nos permitirá detectar infecciones simultáneas por dos serotipos; y en un momento dado podremos discriminar incluso entre los genotipos. Por lo que se diseñó un Biosensor de DNA que incluso podría contribuir en el diseño de vacunas para el DENV.

## **Abstract**

The interaction between virus-vector-host may result in an infection that occurs with certain degree of virulence caused by dengue virus (DENV). Different regions in the genome of DENV have been identified to be associated with the alteration of signs and symptoms in animal models; this in conjunction with studies of outbreaks and complete genomes sequencing have been useful to identify different genotypes associated with an increased number of cases diagnosed with hemorrhagic fever, suggesting that the virus has specific proteins and genetic properties that dramatically affect the outcome with a DENV infection, that may confer greater virulence. This knowledge will be important in addition to understanding the pathogenesis of DHF, conceived a way to design highly effective diagnostic tools. Making a DNA Biosensor can help in the diagnosis as well as confer the advantage of detection of DENV in a large number of patient samples and mosquitoes in a short time and with high sensitivity, reproducibility and specificity for a particular serotype. It will also allow us to detect simultaneous infection by two serotypes; and at one point we even discriminate between genotypes. So a DNA Biosensor may even contribute to the design of vaccines for DENV.

# INTRODUCCIÓN

## 1 El Dengue

El Dengue es una enfermedad infecciosa aguda metantropoónica (el hombre como virtual huésped único sintomático) de etiología arboviral (siendo el mosquito el vector transmisor del virus) [1, 2]. El riesgo global de Dengue es muy alto con un estimado de 50 a 100 millones de infecciones anualmente, con medio millón de casos de dengue hemorrágico y 25,000 muertes en más de 100 países, siendo esta con una distribución del vector cosmotropical, donde el costo total anual de los tratamientos asciende a más de dos mil millones de dólares (basado en cifras de cinco países Americanos y tres Asiáticos), presentando un potencial de esparcimiento holoendémico geográfico a futuro. Debido a que en los últimos 50 años, la incidencia de Dengue ha aumentado 30 veces llegando a ser hiperendémico, causado por la sínantropia del vector (preferencia por zonas urbanas y rurales), donde la población mundial en riesgo es de más del 40% [3, 4, 5, 6].

### 1.1 Características clínicas de la enfermedad y sintomatología

El espectro de síntomas que se definen como Dengue fue determinado después de cientos de observaciones hechas desde 1920 en infecciones naturales o experimentales, después de un periodo de incubación de 3 a 15 días (usualmente 5 a 8) [1], comenzando los síntomas sorpresivamente seguidos de 3 fases: la fase inicial, la fase crítica (cuando empieza a disminuir la carga viral) y la fase de recuperación espontánea. La organización mundial de la salud (WHO) ha clasificado a la infección que genera DENV en los pacientes, dependiendo de la severidad de dicha infección, ya que esta puede variar, ya sea que presenten Fiebre por Dengue clásico (DF) o Dengue severo (Fiebre hemorrágica por Dengue= DHF o Síndrome de shock por Dengue= DSS) [3]. El Dengue clásico es caracterizado por

presentar un comienzo abrupto de fiebre (39.4-41.1 °C), conocida como fiebre aguda febril, dolor de cabeza frontal o retro orbital, mialgias, artralgias, dolor de espalda y varias partes del cuerpo, malestar, postración, sarpullido, leucopenia y enrojecimiento de la piel de la cara y cuerpo. Durante los días 2-6 de fiebre continua, se puede producir anorexia, náusea, vómito, sudoración intensa, linfadenopatía generalizada e hiperalgesia cutánea, terminando en crisis, en el último día de la fiebre o durante las siguientes 24 horas, una erupción macropapular duradera (1-5 días) puede aparecer y picazón en las palmas de las manos y plantas de los pies es común con descamación menos frecuente. La viremia generalmente coincide con la fiebre. Aparentemente un segundo incremento de la temperatura puede surgir resultando en un perfil de fiebre, es decir, la fiebre es bifásica. Hacia el final del periodo febril, las erupciones se desvanecen. Durante los picos febriles, los niños pequeños pueden presentar síntomas respiratorios como tos, dolor de garganta y rinitis [1]. En este diagnóstico, algunos pacientes se recuperan sin mayores complicaciones [4]. Por otra parte tenemos la fiebre por Dengue hemorrágico, estos síntomas comienzan como los causados por el Dengue clásico, es decir, en un principio son indistinguibles, seguidos, de 2-5 días después, con un rápido deterioro, colapso físico e incluso la muerte. Esta se presenta como una segunda fase de la enfermedad que además coincide con la defervescencia de la primera fase, esta es febril severa caracterizada por anomalías de la hemostasis [1] o síndrome de ruptura vascular con problemas de coagulación de sangre, donde incluso las células se pueden volver necróticas, siendo más evidente en niños y adultos jóvenes [4] incrementándose la permeabilidad vascular y capilar, con trasvasación al tejido extracelular de líquidos y proteínas [1]; es decir estudios de capilares de biopsias de piel, muestran distorsión e hinchazón con niveles altos de marcador de daño endotelial trombomodulina, aunque no halla daño severo de los vasos (disfunción) [4], con fácil aparición de

moretones, sangrado en los sitios de punción venosa, con manifestaciones de lesiones hemorrágicas pequeñas a manera de puntos en todo el cuerpo y en ocasiones en las mucosas de la cavidad oral (petequias), con una larga y espontánea equimosis, sangrado gastrointestinal, menorragia, sangrado de otros órganos, epistaxis y sangrado bucal; en algunas ocasiones se presenta hepatomegalia, todo lo anterior en conjunto en algunas instancias resulta en síndrome de shock hipovolémico mejor conocido como síndrome de shock de Dengue, siendo esta la etapa letal; donde el pulso es rápido (taquicardia) pero débil, acompañado de una presión sanguínea de <20 mm hg [1], ya que al inicio los mecanismos compensatorios fisiológicos son sobrerregulados en un intento de mantener la circulación adecuada en órganos críticos, lo cual genera la disminución en la presión arterial cuando la pérdida de volumen plasmático llega a ser crítico, presentándose signos de colapso vascular periférico [4], temperatura corporal baja y ansiedad [7], además puede ocurrir acumulación de suero que cause dificultad pulmonar y daño severo a órganos [3], en este diagnóstico, la resucitación efectiva se vuelve urgente, ya que ante la disminución de la presión sistólica y la ruptura vascular, es crucial estar al tanto de los signos vitales donde una resucitación no efectiva puede llevar a una muerte inminente [4]. La convalecencia por ataque severo de Dengue es caracterizado por una pronunciada bradicardia y una marcada astenia, así como depresión psicomotora puede ser evidente en varios pacientes, consistente con el nombre de “fiebre rompehuesos [1]. Tras una trombocitopenia severa, en la fase de recuperación, se observa un aumento plaquetario a las 48h, permitiendo que la permeabilidad vascular alterada revierta casi espontáneamente a niveles normales, además de una mejoría en los síntomas en general en los pacientes de una a dos semanas [4]c.

Los investigadores han observado que los pacientes que tenían DHF de diferentes áreas geográficas y diferentes brotes, no siempre se

presentaban con las mismas características clínicas, por ejemplo en Bangkok es común presentar Hepatomegalia, a pesar de que esta característica no es muy común para la enfermedad. Otro ejemplo es que en Indonesia se presenta sangrado gastrointestinal antes de la aparición del shock y además no coincide con la hemoconcentración típica, cumpliendo los casos en este país solo un 70% de los criterios de la Organización Mundial de Salud, todas estas variaciones podrían estar resultando posiblemente de diferencias étnicas, ambientes culturales, la veracidad de las evaluaciones clínicas y el estatus inmunológico de la población así como otros factores no reconocidos; También se han reportado casos de Dengue combinado con enfermedades causadas por otros Flavivirus e incluso coinfecciones con otro serotipo de Dengue [1].

En los últimos dos siglos, el Dengue ha sido conocido con los siguientes pseudónimos, la fiebre rompe huesos, fiebre “dandi”, dengüero, fiebre ramo, fiebre de la jirafa, fiebre polca, fiebre del quinto día o del séptimo día, fiebre remitente biliosa, etc. Probablemente el Dengue sea la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante en términos de morbilidad y mortalidad humana, generando el mayor problema de salud pública a lo largo de regiones tropicales y subtropicales [1], ya que la OMS calcula que 2500 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la infección [3].

## 1.2 Diagnóstico de la infección (pruebas de laboratorio y coinfecciones)

En las pruebas de laboratorio para el diagnóstico, se establece mediante la detección de componentes virales en el suero mediante métodos directos como el aislamiento de la partícula viral [8] y la hibridación del ácido nucleico como la RT-PCR o los Microarreglos [4,9], cabe mencionar que en células limfoblastoides B humanas tratadas con mitógenos, se puede observar la replicación in vitro del Virión, lo cual sería un método directo de detección viral [1]. Por otra parte también se

cuenta con métodos indirectos como el uso (PRNT y HI) o la identificación de los anticuerpos específicos (ELISA) tanto para la detección de componentes del huésped como los anticuerpos IgM e IgG y componentes virales como la capsula, de la proteína NS1 la cual es soluble y se desprende del polipéptido viral, o de la proteína E en la envoltura, con la cual podemos determinar el serotipo, ya que son 4 serotipos los que presentan al virus, ya que se tratan de virus del Dengue filogenéticamente y antigénicamente distintos [8,4]. La sensibilidad de cada técnica depende de la fase de la infección en la que se determine [4].

Las partículas virales han sido aisladas de ratón, cultivo celular y mosquitos vivos. De los cultivos de las células es factible obtener el aislado, por ejemplo de la línea celular C6/36 de *A. Albopictus* que fue desarrollada por su habilidad de crecer al virus (inclusive otros arbovirus), creando un alto título. Por mucho el método de aislamiento más sensitivo es la inoculación intratorasica de *T. Splendens* o *A. Aegypti* (incubándolos 14 días a 30 °C), incluso más que las líneas celulares. Aunque estas últimas hacen posible identificar al virus a los 6 días. Este sistema se mejoró por la inoculación en el mosquito usando la larva e identificando al virus a los 4-6 días. Estos métodos se han utilizado para aislar al virus de los pacientes confirmados en un 20-65% [1]; también algo que cabe señalar es que los títulos de Dengue son menores que los de la Encefalitis, esto se designa para enfermedad la primaria [10].

La identificación del serotipo a partir de los aislados primeramente se llevó a cabo con anticuerpos policlonales preparados con un ensayo de fijación estandarizado, o por neutralización de reducción de placa (PRNT), el cual no es más que el poder neutralizante de un suero, siendo una técnica muy sensible en virología, donde se mezcla a una suspensión de virus con suero, y si el suero tiene las Inmunoglobulinas

(Ig) específicos contra ese virus se evita la infección. La infectividad de la mezcla puede determinarse inoculando embriones de animales o cultivos celulares, en estos últimos se determina la neutralización si se inhibe el efecto citopático (degeneración celular) en fase líquida o si existe la producción de placa (multiplicación en el cultivo). El método fue exitoso ya que es muy sensible para la detección de anticuerpos contra Dengue, y los Ig producidos después de la primera exposición son comúnmente monoespecíficos, sugiriéndose que el título neutralizante contra el serotipo responsable de la primera infección es anastésicamente mejor que el título neutralizante contra el virus responsable de la segunda infección. Usando este ensayo de neutralización de reducción de placa, fue que se concluyó que los 4 serotipos pertenecían a una única y compleja especie de virus, estos datos nos dicen que el ensayo es muy amigable para estudios epidemiológicos, aunque es laborioso y tardado [1].

Después de la introducción de los anticuerpos monoclonales específicos (método Henchal) para cada serotipo, la identificación fue más sencilla y rápida, incluso cuando cambios significativos en los determinantes neutralizados hicieran difícil la serotipificación por PRNT. Estos Ig monoclonales son usados en inmunofluorescencia directa, ya que los antígenos son visualizados por microscopia fluorescente en células de mosquito, al igual que en la superficie de los linfocitos B durante estados agudos de DHF y DSS (estas observaciones pueden ser debidas a la fijación de los inmuno-complejos circulatorios al receptor Fc) Aunque actualmente son más ampliamente usados los métodos de ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), ya que se este ensayo puede modificarse para la detección de IgM y por lo tanto la determinación de la infección primaria [1]. Es decir, el diagnóstico serológico de infecciones primarias por Dengue se basa en la detección de niveles altos de IgM sérico anti-virus a partir de los 4 días después de que la fiebre comienza [4]. En esta etapa los ensayos

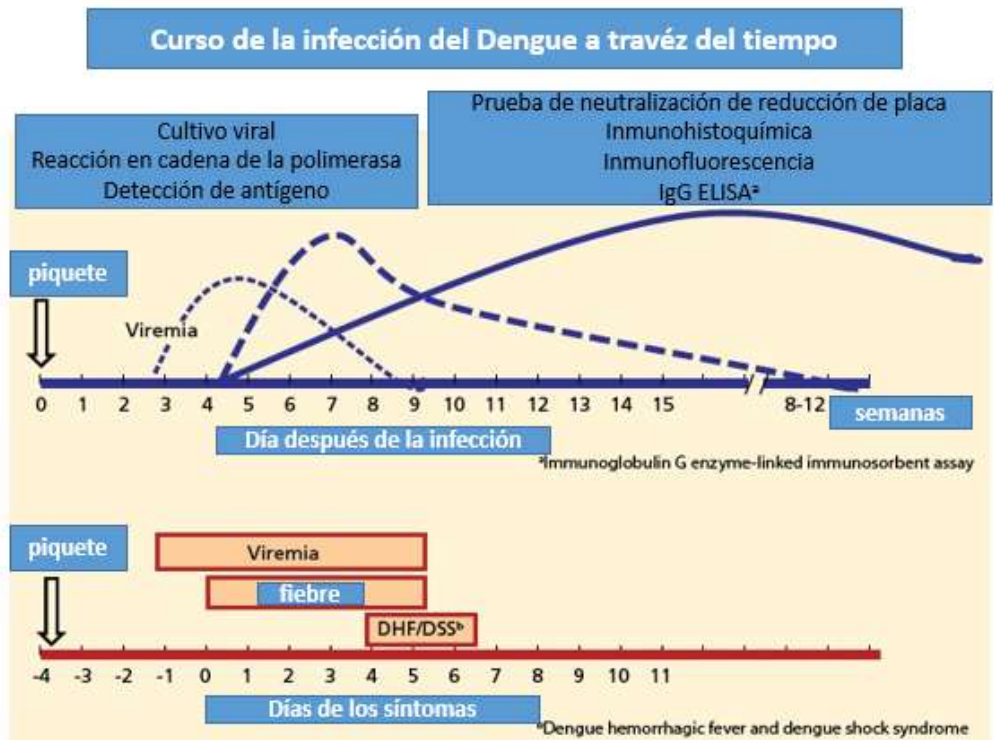


tienen del 10-78% de sensibilidad cuando el suero admitido es probado y >97% con suero convalescente, siendo ampliamente utilizado por investigadores para distinguir entre Dengue y Encefalitis japonesa en regiones geográficas donde ambos virus circulan comúnmente; donde además, pacientes con encefalitis que presentaban anticuerpos contra dengue en el suero, indicaban que se tiene probablemente una memoria inmunológica para flavivirus heterólogo [1, 10]. Por lo que esta prueba se emplea para detectar la seroconversión de IgM como una prueba confirmatoria cuando se trata de una infección primaria. Además los pacientes con infecciones secundarias presentan repuestas humorales rápidamente en donde los niveles de IgG específicos para virus de Dengue predominan sobre los de IgM, es decir, la infección puede determinarse como primaria o secundaria determinando el rango de unidades de IgM y IgG, ya que también una infección con varios epitopes o agentes compartidos, provoca una respuesta inmune por incremento de IgG, donde la IgM solo reconoce un único epítape. En lugares donde los diagnósticos con métodos moleculares no son posibles, el buscar niveles de IgM reactivo a Dengue o NS1, es un método básico [4]. Aun así habrá que recordar que el diagnóstico serológico es complicado por la existencia de la reacción cruzada de determinantes antigénicos compartidos por los 4 serotipos y otros miembros de la familia Flaviviridae que son reconocidos por las IgM, Por lo que es posible diferenciar entre una infección primaria y una secundaria. [1, 10, 11]. Para infecciones primarias para personas que no habían sido infectadas previamente (como es el caso de viajeros), la sensibilidad diagnóstica de la detección de NS1 en la fase febril puede exceder el 90% y la presencia de antígeno puede persistir por varios días tras la resolución de la fiebre. La sensibilidad de la detección en la fase febril es menor en las infecciones secundarias (60-80%) [4].

El método más ampliamente usado décadas atrás fue el ensayo de inhibición por hemaglutinación (HI), ya que fue reemplazado como una

prueba estándar serológica por la técnica de ELISA, donde se inhibe a los antígenos mediante Ig (incremento en título de Ig), quedando bien establecidos los estándares que diferencian entre una enfermedad primaria (primera exposición), la cual es detectada del 5to al 6to día después del comienzo de la fiebre, o una secundaria, la cual es detectada por una elevación en el título de HI al 2do-3er día debido a la presencia de altos títulos de anticuerpos IgG. En pacientes con la enfermedad primaria, al día 5 presentan IgM detectable el cual persiste hasta los 90 días, característica que se comparte con otros flavivirus, por otra parte tenemos al IgG el cual aparece el día 14 en la infección primaria, mientras que en la secundaria al día 2-3. Este IgG, se ha detectado hasta los 60 años después de la exposición, y debido a la durabilidad del IgM en respuesta a algunos flavivirus, se sabe que no necesariamente su presencia indica infección reciente. Pacientes de Dengue primario, usualmente tienen títulos de Ig de inhibición de la hemaglutinación convalescente de  $<1:1,280$ , por lo tanto el test de HI no sirve para distinguir el tipo de flavivirus [1, 10].

Métodos alternativos para la detección del material genético viral y el virus fueron posteriormente reportados y actualmente ampliamente utilizados, algunos de ellos son la hibridación de ácidos nucleicos y la unión competitiva de sitios multi-epitopes con anticuerpos monoclonales. La reacción de cadena de la polimerasa con retro-transcriptasa (RT-PCR), tiene el potencial para una detección sensitiva y rápida de los ácidos nucleicos virales [1], y puede hacerse durante la fase febril a partir del suero [4], pero por otra parte tenemos el uso de Microarreglos, donde con este método, podemos emplear un enfoque múltiple de detección, en contraste con la RT-PCR, la cual se limita a 4 objetivos; (figura 1) [9].



**Figura 1 Opciones de diagnóstico de laboratorio y métodos de detección como pruebas confirmatorias en pacientes con posible infección por Dengue.**

La detección en el suero durante la viremia del ácido nucleico viral, NS1 o la seroconversión de IgM son resultados confirmatorios en pacientes en donde la infección por Dengue es probable, día cero es el primer día cuando el paciente noto algún síntoma durante su enfermedad, cuando la IgM comienza a ser detectable, la viremia y la fiebre terminan apareciendo en el tercer día de la enfermedad afebril y declina su detección hasta el día 30-90, así como la IgG en infección secundaria suele ser detectable a los 3 días, diferente que en infección primaria donde suele detectarse después de los 10 días [7].

En cuanto al diagnóstico de la infección, resultados de laboratorio revelan un decremento del conteo de los leucocitos (leucopenia) periféricos con una absoluta granulocitopenia y un conteo plaquetario

por abajo de los  $<100,000/\text{mm}^3$  (trombocitopenia) en un caso DHF [1], esta última puede ser severa o moderada, ya que también puede aparecer en el rango de  $20 \times 10^9/\text{L}$  células [4].

La organización mundial de la salud, ha definido criterios estrictos para describir y reconocer DHF y DSS dentro de 4 grados de acuerdo a la severidad de la enfermedad (tabla 1). La hemorragia independientemente del sitio y severidad, cuando no es acompañada por trombocitopenia e hipovolemia, no satisface el criterio de DHF, ya que estos 2 diferencian al grado A y B de DHF, del Dengue clásico con manifestaciones hemorrágicas. El shock es el criterio para distinguir entre el grado A y B del grado C y D [1, 3].

**Tabla 1. Criterios de clasificación de reconocimiento de DHF y DSS en pacientes según la OMS [1, 3].**

<b>Grado de la enfermedad</b>	<b>Síntomas</b>
A	Fase febril con síntomas diversos y prueba del torniquete positiva como la única manifestación hemorrágica
B	Igual que el grado A, pero con manifestaciones hemorragias espontaneas como petequias etc.
C	Signo de alerta: Falla en la circulación con pulso débil y estrecha presión ( $<20 \text{ mmHg}$ ) o hipotensión
D	Falla multiorganica, shock profundo, sin presión y pulso detectables.

Por último, en cuanto al diagnóstico de infecciones simultáneas, algunos investigadores han reportado en varios países una infección con Dengue combinada con infección de la Encefalitis Japonesa [1]; también en un estudio sobre diagnóstico, se desarrolló un Microarreglo que podía serotipificar el Dengue en el suero del humano y en los mosquitos, el sistema además de poder distinguir entre los 4 serotipos, podía diagnosticar infecciones duales con diferentes serotipos, encontrando dos casos de coinfección, de igual manera se tenía capacidad de la detección de otros flavivirus animales y humanos [9].

### 1.3 Mecanismos de patogénesis y patología (de DF a DHF)

Los factores de riesgo y mecanismos de patogénesis para DHF y DSS en humano son controversiales y no entendidos completamente, debido al número limitado de huéspedes naturales del virus así como de un modelo animal óptimo [1,4].

En lo que respecta al huésped humano, después de un gran trabajo en Tailandia, Halstead propuso la hipótesis de la “infección secundaria” o “potenciamiento de la infección inmunitaria”, además de que varios estudios sugieren que los individuos que tuvieron una previa infección con algún serotipo del Dengue, sus anticuerpos específicos para ese serotipo (inmunidad), ahora resultan ser no-neutralizantes para otro serotipo, creando una reacción cruzada inesperada, que facilita la infección y por lo tanto se encuentran en riesgo de desarrollar DHF que podría derivar en DSS, es decir, de esta manera el sistema inmune sensibilizado responde de una forma más agresiva generando peores síntomas [1, 8], por lo que de manera paralela al trabajo de Halstead, estudios epidemiológicos han demostrado una clara correlación entre la enfermedad severa e infecciones secundarias con un serotipo distinto a la primoinfección, es decir, bajo ciertas condiciones los anticuerpos anti-

DENV podrían estar generando una reacción cruzada induciendo el Fenómeno de potenciamiento dependiente de anticuerpo=mejora dependiente de anticuerpo (ADE) de la infección, resultando en una infección severa, por lo que estos estudios han demostrado que la infección primaria es específica de “tipo” predominantemente, mientras que las respuestas cruzadas se han visto en infecciones secundarias. El fenómeno ADE aumenta la carga viral que entra a las células blanco que presentan el receptor FcY, esto se debe a la hipótesis de que los anticuerpos no neutralizantes o sub-neutralizantes dirigen al virus hacia células con receptor de Fc (FcYR), como monocitos, macrófagos y células dendríticas, las cuales son blanco natural del virus, resultando en un título mayor de infección de células, lo cual eventualmente, potencia la enfermedad. También estudios han demostrado que la opsonización del virión ocurre cuando el título de anticuerpos es menor que el umbral; Los anticuerpos podrían potenciar la unión del virus a la superficie celular y facilitar la entrada del virión vía endocitosis. Esto no solo aumenta el número de células infectadas sino que también aumenta las partículas virales por célula infectada. También en los últimos años se ha demostrado que la entrada mediada por FcR suprime la respuesta antiviral inducida por disminuir la producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y óxido nítrico y aumentar la producción de IL-12 e IL-10. No solo los anticuerpos anti-E se han visto implicados en el fenómeno de ADE, sino que también los anticuerpos anti-prM, sin embargo estos potencian la infectividad con viriones inmaduros y no tienen un efecto significativo en los virus producidos por la célula infectada [4]. Estos mismos estudios epidemiológicos han demostrado que una infección primaria de infantes de menos de 1 año de edad, debido a que sus madres pudieron haber tenido previamente una infección con DENV en el embarazo y él bebe pudo haber adquirido los anticuerpos que potencian la infección secundaria por otro serotipo, lo que incrementa el riesgo de desarrollar dengue hemorrágico, de manera similar a las

infecciones secundarias con un serotipo heterólogo [3,4]. Por lo tanto patrones espaciales y circulación secuencial de DENV-1-4 suelen ser considerados junto con la genética del hospedero como factores de riesgo poblacional importantes para la enfermedad del dengue severo [8]. Asimismo se ha demostrado que en la presencia de anticuerpos de otros flavivirus que causan reacción cruzada debido a la vacuna de virus atenuados de Dengue-2, solamente aquellos anticuerpos que actuaron contra el Dengue, contribuyeron a la enfermedad severa [1, 13].

También se sabe que las células T contribuyen a la inmunopatogenesis participando en la cascada pro-inflamatoria generando niveles elevados de  $TNF\alpha$ ; de esta manera la respuesta inmune humoral no solo está implicada en la inmunopatogenesis, sino que también causa protección; por lo que es importante señalar un papel importante de la proteína NS1 en la patogénesis de DHF en humanos ya que tiene la capacidad de modular la respuesta del complemento en el hospedero, y tal evento podría estar relacionado con el aumento de la permeabilidad vascular [4].

También se han realizado estudios donde se plantean algunos polimorfismos genéticos que causan cierta predisposición asociada a un incremento de riesgo de padecer un Dengue grave, por ejemplo polimorfismos en el gen  $TNF\alpha$  y  $TGFB$ . Otros polimorfismos que en cambio parecen beneficiar, son los que se dan en el gen del receptor de la vitamina D, los cuales al parecer ofrecen cierta protección contra el desarrollo de formas graves tras la infección con un segundo serotipo. También se ha reportado que una anomalía genética común en África que es la deficiencia de glucosa-6-P, parece aumentar el riesgo a Dengue grave.

Todo lo que se ha reportado hasta hoy son estudios en cultivos celulares de células Dendríticas (DCs), modelos animales que se han utilizado (cada uno con sus limitaciones), los datos clínicos reportados y los

episodios epidemiológicos que se han analizado con ayuda de herramientas bioinformáticas y matemáticas [4]. Otros factores que se ha observado que contribuyen al incremento del riesgo de enfermedades severas [1]; son los genotipos virales, donde se sabe que hay unos más virulentos que otros, capaces de generar brotes y desplazar a otros genotipos existentes en el área geográfica. Esto es indicativo de la posibilidad de reconocer propiedades en el genoma del virus que pueden influir en la manifestación de los signos de la severidad de la enfermedad en los individuos (véase capítulo 4 Virulencia, patogenicidad y severidad) [4].

En cuanto al estudio de los episodios epidemiológicos y brotes, en primer instancia, estos sugieren la presencia de propiedades genéticas asociadas a virulencia; donde las primeras descripciones en la diferencia de virulencia de DENV, fueron observadas en estudios epidémicos y entomológicos en el Pacífico Sur por Rosen y Gluber en 1970. Ellos notaron que algunos brotes en esta región presentaban menor número de casos de DHF donde los virus transmisores se consideraron de menor virulencia; otros brotes presentaban mayor número de casos después de la primoinfección y estos virus se consideraron de mayor virulencia. Sin embargo, no fue hasta el desarrollo de las técnicas de secuenciación de RNA y el uso de estas secuencias para la generación de árboles filogenéticos de relaciones evolutivas entre los virus para descubrir que ciertas variantes de grupo o genotipos, se encuentran más frecuentemente asociados con epidemias de Dengue y enfermedad severa. Más recientemente se ha mostrado que ciertos genotipos asociados a DHF se han introducido y se han establecido endémicamente en otros continentes, desplazando a los DENV menos virulentos (que muchas veces solo causan DF) ya establecidos en estas regiones. Los genotipos más “virulentos” se han descrito para los serotipos 2 y 3 y todavía falta estudiar si estudios evolutivos señalan grupos similares en los serotipos 1 y 4.



Con todo esto, es que podemos hablar de factores intrínsecos/extrínsecos generales que influyen en la patogénesis de la infección con resultado severo en humanos; donde los factores que distinguen la inmunopatogenesis por anticuerpos de reacción cruzada no son claros y su entendimiento podría contribuir a un mejor diseño de vacunas [4].

En lo que a patología respecta, el examen para determinarla en la piel con cuadro de fiebre clásica, es que se muestre hinchazón endotelial, edema perivascular e infiltración de células mononucleadas. En material de biopsia, no se han encontrado virus ni antígenos virales, sugiriendo que las pústulas macropapulares pueden ser causadas por inmunoglobulinas o por otro mecanismo que no muestre infección directa en la piel. Al analizarse tejidos de casos fatales de DHF y DSS, se observa hemorragia en el corazón, tracto gastrointestinal y tejidos subcutáneos, así como cambios histopatológicos significativos como la degeneración en el hígado, células de kupffer y cuerpos de councilman, por otra parte se han visto cambios en el sistema reticuloendotelial. Dilatación, congestión de los vasos y edema de las paredes de las arterias son comúnmente encontradas, así como la acumulación de fluidos en las cavidades corporales, además se observa proliferación de linfocitos jóvenes, células plasmáticas y células del revestimiento sinoidal en el bazo y nódulos linfáticos, así como una acelerada actividad fagocítica de los linfocitos. Se puede presentar hipoplasia de la médula ósea, atrofia aguda y pérdida del timo, delación y atrofia de las células en las vainas linfáticas periarteriales del bazo y del área paracortical de los nódulos. Varios de los tejidos afectados son áreas timo-dependientes del baso, los nódulos y del timo mismo, y se ha sugerido que la inmunodepresión puede ser una parte integral de la patofisiología de DHF, consistente con esto es que los antígenos del Dengue fueron localizados en monocitos y estos como células asociadas a membranas basales del glomérulo y en células

mononucleadas cercanamente infiltradas a las paredes de los vasos sanguíneos en las papilas dermales. En microscopia electrónica se ha visto que las células endoteliales tienen un incremento en las vacuolas y vesículas pinocíticas, esto es importante en el transporte de los fluidos plasmáticos del capilar al espacio pericapilar. Se ha observado que el virus puede infectar células hematopoyéticas alterando su capacidad proliferativa. Evidencia de que las células mononucleadas, macrófagos o monocitos son blanco del virus, se deriva de que se ha observado que las células mononucleadas filtradas de tejidos afectados contienen antígenos virales. El virus puede regularmente ser aislado de fracciones leucocíticas de sangre periférica, donde a cultivos de monocitos se pueden infectar con virus en presencia o ausencia de anticuerpos que generan la reacción cruzada [1].

Otro rubro importante en los mecanismos de patogénesis se desprende del análisis reciente de diferencias nucleotídicas en las secuencias del genoma del virus entre los distintos genotipos, nos señala que repercute directamente en la frecuencia del uso de codones en la traducción, además de que se ha observado que ocurre desplazamiento de secuencias por aquellas con mayor frecuencia de uso de codones para tRNAs más abundantes o disponibles, esto nos permite asociar dicho desplazamiento con una mayor eficiencia de traducción del genoma del virus, consecuentemente esto estaría alterando la patogénesis observada ya sea aumentando la severidad o disminuyéndola [4]. Es decir, debido a que en las células de las especies animales huéspedes (mosquitos, el hombre etc.), disponen de una cantidad más elevada de tRNAs que de otros, es que resulta más eficiente la traducción de ciertos codones y por lo tanto de unas secuencias que de otras, inclusive, aunque los codones de las distintas secuencias de los genotipos, solo tengan cambios en la tercera base del codón (codones homólogos), y generen ante la traducción el mismo aminoácido, pueden tener distintas eficiencias de traducción dependiendo del uso de codones y por lo tanto

es que se comienza a desplazar a la secuencia que presenta menor frecuencia.

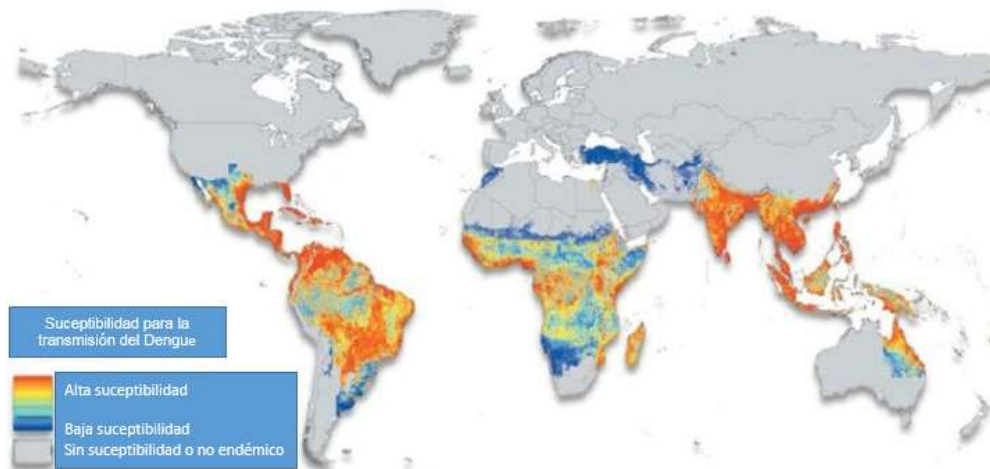
partes importante señalar que regiones que presentan mayor presión de selección, presentan variabilidad genética, como ocurre con NS1, NS3 y NS4B, donde los cambios de nucleótidos en estas regiones podrían estar alterando la estructura secundaria del RNA en la etapa de replicación, de manera que la eficiencia se altere, ya que la formación de la estructura secundaria del RNA resulta una forma de regulación de la síntesis del RNA que será como molde nuevas rondas de replicación o como sustrato para la encapsidación; pero aún más importante, es que dichas regiones más que considerarlas como mecanismos de patogénesis ya establecidos por DENV, se podrían considerar como regiones genéticas que favorecen una mayor virulencia de las cepas y por lo tanto una mayor severidad en la infección que genera este virus [4].

## **2 Patrones epidémicos**

El virus del Dengue es el arbovirus con mayor propagación geográfica, ya que se encuentra disperso en bastantes naciones, las cuales contienen zonas tropicales y subtropicales (distribución principal del vector), donde 2.5 mil millones de personas están en riesgo de contraer la infección, ya que la incidencia de Dengue ha aumentado y seguirá este proceso de expansión hacia nuevos países y nuevas regiones rurales y urbanas, tornándose de una enfermedad hipoendémica o mesoendémica en algunos casos, a una enfermedad con grado de endemicidad hiperendémica (se presenta en áreas donde la intensidad de transmisión e incidencia es persistente por años o largos periodos aunque temporal o estacionaria, donde la inmunidad de la población es insuficiente para prevenir los efectos de la enfermedad) y con riesgo

a llegar a ser holoendémica (figura 2). Más de 50 millones de casos ocurren anualmente, y se desconoce y no está claro si dichos casos o reportes totales de los 4 serotipos son representaciones de una forma epidémica de transmisión persistente del virus o solo desbordamientos esporádicos del ciclo de transmisión selvática [8], ya que se tiene información que sustenta ambas hipótesis; lo que sí es claro, es que se ha demostrado por análisis de secuencias, que el virus del Dengue que participa en los ciclos de transmisión selvática es diferente al virus asociado a los brotes epidémicos de transmisión en los asentamientos humanos urbano-rurales [1], lo cual de manera concluyente nos dice que cual fuera la hipótesis más aceptada sobre los reportes de casos de Dengue, simplemente los virus participantes en los dos tipos de nichos, son diferentes genéticamente. Cabe señalar que la confusión viene a partir de que existe evidencia de que los serotipos se conducen de manera cíclica en dichos asentamientos humanos, lo cual es característica de los virus selváticos, y por lo cual se plantean las siguientes dos hipótesis, a manera de dar una mejor explicación; es decir, por una parte los investigadores han planteado un posible desbordamiento del ciclo selvático ya que se tiene bien documentado que existen especies salvajes de mosquitos como *A. niveus* (subgénero Finlaya) y *A. taylori* o *A. furcifer* (subgénero Diceromyia), que son parte del mantenimiento del ciclo selvático en la selva del sureste Asiático y en África (sub-sahariano), tal y como se comprobó un ciclo selvático para el virus de la fiebre amarilla en el centro de América. Donde el ciclo funciona de la siguiente manera; dichos mosquitos son hospederos naturales del virus del Dengue, y con lo cual podemos decir que son primarios dentro de dicho ciclo; estos infectan a primates no humanos (babuinos, monos, chimpancés etc.), los cuales también son hospederos naturales del virus; estos mamíferos posteriormente pueden ser picados por otras especies de mosquitos sinantrópicos, es decir no salvajes, donde debido al desplazamiento de las especies

(mamíferos y mosquitos) dentro de los límites de una zona salvaje y una zona rural con presencia de actividad humana (desplazamiento fortuito del virus a estas nuevas zonas habitadas por el hombre), donde dichas especies de mosquitos sinantrópicos son *A. aegypti* y *A. albopictus*, el cual además puede llevar acabo su ciclo de vida en zonas de transición selvática-urbana, quedando como un potencial vector del virus hacia los hospederos humanos, los cuales mantienen una relación interespecífica con dichos mosquitos sinantrópicos, quedando susceptibles los humanos a contraer el virus creando una infección sintomática, ya que es la única y virtual especie que parece presentar los síntomas de la enfermedad (virus-metantroponótico). Al mostrarse infección aparente de ciertas especies de mono, hizo que se sugiriera que se podía estar transmitiendo el virus de una manera similar al ciclo selvático del virus de la fiebre amarilla y por consiguiente que se planteara esta hipótesis [1, 4, 8]. Por otra parte o como una segunda hipótesis, es que los casos podrían solo ser reportes de representaciones de formas epidémicas de transmisión que podrían estar siendo afectados y regulados por la combinación de cambios demográficos, ambientales e inmunológicos (Walker demostró que una variación antigénica significativa puede ocurrir dentro de un año epidémico en un área geográfica definida), causando que el número de reportes o casos por infección varíe cada año, con epidemias de 3 a 5 años con tendencia cíclica entre los serotipos, por ejemplo, influencias climáticas como el fenómeno de “El niño” y el calentamiento global se han sugerido como factores que contribuyen al patrón cíclico del Dengue en dichos asentamientos humanos [3, 4, 14].



**Figura 2. Riesgo global de Dengue.**

La determinación del estatus de riesgo global se basó en los reportes combinados de la Organización Mundial de la Salud (WHO), los Centros de Control de Enfermedades (CDC), Gideon Online, ProMED, Eurosurveillance y Dengue Map [4].

## 2.1 Dengue en el mundo

El primer escrito epidemiológico que se tiene del Dengue como enfermedad (fiebre de las articulaciones), ocurrió en 1779 en brotes simultáneos en Batavia (Yakarta) y el Cairo [1], aunque se sospecha de infecciones tipo Dengue reportadas en Martinique Guadalupe y Panamá en 1699, es decir, que la introducción del Dengue a América este datando del siglo XVII, sin embargo, es difícil confirmarlas sin evidencia clínica que lo sustente [4].

Subsecuentemente a los brotes de Dengue anteriores al siglo XX, fueron reportadas descripciones de brotes en Philadelphia en 1780 por Benjamín Rush, en Zanzíbar en 1823, Calcuta en 1824, y se tornaron comunes en los puertos de las ciudades del Caribe, centro y al sur de América, siendo relacionados con actividades comerciales. Entre 1827

y 1828, un brote se suscitó en el Caribe y el Golfo de México, sin embargo, no fue hasta la epidemia de 1828 en Cuba que la infección fue nombrada Dunga, posteriormente cambio a Dengue [15]. Entre 1845 y 1849 existe evidencia de brotes parecidos a Dengue en Nueva Orleans, Cuba y Brasil. En 1873 en Nueva Orleans ocurrió uno de los brotes más grandes (40,000 personas afectadas), seguido de varios brotes de relevancia en este país en los años siguientes [4], también se presentó un brote en Queensland 1897. En regiones donde es endémico el virus de Chikungunya, se cuestiona si los brotes ocurridos pueden ser atribuidos totalmente al virus del Dengue, debido a las características clínicas similares que presentan [1, 16].

Los mayores brotes epidémicos y la mayor cantidad de reportes de Dengue han ocurrido en el siglo XX en intervalos irregulares por donde sea que el mosquito se halla encontrado, ya que este es el vector. Algunos grandes brotes del siglo XX ocurrieron en E.U.A. en 1922, Australia en 1925, Grecia y Durban 1927, Formosa 1931, Japón 1942-1943 y Tailandia 1982, Así como algunos reportes ocurrieron en Hong Kong en 1901 [1], Polinesia Francesa en 1943 (primer DENV-1 confirmado), Hawái 1944-1945 (DENV-1), Papua Nueva Guinea e Indonesia en 1944 (primeros DENV-2 confirmados) y en los 70s (DENV-2 y 3) en Indonesia, Filipinas en 1954-1956 y en los 80s (DENV-2) además en 1953 (primer DENV-3 confirmado y primer DENV-4 confirmado), Malasia en los 60s (DENV-2) y en los 70s (DENV-3), Tailandia en 1953 y cada año a partir de 1973 y hasta 2010 (DENV-3, también primer caso de este serotipo confirmado) y en los 60s (DENV-2) así como en 1953 (también primer reporte de DENV-4 confirmado) y de 1999 a 2002 (también DENV-4) y entre 1943 y 1959 (DENV-1), y existen reportes de 1960 a 1969 aunque serotipo no específico, China y Singapur en los 80s (DENV-2) y en los 90s (DENV-3), sur de India entre 1943 y 1959 (DENV-1) y en varias regiones del subcontinente en los 80s (DENV-2) y existen reportes de 1960 a 1969 aunque serotipo no

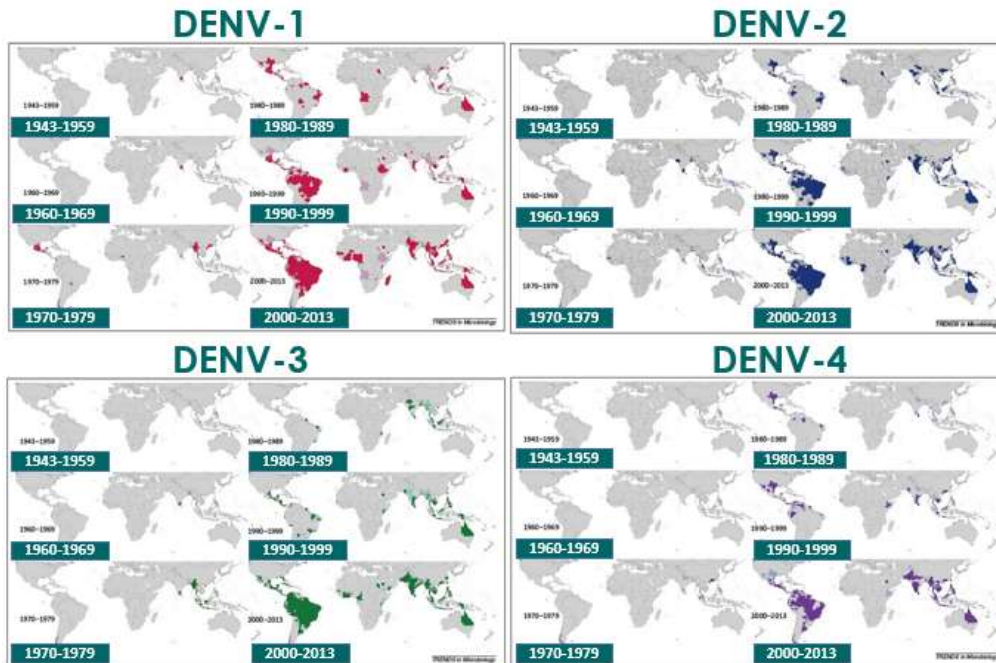
especifico, Japón 1943-1959 (primer DENV-1 aislado), Camboya y Vietnam en los 90s (DENV-2 y 3), Laos de 1960 a 1969 aunque serotipo no especifico, Sri Lanka en los 80s (DENV-2 y 3) y a partir de 1978 (DENV-4) y por último para Asia, en los 90s y 2000s en Arabia Saudita (DENV-1 y 3), aunque miles de reportes al sur de Asia han ocurrido en los últimos 15 años. En África se sabe que en Sudan se reportó en 1984 (DENV-1) y se tienen reportes de 1970 a 1979, Nigeria 1964 y 1968 (DENV-2), Gabón en el 2010 (DENV-2), Kenia en el 2013 (DENV-2) y Mozambique 1984-1985 (DENV-3), así como reportes en Namibia y Etiopia en 1980-1989, y en los 90' y 2000-2014 también se dieron reportes en algunos países del continente, cabe mencionar que muchos estudios de arbovirus se comenzaron a conducir en la zona desde los 80s como respuesta a un esfuerzo para incrementar el número de reportes, ya que en el este del continente a pesar de la presencia del Dengue, casi no existe información de las locaciones específicas de los brotes [8]. Por último se tienen reportes en Australia de 1980 a 1999.

Son varios los factores que permiten una expansión geográfica de la enfermedad, por lo que fue después de la segunda guerra mundial que los reportes de detección y las epidemias, incrementaron drásticamente, en unas áreas más rápido que en otras. En la región que va de India a las islas del Pacífico [8] y sureste asiático, se presentaron los casos en cientos de miles cada año, donde los 4 serotipos pueden ser encontrados con nuevos patrones endémicos de la enfermedad acompañados por un incremento en la incidencia de la forma severa del Dengue DHF y DSS azolando la zona, siendo menos común este tipo de diagnóstico en otras zonas dejándonos claro que las enfermedades más serias DHF y DSS, no fueron elementos muy comunes de los brotes de Dengue en ciertas regiones [1], además, según la división de población de las naciones unidas, Asia y África en 2030 tendrán cuatro quintas partes de la población mundial, por lo que monitorear la



dispersión de los serotipos en estas regiones será bueno para poder responder mejor a la enfermedad [8].

Esfuerzos por tratar de tener un informe completo de todos los casos reportados y confirmados (artículos, bitácoras, periódicos y reportes de ministerios de salud, un total de 3276 recursos en 4 idiomas fueron analizados y reportes sospechosos fueron excluidos), han dado paso a la elaboración de los mapas mundiales, por país y regionales, más actualizados, donde se muestra la distribución-dispersión, aumento y patrones endémicos de la enfermedad de cada uno de los serotipos a lo largo de 70 años desde la segunda guerra mundial (divididos en periodos de 10 años), esto con el fin de dar un mejor entendimiento a la progresión de la transmisión hiperendémica y a los patrones de la enfermedad ya que se puede apreciar el incremento y dispersión de la infección provocando una co-circulación de los 4 serotipos y por ende una co-infección e infección secundaria; reportándose de mayor a menor número, con un total de 1956 para DENV-1, 1931 para DENV-2, 1631 de DENV-3 y 1000 de DENV-4. particularmente intensificadas en los 90s, fueron mapeadas, así como 1811 infecciones que no fueron atribuidas a ningún serotipo, por otra parte, la escasez de información tipo específica y geográfica, como por ejemplo, en varias partes de África (que poco nos dice en cuanto a la historia evolutiva, dinámica actual, transmisión y esparcimiento de la infección en la región), hacen que a pesar de este gran trabajo, sea imposible hacer inferencias acerca de la prevalencia relativa de cada serotipo en una localidad dada, aunque la amplitud de este trabajo también nos permite obtener mucho más detalles de la propagación, que los reportes que se tenían disponibles anteriormente, dejándonos entrever que es necesario urgentemente la recolección de la información (figura 3) [8].



**Figura 3. Distribución espacial de Dengue en los últimos 70 años.**

La distribución espacial global de los casos confirmados de DENV-1, 2,3 y 4 por periodo de tiempo [8].

## 2.2 Dengue en América

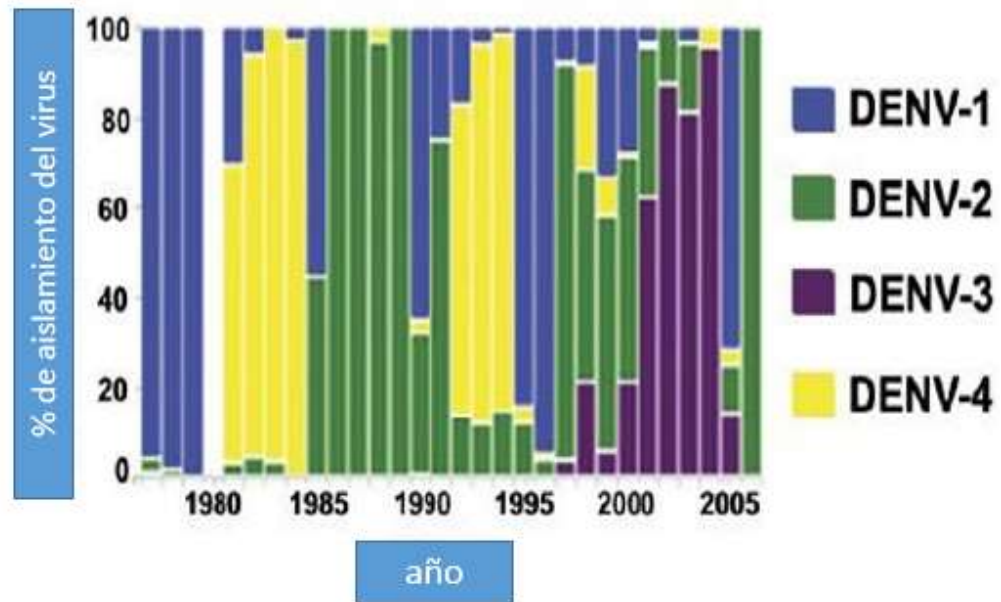
Más allá de los reportes generados antes del siglo XX en América, se observó que a principios de dicho siglo, hubo una amplia distribución de la enfermedad, incluyendo regiones más al norte de los Estados Unidos y países más al sur del continente como Chile y Argentina, no obstante, la historia de la infección de Dengue en América se puede resumir en guerras ganadas y perdidas [15].

Para el Sur de los Estados Unidos de América, la epidemia de Dengue en el sur de E.U.A. afectó de 1 a 2 millones de personas en 1922, y aunque después de una ardua campaña se controló la población del mosquito, aún existía la incertidumbre de una posible reintroducción de la enfermedad. A partir de 1977 se confirmaron casos de introducción

del Dengue, así como de 1980 a 1989. En los 90s el vector asiático del virus del Dengue *Aedes albopictus*, se estableció en el este de E.U.A. en zonas con una latitud más elevada 42° N [1].

Para Latinoamérica, existieron grandes epidemias en 1952 y 1963 [1], así como reportes en 1953 en Trinidad y Tobago (DENV-2/genotipo americano), siendo aquí la primera vez que se aislaba de una muestra de paciente con DF este genotipo, al final de los 60s y principio de los 70s en Puerto Rico (siendo el que presentó el mayor número de casos 27,000 personas) y las regiones cercanas en el Caribe se presentaron epidemias (DENV-2) así como en 1963 y hasta 1978 (DENV-3) y de nuevo de 1994 a 2008 pero con otro genotipo asiático de DENV-3, también Puerto Rico reportó desde 1981 y hasta los 90s al igual que otros países de la región (México, Centro y Sudamérica) y demás islas caribeñas (Antillas) el serotipo 4/genotipo I. Por otra parte Jamaica también presentó un brote en 1963-64, considerándose parte del primer gran episodio epidémico fuerte junto con el de Puerto Rico dentro de este periodo, ya que el segundo episodio se presentó en 1968- 1969, donde se aisló DENV-3 genotipo V (una sepa de origen asiático). Desde el colapso de la campaña de erradicación en América del vector *A. Aegypti* en los 60s-70s y mediante el comercio asiático, hubo la introducción de otros serotipos a Centro y Suramérica y El Caribe resultando en grandes epidemias entre 1970 y 1979 (Barbados, Cuba, Antillas Francesas, Granada, México, Colombia, Paraguay y Puerto Rico, todos de DENV-1) y 1981 (Cuba DENV-1, 2 (genotipo asiático) y 4), con 344,203 reportes siendo 10,312 casos de DHF (siendo el primer episodio de DHF reportado en esta región y 158 muertes); los reportes también incrementaron en Brasil, México, Colombia, Costa Rica, Guyana francesa, Paraguay, Perú, Venezuela y Puerto Rico (todos de DENV-1) en las décadas siguientes (80s-90s), donde a pesar de la rápida dispersión, la incidencia de DHF permaneció baja hasta un episodio de DHF reportado en Venezuela en 1989-1990 donde presentó

6,000 casos y 73 muertes, siendo DENV-2 el más asociado con los casos fatales, con el mismo genotipo (asiático) que la epidemia de Cuba en 1981. Los reportes alcanzaron su punto máximo 2005-2006, al igual que se reporta en Brasil en 1984 (DENV-2) y a mediados de los 2000s (DENV-3) así como en 1981 (DENV-4), también se reporta en Dominica y las Islas Vírgenes US en 1981 (DENV-4), por último Venezuela, Colombia, Nicaragua Brasil y Perú, reportaron al serotipo 4 desde los 90s hasta los 2000s [8], también en 1994, DENV-3/genotipo III, fue reintroducido en América inicialmente en Nicaragua y Panamá (469 casos), siendo Nicaragua el que reporto mayor número de casos (19,260 para el año de 1995); posteriormente se distribuyó a América central y México en 1995. Desde entonces múltiple serotipos se hicieron endémicos en varios países en América tropical y sub-tropical (es decir se les asocia a brotes y no solo casos aislados, figura 4), además de un incremento en el número de casos de manifestaciones hemorrágicas han sido reportados cada año en el Caribe desde la gran epidemia en Cuba [17], es decir, desde los 90s probablemente debido al reemplazo del genotipo americano DENV-2 por el genotipo importado asiático 1 (DENV-2) que es más virulento, es que el DHF viene en incremento [4, 8]

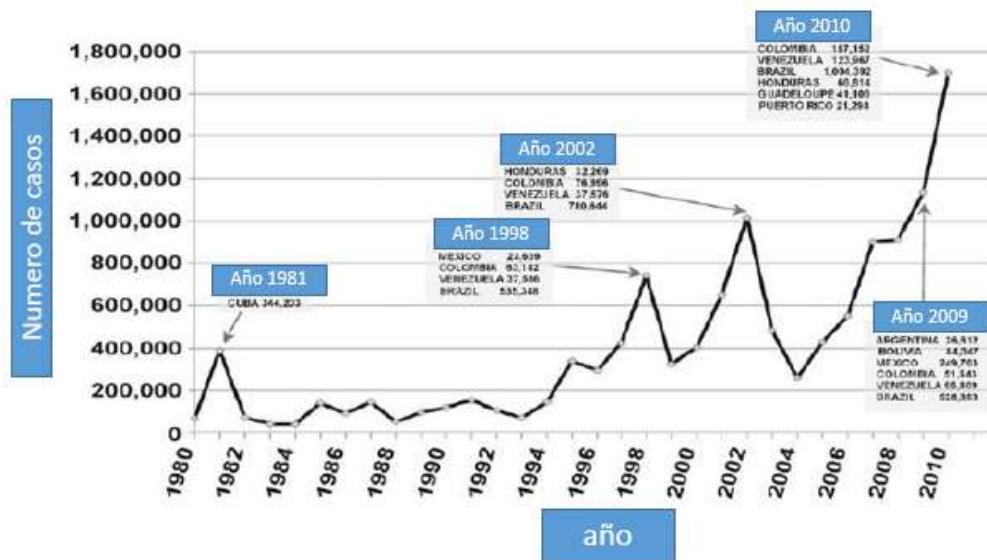


**Figura 4. Representación de los desplazamientos de los serotipos en América desde 1980.**

Histograma que muestra el porcentaje de infecciones confirmadas por aislamiento del virus para cada serotipo por año [4].

Durante los años 2000-2010, el número de casos reportados en América ha aumentado sin precedentes, circulando los 4 serotipos y se han sobrepasado los más altos records de la última década. Presentando dos episodios sobresalientes, en 2002; PAHO reporto un total de 1, 015,420 casos incluyendo 14,374 casos de DHF y 255 muertes, siendo de Brasil el 75% de los casos. Para este brote se reportó a DENV-3 como el responsable de la mayoría de los casos. En 2010, más de 1.7 millones de casos, 50,235 clínicamente severo y 1,185 muertes. La tasa de mortalidad se elevó a 2.6%, presentándose varios brotes en distintos países, siendo Colombia el que presento mayor número de casos, asociados a DENV-2. Brasil duplico sus cifras de infección alcanzando el millón de infectados en este año, con prevalencia de DENV-4; Honduras con el peor brote de su historia con 66,814 casos con prevalencia en niños de 9-15 años siendo DENV-2, el

serotipo mayormente reportado, y entre el 2000 y el 2014 ya se han presentado reportes en Argentina y Uruguay (figura 5) [4].



**Figura 5. Cifras de casos de infección por Dengue en el periodo de 1980-2010 en América.**

Se observa como en la última década se ha tenido un incremento de 4.6 veces, en distintos países de América. México presentó un brote de importancia en 2009, asociado a DENV-1 con un cuarto de millón de casos [4].

“Pan american health organization” (PAHO) en colaboración con el “Center for Disease Control” (CDC) de Puerto Rico, proveen la asistencia técnica para desarrollar las redes de vigilancia de laboratorio para varios países de la región, lo cual explica parcialmente el incremento de los reportes de todos los serotipos desde su creación [8].

Son varios los factores responsables del incremento de la transmisión del Dengue y la introducción de nuevos genotipos en localidades donde aún no están presentes en América, es decir sin previo reporte de infección: la falla en el control poblacional del mosquito *Aedes aegypti* vector del virus y el cual se expande a nuevas regiones, la introducción

y rápida diseminación de nuevas cepas virales dentro de la región a través de distancias más largas y en muy poco tiempo por el incremento de los vuelos, rutas y comercio debido al fenómeno global, así como la migración y el aumento de la urbanización en infraviviendas con abastecimiento de agua poco fiable y una escasa sanidad [4, 8] creando las condiciones óptimas ecológicas, tal fue el caso de las ciudades tropicales americanas a finales de los 80s y principios de los 90s, las cuales coexisten con múltiples serotipos del Dengue por la proliferación de *A. aegypti* [1].

### 2.3 Dengue en México

Los primeros esfuerzos en este país por controlar al mosquito fueron en campañas hechas en 1901 mediante la aplicación del petróleo como larvicida a los cuerpos de agua para erradicar a la fiebre amarilla, resultando en el olvido los programas ante la llegada de la revolución mexicana, tornando la enfermedad. Donde más adelante se pusieron en marcha nuevos programas de control del vector (1920) con ayuda del uso de Diclorodifeniltricloroetano (DDT), declarando al país territorio libre de *Aedes* en 1963, pero dos años más tarde entro por la frontera norte y en 1977 por la frontera sur, y con la creación de la vacuna antiamarilica, dejaron de enfocar los esfuerzos en el vector, y comenzó a ser un problema ahora pero por otra enfermedad.....el Dengue (figura 6) [10].



**Figura 6. Mapa global de áreas donde es factible el desarrollo de *Aedes aegypti* en México [10].**

Se recomienda el uso de cartas de mayor escala emitidas por el INEGI de tipos y sub-tipos de climas clasificación de Köppen modificado por García para poder observar a detalle las zonas de riesgo de transmisión del Dengue según la temperatura mínima media anual requerida que permita el desarrollo adecuado del vector, tal y como se plantea en el apartado 3.1 vector [10].

En 1987 se registró por primera vez en México una población de *Aedes aegypti* establecida en Tlayacapan, un poblado del estado de Morelos a una altura de 1630 msnm y más tarde un brote de Dengue en Taxco, Guerrero a 1735 msnm, ambas localidades con temperatura media anual por encima de los 19.3°C [10].

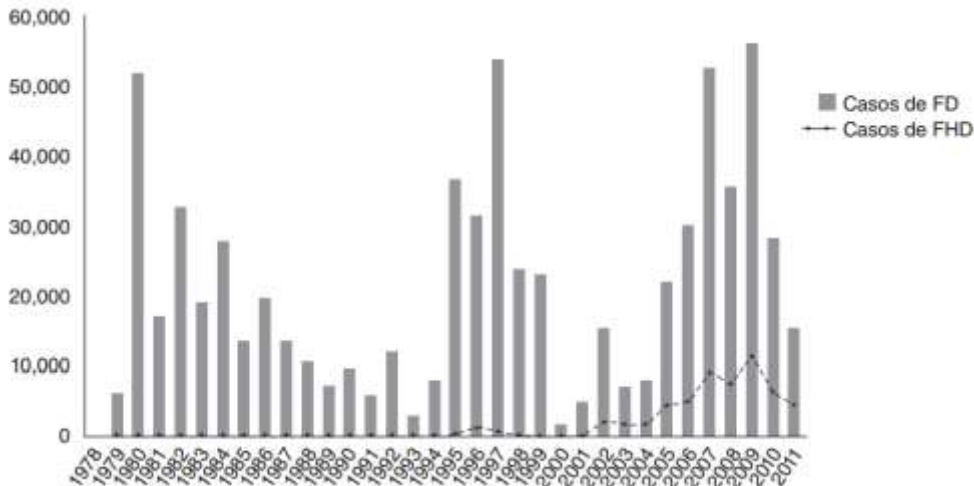
El vector *Aedes albopictus* se detectó en 1985 en el condado de Harris en Houston Texas aumentando su distribución a tal grado que se detectó su presencia en una llanta en Matamoros Tamaulipas, siendo en este país el primer registro de la especie de infección natural con



DENV-1 y DENV-3, y la especie no volvió a encontrarse en México hasta los últimos meses de 1992, y finalmente se confirmó su presencia en poblaciones establecidas en algunas ciudades fronterizas de Coahuila en 1993 y para 1995 ya se encontraba disperso en la ciudad de Múzquiz de este mismo Estado y en otras ciudades fronterizas de Tamaulipas y Nuevo León, por lo que es de suma importancia realizar monitoreo y control entomológico periódicos y sistemáticos de esta especie tanto como de *A. aegypti* [10, 18].

En México los primeros reportes de Dengue se registraron en 1941, cuando se notificaron 6955 casos en toda la república y durante esa misma década, el Dengue se dispersó en regiones donde anteriormente no se presentaba, contrayendo la enfermedad habitantes de Sonora en 1945-1946, identificando como DENV-2 al patógeno mediante los estudios serológicos que se realizaron a la población más adelante, posteriormente se reportaron pocos casos, hasta su desaparición en 1963 gracias a la campaña de erradicación de *Aedes* que mantuvo al Dengue ausente durante 12 años. Sin embargo en 1978 se reintrodujo en México donde aumentaron los casos a partir de 1980 lo que convirtió al Dengue en uno de los problemas actuales más importantes de salud pública a nivel nacional [4, 19].

A partir de su reintroducción, el Dengue ha causado cuatro brotes epidémicos: el primero en 1980, en el cual se reportaron 51406 casos y se detectó la circulación de DENV-1; el segundo en 1997 con 53541 casos de los cuales 980 correspondieron a DHF y donde se observó la circulación predominante de DENV-3; el tercero en 2007, con 52369 casos, 9433 correspondieron DHF; y el cuarto en 2009 con 55961 casos de los cuales 11396 correspondieron a DHF, en los dos últimos se observó la circulación predominante de DENV-1 y DENV-2 (figura 7) [19].



**Figura 7. Total de casos de DHF y DF en la república mexicana.**

Casos reportados por la secretaria de salud de 1979 a 2011 [19].

Muchos casos de reporte no comprenden en su totalidad información detallada como la tipificación (por falta de capacidad de diagnóstico), la temporalidad y la espacialidad, además de tener variabilidad en diferentes factores como el etiquetado de la muestra y la confiabilidad de los métodos de tipificación, es decir, por las prácticas de reporte que se han tenido a lo largo de los años y la variabilidad en la práctica por regiones o países, además no todos los casos son reportados, causando irregularidad que afecta a las estadísticas, recordándonos que la ausencia de un reporte de algún serotipo, no es sinónimo de que ese serotipo no aparezca.

Con estudios filogeográficos y de filogenia, complementado con una vigilancia activa (rastreo de las dispersiones de los serotipos) y con una mejora en el mundo en los métodos de tipificación y estudios de seroprevalencia a un mejor costo-efectividad y menor trabajo laborioso, realizando una exhaustiva descripción de los casos confirmados, es que se tendrán bien documentados los reportes, incrementando significativamente su número, siendo además tipo-específicos, es decir, se elucidaran y entenderán los patrones de co-circulación global, el

establecimiento y cambios de la hiperendemicidad en un área en el tiempo, la severidad de la enfermedad, la estructura poblacional del Dengue, su evolución e información sobre como la inmunidad en el humano regula la transmisión de la enfermedad en microescalas y macroescalas, colaborando con el diseño de vacunas y otras estrategias de prevención [8].

#### 2.4 Descubrimiento del agente infeccioso e identificación del vector

El Dengue fue la segunda enfermedad humana (después de la fiebre amarilla) que su etiología fue criticada como un “virus filtrable”. Investigaciones tempranas habían sugerido que el Dengue se transmitía por mosquitos, pero esto fue demostrado hasta 1906, siendo su vector el mosquito *Aedes aegypti*, probablemente esta idea surgió al demostrar el cubano Carlos Finlay que el vector de la enfermedad de la fiebre amarilla era el mosquito *Aedes aegypti*. En los años siguientes, Ashburn y Craig demostraron por primera vez el carácter filtrable ultramicroscópico del agente etiológico. Conforme se establecieron los estudios por los investigadores, se estableció el rol de *A. albopictus* en la transmisión del Dengue, así como la demostración de que en ciertas especies de monos el virus no mostraba infección aparente, y con estos resultados se sugirió que el Dengue se podía estar transmitiendo de una manera similar al ciclo selvático del virus de la fiebre amarilla. Posteriormente se encontró evidencia de que existen ciclos selváticos en la selva del sureste asiático y en África. También otras especies de *Aedes* fueron implicadas en Asia y en África como vectores [1].

El virus y sus cepas, no eran en gran parte estudiados por los laboratorios hasta después de la segunda guerra mundial, estimulado por las demandas de la guerra en el sureste del pacifico, donde en Japón en 1943 se aisló DENV-1 y Sabin y sus colaboradores en 1944-

45 en Hawái [8] aislaron al menos 2 cepas (DENV-1 y DENV-2) de voluntarios que fueron inoculados con la infección, este reconocimiento se basó en la susceptibilidad de los cambios heterologos después de la convalecencia de la infección inicial, también hicieron descubrimientos importantes con respecto a los síntomas clínicos, el tamaño de la partícula viral, rutas de la infección, competencia vectorial, estabilidad, la sensibilidad del virus ante agentes desnaturalizantes, la susceptibilidad de ciertos animales como hospederos de la infección, inducción y duración de la protección inmunitaria y la interferencia con virus heterólogo. Ante el modelo de infección de ratón, se comienza con la nueva era de la virología del Dengue, encontrándose que algunos ratones adaptados a cepas virales, fueron atenuados para poder estudiar la habilidad de causar la enfermedad humana del agente pero en esta nueva especie y sin riesgos para el hombre, así como otros ratones se desarrollaron para adaptarse a las diferentes cepas del virus y poder cultivarlo [1].

## 2.5 La filogenia como una herramienta de caracterización epidemiológica-evolutiva

Las primeras comparaciones genéricas que se llevaban a cabo en los serotipos de DENV, eran principalmente en “RNA fingerprinting” donde se agrupaban cepas de DENV en topotipos basadas en la topología de los arboles realizados con valores de “bootstrap” (cepas que compartían la distribución espacial similar). La secuenciación directa del RNA viral permitió la caracterización de cepas de aislados de DENV con mayor detalle. Esto ayudo a delinear las relaciones evolutivas de DENV-1 y DENV-2 en un principio, introduciendo el término de “Genotipos” y desapareciendo el de topotipos, como el grupo de virus de DENV con una divergencia de secuencia nucleotídica menor al 6%, y como

“Serotipos” al grupo de virus de DENV con una divergencia menor al 30% dentro de una región dada [20]. Al avanzar la tecnología, la secuenciación automática permitió la utilización de genes o genomas completos para obtener una filogenia más robusta y precisa, con frecuencia identificando genotipos adicionales e intragenotípos [4, 6].

Chen R. y Nikos V. en 2011, determinaron para DENV-1, utilizando secuencias completas del gen E o secuencias completas de genomas, cinco genotipos; el genotipo I, representa cepas del sudeste de Asia, China, y Medio Oriente. El genotipo II representa un par de cepas recolectadas en Tailandia durante 1950 y 1960. Estas cepas no se han detectado en la actualidad sugiriendo que este genotipo circula en muy baja frecuencia o bien se ha extinguido. El genotipo III (silvestre), representa lo que al principio se pensaba, incluía dos aislados silvestres putativos recolectados en Malasia. Se pensaba que su origen era a partir de los simios, sin embargo, se ha sugerido que su origen es de humano. El genotipo IV representa cepas del Pacífico (Japón, Corea, China, Myanmar, Malasia e Indonesia), las islas del Pacífico Occidental (Nauru, Filipinas, y Hawái) y Australia. El genotipo V representa mayormente cepas de América: América Central (Nicaragua y Costa Rica), América del Sur (Venezuela, Colombia, Brasil, Paraguay y Argentina) y el Caribe como Puerto Rico; así como para América del Norte las de los casos de la frontera México/Texas [21].

Para DENV-2, inicialmente se identificaron 4 genotipos, al realizar estudios filogenéticos del gen E con un mayor grupo de datos revelaron la existencia de dos genotipos adicionales con una distribución geográfica restringida (únicamente Asia). El genotipo Asiático I incluye cepas provenientes de Malasia, Camboya, Myanmar, Vietnam y Australia, así como la cepa de referencia 16681, aislada en Tailandia en 1964. Estudios recientes sugieren que la re-introducción de este genotipo en Vietnam y Tailandia en 1990 llevó a una serie de brotes y

el desplazamiento del genotipo Asiático/Americano al colocarse como el linaje dominante de la región. Este desplazamiento se atribuyó en su ventaja de adaptación (la habilidad de generar viremias más altas en humanos). El genotipo Asiático II, representa cepas de China, Indonesia, Las Filipinas, Taiwán, Sri Lanka, India, Honduras y México (el nombre no limita la endemicidad necesariamente). Este genotipo incluye la cepa prototipo New Guinea C (NGC) aislado en 1944. Varias cepas aisladas independientemente de distintas partes del mundo (por ejemplo, México, Honduras, China) son genéticamente similares a la cepa NGC. El genotipo Asiático/Americano sugiere una división espacial de dos subclados: todas las cepas recolectadas del sudeste de Asia y todas las cepas recolectadas de América Central y del Sur y del Caribe de los últimos 30 años. Debida a su gran habilidad de adaptación, estos virus desplazaron cepas menos virulentas del genotipo Americano. El genotipo Cosmopolitan o genotipo IV, representa cepas distribuidas en una región geográfica muy amplia, incluyendo África, Medio Oriente, India y regiones cercanas al subcontinente Hindú, islas del Océano Pacífico y Australia. Recientemente se han recolectado en México [22]. El genotipo Americano (V) representa cepas de América del Sur y Central, el Caribe y cepas antiguas recolectadas en India e islas del Pacífico, estas cepas se recolectaron antes de 1971, posterior a este genotipo se presentó un desplazamiento por cepas del genotipo Cosmopolita. Históricamente, cepas de este genotipo se han asociado con Dengue no severo, con corroboración experimental y así, considerada con impacto epidemiológico bajo. Por último, el genotipo silvestre o VI, representa cepas provenientes de humanos, mosquitos y primates recolectados en África occidental y del sudeste de Asia. Este genotipo es el más distinto genéticamente y recae en la parte basal del linaje DENV-2, indicando que representa al genotipo más ancestral. Reportes recientes, indican que DENV-2 silvestre (de mosquitos y primates) evoluciona de una

manera similar a DENV-2 en humanos (1, 2, 3, 4, 5 y 6) sugiriendo que la dinámica de mutación, replicación y selección de ambos tipos, son equivalentes e independientes del hospedero [23].

En DENV-3, Lanciotti delimito por primera vez 4 distintos genotipos; el genotipo I representa cepas del sudeste de Asia, Las Filipinas e islas del Sur del Pacífico. El genotipo II, representa cepas de la parte continental del sudeste de Asia; el genotipo III representa cepas de propagación en Asia, África oriental y América y el genotipo IV representa cepas de Puerto Rico y Tahití. Sin embargo, al haber aumentado las secuencias viables del gen E, sugieren un nuevo genotipo (V) donde se incluyen cepas provenientes de Japón, China (del muestreo de 1997-2009) y muestras de Brasil en el año 2000.

En DENV-4, se ha confirmado la existencia de otros genotipos y genera una visión más amplia que las topologías anteriores. El genotipo I representa cepas de las Filipinas, Tailandia, Vietnam, Myanmar, Sri Lanka, India y un número importante de casos en Japón, China y Brasil. Este genotipo incluye el aislado prototipo H241 aislado en las Filipinas en 1956. El genotipo II representa cepas del sudeste de Asia (Indonesia, Malasia, Singapur), China, Australia, el Caribe y América. La introducción de este genotipo del sudeste de Asia en América tomo lugar a principios de 1980 por el Caribe [24]. El genotipo III, representa cinco cepas aisladas entre 1997 y 2001, siendo distintas de todos los demás aislados en Tailandia. Por último, el genotipo IV representa tres cepas silvestres aisladas en monos centinelas en Malasia en 1970. Todas estas cepas silvestres son distintas genéticamente de las demás cepas humanas, sugiriendo que representa el genotipo ancestral [4].

Ante la genotipificación por serotipo hecha por Ángeles en 2012 para secuencias de genomas completos de virus del Dengue recolectados en América en el periodo 2000-2009 [4], mediante reconstrucción filogenética con criterio de distancias Neighbor-Joining, se encuentra un

modelo evolutivo diferente, lo cual hace pensar que posiblemente los diferentes serotipos del Dengue han presentado distintos tipos de presión selectiva lo cual ha generado diferente divergencia evolutiva fácilmente detectable entre estos, además, en la más reciente reconstrucción filogenética realizada por Chen R. y Nikos V. *et al* en el 2011, se reportan los genotipos de todos los serotipos que presentan prevalencia en América. El genotipo V del serotipo 1, es el genotipo prevaleciente desde 1940. El genotipo asiático/americano del serotipo 2, es el prevaleciente desde los 80's como resultado de la adaptación del genotipo asiático en América, desplazando el genotipo prevaleciente; el análisis de este episodio epidemiológico sugiere una de las evidencias más importantes a favor de la existencia de cepas más virulentas en DENV que otras, ya que el primer brote de Dengue hemorrágico reportado en América (Cuba 1981), coincide con la emergencia en ese entonces de dicho serotipo asiático. El serotipo 3 genotipo III es el prevaleciente de las secuencias de más de 10 países en la década del 2000, este genotipo se encuentra presente desde hace más de tres décadas, donde se hipotetiza la posible entrada al continente fue a través de México; antes de América, las cepas más antiguas, provienen de Sri Lanka e India aunque también se encuentran algunas secuencias de África, dependiendo del autor así como los parámetros utilizados en la reconstrucción filogenética. El serotipo 4 genotipo II proviene de Asia, El Caribe y América en general, este genotipo presenta una distribución conservada en el tiempo a diferencia de los otros serotipos.

Dicho lo anterior podemos decir con certeza que actualmente con el análisis de genómica comparativa de aislados clínicos virales de DENV con datos epidemiológicos, encuestas de enfermedad e historial clínico bien definidos, resulta ser una alternativa para definir los determinantes genéticos asociados con la severidad de la infección [4], donde la viabilidad de secuencias genómicas completas así como el software



avanzado funcionan como herramientas importantes e indispensables para detectar y entender los factores intrínsecos como la presión de selección, dinámica de intervalos de evolución (divergencia y nuevos grupos virales) y la influencia de la dinámica de población humana en la evolución de DENV, por ejemplo, en recientes años mucha atención se ha puesto en estos rubros y en la diversidad génica viral, teniendo en cuenta que el Dengue, similar a otros virus de RNA, exhibe un alto grado de variación genética debido a la falta de actividad de prueba de lectura de su polimerasa, las altas tasas de mutación, el inmenso tamaño poblacional y la presión inmunológica, dejando a la emergencia de nuevos sub-tipos virales tal y como se ha descrito la existencia de varios taxa, permitiéndonos saber las tasas de divergencia entre los diferentes niveles taxonómicos, es decir nos provee datos relacionados al proceso que controla la evolución viral, así como información sobre la variabilidad de cada gen a través de los diferentes grupos virales, además sabemos que los cambios genéticos, juegan un papel importante en el trazo del origen de la infección; todo esto es posible primeramente a través de los análisis de secuenciación y filogenética del gen completo de la envoltura de los aislados (ya que las proteínas de la envoltura confieren una protección a la respuesta inmune provocada por la neutralización y mejora de la replicación de los anticuerpos, siendo el gen más común en los estudios epidemiológicos moleculares), y últimamente gracias a la secuenciación nucleotídica completa de la region codificante (ORF), llevado a cabo por el método de “Neighbor-Joining” o el método Bayesiano, donde los arboles filogenéticos obtenidos pueden ser construidos por el modelo de Tamura-Nei para el método de “Neighbor-Joining” o por inferencia de cadena de Markov para el método Bayesiano, donde las sepas de serotipos individuales frecuentemente caen en genotipos bien definidos con ayuda de altos valores de “bootstrap” restringidos a un área geográfica particular, donde se muestra el reflejo de la extensa

migración tanto del hospedero como del vector, contribuyendo en el entendimiento de la relación entre las sepas de diferentes áreas y tiempos, determinando si la epidemia ha reemergido, o solo es una nueva introducción, es decir, no solo se limita en áreas endémicas, dicho entendimiento puede ser usado para seleccionar blancos para el diseño de sondas de diagnóstico, terapias antivirales y la construcción de vacunas candidatas además de ser funcional en la caracterización de las epidemias futuras de DENV [5, 6, 25].

Por ejemplo en el análisis epidemiológico y filogenético basado en secuencia de genoma completo de ácidos nucleicos de aislados obtenidos en el 2009 en Guangzhou, China (área endémica mayormente afectada en este país y azotada por mucho tiempo principalmente por el serotipo 1 aunque los otros tres están muy bien documentados (ciclos de 3 a 5 años), y después de 30 años sin reportes desde los brotes sucedidos en la segunda guerra mundial) resultaron ser parte del serotipo 3 genotipos III y V, es decir mostraban una co-circulación incrementando el riesgo de una potencial infección heteróloga-secundaria en la población, dicho genotipo III fue encontrado circulando en India dos años antes, así como en Pakistán causando una emergencia en casos DHF, sugiriendo una posible importación del genotipo, pudiendo causar infecciones esporádicas o grandes epidemias, cabe mencionar que a pesar de que los aislados se obtuvieron de tres miembros una misma familia, hubo incluso diferencias de 3 nucleótidos entre dichos aislados, por lo cual se caracterizaron como dos sepas distintas, lo que nos muestra la alta tasa de mutación del virus, el mismo estudio se llevó a cabo en la misma ciudad de Guangzhou en el 2010 en el aislado de un paciente que recientemente había viajado a Tailandia (el país con el mayor reservorio y epicentro del virus del Dengue) usando el mismo método, mostro ser parte del DENV-4 genotipo II ausente por 20 años ya que en 1990 en la misma ciudad en un brote se aisló el mismo serotipo pero del Genotipo

I; el aislado del 2010, tiene una estrecha relación con aislados del sudeste de Asia (Indonesia, Singapur y Tailandia) con una homología aminoacídica del 99.5% en promedio, donde los aislados posicionados en el Cluster filogenético muestran distancias que representan la divergencia evolutiva en el tiempo entre ellos mismos. En los últimos 10 años DENV-4 ha estado reemergiendo o emergiendo en diferentes países y regiones después de una ausencia de 25 años, por ejemplo el genotipo II reemergió en Brasil seguido por el genotipo I, también en India reemergió el genotipo I, en el Caribe el genotipo II fue aislado después de la Introducción desde Asia en el 81, en conclusión, DENV-4 tuvo una alta tasa de dispersión, tanto como el DENV-2 en América durante el periodo de estudio, donde el rango de evolución puede incrementar seguido de una expansión geográfica tal como se mostró en Perú en 2008 donde dicho serotipo reemplazo al DENV-3 como una sepa epidémica, al igual que se encargó de desplazar al DENV-1 como la sepa epidémica primaria en la region del Pacifico en el 2007; el reconocimiento de los clústeres de la infección es importante para los prestadores de servicios médicos y para el personal de salud pública que trata y controla le enfermedad, debido a que múltiples genotipos podrían ocurrir simultáneamente [5, 6, 13, 25].

Otro estudio filogenético similar se llevó a cabo en Brasil en 2012 para relacionar la dinámica de la población viral y de la divergencia así como la evolución entre los aislados obtenidos en dicho país y Paraguay con respecto a secuencias del Genbank, todos de DENV-3 (introducido en América por Nicaragua-Panamá en 1994 causando brotes en Centroamérica, México, El Caribe, Brasil en el 2000 y Paraguay en 2002); los genomas virales completos fueron secuenciados, analizando su divergencia nucleotídica y la presencia de motivos aminoacídicos, agrupándose dentro de tres genotipos (I, II y III), y muchos clados fueron encontrados dentro de los genotipos llamados linajes los cuales a su vez se dividieron en sub-linajes y estos a su vez se llegaron dividir en

grupos (el genotipo I contiene dos linajes= I y II, y sucesivamente el linaje II se diversificó en dos sub-linajes= I y II, donde el sub-linaje II se diversificó en tres grupos mono filéticos= A, B y C; el genotipo II se diversificó en cuatro linajes, donde el linaje IV incluía cuatro sub-linajes= A, B, C y D; el genotipo III contenía tres linajes= I, II y III, y sucesivamente el linaje III se diversificó en cuatro grupos mono filéticos= A, B, C y D); la divergencia nucleotídica analizando el ORF completo en promedio entre los genotipos fue de 6.7 %, y para los genotipos II y III, sus linajes tuvieron una divergencia de 2.7 % y para los sub-linajes de 1.5 %, ya que para el genotipo I, se mostró una tasa más elevada en la divergencia para sus linajes y sub-linajes, para el análisis de cada gen por separado resultó en una divergencia nucleotídica entre los genotipos de 4.1 a 8.8 % (la divergencia más baja fue observada para el gen C= 4.1 %, y la mayor para NS2A= 8.8 %, NS4A= 8.1 % y E= 7.3 % en promedio), además de que fueron analizados los motivos aminoacídicos (sustituciones aminoacídicas presentes en al menos 90 % de la secuencia dentro de cada grupo genético) del ORF completo mostrando una divergencia en la secuencia aminoacídica entre los genotipos de 3.25 % y entre los sub-linajes de 0.55 % en promedio, para el análisis de cada gen por separado resultó en una divergencia entre los genotipos de 0.5 a 3.6 % (la divergencia más baja fue observada para las proteínas NS2B= 0.5 %, NS4B= 0.95 % y NS3= 1.35 %, y la mayor para NS4A= 3.6 %, NS2A= 3.2 % y E= 2.65 % en promedio); identificando como responsables de la segregación del DENV-3 en diferentes genotipos a todos los genes, aunque en mayor medida a unos que otros, ya que al analizarse las secuencias de los genes por separados (construyendo árboles filogenéticos con dichas regiones genómicas), mostraron la misma segregación que si fuera utilizando el ORF completo, con algunas excepciones (gen prM del genotipo I ya que no forma un grupo mono filético, y gen NS4A del genotipo I, ya que algunos aislados de 1980 y

otros virus con secuencia idéntica, fueron agrupados en el genotipo II); específicamente el análisis mostro que el virus que circulo en Brasil en la década del 2000 pertenecía a tres sub-linajes (A, B y D) del linaje III del genotipo III, sugiriendo diferentes eventos de introducción del virus, al menos tres (por Rio de Janeiro el cual se encuentra muy bien documentado y por el norte procedente del caribe debido al parentesco con aislados de este lugar), donde posteriormente se dispersó a Paraguay solo el sub-linaje B (parentesco muy cercano al virus que circulaba en Brasil) siendo el único encontrado en circulación, cabe mencionar que cada sub-linaje muestra una divergencia evolutiva muy característica; pudiéndose llegar a este tipo de deducciones gracias a la colaboración de la epidemiología y la filogenética, ya que en un análisis previo de DENV-3, aislado en Sri Lanka e identificado después de 1989 (reemplazo de genotipo III linaje III sub-linaje A por sub-linaje B) como un nuevo sub-tipo, fue relacionado con epidemias de DHF que se dispersaron a india, este de África y América en los 90<sup>ts</sup> tal y como lo muestran los aislados obtenidos en Nicaragua y por lo que se piensa que fue la puerta de entrada a este continente. Por otra parte, este serotipo en previos estudios donde se han analizado los genes C, PrM, E y NS3, ha mostrado que se distribuye en cuatro genotipos, pero Wittke y colaboradores, han sugerido la existencia de un nuevo genotipo (V), aunque en el análisis filogenético del gen E de estas secuencias sugieren que dicho genotipo corresponde al linaje I dentro del genotipo I, el cual al igual que el linaje II del mismo genotipo, tienen una divergencia nucleotídica en promedio de 4.9 %, aunque mayor que la observada entre otros linajes del mismo serotipo (2.7 %), es menor que la observada entre los genotipos de dicho serotipo (6.7 %) [6 y 26].

Por último y como parte de esta serie de análisis evolutivos, fue analizada la secuencia nucleotídica de la region C-PrM de aislados del sur de India (region endémica), de un brote ocurrido durante los meses pre-monsonicos o de sequía irregular Mar-May (brote no estacional,

donde ocurre una fuerte asociación entre los brotes de DENV y el periodo del monzón y pos monzón Jun-Oct donde resurge la actividad del mosquito), formando parte la inmensa mayoría de un clado (1) del genotipo III DENV-1, y una sola muestra tenía parentesco con secuencias de América dentro de otro clado (2) del mismo genotipo; dos muestras del primer clado (1) mostraban relación con aislados de Tailandia 1980, Comoros 1993, Singapur 1993 y Brunei 2005 (es decir con significativo parecido genético entre países del borde indo-pacífico) en un 98% tanto en nucleótidos como en aminoácidos, revelando muchas sustituciones aminoacídicas no sinónimas en regiones previamente reportadas como funcionales tanto en proteínas estructurales y no estructurales (cápside, NS1 y NS5), además tienen una deleción en la región hipervariable de 21 nc dentro de la región variable del 3' UTR (correspondiente a la posición entre el nc 10293 y el 10325, región que con solo 26 de sus 45 nc, es suficiente para una eficiente replicación del RNA, y donde la deleción observada es río abajo de estos 26 nc, por lo tanto no se ve afectada la cinética de replicación viral), este reporte en India revela brotes causados por cepas virales genéticamente diferentes, dejando a la posibilidad de introducciones en la región por varios frentes, donde la variación genética observada en los aislados puede ser debida a una rápida evolución, ya que este virus es el que tiene la tasa de mutación más alta entre los flavivirus, lo cual permite la formación de linajes entre los genotipos gracias a estas deleciones y mutaciones las cuales se van acumulando como cambios nucleotídicos durante las infecciones esporádicas, mostrando una viremia acrecentada de algunos genotipos, potenciando la transmisibilidad durante el brote, creando un progresivo desplazamiento de cepas menos virulentas (menor viremia) durante los brotes de larga escala. En la caracterización molecular, el reemplazo de un segmento genético por todo el genoma completo, ha permitido que entendamos la dinámica de la enfermedad mejor, además de hacer

análisis de presión de selección más finos. El DENV-1 es el serotipo que circula con más dominancia en aquellos países endémicos, y muy importante es que se observó variación genética durante los 90's y 2000's que creó un nuevo linaje, además de la co-circulación de múltiples linajes genéticos, teniendo en cuenta que en la dinámica evolutiva, cambios a nivel de genotipo, son considerados significantes y convencionalmente se les atribuye a cambios en el perfil de la infección [26].

### **3 Factores generales que generan la infección del Dengue**

#### **3.1 El vector**

El virus del Dengue es transmitido por mosquitos vectores. El vector primario o principal transmisor de DENV es la especie *Aedes aegypti*, la cual probablemente apareció inicialmente en África y fue introducida a América (donde muestra sinantropía muy claramente) durante los siglos XV y XIX con el tráfico de esclavos y los viajes de conquista, diseminándose hacia Asia en los siglos XVIII y XIX debido al intercambio comercial. Desde entonces se ha visto una constante diseminación mundial al aumentar los lazos globales por el comercio y transporte en los últimos 50 años. La rápida urbanización de ciudades en Asia como en América Latina ha generado la posibilidad de mayores sitios de reproducción del vector dentro de ciudades como en sus alrededores. También como vector importante se tiene a la especie *Aedes albopictus*, aunque esta se considera como vector secundario, ya que no se ha establecido una relación directa de este mosquito con la transmisión epidémica de DENV, sino solo casos específicos [4, 27, 10].

El vector tiene distribución hemisinantrópica cosmotropical, ya que se ha distribuido ampliamente a lo largo de las regiones tropicales y subtropicales que van desde el ecuador y hasta los trópicos a lo largo

del cinturón ecuatorial terrestre (circuntrópical) alcanzando a más de 100 países entre las isothermas de 20°C dentro de los límites de los 35° de latitud norte y los 35° de latitud sur, correspondiente a los límites de la isoterma de verano de 10°C con ciertas expansiones a regiones más frías en las épocas del año más calurosas y por los msnm que combinados con el sub-tipo de clima resulten en una temperatura ideal de reproducción, en términos generales se le ha encontrado en áreas geográficas con una temperatura media anual mayor a los 16.9°C en la mayoría de los subtipos de clima presentes en dicho cinturón circuntrópical (tipos A=tropical lluvioso, B=templado húmedo y sub-húmedo y C=seco) los cuales permiten el desarrollo continuo del vector a lo largo del año, presentando un patrón de distribución idéntico al de los asentamientos humanos (zonas urbanas y rurales) y con índice de sinantropia exófila (con preferencia peridomiciliar), refiriéndonos con esto a su diseminación geográfica dependiente de la actividad humana, la cual va en crecimiento y expansión, además presenta actividad estacional; destacando que la especie *A. aegypti* es la mejor establecida en estas regiones circuntrópicas [3, 4, 27, 10]

### 3.1.1 Taxonomía y Cepas

Sistemática científica

Dominio: Eucaria

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Clase: Insecta

Subclase: Pterigota

Infraclase: Neoptera

Superorden: Endopterygota

Orden: Diptera

Suborden: Nematocera



Infraorden: Culicomorpha

Superfamilia: Culicoidea

Familia: Culicidae

Subfamilia: Culicinae

Infracomunidad: Aedini

Género: *Aedes*

Subgénero: *Stegomyia*

Especie: *Aedes aegypti* (Lineo 1762)

Subespecies: *Formosus* y *Aegypti*

Tribus: *A. aegypti* (mundo entero) y *A. aegypti aegypti* (África)

Cepas: Moyo, Moyo R, Moyo S, Rockefeller, Liverpool, DMEB II, IBO II, DS3 etc.

Especie: *Aedes albopictus* (Skuse 1985)

Nombre común mosquito (en español) con otros muchos nombres alrededor del mundo, dependiendo el idioma o lengua, y en cuestiones de sistemática llega a tener cambios taxonómicos o sinónimos. Y la diferencia entre las dos especies de vector, son que *Aedes aegypti* presenta un escutem curvado con líneas blancas laterales y dos bandas centrales cosa que en *Aedes albopictus* no se presenta ya que en este se presenta en el escutem una única banda blanca. En cuanto a la especie *Aedes aegypti*, se sabe que existe una población dividida genéticamente en 2 grupos con diferente distribución geográfica, basándonos en el gen ND4 de la mitocondria, donde los clados muestran 5 haplotipos [27, 18]

Se sabe por estudios filogenéticos, que el mosquito del género *Aedes*, diverge evolutivamente de la mosca de fruta hace aproximadamente 250 millones de años, motivo por el cual actualmente los estudios

enfocados en control con mosquitos transgénicos, suelen estar basados en genomas de *Drosophila sp.*

### 3.1.2 Biología- desarrollo

El vector está bien adaptado a la vida urbana y típicamente se cría en aguas estancadas en las ciudades o cerca de ellas, y su actividad disminuye a los 17 °C, desapareciendo a los 12°C (la temperatura es el factor limitativo más importante de la distribución y no la altitud como antes se creía). El superorden Endopterygota=alas internas, es de desarrollo holometábolo también conocido como metamorfismo completo, característico de los insectos más modernos en términos evolutivos, y el cual es el caso del vector , en este suceden las fases de embrión, larva (2.7 días), pupa (>4 días) e imago (adulto=2 días), con alas presentes en esta última fase (los esbozos de las alas están dentro del cuerpo durante los estadios larvales de desarrollo); la etapa embrionaria tiene lugar dentro del huevo, larvas y pupas son etapas inmaduras (preimaginales), siendo muy distintas del adulto, tanto por lo que refiere a su anatomía como a su ecología. Mudan varias veces para crecer. El paso de larva a adulto requiere de una serie de cambios drásticos que ocurren durante la fase de pupa, estos cambios incluyen la diferenciación de los tejidos y órganos del adulto y la destrucción de los de la larva, en el caso de los dípteros, el adulto no muda [18]; dicho desarrollo se puede llevar a cabo en cuerpos de agua lenticos relativamente pequeños no contaminados con calidad aceptable de agua en términos químicos (oxígeno disuelto, pH, nitritos, nitratos, amonía, salinidad y sustancias orgánicas en descomposición) y físicos (temperatura, grado de insolación y movilidad), con permanencia tal que permitan completar los ciclos de vida y con poblaciones de otros organismos (flora y fauna) en densidades que no impacten negativamente a la población de este mosquito; al momento de la

adultez se dá la copula (fase temeral-abordaje-introducción del aedageus o pene-inseminación o introducción de semen-se crea taponina o complejo proteico), luego viene el desarrollo orogénico que es cuando maduran los folículos (5 etapas escala de Christofer= 1, 2a, 2b, 2c, 4 y 4b) y se continua con la oviposición; la especie muestra preferencia por cierto tipo de depósitos con agua para la oviposición algunos de los cuales podrían favorecer la esperanza de vida de la siguiente generación, en general la especie es más frecuente en los recipiente artificiales que en otro tipo de contenedores naturales, y aun de estos recipientes artificiales existen aquellos que muestran capacidad diferencial en la dinámica poblacional y productividad, es decir diversos factores ecológicos determinan una distribución diferencial de las poblaciones de mosquito no solo en sentido espacial sino también temporal, en cuanto a *Aedes albopictus*, este se encontraba restringido a Asia y océano pacifico, siendo un vector eficiente de los cuatro serotipos de Dengue tanto vertical como horizontalmente el cual además soporta una temperatura media anual considerablemente inferior a la indicada para *A. aegypti* pudiendo lograr dispersiones a mayores altitudes (quizá solo restringido por adaptaciones al fotoperiodo de latitudes por encima de los 28°, cosa que se observa en la ciudad de México, y cosa que se ha violado en Miami E.U.A.) y causante de desplazamiento competitivo en otras especies como *A. aegypti* y *A. triseriatus* en las cuales causa decremento paulatino de su población e incremento en la suya, lo que con el transcurso del tiempo podría implicar un cambio interesante en la epidemiología del Dengue; ambas especies son ovíparas y la especie *A. aegypti* presenta poliandria o competición espermática ya que a la copula, el macho deja un sello que la enzima femal degrada en 14 minutos, quedando preparado para poder recibir la segunda carga espermática; también se sabe que el vector presenta capacidad de diapausa, lo cual es la interrupción temporal del desarrollo en el estado

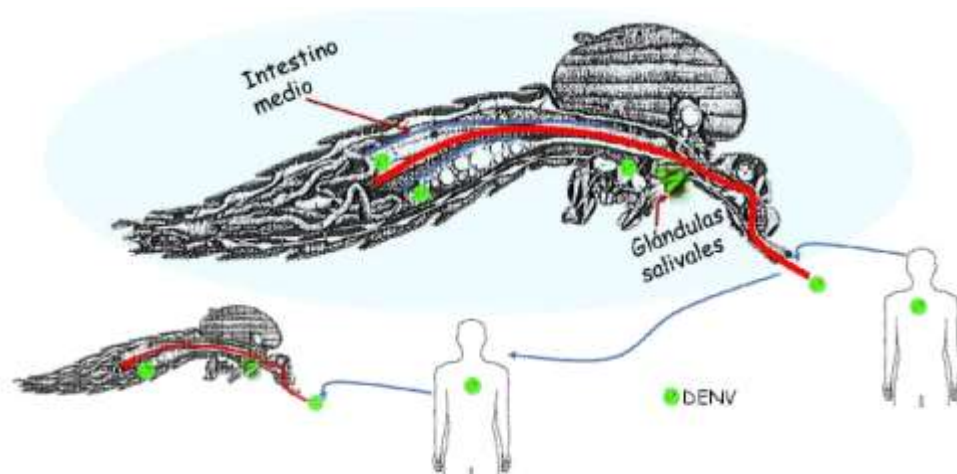
de huevo, además de que el huevo presenta resistencia ante la desecación causada por los cambios ambientales que suceden en zonas tropicales y subtropicales. Se ha demostrado el mantenimiento del reservorio del virus en la naturaleza en varios estudios de la transmisión transovarial conocida como transmisión vertical (*A. albopictus* en mayor grado) [1, 4, 27, 10 y 18].

El macho se alimenta de la savia de las plantas y aunque no causan picadura, pueden detectar el CO<sub>2</sub> y el ácido láctico (por lo que se pueden utilizar como atrayentes), las hembras tienen hábitos hematófagos con grado marcado de antropofilia, detectando el CO<sub>2</sub> de los animales de los que se alimentara mediante sensores en las antenas (sensulus) y patas y barbillas a un costado de la probóscide, además de que se piensa que al picar las hembras, estas levantan las patas traseras para detectar hormonas (cosa que en el macho (sugieren los entomólogos) hacen para aparearse y otros sugieren que es porque la coxa no es detenida por el merón, quizá faltan hacer estudios con el electroantenógrafo), las femeas se pueden alimentar de sangre en cualquier momento, aunque con más frecuencia suelen hacerlo al atardecer o al amanecer, ya que la temperatura altera la digestión de la sangre, cabe mencionar que la sangre aporta el alto contenido proteico necesario para la producción del huevo durante su ciclo gonotrópico, por lo cual al picar la hembra, es que a los pocos días esta apta para la ovoposición (*aegypti* más de una vez, *albopictus* con una sola comida completa su ciclo gonotrópico). Aunque los estudios de competencia interespecifica por los recursos y sobre los enemigo naturales (depredadores, parasitoides y parásitos) son extremadamente escasos en México, y aunque los competidores o enemigos existan, no se encuentran en abundancia suficiente como para limitar la población a tamaños que no representen un peligro epidemiológico; cabe mencionar que el genoma del mosquito *Aedes aegypti* fue el segundo en ser secuenciado, y posee 15419 genes, además de que existe

intercambio de material genético entre especies y entre otros insectos [27, 10 y 18].

### 3.1.3 Proteínas del intestino medio

Es necesario estudiar y determinar las diferencias poblacionales de mosquitos existentes, así como su competencia vectorial (habilidad intrínseca del vector para transmitir una enfermedad causada por un patógeno) para transmitir al virus, es decir a la permisividad del artrópodo vector a infectarse, replicarse y transmitir al virus. La transmisión del Dengue involucra la interacción de este con el mosquito en un ciclo humano-mosquito, donde la capacidad vectorial comprende tanto la interacción del vector con el patógeno, como la interacción de este con el hospedero; mientras que la competencia vectorial está restringida exclusivamente a la interacción vector-patógeno, por lo tanto la competencia vectorial depende de factores propios del vector (genéticos) como de factores relacionados al patógeno (figura 8) [28, 29].



**Figura 8. Ciclo del DENV en el humano y en el mosquito [28].**

Cuando este mosquito ingesta sangre virémica, el virus tiene que pasar varias barreras antes de que pueda ser transmitido al nuevo hospedero vertebrado. Primero el virus encuentra la barrera del intestino medio del mosquito que debe ser sobrepasada para que el virus infecte exitosamente las células del epitelio del intestino medio. Si la infección del intestino medio es establecida, entonces ahora el virus debe de ser capaz de escapar de las células epiteliales (superando la barrera de escape al intestino medio) para esparcirse al resto de los tejidos del mosquito para establecer la infección diseminada a través de la hemolinfa y los órganos blanco secundarios (tráquea, cuerpo graso, musculatura torácica, túbulos de Malpighi, ovarios, sistema nervioso). Si el virus no puede escapar del intestino medio (debido a características genéticas del vector que impiden que el virus establezca una infección) entonces este tiene la barrera de escape en el intestino medio. Finalmente, el virus debe de infectar a las glándulas salivales (órgano más importante en la transmisión efectiva) y ser liberado en la saliva para que ocurra la transmisión al siguiente hospedero. La determinación de la viremia se hace 14 días después que el mosquito ingirió sangre virémica (periodo de incubación extrínseco, el cual varía dependiendo de la cepa y las características ambientales que le confieran viabilidad) a partir de su cabezas por inmunofluorescencia con Ig anti Dengue, y si no se detecta el virus, se procede la búsqueda a los abdómenes, y así se determina la susceptibilidad de los mosquitos a la infección por Dengue (cepa DS3 es altamente susceptible y la subespecie Formosus es resistente a la infección), la cual es diferente mostrando diferente competencia vectorial entre las cepas bajo condiciones espacio-temporales dadas [28, 29].

Se sabe que en el intestino medio se tiene un receptor principal con un peso molecular de aproximadamente 67/64 kDa, ya que anticuerpos específicos por esta proteína bloquean la infección de las células de los

mosquitos C6/36, pudiendo ser usada como marcador de competencia vectorial, y se sugiere que aquellos individuos que tienen en la superficie de sus células epiteliales esta proteína pueden ser más susceptibles a la infección. En los últimos años muchos otros receptores han sido identificados no solo en células del hospedero humano, sino en el mosquito vector, tal es el caso de otra proteína de 80 KDa que interactuó con todos los serotipos de DENV en un estudio realizado. Las proteínas de la envoltura se unen a los receptores presentes en la célula huésped a través del dominio III, y por análisis de espectrometría de masas de las proteínas purificadas separadas por gel de electroforesis de poliacrilamida se determinó su identidad, indicando que las partículas virales se unen a proteínas con el mismo aparente peso molecular de 57 y 67 KDa, así como a moléculas de alto peso molecular, las proteínas identificadas fueron enolasa, receptor cinasa beta-adrenergico (beta ARK), factor de elongación de translación (EF-1) alfa/Tu y caderina. Estudios recientes han permitido identificar proteínas en glándulas salivares de mosquitos del género *Aedes* que pueden llegar a estar involucradas en la entrada de los cuatro serotipos de DENV a los órganos. Usando ensayos de unión a proteínas virales se han identificado en extractos de glándulas salivares de mosquitos *A. aegypti* cuatro proteínas, de 77, 58, 54 y 37 KDa respectivamente, capaces de unirse a los cuatro serotipos de DENV. Estos primeros estudios abren la puerta a investigaciones que permitan caracterizar los receptores involucrados en la entrada del virus a las glándulas salivares del vector [28, 29, 30].

Por otra parte, se sabe que las barreras que tiene que pasar el virus del Dengue en las tres fracciones intestinales son enzimas digestivas, lectinas (proteína que se une azúcares), péptidos antimicrobianos, óxido nítrico y el complejo profenoloxidasa [31].

Recientemente se ha demostrado que la saliva del mosquito potencia la replicación y patogénesis de numerosos virus transmitidos por artrópodos ya que se ha demostrado *in vivo*, en ratones NOD/SCID/IL2RYKO que los ratones infectados por picadura de mosquito desarrollaron signos de la enfermedad como lo es el eritema, aumento de citosinas como INF- $\gamma$  e IF-8, generando mayor severidad de la infección, que cuando se inyecta el virus solo directamente [4].

Por otra parte algunos estudios demuestran que el virus se multiplica en el interior del mosquito sin afectarlo, y otros estudios demuestran que el mosquito es afectado y vive menos tiempo al estar infectado con el virus [32].

#### 3.1.4 Comunidades parasito-bacterianas en el intestino de *A. aegypti*

Al realizar análisis de RNA16s qRT-PCR (gen libraries) para medir y saber cuáles eran las comunidades bacterianas del intestino medio del mosquito *Aedes aegypti*, se encontró además que la capacidad vectorial del virus del Dengue, varía dependiendo de dicha flora intestinal, es decir, las diferencias influyen en la susceptibilidad del mosquito para la infección del virus. Por lo tanto se estipula que cepas diferentes de *Aedes aegypti* tienen diferente susceptibilidad genética para contraer el DENV. Algunas cepas de *Aedes aegypti* que tienen diferentes comunidades bacterianas son MOYO, MOYO-R y MOYO-S; donde fueron encontradas en las tres cepas de mosquito *Pseudomonas spp* (Proteobacteria), pero en especial fueron diferentes las de MOYO-R, las cuales pueden determinar su capacidad como vector, también en esta cepa se encontraron las bacterias *Pedobacter sp* (Bacterioidetes), *Janthinobacterium sp* (Proteobacteria) y *Rahnella sp* (Enterobacteria), por lo cual la abundancia de bacterias fue mayor en esta cepa, con al menos 10 veces más que en las otras dos cepas, por lo tanto la cantidad de DNA patógeno encontrada fue mayor; la cepa MOYO además de



*Pseudomonas spp* tiene *Rahnella sp* (Enterobacteria); la cepa MOYOS presento además de *Pseudomonas spp*, *Bacillus sp* (Firmicutes). Las bacterias al tener propiedades y características fisiológicas distintas, afectan de manera distinta la infectividad del Dengue e incluso de otras enfermedades, ya que también se ha reportado que las bacterias del intestino medio inhiben la esporogonia de *Plasmodium* en *Anopheles sp*, evitando que el mosquito cause la enfermedad de la malaria, aun así las habilidades del mosquito para transmitir diferentes enfermedades o patógenos también se relaciona a complejos factores genéticos, por otra parte, la susceptibilidad y el rol natural y ecológico de las bacterias en el intestino medio de los mosquitos son desconocidos. Una de las maneras en la que las bacterias modulan la infección de DENV es activando “the toll inmuno pathway”, e incluso puede que las bacterias influyan en la interacción del virus al epitelio, como ocurre con *Pedobacter sp*, y aunque no se ha encontrado es una interacción directa de virus-bacteria, se sabe que todas las bacterias tienen su nicho único en el intestino medio y esta interacción varia de bacteria a bacteria. Las bacterias *Pedobacter sp* comúnmente se encuentran en agua, suelos y nematodos de plantas, y esta secreta heparinasa (heparin liasa), la cual degrada a la heparan sulfato, la cual se encuentra en un receptor importante usado por muchos patógenos para unirse a la superficie celular (*Plasmodium sp*, virus, *Trypanosoma sp*, *Leishmania sp* etc.). Se ha observado similitud entre la heparan sulfato del mosquito y la del hígado humano, esto es importante para la transmisión de *Plasmodium sp* desde el mosquito al hígado, y cabe la posibilidad que otro patógeno como el DENV pueda utilizar la heparan sulfato para mantenerse infectivo desde el mosquito hasta el humano. *Janthinobacterium sp* es común en ríos, lagos y cascadas y produce un pigmento violáceo insoluble que es antibacterial, antiviral, antileishmania y antitumoral, por lo tanto le puede conferir cierta inmunidad a los mosquitos contra los patógenos; por lo tanto *Pedobacter sp* y

*Janthinobacterium sp* tienen un importante rol para determinar la refractariedad (afinidad) del mosquito por DENV o *Plasmodium* y así desarrollar una estrategia para prevenir la transmisión de DENV o malaria. Una reducción en la flora del mosquito *Anopheles sp* incrementa la susceptibilidad por la infección del *Plasmodium sp*, además de que poco contenido de diversidad bacteriana puede indicar un restringido ambiente que soporta mínima colonización, lo cual aplicaría para muchas otras especies de mosquitos, por lo cual se pretende la identificación de bacterias potenciales que sirvan para prevenir la infección y que se inducirían al medio por paratransgenesis a las cepas de mosquitos. En otros hábitats, las diferentes cepas de mosquito de *Aedes* pueden tener diferentes comunidades bacterianas y estar directamente relacionadas con la refractariedad por el DENV, y por lo tanto influyen en la competencia de la capacidad vectorial del mosquito [31].

Además este mosquito puede transmitir el parasito de la filiarías tal como *Wuchereria bancroftii*, *Brugia malayi* y *Brugia timori* y considerando que es sinantrópico, se corre el riesgo de un panel de infecciones más amplio que solo la transmisión del Dengue [33].

### 3.2 El hospedero humano

La respuesta inmunológica que se genera tras la infección de DENV por el vector es la parte más estudiada y compleja. La respuesta inmune a la infección producida por DENV, contribuye a la resolución de la infección y juega un papel clave en la protección contra la reinfección. A la inversa, puede tomar un rol crítico en el potenciamiento de la severidad de la enfermedad en pacientes con DHF/DSS, es decir, dentro de la respuesta inmunológica se pueden señalar varios factores

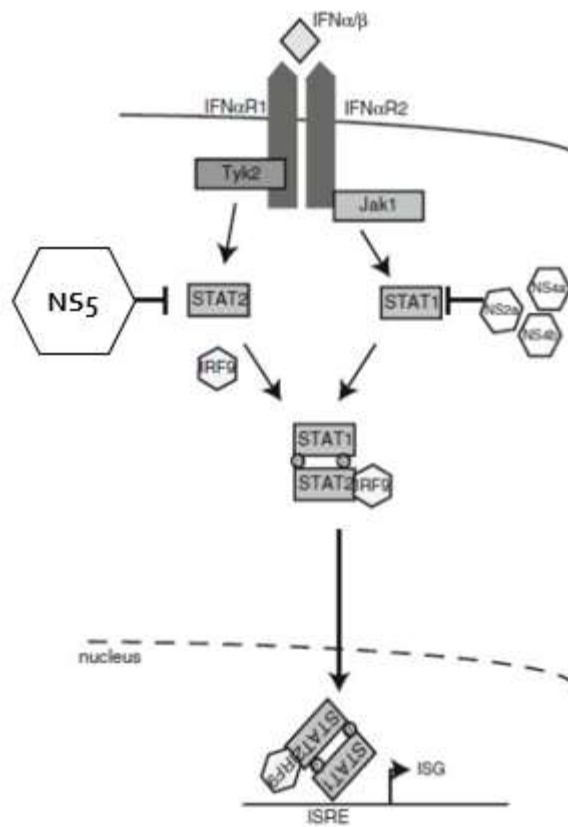
importantes que se han relacionado con un resultado severo en la enfermedad del individuo infectado. Por lo tanto la inmunización en contra la infección por DENV podría generar problemas de protección o bien de potenciamiento de la severidad en pacientes con DHF/DSS [4].

### 3.2.1 Inmunidad innata

El fenómeno que se presenta es el llamado tormenta de citosinas, ya que incrementan los niveles plasmáticos de citosinas pro-inflamatorias y vasoactivas (IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-10, CXCL9, CXCL10, CXCL11, MIF, TNF y VEGF), así como el TNF $\alpha$ , los cuales generan la desregulación de la respuesta inmune y se le ha asociado con la patogénesis de la enfermedad severa, además de que se le ha relacionado a esta tormenta [4], junto con la proteína NS1, a la generación de lisis de células infectadas con DENV por activación excesiva del complemento [34], ya que las anafilotoxinas que se generan como producto de la activación de la cascada (C3a, C4a y C5a) inducen vasodilatación y la extravasación. La primera línea de defensa en contra de la infección por DENV es la producción de interferón (IFNs) al igual que la mayoría de las infecciones virales. Tras la picadura del mosquito, DENV infecta inicialmente a las células dendríticas (DCs) intersticiales de Langerhans que se encuentran justo en la epidermis, las cuales en las primeras horas producen IFN tipo I, y no solo las DCs, sino que la mayoría de las células infectadas producen interferón [4], por ejemplo las células CD4+ en la infección, proliferan y producen interferón gamma en respuesta de antígenos solubles del virus, y también en la respuesta humoral, las células T, pueden jugar un rol importante en la inmunopatogenesis de DHF y DSS [1]. Por lo cual se han encontrado ambos tipos de IFNs; el tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y el tipo II ( $\gamma$ ), los cuales son cruciales contra la infección por DENV *in vivo* e *in vitro*.

Además de que la activación temprana de células asesinas naturales (NK), las principales productoras de IFN-  $\gamma$ , son importantes en la infección de DENV [35].

La producción de IFN se inicia cuando el virus interacciona con los receptores de reconocimiento a patógenos (PRRs), por ejemplo, las lectinas tipo-C y los receptores tipo Toll (TLRs). La transducción de señales generada por los PRRs activos lleva a la inducción de IFN. El IFN secretado se une a los receptores de IFN de las células vecinas, esto activa la vía JAK/STAT lo cual activa a más de 100 proteínas efectoras [36]. Las vías dependientes de STAT-1 e independiente de STAT-1 se han visto implicadas en la respuesta mediada por IFN contra la infección por DENV [37, 38]. La respuesta activada por IFN induce que la célula entre en un estado antiviral iniciando un gran número de procesos incluyendo el control metabólico para tratar de eliminar la infección viral. Además de que estas respuestas promueven la respuesta inmune adaptativa estimulando la maduración de DCs y activando directamente linfocitos B y Ts (figura 9) [39].



**Figura 9. Respuesta innata generada ante la infección por DENV.**

La respuesta del IFN tipo I y II es la primer línea de defensa contra el virus de Dengue. Se ejemplifica únicamente IFN-I que transduce a la activación de elementos ISRE (Elemento de Respuesta a Secreción de Interferón) [4, 36, 37, 38, 39].

DENV es capaz de inhibir la respuesta antiviral de la vía de IFN- $\alpha$ , en particular NS2, NS4a, NS4b y NS5 que podrían estar bloqueando la señalización de IFN reduciendo la activación de la vía STAT. Además de que la habilidad de suprimir la respuesta de IFN-1 se ha encontrado que depende de la cepa, dentro de cada serotipo [40].

### 3.2.2 Inmunidad adaptativa

La respuesta humoral se desarrolla seis días después de la picadura del mosquito infectado con DENV. La respuesta generada es principalmente anti-E y anti-prM que están en la superficie del virus. También se presenta una respuesta anti-NS1, ya que esta proteína se expresa en la superficie de células infectadas y es excretada como un factor soluble [41, 42]. Sin embargo, los anticuerpos pueden neutralizar o bien, potencializar la infectividad de DENV *in vivo* e *in vitro*, lo cual indica un papel ambiguo en la respuesta humoral al controlar la respuesta humoral [43]. Los anticuerpos neutralizantes más potentes son dependientes de la sepa, además de reconocer el dominio III de la proteína E y los anticuerpos neutralizantes más débiles provienen del dominio II y I. sin embargo, la respuesta humoral predominante en humanos es hacia los dominios I y II de esta proteína [4]. Los anticuerpos generados en contra de la proteína E, son claramente los mediadores principales de protección en contra de DENV y por lo tanto, el principal objetivo de la inmunización es la inducción de niveles de protección de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, existen barreras de una inmunización exitosa, como la incapacidad de producir inmunidad protectora a largo plazo [4].

La respuesta inmune que se genera para infecciones primarias de DENV es relativamente convencional, una respuesta temprana de IgM a los antígenos de Dengue seguida de una respuesta de IgG (predominantemente subclases IgG1 y IgG3). Durante una infección secundaria se observa una respuesta acelerada de IgG con una respuesta IgM disminuida. Lo que es particularmente interesante en la infección por Dengue es la respuesta inmune desencadenada hacia DENV homotípico y heterópico seguida de una infección primaria o secundaria con DENV. Este hallazgo es inesperado ya que los cuatro serotipos están relacionados estructuralmente y comparten estructuras antigénicas comunes en sus proteínas E [4].

La reacción cruzada serotípica provoca que sean detectadas las clonas de los linfocitos T citotóxicas CD4+ CD8- las cuales son restringidas a clase II y secretan interferón gamma. Se ha visto que el interferón gamma incrementa la infección en los monocitos humanos debido al potenciamiento de la inmunoinfección. Por otra parte se observó la proliferación de células mononucleadas de la sangre periférica de un donador inmune a DENV-4 en respuesta a una partícula viral generando una reacción cruzada de un linfocito citotóxico clase I específico para virus del Dengue CD8+, lo cual sugiere que este linfocito puede mediar la salida del virus y contribuir al shock lisando a la célula infectada en la infección secundaria [1].

Interesantemente, seguida de la infección secundaria, se generan anticuerpos neutralizantes contra serotipos de DENV, con los que la persona jamás ha tenido contacto. Esto complica en gran manera, el uso de ensayos de anticuerpos para identificar el serotipo causante de la infección secundaria y en la ausencia del aislamiento del virus. La inferencia que queda para determinar el serotipo causante de la infección primaria se hace examinando la magnitud de la respuesta IgM/IgG. Sin embargo, la creación de anticuerpos contra serotipos de DENV con los que el paciente jamás ha estado en contacto genera dudas sobre la capacidad de los anticuerpos neutralizantes para mediar protección en humanos [44].

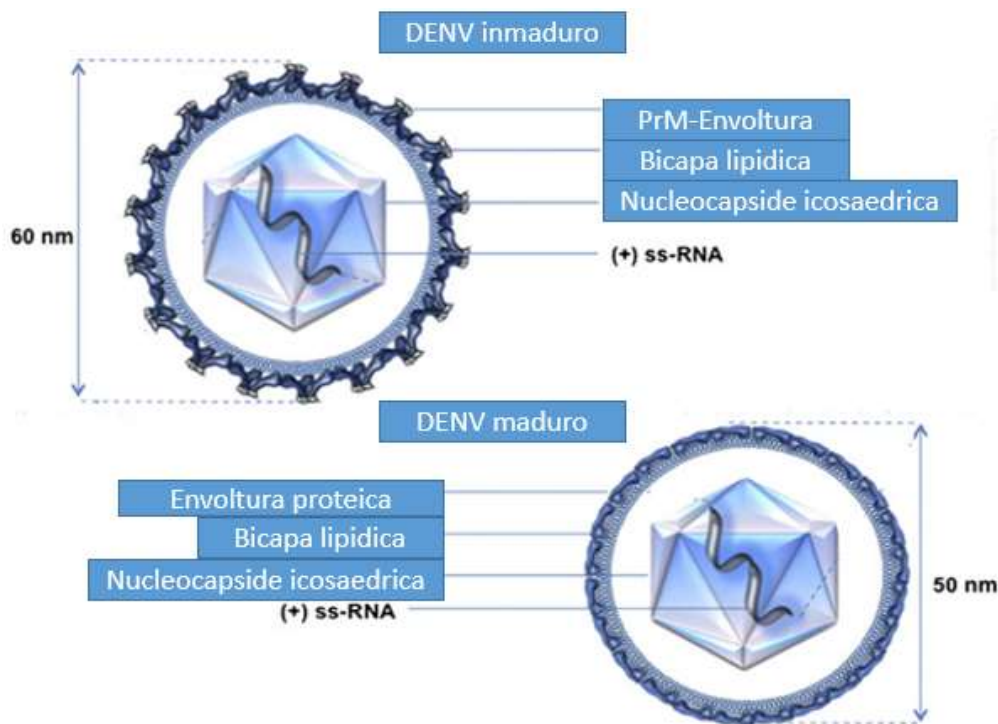
La identificación de factores que contribuyen en la enfermedad requiere estudios de la virulencia de diferentes cepas del DENV, así como la identificación de epítopes antigénicos en la superficie de los virus y definir el papel de las células del sistema inmune en la regulación de la inmunopatología de la enfermedad [1].

### 3.3 El virus

#### 3.3.1 Estructura y composición

##### 3.3.1.1 Propiedades físicas y químicas del virión

El virión maduro del Dengue consiste en un genoma de una cadena simple de RNA, rodeado por una nucleocapside aproximadamente icosaedrica o isométrica de 30 nm de diámetro. Esta nucleocapside es cubierta por una bicapa membranal de lipopolisacáridos de 10 nm de grosor de origen reticular endoplasmático. El virión inmaduro mide 60 nm de diámetro y el virión maduro completo mide 50 nm de diámetro, siendo una partícula esférica, y tiene una densidad de  $1.23 \text{ g/cm}^3$  y fue medido por centrifugación equilibrada en gradiente de óxido de sucrosa y deuterio y el coeficiente de sedimentación fue de aproximadamente  $210 \text{ s}_{20, w}$ , todos los pesos y las medidas son aproximadas [1, 4, 45] (figura 10).



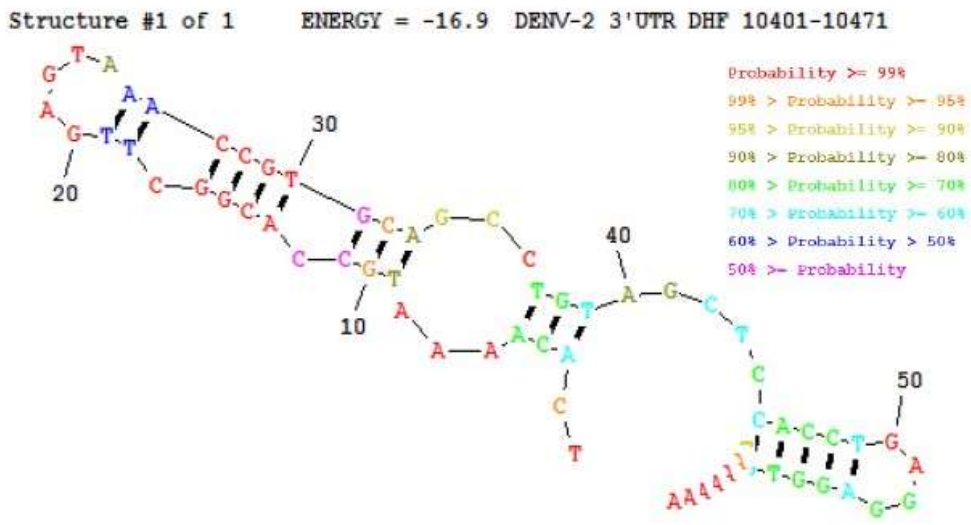
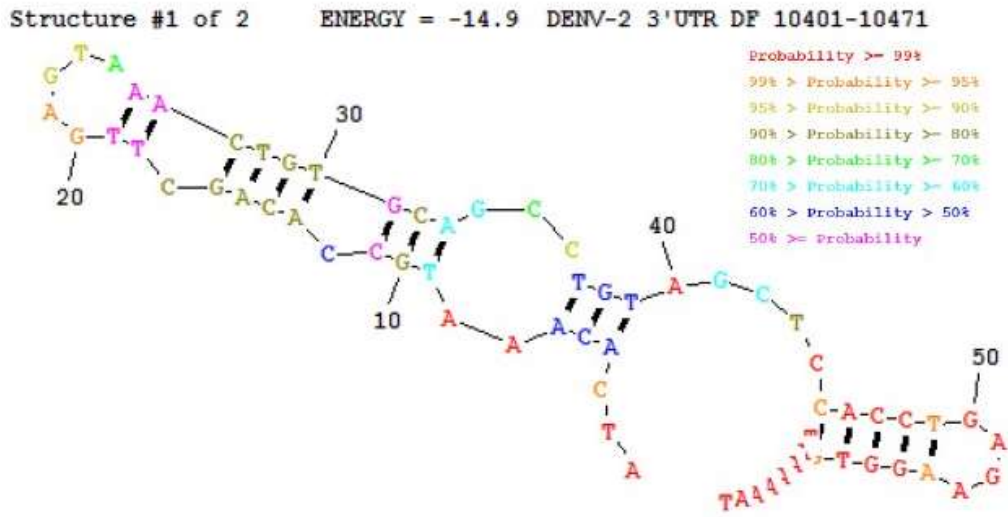
**Figura 10. Propiedades Fisicoquímicas del Virión [46].**

Se muestra el virus en su estado inmaduro y maduro.



### 3.3.1.2 Genoma

La cadena simple del RNA tiene un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 42 s<sub>20, w</sub> y un peso molecular de 3.3 x 10<sup>6</sup> Da. A partir de la información de la secuencia nucleotídica, se han predicho estructuras secundarias en las regiones no codificantes (UTR) 5' y 3' [1], particularmente los primeros 100 nc del 3'UTR forman el dominio I, la cual es variable para los cuatro serotipos, dichos nucleótidos, su estructura secundaria generan interacciones RNA-RNA que potencializan la síntesis de RNA, es decir, la función es como de enhancer en la síntesis. Al generarse la estructura secundaria del RNA en esta region con el software RNAstructure-MatthewsLab, se observa el bucle característico, el cual además mantiene su estructura en secuencias tanto de diagnóstico DHF como del DF, aunque la estabilidad energética de la estructura se ve disminuida para las secuencias de DF, con lo cual podría afectarse su capacidad de potenciamiento de la síntesis y disminuir su infectividad del RNA; dicha estabilidad depende del número de adeninas, dicho lo anterior, es que se propone que la estabilidad de la estructura secundaria en esta region podría resultar en la eficiencia del enhancer de la síntesis del RNA que está presente; también se ha propuesto que la evolución genética observada en el extremo 3' UTR de los flavivirus se ha dado dependiendo de los ciclos de replicación y transmisión en el mosquito y en su hospedero primate/humano. Esto explica por qué encontramos mayor similitud de las secuencias por país, ya que la evolución del extremo 3'UTR dependerá de la region donde se presente (figura 11) [4, 6, 26].

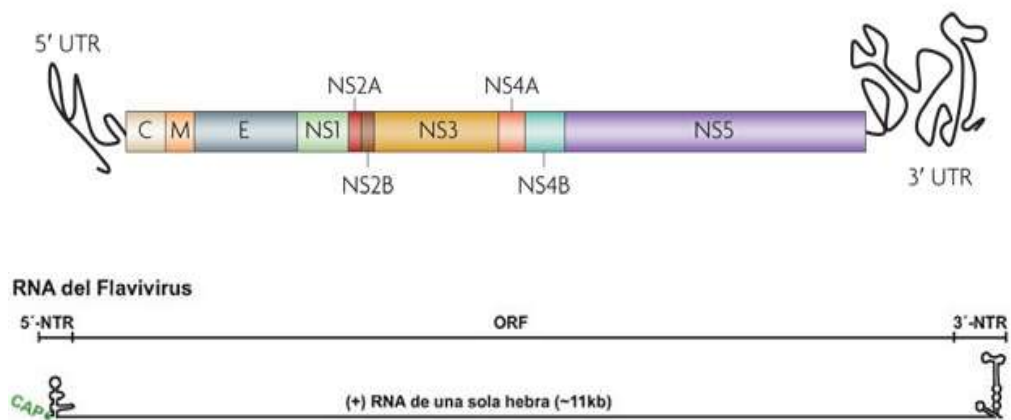


**Figura 11. Predicción de estructura secundaria de RNA de la region nucleotídica 10430-10471 (Dominio 1 del 3'UTR).**

Se muestran las estructuras de las secuencias con diagnostico DF (arriba) y DHF (abajo), su estabilidad energética, al igual que la probabilidad de cada estructura dependiendo del color [4].

El RNA es infeccioso ya que es de polaridad positiva el cual puede ser transcrito "in vitro", por lo tanto su RNA natural y que trae consigo, ya funge como "mensajero" (polaridad positiva), aunque también esta hebra resulta de la replicación (fase temprana) donde se utilizan

cadenas de polaridad negativa (estas cadenas meramente sirven para replicar el genoma); además es monocatenario. El 5' del RNA tiene un cap, y carece de una cola de poli A en el 3'. El RNA tiene una longitud de aproximadamente 10698 nucleótidos (10.7 Kb), y tiene solo un marco de lectura abierta (ORF) de 10185 nucleótidos que codifican para un polipéptido de 3395 amino ácidos, flanqueado por las regiones no codificantes (UTR), es decir, se encuentran en los extremos y son altamente conservadas ya que presentan una función indispensable en la replicación viral; La del 5' mide apenas 95 nucleótidos, seguida por el primer codón AUG donde la traducción es iniciada, esta región es considera más pequeña que la de los picornavirus. La traducción se inicia con el gen C de 342 nc, seguido del gen prM de 498 nc, gen E de 1485 nc (en total los genes estructurales 2325 nc), NS1 de 1056 nc, NS2A de 654 nc, NS2B de 390 nc, NS3 de 1857 nc, NS4A de 450 nc, NS4B de 747 nc y finalmente NS5 de 2706 nc (en total los genes no estructurales 7860 nc). El primer codón de termino (UAG) se encuentra en el nucleótido 10278, seguida por una región no codificante (UTR) de 418 nucleótidos en el 3' [4, 45, 47] (figura 12).



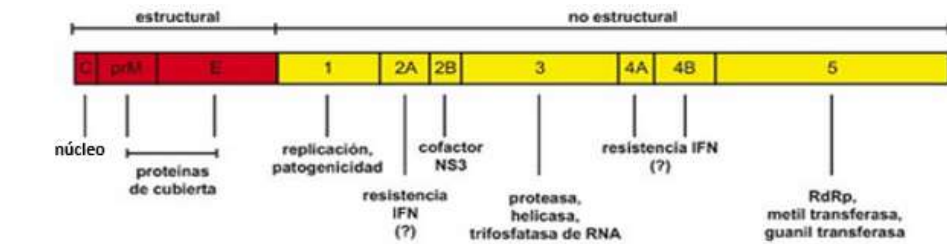
**Figura 12. Genoma (ORF) y RNA del Dengue virus.**

Se muestran las estructuras secundarias que flanquean al ORF de cadena (UTRs). (Genome Organization. Molecular Virology University of Heidelberg).

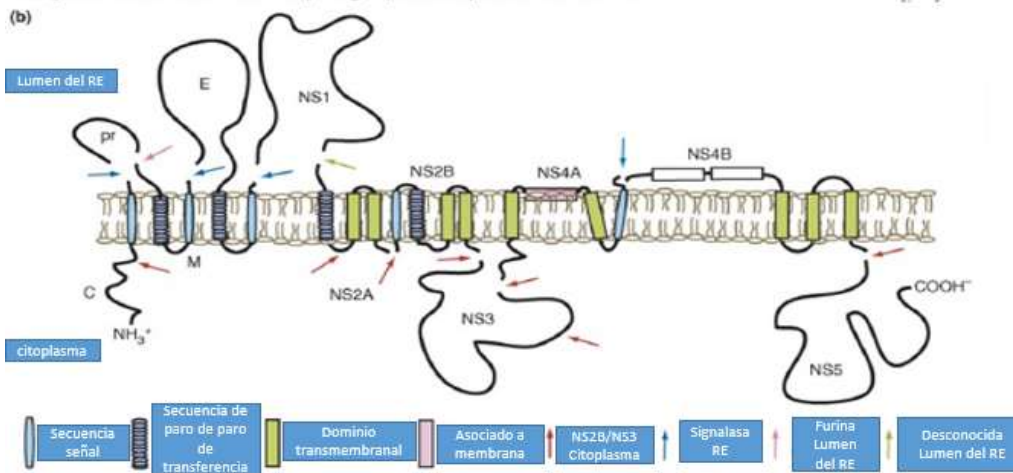
La disponibilidad de las clonas de algunos flavivirus infecciosos pueden permitirnos explorar la función de los genes y así desarrollar vacunas para sitios específicos mutagénicos [1].

### 3.3.1.3 Proteoma estructural y no estructural

La nomenclatura para los Flavivirus de proteínas estructurales y no estructurales, fue propuesta por Rice y sus colaboradores. El virus maduro contiene tres proteínas estructurales: C, la nucleocapside, M, una proteína asociada a la membrana y E, la proteína de la envoltura. El virión inmaduro (es decir cuando sigue dentro), contiene una proteína que es conocida como preM, la cual es precursora de M. Los genes que codifican para las proteínas estructurales (3), están localizadas en el 5' y comprenden un poco más de un cuarto de la región con capacidad codificadora del RNA. El orden de las proteínas estructurales en el 5' terminal es C-prM (M)-E (Figura 13), las proteínas derivan de un único polipéptido transmembranal precursor, lo que genera una poli proteína [1, 48].



**Poliproteína del Flavivirus: Topología (Putativa) de la membrana**

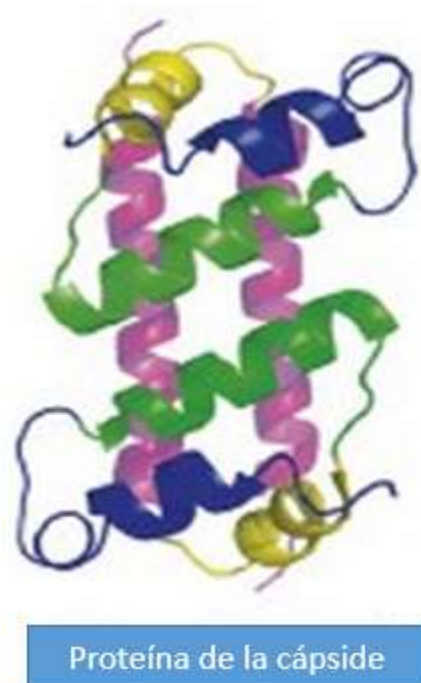


**Figura 13. Proteoma del Dengue virus.**

Se muestran las proteínas que contiene el polipéptido así como sus sitios de corte. [Protein Organization. Molecular Virology University of Heidelberg y 48].

La nucleocapside se conforma por múltiples copias de la proteína C y es la primera en sintetizarse durante la traducción, y tienen un peso molecular de 13500 Da, siendo rica en residuos de Lisina y Arginina (25%), este alto carácter básico probablemente le permite interactuar con el RNA al cual protege. Esta proteína carece de N-terminal, el cual funciona como señal hidrofóbica, lo que sugiere que su síntesis no sucede en ribosomas unidos a la membrana. Un tramo hidrofóbico de amino ácidos en la parte del carboxilo terminal, probablemente actué como señal transmembranal de la proteína adyacente prM, este dominio hidrofóbico puede servir para anclarse transitoriamente la proteína C a

la membrana en el sitio de replicación después del corte que hace probablemente una signalasa del hospedero en el N-terminal de prM. Después, el dominio hidrofóbico se corta de la proteína C quizá por una proteasa codificada por el virus antes de que el virus madure. Diagramas de hidropatía de esta proteína, indican que es estructuralmente conservada entre flavivirus, aunque menos que otras proteínas estructurales [1, 4 y 48]. (Figura 14).



**Figura 14. Estructura obtenida en NMR del dímero de la proteína de la cápside.**

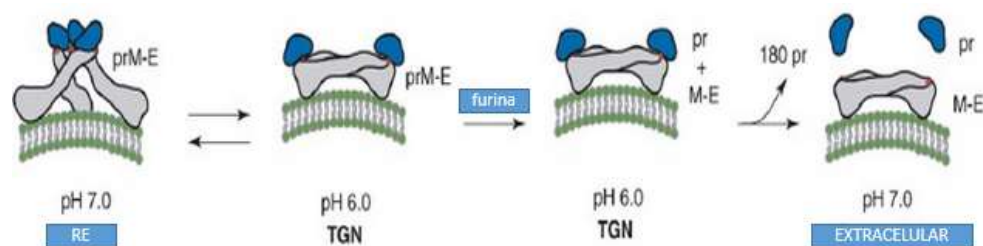
La hélice uno se muestra en azul, la dos en verde, la tres en amarillo y la cuatro en rosa [48].

Un corte específico proteolítico de la proteína glicosilada precursora prM (aproximadamente 21000 Da), durante la maduración del virus, resulta en la formación de la proteína pequeña M de 8000 Da “perteneciente a la envoltura” ya que esta se encuentra anclada en la bicapa. Este corte que ocurre en las vesículas ácidas post-Golgi, parece preceder a la liberación del virus de la célula, así como la cantidad de pr asociado al

virus extracelular, es bajo. La formación de M a partir de prM es crucial, ya que es el evento terminal de la morfogénesis, lo cual resulta en un gran incremento en la infectividad y en la reorganización de la superficie, la cual se compone de los heterodímeros de preM-E en los viriones inmaduros, dando paso mediante el corte a cambios rotacionales y de conformación para la maduración del virión en un rearreglo de la glicoproteína E (la cual también se encuentra anclada a la bicapa) como homotrímero, con lo cual se reduce el diámetro de la partícula viral y la proteína pr queda libre y soluble en el citoplasma, siendo también liberada al exterior celular [1, 4 y 48] (figura 15 y 16).



**Figura 15. Proteína prM tomada con rayos X [14].**



**Figura 16. Esquema de los cambios entre las proteínas pr, M y E ante el corte en viriones inmaduros.**

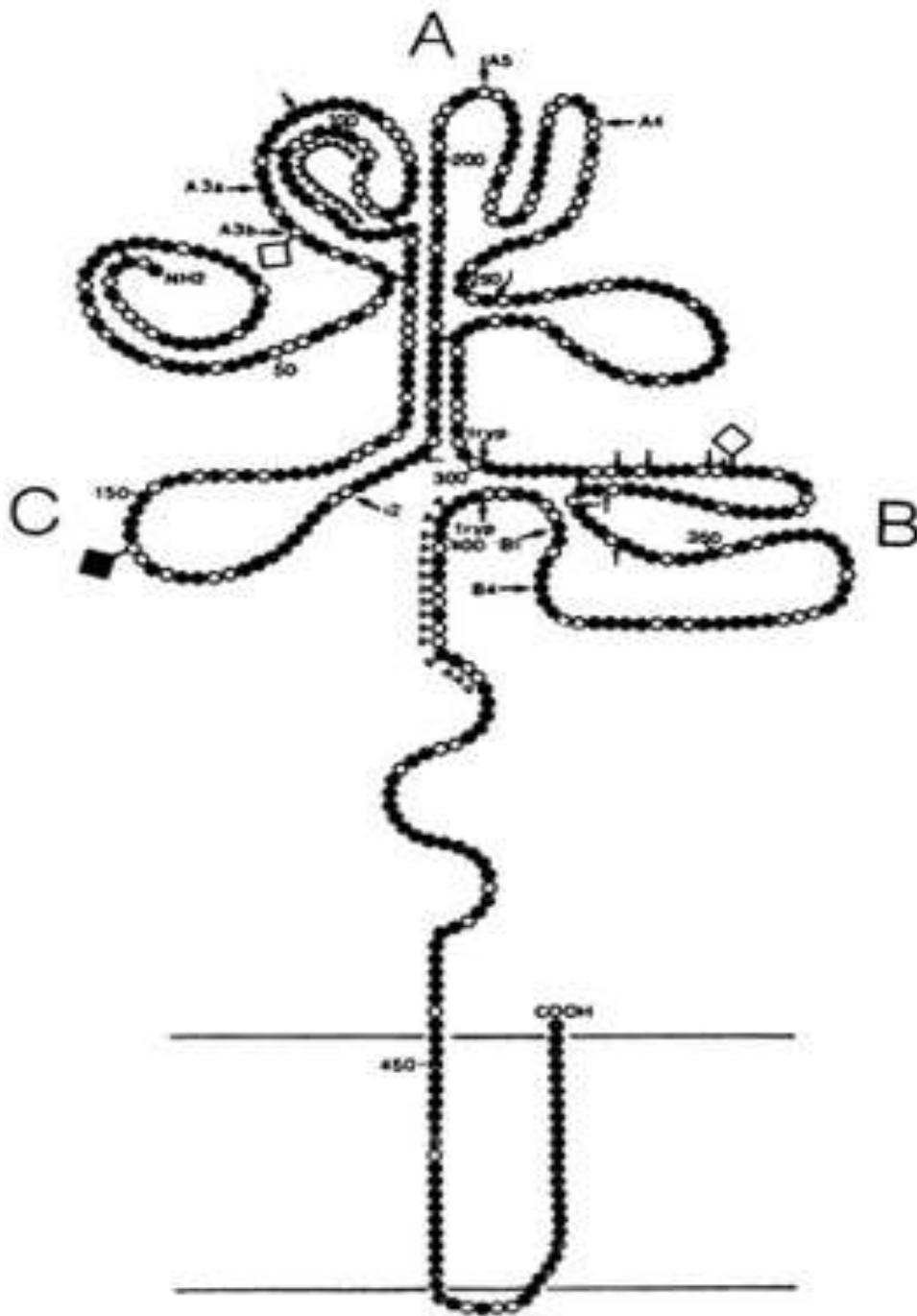
(A) Durante el ensamblaje del retículo endoplásmico y virus inmaduros (B) detectados en el espacio extracelular. El clivaje final de la prM es catalizado por la proteasa celular furina (aparato de Golgi), liberando al

fragmento pr y permitiendo la reacomodación de las glicoproteínas M-E, al igual que se muestran los pHs a los que ocurre el corte y rearreglo [48, 49].

La glicoproteína E, es la glicoproteína mayor de la envoltura con un peso de 53000 Da, aparece como un homotrímero en la superficie de los viriones maduros o como un heterodímero de prM-E si se encuentra intracelularmente el virión. La comparación de las secuencias del gen E de diferentes flavivirus, muestran una conservación perfecta de 12 residuos de cisteína, los cuales forman 6 puentes disulfuro y al deducirse la localización de estos, se obtiene un modelo, correlacionándose propiedades estructurales de los diferentes epitopes de los dominios con dichos puentes. El modelo de la proteína E (figura 11), consiste en 3 dominios antigénicos no superpuestos compuesto de al menos 16 epitopes distintos, A, B y C. A y B contienen epitopes discontinuos y su integridad depende de los puentes disulfuro intactos, y el hecho de que el dominio C (3) que es muy variable, no tenga puentes, los epitopes en esta región no pueden ser destruidos por reducción, carboximetilación o desnaturalización por dodecil-sulfato de sodio, solo pudiéndose desnaturalizar después de remover la región de carbohidratos de la cadena. Los dominios funcionales (A=1 y B=2) son los responsables de la neutralización del virus (los que generan la respuesta inmune), hemaglutinación, fusión e interacción con receptores específicos de la superficie celular. Epitopes antigénicos asociados a la neutralización del virus han sido mapeados usando anticuerpos monoclonales de ratón en ensayos competitivos de unión, mostrándonos 3 o 4 sitios antigénicos con más afinidad; aunque epitopes inmunodominantes en ratón pueden no ser inmunogénicos en humano y vice versa, también estudios sobre neutralización de epitopes usando péptidos sintéticos, proteínas expresadas y neutralización por variantes de escape de anticuerpos monoclonales han sido utilizados [1]. Estructuralmente en un virión inmaduro (heterodímero= pr-M-E), en



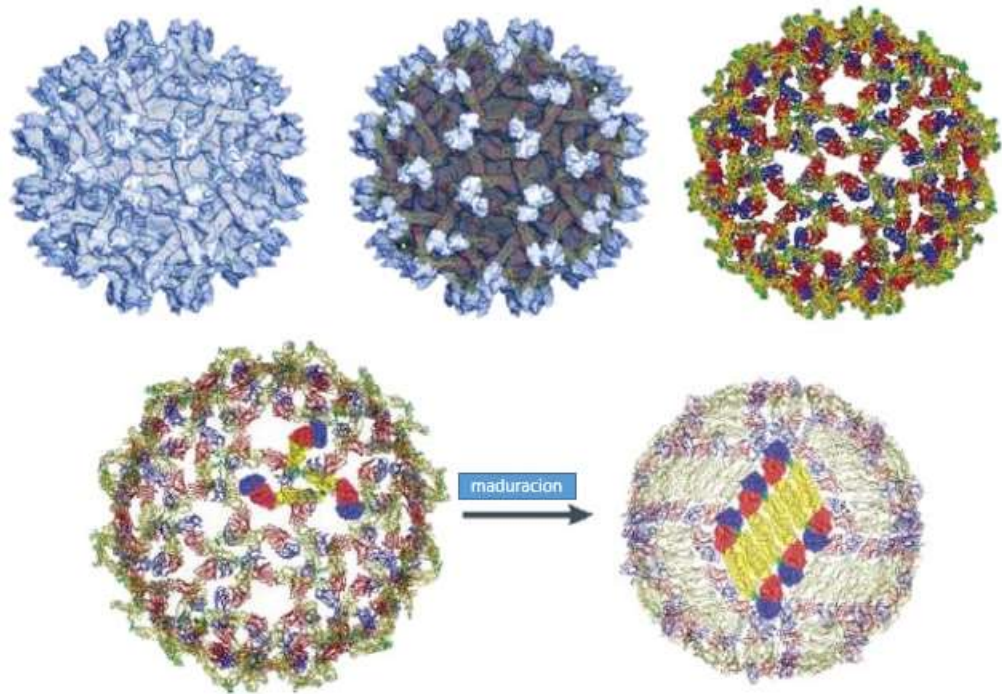
la proteína E, el dominio I está posicionado entre el dominio II (el dominio de homotrimerización) y el dominio III (de reconocimiento de inmunoglobulina) [50, 51]. En el virión maduro, después del corte con furina, el complejo deja de ser una heteroproteína pr-M-E, donde la proteína E reacomoda sus dominios y utiliza un péptido fusión, donde además presenta una orientación de cabeza-a-cola como homotrímero (3 proteínas E), es decir, se encuentra en grupo de tres de manera paralela una de otra en la superficie viral, y la proteína M se encuentra de manera homoproteica debajo de la superficie viral y embebida en la bicapa lipídica. Esta simetría de la proteína E, sugiere que presenta tres posibles configuraciones en tres medios químicamente distintos que pueden jugar distintos papeles en etapas diferentes de la infección (figura 17) [4].



**Figura 17. Modelo de la proteína E.**

Se muestran sus residuos hidrofóbicos en círculos blancos, los círculos con punto representan residuos intermedios y los círculos negros representan aminoácidos hidrofóbicos. La posición del número es de

cada 50 residuos. También se muestran los puentes bisulfuro que se forman entre las cisteínas. Las flechas representan sitios potenciales de corte. Se muestran los 3 dominios y la membrana lipídica con las 2 regiones transmembranales [1].



**Figura 18. Cambios conformacionales de la superficie viral de DENV en el proceso de maduración.**

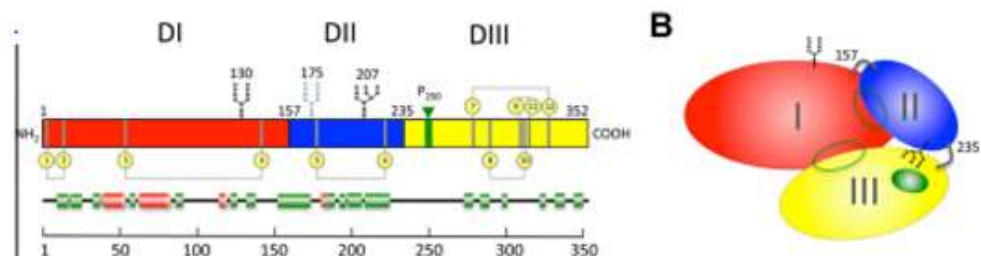
Se observa la superficie de un virión inmaduro por Crioelectromicrografía, Arriba-izquierda= la proteína prM (pre-membrana), arriba-derecha= tenemos a la proteína E (envoltura) antes de poder formar los homotrímeros debido al impedimento que genera la proteína prM, cabe destacar que ambas proteínas se encuentran embebidas en la membrana lipídica obtenida del huésped; arriba-en medio= superposición de ambas imágenes mostrando al virión inmaduro tal como es (60 nm), donde se destaca la presencia de la proteína prM “impidiendo” el rearrreglo de la proteína E. Abajo-izquierda= se enfatiza en los diferentes dominios de la proteína E, rojo= dominio I, amarillo= dominio II, azul= dominio III y verde péptido fusión,

los cuales al cortarse la proteína pr de M, se desplazan para formar homotrímeros, resultando en un virión maduro y más pequeño, tal y como se muestra abajo-derecha. Los posibles cambios de conformación se describen en el texto [1, 4, 50, 51].

Siete proteínas no estructurales y no sobrelapadas han sido identificadas y mapeadas del RNA por secuenciación aminoacídica (amino y carboxi terminal), codificando en la región 3' del RNA y a partir de la proteína E, encontrándose en el siguiente orden: a NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5 [1].

NS1, la primer proteína no estructural, se encuentra glicosilada en el dominio I (sitio del aminoácido N130 para N-glicosilación), es decir se agrega el azúcar complejo, indispensable e importante para la formación, secreción, solubilidad e interacción con moléculas del complemento C1s y C4; pesa 48000 Da, además contiene 2 señales del tipo Asn-X-Ser/Thr, que son usadas para la adición de carbohidratos al N-terminal. Esta es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso como una glicoproteína oligomérica hidrofílica, e inmediatamente después de eso, forma una unión no covalente homodimérica, la cual es más hidrofóbica que el monómero, y este incremento de hidrofobicidad no se sabe exactamente si se debe a la dimerización o a otras modificaciones postraduccionales. Después de la formación del dímero y antes de ser secretada de la célula, esta glicoproteína es transportada al aparato de Golgi, donde 2 de sus 4 glicanos unidos al N-terminal son modificados por una manosa en una proteína compleja. NS1 puede permanecer intracelular, ser transportada a la membrana plasmática o puede ser secretada de la célula, donde presenta una estructura hexamérica al ser secretada al medio extracelular. La secreción de grandes cantidades de NS1, está restringida a mamíferos infectados y no a células de mosquito. La N-glicosilación no parece ser requerida en la dimerización o la secreción. Está implicada en la

replicación ya que está participando asistiendo en la morfogénesis viral, además es importante señalar que tiene importancia inmunológica, para la detección de células infectadas por ejemplo, con funciones sorprendentes como la unión a ciertos componentes de la respuesta inmune innata ya que desde que la célula expresa la proteína en su superficie, comienza a ser blanco para la inmuno citólisis o lisis, ya que se conoce que la forma hexamérica tiene afinidad a componentes de la cascada de complemento proC1s/C1s y C4 lo cual resulta en una eficiencia de corte de C4 a C4a y C4b lo cual limita el C4 viable, protegiendo al virus de la neutralización por complemento. De manera antagónica se demostró que se une a la proteína reguladora C4BP, reguladora de la cascada del complemento que se une a C4 evitando su rompimiento, donde se hipotetiza que interfiere en la activación de las vías clásicas así como vía lectinas; lo anterior indica que NS1 tiene la capacidad de modular la respuesta del complemento del huésped y estar íntimamente relacionado con el aumento de la permeabilidad vascular y por lo tanto en la patogénesis de DHF en humanos, la falta de glicosilación de N130 lleva a una falta de NS1 soluble hexamérica debido a que la glicosilación es para mantener y estabilizar al hexámero, la cual en modelo animal murino disminuye la neurovirulencia así como en mosquito, el cual no posee esta maquinaria de glicosilación; todo esto hasta hace no mucho se desconocía y no se sabía que tenía otra función además de participar en el evento de replicación; cabe señalar que esta region debido a que presenta mayor presión de selección, es que presenta variabilidad genética [1, 4 y 52] (figura 19).

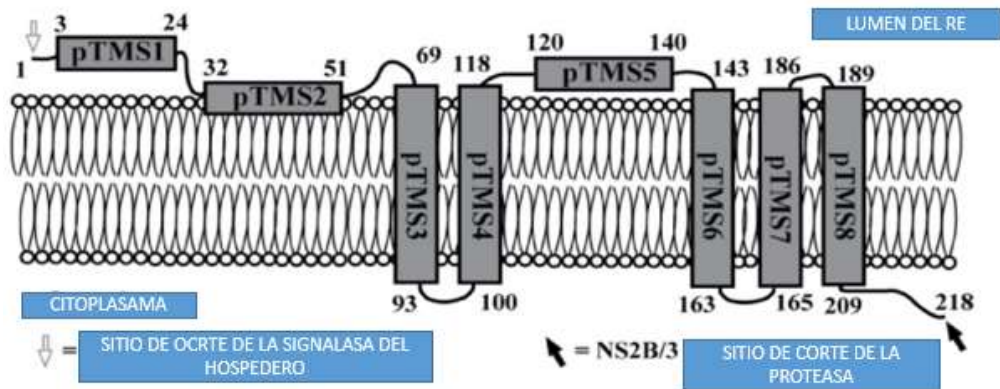


### **Figura 19. Representación de la NS1.**

(A) Se muestra el dominio I (rojo), dominio II (azul) y dominio III (amarillo). En esferas amarillas se muestran los 12 residuos de cisteína conservados. En negro se muestran los 2 sitios de N- glicosilación. La predicción de estructura secundaria se muestra abajo. La hélice en rojo y  $\beta$ -plegada en verde. (B) conformación tridimensional de NS1 para la generación del dímero [52].

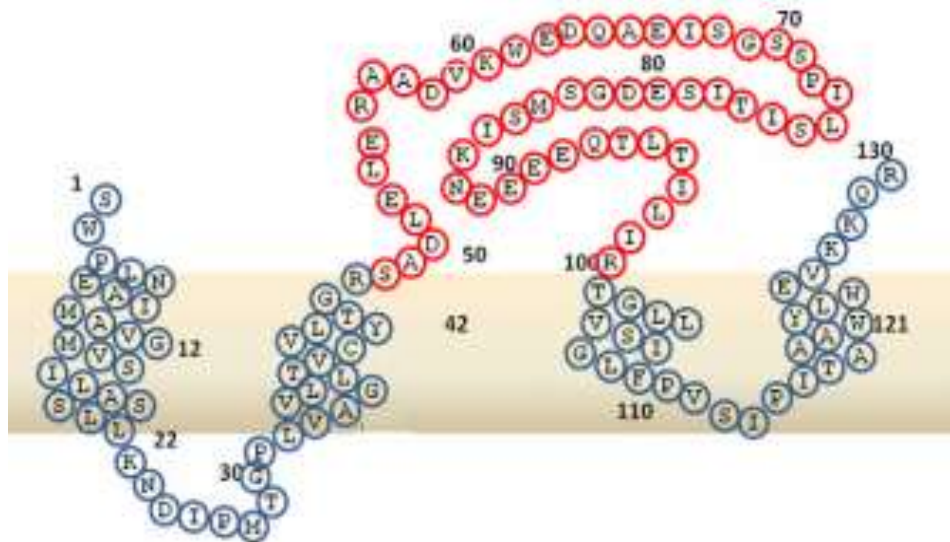
La región codificante NS2, consiste en 2 proteínas. NS2A ha sido identificada como una proteína hidrofóbica de 20000 Da con muchos dominios putativos transmembranales, los cuales son importantes que mantengan el carácter hidrofóbico ya que un cambio de carga por pequeño que sea, podría resultar significativo. Es requerida para un proceso proteolítico apropiado del C-terminal de NS1, por lo tanto se ha asociado con funciones esenciales e importantes para la replicación, ensamblaje y liberación de las partículas virales así como presentar un papel en la unión y degradación de STAT1 como mecanismo de evasión de la respuesta inmune innata del hospedero, sin embargo aún se desconoce cuáles son las regiones que participan en cada region y poco se conoce de su estructura donde apenas en 2013 se propone un modelo con una hipotética estructura (Figura 14) estructura propuesta en 2013. NS2B pesa 14500 Da y es hidrofóbica, siendo esta region de la proteína la formadora y reguladora de la actividad de proteasa viral NS2B-NS3 encargada de realizar varios cortes de la poliproteína tras la traducción, por lo tanto es una region relevante en relación a la severidad de la patogénesis en la infección de DENV en su hospedero debido a la eficiencia de corte , siendo hasta hace poco que se tiene idea de la estructura de esa proteína, donde se predice la presencia de tres dominios transmembranales y una porción hidrofílica, del aminoácido 51, 53-55 y 56-93, los cuales tienen la función de activar la

proteasa que forma con los primeros 140 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína no estructural NS3 (figura 20) [1, 4, 53, 54].



**Figura 20. Modelo de la estructura de NS2A en la membrana.**

Se observa el modelo de DENV-2 NS2A embebida en la membrana del retículo endoplásmico. La región 1-69 se observa en el Lumen del RE seguida de dos porciones transmembranales. La región 118-143 en el Lumen del RE seguida de tres porciones transmembranales [54].



**Figura 21. Representación de NS2B en la membrana del retículo endoplásmico.**

Se muestra la conformación de la proteína no estructural 2 en la membrana. En azul se representa la porción transmembranal y en rojo

la porción hidrofílica con función reguladora de la proteasa NS2B-NS3 [53].

NS3 es una proteína de 70000 Da e hidrofílica, y se sugiere que tiene actividad de proteasa en el proceso postraducciona de la poliproteína, así como ser componente de la RNA polimerasa viral (helicasa y NTPasa); la región que codifica para la helicasa, al determinarse su estructura, se observa que presenta a lo largo de los dominios 1 ( $\beta$ -plegada) y 2 parches con aminoácidos cargados negativos en dirección de la formación del túnel, dado que en estas regiones se forma la estructura por donde se predice pasa y se desenrolla el ssRNA que va a servir de molde para la replicación. Esta fuerza de repulsión tan grande que presenta sirve para que la eficiencia de desenrollado del RNA sea óptimo y no permita la formación de otras estructuras o retraso del desenrollamiento debido a la tracción de las cargas; por lo tanto, si se reduce la carga (cambio de aminoácido que conlleva modificación de carga a un menor contenido energético negativo), o por aminoácidos con carga neutra, podrían afectar y disminuir la eficiencia de desenrollamiento del RNA en el evento de replicación; este dominio 1 de la helicasa, posee una alta homología funcional con el dominio 2, lo cual es de suponer provienen de un proceso de duplicación génica. Mientras la región del N-terminal comparte homología en la secuencia con tripsina como proteasa de serina, el C-terminal al principio se pensaba que la secuencia se parecía a la de proteínas que unen trifosfato al nucleósido, lo cual desempeña la función de la replicación del ácido nucleico, pero ahora ya se sabe que ese parecido es debido a que se trata de una trifosfatasa de RNA; esta región presenta variabilidad genética debido a que presenta mayor presión de selección [1, 4 y 48] (figura 22).



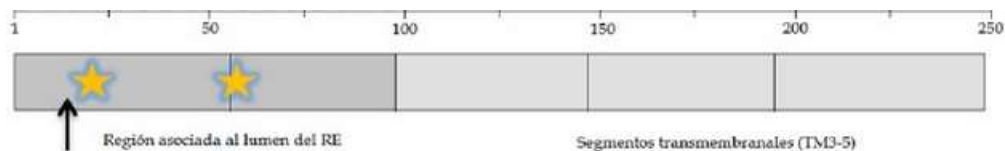


**Figura 22. Estructura de listones del dominio de proteasa y helicasa de NS3.**

Se representa la conformación tridimensional (mediante estructuras de  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -plegada) de la proteasa y la helicasa (con 3 dominios, el dominio 3 es una estructura única para flavivirus) de DENV NS3 [48].

NS4A y NS4B, estas proteínas hidrofóbicas tienen un peso molecular de 16000 y 27000 Da respectivamente y podrían ser cofactores de la polimerasa viral de RNA dependiente de RNA (NS5), formando un complejo de replicación del RNA viral [1]; la estructura de NS4A hasta ahora no ha podido determinarse, sin embargo, se conoce la funcionalidad de algunas de estas regiones. Se conoce que el extremo N-terminal de esta proteína, presenta la actividad de cofactor del dominio de helicasa de NS3 durante el evento de replicación, además de que se le atribuye a esta proteína la formación de los rearrreglos membranales esenciales para la formación del complejo de replicación, además de que la región del N-terminal de la porción de NS4B, es

asociada a la función de evasión de la respuesta de interferón tipo I ya que se une y degrada a STAT1 (por lo que es recurrente a la asociación de severidad de la infección debido a que un factor importante de esta es la modulación de la respuesta de evasión de la respuesta inmune innata), esta region se encuentra asociada al lumen del retículo endoplásmico con una posible función membranalmente activa, y de igual manera, la estructura de la NS4B aun o se determina con detalle; cabe señalar que esta region debido a que presenta mayor presión de selección, es que presenta variabilidad genética, al igual que ocurre con NS1 y NS3 [4 y 55] (figura 23).

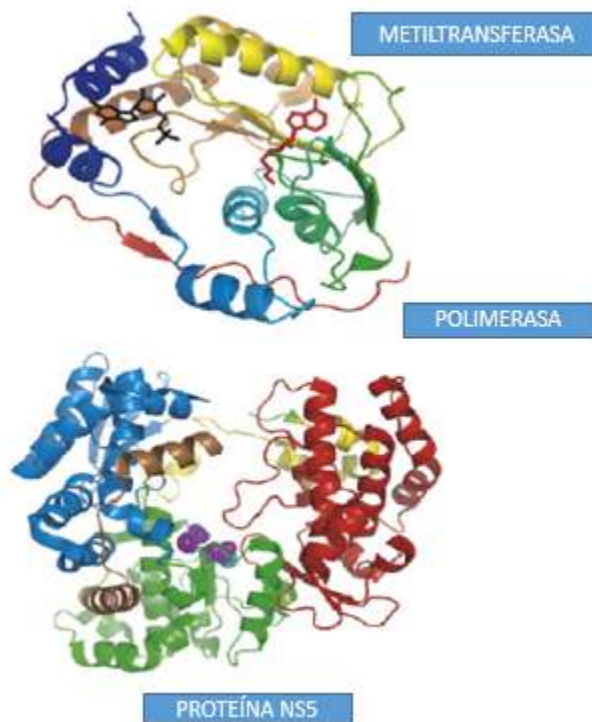


**Figura 23. Representación lineal de NS4B.**

Se representa los dominios funcionales de NS4B. Se colocó estrellas a la región asociada al Lumen del RE, la cual tiene función de evasión de la cascada del  $\text{INF}\alpha/\beta$  y los fragmentos TM3 y TM5 asociados a la supresión de RNAi [55].

Basándonos en su gran tamaño, peso de 105,000 Da y la presencia de Gly-Asp-Asp en su secuencia aminoacídica, la cual es común en otras polimerasas virales de RNA, se sabe que parte de la proteína NS5, es una polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp) [1], la cual en el dominio conocido como “palma”, se conforma de la  $\alpha$ -hélice 16 y 18, donde se presenta la estructura túnel por donde el RNA naciente recién sintetizado va saliendo, este centro catalítico de polimerización de la cadena de nucleótidos, presenta tres aminoácidos muy conservados (GDD=662-663-664). Se ha reportado que esta region debe presentar cambios conformacionales finos controlados para evitar un choque del RNA saliente con la estructura de “pulgar” que tiene el *priming loop* donde inicia la síntesis de RNA, de manera que un cambio de

aminoácido en este dominio podría alterar la eficiencia de cambio de conformación del dominio de “palma”, y de manera indirecta afectar la eficiencia de replicación del RNA [58], donde incluso se han reportado cambios en este sitio, los cuales reducen hasta 51 LD<sub>50</sub> la neurovirulencia observada en ratones, por lo tanto se corrobora la importancia de la región con la severidad de la patogénesis [56] (figura 24).



**Figura 24. Representación de listones de la metiltransferasa y RdRp codificada en NS5.**

Se muestran las 2 regiones, la primera abarca del aminoácido 1 al 272 de la proteína NS5 mientras que los dominios de la RdRp abarcan del aminoácido 273 al 900. La polimerasa muestra el dominio de los dedos en azul, en rojo el del pulgar y en verde el de la palma [58].

#### 3.3.1.4 Composición de la membrana viral

La composición lipídica de la envoltura viral refleja con pocas excepciones, la de la membrana de la célula hospedera de la que el virus se produce presumiblemente, pudiendo ser obtenida del retículo endoplásmico, después de una examinación del flavivirus encefalitis de St. Louis, se encontró que los lípidos eran el 17% del peso seco y de estos el 90% eran fosfolípidos, el 7% esfingomielinas y el resto consistía en colesterol y lípidos neutrales. Esta estructura es importante ya que la nucleocapside es una estructura tenue permeable a RNAsas y así el rol de la envoltura también sería la de proteger al RNA. Probablemente también en el primer contacto del virio con la célula, la envoltura se fusiona a la membrana celular durante la penetración, para después pasar a la etapa de desnudamiento, presumiblemente promovido por un único dominio de fusión de la proteína E [1].

### 3.3.2 Recepción y penetración

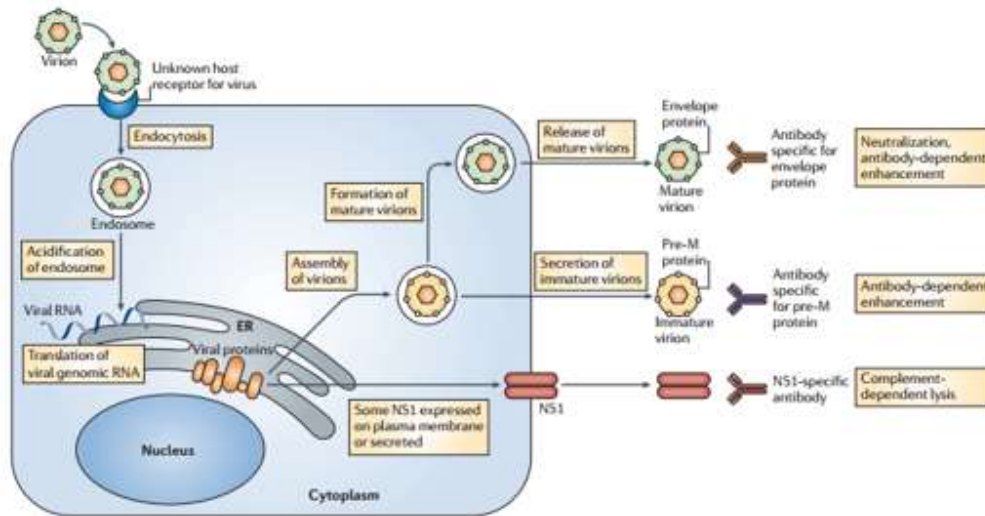
El virus del Dengue se une a las células susceptibles o blanco primarias (la línea mononuclear fagocítica: monocitos MO, macrófagos Mø y principalmente células dendríticas DC incluyendo las células de Langerhans, las cuales son una subpoblación de esta última y que se encuentran en la piel) en una infección natural por DENV por cualquiera de 2 mecanismos conocidos. En un caso las partículas virales no neutralizadas, pueden ser tomadas por la inmunoglobulina G (IgG) y esta puede unirse a los macrófagos o monocitos vía receptor Fc encontrada en la superficie celular. Cuando el receptor Fc sujeta a la región constante del IgG, la célula podrá ser infectada en la presencia de una reacción cruzada serológica y la neutralización llega a su punto final, obteniéndose un gran número de células infectadas y un gran título viral, esta contradicción inmunológica, se conoce como mejora de la infección inmune, la cual puede contribuir a la patogénesis del DHF y

DSS. Alternativamente el virión puede unirse a las células de la línea mononuclear fagocítica, vía receptor del virus sensible a tripsina. La composición y estructura de este receptor celular, nos dice mucho de las regiones distintas de la glicoproteína E a las que se une, por ejemplo, se tiene al receptor no específico de material extraño de la célula presentadora dendrítica de lecitina tipo C llamado DC-SIGN, siendo el punto principal que permite la entrada del virus al interior de la célula la cual migra hacia el nódulo linfático más cercano [1, 57, 58].

En insectos, DENV inicialmente infecta el intestino medio (donde se propaga y replica posteriormente a diversos órganos y compartimentos). El amplio intervalo de células permisivas indica que el virus se une a varias moléculas de superficie celular o bien se une a varios receptores [4]. En el mosquito se ha descrito que DENV interactúa con las proteínas de shock de calor Hsp70 y Hsp90 [59], R80 y R67 [60], Heparan sulfato [61], CD14 [62], y en células de mamíferos se une a lectina tipo-C, receptores tales como la molécula de adhesión intracelular específica de DC ICAM-3 (DC-SIGN, CD209<sup>+</sup>) [63] y receptor de manosa [64].

En la invasión a la célula hospedera, la membrana del virión puede fusionarse con la membrana plasmática con deposición inmediata de la nucleocapside en el citoplasma, o la membrana plasmática puede invaginarse, formando una vesícula de membrana endocítica (endosoma) alrededor de la envoltura viral, es decir, al igual que en otros flavivirus, la endocitosis de DENV es mediada por clatrina para entrar a la célula [65]. Las partículas son transportadas por endosomas Rab5-positivo, los cuales maduran a Rab7-positivos ante la desencapsidación [66]. Usando microscopía electrónica se ha reportado que los viriones del Dengue y la Encefalitis japonesa penetran la membrana plasmática de las células del mosquito a través de una disrupción creando sitios de absorción, esto fue observado también en

partículas de Dengue que entraban a monocitos de sangre periférica, es decir, creaban vacuolas macropinocíticas, estos datos sugieren que los flavivirus tienen diferentes mecanismos para entrar a la célula, y además de que la interpretación de las micrografías electrónicas en las que las conclusiones se basan, son complicadas debido al PFU [1] (figura 25).



**Figura 25. Ciclo de replicación del Dengue y antígenos.**

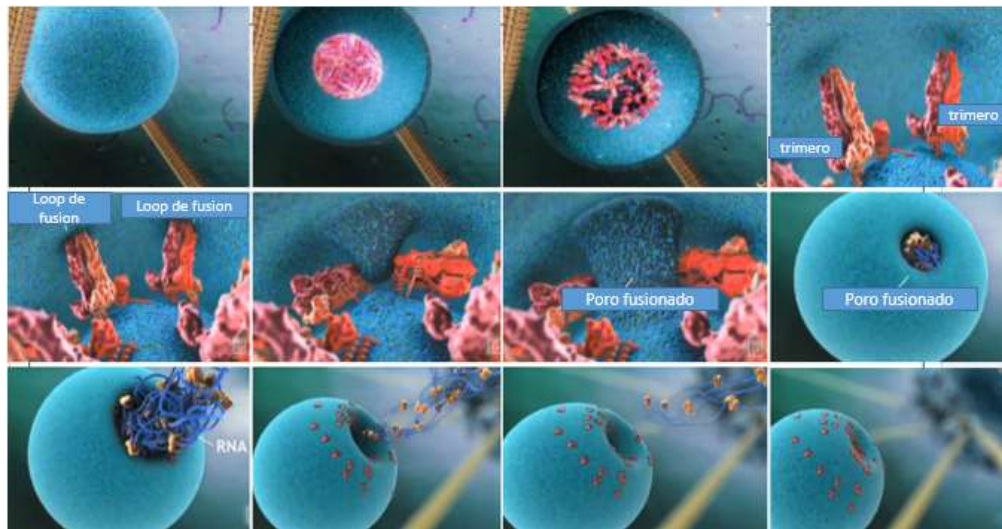
El virus se une a los receptores de la superficie membranal celular (no están completamente caracterizados aún), y así es como los viriones se internalizan mediante endocitosis. La acidificación de las vesículas endocítica permite el rearrreglo de la superficie de la envoltura (glicoproteína E), posteriormente se fusionan las membranas del virión y de la vesícula y se libera el RNA en el citoplasma. El RNA se traslada después para producir las proteínas virales en el retículo endoplásmico, y así las proteínas virales y el nuevo RNA recién sintetizado se ensamblan en viriones inmaduros dentro del lumen del RE, posteriormente ocurre un corte en la proteína precursora de la membrana viral (prM) por la enzima del huésped furina permitiendo la formación del virio maduro, el cual es secretado de la célula. Además la proteína no estructural sintetizada (NS1) se expresa en la membrana

plasmática de la célula o es excretada. Algunos viriones son secretados en forma inmadura. Viriones maduros e inmaduros inducen la respuesta de anticuerpos contra la proteína E, y esos anticuerpos pueden neutralizar o incrementar la infección mediante mejora o potenciamiento de la infección dependiente de anticuerpo. Viriones inmaduros también inducen respuesta de anticuerpo contra la proteína pr-M. Anticuerpos específicos para NS1 pueden interactuar con la unión a la membrana de NS1 y causar lisis dependiente de complemento de las células infectadas [67].

### 3.3 3 Desencapsidacion

Similar a otros endosomas virales, al tener al endosoma Rab7-positivo (endosoma maduro en donde se activa la fusión de membranas principalmente) [66], la fusión de proteínas de la envoltura viral con la membrana celular endosomal parece ser dependiente del pH, más específicamente de las condiciones acidas [1], se ha propuesto que el pH ácido de los endosomas genera la disociación de los homotrímeros de E, lo cual genera la exposición del dominio II y por consiguiente la exposición del péptido de fusión hidrofóbico a la membrana lipídica del endosoma. Por lo tanto, los residuos hidrofóbicos del dominio II se insertan en la membrana, permitiendo la formación de los heterodímeros de E; entonces el dominio III cambia de conformación y se dobla hacia el péptido de fusión en una horquilla. Este mecanismo forzaría a la membrana endosomal y a la membrana viral a doblarse para acercarse una a la otra y eventualmente fusionarse, dando paso a la deposición o liberación de la nucleocapside al citoplasma celular [68]. Evidencia de que la glicoproteína E es la que se fusiona, viene de experimentos que muestran como los Ig monoclonales anti-E inhiben la

fusión y además dicha proteína sufre un cambio conformacional irreversible en pH ácido [1, 69] (figura 26).



**Figura 26. Proceso de desencapsidación del virión.**

Se muestra el proceso de desencapsidación después de la endocitosis del virión debido a cambios de pH (reducción del pH) sufridos dentro del endosoma, los cuales promueven el rearrreglo de las glicoproteínas de la envoltura (proteínas E) exponiendo el bucle del péptido fusión y permitiendo que las glicoproteínas individuales o monómeros se muevan libremente en el plano de la envoltura lipídica, lo cual conlleva al virtual anclaje en la membrana interna del endosoma de los trímeros que forman las glicoproteínas E, esto debido a que exponen su bucle de fusión insertándolo sobre la membrana del endosoma, donde luego se pliegan sobre si mismas en dirección del carbono terminal, el cual se encuentra anclado en la membrana viral, torciendo el bucle de fusión provocando una invaginación membranal del endosoma y una evaginación de la membrana viral lo cual provoca que ambas membranas lipídicas se fusionen y así forman lo que es llamado el poro de salida o expulsión del ácido nucleico al citoplasma celular, mientras la envoltura viral continua desplegándose sobre la membrana del endosoma quedando de esta manera en sentido opuesto hacia el



exterior o el citoplasma, dejando ver a las proteínas E ancladas en su superficie. Cabe mencionar que la nucleocapside al tener contacto inmediato con el citoplasma ante la formación del poro, el cual tiene otro pH, le provoca tener reacomodos que de igual manera facilitan la liberación del RNA [1, 66, 68, 69].

### 3.3.4 Traducción y replicación (transcripción)

#### 3.3.4.1 Traducción

Después del evento de entrada y desnudamiento de la nucleocapside, el RNA al ser de sentido positivo, puede y necesita ser primero traducido para hacer a la polimerasa que requerirá para su replicación. Proteínas estructurales y no estructurales derivan de un único y largo polipéptido precursor codificado por un solo ORF en la traducción. Este precursor no es usualmente visto en una célula infectada. La traducción empieza en el primer codón AUG del RNA. La traducción puede estar empezando inicialmente en ribosomas que no están unidos a la membrana del retículo endoplásmico debido a que la proteína C, la primera en sintetizarse, no tiene secuencia señal hidrofóbica N-terminal, dicha señal se encuentra en el C-terminal de la misma proteína (proteína C), después que se encuentra dicha señal, el complejo RNA-ribosoma comienza a asociarse a la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER) para continuar con la traducción y concomitante translocación membranal de las proteínas faltantes hasta encontrar la secuencia de “alto de transferencia” de la poliproteína en la proteína NS5 [1, 4].

#### 3.3.4.2 Proceso proteolítico de proteínas virales

Proteínas individuales son formadas por un proceso proteolítico parcialmente autocatalítico co- y pos-traduccionales del polipéptido precursor, donde el primer péptido liberado, libera a los demás, las proteasas son tanto hospederas como virales, generando tres proteínas estructurales (C, pr-M y E) y siete proteínas no estructurales (NS). Las signalasas (del hospedero) en el lumen del retículo endoplásmico son probablemente las responsables de la reacción proteolítica del N-terminal de las proteínas, generando los péptidos prM, E, NS1 y NS4b, e indirectamente el péptido C (donde la M requiere otro corte de la proteasa viral en el N-terminal) ya que en el no ocurre el corte pero se encuentra al extremo del polipéptido. Posibles sitios de corte precedidos por una secuencia señal hidrofóbica han sido identificados, además de que se ha visto en un sistema de traducción in vitro que las membranas celulares son requeridas para el proceso proteolítico de la proteína precursora; por lo tanto, mutaciones que anulan la translocación, afectan el corte. Otro tipo de actividad proteolítica ha sido identificada después de un aminoácido de cadena corta, como ocurre en el N-terminal de la proteína NS2a, aunque la proteasa es desconocida. En cambio, otra actividad proteolítica ocurre debido a una proteasa no signalasa viral después de 2 aminoácidos básicos como la Arg-Arg en el N-terminal de M, NS2b, NS4a, NS4b y NS5, mientras que el corte del N-terminal usualmente ocurre igual en la NS3 en otros flavivirus, en el Dengue ocurre después de Gln-Arg (tabla 4) (Figura 13) [1, 4].

**Tabla 2. Proteínas del Dengue: formación y función [1].**

nombre	glicosilación	Corte en el N-terminal	Numero de aa en proteínas maduras	Función

C	NO	Aminopeptidas a NS2B-3	99	Nucleocapside
prM	SI	Furina (Golgi)	166	Precursor de M
M	NO	Bibásica	75	Proteína membranal
E	SI	Signalasa	495	Proteína de envoltura
NS1	SI	Signalasa	352	Ensamblaje viral y activación de complemento
NS2A	NO	Desconocida	218	Procesamiento de NS1
NS2B	NO	Bibásica NS2B-3	130	Resistencia a IFN
NS3	NO	Bibásica NS2B-3	618	Proteasa, helicasa, NTPasa
NS4A	NO	Bibásica NS2B-3	150	Resistencia a IFN
NS4B	NO	Signalasa NS2B-3	248	Resistencia a IFN
NS5	NO	Bibásica NS2B-3	900	RNA polimerasa, metiltransferasa

El proceso proteolítico ocurre muy rápido, de hecho es muy difícil identificar al precursor. El corte entre NS1 y NS2a, es interesante, ya que requiere la presencia de la mayor parte de la proteína NS2a, y la

NS1 fusionada a la NS2a que se encuentra truncada por ser transmembranal, no pueden ser procesadas in vitro ya que resultan en una proteína más larga que la NS1 madura. Si la NS2a es una proteasa o si es meramente requerida para la correcta conformación del sitio de corte, no es conocido, y tampoco tiene homología con proteasas conocidas. En el supuesto de que sea una proteasa, podría estar actuando en *cis*, ya que el complejo truncado NS1-NS2a, no es cortado por NS2a libre [1].

#### 3.3.4.3 Replicación temprana

Tras la traducción y plegamiento de las proteínas individuales, las proteínas NS inician la replicación del genoma viral [70]. Esta puede ser detectada a las 3 horas después de la infección y ocurre en la zona perinuclear o membranas rugosas. La polimerasa transcribe de la cadena positiva de RNA la cadena negativa de RNA, la cual sirve de templado-molde para transcribir y formar más réplicas de cadenas positivas durante el largo periodo de incubación (12-16 horas), permitiendo la formación de la primera progenie de virus, sirviendo el RNA primero como un templado para la traducción y replicación y no para encapsidación. Tanto las cadenas positivas como las negativas son hechas en tasas iguales, permitiéndole al RNA amplificarse exponencialmente, y al final del periodo de incubación se inclina la síntesis a cadenas positivas para que ellas sean las ensambladas. La membrana del retículo contiene complejos de replicación, la cual incorpora precursores de los nucleósido trifosfatos, detectados mediante marcaje y aislado. Tres formas de RNA pueden ser extraídas y aisladas por sedimentación a través de gradientes de sucrosa de una célula infectada: RNA resistente a RNAsa de 20S a 22S llamado "RNA replicativo"; RNA parcialmente resistente a RNAsas heterodisperso de

20S a 28S llamado “RNA de replicación intermedia”; y el “RNA sensitivo” a RNAsas de 42S. El RNA replicativo puede convertirse a RNA sensitivo por medio de calor u otros desnaturalizantes, al igual que el de replicación intermedia, solo que este último también se convierte en fragmentos más pequeños, estos estudios sugieren que la forma explicativa es completamente RNA de cadena doble, una positiva y una negativa. El de replicación intermedia es parcialmente de doble cadena, debido a un desplazamiento de cadena que pudo haber ocurrido durante la elongación de la cadena naciente; por lo tanto el replicativo y de replicación intermedia, son los precursores del RNA 42S [1].

#### 3.3.4.4 Replicación tardía

La replicación podría estar siendo regulada posiblemente por los complejos tempranos y tardíos de la RNA polimerasa, ya que estos tienen diferentes afinidades por los templados positivos y negativos. La replicación tardía favorece la síntesis de la cadena positiva (infectiva). Al haber más proteína C, se da el ensamblaje, el cual remueve a las cadenas positivas, se ha propuesto que la unión de la proteína C es al 3' de la cadena positiva, lo cual previene que sea reconocido el RNA por la polimerasa y así ya no se forma la cadena negativa mediante replicación, aunque si lo reconocerá el ribosoma, ya que este se une al 5', esto permitiría su continua traducción y explicaría la predominancia de las cadenas positivas en la infección tardía [1].

#### 3.3.5 Ensamblaje-maduración

Este proceso se divide en dos fases: En la primera, se da el ensamblaje de las proteínas C que formaran la nucleocapside que a la vez empaca

al RNA recién sintetizado, este ensamblaje podría ser debido al incremento en la concentración de proteína C en la infección tardía, donde el C-terminal de esta proteína el cual tiene aminoácidos hidrofóbicos que se anclan a la membrana del retículo, hacen que se tenga que remover la proteína del lumen intrarreticular mediante corte proteolítico con una signalasa hospedera y una proteasa viral al N-terminal de la proteína vecina prM durante la maduración del ensamblaje de la nucleocapside. En la segunda fase, se envuelve la nucleocapside a través de la membrana y dentro de la cisterna del retículo rugoso, al integrarse las proteínas prM y E (acumulación de la envoltura), las cuales forman heterodímeros que son localizados hacia el lumen del retículo. Los heterodímeros prM-E se asocian en trímeros y estas interacciones oligoméricas se cree, forman una superficie curva, lo que hace que se induzca la formación de la envoltura con forma circular o mejor dicho, que se adquiera la conformación vesicular, quedando dentro de esta la nucleocapside, donde circulando las partículas como vesículas intracitoplasmicas, son excretadas del RE continuando con la maduración viajando al aparato de Golgi [1, 4]. Posteriormente aquí se da el corte específico del péptido pr de la proteína M (ambas glicosiladas), ya que el pH de la vesícula que es ligeramente ácido (5.8-6.0), genera la disociación de los heterodímeros prM-E, lo cual cambia la conformación de la envoltura viral, donde la proteína prM protege el péptido de fusión de la proteína E; esta reorganización estructural membranal expone el sitio de corte por la proteasa del hospedero furina (de Golgi) de la proteína prM, lo cual libera a la proteína M del péptido pr, resultando en una reorganización más elevada de la superficie de la envoltura viral, crucial para terminar la morfogénesis, ya que de prM-E heterodímeros, pasa a E monotrímero [71], la cual es también es glicosilada de manera postraduccional en dicho aparato de Golgi para su correcto plegamiento [72], concluyendo con la maduración del virión, además, este péptido pr, se mantiene

asociado al virión hasta que este es liberado al medio extracelular [71]. Se cree que tanto la proteína prM como el péptido pr tienen función de chaperonas que estabilizan a la proteína E de manera que no se una a la membrana de forma prematura. Al disociarse el péptido pr, los viriones han madurado, siendo las nuevas partículas virales potencialmente infectivas transportándose a la membrana celular. Las partículas envueltas inmaduras, son algunas veces mayores que las maduras, lo cual concuerda con la generación de precursores (NS1). Con pocas excepciones, la nucleocapside de los flavivirus no se observa libre en el citoplasma, como en los Alfavirus (Chikungunya), que adquieren su envoltura en el citoplasma-membrana plasmática, y aunque existe evidencia contradictoria, por ejemplo, se reportó en DENV-2 cepa PR 159, que su maduración en células de mosquito, además de ser intracitoplasmática, también se presentó en la membrana plasmática; por lo tanto, las vías morfogénicas pueden diferir dependiendo de la célula hospedera y de la cepa, además, la composición de los recursos (lípidos) de la envoltura, aparentan ser más intracitoplasmáticos que de la membrana celular [1, 4] (figura 18).

### 3.3.6 Liberación

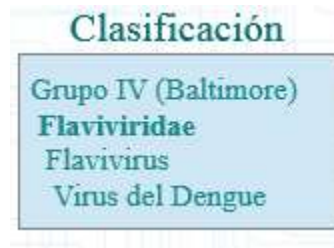
La salida del virión de la célula infectada, se da como resultado del proceso de ensamblaje-maduración de la envoltura, mediante vesículas exocitóticas, presumiblemente como virus dentro de vesículas secretorias que se fusionaran con la membrana plasmática, pudiendo provocar ante un elevado título viral la lisis celular. La liberación lleva consigo la proteína pr, por lo tanto el corte de dicha proteína de M (fase final de maduración) puede estar ocurriendo antes o durante la liberación, dejando al virión competente y más lábil. También se llegan a liberar partículas que no maduraron totalmente y al contener pr-M, son

60 veces menos infectivas que las maduras pero aun así pueden llegar a crear mejora dependiente de anticuerpo. También se sabe que puede mantener al virión en un estado aunque relativamente inerte, pero muy estable [1] (figura 18).

### 3.3.7 Relación del virus del Dengue con otros Flavivirus

Al ancestro de este virus ha sido postulado que emergió 1000 años atrás en un ciclo de infección entre primates no humanos y mosquitos con transmisión a humanos de los 4 serotipos de manera independiente solo unos cientos de años atrás [8]. Los 4 serotipos de Dengue son miembros del grupo IV de la clasificación de Baltimore (RNA monocatenario positivo “ssRNA (+)”), perteneciente a la Familia *Flaviviridae* la cual contiene 5 Géneros, de los cuales 4 tienen clasificación en el ViPR (viral pathological resource) [69], y estos se clasifican según sea su vector, animales hospederos o infectados y zona geográfica de origen, es decir, aquellos virus transmitidos por artrópodos son llamados arbovirus; por ejemplo, dentro del Género Flavivirus que es transmitido por garrapatas, mosquitos etc., es decir, los vectores son varios artrópodos (incluso se presenta a veces un vector desconocido), podemos encontrar al “grupo del Dengue”, que exclusivamente infecta a primates no humanos, mosquitos y humanos (sintomáticos) y exclusivamente es transmitido por mosquitos, dicho grupo contiene a 2 especies de virus, DENV (virus Dengue) y KEDV (virus Kedougou); el Género Flavivirus, contiene más de 60 especies de arbovirus de los cuales 53 se encuentran en el ViPR clasificados y el más representativo es el de la fiebre amarilla [1, 69]. Los 4 serotipos bajo estudio, pertenecen a la especie DENV [1], y según el serotipo, es la zona geográfica de distribución (figura 3).





**Figura 27. Clasificación del DENV [69].**

El virus de la fiebre amarilla es el virus prototipo de toda la Familia. Además todos los miembros comparten una morfología y estructura genómica común, lo que hace que compartan los mismos determinantes antigénicos, lo que hace su clasificación individual difícil con las técnicas serológicas comunes [1].

Mediante características epidemiológicas se pensaba ya en 1928 que el virus del Dengue era el mismo que el virus de la fiebre amarilla, pero fue hasta 1950 cuando las relaciones serológicas con otros flavivirus se demostraron por la reacción cruzada serológica. Se observó que el virus de la fiebre amarilla inmunizaba a los individuos después de que fueron infectados con Dengue, posteriormente se estandarizaron cuidadosamente ensayos de HI para formalizar relaciones serológicas entre diferentes arbovirus, y más tarde se definió un único epítipo antigénico que comparten los flavivirus en la envoltura glicoproteínica [1].

### 3.3.8 Variantes virales (serotipos y genotipos) y mutantes

El virus del Dengue abarca a cuatro distintos serotipos (DENV-1 a DENV-4), estos serotipos están estrechamente relacionados [3]. La existencia de variantes ha sido bien reconocida por muchos investigadores usando ensayos serológicos. Esto es porque la mutabilidad del genoma de RNA causa variación dentro de cada serotipo de manera normal. Los virus del Dengue fueron primero diferenciados en el laboratorio usando "índices de neutralización", y

algunos de ellos difirieron de la referencia que se tenía del virus prototipo de tal manera que ellos fueron interpretados como diferentes serotipos. Después, se caracterizaron dos aislados virales, TH-36 y TH-SMAN, los cuales al principio se sugería que eran tipo 5 y 6, después usando suero específico en ensayos sensitivos de neutralización de reducción de placa, concluyentemente se demostró que esos virus Tailandeses no fueron distinguidos del prototipo DENV-1 y DENV-2. Sin embargo, aislados individuales del virus, muestran variación significativa en el ensayo de neutralización de reducción de placa por un único inmuno-suero prototipo como referencia son encontrados frecuentemente. La existencia de subtipos del Dengue fue especialmente demostrado cuando anticuerpos de referencia para ciertos aislados del virus DENV-3 Tahitianos y Caribeños mostraron neutralizar pobremente los prototipos del sureste asiático. Similarmente, usando el ensayo de neutralización de reducción de placa, también se demostró que el aislado de DENV-4 de la extensa epidemia en el Caribe en 1981-1982, difiere significativamente del prototipo del virus [1].

Interés en la variantes intratípicas fue inicialmente debido a observaciones en algunas epidemias ocurrían con transmisión explosiva y síntomas severos inusuales. Mientras que el factor de virulencia aún no había sido identificado para el virus del Dengue, los pacientes se agrupaban de acuerdo a la severidad de la enfermedad, usando un cuidadoso criterio clínico definido. También se reportó que aislados del DENV-2 de pacientes con diferentes niveles de enfermedad severa tenían diferencias antigénicas identificables, detectadas por el uso de anticuerpos monoclonales preparados con antígenos de DENV-4. Sin embargo marcadores definitivos de virulencia apenas comienzan a ser identificados [1].

En un principio, avances en biología molecular permitieron la identificación de variantes del virus, por ejemplo el ensayo fingerprinting con oligonucleótidos de RNA demostró ser una herramienta efectiva para la identificación de virus que tienen características genéticas similares, ya que se compartían dichos patrones de fingerprinting. Los aislados del virus que compartían los mismos patrones de RNA se organizaban en grupos llamados “topotipos”, los cuales describían las diferentes distribuciones geográficas o regionalidad, lo cual vendría más tarde a corroborar de manera tajante la secuenciación o el uso de los genotipos. Numerosos topotipos genéticos de los 4 serotipos fueron identificados. El DENV-2 ha sido el más estudiado y 14 topotipos de diferentes regiones geográficas fueron descritos. Comparaciones exhaustivas de la secuencia homóloga de diferentes virus del Dengue han sido completadas y tasas de evolución han sido estimadas y evaluadas. Caracterización adicional con anticuerpos monoclonales (inmunodetección) ha asistido la identificación de la variación ocurrida en epitopes específicos. Análisis de firmas antigénicas, en donde la unión de varios anticuerpos monoclonales directos contra diferentes epitopes de las glicoproteínas de la envoltura (antígenos de superficie) fueron evaluadas, demostrando pocas diferencias entre DENV-2 de la misma región geográfica, y revelando diferencias antigénicas significativas entre aislados de diferentes regiones. También se demostró que variación antigénica significativa puede ocurrir dentro de un solo año epidémico en un área geográfica definida. Muchos de esos cambios ocurren en la NS1. Mientras tanto los significados de esos cambios con respecto a la virulencia aún no ha sido bien determinada [1].

Se han hecho exhaustivas comparaciones de secuencias del gen E de DENV-2 de aislados de pacientes con diferentes niveles de severidad en la enfermedad, y ninguna de las secuencias cambio, ya sea a nivel de nucleótidos o en la secuencia de aminoácidos sin poder ser

correlacionadas con las diferencias percibidas en la severidad de la enfermedad. Estudios adicionales se requieren para correlacionar estas diferencias con otros aspectos funcionales de la envoltura proteica. Se ha demostrado por análisis de secuencias limitadas que el virus del Dengue que participa en los ciclos de transmisión selvática puede ser diferenciado de los virus asociados a brotes epidémicos [1].

La selección de variantes virales de la población natural o por mutagénesis ha sido usada para desarrollar cepas candidatas para la vacuna. Sensibilidad a la temperatura y una morfología de placa pequeña son características fenotípicas frecuentemente asociadas con atenuación de virus. Se demostró que la función de la vacuna que fue candidata de DENV-2 PR-159 es menos eficiente en sensibilizar a las células a altas temperaturas, sugiriendo que se presentan algunas alteraciones en la envoltura glicoproteína, así como un ensamblaje tardío en la fase de maduración durante el tiempo de replicación viral, también fueron inhibidos. Mientras tanto, estas características fenotípicas no son marcadores confiables de la atenuación del virus y frecuentemente no eran estables para transferir la progenie del virus [1].

Cabe mencionar que dentro de los serotipos antes descritos, una variación aproximadamente del 7 por ciento, es asociada a un genotipo distinto, e inclusive dentro de un mismo genotipo, los genomas del Dengue presentan cierta variación en la composición genética específica dependiendo del país o región de donde provengan las secuencias (intra-genotipos), donde recientemente, estudios donde se utilizan secuencias genómicas completas provenientes de aislados clínicos han mostrado la importancia de serotipos o genotipos virales específicos causantes de brotes de infección severa [4].

***Tabla 3. Endemicidad-distribución u orden de aparición de los genotipos.***

La tabla no incluye las exportaciones, los genotipos también son geográficos específicos y en la actualidad debido a la globalización ya se presenta cambio en la endemicidad de algunos genotipos.

1	2	3	4
I (China-Medio Oriente)	Asiático 1	I (Pacífico)	I (Asia-Brasil)
II (Tailandia "extinto")	Asiático 2 (México-Honduras)	II (Asia)	II (Pacífico-América)
III (silvestre)	Asiático/Americano	III (Africa-Asia-América)	III (Tai)
IV (Pacífico)-América	Cosmopolita	IV (Puerto Rico-Tahití)	IV (silvestre)
V (América)	Americano (India-Pacífico)	V (Asia-Brasil) ?	
	Silvestre (Asia-Africa)		

#### 4. Interacción de los factores extrínsecos-intrínsecos

Existen diversos factores extrínsecos-intrínsecos que interactúan y que en conjunto son responsables de generar desde la aparición del mosquito, hasta un cuadro severo de la enfermedad del Dengue.

Uno de los factores más importantes es el virus en sí. A lo largo de la historia de DENV, no se ha detectado incremento en la tasa de replicación para ningún genotipo, sin embargo, algunos de los eventos evolutivos han producido cepas más virulentas y que se han propagado del sudeste de Asia a otras áreas del mundo. Además de que no se ha medido ningún cambio genético específico encontrado en las poblaciones virales como genotipos virulentos que se hayan dispersado hacia otros continentes y no se conoce si alguno de estos cambios se hayan presentado debido a la adaptación a los nuevos ambientes. Por ejemplo, para el serotipo 2, el genotipo Asiático 1 introducido en América; para el serotipo 3, el genotipo de Sri Lanka III introducido a

América; es decir, estos virus han incrementado su acoplamiento desde su origen, lo cual se ha ligado directamente con la aparición de más reportes DHF siendo transmitidos de manera eficiente por mosquitos, por lo que se les asocia como cepas más virulentas, donde para el caso de DENV-2 genotipo asiático 1, ya existen estudios que dejan saber bajo que mecanismo patológico opera esta premisa (véase antecedentes).

Otro de los factores importantes es el hospedero humano, ya que no obstante, algunos investigadores proponen que las diferencias en la presentación clínica y severidad de la enfermedad están en función de la diversidad inmunológica y genética de las poblaciones en ambos continentes (Asiático y Americano), y no solo que los anticuerpos no neutralizantes formados durante la infección secundaria con DENV estarían jugando un papel en la selección de virus patógenos en humanos. Como ya se explicó en el capítulo 1.3 “Mecanismos de patogénesis y patología (de DF a DHF)”, es menester hacer énfasis en cuanto a la patología de la enfermedad severa en humano, esto para un entendimiento más completo de uno de los factores intrínsecos que interactúa con otros factores [4].

Algunos de estos factores que interactúan, son el Hospedero, el Virus, los Ecológicos y el Vector; y estos a su vez desglosan una serie de características sumamente específicas como lo son: (intrínsecos) Hospedero= genéticos, fenómeno ADE, inmunosupresión, tormenta de citosinas, edad, etnia, enfermedad; Virus= NS1 “que activa al complemento”, virulencia del genotipo y cepa, plasticidad genética, mutación; Vector= barreras gastrointestinales, flora intestinal bacteriana, saliva, densidad, resistencia del huevo a la sequedad, capacidad de diapausa, ciclo de vida rápido, elevada tasa generacional, plasticidad genética etc.; (extrínsecos) Ecológicos= ciclo selvático,

condiciones ecológicas, circulación viral, demografía humana, cambio climático, rutas de comunicación, globalización y colonización de nuevas áreas geográficas, factores económicos; y que son en conclusión las causantes del tipo y grado de la enfermedad del Dengue (figura 28) [1, 3, 4, 8].



**Figura 28. Resumen de los principales factores reportados extrínsecos-intrínsecos asociados a patogénesis severa en humanos.**

Los mecanismos de patogénesis que generan el cuadro de enfermedad severa en humanos se desconocen, y dicho cuadro severo es resultado de la interacción de los distintos factores [1, 3, 4, 8].

## 5 Tratamiento, desarrollo de vacunas y medicamentos auxiliares

### 5.1 Tratamiento

No existe un tratamiento específico de la infección en los pacientes. Los cuidados intensivos de soporte incluyen descanso en cama, antipirético y analgésico. El mantenimiento de los fluidos y los electrolíticos es muy importante en pacientes con DHF. La Aspirina y otros salicilatos podrían ser evitados en vista de que disminuyen el número de las plaquetas (trombocitopenia) y posiblemente su función con lo cual funcionaría como anticoagulante [1].

Intentos de inducir protección contra el Dengue transmitido experimentalmente inoculando a voluntarios con virus no modificados mediante rutas de infección anormales (instilación nasal, esclarificación dermal e instilación de sacos conjuntivos) fueron hechos por Sabin [1]. Los prospectos de vacunas para Dengue comparten objetivos en común, necesidades que a lo largo del estudio del Dengue han generado en común todos los desarrolladores de vacunas, sin importar el tipo de vacunas que generen. En primer lugar, la vacuna debe ser protectora de cada uno de los 4 serotipos de DENV. Esto podría ser alcanzado, ya sea con una vacuna que incluya solo una proteína E representativa de cada serotipo o bien, que la vacuna consista de un antígeno que compartan y que induzcan inmunidad protectora de cada uno de los 4 serotipos así como se evite la inducción del fenómeno de ADE. En segundo lugar, la protección que genere debe ser de gran duración, es decir, los títulos virales producidos deben ser comparables a aquellos que se observan en la infección con DENV silvestre. En tercer lugar, la inmunización debe ser segura y bien tolerada y causar únicamente un nivel aceptable de síntomas locales o sistémicos. En cuarto lugar, que tenga una cobertura universal para las regiones endémicas con esta infección. Además de que una vacuna para viajeros



debe cubrir personas de todas las edades y en quinto lugar, el costo de la vacuna debe ser accesible a la población [4].

Existen 4 tipos de vacunas en desarrollo para Dengue.

## 5.2 Vacunas vivas atenuadas

El desarrollo de vacunas efectivas contra el Dengue ha tenido lugar desde la década de los 40s, con la identificación específica de epitopes como complejos reactivos en antígenos estructurales y no estructurales, usando anticuerpos monoclonales de ratón, esto nos ha ayudado a saber que esos determinantes antigénicos, podrían estar jugando un papel importante en la inmunopatología de la enfermedad y nos han ayudado a asociar el DHF y DSS con la reacción inmune del hospedero, aun dentro de toda la complejidad del Dengue; por otra parte, estudios epidemiológicos sirven de evidencia de que los anticuerpos anti-dengue, juegan un rol en el potenciamiento de la infección [1].

Las vacunas vivas atenuadas (LaVs) pueden inducir respuestas inmunes humorales y celulares ya que la mayoría mimetiza la infección natural. Varios parámetros son cruciales para LaVs: en primer lugar los virus deben ser atenuados eficientemente y presentar una baja viremia, baja reactogenicidad y alta inmunogenicidad. Los niveles de viremia deben ser bajos para que no haya transmisión viral a mosquitos [4].

En 1944-45 Sabin-Schlesinger en Hawái, aislaron, prepararon y probaron la “primer” vacuna contra el DENV-1 viva atenuada (por pasaje serial en ratón), hecho también independientemente en Japón en el 43 (a menor escala) [8] provocando en los pacientes un bajo grado de fiebre con o sin dolor de cabeza y malestar, al menos 24 h o menos o quizá ningún síntoma, todas las vacunas desarrollaron postulas macropapulares y petequia, a pesar de ello todos fueron completamente

inmunes al virus homotípico no modificado. Además, después de que las cepas de DENV-2 fueron propagadas a altos títulos con éxito en ratón, pruebas en humanos con las dos cepas modificadas (Nueva Guinea C y Nueva Guinea B), indicaron que su comportamiento era como el de DENV-1, por lo tanto se probó la vacuna de DENV-1 derivada de los 18 pases en ratón y luego sometida a 13-14 pases adicionales, en 1,100 individuos durante la epidemia en puerto rico de DENV-3, mostrando ser bien tolerada sin causar reacciones sistémicas (solo leve sarpullido en algunos pacientes), induciendo anticuerpos neutralizantes tipo-específicos y reduciendo el incidente de Dengue en más de la mitad con respecto al grupo placebo. Trabajo similar con estas vacunas han sido abandonados para evitar posibles complicaciones asociadas con vacunas derivadas de cerebro de ratón [1].

Además fue probada la vacuna de DENV-1 propagada en huevos embrionarios de pollo (por pasaje serial) usando como modelo la exitosa vacuna derivada de embrión de pollo de la fiebre amarilla 17D, mostrando que después de 38 pases, el virus retiene el carácter atenuado de su progenitor (ratón-adaptado); la prueba se hizo inoculando dos niños nefróticos, para obtener una posible medida terapéutica, sufriendo nulos o leves (2-días de fiebre con sarpullido) efectos pero produciendo anticuerpos neutralizantes [1].

Intentos de proteger a humanos y primates por medio de la hiperinmunización con varios flavivirus se han probado sin éxito y aunque sujetos vacunados producen un alto título de anticuerpos de neutralización cruzada, después de una infección serial o simultánea con varios flavivirus, ninguno fue protegido contra los virus heterologos; la protección duradera es establecida solo en respuesta a un estímulo inmunológico por un serotipo específico, siendo convincente y estableciendo efectividad. Se ha reportado infección serial con 3

diferentes serotipos de Dengue, aunque la evidencia epidemiológica sugiere que la enfermedad clínica raramente sucede con 3 o 4 serotipos [1].

Dos vacunas contra el DENV-2 producidas en cultivo celular han sido exitosamente probadas, la PR-159/S-1 que derivó de la selección de una clona de un virus estable después de un pasaje secuencial en células primarias de hígado de mono verde, fue dada a más de 145 voluntarios siendo un producto seguro que atenúa moderadamente, además tiene marcadores fenotípicos de sensibilidad a la temperatura, produce placas pequeñas y causa una reducida viremia en monos, aunque ensayos eficaces no se han llevado a cabo con este producto, y las candidatas para DENV-1, DENV-3 y DENV-4 con propiedades similares han sido evaluadas en voluntarios obteniendo resultados insatisfactorios. También virus atenuados por pasaje serial a través de células PDK han demostrado ser vacunas prometedoras, e incluso se han producido de esta manera vacunas para DENV-1, DENV-2 y DENV-4, siendo extensivamente probadas para saber su seguridad y eficacia. Posteriormente surgió el interés en el desarrollo de una vacuna contra subunidad, ya que por ejemplo se demostró que al ratón se le podía proteger de una infección letal si se le inmunizaba con DENV-1 NS1 purificada, al igual que los antígenos (proteínas NS y estructurales de DENV-4) expresados con los virus vectores vaccinia y baculovirus ofrecían protección. Se han hecho intentos por identificar epitopes importantes para la protección como los de las proteínas prM, E, NS1 y NS3 usando anticuerpos monoclonales en ensayos de protección pasiva. Compuestos de péptidos sintéticos de secuencias de amino ácidos lineales han sido usados para identificar regiones reactivas antigénicas en la proteína E [1].

Las mutaciones que confiere el fenotipo atenuado deben ser estables y no revertir al fenotipo silvestre o alguna otra forma virulenta. Sin

embargo, el manejar la interferencia viral y el balance de la atenuación para producir inmunogenicidad tetravalente aceptable con reactogenicidad mínima es otro desafío. Cada uno de los cuatro componentes de la vacuna debe inducir una respuesta humoral neutralizante balanceada [4].

### 5.3 Vacunas quiméricas vivas atenuadas

La vacuna del Dengue con más desarrollo y avance es la vacuna quimérica de Dengue/fiebre amarilla. Esta vacuna usa el virus de la vacuna de fiebre amarilla 17YD como estructura base y reemplazados los genes E y M con cada uno de los cuatro serotipos de Dengue. Esta vacuna mostro ser atenuada, eficaz, segura y no transmitida por vectores artrópodos. La vacuna ChimerVax-Dengue (Sanofi Pasteur, Lyon, Francia) genera anticuerpos contra el Dengue únicamente. Esta vacuna se ha aplicado en sujetos con inmunidad preexistente para virus de fiebre amarilla. Los resultados muestran que esta inmunidad no interfiere con la inmunidad y la respuesta a largo plazo y neutralización cruzada para los cuatro serotipos de Dengue virus. En la actualidad, esta vacuna está en fase III.

Otra vacuna quimérica viva atenuada usa la vacuna PDK-53 DEN-2 Mahidol como estructura base. Este virus fue atenuado por pases en cultivo primario de riñón de perro. De manera similar al concepto de la vacuna quimérica de Dengue/fiebre amarilla, los genes E y prM de DENV-2 se reemplazaron con DENV-1, DENV-3 y DENV-4. Las tres mutaciones atenuantes de PDK-53 DEN-2 se localizan fuera de los genes de las proteínas estructurales y parecen ser estables. La vacuna tetravalente producida por combinación de los cuatro virus de Dengue quiméricos genera protección cuando se administra en ratones y monos y apenas y apenas se han iniciado las pruebas en humanos.

Una tercera vacuna quimérica usa un virus DENV-4 atenuado por una eliminación ( $\Delta 30$ ) de la región no traducible 3'-UTR como estructura base. Las proteínas prM y E se remplazan como las anteriores [4].

#### 5.4 Vacunas inactivas

Las vacunas de virus completos inactivados presentan dos ventajas sobre las vacunas de virus atenuadas. En primer lugar, no es posible que reviertan a un fenotipo virulento; y segunda, la inducción de una respuesta humoral es más fácil de obtener. No obstante, las múltiples dosis y la respuesta inmune relativamente más corta hace de esta técnica sea menos atractiva comparada con las otras, aunque ambas estrategias tienen sus limitaciones se pueden superar utilizando adyuvantes novedosos. Estas propuestas son costosas y no serían rentables para aquellos países con economías en desarrollo [4].

#### 5.5 Vacunas de DNA

Tecnologías de DNA se han desarrollado para construir vectores de expresión de DNA que llevan los epitopes de los cuatro serotipos. Estas vacunas han mostrado inmunogenicidad y estudios de vacunas para Dengue monovalentes se encuentran en fase I. Esta estrategia presenta ventajas rentables en términos de producción, estabilidad, transporte a temperatura ambiente, baja interferencia en la replicación y la posibilidad de vacunación en contra de múltiples patógenos en una sola aplicación. Las desventajas, al igual que las vacunas inactivadas necesitan múltiples dosis y adyuvantes experimentales además de no ser nada económicas [4].

## 5.6 PRODEN®

La Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil (Anvisa), aprobó el registro de un medicamento o producto homeopático Industrializado contra el dengue que es utilizado sin la necesidad de prescripción médica llamado PRODEN® (nombre comercial), y desarrollado por la farmacéutica argentina Almeida Prado. El medicamento se utiliza para el tratamiento en caso de haber contraído Dengue y también es utilizado como preventivo ya que según estudios Médicos, en un programa de la secretaria de salud en una región de Brasil se afirma que cerca del 80% de los pacientes que tomaron esta fórmula homeopática no contrajeron Dengue, y las contraindicaciones no son totalmente conocidas, aunque se sugiere a personas hipertensas no tomar el medicamento. Su fórmula está basada en parte, en remedios caseros utilizados empíricamente por los nativos indios americanos como el veneno de la serpiente *Crotalus horridus* (serpiente de cascabel) diluido, el cual causa un síntoma subclínico de hemorragia, parecido al Dengue hemorrágico, por otra parte, el medicamento utiliza *Eupatorium perfoliatum* que es una planta perenne utilizada para curar la fiebre, el medicamento también posee fosforo el cual ejerce protección hepatotrópica, manutención de la integridad funcional de los órganos y de la producción de los factores de coagulación [73, 74].

La vacuna del futuro indudablemente ofrecerá protección contra los diferentes serotipos y trabajo extensivo es aun requerido para definir los elementos importantes para una respuesta de protección inmune [1].

## 6 Características biológicas

## 6.1 Rango alimentación del mosquito y rango de hospederos del virus que presentan infección, ¿todos son sintomáticos?

A pesar de que el rango de alimentación de las fêmeas es amplio, ya que pueden picar para alimentarse a animales exóticos de sangre caliente, aves, ganado, animales domésticos y desde luego al hombre [2], los humanos, primates no humanos y mosquitos, representan los únicos hospederos naturales del virus del Dengue [1], y de estos el único sintomático de manera natural es el hombre, es decir, es el único que presenta infección sintomática, por lo tanto este virus es metantropónico [2]. Muchas especies de primates no humanos (chimpancés, Rhesus, gibón y macacos) desarrollan viremias en una magnitud suficiente para infectar mosquitos y desarrollan respuesta inmune con ningún signo clínico detectable después de la infección [1].

El único mosquito que es hospedero natural para el virus del Dengue, es miembro del género *Aedes* y muchos reportes en la literatura han incriminado a las especies del género *Culex*, donde miembros de este género se sabe que son resistentes a la infección del virus. *A. aegypti* y *A. albopictus* son hospederos bien reconocidos, otras especies del amplio y distribuido subgénero *Stegomyia* que puede transmitir el virus del Dengue son *A. scutellaris*, *A. africanus* y *A. leuteocephalus*. También otras especies son *A. niveus* (subgénero *Finlaya*) y *A. taylori* o *A. furcifer* (subgénero *Diceromyia*, los cuales parecen ser parte del mantenimiento del ciclo selvático en Asia y África, por otra parte, se ha realizado propagación del virus en *A. mediovittatus* (*Gymnometopa*) y *A. triseriatus* (*Protomacleaya*) [1].

## 6.2 Infección en animales experimentales para desarrollo de vacunas y medicamentos

El desarrollo de vacunas de Dengue se ha convertido en una prioridad de la Organización Mundial de la Salud por tres décadas. Los desafíos del desarrollo de una vacuna de Dengue son el fenómeno ADE, la falta de un buen modelo animal y la confianza de obtener un marcador sustituto de inmunidad. Solo las observaciones clínicas han aportado información sobre la patogénesis de DENV, sin embargo, por la falta de un modelo animal adecuado no nos podrá dar información confiable de este patógeno humano. Un modelo animal es ideal para la investigación de interacciones huésped-patógeno [4].

Se han hecho muchos intentos por adaptar el virus en modelos animales (no primates), como por ejemplo, se reportó la replicación de una cepa del virus en membranas corioalantoideas de pollo, aunque no fue hasta los 1950s que se realizó los 90 pasajes del virus en embrión de pollo, además de esto, investigación para alcanzar un modelo animal alternativo fue llevado en práctica por Sabin y sus colaboradores en 1944. Infantes de ratón y hámsters, cerditos de guinea recién nacidos y adultos, ratas de algodón, conejos y monos Rhesus fueron inoculados intracerebralmente, intra-abdominalmente, o ambos. Donde el suero colectado después de 6 días de la infección, fue inoculado en voluntarios humanos, siendo las únicas muestras las de mono, las que causaron los síntomas típicos de la fiebre del Dengue. La replicación del virus fue demostrada por pasaje serial del suero en otros voluntarios, los cuales desarrollaron los mismos síntomas de enfermedad [1].

En la ausencia de un modelo animal satisfactorio es que no han sido bien establecidos los parámetros que reproduzcan los síntomas clínicos humanos así como marcadores de atenuación que predigan el posible éxito de una vacuna contra el Dengue [1].

### 6.2.1 Modelo de ratón



Los ratones Wild-type (WT) son resistentes de manera natural a la infección por Dengue. Es por eso que los ratones utilizados en la actualidad para modelar la infección son ratones inmunocomprometidos, se utilizan vías de inoculación no naturales y ratones con tejidos humanos, los cuales presentan sus limitaciones [4].

La infección en el modelo de ratón, fue desarrollada para el estudio del virus del dengue, en modelos murinos iniciales no se observaba ningún tipo de signo de infección por DENV como en humanos, pero si se notó que se desarrollaba la enfermedad neurotrópica, la cual no se observa generalmente en humanos [4]. El virus puede infectar al ratón por varias rutas, pero la manera intracraneal es la más sensitiva, especialmente en ratones con 1 o 2 días de inoculación, además de que si el virus se adapta bien, este muere por encefalitis en una semana, dependiendo de la dosis del virus; y debido a que el virus usualmente no es neurotrópico, el proceso de adaptación usualmente requiere varios pasajes ciegos seriales [1].

Se demostró posteriormente que el 50% de la dosis letal para ratones adultos inoculados intracranealmente, incrementa después de repetidos pases del virus, y algunas cepas de este virus resisten el aislamiento con este método. Los picos de los títulos virales en el rango de  $10^8$  a  $10^9$  UFP/g en tejido cerebral son inusuales. Los ratones generalmente llegan a ser menos susceptibles a la encefalitis por el virus del Dengue cuando comienzan a hacerse más viejos [1].

Ratones WT de las cepas A/J, BALB/c; soportan bajos niveles de replicación de DENV, aunque se limita a daño en el hígado y trombocitopenia. Sin embargo, solo se ha reportado severidad de la infección en ratones BALB/c con cepas adaptadas a ratón. Al inocular dosis más altas de DENV, se induce daño endotelial y hemorragias sin

la presencia de otro tipo de signos [4].

Utilizando ratones incapaces de desarrollar células T y B, llamados comúnmente ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID), es que se ha estudiado las infecciones por DENV. Sin embargo, se ha utilizado otro tipo de modelos en los cuales a ratones SCID se les ha injertado células tumorales previo a la infección, posteriormente DENV se inocula en las células injertadas. DENV se replica eficientemente en las células tumorales, el virus infecta el cerebro y causa neuropatías como parálisis general. Los modelos con células tumorales más utilizados son K562-SCID; Huh7-SCID o HepG2-SCID. Estos modelos no generan información relevante para estudios de tropismo y patogénesis, sin embargo, es útil para evaluación de fármacos y vacunas [4].

Otro enfoque que se ha desarrollado son ratones con injerto de progenitores de células humanas como células CD34<sup>+</sup>. Los ratones SCID pueden ser fácilmente injertados con células tumorales pero no lo es si se trata de injertos humanos; no es óptimo debido a la respuesta inmune innata fuerte, incluyendo NKs que dificulta la aceptación del injerto. Es por eso que se han cruzado con ratones diabéticos no obesos (NOD) los cuales presentan defectos en la función de NKs y n la respuesta por complemento por la falta de C5 y por lo tanto, con ratones IL2RY-knock-out (KO). La combinación de la deficiencia de la respuesta innata y adaptativa permiten que haya diversidad d trasplantes de células y tejidos humanos. La constitución de ratones NOD/SCID/IL2RYKO con células progenitoras humanas CD34<sup>+</sup> permite el desarrollo de distintas estirpes celulares de humano, incluyendo células dendríticas (DCs), una de las principales células blanco en humanos. DENV infecta células humanas en distintos tejidos murinos, incluyendo bazo, medula ósea e hígado, todos tejidos importantes en la

patogénesis. Tras la infección, estos ratones desarrollan signos clínicos de DF incluyendo fiebre eritema y trombocitopenia, aunque generalmente no se dan signos de enfermedad severa. La ventaja de este modelo es poder estudiar la respuesta inmune humana *in vivo*. En contraste, no se ha podido generar una producción sostenida de anticuerpos, sin embargo, logran generar una respuesta de células T. otro tipo de ratones, los RAG/IL2RYKO, los cuales son deficientes en genes RAG e IL2RY, han demostrado la producción de anticuerpos neutralizantes [4].

Otro modelo de ratón inmunosuprimidos pero no “humanizado” como los anteriores es el AG129, el cual tiene una deficiencia de receptores de INF tipo I y II. Se ha llegado a presentar signos de infección severa, además de utilizarse ampliamente en el estudio de del fenómeno ADE y en la evaluación de vacunas [4].

Otros factores además de la edad en el ratón, han sido encontrados que influyen en la patogénesis del virus. Cepas virales que difieren en su patogenicidad en ratón han sido identificadas. Además diferentes cepas de ratón tienen diferentes grados de susceptibilidad al virus. Sabin elegantemente demostró que el ratón del Instituto Princeton, era resistente a la infección por Flavivirus como reflejo de una depresión de la multiplicación viral, la cual es controlada por un único gen autosomal dominante heredado de acuerdo con las leyes mendelianas, y también se sugiere que la sobrevivencia del ratón resistente a la infección es asociada con un sistema inmune funcional y al incremento en la generación de genomas interferidos defectivos y partículas [1].

### 6.2.2 Modelo de primate no humano

En el primer intento de infectar hospederos no humanos, se demostró

que el virus puede ser transmitido de mono a mono y de mono a humanos, y aunque los primates no humanos no manifiestan enfermedad clínica aparente, ellos son frecuentemente usados como modelo en el estudio de la respuesta inmune ante una infección por flavivirus, y como sujetos de prueba de vacunas desde que se observó que el inicio de la viremia en estos animales es similar a la de los humanos [1], es decir, que aunque los NHPs no desarrollan ningún tipo de signo clínico de la enfermedad, si desarrollan una respuesta inmune humoral similar a la observada en humanos; también se ha observado que infecciones secuenciales en NHPs inducen reacción cruzada, la viremia incrementa tras la infección secundaria sugiriendo que se presenta de igual manera el fenómeno de ADE en NHPs. Con dosis  $>10^4$  vía subcutánea, NHPs pueden sustentar la replicación viral, sin embargo, la carga viral es mucho menor que en humanos, se limita a tejidos linfoides. El uso de inmunosupresor ciclofosfamida, permite que se presente infección de monocitos en monos *Rhesus* por periodos prolongados. Ocasionalmente se pueden presentar cuentas bajas de plaquetas pero en NHP no se presentan otros signos de importancia [4].

Las viremias en estos primates, generalmente dura 1 o 2 días y raramente llega a títulos de  $10^6$  (50% la dosis de infección del mosquito), comparado con la viremia humana que va de 2 a 12 días y con títulos de  $10^8$  (50% la dosis de infección del mosquito) [1].

Ante el interés de vacunas contra las subunidades, que ofrezcan protección de una infección letal al ser inmunizados los individuos por un antígeno (proteína purificada NS o estructural) expresado con los vectores vaccinia y baculovirus, se han hecho ensayos en modelos de primates infectados, teniendo éxito limitado [1].

### 6.3 Propagación en cultivos celulares

El virus puede ser propagado en un amplio rango de células hospederas en cultivo celular, incluyendo aquellas de origen mamífero o de insecto. El efecto Citopático es el resultado de un rango de la infección del virus, desde severo hasta inaparente, dependiendo de la línea celular y de la cepa viral utilizada. Como con otros flavivirus, el dengue no apaga la biosíntesis de proteínas en la célula hospedera. El efecto cito patico es visto usualmente como un incremento en la refractariedad celular, redondeamiento celular y algunas veces como una fusión celular. Parece ser que existe menos efecto Citopático en células de mosquito que en las de mamífero, pero esto depende en gran parte del serotipo del virus, cepa e historia de pasajes. Después de la infección de las células en cultivo, se entra en un largo periodo de latencia, típicamente entre 12-16 h, antes de que la progenie del virus pueda ser detectada en el medio extracelular. Usando muchas multiplicidades de la infección, títulos virales altos son usualmente obtenidos de 3 a 6 días después de la infección, dependiendo de la combinación del virus-cultivo hospedero. En el pico de producción viral, el rendimiento del virus por célula a 37% raramente excedía de 200-500 UFP/cel. También mientras un gran número de partículas que no se desarrollaron bien como viriones se acumulan intracelularmente, el 80% o más de la infectividad es encontrada en el medio extracelular. Los virus intracelulares pueden consistir en inmaduros, viriones menos infecciosos que contienen a la proteína preM en lugar de la M en la envoltura [1].

Las líneas celulares de mamíferos que han sido usadas extensamente con el virus del Dengue son: LLC-MK2 (riñón de mono), VERO (riñón de mono), BHK-21 (riñón de hámster bebe), varias líneas celulares humanas, FRhL (pulmón de feto de mono Rhesus) y PDK (células

primarias de riñón de perro). En cada caso de los anteriores, el periodo de adaptación después del aislamiento es frecuentemente requerido, y los máximos títulos raramente exceden  $10^5$  a  $10^6$  UFP/ml. La línea celular LLC-MK2 tiene valor comprobado para el ensayo de titulación de placa o ensayo de la neutralización de reducción de placa. El método de microtitulación usando la línea BHK-21 ha sido descrito. Las células FRhL son un sustrato popular para la producción de virus vivos y vivos atenuados. En los últimos años la línea PDK está siendo extensamente usada para producir virus candidatos vivos atenuados o cepas que se espera sirvan para la vacuna [1].

Líneas celulares de mosquito han demostrado ser altamente susceptibles a la infección del virus. C6/36 (*A. albopictus*), AP-61 (*A. pseudoscutellaris*), y TRA-284 (*Toxorhynchites amboinensis*) son algunas de las líneas celulares más ampliamente usadas en el campo del aislamiento del Dengue. Los títulos máximos que se han obtenido son arriba de  $10^8$ - $10^9$  UFP/ml [1].

La infección persistente en cultivos celulares, la cual produce infección por largos periodos de tiempo, hace que estos puedan ser subcultivados indefinidamente, siendo bien establecido el método en células de vertebrado e invertebrado. Debido a los virus que fueron subcultivados por un año con persistencia de infección, los cultivos celulares de mosquito no vector *T. amboinensis*, mostraron cambios en la reactividad antigénica, incrementando su sensibilidad a la temperatura, y disminuyendo su neurovirulencia en ratón en comparación con los cultivos que contenían al virus original usado para iniciar la infección. Se ha demostrado la habilidad del DENV-2 para establecer infección persistente en monocitos humanos. Correlatos clínicos no han reportado hasta el momento la persistencia de casos de infección latente por Dengue [1].

## 7 Prevención y control

La transmisión del Dengue puede ser prevenida controlando la población del vector.

El surgimiento de nuevos brotes de Dengue debido a distintos genotipos (genotipo asiático 1 serotipo 2 principalmente) y otros flavivirus en diversos países de América, causados por reintroducciones y la expansión geográfica del mosquito, son ligados directamente a decisiones hechas hace más de 4 décadas atrás con mermar y deteriorar los programas de control del mosquito y erradicación del *A. Aegypti*, ya que desde 1940 y hasta 1960 la PAHO (Organización Panamericana de la Salud) realizaba rigurosas campañas de eliminación del vector debido a que se tomó importancia y conciencia de un problema a nivel continental, además de ser una medida de prevención en Brasil, debido a las epidemias de fiebre amarilla, en donde además el Buro Sanitario Panamericano (PASB) promovió campañas intensas de erradicación del vector en todos los países afectados, logrando debido a este gran esfuerzo que solo dos tipos de virus (genotipo americano serotipo 2 y genotipo III del serotipo tres) estuvieran remanentes en circulación a mediados del siglo XX y a finales de los 70s, es decir, el número de casos empezó a aumentar considerablemente a principios de los 80s, de tal forma que a finales de esa década, en varios países se presentaba de forma endémica los cuatro serotipos; esta merma en el programa fue debido a desestabilidad económica y pérdida del interés político de la región es que programas de este tipo se dejan en el limbo soportando los países un incremento en la transmisión de virus por artrópodos, en donde en algunos países no se logró erradicar como en E.U.A. y Cuba, Venezuela y de algunas islas caribeñas; en dicha introducción del genotipo asiático

1, el cual se estableció en los 70s, se hizo evidente una disminución en la circulación del genotipo americano, es decir, del virus remanente aun con todo y el programa de erradicación, esto podría ser explicado por el reemplazo de un serotipo por otro; por otra parte, en algunas regiones el control es considerado imposible debido a la intensidad del ciclo selvático, al número disponible de hábitats del mosquito y al intercambio comercial con dicho continente [1, 4].

Además, con la incesante propagación del Dengue es necesario implementar medidas para viajeros detectando rápidamente algún caso, ya que deberían ser considerados aquellos que presenten fiebre hasta por 14 días tras la picadura y que hayan tenido un viaje a algún país tropical y subtropical (caso importado) ya que la patogénesis de infección varía ampliamente en los individuos, y esto podría causar un esparcimiento epidémico en el país de residencia, es decir que se dé una rápida repuesta de salud pública [4, 5].

Continuas campañas, encuestas epidemiológicas como conducta preventiva y mercadotecnia social en salud son necesarias para monitorear la transmisión en estados con poblaciones significativas del vector y el incremento de los brotes epidémicos en áreas tropicales y sub-tropicales [1], por lo tanto cabe destacar la importancia de evaluar los métodos generales de estudio entomológicos como la vigilancia (ciclos gonotrópicos (determinar la tasa diaria de sobrevivencia) índices y análisis espaciales) y control larvario directo para conocer el estado de infestación, larvitrapas, ovitrapas, captura de adultos mediante cebo humano, captura de adultos en sitios de reposos, bioensayos con insecticidas en larvas y adultos para verificar la posible erradicación del vector, tomando en cuenta la temperatura, los mm de lluvia anuales, así como las características culturales y patrones conductuales humanos que sean factibles de ser aplicados ya sea en forma cotidiana o como estudio base regional que haga más eficiente la valoración del riesgo



para evitar la continua transmisión y expansión de DENV hacia regiones no endémicas y que fuera posible si organizaciones globales unieran esfuerzos, [4, 26 y 10].

También el demostrar las interacciones competitivas de las dos especies que funcionan como vectores principales con otros elementos de la fauna mexicana, podrían ser posibles alternativas para el control de sus poblaciones en un ejemplo de biorremediación-biocontrol [10], tal es el caso del método de biorremediación que se ha propuesto como control larvario de *A. Aegypti*, usando la larva de *Toxorhynchites splendens*, la cual demuestra en su biología depredar para su supervivencia a otras larvas que estén en desarrollo en el mismo sitio de crecimiento, incluyendo incluso larvas de otros insectos, donde desde luego no tendría que causar un impacto ecológico hacia otras especies [18, 75]. Por otra parte, para el control del vector, se ha planteado el uso de la bacteria wolbachia, ya que reduce la sensibilidad de *Aedes aegypti* al virus del Dengue, por lo que se propone introducirla al área de distribución del mosquito, y así disminuir la población humana infectada; estudios preliminares confirmaron que mosquitos inoculados con la bacteria, la transmitieron a la población local donde fueron liberados [18, 76], además el estudio de diferentes bacterias que puedan funcionar previniendo la infección como las del género *Pedobacter* las cuales podrían ser inducidas y liberadas, y mediante paratransgénesis infectar a los otros mosquitos del medio para la propagación bacteriana que evita que la partícula viral sea reconocida por el receptor heparanasulfato con proteínas degradadas, por lo tanto *Pedobacter* puede ser usada con fines comerciales para la producción de la enzima heparinasa como nueva forma de estrategia contra el Dengue [31].

También se han hecho experimentos con hongos entomopatógenos, de los cuales en algunos es inhibida la esporulación y la germinación al

utilizarse algunos insecticidas, tal es el caso de *Trichoderma longibrachiatum* (el más patógeno para *Aedes sp* el cual además infecta imago y larva) siendo el inhibidor el insecticida “malation®”; también se sabe que los clorpirifos son tóxicos al crecimiento vegetativo reduciendo la esporulación, por lo que se tienen que buscar hongos compatibles dependiendo que insecticida sea el que se quiere usar, es decir, que no sea inhibida la función del biorremediador, por ejemplo existen especies de hongos resistentes o compatibles a ciertos insecticidas, tal son los casos de *Gliocladium virens* (patógeno a imago y larva) y *Metarhizium anisopliae*, este último se ha observado que mediante la copula y encuentro de cutículas de los mosquitos, uno le pasa al otro los conidios del hongo por contacto sexual y de tarsos (esto se puede observar gracias a un biomarcador de color), y considerando que el macho fecunda a entre 6 y 8 hembras, resulta en una forma muy eficaz de control, dejando a los mosquitos muertos dentro de los 6 o 7 días siguientes, esto ocurre ya que las hifas provocan daño mecánico en cutícula externa, penetrando por ano, espiráculo y probóscide, gracias a enzimas y toxinas dañinas al vector, matando incluso a cepas de mosquitos resistentes a insecticidas, ya que estos resultan más susceptibles a la infección, y de manera inversa, los mosquitos infectados con hongo son más susceptibles al insecticida, a lo cual se le conoce como control integral, además de que reducen la capacidad vectorial al transmitir el virus, es decir, este no llega a la probóscide. Este método ya se emplea actualmente en África en muchas aldeas, donde se tiene al hongo y conidias en mantas y estas son colocadas sobre las tejas de palma de las casas o chozas, en donde se trata de controlar a la malaria (vector *Anopheles gambiae*), solo se tiene que tener cuidado sobre las reacciones alérgicas que pueda llegar a causar al humano. Cabe mencionar que existen 750 especies de hongos entomopatogenos, y que este método de control tiene mayor persistencia en el tiempo ya que un individuo muerto se convierte en

una nueva fuente de inoculación y resultan muy económicos ya que se pueden producir incluso con arroz [10].

Por otra parte, el uso de piretros o piretroides (deltametrina, permetrina, esbioletrina, propoxur, lambda cialotrina, bifentrina y piroproxifeno) así como insecticidas organofosforados y carbamatos son ampliamente utilizados con los cuales se pueden impregnar la ropa, telas y cortinas, evitando al vector, estos compuestos actúan sobre los canales de sodio en el mosquito, siendo larvicidas, pupicidas y adulticidas, aunque se sabe que se aumenta la resistencia a estos compuestos químicos, donde quizá la causa sea el factor operacional de las formas de aplicación, por lo que se sugiere utilizar nebulizadores o dispositivos ULV, ya que la neblina se dispersa y entra a la vegetación en áreas suburbanas y rurales, así como en todos los rincones dentro de la vivienda con una mortalidad del 80-90 %. Por otra parte surge la pregunta de ¿si monitoreando la resistencia a dichos insecticidas, podríamos detener la dispersión de los genes que brindan la resistencia?, mientras estos estudios no se realicen, se seguirán fabricando insecticidas de última generación, tal es el caso de los que contienen benzolureas (compuesto que inhibe la biosíntesis de quitina), otro caso son los que desregulan el crecimiento mediante el desequilibrio de las hormonas en el desarrollo, o el uso de metopreno altosid XR-6, el cual es un análogo a la hormona juvenil, evitando que pueda emerger adecuadamente el imago, generando malformaciones que provocan que las larvas queden esclerotizadas con órganos degradados sin poder pasar al estado de pupa, sin que exista desarrollo de pelos los cuales son importantes en el vector ya que tienen función sensorial, sin contar que estos nuevos insecticidas, vienen en microcápsulas que provocan al adherirse al exoesqueleto de los artrópodos su liberación progresiva, con propiedades de hasta 12

meses de residualidad una vez adherido a las superficies (documentado en Sudáfrica) También existen repelentes con DEET (N, N-dietil metatoluamida), suelen ser los mejores [10, 27].

Como estudios alternos se han hecho Intentos por transformar mosquitos *Aedes* con elementos genéticos móviles o transposones de la clase II de *Drosophila melanogaster* se ha hecho desde 1980, sin embargo no hubo éxito en ese proyecto. Recientemente, ensayos exitosos de transposición en embriones de *A. aegypti* se reportaron para *Hermes*, *mariner* y *piggyBac* que pertenecen a los elementos traspasables de la clase II. La longitud del DNA de las secuencias insertadas fluctúa aproximadamente de 4.8 a 10-11 kb. La habilidad de manipular el genoma de este mosquito da la posibilidad de verificar experimentalmente la función de moléculas importantes para el mosquito y expresarlas, incluyendo aquellas que sean anti-patógenos, así como la expresión de un gen mortal [33].

## **Antecedentes**

### A) Reportes de regiones genómicas (determinantes genéticos) asociados a alteración de la virulencia.

Se han reportado trabajos donde identifican cambios de nucleótidos en ciertos sitios específicos del genoma que repercuten en la alteración de la virulencia en modelo de ratón y por consiguiente podrían estar relacionados a humano.

Mecate en 2013 a partir de una base de datos de genomas completos de DENV, mediante miles de sondas de 10bp realizo huellas genómicas y a las sondas funcionales resultantes (163) les agrupo con Cluster obteniendo 6 grupos importantes, aquellas que se unían de manera preferencial a un tipo de diagnóstico (DHF o DF) y que no la hacían con el otro, además de discriminar entre el serotipo (1, 2 o 3), esto para encontrar las regiones genéticas asociadas a alteración de la virulencia; posteriormente analizo dichas regiones nucleotídicas y aminoacídicas (realizo traducción *in silico*) para ser determinadas, encontrando diferencias entre los dos tipos de diagnóstico, muchas de ellas reportadas en la literatura como asociadas a alteración de la virulencia en modelos de ratón, las diferencias no eran más que cambios de nucleótido o aminoácido. Esto nos podría estar advirtiendo de que ciertas regiones genéticas se involucran con la severidad de la patogénesis pero más que como mecanismos de patogenicidad ya establecidos, lo hacen como resultado de la mayor adaptación al medio donde se presentan [4].

Chen en 1995 [77], causo mutaciones puntuales en el gen E para determinar la respuesta inmune generada y la neurovirulencia en ratones, mediante inoculación vía intracraneal, determinando que la

mutación EE406k generaba 100% de mortandad. También nos explica que este cambio de aminoácido genera un cambio de carga.

Por otra parte tenemos que Leitmeyer en 1999 [78], al secuenciar los genomas completos de los genotipos Americano y Asiático de DENV-2, encontró 55 cambios de aminoácidos de los cuales 6 son de cambio de carga, y basados en el aumento de casos de DHF ante el desplazamiento en Latinoamérica del genotipo Americano por el Asiático, es que propone que estos cambios le dan mayor virulencia al Asiático, y que es reflejada en una patogénesis más severa.

Además tenemos que Grant en 2011 [79], identifico en una cepa de DENV-2 (que se sabía causaba infección letal en ratones y con 47 aa diferente a una cepa no letal malaya), un determinante critico de virulencia ya que al realizar un panel de mutaciones, una en especial, la NS4B F52L abolió por completo la patogenicidad, reduciéndose el titulo viral y la permeabilidad vascular estaba intacta. Por el contrario, en una cepa del mismo serotipo pero no virulenta, al mutarle el mismo aminoácido pero invertido, es decir la L por la F, se produjo una letalidad del 80% en los ratones y un incremento en la viremia, ya que la letalidad no estaba ligada al hecho de que la proteína NS4B era blanco de los IFN de la respuesta de la célula para activar a otras células en la respuesta IRES, sino que esta proteína degrada directamente al factor de transcripción STAT1 y por lo tanto la respuesta IRES era nula; además Grant demostró que este determinante era más afín a células de mamífero que a las de C6/36 ya que aquí se replicaba mejor.

También Engel y colaboradores en el 2010 [56], crearon virus quiméricos de virus de Encefalitis transmitido por garrapatas (TBEV) con DENV-4, los cuales llevaban mutaciones en los genes E315 con una sustitución de K por D y las reportadas en el 2002 por Hanley D. *et al*, del gen NS5 en las posiciones 654 Y 655 de los aminoácidos D y R por A y A. Los viriones con estas combinaciones redujeron la

neurovirulencia en ratones Swiss Webster de tres días de edad, 51 veces la LD<sub>50</sub> observada en ratones control con la cepa quimérica sin las mutaciones, siendo que con las mutaciones individuales disminuyen 6.6 y 16.2 veces la dosis de letalidad, por lo que la combinación de mutaciones disminuye significativamente la neurovirulencia en ratones.

Otro de los antecedentes es el de Rodpothong P. y Prasert A. [80], quienes en 2011, encontraron un sitio (codón en la posición 82) sometido a presión positiva a lo largo de la línea ancestral (rama B) del gen prM de DENV-2 usando Branch-Site model. El sitio se localiza en la región de la premembrana (pr) de la proteína prM. La proteína prM se asocia con el dominio III de la proteína E y actúa como chaperona para el plegamiento de E y para prevenir la fusión prematura del virus a la membrana dentro de la célula del huésped [49, 71]. El sitio detectado en este estudio es próximo al corte de furina en la posición P10. El sitio de corte contiene aminoácidos básicos en las posiciones P1, P2 y P4, seguido con Arg (P4)-X (P3)-X (P-2)-Arg (P1). De las posiciones P5-P13 son residuos básicos adicionales altamente conservados en DENV. El corte de prM está asociado con la maduración viral y la eficiencia del corte es distinta en diversas líneas celulares. Al comparar el corte completo de prM en otros flavivirus, este corte parcial en DENV ha generado varias interrogantes, como la asociación entre el corte parcial y la propiedad de potenciamiento de prM. La habilidad de prM de potenciar una infección viral se demostró en el estudio de Dejnirattisai W. y colaboradores en 2010 [81], donde los anticuerpos anti-prM potencian la infección viral más que neutralizarla, mientras que los anti-E dirigidos hacia el dominio III parecían ser los más potentes en neutralizar al virus. También mostraron que tanto los anticuerpos anti-prM y anti-E generan reacción cruzada para los cuatro serotipos, pero cuando compararon si existía reacción cruzada con JEV, la mayoría de los anti-prM no. Esto sugiere un posible papel para este sitio que podría

explicar por qué el DENV-2 se ha asociado más frecuentemente con DHF/DSS.

Lee y colaboradores en 2011 [82], determinaron la estabilidad genética que el genoma viral de DENV presenta en cultivo celular. Al realizar pases determinan la frecuencia de mutaciones para una cepa de DENV-4 2A y una mutante con una eliminación de la porción 3'UTR llamada DENV-4 2A  $\Delta$ 30. Determinaron el sitio de la mutación por secuenciación y evalúan la neurovirulencia en ratones inmunocompetentes C57BL/6, encontrando que las mutaciones puntuales en E<sub>Q438H</sub>, E<sub>V463L</sub>, NS2B<sub>Q78H</sub> y NS2B<sub>A113T</sub> generaban mayor severidad del cuadro hemorrágico en los órganos de los ratones.

Por último de Borba L. y colaboradores en 2012 [83], como objetivo de su estudio fue identificar posibles determinantes virales utilizando firmas moleculares encontradas en los genes E y NS3, reportadas anteriormente por Bordignon J. (codones E<sub>F402I</sub>, E<sub>T405I</sub>, y NS3<sub>V209I</sub>, NS3<sub>L435S</sub>, y NS3<sub>L480S</sub>,) [84]. Evaluaron las mutaciones en ratones FGA/NA como mutaciones individuales, dobles o triples. Encontraron que las mutaciones de E<sub>402</sub>, E<sub>405</sub> podrían estar involucradas en la formación de homotrímeros, lo cual estaría involucrado en el evento de fusión de membranas dentro del endosoma en el fenómeno de entrada. Las mutaciones encontradas en NS3<sub>209</sub>, <sub>435</sub>, <sub>480</sub> se sitúan en el dominio de la helicasa, la cual está involucrada en la replicación junto con la polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdPd) codificada por el gen NS5. La mortalidad en los distintos grupos de ratones con mutaciones individuales era del 29% para NS3<sub>435</sub> y del 61% para NS3<sub>480</sub>, las cuales destacan su importancia en la neurovirulencia, sin embargo, el efecto para las mutaciones de E<sub>402</sub> y E<sub>405</sub> no fue mayor que la observada en el control. Al realizar mutaciones dobles y triples se encontró que la neurovirulencia aumentaba al 73% para E<sub>405</sub>/NS3<sub>435</sub> y para E<sub>402</sub>/ns3<sub>480</sub> y para la mutación triple E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub> fue del 100% la mortalidad.



Lo cual demuestra que mutaciones múltiples en distintas regiones del genoma de DENV cooperan en la modulación de la virulencia de DENV.

## **B) Microarreglo**

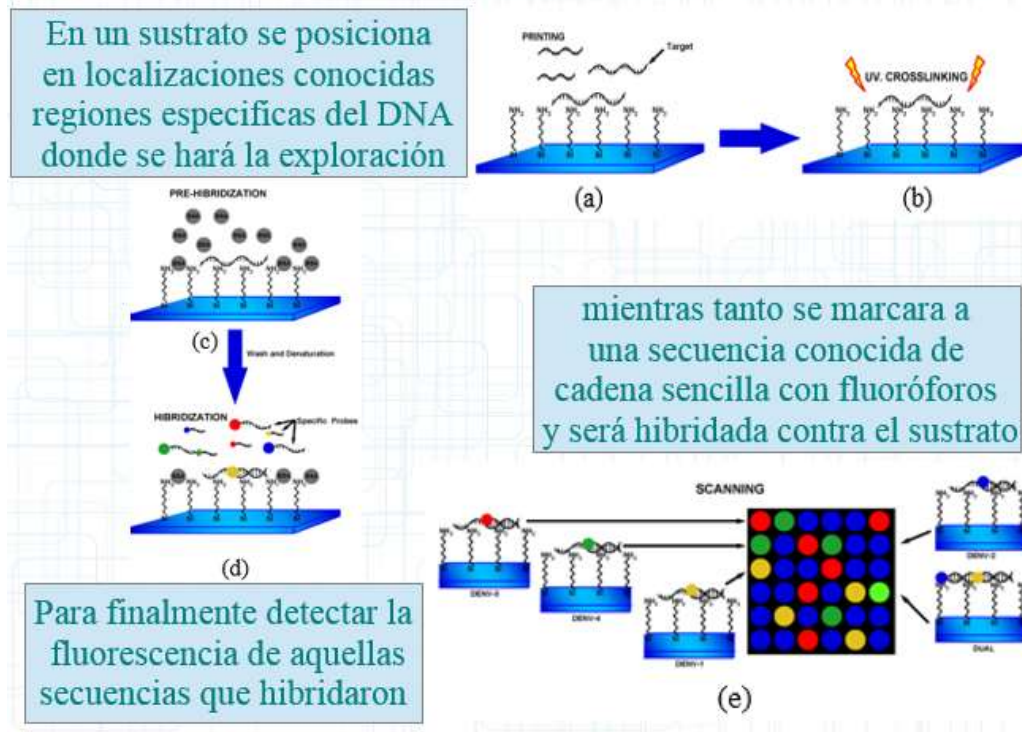
### **B 1) ventajas de este método de detección**

Un Microarreglo es una herramienta de diagnóstico que se basa en la hibridación de ácidos nucleicos, y es empleado en el estudio de secuencias conocidas permitiendo la automatización simultánea de miles de ensayos [9].

Las ventajas de este método de detección se presentan en la cantidad mínima de cDNA a utilizar para hacer la hibridación en el spot o pozo, con respecto a otros métodos como en la RT-PCR, ya que el poder mínimo de detección del amplicón en gel de agarosa en electroforesis es de 20-30 ng de concentración de cDNA, mientras que en el Microarreglo es de 0.5-2 ng de concentración de cDNA, es decir, se requiere una cantidad 10 veces menor de la muestra para realizar la detección, además de que la sensibilidad de detección es absoluta y específica lo que permite su reproducibilidad, aunado a esto, el enfoque de detección es múltiple, con respecto al RT-PCR, el cual solo se limita a 4 objetivos, con lo cual el Microarreglo, permite la automatización simultánea de miles de ensayos con dicha sensibilidad y reproducibilidad [9].

### **B 2) Construcción de un Microarreglo**

## Fabricación de un Microarreglo de DNA



**Figura 29. Construcción de un Microarreglo.**

Nos muestra los pasos básicos de fabricación de un chip, donde el diámetro de cada uno de los spots, es de  $300\ \mu\text{m}$  y la separación entre cada uno de los spots es de  $200\ \mu\text{m}$ , y la separación entre el centro de un spot con respecto al otro es de  $500\ \mu\text{m}$  [9].

### B 3) Antecedentes del uso de Microarreglo para detección de flavivirus

Se tienen algunos antecedentes del uso de este método de detección de virus de diferentes familias, e incluso de flavivirus, donde se ha demostrado su efectividad y precisión.

Por ejemplo Kang en el 2011 [85], utilizó sondas (oligonucleótidos) específicas a ciertos géneros de virus. Estas sondas fueron utilizadas para visualizar virus de RNA patógenos en humano. Un total de 628

sondas fueron necesarias, cubriendo 32 géneros de virus de RNA dentro de 14 familias.

Por otra parte, Álvaro en 2014, utilizo el método de detección de Microarreglos, para serotipificar al virus del Dengue, e incluso detectar infecciones simultaneas por dos o más serotipos, o entre diferentes flavivirus en una misma muestra de paciente, es decir, el chip, era capaz de detectar co-infecciones [9].

## Justificación

Debido a que ciertas regiones del genoma del DENV se han asociado con su virulencia, y considerando la interacción que existe entre virus-vector-hospedero, se plantea el escenario donde se obtenga como resultado una infección con determinado grado de virulencia que puede ser dengue clásico, o en el peor de los casos puede generarse la enfermedad grave o el shock por dengue (SSD).el DENV. Por lo tanto es de suma importancia estudiar la relación que existe entre la patogenicidad del virus y su genoma. Lo que nos permitiría desarrollar un sistema de diagnóstico basado en un Biosensor de cDNA que nos daría la ventaja de detectar al DENV en un gran número de muestras de pacientes y mosquitos en un corto periodo de tiempo y con una alta sensibilidad, reproducibilidad y especificidad por un determinado serotipo; detectar infecciones simultáneas por dos o más serotipos; la discriminación entre genotipos; y la distinción entre la posible derivación de la enfermedad en DEN grave.

Este futuro Biosensor también podría detectar otros flavivirus humanos con la misma secuencia consenso de los “primers específicos” como lo son la Encefalitis japonesa, Kunjin y Fiebre amarilla, contribuyendo en otras aplicaciones en el estudio de la patogénesis viral. Asimismo, debido a la aparición de infecciones producidas por el virus Chikungunya se podrían diseñar sondas adicionales e incluirlas en este ensayo en el futuro. El resultado final de este proyecto fue evaluar si dengue virus posee propiedades genéticas asociadas a la severidad de la infección observada.

## **Hipótesis**

El genoma del DENV se ha asociado con la gravedad de la enfermedad por lo tanto, Las sondas seleccionadas para la detección con el Biosensor, servirán como marcadores de severidad y por lo tanto se espera que funcionen como sondas específicas de diagnóstico en la construcción del Biosensor comercial.

## **Objetivo general**

Diseño de un Biosensor de DNA para la detección del serotipo y los marcadores de la severidad de la enfermedad del Dengue clásico y grave.

## **Objetivos particulares**

1. Diseñar las sondas para diferenciar Dengue clásico (DF) de Dengue hemorrágico (DHF), así como la obtención de la región que será amplificada en las muestras de los pacientes
2. Establecer las condiciones óptimas de inmovilización de la neutravidina, captura del amplicon del DENV e hibridación de las sondas mediante la técnica de SPR
3. Diseño del prototipo final del Microarreglo para comercializar
4. Establecer las condiciones de inmovilización de los amplicones marcados del Dengue e hibridación de las sondas en el Microarreglo

## **Materiales y Métodos.**

### **A. Materiales, reactivos y equipos**

Para el análisis de depuración de las sondas se utilizó el software Geneious®, y para elegir la región de los primers en las muestras de los pacientes para los tres serotipos se utilizaron los programas Seaview, WebLogo y AmplifX, para obtener el RNA de las muestras de pacientes se empleó el equipo PREPITO® (Perkin Elmer), y su kit de extracción Viral 300 RNA/DNA extraction. Para la amplificación y reamplificación de los cuatro serotipos del fragmento DV1-DV3 del DENV se empleó el kit RT-PCR one step de SuperScrip III de Platinum Taq retrotranscriptasa-DNA polimerasa (*Thermophilus aquaticus*) High fidelity (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) y el kit One Step PCR con HotStar Taq DNA Polimerasa (Taq, *Thermophilus aquaticus*-QUIAGEN®), así como el termociclador GENEAMP® system 9700 Applied biosystems, para la concentración de los amplicones se utilizó el kit DNA Clean up y para precipitarlos se utilizó acetato de sodio. El termociclador real time-PCR que se utilizó fue CFX96™ touch Bio Rad para amplificar los serotipos del DENV añadiendo la biotina con primers biotin-DV1-DV3 de IDT (integrate DNA technologies-Belgica). Todos los químicos y solventes para la fabricación del Biosensor mediante la técnica de SPR fueron apoyados a través del proyecto titulado: “Advanced Multiplex Nanosensor Platform for Proteomic and Genomic Biomarkers for Dengue Virus” (**A Cranfield University and Cinvestav Joint Research Projects**) a cargo de las Doctoras **María de Lourdes Muñoz Moreno (Cinvestav) e Ibtisam E. Tothill (Cranfield)**. El material fue: PBS buffer, MUDA (ácido mercaptoundecanoico), chip de oro de General Electric® para Biacore 3000®, máquina Biacore 3000, neutravidina, ácido acético, acetato de sodio, hidróxido de sodio, EDC/NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhidrato +N-

hidroxisuccinimida), etanolamina, HEPES buffer, BCA-suero bovino fetal. Además se utilizó para el SPR las sondas específicas fluorescentes de DENV (20  $\mu$ M Texas red-DSP 1 (color amarillo), 20  $\mu$ M 6 FAM-DSP 2 (color azul), 20  $\mu$ M Cy5-DSP 3 (color rojo) and 20  $\mu$ M Yakima yellow-DSP 4 (color verde); (Jena Bioscience®)). Todos los químicos y solventes para la fabricación del Microarreglo (DMSO pH 6.5, Buffer CAPS & CHAPS 10x, H<sub>2</sub>O DEPC, SDS 0.1%, H<sub>2</sub>O mili Q, 4x SSC, 1% SDS, y 10 mg/ml BSA (solución de bloqueo) y la cámara húmeda (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), se compraron a Fluka-Sigma de St. Louis, MO, USA al más alto grado analítico en su caso. Fueron utilizados los sustratos Slide A+Aminosilane-Coated substrate (Schott Nexterion®, Jena, Alemania), se utilizó un robot espoteador de cabezal con 32 puntas solidas (GeneTAG G3, Genomic Solutions, Harvard Bioscience, Boston, MA, USA) para la impresión y se utilizó para la visualización el escáner GeneTac LS IV (Genomic Solutions, Harvard Bioscience, Boston, MA, USA). Los valores de fluorescencia se obtuvieron usando el software TM4 (Spotfinder, MeV, MIDAS y Madam Administrator) y el análisis estadístico se llevó a cabo con el software estadístico S-Plus.

## B. Virus

Los virus utilizados como controles positivos del DENV-1 cepa de Hawái (HA1-1944), DENV-2 cepa de Nueva Guinea C (NGC-1944) y DENV-3 cepa de Filipinas (H-87) utilizados en este estudio fueron obtenidos por una generosa contribución del Dr. J. Gubler (Division of vector-borne Infectious Diseases, Center for Diseases Control, Fort Collins, CO, USA).

## C. Muestras de los pacientes



Las muestras de los pacientes fueron obtenidas por un programa de encuesta epidemiológica llevada a cabo por la secretaria de salud y el Instituto Mexicano del Seguro social (IMSS) de los Estados de Veracruz y Oaxaca, las Cuales fueron evaluadas con ELISA en dichas instituciones. Estas muestras fueron guardadas a -70 °C. El estudio fue revisado y autorizado por el comité de bioética para la investigación en seres humanos del centro de investigaciones y de estudios avanzados del IPN (COBISH-CINVESTAV IPN).

D. Selección de sondas a partir de la colección de sondas; definición de la región a amplificar; construcción de los primers a utilizar; y análisis de diagnóstico *in silico* para verificar su funcionalidad.

Selección de las sondas.

A la colección de sondas obtenidas *in silico* por Mecate en el trabajo que le antecede al presente proyecto, se seleccionaron aquellas considerando que no hibriden en otras regiones del genoma del virus; ni que no estén en la misma región genómica; y que no alineen en otros genomas de otro serotipo, o genotipo y diagnóstico. Esta selección se realizó mediante análisis de búsqueda-ubicación (mapeo) con alineamiento de la sonda contra el genoma viral de ocho tipos de secuencias distintas. El Software utilizado fue Geneious®. Para poder hacer la selección de sondas a sintetizar, primero se tuvieron que tener las secuencias de las sondas almacenadas en formato fasta y con su encabezado (<), seguido del nombre de la secuencia y su número de registro o acceso en el banco de datos de secuencias, donde después fueron metidas al programa Geneious para mapearlas en sets con sus respectivas sondas, donde se colocó en la primera fila la secuencia viral de 10.7 kb y a partir de la segunda fila se colocaron las sondas y se

procedió con el análisis, esto para los seis sets y por lo tanto se generaron seis carpetas de archivos en el programa.

### Selección de region a amplificar

Una vez que se obtuvo el catalogo final de sondas depuradas, fue posible determinar la región que seleccionará para amplificar el genoma del virus de las muestras de los pacientes, ya que en esta región es donde dichas sondas determinaran mediante complementación al cDNA el serotipo y el tipo de diagnóstico. El criterio de selección de región nucleotídica a amplificar fue que nos permita disminuir el número de sondas a sintetizar al momento de la fabricación del chip, este método permite economizar dinero en las sondas a fabricar sin comprometer la capacidad de diagnóstico. Además de que la amplificación será menos susceptible a errores por parte de la polimerasa ya que será una región más pequeña comparada con utilizar el genoma completo, donde incluso el tiempo de amplificación será más eficiente.

### Construcción de primers

El número de primers que utilizará la instancia que maneje el microchip para el diagnóstico (el sector salud etc.) será de 3 juegos de primers (forward y reverse), es decir por serotipo, por lo cual se hizo análisis de alineamiento por Seaview, y con ayuda de WebLogo se determinó la zona de diseño de los primers y se establecieron sus características de los mismos mediante el programa AmplifX.

### Análisis *in silico* de diagnostico

Posteriormente se realizaron las sondas por un mapeo contra todas las 179 secuencias de DENV que se utilizaron para la construcción de las sondas en el trabajo previo o antecedente directo al presente proyecto, las secuencias de virus que circulaban en América en el periodo 2000-2009. Esto se hizo para realizar el primer análisis de diagnóstico *in silico*, para corroborar que fueran funcionales las sondas seleccionadas. De igual manera se mapearon las sondas del DENV-3 (dengue clásico) contra secuencias de virus que circularon recientemente (2010) de DENV-3 (dengue clásico) obtenidas del ViPR, para corroborar que los marcadores de severidad se mantengan funcionales y así quedar listas para su síntesis; (no se mapearon los otros 5 sets de sondas contra secuencias de virus que circularon recientemente ya que no se encontraron secuencias en la base de datos del ViPR para dichos sets).

E. Extracción, amplificación, concentración y precipitación del RNA viral de DENV de las muestras de pacientes (tres serotipos) para poder establecer las condiciones óptimas de captura del amplicon e hibridación de las sondas después de la inmovilización de la neutravidina mediante la técnica de SPR

#### Extracción

Se extrajo el RNA total del plasma de la fase aguda de las muestras de los pacientes colectadas en los programas de encuestas epidemiológicas de las dependencias de salud. El RNA se obtuvo usando el equipo PREPITO® de acuerdo con las recomendaciones de manufactura y usando el kit de extracción del núcleo ácido viral de la misma marca. El RNA fue resuspendido por el aparato en 200 µL de

H<sub>2</sub>O tratada con dietilpolycarbonato (DEPC), la cual inactiva las ribonucleasas.

### Amplificación

El RNA extraído fue usado como templado (5µL) para la transcripción reversa (muestras procesadas por un ciclo de transcripción reversa= 42 °C, 45 min [86]) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 25 µL de mezcla de reacción. Los primers que se utilizaron fueron complementarios y específicos a una región blanco altamente conservada del gen NS3 para los 3 serotipos y ambos diagnósticos DHF/DF, lo cual maximizó la probabilidad de que todos los miembros virales sean detectados (forward= DV1 (+), 5'GGRACKTCAGGWTCTCC3', posición del 4918nc al 4934nc del genoma completo viral= fracción del NS3, y reverse= DV3, 5'AARTGIGCYTCRTCCAT3', posición del 5368nc al 5384nc, fracción de NS3; tamaño del amplicon de 470 nc) dando paso a productos todos del mismo tamaño. El cDNA obtenido se procesó a 35 ciclos de PCR (cada ciclo= 30 seg a 94 °C, 30 seg a 50 °C y 60 seg a 72 °C) [86, 87]. La verificación del tamaño esperado se realizó mediante un gel de agarosa al 2% 100 V/100 mA por 35 minutos.

### Concentración

La concentración de los amplicones se determinó mediante la técnica de DNA Clean UP, siguiendo las instrucciones dadas en el kit de Wizard®. Cada suspensión de DNA fue concentrado por separado en un solo tubo eppendorf.

### Precipitación

La precipitación de los amplicones se realizó con el uso de acetato de sodio y etanol, la cual fue realizada para poder enviar las muestras de los serotipos a Cranfield para continuar con la estandarización de las condiciones del chip mediante la técnica de SPR.

Trabajo realizado en Cranfield University

Reamplificación para añadir la biotina a los amplicones

Se realizó la reamplificación de los serotipos con primers que añaden la biotina en el 5' del amplicon (forward= DV1 (+), 5' biotin-GGRACKTCAGGWTCTCC3', posición del 4918nc al 4934nc del genoma completo viral= fracción del NS3, y reverse= DV3, 5'AARTGIGCYTCRTCCAT3', posición del 5368nc al 5384nc, fracción de NS3; tamaño del amplicon de 470 nc) con el kit Rotor-Gene SYBR Green, siguiendo la ficha técnica y para 16 reacciones en termociclador de tiempo real CFX96 de Bio Rad.

Precipitación a los amplicones con biotina

La precipitación de los amplicones se realizó con el uso de acetato de sodio y etanol convencional, la cual fue realizada para resuspender el pellet en buffer PBS necesario para comenzar la inyección en el experimento de SPR.

Inmovilización de la neutravidina

Preparar el chip de general electric® con MUDA 5mM 10 mL por un día en ausencia de luz e un tubo falcón, lavarlo con etanol y secarlo a corriente de aire de nitrógeno, y colocarlo en la máquina de Biacore siguiendo las instrucciones del equipo, colocar la etanolamina pH 8.5

1M 1 mL, neutravidina 0.200, 0.100 y 0.050 mg/mL (acetato de sodio 10 mM 4, 4.5 y 5 pH) 1 mL y EDC/NHS 200Mm/50mM 1 mL en el equipo para comenzar a hacer las exploraciones en las concentraciones de la neutravidina y el pH para poder hacer una inmovilización adecuada. Igualmente se siguieron las instrucciones del manual para la colocación de las muestras en la equipo (rack A columna A filas 1, 2 y 3), así como el buffer PBS 7.4 pH 10 mM 400 mL y de la programación con el software Wizard. Las inyecciones se dan por tres minutos con volúmenes de 10  $\mu$ L por minuto, según estandarizaciones en el manual de Biacore.

#### Captura del amplicon

Se resuspendido al amplicon con biotina en buffer PBS 7.4 pH 10 mM 500  $\mu$ L para proceder a las inyecciones en el equipo (el pellet concentrado precipitado de las 16 reacciones de 50  $\mu$ L de amplicon en 500  $\mu$ L de buffer), para lograr una captura adecuada se hizo una exploración de la concentración, posteriormente se inyectó el hidróxido de sodio 0.005 mM que funciona como buffer de apertura de la cadena del amplicon, lo cual permitió que las sondas puedan ser capturadas al ser de cadena sencilla.

#### Hibridación de las sondas

Después de estandarizar la inmovilización y unión del amplicon y apertura de su cadena, se hibridaron las sondas para serotipificar el amplicon respectivo en estudio, la concentración de estas fue de 50 ng/ $\mu$ L en HEPES buffer 7.4 pH 10 mM 500  $\mu$ L, cabe mencionar que el fluoróforo presente en la sonda en este caso no es funcional.

Trabajo realizado en Cinvestav

F Diseño del prototipo final del Microarreglo para comercializar

Diseño

El diseño se hizo siguiendo el arreglo idéntico a la tabla de distribución en localizaciones conocidas de las sondas seleccionadas para su síntesis, el cual es dividido por serotipo (metafila), tipo de diagnóstico (meta columna) y número de sondas (fila), además el diseño presenta repetición por triplicado (columna), además se deja un espacio para posibles sondas a futuro para el serotipo 4 y se contemplan los controles positivos y negativos en el diseño del Microarreglo.

G. Establecer las condiciones de inmovilización del amplicon del DENV marcado e hibridación de las sondas en la fabricación del Microarreglo [88]

Impresión, fijación y bloqueo

Este paso comenzó después de la compra del sustrato de vidrio con cubierta en forma de película de aminoacil, donde Los amplicones de RNA fueron impresos inmovilizados como se muestra en la figura 31 donde alícuotas con una concentración de 100 ng/ $\mu$ L se diluyeron en buffer (1.6 mol/ml CHAPS, 1% CAPS, buffer 50 % DMSO pH 6.5) y se imprimieron con un robot espoteador a 55% de humedad relativa y una temperatura de 20-25 °C. Cada pin solido libero un volumen de aprox 0.2  $\mu$ L creando un spot de un diámetro de 300  $\mu$ m, del centro de un spot al centro de otro spot son 500  $\mu$ m. Después de la impresión del amplicon de doble cadena, se unió mediante enlace covalente a la superficie mediante una breve exposición a un haz de luz UV (crosslinked-254 nm

a 250 mJ/cm<sup>2</sup>), el cual protona a los grupos amino primarios disponibles en una alta concentración en la superficie del sustrato, adquiriendo una carga positiva cuando son colocados en una solución acuosa casi neutral, y los amplicones que son moléculas negativas (carga negativa que es conferida por el grupo fosfato del ácido nucleico) pueden iniciar la formación de múltiples interacciones iónicas con la superficie cubierta de aminos cargados positivamente, sin necesidad de que modificaciones adicionales sean hechas en los grupos amino de los ácidos nucleico., Posteriormente se incubó el chip por 20 minutos a 75 °C seguido de un extenso lavado con 0.1 % de SDS y dos enjuagues con agua doble desionizada. Los chips se bloquearon con buffer pre-hibridador (4x SSC, 1% SDS, y 10 mg/ml BSA) por 45 min a 42 °C, se lavó con agua doble desionizada por 20 seg y se secó con corriente de aire filtrado.

Hibridación, visualización-detección, análisis estadístico, corrección de background y normalización

Las sondas marcadas con fluoróforos se hibridan a los amplicones inmovilizados en el chip, en un volumen de 5 µl de las sondas sobre la lámina y fue cubierto el chip con dos cubreobjetos, el chip y los cubreobjetos fueron sellados en una cámara húmeda e incubados a 65 °C por al menos 6 horas. La concentración óptima de las sondas se determinó iniciando con 20 µM. Los cubreobjetos y soportes se removieron cuidadosamente con 4x SSC en una botella de lavado y los chips se lavaron por inmersión en 1x SSC, 0.1% SDS por 10 minutos (equivalencia de 10 chips en 250 ml), 0.1x SSC, 0.1% SDS dos veces por 10 minutos y 0.1x SSC dos veces por 10 minutos, finalmente los chips se secaron en corriente soplando el líquido fuera del spot y hacia los bordes exteriores.

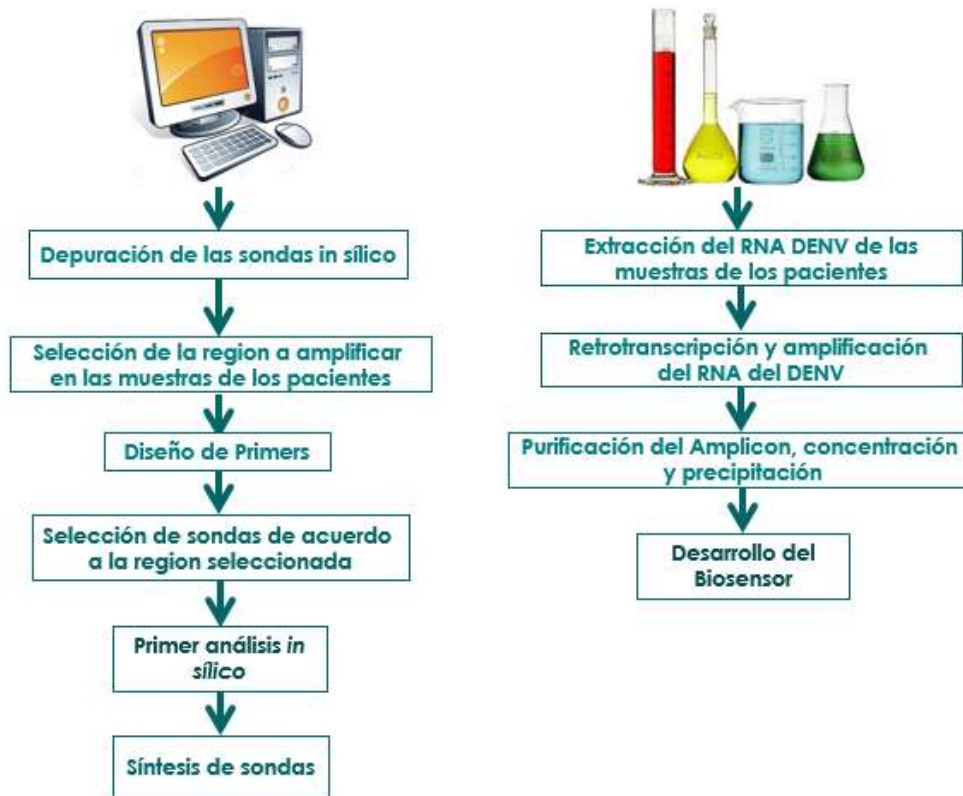


Los chips fueron escaneados para detectar fluorescencia Texas Red, 6-FAM, Cy5 y Yakima Yellow a ondas de excitación de 583, 519, 646 y 530 nm respectivamente. Los valores de fluorescencia se obtuvieron usando el software TM4 (Madam, MeV, Spotfinder y MIDAS) y el análisis estadístico se llevó a cabo con el software estadístico S-Plus. La normalización de los medios se llevó a cabo después de la corrección del background. La especificidad de hibridación fue analizada por dicha normalización de los valores de la intensidad de la fluorescencia de todos los fluorocromos, donde hubo la posibilidad de que la variabilidad de los valores de fluorescencia normalizados sean mayores entre muestras que la variabilidad entre muestras por triplicado, es decir que lo esperado fue que la variabilidad de fluorescencia haya sido muy baja en los ensayos.

#### Optimización de la concentración en el spot

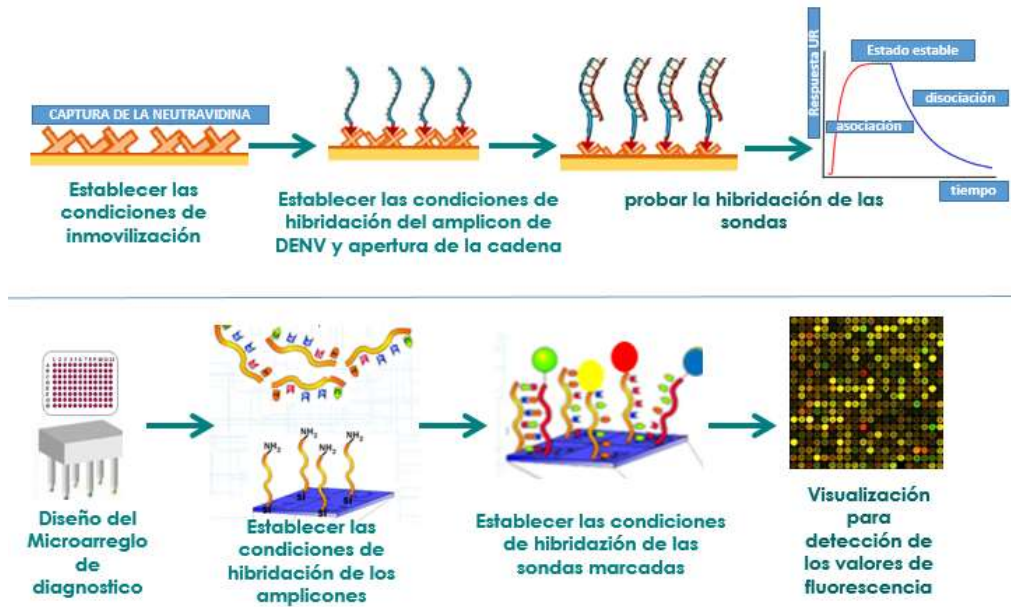
Fue optimizada la concentración de la sonda en la superficie del chip para una hibridación efectiva, empleando varias concentraciones en el rango de 50, 100, 200 ng/ $\mu$ l y se determinó la densidad al momento de la lectura con la visualización, determinándose que la concentración ideal de DNA spotado para una detección fluorescente con la sonda complementaria marcada (20  $\mu$ M) fue de 50 ng/ $\mu$ L. Todos los experimentos se hicieron con 5 spots cada uno de la misma muestra. Diseño de la estrategia experimental Figura 30.

## Estrategia experimental general de trabajo



**Figura 30. Estrategia experimental.**

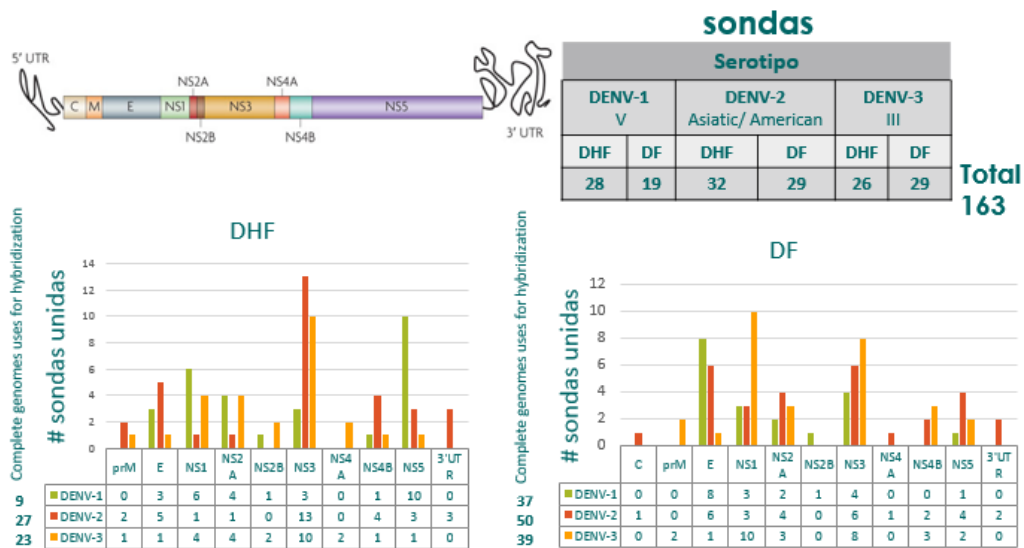
Se presentan los pasos o estrategia experimental que se llevó a cabo durante el desarrollo del proyecto.



**Figura 31. Representación gráfica de construcción de los Biosensores para la selección de sondas específicas positivas de DF/DHF para la fabricación del Chip de diagnóstico.**

Mediante la técnica de SPR se optimizaron las condiciones de inmovilización de la neutravidina, la cual capturo al amplicon del DENV para después establecer las condiciones de apertura de su cadena y así poder hibridar las sondas y determinar la especificidad de las mismas. Abajo) Mediante el uso de un robot, los amplicones fueron impresos en el sustrato para luego ser unidos covalentemente mediante el uso de luz UV. Posteriormente se dio lavado y secado al sustrato para eliminar aquellos residuos inespecíficos y así se dio paso al bloqueo de los amplicones con el uso de buffers de pre-hibridación. Más adelante fueron hibridadas contra el sustrato las sondas marcadas, para dar lugar a la visualización del Microarreglo y así poder obtener los valores de fluorescencia de aquellas sondas que hayan hibridado, para finalmente discriminar aquellas sondas específicas positivas y así poder dar paso a la construcción del chip de diagnóstico que será comercializado.

## Información general de las sondas (Genes que hibridan con las sondas)



**Figura 32. Numero de sondas que se unen en cada gen ante la hibridación de las sondas contra genomas con diagnóstico DHF y DF de cada serotipo.**

Se muestran las sondas totales obtenidas por Mecate en 2014, las cuales se dividen por serotipo y tipo de diagnóstico, además se muestra en las gráficas la distribución de dichas sondas de acuerdo al número que corresponde a cada gen del virus.

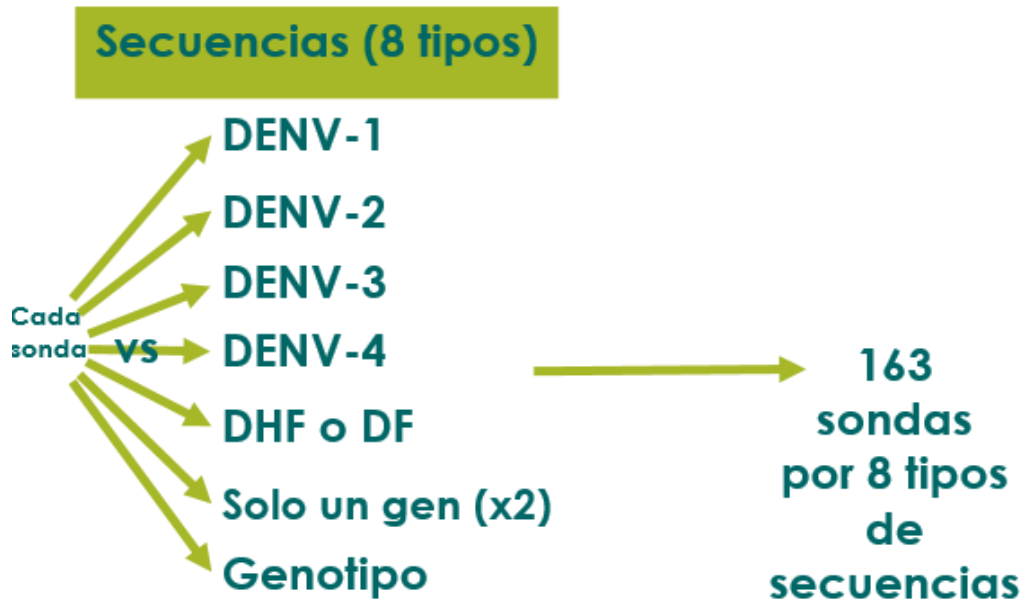
## Resultados

### 1

Selección de sondas mediante análisis de mapeo en Geneious®, selección de región a amplificar en las muestras de los pacientes (diseño de primers), fusión de sondas que se traslapan, selección de sondas a emplear para el diagnóstico, análisis de diagnóstico *in silico* con secuencias de genomas completos de Dengue del continente Americano del periodo 2000-2009 y análisis de diagnóstico *in silico* con secuencias de genomas completos de Dengue del continente de Americana recientes.

#### A) Selección de sondas

De las 163 sondas divididas en 6 sets para los serotipos 1, 2 y 3 del DENV DF y DHF (Figura 33) se realizó un análisis de mapeo con secuencias de los dos diagnósticos (DHF y DF) de su respectivo serotipo, también se mapearon contra secuencias de genes por separado de su respectivo diagnóstico y serotipo. De la misma manera se mapearon contra una secuencia de genotipo distinto de su respectivo serotipo; se indica en las imágenes la particularidad de ese set de sondas, el cual varía con respecto a otro set al ser mapeados contra los diferentes genomas. Se muestran solamente 2 ejemplos de estos resultados, en los cuales se puede apreciar cómo es que se hizo la selección de sondas que son únicamente específicas, desechando aquellas sondas que no son funcionales o específicas.



**Figura 33. Esquema de hibridación de las sondas.**

Se muestra el esquema de hibridación de los 6 sets de sondas contra los 8 tipos distintos de secuencias.

Mapeo de set de sondas DENV-1 DHF con genoma DENV-1 DHF



**Figura 34. Sonda 4635 DENV-1 DHF.**

Se muestra la region específica del genoma completo de DENV-1 DHF donde alinea la sonda perteneciente a DENV-1 DHF.



**Figura 35. Sonda 4635 DENV-1 DHF.**

Al ser alineada con genoma DENV-2 DHF, si existe alineamiento, comprobando inespecificidad de esta sonda en este caso.

Sondas depuradas por serotipo y por tipo de diagnóstico y sondas que no sirven

De las sondas seleccionadas en el mapeo por serotipo y por tipo de diagnóstico, quedaron 114 en total.

Se muestra una lista de sondas que hibridan en su secuencia específica y una de sondas que hibridan con otra secuencia con serotipo, genotipo o diagnóstico distinto aun corrigiendo el mismatch, es decir que no son funcionales para el diagnóstico, por serotipo y tipo de diagnóstico, por lo tanto, estas tablas muestran los resultados concentrados de las imágenes que no se muestran del análisis de mapeo anterior.

**Tabla 4. Lista de sondas depuradas de DENV-1 DHF.**

Este set depurado de sondas tiene más sondas alineadas al gen NS5 funcionales (9) que en otras regiones.

Nombre y fusión de sondas en su caso	Tamaño de sonda nuevo adoptado por sondas fusionadas	Region de alineamiento
1460_DENV-1_DHF_E		E
4635_DENV-1_DHF_E		E
8_DENV-1_DHF_E		E
3121_DENV-1_DHF_NS1		NS1
3455_DENV-1_DHF_NS1 1672_DENV-1_DHF_NS1	25 nc	NS1
363_DENV-1_DHF_NS1 3712_DENV-1_DHF_NS1	18 nc	NS1
4875_DENV-1_DHF_NS1		NS1
883_DENV-1_DHF_NS2A		NS2A



509_DENV-1_DHF_NS2A 4328_DENV-1_DHF_NS2A	25 nc	NS2A
3030_DENV-1_DHF_NS2A		NS2A
3361_DENV-1_DHF_NS2B		NS2B
2284_DENV-1_DHF_NS3 4890_DENV-1_DHF_NS3 3279_DENV-1_DHF_NS3	17 nc	NS3
2062_DENV-1_DHF_NS4B		NS4B
679_DENV-1_DHF_NS5 2363_DENV-1_DHF_NS5 4218_DENV-1_DHF_NS5 1553_DENV-1_DHF_NS5 1012_DENV-1_DHF_NS5	18 nc	NS5

2459_DENV-1_DHF_NS5	21 nc	NS5
294_DENV-1_DHF_NS5		
477_DENV-1_DHF_NS5		NS5
4734_DENV-1_DHF_NS5		NS5

**Tabla 5. Lista de sondas de DENV-1 DHF que alinean en otra secuencia.**

Lista de sondas que alinean en otra secuencia con serotipo, genotipo o diagnóstico distinto aun corrigiendo el mismatch, es decir que no sirven.

Nombre	Region de alineamiento	Con más de un mismatch con respecto a la secuencia original
2802_DENV-1_DHF_NS5	NS5	

**Tabla 6. Lista de sondas depuradas de DENV-1 DF.**

Este set depurado de sondas tiene más sondas alineadas al gen E funcionales (7) que en otras regiones.

Nombre y fusión de sondas en su caso	Tamaño de sonda nuevo adoptado por sondas fusionadas	Region de alineamiento
4247_DENV-1_DF_E		E
4319_DENV-1_DF_E		E
2312_DENV-1_DF_E		E
2094_DENV-1_DF_E		E
717_DENV-1_DF_E		E
2640_DENV-1_DF_E	30 nc	E
4187_DENV-1_DF_E		
245_DENV-1_DF_NS1		NS1
348_DENV-1_DF_NS1		NS1
2715_DENV-1_DF_NS2A		NS2A
3803_DENV-1_DF_NS3		NS3
1226_DENV-1_DF_NS3		NS3
366_DENV-1_DF_NS5		NS5

**Tabla 7. Lista de sondas de DENV-1 DF que alinean en otra secuencia.**

Lista de sondas que alinean en otra secuencia con serotipo, genotipo o diagnóstico distinto aun corrigiendo el mismatch, es decir que no sirven.

Nombre	Region de alineamiento	Con más de un mismatch con respecto a la secuencia original
1572_DENV-1_DF_E_1561	E	
3678_DENV-1_DF_NS1	NS1	
683_DENV-1_DF_NS2A	NS2A	
1862_DENV-1_DF_NS2B	NS2B	
1170_DENV-1_DF_NS3	NS3	
3386_DENV-1_DF_NS3	NS3	

**Tabla 8. Lista de sondas depuradas de DENV-2 DHF.**

Este set depurado de sondas tiene más sondas alineadas al gen NS3 funcionales (9) que en otras regiones.

Nombre y fusión de sondas en su caso	Tamaño de sonda nuevo adoptado por sondas fusionadas	Region de alineamiento
1857_DENV-2_DHF	15 NC	E

39_DENV-2_DHF_E		
3454_DENV-2_DHF_M	13 NC	M
534_DENV-2_DHF_M		
3891_DENV-2_DHF_NS1		NS1
2881_DENV-2_DHF_NS3	15 NC	NS3
2160_DENV-2_DHF_NS3		
1853_DENV-2_DHF_NS3		
4433_DENV-2_DHF_NS3	13 NC	NS3
4002_DENV-2_DHF_NS3		
4630_DENV-2_DHF_NS3		
4431_DENV-2_DHF_NS3		
725_DENV-2_DHF_NS3		NS3
3371_DENV-2_DHF_NS3		NS3
4511_DENV-2_DHF_NS5		NS5
3861_DENV-2_DHF_NS5		NS5
1097_DENV-2_DHF_NS5		NS5
4653_DENV-2_DHF_3'UTR	13 NC	3'UTR
3840_DENV-2_DHF_3'UTR		

**Tabla 9. Lista de sondas de DENV-2 DHF que alinean en otra secuencia.**

Lista de sondas que alinean en otra secuencia con serotipo, genotipo o diagnóstico distinto aun corrigiendo el mismatch, es decir que no sirven.

Nombre	Region de alineamiento	Con más de un mismatch con respecto a la secuencia original
1063_DENV-2_DHF_E	E	
2228_DENV-2_DHF_E	E	
549_DENV-2_DHF_E	E	X
2908_DENV-2_DHF_NS2A	NS2A	X
1360_DENV-2_DHF_NS3	NS3	X
1598_DENV-2_DHF_NS3	NS3	
1558_DENV-2_DHF_NS3	NS3	
3235_DENV-2_DHF_NS3	NS3	X
4097_DENV-2_DHF_NS4B	NS4B	X
4293_DENV-	NS4B	X

2_DHF_NS4B		
1782_DENV-2_DHF_NS4B	NS4B	X
4291_DENV-2_DHF_NS4B	NS4B	X
3592_DENV-2_DHF_3'UTR	3'UTR	X

**Tabla 10. Lista de sondas depuradas de DENV-2 DF.**

Este set depurado de sondas tiene más sondas alineadas al gen NS3 funcionales (4) que en otras regiones.

Nombre y fusión de sondas en su caso	Tamaño de sonda nuevo adoptado por sondas fusio-nadas	Region de alineamiento
12_DENV-2_DF_E		E
24_DENV-2_DF_NS1	16 NC	NS1
3129_DENV-2_DF_NS1		
2983_DENV-2_DF_NS2A		NS2A
2851_DENV-2_DF_NS3		NS3
4317_DENV-2_DF_NS3		NS3

2279_DENV-2_DF_NS3	15 NC	NS3
511_DENV-2_DF_NS3		
2701_DENV-2_DF_NS4A		NS4A
3274_DENV-2_DF_3'UTR	14 NC	3'UTR
3911_DENV-2_DF_3'UTR		

**Tabla 11. Lista de sondas de DENV-2 DF que alinean en otra secuencia.**

Lista de sondas que alinean en otra secuencia con serotipo, genotipo o diagnóstico distinto aun corrigiendo el mismatch, es decir que no sirven.

Nombre	Region de alineamiento	Con más de un mismatch con respecto a la secuencia original
2585_DENV-2_DF_C	C	
2633_DENV-2_DF_E	E	
22_DENV-2_DF_E	E	
2379_DENV-2_DF_E	E	
2105_DENV-2_DF_E	E	
1071_DENV-2_DF_E	E	



910_DENV-2_DF_NS1	NS1	
26_DENV-2_DF_NS2A	NS2A	
3435_DENV-2_DF_NS2A	NS2A	
3015_DENV-2_DF_NS2A	NS2A	
3407_DENV-2_DF_NS3	NS3	
2866_DENV-2_DF_NS3	NS3	
1160_DENV-2_DF_NS4B	NS4B	
2011_DENV-2_DF_NS4B	NS4B	
622_DENV-2_DF_NS5	NS5	
1590_DENV-2_DF_NS5	NS5	
4166_DENV-2_DF_NS5	NS5	
3620_DENV-2_DF_NS5	NS5	

**Tabla 12. Lista de sondas depuradas de DENV-3 DHF.**

Este set depurado de sondas tiene más sondas alineadas al gen NS3 funcionales (9) que en otras regiones.

Nombre y fusión de sondas en su caso	Tamaño de sonda nuevo adoptado por sondas fusionadas	Region de alineamiento
2992_DENV-3_DHF_E		E
56_DENV-3_DHF_M		M
117_DENV-3_DHF_NS1		NS1
4612_DENV-3_DHF_NS1		NS1
2403_DENV-3_DHF_NS1 4607_DENV-3_DHF_NS1	13 NC	NS1
825_DENV-3_DHF_NS2A		NS2A
1718_DENV-3_DHF_NS2A 4494_DENV-3_DHF_NS2A 4084_DENV-3_DHF_NS2A	14 NC	NS2A

1809_DENV-3_DHF_NS2B	10 NC	NS2B
2488_DENV-3_DHF_NS2B		
3959_DENV-3_DHF_NS3		NS3
4162_DENV-3_DHF_NS3	15 NC	NS3
4196_DENV-3_DHF_NS3		
2758_DENV-3_DHF_NS3		
2383_DENV-3_DHF_NS3	16 NC	NS3
454_DENV-3_DHF_NS3		
2877_DENV-3_DHF_NS3	12 NC	NS3
4931_DENV-3_DHF_NS3		
503_DENV-3_DHF_NS3		NS3
1893_DENV-3_DHF_NS4A		NS4A
3935_DENV-3_DHF_NS4A		NS4A

3181_DENV-3_DHF_NS4B		NS4B
1327_DENV-3_DHF_NS5		NS5

**Tabla 13. Lista de sondas de DENV-3 DHF que alinean en otra secuencia.**

Lista de sondas que alinean en otra secuencia con serotipo, genotipo o diagnóstico distinto aun corrigiendo el mismatch, es decir que no sirven.

Nombre	Region de alineamiento	Con más de un mismatch con respecto a la secuencia original
3289_DENV-3_DHF_NS3	NS3	

**Tabla 14. Lista de sondas depuradas de DENV-3 DF.**

Este set depurado de sondas tiene más sondas alineadas al gen NS3 funcionales (5) que en otras regiones.

Nombre y fusión de sondas en su caso	Tamaño de sonda nuevo adoptado por sondas fusionadas	Region de alineamiento
128_DENV-3_DF_E		E
371_DENV-3_DF_NS1	17 NC	NS1

4264_DENV-3_DF_NS1		
1961_DENV-3_DF_NS1	16 NC	NS1
4396_DENV-3_DF_NS1		
282_DENV-3_DF_NS2A	12 NC	NS2A
2525_DENV-3_DF_NS2A		
2520_DENV-3_DF_NS3		NS3
205_DENV-3_DF_NS3		NS3
4149_DENV-3_DF_NS3		NS3
2781_DENV-3_DF_NS3		NS3
2035_DENV-3_DF_NS3		NS3
3037_DENV-3_DF_NS4B		NS4B
2058_DENV-3_DF_NS4B	14 NC	NS4B
2714_DENV-3_DF_NS4B		

**Tabla 15. Lista de sondas de DENV-3 DF que alinean en otra secuencia.**

Lista de sondas que alinean en otra secuencia con serotipo, genotipo o diagnóstico distinto aun corrigiendo el mismatch, es decir que no sirven.

Nombre	Region de alineamiento	Con más de un mismatch con respecto a la secuencia original
4827_DENV-3_DF_M	M	
4889_DENV-3_DF_M	M	
8_DENV-3_DF_NS1	NS1	
410_DENV-3_DF_NS1	NS1	
2984_DENV-3_DF_NS1	NS1	
3245_DENV-3_DF_NS1	NS1	
3791_DENV-3_DF_NS1	NS1	
2269_DENV-3_DF_NS1	NS1	
2310_DENV-3_DF_NS2A	NS2A	
589_DENV-3_DF_NS3	NS3	
3477_DENV-3_DF_NS3	NS3	
769_DENV-3_DF_NS3	NS3	

3285_DENV-3_DF_NS5	NS5	
3080_DENV-3_DF_NS5	NS5	

**B)** Region a amplificar de los genomas de DENV extraídos de las muestras de los pacientes a diagnosticar.

Esta region se eligió por ser la que tiene mayor número de sondas funcionales alineadas de los 6 sets distintos después de la depuración (lo cual garantizara la serotipificación con diagnostico).

***Tabla 16. Genomas de los 3 serotipos y de los 2 diagnósticos (6), mostrando region con más sondas alineadas.***

Se muestra la region de cada genoma en la cual se alinean más sondas funcionales después de la depuración, lo que se puede apreciar es que la region perteneciente al gen NS3 es la que tiene mayor número de sondas funcionales alineadas (31 en total, 4 de estas se encuentran en DENV-1 DHF y DF), por lo cual se seleccionara esta region a amplificar en el RNA viral de las muestras extraídas de los pacientes en los cuales se hará el diagnóstico.

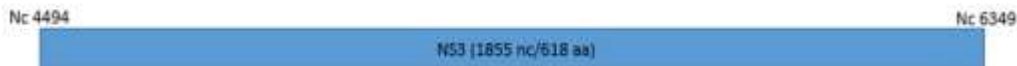
Genoma	región	Número de sondas
DENV-1 DHF	NS5	3
DENV- 1 DF	E	2
DENV-2 DHF	NS3	9

DENV-2 DF	NS3	4
DENV-3 DHF	NS3	9
DENV-3 DF	NS3	5



**Figura 36. Distribución de los sets de sondas en el genoma.**

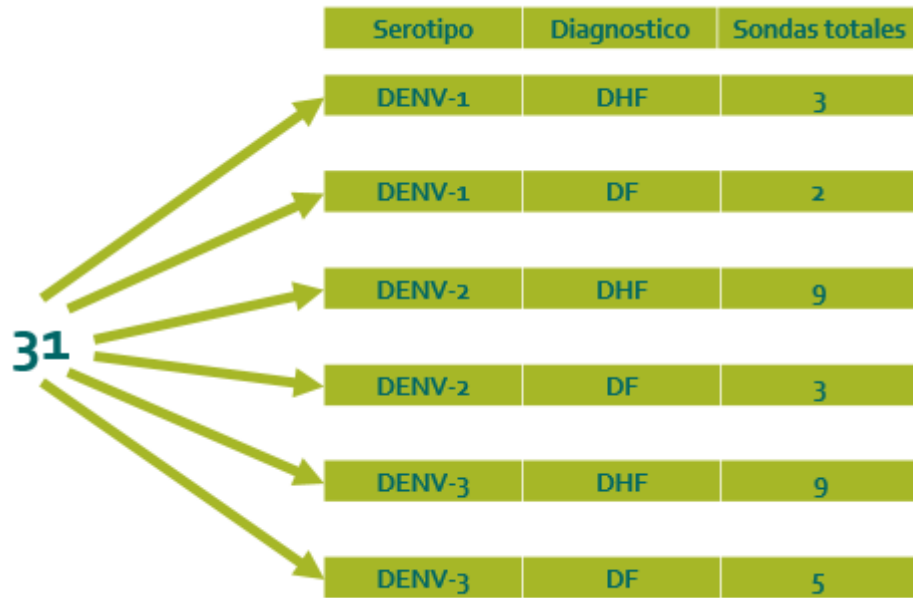
Son tres las regiones candidatas a seleccionarse para amplificarse en las muestras de los pacientes, pero la región perteneciente al gen NS3 tiene más sondas funcionales alineadas, por lo cual esta región es la seleccionada para amplificarse.



**Figura 37. Región seleccionada para amplificarse en las muestras de los pacientes para el diagnóstico (gen NS3).**

La región comprende del nc 4494 al nc 6349 en el genoma de DENV (genoma estándar promedio de los genomas utilizados para el análisis).

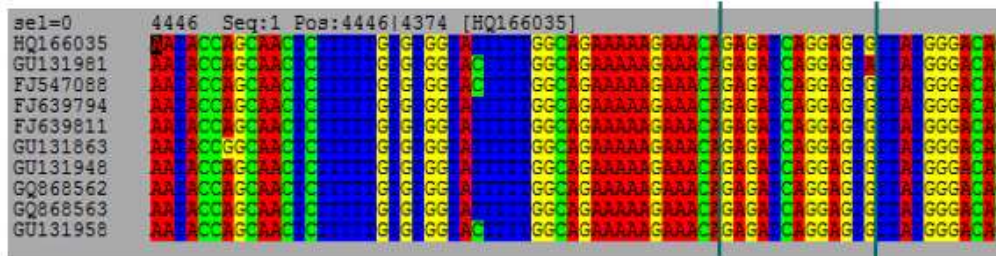




**Figura 38. Distribución de las sondas depuradas seleccionadas.**

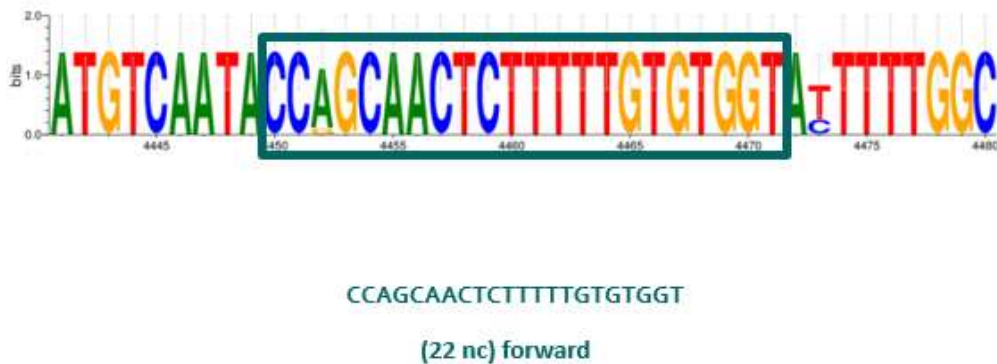
Distribución de las sondas depuradas seleccionadas a lo largo de la region que será amplificada en las muestras de los pacientes, divididas por sets (6).

**C) Diseño de los tres juegos de primers (3 juegos=3 serotipos) para amplificar la region seleccionada en las muestras de los pacientes para realizar el diagnóstico.**



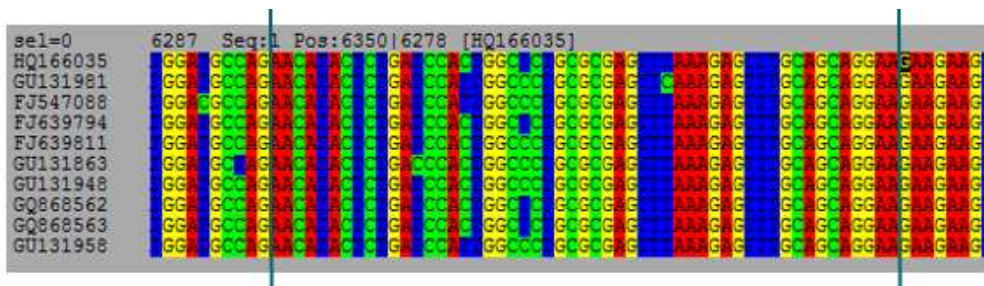
**Figura 39. Alineamiento de 10 secuencias del serotipo 1 region 5' gen NS3 por Seaview.**

Alineamiento de la region 5' del gen NS3 para poder seleccionar la region referencia para el diseño del primer forward; la primera línea de derecha a izquierda representa el nucleótido específico donde empieza el gen NS3, la segunda representa el nucleótido específico donde se une la primer sonda de diagnóstico.



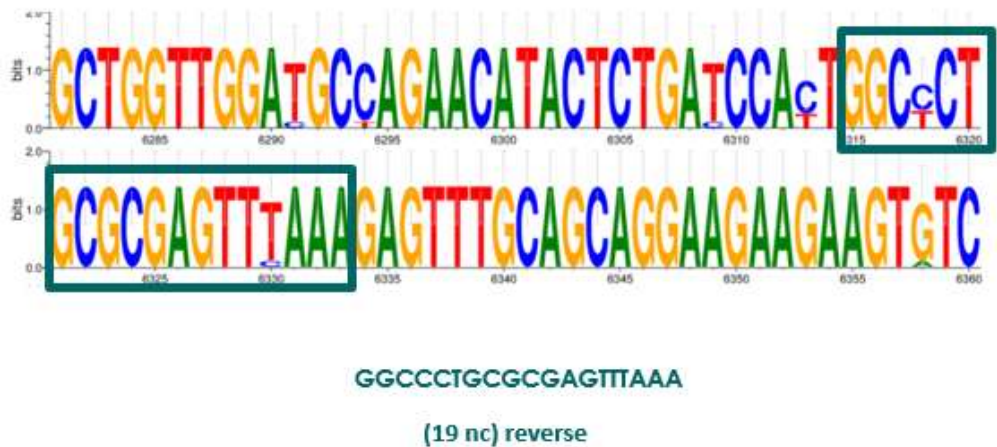
**Figura 40. Análisis WebLogo para diseño de primer forward del serotipo 1.**

Análisis para escoger la region consenso en el alineamiento para la fabricación del primer Forward (5'), la cual además de ser consenso, contiene un buen porcentaje de G=C que se requiere para la función de sebador. De igual manera el análisis muestra la secuencia del primer, nótese que un nucleótido tendrá que ser degenerado para su total funcionamiento (A o G=R).



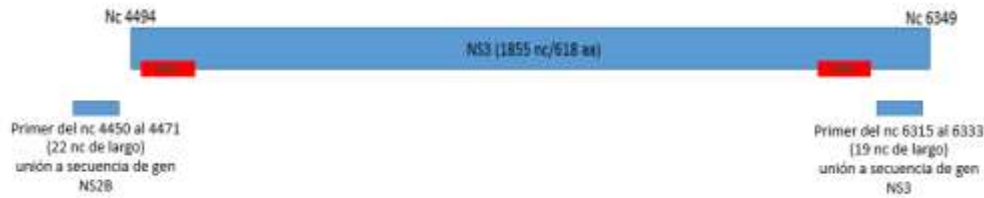
**Figura 41. Alineamiento de 10 secuencias del serotipo 1 region 3' gen NS3 por Seaview.**

Alineamiento de la region 3' del gen NS3 para poder seleccionar la region referencia para el diseño del primer reverse; la primer línea de izquierda a derecha representa el nucleótido específico donde se une la última sonda de diagnóstico, la segunda representa el nucleótido específico donde termina el gen NS3.



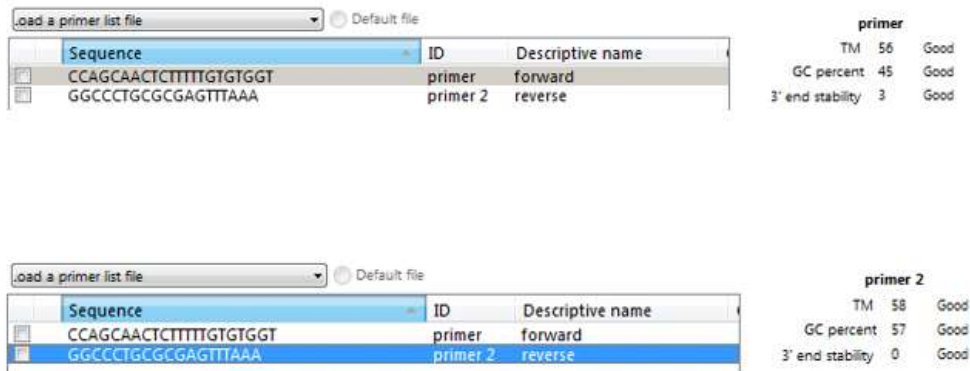
**Figura 42. Análisis WebLogo para diseño de primer reverse del serotipo 1.**

Análisis para escoger la region consenso en el alineamiento para la fabricación del primer Reverse (3'), la cual además de ser consenso, contiene un buen porcentaje de G=C que se requiere para la función de sebador. De igual manera el análisis muestra la secuencia del primer, nótese que dos nucleótidos tendrán que ser degenerados para su total funcionamiento (T o C=Y).



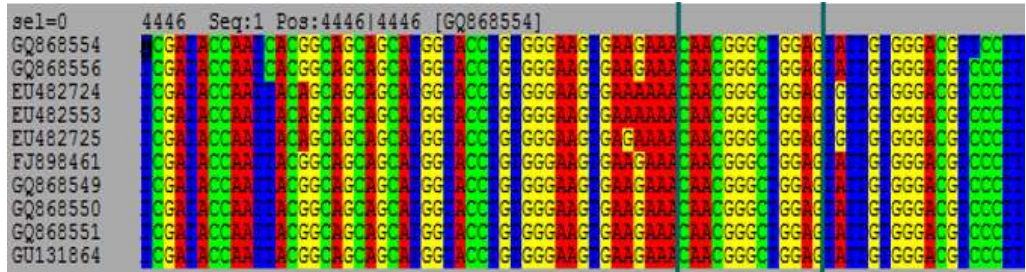
**Figura 43. Localización de Primers del serotipo 1.**

Localización de los Primers (22 nc forward y 19 nc reverse) a utilizar para la amplificación de la region seleccionada en el gen NS3 del DENV para serotipo 1 ambos diagnósticos, es decir region consenso. Nótese que la region donde sebará el primer forward será perteneciente al gen NS2B. También se muestran las sondas (rojo) que hibridaran en los extremos de la region ante el diagnóstico.



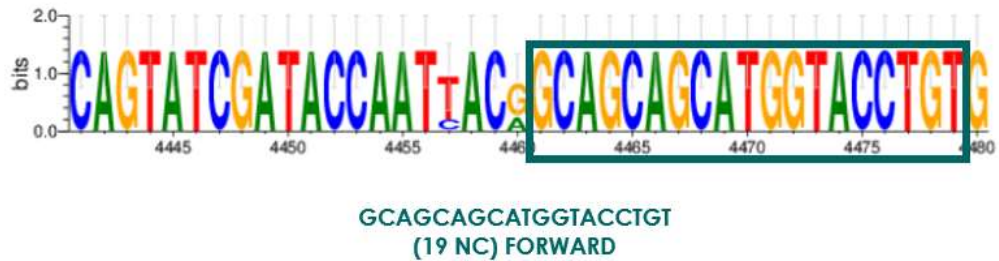
**Figura 44. Análisis AmplifX para comparar las características de los primers del serotipo 1.**

Se muestra el análisis de ambos primers donde se observa que poseen una TM similar y un buen porcentaje de G=C, por lo cual son aptos para la misma amplificación.



**Figura 45. Alineamiento de 10 secuencias del serotipo 2 region 5' gen NS3 por Seaview.**

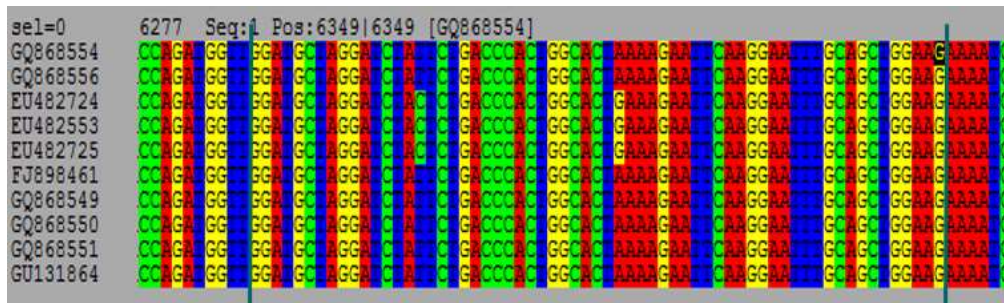
Alineamiento de la region 5' del gen NS3 para poder seleccionar la region referencia para el diseño del primer forward; la primer línea de derecha a izquierda representa el nucleótido específico donde empieza el gen NS3, la segunda representa el nucleótido específico donde se une la primer sonda de diagnóstico.



**Figura 46. Análisis WebLogo para diseño de primer forward del serotipo 1.**

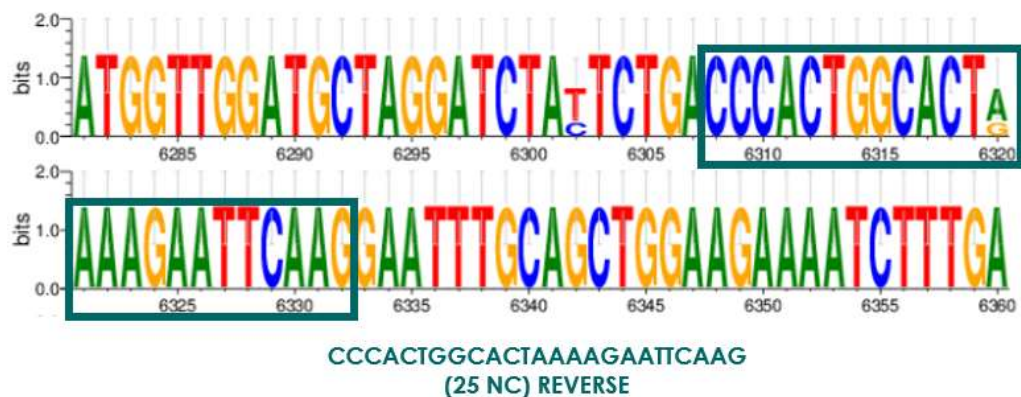
Análisis para escoger la region consenso en el alineamiento para la fabricación del primer Forward (5'), la cual además de ser consenso, contiene un buen porcentaje de G=C que se requiere para la función de sebador. De igual manera el análisis muestra la secuencia del primer.





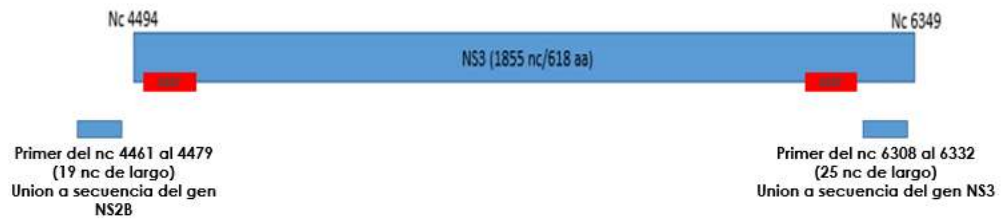
**Figura 47. Alineamiento de 10 secuencias del serotipo 2 region 3' gen NS3 por Seaview.**

Alineamiento de la region 3' del gen NS3 para poder seleccionar la region referencia para el diseño del primer reverse; la primer línea de izquierda a derecha representa el nucleótido específico donde se une la última sonda de diagnóstico, la segunda representa el nucleótido específico donde termina el gen NS3.



**Figura 48. Análisis WebLogo para diseño de primer reverse del serotipo 2.**

Análisis para escoger la region consenso en el alineamiento para la fabricación del primer Reverse (3'), la cual además de ser consenso, contiene un buen porcentaje de G=C que se requiere para la función de sebador. De igual manera el análisis muestra la secuencia del primer, nótese que un nucleótido tendrá que ser degenerado para su total funcionamiento (A o G=R).



**Figura 49. Localización de Primers del serotipo 2.**

Localización de los Primers (19 nc forward y 25 nc reverse) a utilizar para la amplificación de la region seleccionada en el gen NS3 del DENV para serotipo 2 ambos diagnósticos, es decir region consenso. Nótese que la region donde sebará el primer forward será perteneciente al gen NS2B. También se muestran las sondas (rojo) que hibridaran en los extremos de la region ante el diagnóstico.

Sequence	ID	Descriptive name			
GCAGCAGCATGGTACCTGT		forward			
CCCCTGGCACTAAAAGAATCAAG		REVERSE			

forward		
TM	57	Good
GC percent	57	Good
3' end stability	3	Good

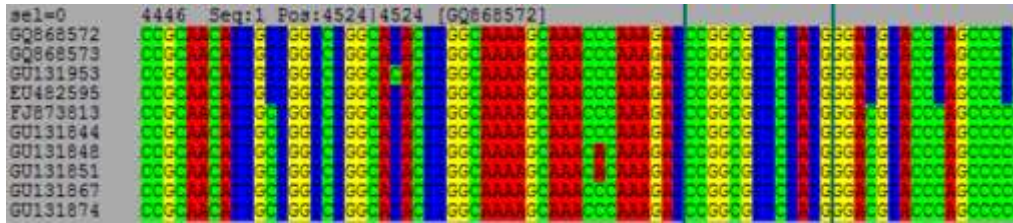
Sequence	ID	Descriptive name			
GCAGCAGCATGGTACCTGT		forward			
CCCCTGGCACTAAAAGAATCAAG		REVERSE			

REVERSE		
TM	56	Good
GC percent	44	Good
3' end stability	2	Good

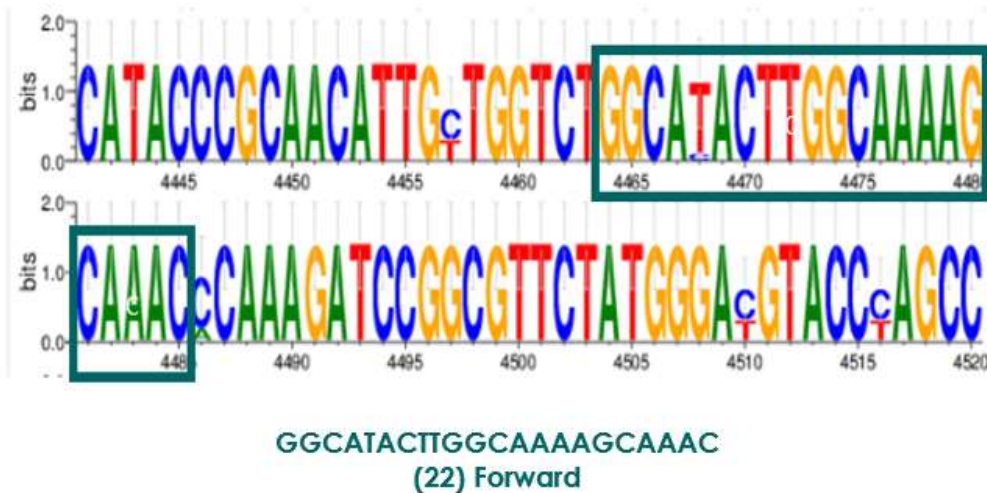
**Figura 50. Análisis AmplifX para comparar las características de los primers del serotipo 2.**

Se muestra el análisis de ambos primers donde se observa que poseen una TM similar y un buen porcentaje de G=C, por lo cual son aptos para la misma amplificación.



**Figura 51. Alineamiento de 10 secuencias del serotipo 3 region 5' gen NS3 por Seaview.**

Alineamiento de la region 5' del gen NS3 para poder seleccionar la region referencia para el diseño del primer forward; la primer línea de derecha a izquierda representa el nucleótido específico donde empieza el gen NS3, la segunda representa el nucleótido específico donde se une la primer sonda de diagnóstico.

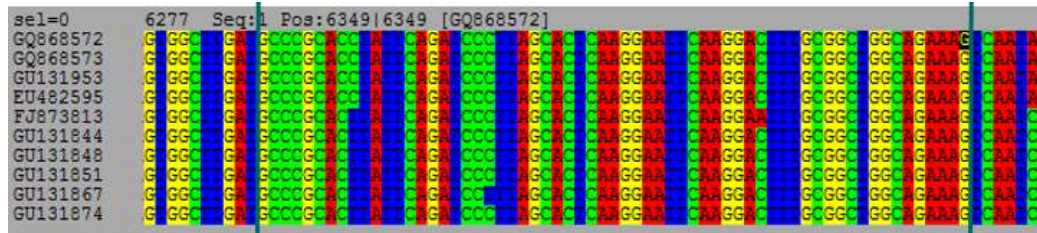


**Figura 52. Análisis WebLogo para diseño de primer forward del serotipo 3.**

Análisis para escoger la region consenso en el alineamiento para la fabricación del primer Forward (5'), la cual además de ser consenso, contiene un buen porcentaje de G=C que se requiere para la función de sebador. De igual manera el análisis muestra la secuencia del primer,

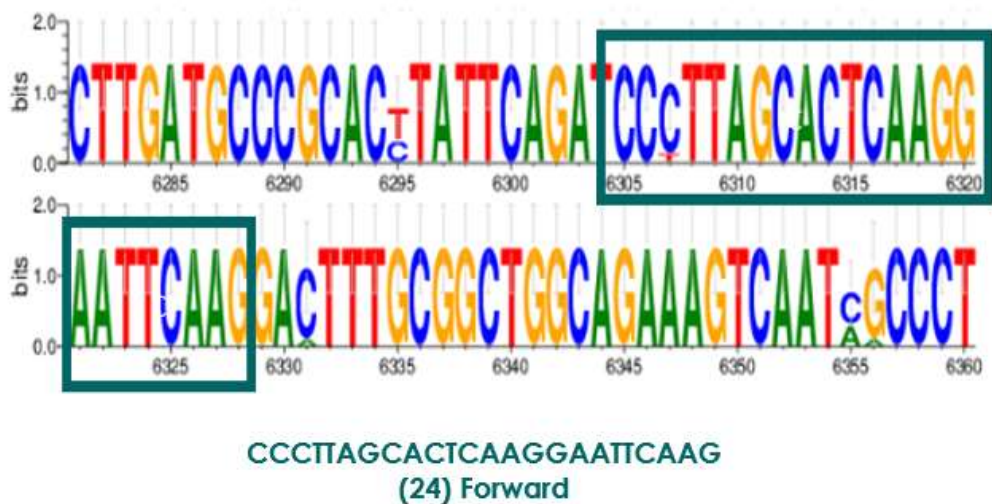


nótese que un nucleótido tendrá que ser degenerado para su total funcionamiento (T o C=Y).



**Figura 53. Alineamiento de 10 secuencias del serotipo 3 region 3' gen NS3 por Seaview.**

Alineamiento de la region 3' del gen NS3 para poder seleccionar la region referencia para el diseño del primer reverse; la primer línea de izquierda a derecha representa el nucleótido específico donde se une la última sonda de diagnóstico, la segunda representa el nucleótido específico donde termina el gen NS3.



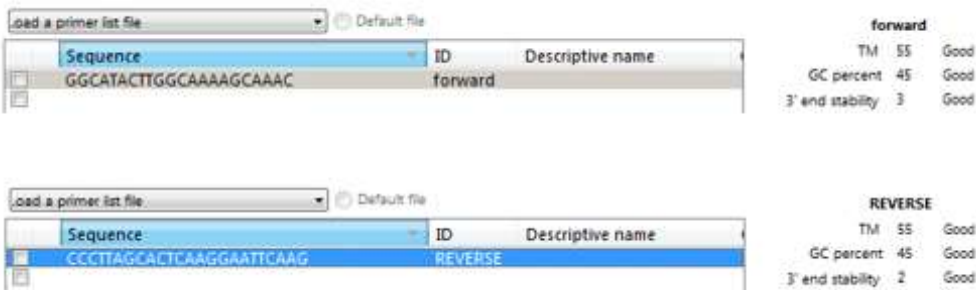
**Figura 54. Análisis WebLogo para diseño de primer reverse del serotipo 3.**

Análisis para escoger la región consenso en el alineamiento para la fabricación del primer Reverse (3'), la cual además de ser consenso, contiene un buen porcentaje de G=C que se requiere para la función de sebador. De igual manera el análisis muestra la secuencia del primer, nótese que dos nucleótidos tendrán que ser degenerados para su total funcionamiento (T o C=Y).



**Figura 55. Localización de Primers del serotipo 2.**

Localización de los Primers (19 nc forward y 25 nc reverse) a utilizar para la amplificación de la región seleccionada en el gen NS3 del DENV para serotipo 2 ambos diagnósticos, es decir región consenso. Nótese que la región donde sebará el primer forward será perteneciente al gen NS2B. También se muestran las sondas (rojo) que hibridaran en los extremos de la región ante el diagnóstico.

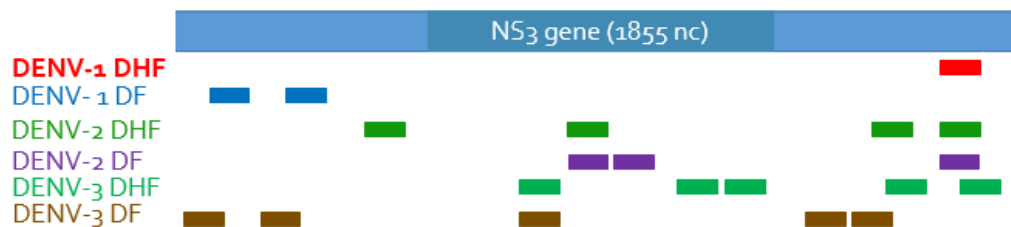


**Figura 56. Análisis AmplifX para comparar las características de los primers del serotipo 3.**

Se muestra el análisis de ambos primers donde se observa que poseen una TM similar y un buen porcentaje de G=C, por lo cual son aptos para la misma amplificación.

D) Además de que algunas de estas 31 sondas depuradas seleccionadas se pueden fusionar a una más grande, disminuyendo el costo de síntesis sin poner en riesgo la especificidad y certeza de la detección en el diagnóstico.

### Distribución de los sets de sondas en el gen NS3



**Figura 57. Muestra la distribución de las 20 sondas seleccionadas en el gen NS3 del genoma viral.**

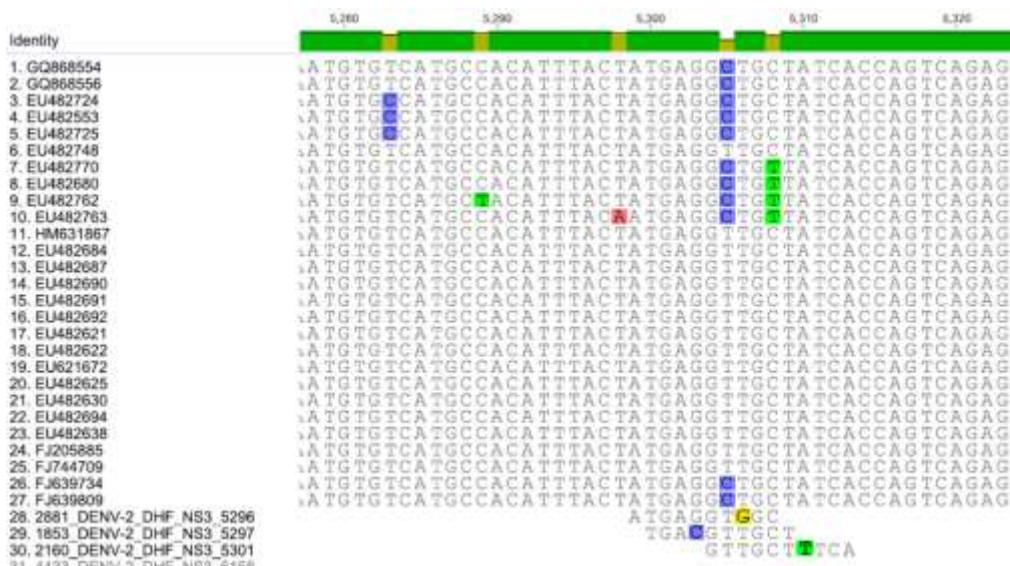
De las 31 sondas 11 se pueden fusionar en una sonda más larga, por lo que en total son 20 las sondas que se utilizarán para el análisis *in silico*.

E) Primer análisis *in silico* para corroborar la especificidad de las 20 sondas depuradas seleccionadas por secuencias del virus del dengue que circula en América obtenidas en el periodo 2000-2009 utilizadas por Mecate para la construcción de las sondas, únicamente se muestran 2 resultados de dicho análisis, los más representativos.



**Figura 58. Alineamiento entre todas las secuencias (9) de DENV-1 DHF contra todas las sondas de DENV-1 DHF (3).**

Las secuencias son diferentes entre sí en un nucleótido en la misma posición, por lo cual se tendrá que degenerar la sonda en esa posición.

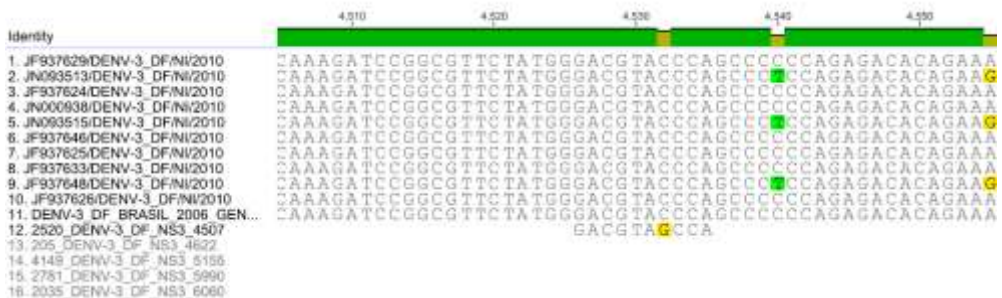


**Figura 59. Alineamiento entre todas las secuencias (27) de DENV-2 DHF contra todas las sondas de DENV-2 DHF (9).**

Las secuencias son diferentes entre sí en dos nucleótidos en la misma posición, por lo cual se tendrán que degenerar las sondas en esa posición.

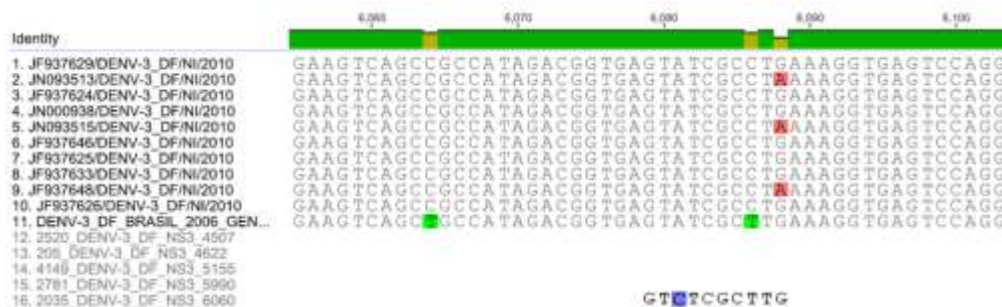
F) Segundo análisis *in silico* de las sondas depuradas seleccionadas de

DENV-3 DF para corroborar que los marcadores de severidad se mantienen funcionales a través del tiempo por secuencias del virus del dengue que circula en América encontradas en la base de datos más recientes (2010/ViPR page); es decir para observar el comportamiento y evolución de la secuencia del Dengue a través del tiempo. Cabe mencionar que no se hizo el análisis para los otros 5 sets de sondas ya que no se encontraron en la base de datos secuencias más allá del 2009 para dichos sets, únicamente se muestran 2 resultados de dicho análisis, los más representativos.



**Figura 60. Alineamiento entre secuencias de DENV-3 DF del 2010 (10) contra todas las sondas del DENV-3 DF (5).**

Las secuencias no tienen diferencia entre sí en ningún nucleótido, en comparación con el análisis de mapeo de la misma sonda contra las secuencias del periodo 2000-2009, donde sí se presentan dos nucleótidos diferentes; por lo cual no es necesario degenerar a la sonda en ninguna posición mostrando que los marcadores de severidad se mantienen funcionales.



**Figura 61. Alineamiento entre secuencias de DENV-3 DF del 2010 (10) contra todas las sondas del DENV-3 DF (5).**

Las secuencias tienen dos nucleótidos diferentes entre sí en el mismo nucleótido, además, en comparación con el análisis de mapeo de la misma sonda contra las secuencias del periodo 2000-2009, donde se presenta un nucleótido diferente entre las secuencias, dicha diferencia en este análisis ya no se presenta; por lo tanto es necesario agregar estas dos degeneraciones a la sonda, aun así, los marcadores de severidad se mantienen funcionales.

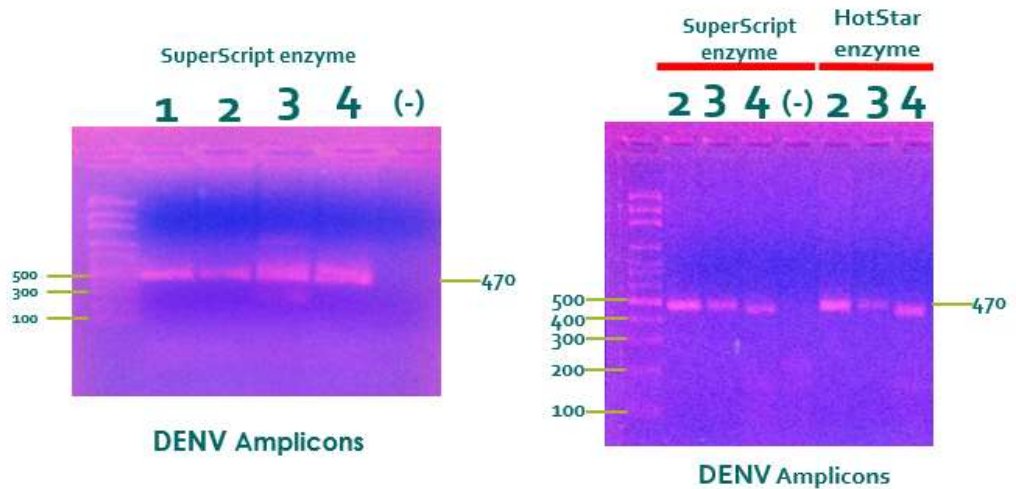
**G)** Obtención de las sondas listas para síntesis. Después del análisis de diagnóstico *in silico* se obtienen las degeneraciones necesarias en los nucleótidos de las sondas para asegurar que serán funcionales en la hibridación con secuencias de Dengue que circula en América recientemente, es decir, la secuencia específica es la que se obtiene. La secuencia es información clasificada y es por ello que no se muestra.



2

Amplificación, concentración y desecación del DNA de los amplicones de DENV de los 4 serotipos, establecimiento de las condiciones óptimas de inmovilización de la neutravidina, adición de la biotina al amplicon del DENV para su captura por la neutravidina e hibridación de las sondas por la técnica de SPR para validar su especificidad.

Amplificación del DENV de los cuatro serotipos (extraído de las muestras de pacientes mediante PREPITO®), para obtener una generosa cantidad de amplicon para los ensayos de estandarización del SPR.



**Figura 62. Amplificación del fragmento DV1-DV3 del DENV de los 4 serotipos utilizando dos enzimas diferentes.**

La amplificación se hizo con dos enzimas diferentes para utilizar aquella que haya dado más rendimiento para conseguir la cantidad de amplicon necesaria para la estandarización de las condiciones en los experimentos del SPR. Se puede observar que el amplicon perteneciente al serotipo 4, se encuentra por debajo de los 470 pares de bases que es lo que pesa el fragmento DV1-DV3.

Volume					
179 uL					
171 uL					
179 uL					
271 uL					

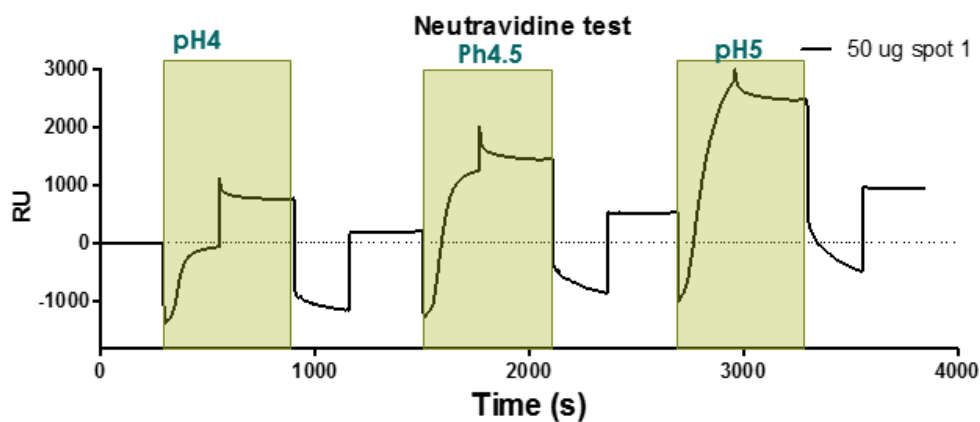
#	Sample ID	User name	Date and T	Nucleic Acid Conc.	Unit
1	Blank	Nanodrop	18/12/2014		
2	DENV-1	Nanodrop	18/12/2014	121.7	ng/μl
3	DENV-2	Nanodrop	18/12/2014	69.19	ng/μl
4	DENV-3	Nanodrop	18/12/2014	44.41	ng/μl
5	DENV-4	Nanodrop	18/12/2014	36.04	ng/μl

Concentración final	
21784.3 ng	
11831.9 ng	
7950.1 ng	
9769 ng	

**Tabla 17. Concentración, medición por Nanodrop y precipitación de los amplicones del DENV.**

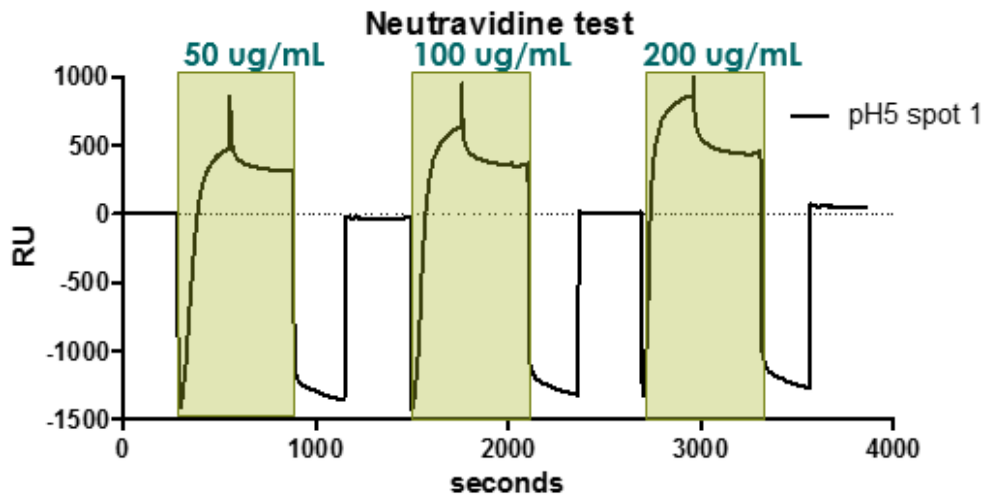
Se concentraron los amplicones mediante la técnica de Clean up, posteriormente se les midió la concentración por Nanodrop y se les precipito por acetato de sodio para su envío a Cranfield Inglaterra, ya que ahí fue donde se estandarizo la técnica del SPR. Los valores finales de concentración del amplicon disecado se muestran en la tercera tabla.





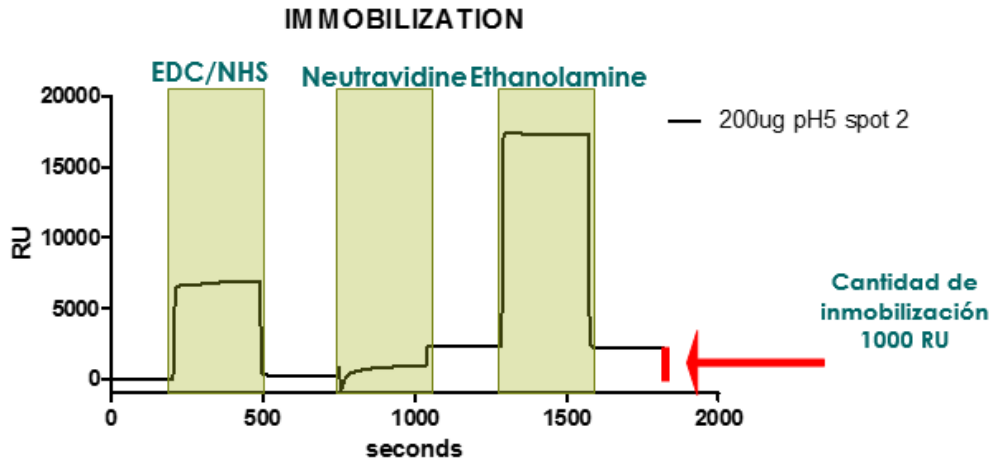
**Figura 63. Optimización en las condiciones de inmovilización mediante exploración en el pH en la neutravidina.**

Se utilizaron pH's de 4, 4.5 y 5 a una concentraciones de neutravidina de 50 ug/mL como punto de partida. Se puede observar que la mejor respuesta en el sensograma fue a un pH de 5.



**Figura 64. Optimización en las condiciones de inmovilización mediante exploración de la concentración de neutravidina.**

Se utilizaron concentraciones de 50, 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$  a un pH de 5 ya que es el que mejor funcionó en la exploración del pH previamente. Se puede observar que la mejor respuesta en el sensograma fue a 200  $\mu\text{g/mL}$  de concentración. Por lo cual esta condición es la que se utilizó ante una inmovilización ya estandarizada.

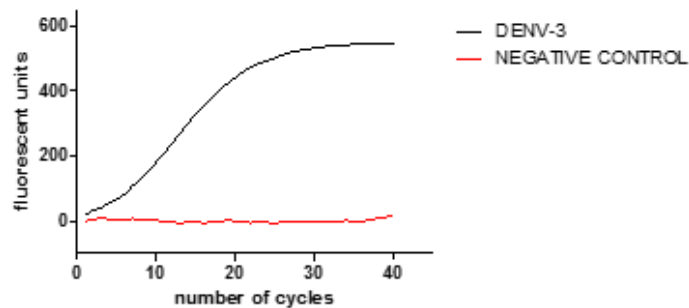


**Figura 65. Condiciones finales ya establecidas de inmovilización de la neutravidina.**

Se utilizó la mejor concentración (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y el mejor pH (5) ya que fueron los que mejor funcionaron en los resultados previamente mostrados. Se puede observar el bulk que genera el EDC/NHS (para realizar la química básica de formación de enlace amidico), seguido de la inmovilización máxima (1000 UR) que determina la literatura para esta biomolécula al ser inmovilizada en MUDA y por último el bloqueo con etanolamina de los sitios activos sobre el MUDA.

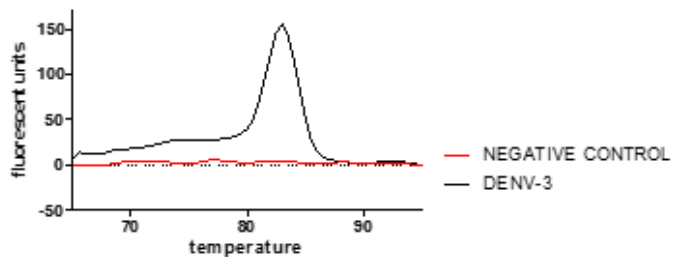
## PCR en tiempo real de DENV-3 con biotina

AMPLIFICATION GRAPH FOR DENV-3 DNA



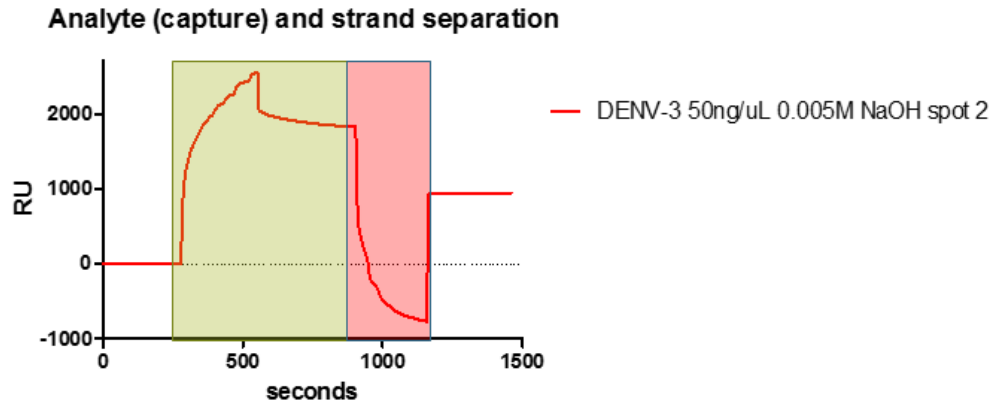
## Solo los productos esperados amplificaron

MELTING CURVE ANALYSIS FOR DENV-3



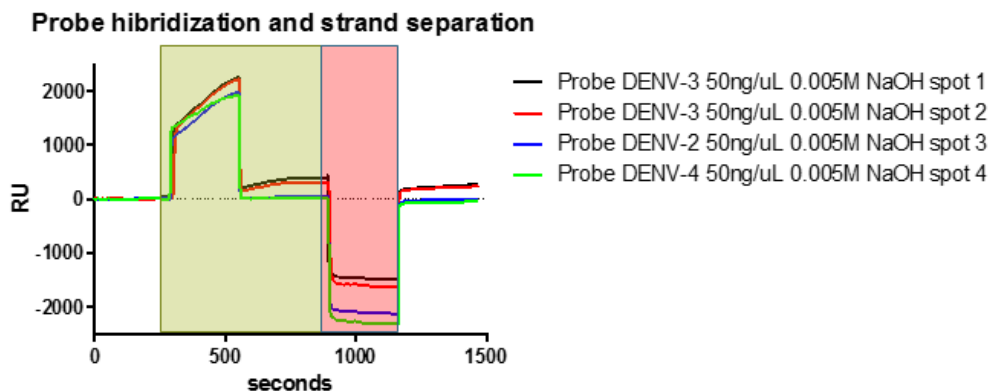
***Figura 66. Amplificación del serotipo 3 del DENV (resuspensión del amplicon previamente precipitado) con primers DV1-DV3 que añaden la biotina al 5' para fijar el amplicon a la capa de neutravidina en el Biosensor.***

Aquí se muestra la amplificación del serotipo 3 mediante PCR tiempo real para añadirle la biotina al 5', ya que será necesaria para fijar el DNA a la neutravidina, en la gráfica de abajo se muestra que únicamente el producto esperado fue el amplificado.



**Figura 67. Captura del amplicon del DENV-3 con biotina por la neutravidina y establecimiento de condiciones para la apertura de la cadena con hidróxido de sodio.**

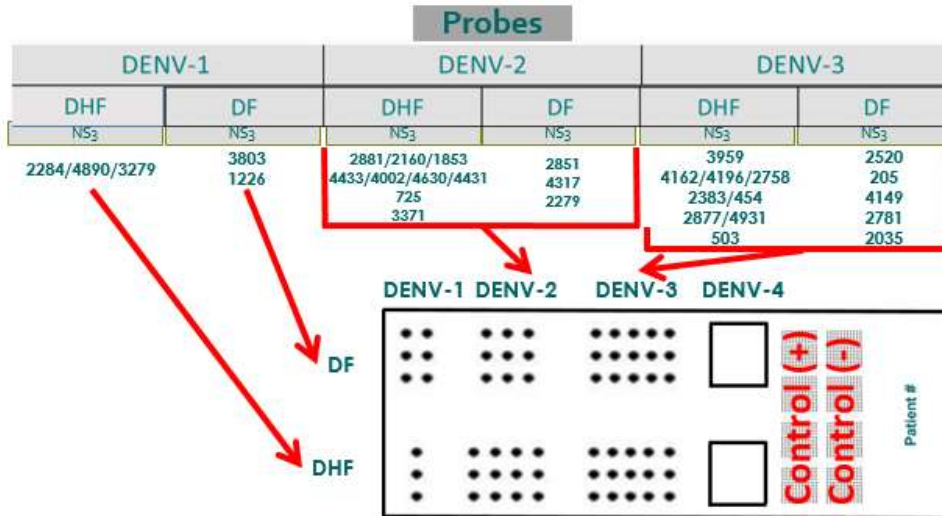
Se obtiene la mejor concentración de DNA en la inyección (50 ng/ $\mu$ L), permitiendo una buena respuesta en el sensorgrama (sugerida por la literatura) y lo mismo para el buffer de apertura de cadena, la concentración seleccionada es la que mejor presento la función de apertura ante la exploración de la concentración del buffer, la concentración adecuada fue (0.005M NaOH) ya que permite una apertura óptima del amplicón, sin removerlo de la neutravidina.



**Figura 68. Establecimiento de las condiciones de hibridación de las sondas y apertura de la cadena mediante hidróxido de sodio.**

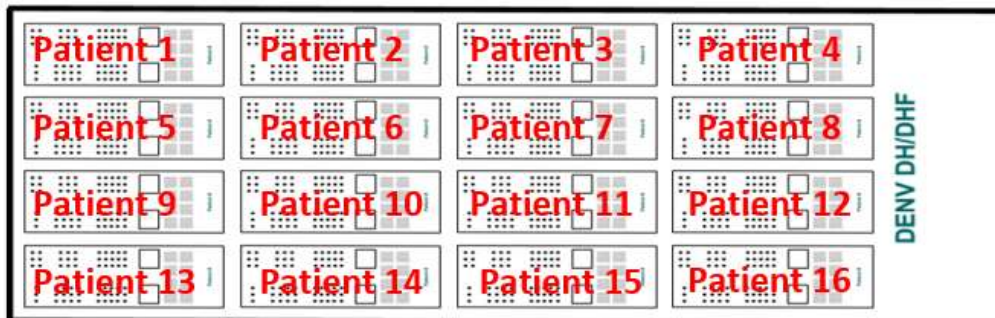
La hibridación de las sondas fue realizada bajo las condiciones preestablecidas en la literatura de concentración de inyección, así como la mejor concentración de acción del buffer de apertura de cadena (0.005M NaOH).

Diseño del Microarreglo de diagnóstico (Posición de las sondas en localizaciones conocidas)



**Figura 69. Representación esquemática del diseño del Microarreglo de diagnóstico.**

La colocación de las sondas está basado en un acomodo idéntico a la tabla para un fácil entendimiento y manejo de los datos, así como el implemento al diseño de los controles positivos y negativos, los cuales permitirán optimizar el perfecto funcionamiento del Microarreglo.



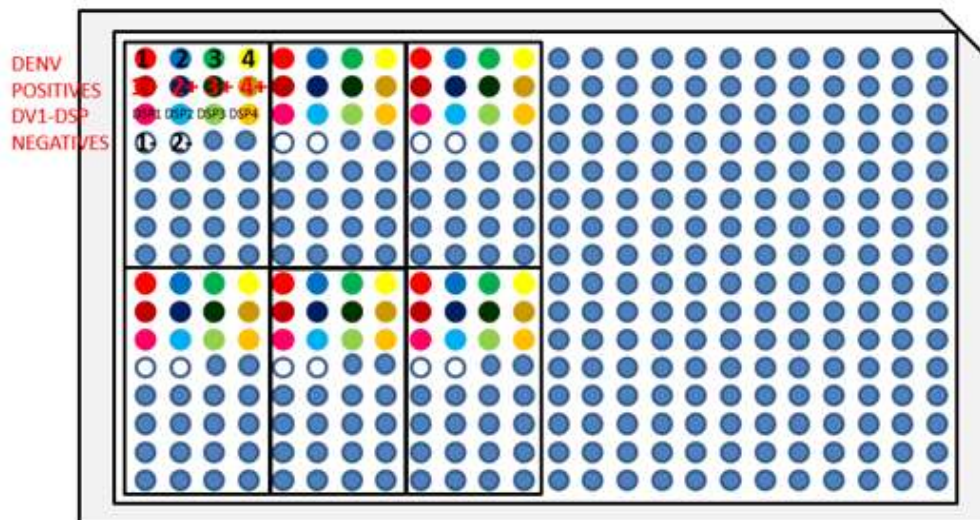
**Figura 70. Representación esquemática del diseño del Microarreglo de diagnóstico para más pacientes.**

Este diseño nos permite diagnosticar a más pacientes en la misma laminilla permitiéndonos ahorrar en costos en cuanto a la fabricación del chip de diagnóstico.

4

Establecer las condiciones de inmovilización de los amplicones del Dengue e hibridación de las sondas marcadas con fluoróforo en el Microarreglo

Al realizar el acomodo de los amplicones del Dengue de los 4 serotipos extraídos de las muestras de los pacientes, los 4 controles positivos y los 2 controles negativos, todos con el buffer de espoteo (1.6 mol/ml CHAPS, 1% CAPS, buffer 50 % DMSO pH 6.5), el diseño sobre la placa de 384 pozos fue el siguiente.

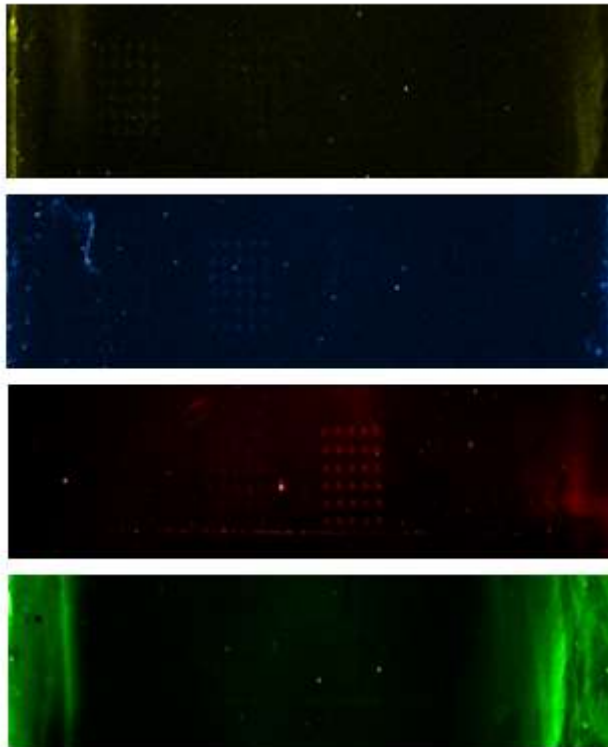


**Figura 71. Diseño de acomodo de la solución de impresión en la placa de 384 pozos.**

El robot imprime de cada pozo de la placa por quintuplicado, es decir que el pin solido dispensa cinco veces de cada pozo, generando cinco spots en dirección horizontal o en la misma fila dentro del pach; y cada en cada spot se dispensa 0.2  $\mu$ L de volumen por cuadruplicado, es decir, cada pin solido dispensa 0.8  $\mu$ L de volumen en cada spot, por lo cual el pin solido dispensa por cuadruplicado cinco copias en total; cada



pozo pierde 4  $\mu\text{L}$  de volumen (sobrando 2  $\mu\text{L}$ ); la impresión se da a una humedad relativa de 55% a temperatura ambiente. NOTE: Due to the robot GENETAG G3 needs to change position on the plate when taking with solid pins the solutions mixes to create each row pach (considering quintuplicate), is that they had to create identical sets in plate (ie repetitions of the Microarray design on the same plate, all with the same solutions mixes and volume), meaning that the time of printing, each row of each pach chip comes from each set of wells from the plate; in this case, being 6 sets, is that they are 6 rows in all pach on the Microarray and considering that each row is the result of 5 spots, we can count on each pach 30 spots



***Figura 72. Hibridación de las sondas marcadas con el fluoróforo contra los amplicones del Dengue impresos en el Microarreglo.***

El primer filtro muestra la especificidad del Dengue 1 (pach color amarillo), el segundo filtro muestra la especificidad del Dengue 2 (pach color azul), el tercer filtro muestra especificidad por el Dengue 3 (pach color rojo) y el cuarto filtro (color verde) sin mostrar pach.

## Discusión

El Dengue es una enfermedad infecciosa aguda metantropoñótica (el hombre como virtual huésped único sintomático) de etiología arboviral (siendo el mosquito el vector transmisor del virus) [1, 17]. El riesgo global de Dengue es muy alto ya que un estimado de 50 a 100 millones de infecciones anualmente con medio millón de casos hemorrágicos y 25,000 muertes se presenta en más de 100 países, siendo esta el área de distribución del vector (distribución cosmotropical), donde el costo total anual de los tratamientos asciende a más de dos mil millones de dólares (basado en cifras de cinco países Americanos y tres Asiáticos), presentando un potencial esparcimiento holoendémico geográfico a futuro, ya que en los últimos 50 años, la incidencia de Dengue ha aumentado 30 veces llegando a ser hiperendémico, debido a la sínantropicidad del vector (preferencia por zonas urbanas y rurales), donde la población mundial en riesgo es de más del 40% [30], por tanto es el arbovirus de mayor propagación mundial. Dicha mortandad es atribuida a un conjunto de factores, tales como la genética y respuesta del hospedero, las características transmisoras del vector y las características genéticas del virus, ya que se han encontrado regiones nucleotídicas a las que se les atribuye una infección severa.

Debido a dichas regiones de virulencia en el genoma del virus del Dengue, y la interacción de 3 factores como lo son virus-vector-hospedero, los cuales plantean el escenario que dará como resultado que se produzca una infección con determinado grado de virulencia producida por dengue virus (DENV). A pesar del reducido número de estudios que se han generado a nivel mundial sobre factores virales asociados a la enfermedad, se han determinado que regiones en el genoma del DENV están asociadas a la alteración de los síntomas en modelos de ratón y primates no-humanos, que por consiguiente podrían estar relacionados también en el humano. Aunado a esto y con los estudios de los brotes

epidemiológicos se han determinado en genomas completos la existencia de genotipos a los cuales se le asocia con un incremento del número de casos con diagnóstico grave, lo cual sugiere que el virus posee propiedades genéticas y proteínas específicas que afectan drásticamente el resultado de una infección por DENV, pudiendo conferirle a este una mayor virulencia. Este conocimiento además de tener gran importancia en el entendimiento de la patogénesis de DHF, concibe un camino para la consecuente aplicación en el diseño de herramientas de diagnóstico. Por lo tanto la fabricación de un Biosensor de DNA además de conferirnos la ventaja de la detección del DENV en un gran número de muestras de pacientes y mosquitos en un corto periodo de tiempo y con una alta sensibilidad, reproducibilidad y especificidad por un determinado serotipo, también nos permitirá detectar infecciones simultáneas por dos o más serotipos.

El diseño de dicho Biosensor de DNA, se llevó a cabo en el presente proyecto, el cual tuvo como objetivo funcionar como posible marcador de la severidad del Dengue sea clásico o grave, mediante el cumplimiento de los pasos necesarios para desarrollar un Biosensor.

En los resultados que competen al objetivo uno, en la sección de “segundo análisis *in silico* de las sondas seleccionadas de DENV-3 DF mapeadas con secuencias del virus del Dengue que circulan en América, encontradas en la base de datos y que son las más recientes (2010/ViPR page)”, la finalidad del análisis que se realizó fue corroborar que los marcadores de severidad se mantuvieran funcionales a través del tiempo, es decir para observar el comportamiento y evolución de la secuencia del Dengue a través del tiempo; donde cabe aclarar que no se hizo el análisis para los otros 5 sets de sondas (DENV-1 DF, DENV-1 DHF, DENV-2 DF, DENV-2 DHF y DENV-3 DHF) ya que no se encontraron en la base de datos secuencias más allá del 2009 para dichos sets con secuencias que fueran más recientes y que además estén bien

etiquetadas no solo por serotipo, sino que también por tipo de diagnóstico, ya que las secuencias disponibles en la base de datos, hablan únicamente del serotipo y no del diagnóstico (excepto DENV-3 DF, del cual si se hizo este análisis). Estas secuencias están disponibles solo hasta el año 2012. Partiendo de esta información, al comparar las imágenes del primer diagnóstico *in silico* de las sondas del DENV-3 DF, contra las imágenes del segundo análisis *in silico* de las sondas del DENV-3 DF, nos permitió analizar que en cuatro de esas sondas no existe diferencia de aumento o disminución del número de degeneraciones por parte de sus nucleótidos, lo cual indica que los marcadores se mantienen funcionales a través del tiempo ya que las secuencias en esos sitios específicos del genoma del virus no se observaron cambio. Esto también podría deberse a que no ha transcurrido el tiempo suficiente para que el virus cambie (un año de diferencia entre las secuencias del primer análisis =2000-2009 y las del segundo análisis = 2010) Para dar una conclusión definitiva sobre si los marcadores puedan ser funcionales en un periodo de 10 años será de suma importancia seguir monitoreando nuevos aislados., Además en una de las sondas para DENV-2 DF al comparar entre los dos diagnósticos *in silico* podemos observar dos nuevos nucleótidos por lo que la sonda se tuvo que degenerar para poder mantener su funcionalidad. Tenemos que considerar que en el caso específico del DENV, el cambio de alguno de los nucleótidos a través del tiempo, y ese mismo nucleótido puede regresar a ser el mismo. En este caso el análisis de seguimiento del marcador de severidad a través del tiempo será posible si mantenemos un seguimiento constante durante los periodos de las epidemias.

En cuanto a los resultados que competen al objetivo dos, cabe aclarar que debido a que las sondas depuradas y listas para su síntesis obtenidas en el objetivo uno aún no han sido sintetizadas, la optimización de las condiciones de funcionamiento de la técnica de SPR fueron hechas

con sondas que ya se tenían establecidas en el laboratorio para la serotipificación, dichas sondas son funcionales en una región seleccionada del gen NS3 que pertenece al interdominio entre la helicasa y la proteasa de la proteína, para lo cual de igual manera se utilizaron los primers que amplifican dicha región a utilizar para hibridar las sondas (forward=DV1-DV3=reverse) Las sondas además tienen unido a ellas un fluoróforo que para este caso su uso no fue necesario, ya que la técnica de SPR no requiere de una marca. En este caso a los amplicones se les unió la biotina mediante una reamplificación con primers que añaden la biotina (forward=biotin-DV1-DV3=reverse), esto con el fin de que fueran los amplicones los que se inmovilizaran en el chip, y posteriormente fueron las sondas las que se hibridaron contra los amplicones fijados en el chip; este diseño fue contrario a lo que se pretende fabricar como diseño del chip con las sondas de diagnóstico de severidad (DF-DHF) obtenidas en el objetivo uno, ya que en ese caso serían las sondas las que tendrían la biotina añadida y las que serían fijadas al chip (neutravidina), para ser posteriormente hibridados con los amplicones obtenidos de la amplificación con el uso de los primers que permiten la elongación del gen NS3 completo, para así determinar si las sondas de severidad son funcionales o no in vivo. Para esta técnica se optimizó la unión del amplicon al sustrato y la hibridación de la sonda con el sustrato por lo tanto estas condiciones ya optimizadas se usaran con las sondas específicas para el diagnóstico de dengue clásico y dengue grave. Por otra parte, analizando los resultados, observamos que se presentaron resultados del amplicon para DENV-3 con sus respectivas sondas. Para DENV-2 se observaron los resultados con sus respectivas sondas aunque no se demostró la inespecificidad de las sondas por otros serotipos

En cuanto a los resultados que competen al objetivo 3, en el diseño del Microarreglo de diagnóstico para su comercialización, en la zona del

chip donde irán las sondas para el serotipo 4 (cuarta metafila) simplemente se dejó el espacio en blanco, ya que no se tienen por el momento sondas para diagnosticar dengue clásico y grave. En el momento que se implemente el diseño de dichas sondas, se podrán espotear por el cabezal de la maquina en esas sondas en el Microarreglo. En cuanto a los controles positivos, se hará la detección con los primers ya establecidos en el laboratorio de serotipificación (DSP1, DSP2, DSP3 y DSP4), aunque no será posible por el momento tener un control positivo de tipo de diagnóstico, con los controles de serotipificación, podremos tener un buen diagnóstico al momento de probar el chip en el sector salud; en cuanto a los controles negativos, estos serán sondas o primers que puedan reconocer a algún otro flavivirus, como por ejemplo al virus de la fiebre amarilla.

En lo que respecta al cuarto objetivo, la misma situación de los resultados del objetivo 2 se presenta aquí, debido a que las sondas de diagnóstico de severidad (DF-DHF) obtenidas en el primer resultado no se tienen listas aun, la optimización de las condiciones de inmovilización e hibridación de amplicones y sondas en el Microarreglo, se hizo con las sondas de serotipificación que se tenían previamente establecidas en el laboratorio, dichas sondas recordemos que son funcionales en una región seleccionada del gen NS3 que pertenece al interdominio entre la helicasa y la proteasa de la proteína, para lo cual de igual manera se utilizaron los primers que amplifican dicha región a utilizar para hibridar las sondas (forward=DV1-DV3=reverse), las sondas como ya se mencionó antes, tienen unido a ellas un fluoróforo que para este caso es muy importante su participación, ya que son mediante este marcador se realizara la detección; en este caso, los amplicones fueron a los que se les inmovilizo en el chip, y posteriormente fueron las sondas las que se hibridaron contra los amplicones fijados en el chip; este diseño fue contrario a lo que se pretende fabricar como diseño del Microarreglo con

las sondas de diagnóstico de severidad (DF-DHF) obtenidas en el objetivo uno, ya que en ese caso serían las sondas las que serían fijadas al chip, para ser posteriormente hibridados los amplicones obtenidos de la amplificación con el uso de los primers que permiten la elongación del gen NS3 completo, para así determinar si las sondas de severidad son funcionales o no; partiendo de esta información se aclara que por ser la optimización de las condiciones para la construcción del Microarreglo, se optimizó la unión del amplicon al sustrato y la hibridación de la sonda con este. Para las sondas de diagnóstico de severidad (DF-DHF), se seguirá la técnica ya estandarizada con estas condiciones.



## Conclusión

1 Las 163 sondas seleccionadas por Mecate en el trabajo previo al presente proyecto, fueron depuradas mediante análisis de mapeo en Geneious® obteniéndose un total de 114 sondas totalmente específicas y funcionales.

2 Fue seleccionada eficazmente la región a amplificar en las muestras de los pacientes para poder hacer el diagnóstico, obteniéndose la región con más sondas funcionales de diagnóstico de los seis tipos de secuencias (DENV-1 DF-DHF, DENV-2 DF-DHF y DENV-3 DF-DHF).

4 Se seleccionaron las sondas depuradas específicas que hibridaban dentro de esta región seleccionada a amplificar en las muestras de los pacientes, obteniéndose un total de 31 sondas.

5 Se fusionaron en una sonda más larga las sondas depuradas específicas seleccionadas que se traslapaban con una o más sondas en la misma región al momento de hacer el diagnóstico, respetando el serotipo y tipo de diagnóstico al que pertenecieran dichas sondas traslapadas, quedando un gran total de 20 sondas específicas y funcionales, sin comprometer la calidad del diagnóstico y permitiendo reducir los costos de síntesis.

6 Los tres juegos de primers (serotipo 1, 2 y 3) que amplifican dicha región seleccionada en las muestras de los pacientes se diseñaron con un buen contenido de G=C y una TM que permite su uso en el forward y el reverse en el mismo ciclo de PCR, así como con una buena región consenso que permite se utilicen el mínimo de nucleótidos degenerados (1 o 2), para permitir una alta especificidad.

7 Se realizó el análisis de diagnóstico *in silico* de las sondas seleccionadas específicas mediante mapeo contra secuencias Americanas del

virus del Dengue que circuló en el periodo 2000-2009, permitiendo saber que nucleótidos de las sondas debían ser fabricados con nucleótidos degenerados para permitir una hibridación de la sonda en el diagnóstico al presentarse secuencias de diferente ventana temporal o diferente región del continente Americano sin comprometer la capacidad de dicho diagnóstico.

8 Se realizó un análisis de diagnóstico *in silico* a las sondas de DENV-3 DF, contra secuencias Americanas que circulan recientemente (2010), para determinar si los marcadores de severidad (sondas) son funcionales a través del tiempo debido a la alta mutabilidad del virus del Dengue.

9 Se optimizaron las condiciones de inmovilización de la neutravidina al sensor de oro mediante la técnica de SPR

10 Se optimizaron las condiciones de captura del amplicon del Dengue con biotina a la neutravidina mediante la técnica de SPR, así como la apertura de su cadena sin que se desprendiera la neutravidina

11 Se optimizaron las condiciones de hibridación de las sondas a los amplicones capturados en el chip

12 Se logró el diseño final del prototipo del Microarreglo, contemplando los cuatro serotipos y controles positivos y negativos, así como su capacidad para 16 pacientes al momento del diagnóstico

13 Se optimizaron las condiciones de fijación de los amplicones del Dengue al Microarreglo

14 Se optimizaron las condiciones de hibridación de las ondas marcadas con fluoróforo en el Microarreglo

## Perspectivas

### Directas

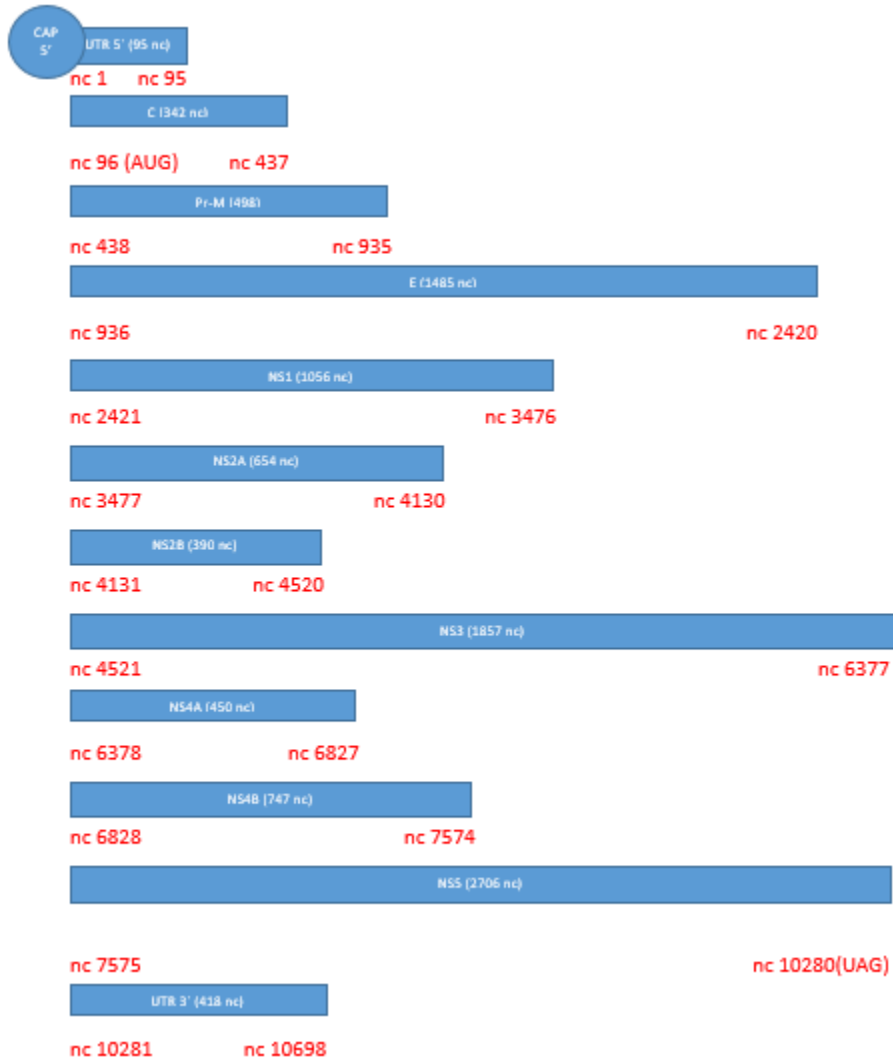
1. Análisis de la eficiencia del Microarreglo para saber si funciona como marcador de severidad para la selección de sondas específicas probadas *in vivo*, resolviendo la problemática o impedimento que se presenta en la determinación del porcentaje de hibridación de las sondas con su respectiva secuencia por serotipo y tipo de diagnóstico
2. Construcción del chip de diagnóstico de severidad con las sondas específicas.
3. Depósito de datos en el NCBI-GEO.
4. Determinar las regiones asociadas a virulencia para secuencias del serotipo 4 y la construcción de las sondas de dichas zonas
5. Determinar las regiones específicas de cada uno de los genotipos para poder implementar dicho parámetro en el chip de diagnóstico añadiendo sondas específicas para genotipo.
6. Investigar sobre los requerimientos necesarios para la comercialización del chip de diagnóstico en forma de kit tanto al sector salud como al sector privado

### Indirectas

7. Estudiar la evolución del virus sobre las diferentes áreas geográficas así como epidemiología mediante secuenciación y análisis filogenético con la ayuda de los resultados obtenidos mediante el chip diagnóstico, ya que en el futuro se planea que dicho chip detecte a nivel de genotipo e intragenotipo.

## Anexos

### 1 Genoma estándar del Dengue



**Figura 73. Genoma estándar del Dengue.**

10698 nucleótidos, 1 ORF de 10185 nucleótidos= 3395 aminoácidos y 2 regiones UTR, una a cada extremo de la cadena, una de 95 nucleótidos y otra de 418 nucleótidos. El gen C presenta 113 aminoácidos, el gen prM presenta 165, el gen E presenta 494, el gen NS1 presenta 351, el gen NS2A presenta 217, el gen NS2B presenta 129, el gen NS3 presenta 618, el gen NS4A presenta 149, el gen NS4B

presenta 248, y el gen NS5 presenta 901 aminoácidos; todas son aproximaciones ya que los genomas de la especie del virus varían con el serotipo, genotipo e intragenotipo [89].

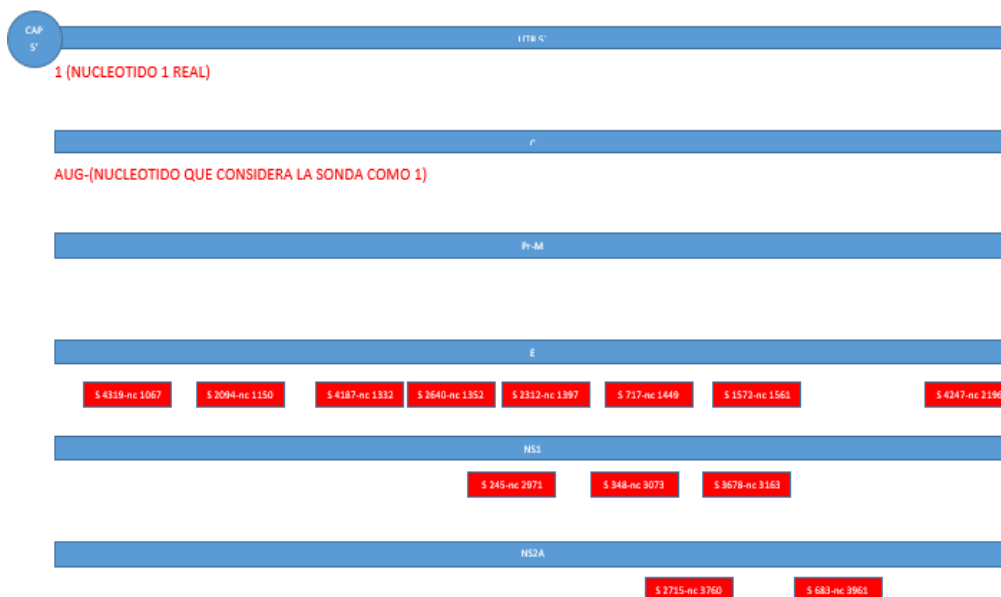
2 Esquemas representado el alineamiento de la colección de sondas con el genoma del Dengue, tomando en cuenta el genoma estándar del Dengue, esto con la finalidad de comparación didáctica con las imágenes obtenidas en el mapeo del resultado 1 de depuración de las sondas, el alineamiento es con secuencias para cada serotipo y por tipo de diagnóstico que corresponden a su respectivo set de sondas.





**Figura 74. Serotipo 1 DHF.**

El sitio de alineamiento de la sonda es tomando de referencia como nucleótido 1 la A del codón de inicio (AUG) del ORF





**Figura 75. Serotipo 1 DF.**

El sitio de alineamiento de la sonda es tomando de referencia como nucleótido 1 la A del codón de inicio (AUG) del ORF.



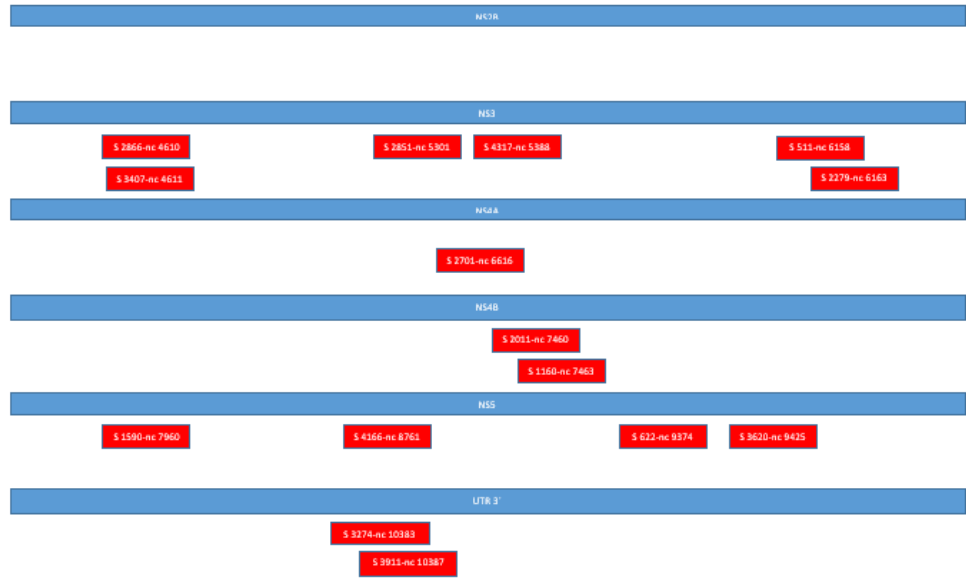


**Figura 76. Serotipo 2 DHF.**

El sitio de alineamiento de la sonda es tomando de referencia como nucleótido 1 la A del codón de inicio (AUG) del ORF.







**Figura 77. Serotipo 2 DF.**

El sitio de alineamiento de la sonda es tomando de referencia como nucleótido 1 la A del codón de inicio (AUG) del ORF.

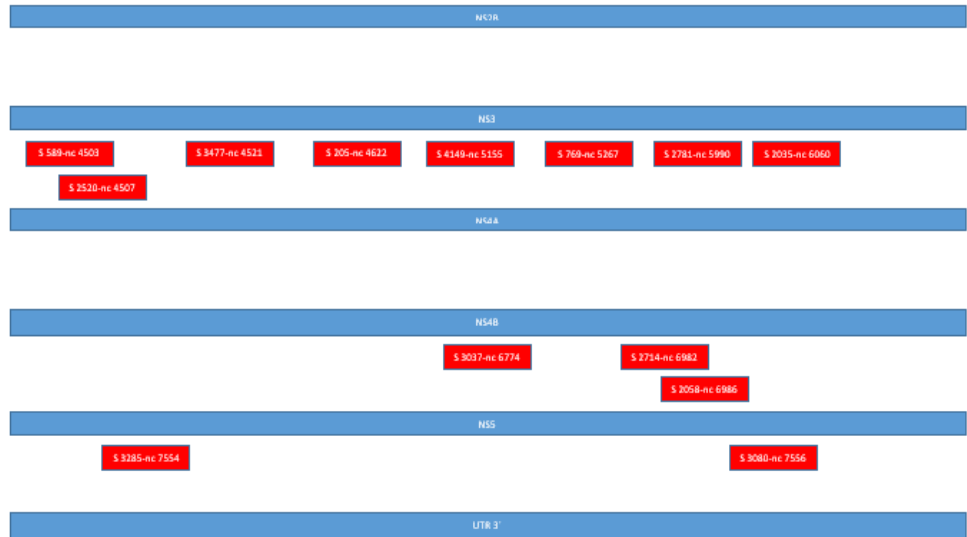




**Figura 78. Serotipo 3 DHF.**

El sitio de alineamiento de la sonda es tomando de referencia como nucleótido 1 la A del codón de inicio (AUG) del ORF.





**Figura 79. Serotipo 3 DF.**

El sitio de alineamiento de la sonda es tomando de referencia como nucleótido 1 la A del codón de inicio (AUG) del ORF.

3 Tablas de referencia de la secuencia de las sondas

**Tabla 18. Descripción de alineamiento de las sondas.**

Descripción de alineamiento con tendencia a DHF y DF para DENV-1.

No. sonda	Secuencia reconocida	Proteína codificante	Región unión*	No. sonda	Secuencia reconocida	Proteína codificante	Región unión*
DHF				DF			
1460	TCACCTTGCT	E	878	4247	GTCCACATCT	E	2196
4635	ACCATGAAGA	E	2272	4319	AGCCTGCCAT	E	1067
8	TTCGCAGCAC	E	1747	2312	TGACCATAAC	E	1397
3121	TAAATGCGGA	NS1	2436	2094	GCGACATTGG	E	1150
3455	GCCCAGACAT	NS1	2807	717	TGCCCTCACA	E	1449
1672	AATGTCGCGA	NS1	2822	2640	ACCAGCACTA	E	1352
363	TAAGTTGGAC	NS1	3210	4187	AGTCACGGTC	E	1332
3712	CACCTTGGTA	NS1	3202	1572	CGACTGCCTT	E	1561
4875	AAAAGCTCAC	NS1	3075	245	AACGCAGTCC	NS1	2971
883	GCTATTACTC	NS2A	3723	3678	TATAGACCAG	NS1	3163
509	GAGATTGTGC	NS2A	3909	348	CCGAAATGTC	NS1	3073
4328	AACCTCGCA	NS2A	3924	683	ATGGCACGGT	NS2A	3961
3030	TTCTCGCAC	NS2A	3758	2715	CTTCTACGA	NS2A	3760
3361	CACTCCAGTG	NS2B	4306	1862	AGTTAGCATC	NS2B	4146
2284	ACTGCGACCT	NS3	6270	1170	TTCGATCTCA	NS3	4722
4890	TCTCGCTGGT	NS3	6277	1226	CACAGTCTC	NS3	4519
3279	TTGCGAACTC	NS3	6271	3803	GCTTGGAGGT	NS3	4741
2062	TGGGCTATGT	NS4B	6848	3386	ATGCCACTTT	NS3	5285
679	GCTCTTAATG	N55	9586	366	CCTAAATGAC	N55	9588
2363	CTAACAGCTC	N55	9580				
4218	AGCTCTCAAT	N55	9585				
1553	AGCTGTGAAT	N55	9585				
477	ATACTGAACC	N55	8263				
2459	TCTACCCACG	N55	8188				
1012	TCTGATTGAC	N55	9588				
2802	ACTAGGTGGT	N55	9272				
294	AACGTATTGG	N55	8199				
4734	GGCTGATACG	N55	9509				

\*Sitio de unión tomando de referencia como nucleótido 1 la A del codón de inicio del marco de lectura.

**Tabla 19. Descripción de alineamiento de las sondas.**

Descripción de alineamiento con tendencia a DHF y DF para DENV-2.

No. sonda	Secuencia reconocida	Proteína codificante	Región unión*	No. sonda	Secuencia reconocida	Proteína codificante	Región unión*
DHF				DF			
4653	CACGGTTTGA	3' UTR	<b>10373</b>	3274	TAAACTGTCC	3' UTR	<b>10383</b>
3840	GGCTTGAATA	3' UTR	<b>10376</b>	3911	CTGTACAGCC	3' UTR	<b>10387</b>
3592	ACTAACTCGA	3' UTR	<b>10257</b>	2585	TGTTATGCTG	C	<b>387</b>
1063	GTTTCTTGAC	E	<b>1548</b>	2633	TGGCAGTAA	E	<b>1386</b>
1857	GAAGTTACTG	E	<b>1737</b>	22	AGGCACTGTC	E	<b>1446</b>
549	GGAGCTGTTG	E	<b>2390</b>	2379	CTGTCAAGAT	E	<b>1451</b>
2228	AGAACACTTG	E	<b>1508</b>	2105	CGTTCTCTAG	E	<b>1546</b>
39	TCAGGGGACT	E	<b>1732</b>	12	AAGCTTACTG	E	<b>1737</b>
3454	GATCTGAGAC	M	<b>731</b>	1071	AGGAAACTCA	E	<b>1734</b>
534	CTGAGACACG	M	<b>734</b>	910	CTACCATACG	NS1	<b>3174</b>
3891	GATCTTTGCT	NS1	<b>2702</b>	24	AACCGATCCT	NS1	<b>2689</b>
2908	ATATCACTCC	NS2A	<b>3775</b>	3129	TCCTTGCGGA	NS1	<b>2704</b>
2881	ATGAGGTGGC	NS3	<b>5296</b>	26	GAATCGAACT	NS2A	<b>3773</b>
2160	GTTGCTTTCA	NS3	<b>5301</b>	3435	AGGCATCGCA	NS2A	<b>3771</b>
1853	TGACGTTGCT	NS3	<b>5297</b>	3015	GGCTTTGACG	NS2A	<b>4035</b>
725	ACGGCTATGG	NS3	<b>4946</b>	2983	CGTTGATTAC	NS2A	<b>3578</b>
4433	GCATCAATGA	NS3	<b>6158</b>	2279	AACTAGGCAG	NS3	<b>6163</b>
1360	TGGTCGCCAA	NS3	<b>5735</b>	2851	GCTGCTACCA	NS3	<b>5301</b>
4002	TGAATTACGC	NS3	<b>6161</b>	4317	AGGATACAGT	NS3	<b>5388</b>
4630	ATCCATTACG	NS3	<b>6160</b>	511	GCATCAACTC	NS3	<b>6158</b>
4431	GCATCAATGA	NS3	<b>6158</b>	3407	CGGAGGTTAC	NS3	<b>4611</b>
1598	ACATCGCAAC	NS3	<b>5393</b>	2866	CCGGAGTTCA	NS3	<b>4610</b>
1558	CAATGGTCTT	NS3	<b>4950</b>	2701	ATCACAGGTA	NS4A	<b>6616</b>
3235	CTCGAGTTTA	NS3	<b>4610</b>	1160	TCGCTAACAT	NS4B	<b>7463</b>
3371	TCTATACACC	NS3	<b>5990</b>	2011	CAATGGCTCA	NS4B	<b>7460</b>
4097	GCCATCCCTA	NS4B	<b>7000</b>	622	ATACTTTCGC	NS5	<b>9374</b>
4293	GCGATCGCTA	NS4B	<b>7000</b>	1590	AGGTGTGATA	NS5	<b>7960</b>
1782	GAATACTTCC	NS4B	<b>7440</b>	4166	AATGCAGCCG	NS5	<b>8761</b>
4291	GCGATCGCTA	NS4B	<b>7000</b>	3620	GAATCTTCAG	NS5	<b>9425</b>
4511	CGTTAAACT	NS5	<b>9369</b>				
3861	ACGCAGCCAT	NS5	<b>8762</b>				
1097	CAACGCATCC	NS5	<b>8760</b>				

\*Sitio de unión tomando de referencia como nucleótido 1 la A del codón de inicio del marco de lectura.

**Tabla 20. Descripción de alineamiento de las sondas.**

Descripción de alineamiento con tendencia a DHF y DF para DENV-3.



No. sonda	Secuencia reconocida	Proteína codificante	Región unión*	No. sonda	Secuencia reconocida	Proteína codificante	Región unión*
DHF				DF			
2992	ATTGGACTTC	E	1461	128	ACAGATTGGA	E	1775
56	CACATCAAGA	M	609	4827	CTCACATTAC	M	575
117	ATCCCGCAAC	NS1	3127	4889	CGACCTTACA	M	618
4612	CACGATCATT	NS1	3096	2269	CGAATGGCGT	NS1	3318
2403	AGAGGTGTCT	NS1	2892	8	TTCGCAGCAC	NS1	3144
4607	GGTGTATACA	NS1	2895	410	ATCCCAACGA	NS1	3118
825	AGATATGCG	NS2A	3585	2984	TGCTCGAGAG	NS1	3098
1718	ACGTTTGTAG	NS2A	3547	3245	CTAGGGAGTG	NS1	3100
4494	GTCTGTACTC	NS2A	3549	3791	GGTGTGCTAC	NS1	3094
4084	GTGTACTCCT	NS2A	3566	371	TTCGTGAACA	NS1	3333
1809	AGCTTAAACG	NS2B	4060	4264	GTTGCAGTTC	NS1	3326
2488	AGCTTACAAG	NS2B	4060	1961	GCATGTGTTA	NS1	2398
3959	GCCTACGGAA	NS3	5600	4396	GTCATGGGAT	NS1	2392
4162	TCGTCTGAAA	NS3	6048	282	TGCTCATTCT	NS2A	3569
4931	ACCTATCCG	NS3	6277	2310	CGTTTATGCT	NS2A	3563
4196	TAGTATCGCC	NS3	6043	2525	TGTGCTCCGT	NS2A	3567
2758	AGCGCCTGAA	NS3	6047	2520	GACGTAGCCA	NS3	4507
2383	ACGACTACA	NS3	5698	205	GAGTCATCCA	NS3	4622
454	GTGGTAACGA	NS3	5692	589	GTGGGACGTA	NS3	4503
3289	TGATGTGGCA	NS3	5255	769	ACCTAATGTG	NS3	5267
2877	GCACCTATTT	NS3	6275	4149	TTGGCTCCGA	NS3	5155
503	CTGGCACTGA	NS3	5140	3477	CCCAGTGACA	NS3	4521
1893	GAGGCCTACA	NS4A	6448	2781	ATCACCAGA	NS3	5990
3935	CTTAGCTCAT	NS4A	6381	2035	GTCTCGTTG	NS3	6060
3181	TGCAGCAATA	NS4B	6765	3037	CACATTGGCT	NS4B	6774
1327	GAGCCGTGTT	NS5	8753	2058	TGTATCTGGC	NS4B	6986
				2714	GATGTGTCTC	NS4B	6982
				3285	ACAMGGTGTA	NS5	7554
				3080	AAGGTGCAAC	NS5	7556

\*Sitio de unión tomando de referencia como nucleótido 1 la A del codón de inicio del marco de lectura.

## Referencias bibliográficas

- 1 Henschel A. E.; *et al.*, The Dengue Viruses. *Clinical Microbiology Reviews* Oct. 1990, Vol. 3, No 4, pp 376-396.
- 2 Ibáñez B. S.; *et al.*, Los vectores de Dengue en México: una revisión crítica. *Suplemento de Salud Pública* 1995 1995, Vol. 37, pp 53-63.
- 3 DENGUE: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control, Publicación conjunta de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Programa Especial para la Investigación y Capacitación de Enfermedades Tropicales (TDR). Edición 2009, OPS/OMS, La Paz, Bolivia, 2010, pp 1-170.
- 4 Mecate Z. A. E. Identificación de determinantes genéticos de virulencia en genomas completos de Dengue virus de América (2000-2009). Tesis de maestría, CINVESTAV, D. F., México, Agosto 2013 pp 107.
- 5 Qin-Long J; *et al.*, Emergence of Dengue virus 4 genotype II in Guangzhou, China, 2010: survey and molecular epidemiology of one community outbreak. *BMC Infectious Diseases* 2012, Vol. 12, No 88, pp 1-8.
- 6 Helda L. Alfonso; *et al.*, Phylogenetic relationship of Dengue virus type 3 isolated in Brazil and Paraguay and global evolutionary divergence dynamics, *Virology Journal* 2012, Vol. 9, No. 124, pp 1-38.
- 7 A. Hynes Noreen. Dengue: a reemerging concern for travelers. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* July 2012, Vol. 79 No 7, pp 474-482.
- 8 P. Messina J.; *et al.*, Global spread of Dengue virus types: mapping the 70 year history. *Cell* 2014, Vol. 22, No 3, pp 138-146.

9 Díaz B. A; *et al.*, A DNA Microarray-Based Assay to detect dual infection with two Dengue virus serotypes. *Sensors* 2014, pp 1-22.

10 G. J. Chang; *et al.*, An integrated target sequence and signal amplification assay, reverse transcriptase-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay, to detect and characterize flaviviruses, *Journal of Clinical Microbiology* 1994, Vol, 32, No 2, pp 477-483.

11 Innis B. L; *et al.*, An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize Dengue infection where Dengue and Japanese Encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1989, pp 418-427.

12 Halstead S. B. Dengue and hemorrhagic fevers of Southeast Asia: with discussion by Max Theiler. *Biol. Med.* 1965, No 37, pp 434-454.

13 Zhao Hui; *et al.*, Complete Genome Sequence of a Dengue Virus Serotype 4 Strain Isolated in Guangdong, China. *Journal of Virology* Jun 2012, Vol. 86, No 12, pp 7021-7022

14 Walker P. J; *et al.*, Variation in Dengue type 2 virus isolated in Bangkok during 1980. *J Gen. Virol* 1988, Vol. 69, pp 591-602.

15 Muñoz Bernal J. A. Memoria sobre la epidemia que ha sufrido esta ciudad, nombrada vulgarmente el Dengue. *Oficina del Gobierno y Capitanía General. Habana* 1828, Vol. 1, pp 26.

16 Carey D. E., Chikungunya and Dengue: A case of mistaken identity. *J. Hist. Med. Allied Sci* 1971. Vol 26, pp 243-262.

17 Bres P., Historical review of dengue-1: implications of its introduction in the Western Hemisphere in 1977. In *Dengue in the Caribbean, 1977*. Pan American Health Organization Publication, Washington, D.C. 1979, No 375, pp 4-10.

18 [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com)

19 Torres G. I.; *et al.*, Dengue en México: análisis de dos décadas, *Gaceta Médica de México* 2014, Vol. 150, pp 122-127.



- 20 Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of Dengue Viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990, Vol. 174, No 2, pp 478-493.
- 21 Chen R; *et al.*, Dengue—quo tu et quo vadis?. *Viruses* 2011, Vol. 3, No 9, pp 1562-1608.
- 22 Diaz F. J; *et al.*, Dengue virus circulation and evolution in Mexico: a phylogenetic perspective. *Arch Med Res* 2006, Vol. 37, No 6, pp 760-773.
- 23 Vasilakis N; *et al.*, Evolutionary processes among sylvatic Dengue type 2. *J Virol* 2007, Vol. 81, No 17, pp 9591-9595.
- 24 Foster J. E; *et al.*, Molecular evolution and phylogeny of Dengue type 4 virus in the Caribbean. *Virology* 2003, Vol. 306, No 1, pp 126-134.
- 25 Li D. S; *et al.*, Rapid displacement of dengue virus type 1 by type 4, Pacific region, 2007-2009, *Emerg. Infect. Dis.* 2010, Vol. 16, pp 123-125.
- 26 M. Anoop; *et al.*, Complete genome sequencing and evolutionary analysis of dengue virus serotype 1 isolates from an outbreak in Kerala, South India, *Virus Genes* 2012, pp 1-13.
- 27 Exposición del Dr. B. K. Tyagi en el evento “Consensus Document on the Biology of *Aedes aegypti*” realizado por CIBIOGEM-CONACYT, Ciudad de México 2014
- 28 Muñoz M. M. de L, Aportaciones de la estudiante y la investigadora independientes en la genética y la biología molecular, *Revista Digital Universitaria* 2011, Vol. 12, No 10, pp 1-24.
- 29 Quintero G. D. C.; *et al.*, Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del Dengue, *IATREIA* Junio 2010, Vol. 23, No 2, 146-156.

30 Muñoz M. M. de L; *et al.*, Proteomic Identification of Dengue Virus Binding Proteins in *Aedes aegypti* Mosquitoes and *Aedes albopictus* Cells, BioMed Research International Septiembre 2013, pp 1-11.

31 Charan S. S; *et al.*, Comparative analysis of midgut bacterial communities of *Aedes aegypti* mosquito strains varying in vector competence to Dengue virus. Parasitol Res 2013, No 112, pp 2627-2637.

32 Black W. C.; *et al.*, Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*, *Archives of Medical Research* 2002, Vol. 33, pp379-388.

33 <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/seminarios-en-biotecnologia-y-bioseguridad-de-ogms/estrategias-geneticas-para-el-control-de-poblaciones-de-mosquitos-vectores-de-dengue>

34 Bryant J. E; *et al.*, Glycosylation of the dengue 2 virus E protein at N67 is critical for virus growth in vitro but not for growth in intrathoracically inoculated *Aedes aegypti* mosquitoes. *Virology* 2007, Vol. 366, No 2, pp 415-423.

35 Shresta S; *et al.*, Early activation of natural killer and B cells in response to primary Dengue virus infection in A/J mice. *Virology* 2004, Vol. 319, No 2, pp 262-273.

36 Aebi M; *et al.*, cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol Cell Biol* 1989, Vol. 9, No 11, pp 5062-5072.

37 Kurane I; *et al.*, Production of interferon alpha by Dengue virus-infected human monocytes. *J Gen Virol* 1998, Vol. 69 (Pt 2), pp 445-449.

38 Shresta S; *et al.*, Critical roles for both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways in the control of primary Dengue virus infection in mice. *J Immunol* 2005, Vol. 175, No 6, pp 3946-3954.

39 Erickson A. K; *et al.*, Regulation of infection production and innate antiviral immunity through translational control of IRF-7. *Cell Res* 2008, Vol. 14, No 4, pp 433-435.

40 Muñoz J; *et al.*, Inhibition of interferon signaling by Dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, Vol. 100, No 24, pp 14333-14338.

41 Stiasny K; *et al.*, Membrane interactions of the tick-borne encephalitis virus fusion protein E at low pH. *J Virol* 2002, Vol. 76, No 8, pp 3784-3790.

42 Clyde K; *et al.* Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 2006, Vol. 80, No 23, pp 11418-11431.

43 Kuhn R. J; *et al.*, Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 2002, Vol. 108, No 5, pp 717-725.

44 Murphy B. R; *et al.*, Immune response to Dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol* 2011, No 29, pp 587-619.

45 <http://www.cdc.gov/dengue/>

46 <http://eldengueunaepidemimundial.blogspot.mx/2013/05/genoma-del-virus-dengue.html>

47 Zhang H.; *et al.*, Spatiotemporal Characterizations of Dengue Virus in Mainland China: Insights into the Whole Genome from 1978 to 2011. *PLOS ONE* February 2014, Vol. 9, pp 1-10.

48 Perera R.; *et al.*, Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion in Microbiology* 2008, No 11, pp 369–377.

49 Velandia L. M.; *Virus del Dengue: Estructura y ciclo viral.* *Infectio* 2011, Vol. 15, No 1, pp 33-43.

50 Nybakken G. E; *et al.*, Crystal structure of the West Nile virus envelope glycoprotein. J Virol 2006, Vol. 80, No 23, pp 11467-11474.

51 Modis Y; *et al.*, Variable surface epitopes in the crystal structure of Dengue virus type 3 envelope glycoprotein. J Virol 2005, Vol. 79, No 2, pp 1223-1231.

52 Muller A. D.; *et al.*, The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. Antiviral Research 2013, No 98, pp 192–208.

53 Huang Q.; *et al.*, Expression, purification, and initial structural characterization of nonstructural protein 2B, an integral membrane protein of Dengue-2 virus, in detergent micelles. Protein Expression and Purification 2011, No 80, pp 169–175.

54 Xie X.; *et al.*, Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein. Journal of virology 2013, Vol. 87, No 8, pp 4609-4622.

55 Kumar K. P.; *et al.*, Role of RNA Interference (RNAi) in Dengue Virus Replication and Identification of NS4B as an RNAi Suppressor. Journal of Virology 2013, Vol. 87, No 16, pp 8870–8883.

56 Engel A. R; *et al.*, The neurovirulence and neuroinvasiveness of chimeric tick-borne encephalitis/Dengue virus can be attenuated by introducing defined mutations into the envelope and NS5 protein genes and the 3' non-coding region of the genome. Virology 2010. Vol. 405, No 1, pp 243-252.

57 Pierson T. C.; *et al.*, The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. Cell Host Microbe 2007. Vol 1, No 2, pp 135-145.

58 Jessie K.; *et al.*, Localization of Dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. J Infect Dis 2004. Vol 189, No 8, pp 118.

59 Reyes Del Valle J; *et al.*, Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of Dengue virus receptor complex in human cells. *J. Virol* 2005, Vol. 79, No 8, pp 4557-4567.

60 Mercado Curiel R. F; *et al.*, The four serotypes of Dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *A. albopictus* cells. *BMC Microbiol* 2006, Vol. 6, pp 85.

61 Chen Y; *et al.*, Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 1997, Vol. 3, No 8, pp866-871.

62 Chen Y. C; *et al.*, Bacterial lipopolysaccharide inhibits Dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J. Virol* 1999, Vol. 73, No 4, pp 2650-2657.

63 Lozach P. Y; *et al.*, Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediate enhancement of Dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem* 2005, Vol. 280, No 25, pp 23698-23708.

64 Miller J. L; *et al.*, The mannose receptor mediates Dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog* 2008, Vol. 4, No 2, pp e17.

65 Acosta E. G; *et al.*, Functional entry of Dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol* 2008, Vol. 89 (Pt 2), pp 474-484.

66 Van der Schaar H. M; *et al.* Dissecting the cell entry pathway of Dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog* 2008, Vol. 4, No 12, pp e1000244.

67 Rothman L. A. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature Immunology* 2011, Vol. 11, pp 532-543.

68 [http://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=flavi\\_denque](http://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=flavi_denque)

69 Stiasny K; *et al.*, Membrane interaction of the tick-borne encephalitis virus fusion protein E at low pH. J Virol 2002, Vol. 76, No 8, pp 3784-3790.

70 Clyde K; *et al.*, Recent advances in deciphering viral and host determinants of Dengue virus replication and pathogenesis. J Virol 2006, Vol. 80, No 23, pp 11418-11431.

71 Zybert I. A; *et al.*, Functional importance of Dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. J Gen Virol 2008, Vol. 89 (Pt 12), pp 3047-3051.

72 Bryant J. E; *et al.*, Glycosylation of the Dengue 2 virus E Protein at N67 is critical for virus growth in vitro but not for growth in intrathoracically inoculated *Aedes aegypti* mosquitoes. Virology 2007, Vol. 366, No 2, pp 415-423.

73 <http://www.medicinanet.com.br/bula/7906/proden.htm>

74 <http://www.portalhomeopatico.com.ar/dengue.htm>

75 Amalraj D. D; *et al.*, Cannibalism and carnivory in *Toxorhynchites splendens* (Diptera: Culicidae). Southeast Asian J Trop Med Public Health Sep 1992, Vol. 23, No 3, pp 450-452.

76 Iturbe-Ormaetxe I; *et al.*, Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease, EMBO Rep 2011, Vol. 12, pp 508–518. doi:10.1038/embor. 2011.

77 Chen W; *et al.*, Construction of intertypic chimeric dengue viruses exhibiting type 3 antigenicity and neurovirulence for mice. J Virol 1995, Vol. 69, No 8, pp5186-5190.

78 Leitmeyer K. C; *et al.*, Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. J Virol 1999, Vol. 73, No 6, pp 4738-4747.

79 Grant D; *et al.*, A single amino acid in nonstructural protein NSB4 confers virulence to dengue virus in AG129 mice through enhancement of viral RNA synthesis. *J Virol* 2011, Vol. 85, No 15, pp 7775-7787.

80 Rodpothong P; *et al.*, Positive selection sites in the surface genes of Dengue virus: Phylogenetic analysis of the interserotypic branches of the four serotypes. *Virus Genes* 2012. Vol. 44, No 3, pp 408-414.

81 Dejnirattisai W; *et al.*, Cross-reacting antibodies enhance Dengue virus infection in humans. *Science* 2010, Vol. 328, No 5979, pp 745-748.

82 Lee H. C; *et al.*, Dengue type 4 live-attenuated vaccine viruses passaged in Vero cells affect genetic stability and Dengue-induced hemorrhaging in mice. *PloS One* 2011, Vol. 6, No 10, pp e25800.

83 De Borja L. S. D; *et al.*, Synergistic Interactions between the NS3hel and E proteins contribute to the virulence of Dengue virus type 1. *PloS Negl Trop Dis* 2012, Vol. 6, pp 4.

84 Bordignon J; *et al.*, Dengue neurovirulence in mice: identification of molecular signatures in the E and NS3 helicase domains. *J Med Virol* 2007, Vol. 79, No 10, pp 1506-1517.

85 Kang X; *et al.*, Improvement of the specificity of a pan-virus microarray by using genus-specific oligonucleotides and reduction of interference by host genomes. *J Med Virol* 2011, Vol. 83, No 9, pp 1624-1630.

86 Chizhikov V.; *et al.*, Detection and Genotyping of human group a Rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *Journal of clinical microbiology*, 22 April 2002, Vol. 40, No 7, pp 23982407.

87 Ryabinin V. A.; *et al.*, Universal oligonucleotide microarray for subtyping of influenza a virus. *PloS One* 2011, No 6, doi: 10.1371/journal.pone.0017529.

88 Protocol. Nexterion ® Slide A+ DNA Application

89 Zhang H.; *et al.*, Spatiotemporal Characterizations of Dengue Virus in Mainland China: Insights into de Whole Genome from 1978 to 2011, PLOS ONE Febrero 2014, Vol. 9, No 2, pp 1-10.