

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Identificación de proteínas de células de intestino medio de
Aedes aegypti que se unen a la proteína E del virus del dengue
serotipo 2 (DENV-2)”

Tesis que presenta:

QFB. Karla Zavala Maldonado

para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

en la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de la Tesis

Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno

México, CDMX

Agosto, 2017

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado del periodo de agosto del 2015 a agosto del 2017 para la elaboración del presente proyecto.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. María de Lourdes Muñoz por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y por todo el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

Gracias a los auxiliares de investigación Rosy, Miguel y Gerardo por su ayuda y apoyo cuando los necesité. Gracias a Hebert porque su trabajo fue muy importante para que este proyecto se realizara. Gracias a todos mis compañeros de laboratorio porque siempre pude contar con ellos cuando lo necesitaba, en especial a César que fue y sigue siendo un gran apoyo y guía desde que comenzó este proyecto.

Gracias a mis asesores, el Dr. Javier Hernández y el Dr. Kameyama, así como a sus respectivos grupos de investigación por su guía y consejos.

Gracias también a Gabriela Mora por su constante apoyo en todo lo referente a trámites y su enorme paciencia.

Agradezco a mis papás, a mi abuelita, a mi hermano, a mi hermana, a Sara, a Alexito y a Emilio por ser siempre un apoyo y distracción cuando los he necesitado y por ser la maravillosa familia que me tocó. Gracias también a mis tíos Amelia y Jorge por su constante interés en mí y en mi proyecto.

Gracias a Paco por comprensión durante todo este tiempo y por su ayuda con mis presentaciones y la realización de este trabajo escrito.

Gracias a mis amigos, Fernando, Gerson, María y Aida por todos los buenos momentos que vivimos, estos 2 años no hubieran sido lo mismo sin ustedes.

Muchas gracias especialmente a dos de mis amigos, Noé y Carlos, gracias por todos esos momentos especiales que compartimos y por toda su ayuda e interés constante a lo largo de estos dos años, sin ustedes habría sido muy difícil llegar a ver este proyecto realizado.

Contenido

| | |
|--|----|
| Introducción | 1 |
| 1. Dengue | 1 |
| 1.1. Epidemiología..... | 2 |
| 1.1.1. Dengue en México | 6 |
| 1.2. Sintomatología del dengue | 8 |
| 1.3 Vectores de transmisión | 10 |
| 1.4 Virus del dengue | 13 |
| 1.4.1 Regiones UTR | 14 |
| 1.4.2 Proteínas no estructurales..... | 16 |
| 1.4.3 Proteínas estructurales..... | 17 |
| 1.5 Ciclo viral | 19 |
| 1.5.1 Replicación del genoma viral | 24 |
| 1.5.2 Complejo de replicación flaviviral..... | 26 |
| 1.6 DENV y sistema inmune | 27 |
| Justificación..... | 29 |
| Hipótesis | 29 |
| Objetivo general..... | 29 |
| Objetivos particulares | 29 |
| Materiales y métodos | 30 |
| A. Material biológico | 30 |
| B. Purificación y cuantificación del RNA del DENV-2 | 30 |
| C. Amplificación de cDNA correspondiente a la proteína E..... | 31 |
| D. Purificación del fragmento de cDNA correspondiente a la proteína E de DENV-2..... | 32 |
| E. Preparación de células competentes..... | 33 |
| F. Ligación de secuencia de proteína E en el vector de clonación pJET1.2 | 33 |
| G. Transformación de células competentes..... | 34 |
| H. Colony PCR | 35 |
| I. Extracción de plásmido | 36 |

| | |
|---|----|
| J. Restricción y ligación..... | 37 |
| K. Caracterización y restricción de PPROEX 1 y ligación con la secuencia de la proteína E 39 | |
| L. Comprobación de sitios EcoRI presentes en las construcciones obtenidas y PCR con primers para proteína E | 41 |
| M. Secuenciación..... | 42 |
| N. Inducción de la expresión de la proteína E recombinante | 43 |
| Ñ. Inducción de grandes cantidades de proteína recombinante..... | 45 |
| O. Purificación de proteína recombinante | 45 |
| RESULTADOS | 46 |
| 1. Obtención de genoma viral y amplificados de cDNA correspondientes a la proteína E 46 | |
| 2. Construcción PJET1.2-E | 47 |
| 3. Transformación de cepas <i>E.coli</i> DH5 α competentes | 48 |
| 4. Colony PCR | 48 |
| 5. Cuantificación y restricción de plásmidos extraídos..... | 50 |
| 6. Caracterización de PPROEX1..... | 52 |
| 7. Transformación de <i>E.coli</i> BL21 competentes y comprobación de obtención de la construcción adecuada | 55 |
| 8. Secuenciación..... | 57 |
| 9. Sobreexpresión de la proteína E recombinante | 62 |
| 10. Purificación de proteína E recombinante | 64 |
| Discusión | 65 |
| Conclusión..... | 69 |
| Perspectivas | 69 |
| Referencias..... | 70 |
| Anexos..... | 77 |

Resumen

La infección por el virus del Dengue (DENV) es una de las enfermedades más ampliamente distribuidas en el mundo, se estima que cada año 390 millones de personas se infectan con este virus.

Existen 4 diferentes serotipos de DENV (1-4) y la infección primaria con uno de ellos genera anticuerpos específicos de por vida para ese serotipo sin embargo estos anticuerpos no son completamente neutralizantes para los otros serotipos, por lo que al existir una infección secundaria se genera una reacción, conocida como ADE, que tiene como consecuencias el desarrollo de las formas graves de la enfermedad y la posible muerte del individuo infectado.

DENV se transmite principalmente por la picadura de sus vectores principales *Aedes Aegypti* y *Aedes albopictus*. La picadura de un mosquito previamente alimentado con sangre infectada tiene como consecuencia el desarrollo de una infección en el humano estableciendo así un ciclo de infección.

Actualmente no existen medidas preventivas para bloquear la infección en humanos, por lo que se han buscado otras estrategias para contener la enfermedad. Algunas de estas estrategias se enfocan en encontrar el receptor del virus en las células hospederas tanto de humano como en el vector. Sin embargo no se han caracterizado ninguno de los posibles receptores propuestos.

En este estudio, se obtendrá la proteína E recombinante de DENV-2 y se acoplará covalentemente a columnas de Sepharose 4B por las que se pasarán extractos de proteínas de intestino medio de mosquitos para identificar las proteínas que interactúen con la proteína E de DENV-2 para su análisis *in silico* y comprobación de su localización en la membrana, identificando así los posibles receptores de DENV-2 y por lo tanto los posibles blancos para el tratamiento de la enfermedad.

Abstract

Dengue virus (DENV) infection is one of the most widespread diseases around the world. Every year, approximately 390 million people is infected with this virus.

There are 4 different DENV serotypes (1-4) and the primary infection with one of them results in the generation of specific antibodies that last through all the individual life. However, these antibodies are not completely neutralizing for the other DENV serotypes. When a secondary infection is developed it triggers a reaction known as ADE that is resistible of the dangerous forms of the disease severe dengue and the possible dead of the infected individual.

DENV is transmitted by the bite of its main vectors, *Aedes aegypti* or *Aedes albopictus*. The bite of a mosquito previously fed with infected blood transmit the infection the human establishing an infection cycle.

Currently, there are no preventing measures for blocking the infection in humans, so other measures have been tested for containing the disease. These strategies have been focused in the identification of the DENV receptor on human and insect host cells; however no suggested receptor has yet been successfully characterized.

In this study, the recombinant protein E of DENV-2 will be obtained and linked covalently to Sepharose 4B to make affinity columns. Mosquitoes midguts protein extracts will pass through the columns to isolate and identify the midguts proteins that interacts with DENV-2 protein E and they will be analyze *in sílico* to determine their role as receptors and consequently, to develop a treatment for the disease.

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Casos confirmados de dengue en México en la semana 20 del año 2016 y en la semana 20 del año 2017..... | 8 |
| Tabla 2. Receptores putativos de DENV en células de insecto..... | 21 |
| Tabla 3. Primers específicos para amplificar la región codificante de la proteína E de DENV2..... | 30 |
| Tabla 4. Reacciones para RT-PCR..... | 30 |
| Tabla 5. Mezcla de reacción para la formación de extremos romos en el fragmento a insertar..... | 33 |
| Tabla 6. Mezcla de reacción de ligación en el vector pJET1.2/Blunt Cloning vector..... | 33 |
| Tabla 7. Mezcla de reacción para colony PCR..... | 34 |
| Tabla 8. Reacción de restricción con EcoRI..... | 36 |
| Tabla 9. Restricción con NdeI..... | 37 |
| Tabla 10. Restricción con XhoI..... | 37 |
| Tabla 11. Restricción de la construcción PJET1.2-E por pasos con las enzimas NdeI y XhoI..... | 37 |
| Tabla 12. Restricción de PPROEX1 con XbaI..... | 38 |
| Tabla 13. Restricción de PPROEX1 con XhoI..... | 38 |
| Tabla 14. Restricción de PPROEX1 con XbaI y XhoI..... | 38 |
| Tabla 15. Restricción de PPROEX1 con NdeI y XhoI..... | 39 |
| Tabla 16. Componentes de la reacción de ligación de PPROEX1 con el fragmento de proteína E..... | 39 |

| | |
|---|----|
| Tabla 17. Reacción de restricción de PPROEX1-E con EcoRI..... | 40 |
| Tabla 18. Reacción de secuenciación de PPROEX1-E..... | 41 |
| Tabla 19. Composición del gel de poliacrilamida al 10%..... | 42 |
| Tabla 20. Cantidad de muestra y de buffer cargada en el gel de poliacrilamida después del ajuste por absorbancia..... | 43 |
| Tabla 21. Cuantificación de RNA viral extraído..... | 45 |
| Tabla 22. Cuantificación de plásmidos PJET1.2 extraídos..... | 49 |
| Tabla 23. O.D ₆₀₀ de cada muestra..... | 61 |
| Tabla 24. Primers específicos para amplificar el DIII..... | 75 |
| Tabla 25. Componentes de la reacción de amplificación de DIII..... | 75 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Distribución de <i>Aedes aegypti</i> en el continente americano en 1970 y en 2002, después de finalizarse el programa de erradicación del mosquito... | 4 |
| Figura 2. Casos de dengue reportados en el año 2017..... | 6 |
| Figura 3. Número de casos de dengue reportados en México en los años 2000-2016..... | 7 |
| Figura 4. Incidencia de dengue y distribución de serotipos en México en la semana 25 del año 2017..... | 8 |
| Figura 5. Fases de la infección por DENV..... | 10 |
| Figura 6. Ciclo urbano y selvático de <i>Aedes aegypti</i> | 11 |
| Figura 7. Ciclo de vida de un mosquito..... | 12 |
| Figura 8. Esquema del genoma de DENV..... | 13 |
| Figura 9. Representación de la región 5'UTR de DENV..... | 14 |
| Figura 10. Región 3'UTR viral..... | 15 |
| Figura 11. Dímero de proteína E con los tres dominios definidos de cada monómero..... | 18 |
| Figura 12. Ciclo viral de DENV..... | 22 |
| Figura 13. Replicación del RNA flaviviral y síntesis del cap RNA 5' por las proteínas NS3 y NS5..... | 24 |
| Figura 14. Complejo de replicación flaviviral..... | 25 |
| Figura 15. Inhibición de la señalización por IFN de tipo I por DENV..... | 27 |
| Figura 16. Condiciones para RT-PCR..... | 31 |
| Figura 17. Condiciones de colony PCR..... | 35 |

| | |
|---|----|
| Figura 18. Condiciones para reacción de secuenciación..... | 41 |
| Figura 19. Amplificados correspondientes a la proteína E..... | 45 |
| Figura 20. Construcción PJET1.2-E..... | 46 |
| Figura 21. Candidatas obtenidas después de la transformación de células competentes..... | 47 |
| Figura 22. Bandas obtenidas de la colony PCR de las 4 candidatas seleccionadas en el segundo pase..... | 48 |
| Figura 23. Resultados de la restricción con EcoRI..... | 49 |
| Figura 24. Restricciones de PJET1.2-E con las enzimas NdeI, XhoI, NdeI + XhoI y EcoRI..... | 50 |
| Figura 25. Mapa del vector de expresión PPROEX1..... | 51 |
| Figura 26. Caracterización del vector de expresión PPROEX1..... | 52 |
| Figura 27. Restricción de PPROEX1 con las enzimas NdeI, XhoI, NdeI + XhoI y EcoRI..... | 53 |
| Figura 28. Mapa de la construcción PPROEX1-E..... | 54 |
| Figura 29. Candidatas obtenidas con la construcción PPROEX1-E..... | 54 |
| Figura 30. Restricción del plásmido PPROEX1-E extraído de las 4 candidatas seleccionadas..... | 55 |
| Figura 31. PCR con gradiente de temperatura para amplificar el fragmento correspondiente a la proteína E a partir de la construcción PPROEX1-E obtenida de la candidata C9..... | 56 |
| Figura 32. Electroferogramas obtenidos a partir de la reacción de secuenciación de la construcción PPROEX1-E..... | 57 |

| | |
|--|----|
| Figura 33. Alineamiento de la secuencia nucleotídica obtenida con el primer forward..... | 57 |
| Figura 34. Alineamiento de la secuencia nucleotídica obtenida con el primer reverse..... | 58 |
| Figura 35. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas obtenidas con los primers forward y reverse..... | 59 |
| Figura 36. SDS-PAGE 10%..... | 60 |
| Figura 37. Cálculo para ajustar la cantidad de muestra..... | 61 |
| Figura 38. Transferencia a la membrana y WB..... | 61 |
| Figura 39. Purificación de proteína E recombinante mediante columnas de níquel..... | 62 |
| Figura 40. Condiciones para amplificar el DIII..... | 76 |
| Figura 41. Amplificación de DIII..... | 76 |
| Figura 42. Mapa de la construcción PJET1.2-DIII..... | 77 |
| Figura 43. Candidatas transformadas con PJET12-DIII..... | 77 |
| Figura 44. Colony PCR de candidatas transformadas con PJET1.2-DIII..... | 78 |
| Figura 45. Restricción de PJET1.2-DIII con HincII..... | 79 |
| Figura 46. PCR a partir del plásmido PJET1.2-DIII..... | 80 |
| Figura 47. Restricciones con EcoRI y HindIII..... | 81 |
| Figura 48. Mapa de PPROEX1-DIII..... | 82 |
| Figura 49. Candidatas transformadas con PPROEX1-DIII..... | 82 |
| Figura 50. Colony PCR de candidatas con PPROEX1-DIII..... | 83 |

Lista de abreviaturas

DENV. Virus del dengue

DNA. Ácido Desoxirribonucleico

RNA. Ácido ribonucleico

ORF. (Open Reading Frame) Marco de lectura abierto

5' UTR (5' Untranslated Region) Región 5' no traducida

3'UTR (3' Untranslated Region) Región 3' no traducida

SLA Bucle de tallo largo

SLB Bucle de tallo corto

GAGs Glicosaminoglicanos

DC Células dendríticas

DI Dominio I de la proteína E de DENV

DII Dominio II de la proteína E de DENV

DIII Dominio III de la proteína E de DENV

VOPBA (Virus Overlay Protein Binding Assay) Ensayo de unión de proteínas de superposición de virus

mRNA RNA mensajero

TGN Red del Trans-Golgi

RE Retículo endoplásmico

IFN Interferón

PAMPs Patrones moleculares asociados a patógenos

APCs Células presentadoras de antígeno

PRRs Receptores de reconocimiento de patógenos

VPs Paquetes vesiculares

CMs Membranas en complejo

dsRNA RNA de doble cadena

TLR Receptores tipo Toll

JAK1 Cinasa Janus1

STAT1 Transductor de señal y activador de la transcripción 1

STAT2 Transductor de señal y activador de la transcripción 2

Kb Kilobases

pb Pares de bases

IRF 9 Regulador de Interferón 9

ISRF Respuesta estimulada por Interferón

ISGs Genes estimulados por interferón

E. coli *Escherichia coli*

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

SDS Dodecil sulfato de sodio

IPTG Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LB (Luria Broth) Medio Luria

APS Persulfato de Amonio

TEMED N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

BLASTn Alineamiento local básico de nucleótidos comparando con una base de nucleótidos

BLASTx Alineamiento local básico que compara nucleótidos traducidos con una base de proteínas

NCBI National Center for Biotechnology Information

Introducción

1. Dengue

El dengue es una enfermedad viral transmitida por los mosquitos del género *Aedes spp.* y principalmente el *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Al virus del dengue (DENV) por su forma de transmisión se le denomina como arbovirus, término referido a los virus transmitidos por artrópodos (arthropod borne virus) (Denysiuk et al., 2015).

Esta enfermedad se ha establecido globalmente y la infección en humanos es a menudo asintomática pero puede llevar a un amplio rango de manifestaciones clínicas, desde fiebre media, pasando posteriormente por dengue grave, hasta incluso un síndrome fatal de shock por dengue (Simmons et al., 2013; Endy et al., 2011). DENV normalmente está restringido a su huésped natural, mosquitos del género *Aedes spp.*, y generalmente tiene como huésped de amplificación y reserva a primates y humanos, generando así un ciclo que permite la propagación del virus y la enfermedad. (Weaver et al., 2009).

Aunque la expansión histórica de la enfermedad está bien documentada, los casos de dengue en los países tropicales y subtropicales están pobremente enumerados. El conocimiento de la distribución geográfica del dengue y los agravios que ocasiona es esencial para entender su contribución en los índices de morbilidad y mortalidad a nivel mundial y así designar los recursos óptimos disponibles para su control (Bhatt et al., 2013).

La organización mundial de la salud ha determinado que las zonas con un mayor riesgo de infección son Asia y América. Solo en el 2010 se estimó que hubo 96 millones de infecciones por dengue en todo el mundo (Bhatt et al., 2013).

Es ya conocido que existen 4 serotipos de DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) distribuidos de manera global, estos son epidemiológicamente

similares, es decir que la infección con un serotipo de dengue ocasionará la misma sintomatología que la infección con cualquier otro serotipo de dengue, sin embargo, estos son genéticamente distintos. La infección con un serotipo de DENV confiere inmunidad contra el mismo serotipo pero no contra otros serotipos (Weaver *et al.*, 2009; Halstead *et al.*, 1988; De Alwis *et al.*, 2014).

1.1. Epidemiología

Las primeras epidemias de dengue reportadas datan de 1779-1780 en Asia, África y América del Norte. La ocurrencia casi simultánea de los brotes en tres continentes indica que estos virus y el mosquito vector que los transporta han estado ampliamente distribuidos en las áreas tropicales durante más de 200 años. Durante gran parte de este tiempo, se pensaba que el dengue era una enfermedad leve y no mortal, que afectaba a las personas que visitaban las áreas tropicales (<https://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/dengue/hojados.htm>).

Después de la Segunda Guerra Mundial comenzó una pandemia de dengue en el Sureste Asiático que desde entonces se ha venido propagando por el resto del mundo. En la actualidad son más frecuentes las epidemias causadas por serotipos múltiples (hiperendemicidad); se ha ampliado la distribución geográfica de los virus del dengue y de sus mosquitos vectores; y ha surgido el dengue hemorrágico en la región del Pacífico y en el continente americano. La primera epidemia de dengue hemorrágico en el Sureste Asiático se dio en los años 1950, pero para 1975 se había convertido en una causa frecuente de hospitalización y muerte entre los niños de muchos países de la región. (<https://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/dengue/hojados.htm>).

En los años 1980, el dengue hemorrágico comenzó una segunda expansión en Asia, cuando se registraron las primeras grandes epidemias en Sri Lanka, la India y las islas Maldivas. En el Pacífico, se reintrodujeron nuevamente los virus del dengue a principio de los años 1970, después de una ausencia de más de 25 años. La actividad epidémica causada por los cuatro serotipos se ha intensificado en los últimos años y varias islas se han visto afectadas por

epidemias importantes de dengue hemorrágico. En África, se ha observado que las epidemias de dengue causadas por los cuatro serotipos han aumentado considerablemente desde 1980 (<https://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/dengue/hojadosdatos.htm>).

En 1970, solo el virus DEN-2 estaba presente en el continente americano, aun cuando es probable que el DEN-3 haya tenido una distribución puntual en Colombia y Puerto Rico. En 1977, se introdujo a la región el DEN-1, el cual causó grandes epidemias por un período de 16 años. El DEN-4 se introdujo en 1981 y causó epidemias generalizadas de características similares. Asimismo, en 1981, una nueva cepa del DEN-2 proveniente del Sureste Asiático, causó una epidemia de dengue hemorrágico de proporciones considerables en Cuba. Esta cepa se ha propagado rápidamente por la región y ha causado brotes de dengue hemorrágico en Venezuela, Colombia, Brasil, Guyana Francesa, Surinam y Puerto Rico. Para el año 2003, 24 países de la región americana habían reportado casos de dengue hemorrágico confirmados; en la actualidad, el dengue hemorrágico es endémico en muchos de estos países. (<https://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/dengue/hojadosdatos.htm>).

La aparición del dengue y del dengue grave ha representado un problema importante de salud pública de proporciones alarmantes en el continente americano. En un esfuerzo por prevenir la fiebre amarilla en las ciudades, que también es transmitida por el *Ae. aegypti*, la Organización Panamericana de la Salud emprendió una campaña que erradicó, en los años 1950 y 1960, el *Ae. aegypti* en la mayoría de los países de Centroamérica y Suramérica. Es por ello que el dengue epidémico se presentó solamente de manera esporádica en algunas islas del Caribe durante ese período. El programa de erradicación del *Ae. aegypti*, el cual fue discontinuado oficialmente en Estados Unidos en 1970, se debilitó gradualmente también en otras partes del continente Americano como México, por lo cual el mosquito comenzó a infestar nuevamente a los países en los cuales ya se había erradicado. En

consecuencia, la distribución geográfica del *Ae. aegypti* en el 2002 fue mucho más amplia que en los años anteriores al programa de erradicación. (<https://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/dengue/hojados.htm>).

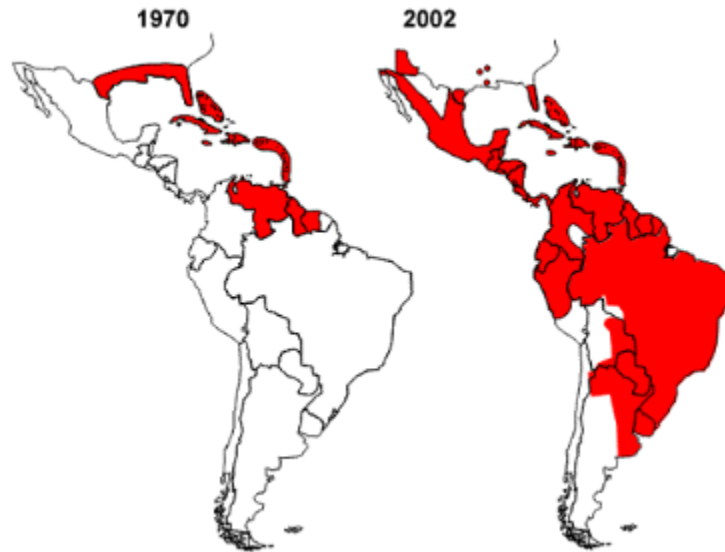


Figura 1. Distribución de *Aedes aegypti* en el continente americano en 1970 y en 2002, después de finalizarse el programa de erradicación del mosquito. (<https://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/dengue/hojados.htm>).

En las últimas décadas ha aumentado enormemente la incidencia de dengue en el mundo. Según una estimación reciente de la OMS, se producen 390 millones de infecciones por dengue cada año, de los cuales 96 millones se manifiestan clínicamente (Bhatt et al., 2013). En 2010, se reportó que la incidencia de dengue aumentó 30 veces en los últimos 50 años. En otro estudio sobre la prevalencia del dengue se estima que 3.9 millones de personas, en 128 países, están en riesgo de infectarse con el virus del dengue (Brady et al., 2012). En 2010, 2013 y 2015, se notificaron casi 2.4 millones de casos al año.

Antes de 1970, solo 9 países habían experimentado epidemias de dengue severo. En la actualidad la enfermedad es endémica en varios países de África, el este del mediterráneo, América, sureste de Asia y el oeste del

Pacífico, siendo las últimas tres regiones las más afectadas. En el año 2015, solamente en América se reportaron 2.35 millones de casos de dengue, de los cuales 10,200 casos fueron diagnosticados como dengue severo causando 1181 muertes (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>).

Se ha observado que los casos de dengue han ido en aumento y a la vez la enfermedad se ha disperso a nuevas áreas, por ejemplo en lugares donde antes no se daban casos de infección por dengue, como en Francia y Croacia, diagnosticaron casos importantes en 2010, así como en Portugal y otros 10 países europeos (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>).

En el año 2013, se detectaron casos de DENV en Florida y la provincia China de Yunnan y varias zonas de Latinoamérica como Costa Rica, Honduras y México, los cuales continúan siendo afectados. En Asia, Singapur reportó un incremento en los casos de dengue y se reportó un brote en Laos. En 2014, las tendencias en los números de casos siguieron incrementándose en China, las islas Cook, Fiji, Malasia y Vanuatu (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>).

Se reportaron también casos de dengue después de 70 años en Japón (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>).

El año 2015 se caracterizó por un gran número de brotes de dengue a nivel mundial, donde Filipinas reportó más de 169,000 casos y Malasia excediendo 111,000 casos sospechados de dengue, representando un incremento de 59.5% y 16% en comparación con el año anterior respectivamente. En Brasil se reportaron 1.5 millones de casos que fue tres veces más de lo reportado en 2014 y en Delhi se registró el peor brote de dengue desde el año 2006 con 15,000 casos. La isla de Hawaii se vio afectada por un brote de 181 casos y las islas del Pacífico, como Fiji, Tonga y la Polinesia Francesa, también reportaron casos de dengue (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>).

Un estimado de 500,000 personas con dengue severo requiere hospitalización cada año, de los cuáles la gran mayoría son niños. Cerca de un 2.5% de los afectados mueren (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>).

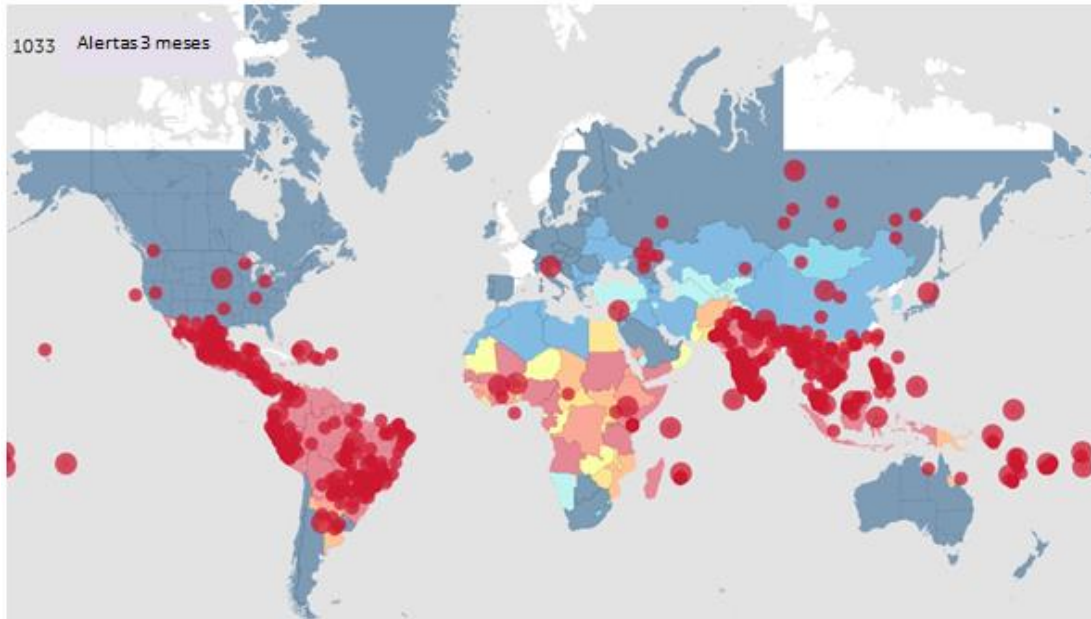


Figura 2. Casos de dengue reportados en el año 2017. Los puntos rojos representan los brotes de dengue que se han reportado.

1.1.1. Dengue en México

La presencia de DENV en México obedece a la conjunción de diversos factores: Circulación viral cíclica de los 4 serotipos, altas densidades vectoriales, fenómenos asociados al cambio climático, servicios públicos deficientes, falta de percepción de riesgos y escasa participación comunitaria en las actividades de prevención, entre otros (<http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/236401/sem25.pdf>).

De acuerdo al Sistema Nacional de Salud y a la Secretaría de Salud, corresponde a la Dirección General Adjunta de Epidemiología (DGAE) coordinar la elaboración de las normas y procedimientos para la vigilancia epidemiológica del dengue. El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica capta, registra y analiza los datos de morbilidad, mortalidad, daños y riesgos en la salud a través del Sistema Único de Información para la Vigilancia

(http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/panodengue/intd_dengue.html)

Para el periodo 2000-2016 se observó una tendencia ascendente en los casos confirmados de dengue hasta el 2009, posteriormente se presentan alternancias entre decrementos e incrementos a partir del 2012 y finalmente se presentó un notable decremento en 2016 (Fig. 2) (<http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/236401/sem25.pdf>).

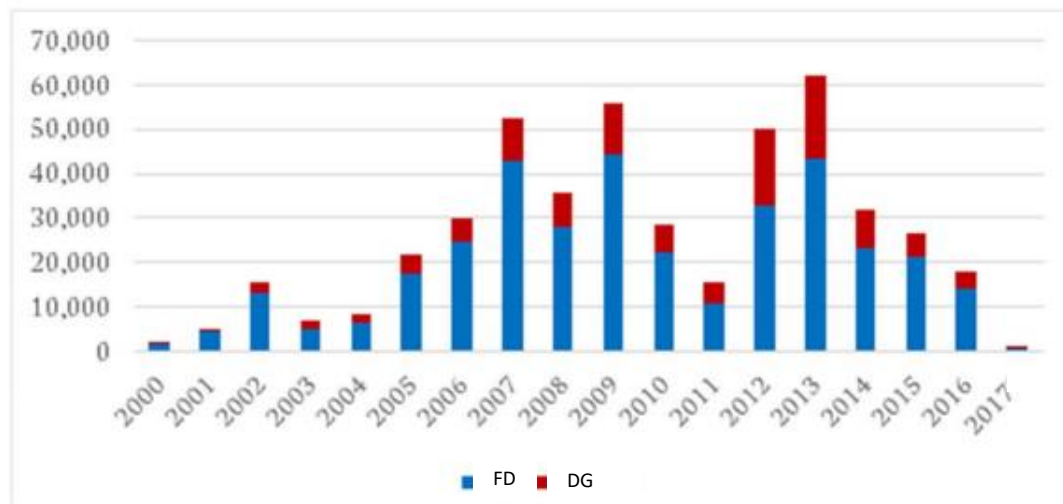


Figura 3. Número de casos de dengue reportados en México en los años 2000-2016. (FUENTE: SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue). En azul se muestran los casos de fiebre por dengue (FD) y en rojo los casos de dengue grave (DG).

Haciendo una comparación más detallada entre los años 2016 y lo que va del año 2017, se han confirmado 1,236 casos de dengue en nuestro país, lo que representa una disminución del 66.9% en los casos confirmados con respecto al mismo periodo de 2016, donde se habían confirmado 3,735 casos (Tabla1) y que el estado con mayor incidencia de dengue es Chiapas (Fig.4) (<http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/236401/sem25.pdf>).

| Indicador | Semana 20, 2016 | Semana 20, 2017 | % de variación |
|------------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Dengue no grave (DNG) | 2,814 | 913 | -67.6% |
| Dengue con signos de alarma (DCSA) | NA | 267 | - |
| Dengue Grave (DG) | NA | 56 | - |
| DCSA + DG | 921 | 323 | -64.9% |
| Total confirmados | 3,735 | 1,236 | -66.9% |
| Defunciones | 11 | 3 | -72.7% |
| Letalidad | 1.19 | 0.93 | -22.2% |

Tabla 1. Casos confirmados de dengue en México en la semana 20 del año 2016 y en la semana 20 del año 2017. (FUENTE: SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue. NA: No Aplica.)

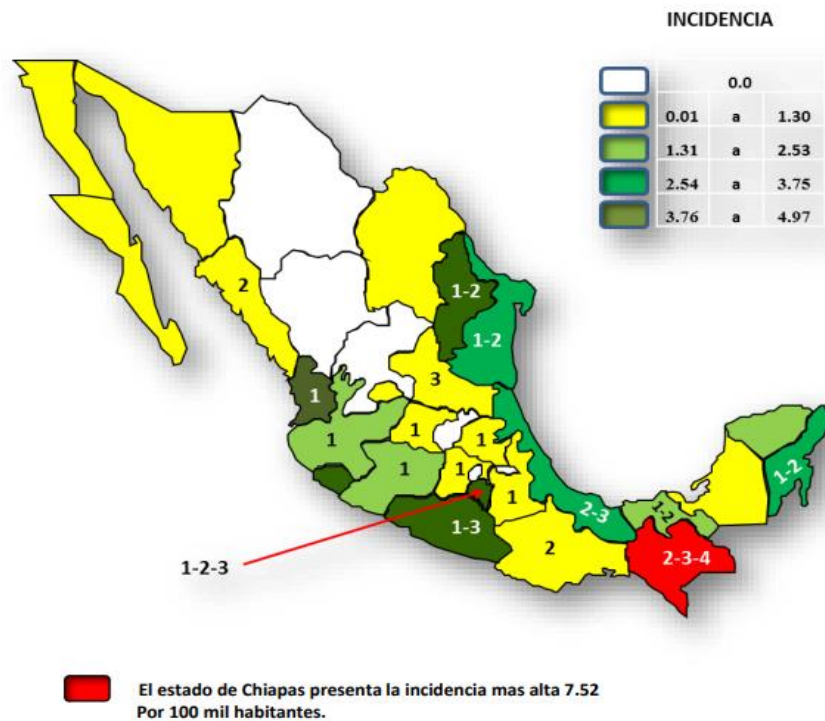


Figura 4. Incidencia de dengue y distribución de serotipos en México en la semana 25 del año 2017. (SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue con información reportada por el InDRE hasta la semana 25).

1.2. Sintomatología del dengue

En humanos, los síntomas de infección usualmente inician entre los 4 y los 7 días después del piquete por el mosquito infectado. La infección por dengue

puede ser asintomática, media o severa con hemorragia espontánea (Gubler., 2002). La alta fiebre es el síntoma más común de la infección con DENV, aunque también se observan complicaciones severas como en el síndrome de shock por dengue (DHS) o fiebre hemorrágica por dengue (DHF) (Rockstroh et al., 2015).

La infección por dengue es a menudo asintomática y el curso de la infección en humanos se divide en tres fases como se observa en la figura 5 (Martina., 2014). El periodo febril se caracteriza por un aumento repentino de la temperatura (39°C- 41°C) que puede durar de dos a siete días. Durante este periodo el paciente puede presentar salpullido, dolor de cabeza severo, dolor retro-orbital, dolor muscular, dolor en ligamentos y molestias gastrointestinales. Una vez que la fase febril pasa se considera que el paciente entra en la fase crítica en la que algunos individuos pueden presentar síndrome de hiper-permeabilidad que resulta en la fuga de plasma de algunas cavidades, esta fase dura de 24 a 48 h y se caracteriza por un pulso débil y rápido con hipotensión y piel fría y pegajosa que refleja un estado de shock. Si el paciente no es tratado con rapidez puede entrar en un estado de shock profundo y desarrollar acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada ocasionando falla de múltiples órganos desembocando finalmente en la muerte (Martina., 2014).

Aproximadamente medio millón de hospitalizaciones y varios miles de fatalidades son causadas por DENV cada año. Durante la primera fase de la infección, el dengue se puede diagnosticar por la detección directa de RNA viral o por la presencia de la proteína no estructural NS1 que es secretada por las células infectadas (Rockstroh et al., 2015).

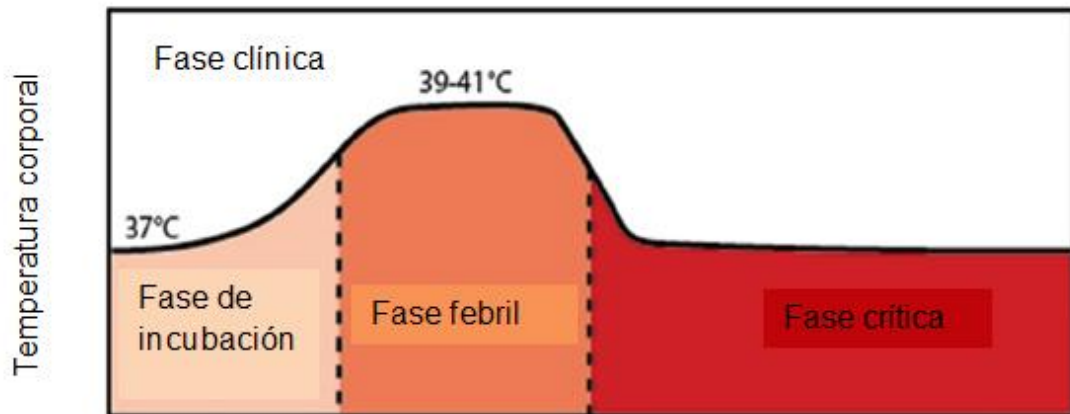


Figura 5. Fases de la infección por DENV (Martina., 2014).

1.3 Vectores de transmisión

La propagación del dengue se atribuye a la expansión geográfica de los vectores que transmiten el dengue, estos son los mosquitos *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Aedes polyneciensis* (Denysiuk et al., 2015).

El mosquito *Aedes aegypti* es una especie tropical y subtropical ampliamente distribuida a nivel mundial y es el principal vector del virus de la fiebre amarilla y el dengue (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>). También puede transmitir el virus Zika y Chikungunya. Vive mayoritariamente en hábitats urbanos y se desarrolla principalmente en contenedores hechos por el hombre. A diferencia de otros mosquitos, se alimenta durante el día, mostrando el mayor número de piquetes en la mañana y por el atardecer (Denysiuk et al., 2015), (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>). *Ae. Aegypti* se encuentra presente también en hábitats selváticos por lo que presenta 2 ciclos, el urbano y el selvático. Estos ciclos involucran a huéspedes humanos para el urbano y a primates para el selvático. (<http://www.southsudanmedicaljournal.com/archive/february-2012/dengue-fever.html>) (Fig. 6)

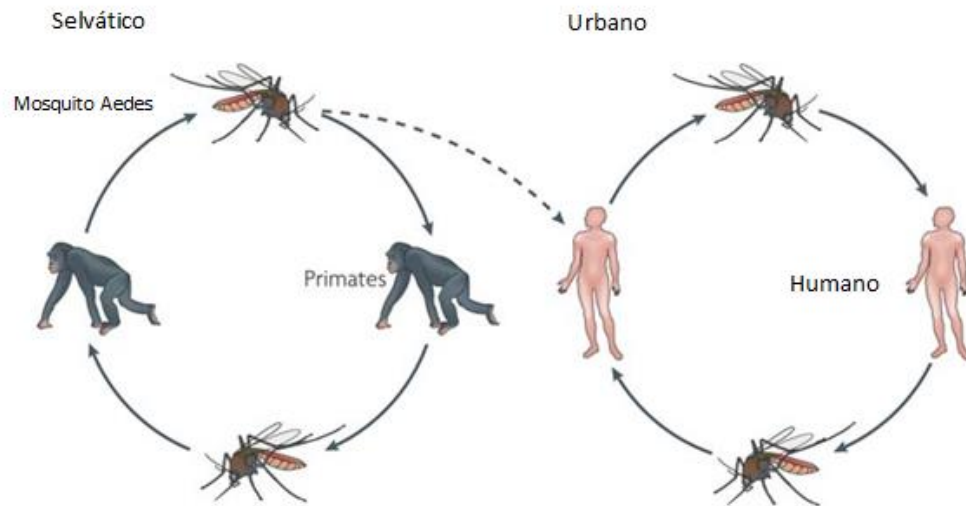


Figura 6. Ciclo urbano y selvático de *Ae. aegypti* (Modificado de: Nature reviews Microbiology 2007; 5: 518 – 528)

El mosquito *Ae. albopictus*, vector secundario, se ha expandido en Asia, Norte América y más de 25 países en la región europea, principalmente por la facilidad de movilidad entre países. Es altamente adaptable y puede sobrevivir a temperaturas bajas. Es vector del virus del dengue, virus del zika y virus del Nilo oriental (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>).

El virus se transmite a los humanos por el piquete del mosquito hembra produciendo la infección. Después de la incubación del virus por 4 a 10 días, el mosquito infectado es capaz de transmitir la enfermedad por el resto de su vida. Los humanos sintomáticos o asintomáticos son los principales portadores y amplificadores del virus (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>).

El ciclo de vida de un mosquito tiene cuatro diferentes etapas: huevo, larva, pupa y adulto (Fig.7). Las primeras tres etapas tienen lugar en sitios con agua, mientras que la fase adulta se desarrolla fuera del agua y se le conoce como fase aérea. La prevención primaria del dengue reside principalmente en el

control de los mosquitos y actualmente existen dos métodos: control larval y control del mosquito adulto (Derouich *et al.*, 2003; Devine *et al.*, 2009).

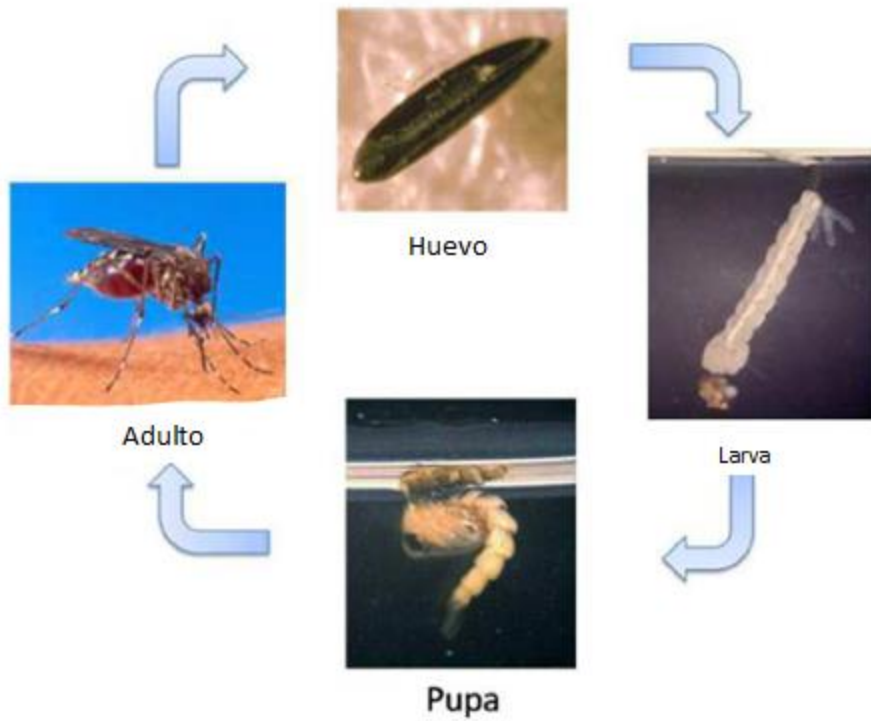


Figura 7. Ciclo de vida de un mosquito. (Denysiuk *et al.*, 2015).

1.4 Virus del dengue

DENV es un virus envuelto que pertenece a la familia flaviviridae, género flavivirus. Su tamaño es de aproximadamente 50 nm y su genoma consta de una molécula de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva y de 11 kb de longitud con un solo marco de lectura abierta (ORF, Open Reading Frame) (Lindenbach *et al.*, 1990). Incluye una región 5' UTR de 100 nucleótidos y una región 3' UTR de 400 a 800 nucleótidos y no es 3' poliadenilado (Fig 8) (Wengler *et al.*, 1978).

La región 3' UTR incluye varias secuencias conservadas y estructuras que tienen funciones importantes en la replicación viral y la traducción, como:

1. Secuencia nucleotídica larga (90-120 nucleótidos) que forma un loop, esta estructura es compartida por todos los flavivirus (Brinton *et al.*, 1986), (Hahn *et al.*, 1987).
2. Los dominios muy bien conservados CS1, CS2, RCS2 y algunas secuencias repetidas en tándem (R) presentes en los flavivirus (Hahn *et al.*, 1987).

Los elementos requeridos para la síntesis del RNA y el inicio de la traducción pueden ser encontrados en la región 5'UTR y 3'UTR del genoma viral. También, la estructura secundaria del RNA en la región 3'UTR provee resistencia contra las RNasas celulares (Morrison *et al.*, 2012).

La traducción del único ORF da como resultado una poliproteína que es cortada por proteasas del huésped y derivadas del virus para producir las proteínas estructurales (C, prM/M, E) y no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Weaver *et al.*, 2009).

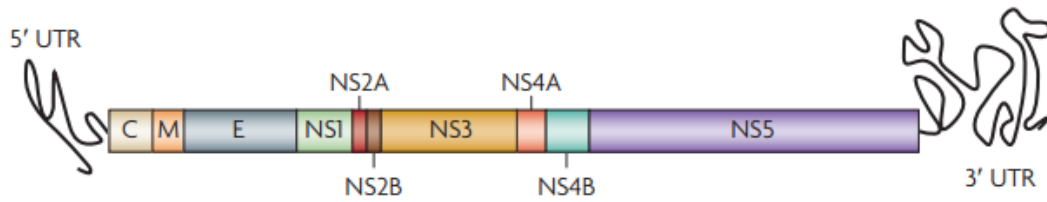


Figura 8. Esquema del genoma de DENV(Guzman *et al.*, 2010).

1.4.1 Regiones UTR

La región 5'UTR del genoma de DENV tiene una longitud de entre 91 y 101 nucleótidos. Contiene dos dominios que tienen diferentes funciones durante la síntesis del RNA viral. El primer dominio de ~70 nucleótidos se pliega formando un bucle de tallo largo (SLA). Se ha propuesto que esta estructura actúa como promotor de la RdRp (NS5) viral (Filomatori *et al.*, 2006) (Yu *et al.*, 2008).

El segundo dominio forma un bucle de tallo corto (SLB) que contiene secuencias esenciales de largo alcance para la interacción RNA-RNA y la replicación del genoma (Alvarez *et al.*, 2005).

Los dos dominios están separados por una secuencia de Oligo(U) que funciona como espaciador para que los dos tallos de los bucles funcionen apropiadamente (Lodeiro *et al.*, 2009) (Fig. 9)

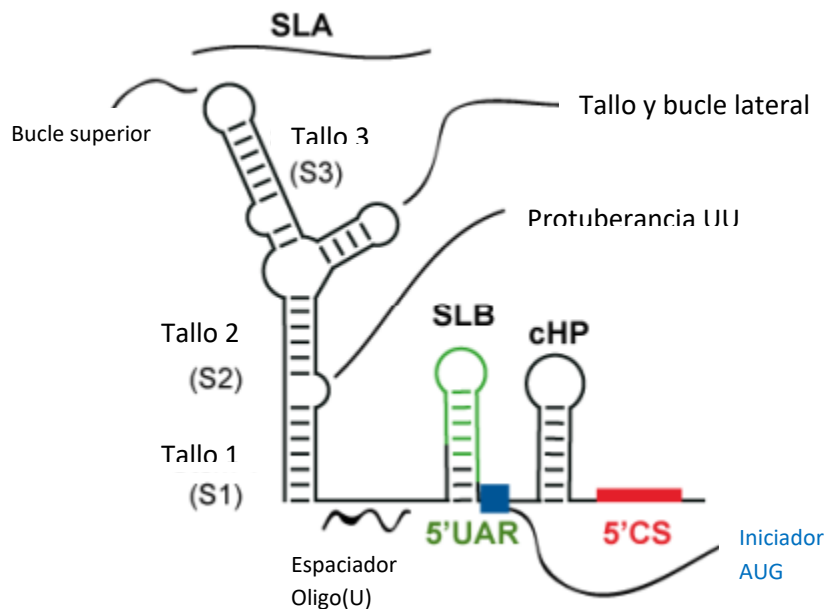


Figura 9. Representación de la región 5'UTR de DENV (Gebhard *et al.*, 2011)

La región SLA tiene una estructura en forma de "Y" y tres regiones helicoidales (S1, S2 y S3) interrumpidas por protuberancias y regiones de cadena sencilla altamente reactivas. Cuenta también con un bucle con tallo lateral y un bucle superior (Fig. 9). Dentro de la secuencia codificadora, justo debajo del codón de inicio de la traducción AUG, se encuentra una horquilla estable cHP, requerida para la replicación viral (Clyde *et al.*, 2008).

Estructuras específicas en la región 3' del genoma viral también tienen papeles cruciales en la síntesis del RNA viral. La región 3'UTR de DENV de ~450 nucleótidos de largo, se puede dividir en tres dominios. El dominio I se localiza inmediatamente después del codón de paro (Alvarez *et al.*, 2005) y es la región más variable dentro de la región 3'UTR. Tiene diferentes tamaños entre serotipos y puede ir desde 120 a menos de 50 nucleótidos (Zhou *et al.*, 2006). El dominio II tiene una estructura parecida a una pesa (DB), que es duplicada en tándem. Los elementos DB contienen secuencias conservadas CS2 y RCS2.

El dominio III es la región más conservada de la parte 3'UTR, contiene un elemento CS1 seguido de una estructura terminal de tallo con bucle (3'SL). CS1 contiene una secuencia de largo alcance para la interacción RNA-RNA entre los extremos del genoma viral (Hahn *et al.*, 1987). La estructura terminal 3' contiene un bucle de tallo corto de 14 nucleótidos (sHP) seguido de un bucle de tallo largo de 79 nucleótidos. Las dos estructuras adyacentes involucran 93 nucleótidos y son referidas como 3'SL (Fig. 10) (Gebhard *et al.*, 2011).

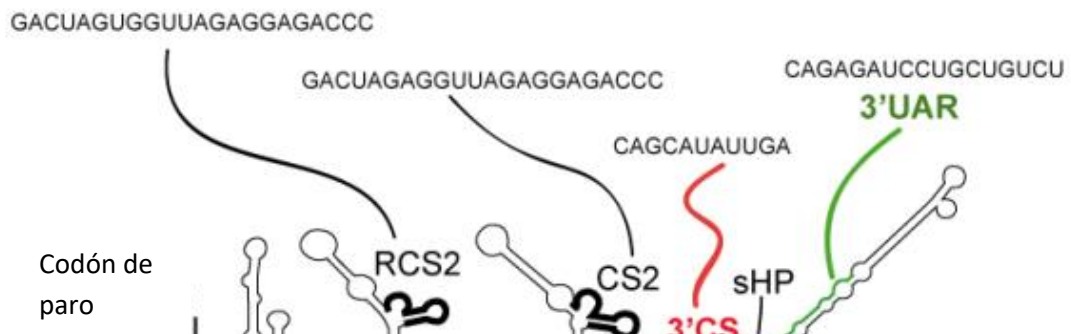


Figura 10. Región 3'UTR viral (Gebhard *et al.*,2011).

1.4.2 Proteínas no estructurales

NS1, es una proteína dimérica de anclaje de 46 kDa que existe de forma intra y extra celular (Fernandez *et al.*, 2009). Es una glicoproteína secretada por las células infectadas por lo que se usa para el diagnóstico de la infección por dengue. También está implicada en la replicación viral. (Tang *et al.*, 2015).

NS2A, es una proteína pequeña transmembranal de 22 kDa que tiene un papel vital en el ciclo de vida del virus y participa en el empaquetamiento del RNA (ensamblaje del virión) y la replicación (Wu *et al.*, 2015).

NS2B, es una proteína de 13 kDa asociada a la membrana, tiene un segmento hidrofílico, requerido para su actividad de cofactor para activar a la serina proteasa NS3 (Erbel *et al.*, 2006), y 3 regiones hidrofóbicas que son las responsables de su asociación a la membrana y de generar la actividad desestabilizadora de membrana y se ha sugerido que tiene un papel potencial en el cambio de permeabilidad de la membrana durante la infección por DENV organizándose para formar poros (León *et al.*, 2016).

NS3, es una proteína cuya secuencia consta de 168 aminoácidos, contiene dominios serin proteasa y helicasa requeridos para la replicación de DENV. Tiene al menos 30 epítopes para células T, esta región está muy conservada

entre los 4 serotipos de DENV (78%). Es un potente estimulador de la respuesta inmune mediada por células (Simmons *et al.*, 2016).

NS4A es una proteína pequeña integral de membrana, 16 kDa, que contiene cuatro dominios transmembranales, es crucial para la formación de estructuras de membrana inducidas por el virus. Interactúa estrechamente con las membranas del huésped. Se ha reportado que la interacción directa de NS4A con la proteína de citoesqueleto, vimentina, es necesaria para la correcta localización del complejo de replicación en el sitio perinuclear (Hung *et al.*, 2015).

NS4B es una proteína transmembranal que funciona como un componente esencial del complejo de replicación viral (Wang *et al.*, 2015). Las proteínas NS4A y NS4B tienen un tamaño de 16 y 27 kDa respectivamente. NS4B actúa también como un inhibidor de la señal de interferón (IFN) (Weaver *et al.*, 2009).

NS5, es una proteína de 105 kDa que codifica una RNA guanilil transferasa, una metil transferasa y una RNA polimerasa dependiente de RNA (Morrison *et al.*, 2012), inductora de interleucina 8 (IL-8) y de localización nuclear (Weaver *et al.*, 2009).

1.4.3 Proteínas estructurales

La proteína de la cápside (C) es un homodímero de 11 kDa esencial para la encapsidación del RNA (Chang *et al.*, 2001).

La proteína de membrana (prM/M) se sintetiza como una proteína precursora (prM) de 21 kDa aproximadamente, está presente en partículas de DENV inmaduras que contienen 60 espigas en su superficie, cada una compuesta de tres heterodímeros prM/E. Se corta en la red del trans Golgi por una proteasa, furina, generando la proteína M de 8 kDa y el péptido pr. El ambiente ácido de la red trans-Golgi induce cambios conformacionales en el heterodímero prM/E que exponen el sitio de corte (Yu *et al.*, 2008).

La proteína de envoltura (E) es una proteína dimérica de fusión a membrana de clase II, glicosilada en los residuos aminoacídicos Asn67 y Asn153 que aseguran su correcto plegamiento (Rodenhuis *et al.*, 2010). Mediante la unión del virus a la célula huésped y la fusión de este con la membrana celular. Cada monómero de la proteína E está compuesto de tres dominios distintos (Fig. 11):

-Dominio I: consta de 8 láminas β con estructura de barril orientado de forma paralela a la membrana viral, representa el dominio de dimerización (Martina., 2014).

-Dominio II: Compuesto de 12 láminas β y 2 hélices α , compuesto por un par de loops discontinuos de los cuales uno está muy conservado entre los flavivirus que funciona como un péptido de fusión interna y es estabilizado por tres puentes disulfuro. Se ha hipotetizado que está involucrado en la estabilización del dímero de glicoproteína E y en iniciar el proceso de fusión.

-Dominio III: extremo C-terminal, localizado en la superficie lateral del dímero interactúa con receptores celulares para la entrada del virus. Forma una estructura parecida a inmunoglobulina (IgG like) con 10 láminas β (Martina., 2014).

La proteína E se ancla a la envoltura viral a través de 2 hélices transmembranales antiparalelas localizadas en el extremo C terminal de la proteína (Kuhn et al., 2002).

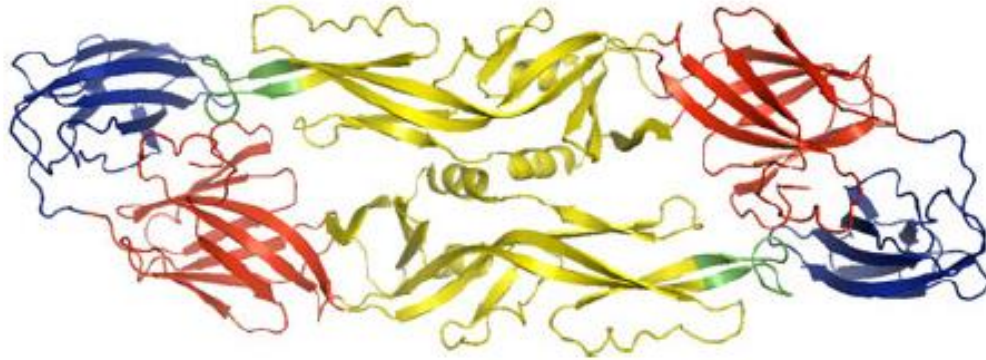


Figura 11. Dímero de proteína E con los tres dominios definidos de cada monómero. El dominio I se muestra en rojo, dominio II en amarillo con el loop de fusión en verde y el dominio III en azul (Rodenhuis *et al.*, 2010).

Aunque la principal función de la proteína E es la de unirse a receptores durante la entrada del virus a la célula hospedera y subsecuente fusión de membrana, se especula que puede tener otras funciones como la interacción con proteínas celulares del hospedero para facilitar el ciclo de replicación viral especialmente alterando la respuesta inmune del hospedero y manipulando vías celulares para crear un ambiente más favorable para la replicación viral (Jitoboam et al., 2016).

1.5 Ciclo viral

El reconocimiento de la célula blanco por el virus depende de la interacción entre proteínas de superficie viral y componentes de la membrana plasmática celular. La susceptibilidad de la célula hospedera depende de la abundancia y distribución de los receptores celulares (Cruz *et al.*, 2015). Esta unión se da de una manera no específica, concentrando al virus en la superficie celular y facilitando la unión con el receptor, una molécula que promueve la entrada del virus a la célula huésped (Grove *et al.*, 2011).

Hasta el momento, no existe un resultado concreto sobre el número de receptores que existen para DENV, sin embargo algunos resultados sugieren que puede tratarse de complejos proteicos y no proteicos que son específicos para DENV y que permiten su internalización a la célula (Cruz *et al.*, 2015). Algunos de estos complejos son los glicosaminoglicanos (GAGs), ya que la infección por dengue se ha inhibido al incubar el virus con heparina, altas concentraciones de heparan sulfato o suramina (Chen *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2006), también se ha inhibido después de someter a la célula a tratamientos con heparina o heparan sulfato previo al contacto con DENV (Germi *et al.*, 2002).

Un candidato a receptor para DENV muy prometedor se identificó en las células dendríticas (DC) consideradas uno de los principales blancos de DENV en la replicación *in vivo* (Wu *et al.*, 2000; Marovich *et al.*, 2001). En estas se encontró una correlación positiva entre la infección por DENV y la expresión de una molécula de adhesión intercelular no específica que se une a no-integrinas (DC-SIGN) (Navarro *et al.*, 2003). El tratamiento con anticuerpos anti-DC-SIGN bloqueó la infección de DENV y la expresión de DC-SIGN en células que no expresaban inicialmente la molécula las hizo susceptibles a la infección por DENV, y un polimorfismo en el promotor de DC-SIGN se asoció con un elevado riesgo de contraer dengue hemorrágico en vez de desarrollar fiebre por dengue (Sakuntabhai *et al.*, 2015).

Dado que la glicosilación en insectos y en mamíferos es distinta, se han hecho otros trabajos que proponen otros receptores putativos tanto en células de mamífero como en células de mosquito (Cruz *et al.*, 2015; Muñoz *et al.*, 2013).

Algunos ejemplos de estos trabajos en células de mamífero se mencionan a continuación:

- Con anticuerpos anti-DIII se bloqueó exitosamente la unión con células vero (Crill *et al.*, 2001)

- Con DIII recombinante se inhibió la entrada de DENV a células de mamífero BHK-21 y HepG2 y a células C6/36 de *Ae. albopictus* (Hung *et al.*, 2004; Fink *et al.*, 2007).

Las técnicas que se han utilizado para la determinación de receptores putativos en células de mosquito son muy variadas, por el momento el candidato mejor caracterizado es la prohibitina (35kDa) que se identificó por VOPBA y espectroscopía de masas con células C6/36 y la línea CCL-125 y *Aedes aegypti* adultos. Las células que se trataron con anticuerpos anti-prohibitina y el silenciamiento de mRNA de prohibitina 1 resultaron en la inhibición de la replicación de DENV, posteriormente su interacción específica con la proteína E se demostró por colocalización mediante microscopía de fluorescencia (Kuadkitkan *et al.*, 2008).

Algunos de los receptores putativos se han descrito específicamente para un serotipo en particular, por lo que es importante mencionar los estudios hechos por Mercado *et al.*, 2008, ya que son de los pocos trabajos que proponen receptores para los cuatro serotipos de dengue y de manera específica se enfocan en las células epiteliales de intestino medio de mosquito que es el sitio por donde DENV entra en el mosquito. Estos trabajos se llevaron a cabo con cromatografías de afinidad, VOPBA, uso de anticuerpos y de proteína E recombinante logrando proponerse algunos receptores putativos como las proteínas de 67 (enolasa) y 80 kDa (Muñoz *et al.*, 1998; Mercado *et al.*, 2006; Mercado *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2013).

Los estudios que se han realizado con células de mosquito para determinar el posible receptor de DENV se enlistan a continuación en la tabla 2:

| Molécula | Tipo | Células y tejidos | Serotipo | Referencias |
|-------------|---------------|------------------------------|----------|---|
| Prohibitina | Proteína | C6/36 CCL-125 | DENV 2 | Kuadkitkan <i>et al</i> 2010 |
| 40 y 45 kDa | Glicoproteína | C6/36 Tejidos de mosquito | DENV 4 | Salas <i>et al</i> 1997 Yazi <i>et al</i> 2002 |

| | | | | |
|------------------------------------|-------------|--|-------------------|--|
| | | | | Reyes <i>et al</i> 2004 |
| 67 y 80 kDa | Proteína | C6/36 Intestino medio de <i>Ae. aegypti</i> | DENV 1,2,3 y 4 | Muñoz <i>et al</i> 1998 Mercado <i>et al</i> 2006 Mercado <i>et al</i> 2008 Muñoz <i>et al</i> 2013 |
| 55 kDa | Tubulina | C6/36 | DENV 2 | Chee <i>et al</i> 2004 |
| 77, 58,54 y 37 kDa | Desconocida | Glándulas salivales de <i>Ae. aegypti</i> | DENV 1,2,3 y 4 | Cao <i>et al</i> 2009 |
| 67, 56, 54, 50 y 48 kDa | Desconocida | Glándulas salivales de <i>Ae.</i> <i>polynesiensis</i> | DENV 1 y 4 | Cao <i>et al</i> 2009 |

Tabla 2. Receptores putativos de DENV en células de insecto (Cruz *et al.*, 2015).

Una vez que el virus se une al receptor, es internalizado por endocitosis mediada por receptor. Las partículas virales son entregadas a endosomas tempranos Rab5 positivos, que maduran en endosomas tardíos Rab7 positivos en los que ocurre la fusión primaria de membranas (Rodenhuis *et al.*, 2010). Cuando DENV llega al endosoma tardío, tres residuos de histidina en el extremo N-terminal de la proteína M se protonan promoviendo la disociación de las proteínas M y E, exponiendo el loop de fusión y permitiendo el acceso del genoma viral al citoplasma (Fig. 12) (Liu *et al.*, 2014).

El genoma viral funciona como mRNA siendo traducido por la maquinaria celular generando las proteínas virales. Después, el genoma es replicado y las nuevas moléculas de RNA son incorporadas a las partículas nacientes (Cruz *et al.*, 2015). El ensamblaje de DENV ocurre en el retículo endoplásmico y los viriones son transportados por la red trans-Golgi (TGN) y finalmente secretados (Fig.12) (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

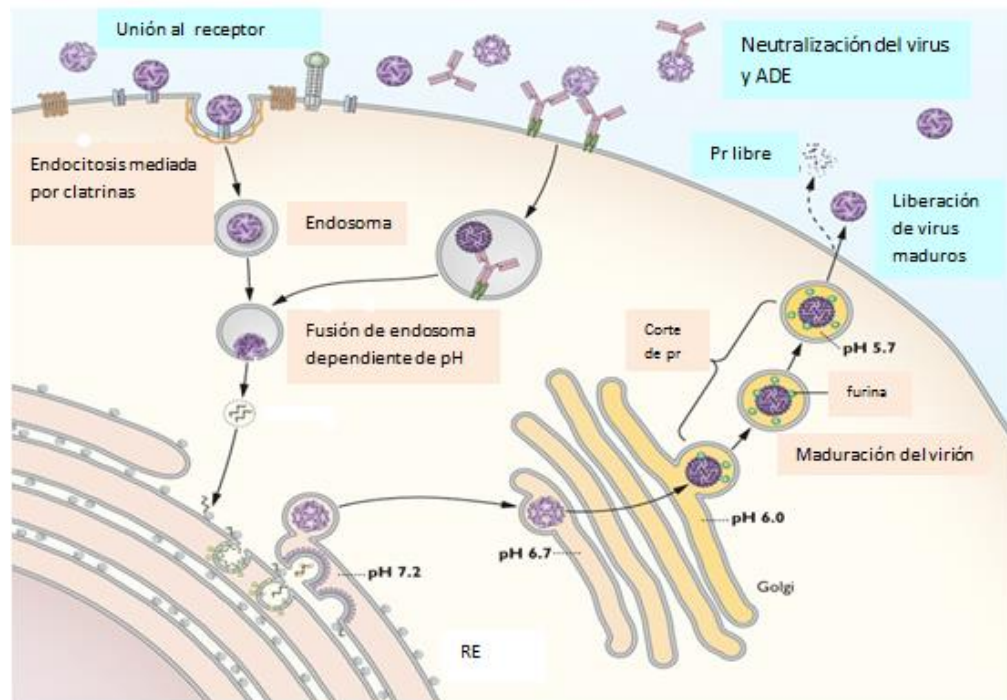


Figura 12. Ciclo viral de DENV (<https://www.niaid.nih.gov/research/ted-c-pierson-phd>).

La maduración del virus ocurre en TGN, en donde la proteasa furina corta a prM, generando a la proteína M (8 kDa) y al péptido pr (Yu *et al.*, 2008). El ambiente ácido de TGN induce un cambio conformacional en el heterodímero prM:E que expone el sitio de corte (Randolph *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 2008). prM interactúa con la proteína E estabilizando el dominio II, la secuencia de barril β de pr actúa como un escudo que protege el loop de fusión. Después de la escisión, el péptido pr permanece asociado al virión a pH ácido previniendo la actividad fusogénica a través de la vía secretoria de TGN (Liu *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2008).

1.5.1 Replicación del genoma viral

El ensamblaje del complejo de replicación de un flavivirus conlleva tres pasos principales: síntesis de RNA, encapsamiento y metilación del RNA para producir un genoma con una estructura de capuchón tipo 1 (m_7GpppN_m -RNA) en su extremo 5'. La síntesis de RNA en los flavivirus es semiconservativa y asimétrica. El RNA con sentido (+), con la misma polaridad que el genoma viral, se forma predominantemente sobre el RNA con sentido (-) (Wengler *et al.*, 1978).

Con base en las observaciones anteriores, un esquema general de la síntesis de RNA y de asociación con la actividad enzimática requerida se muestra en la figura 13.

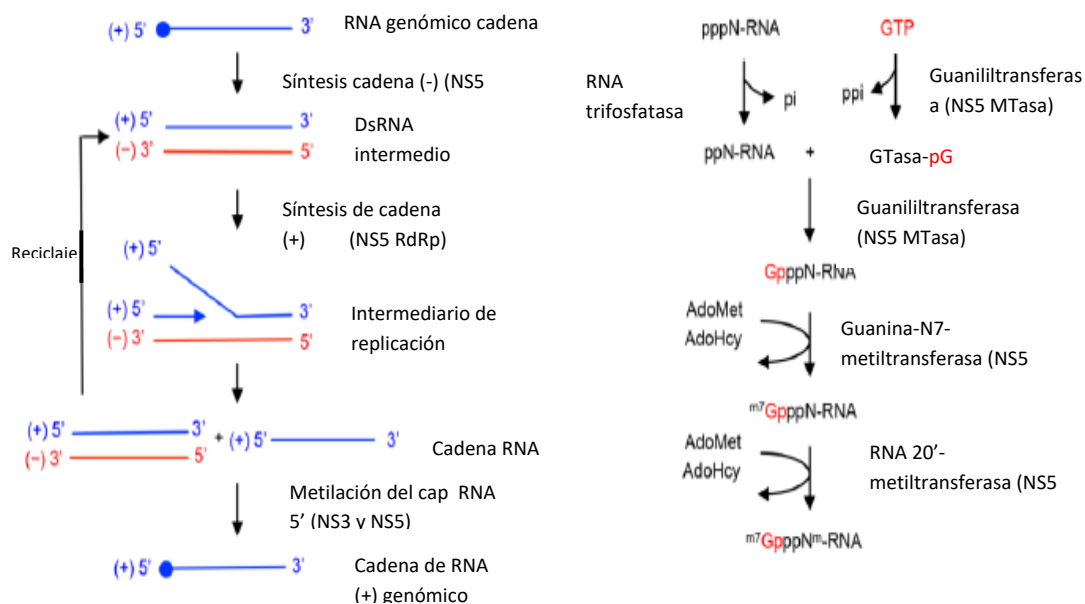


Figura 13. Replicación de RNA flaviviral (izquierda) y síntesis del cap RNA 5' (derecha) por las proteínas NS3 y NS5.

Una cadena de RNA genómico (+) sirve como templado para producir una cadena de RNA (-). La cadena de RNA (-) existe como un intermediario dsRNA (forma replicativa). La cadena (-) del intermediario dsRNA es usada como un templado para la síntesis de la cadena de RNA (+). El producto dsRNA es liberado y reciclado para la síntesis de RNA (+). La replicación flaviviral es asimétrica y múltiples copias de la cadena de RNA (+) son sintetizadas a partir de la cadena (-). A la cadena de RNA (+) se le pone un cap (capuchón), el cuál es metilado por las proteínas NS3 y NS5 para formar la cadena de RNA (+) genómico (Fig.13 lado izquierdo) (Klema *et al.*, 2015).

El cap de tipo 1 es formado en la cadena de RNA (+) mediante la actividad enzimática secuencial de RNA trifosfatasa, guanilil-transferasa, guanina-N7-MTasa y RNA 2'O-MTasa. Primero, la actividad trifosfatasa de la NS3 helicasa libera el fosfato terminal del extremo 5'trifosfato de la cadena de RNA (+). Una guanosina monofosfatada es transferida de un GTP al extremo 5' del RNA defosforilado por la actividad guanilil transferasa de la NS5 MTasa. El RNA con el cap es metilado primero en la posición N7 del cap de guanina y

posteriormente en la posición 2'-O de la ribosa del primer nucleótido de RNA. El dominio MTasa de NS5 lleva a cabo las dos metilaciones usando S-adenosil-L-metionina (AdoMet) como donador de metilo. AdoMet es convertido a S-adenosil-L-homocisteína (AdoHcy) durante el proceso (Fig. 13 lado derecho) (Klema *et al.*,2015).

1.5.2 Complejo de replicación flaviviral

La replicación del genoma en los flavivirus es llevada a cabo por un complejo de replicación viral unido a la membrana del RE de la célula hospedera. Este complejo consiste en las proteínas NS, RNA viral y proteínas del huésped no identificadas (Lindenbach *et al.*, 2007).

El complejo de replicación flaviviral se ensambla en la cara citoplasmática de la membrana del RE. Este complejo de replicación se asocia con la vesícula viral formada por la invaginación de la membrana del RE. Las proteínas virales NS2A, NS2B, NS4A y NS4B forman un andamio para el ensamblaje de las proteínas NS3 y NS5. NS2B interactúa con NS3 a través de su dominio proteasa y con NS4B mediante su dominio Helicasa. NS5 solo interactúa con NS3. Un dímero de NS1 se localiza en el lumen del RE y se asocia con NS4A y NS4B (Fig. 14) (Klema *et al.*, 2015)

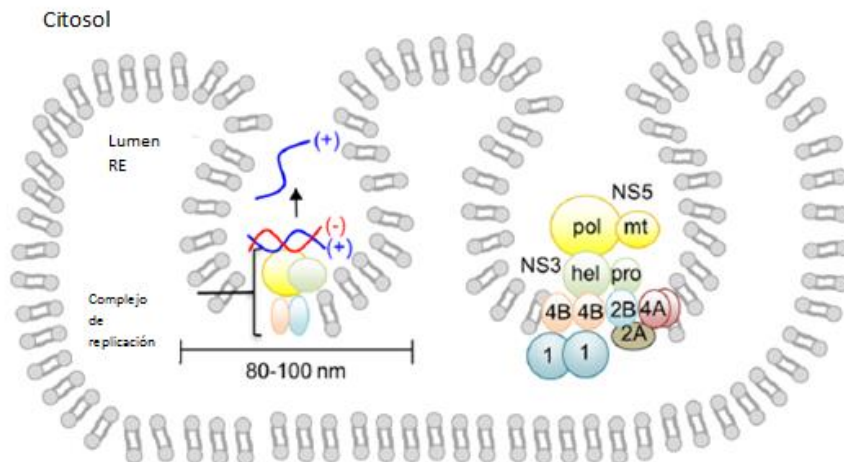


Figura 14. Complejo de replicación flaviviral ensamblado en el lado citoplasmático de la membrana del RE.

1.6 DENV y sistema inmune

La respuesta inmune innata y la respuesta de interferón (IFN) tipo I funcionan como la primera línea de defensa contra infecciones virales. La mayoría de los virus tienen como blanco estos dos elementos para evitar ser reconocidos en las células infectadas y así lograr una infección eficiente en el huésped (Morrison et al., 2012).

Cuando hay una infección, la acumulación de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) facilita la detección del virus a través de una serie de receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) en el huésped, lo cual activa a las células presentadoras de antígeno (APC). Las células dendríticas (DCs) son APCs y las primeras células que interactúan con DENV después de una picadura de un mosquito infectado. Los PRRs más relevantes para la detección del dengue son los receptores tipo Toll asociados a membrana (TLR3 / TLR7 / TLR8) y los receptores citosólicos (RIG-I / MDA-5) (Morrison et al., 2012).

DENV lleva a cabo una evasión pasiva de la detección por PRRs, la cual se logra por la formación de paquetes vesiculares (VPs) y de membranas en complejo (CMs), estas estructuras son formadas por la entrada del virus a la célula. Este rearrreglo intracelular provee un marco físico que concentra componentes virales y del huésped requeridos para la replicación viral. Las VPs son vesículas unidas al RE que contienen múltiples proteínas no estructurales, dsRNA y RNA sintetizado *de novo* y están conectadas por poros al citoplasma. Este rearrreglo espacial crea un microambiente parcialmente aislado del citosol y algunos de sus componentes, esto promueve la concentración de productos virales necesarios para la replicación y se opone a la interacción física con los PRRs del huésped (Morrison et al., 2012).

La señalización por IFN tipo I (Fig.15) es iniciada cuando IFN α/β se une a los receptores de IFN tipo I (IFNAR), presentes en la superficie de la mayoría de

las células, lo que provoca la activación de las tirosina-cinasas asociadas a receptor Jak1 y Tyk2 que fosforilan a STAT1 y STAT2, las cuales junto con el factor regulador de interferón 9 (IRF9) forman un complejo heterotrimérico conocido como ISGF3 que se transloca al núcleo y se une al elemento de respuesta estimulada por IFN (ISRE) que se encuentra upstream de los genes estimulados por IFN (ISGs). Cuando los ISGs se transcriben, sus productos promueven un estado antiviral. DENV antagoniza esta ruta de señalización utilizando a NS5 para degradar a STAT2 y usando a NS2A, NS4A y NS4B para inhibir los pasos previos a la activación de STAT1 (Morrison et al., 2012).

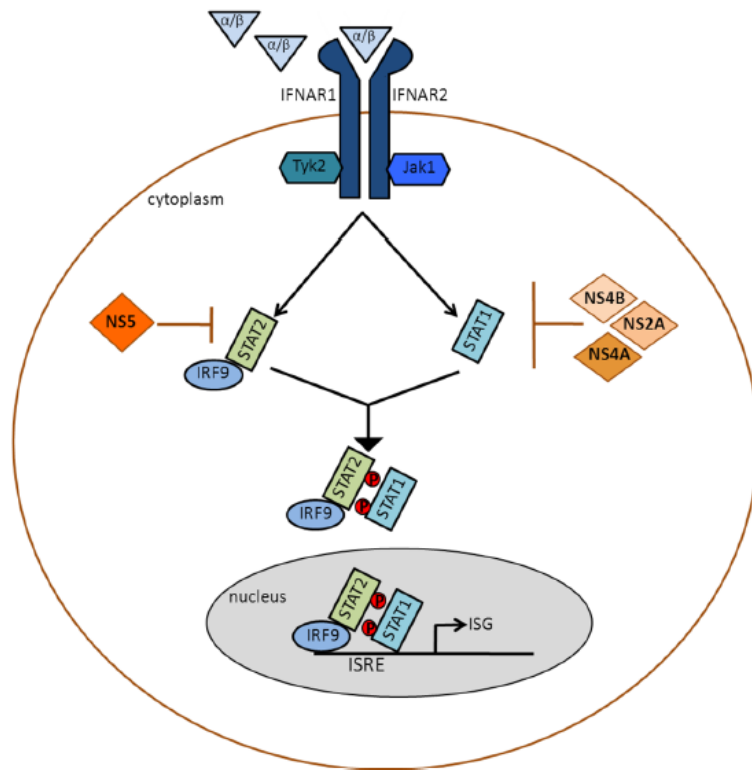


Figura 15. Inhibición de la señalización por IFN tipo I por DENV (Morrison et al., 2012).

Justificación

Hasta este momento no existen medidas preventivas para bloquear la infección en humanos por el DENV, por lo que es necesario establecer nuevas estrategias de control del virus como el bloqueo de la infección en el vector transmisor, a través de los receptores del virus en células de su intestino medio. De esta manera se podrán desarrollar estrategias para inhibir la infección de los mosquitos, como por ejemplo la generación de mosquitos transgénicos que no tengan estos receptores y así evitar la transmisión a los humanos. Para lo cual es necesario identificar los receptores a los virus en células de mosquitos mediante la expresión de la obtención de la proteína E recombinante del virus.

Hipótesis

Si se sobre expresa y purifica exitosamente la proteína E de DENV-2 y se hacen columnas de sepharose 2B con la proteína E acoplada covalentemente, entonces se podrán identificar proteínas de intestino medio de mosquito que estén funcionando como receptores para el DENV-2.

Objetivo general

Identificar receptores putativos para DENV-2 en mosquitos *Ae. Aegypti* con diferente susceptibilidad a la infección por DENV mediante la clonación y expresión de la proteína E en bacterias.

Objetivos particulares

- 1. Obtención de las construcciones: PJET-E y PPROEX-E, mediante la clonación del amplicon correspondiente a la proteína E
- 2. Expresar y purificar la proteína E.
- 3. Identificar las proteínas de intestino medio de mosquito que se unan a la proteína E utilizando columnas de afinidad.

Materiales y métodos

A. Material biológico

El virus DENV-2 4.4.11 obtenido de muestras clínicas de Veracruz.

Las cepas de *E. coli* DH5 α y BL21 fueron obtenidas del laboratorio del Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV sede Zacatenco.

B. Purificación y cuantificación del RNA del DENV-2

Se usaron 250 μ L de una solución concentrada de DENV-2 4.4.11, los cuáles se separaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se conservó el pellet de partículas virales al cuál se le agregaron 750 μ L de TRIzol® (GibcoRBL) y se lisaron las células pipeteando la mezcla varias veces hasta la completa homogenización de la muestra.

La muestra homogenizada se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 150 μ L de cloroformo y se agitó el tubo por inversión por 15 segundos. Se incubó la muestra 3 minutos a temperatura ambiente, después se centrifugó a 12000 x g por 15 minutos a 4°C y se separó la fase acuosa en un tubo Eppendorf nuevo.

A la fase acuosa se le agregaron 375 μ L de isopropanol 100% y se incubó el tubo a temperatura ambiente por 30 minutos. La muestra se centrifugó a 12000 x g por 10 minutos a 4°C; posteriormente se removió el sobrenadante dejando solo el pellet de RNA, el cual se lavó con 750 μ L de etanol al 75%. Se puso la muestra en el vórtex brevemente y se centrifugó a 7 500 x g por 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se secó el pellet de RNA al aire por 20 minutos y luego se resuspendió, por pipeteo, en 30 μ L de agua libre de RNasas y se incubó la muestra a 60°C por 15 minutos. Una vez resuspendida la muestra se procedió a su cuantificación con el equipo

NanoDrop 2000 de ThermoSCIENTIFIC para conocer la concentración de RNA obtenido y su pureza.

C. Amplificación de cDNA correspondiente a la proteína E

Para la amplificación de la secuencia correspondiente a la proteína E de DENV2 a partir del RNA viral se llevó a cabo una reacción de RT-PCR utilizando el kit One Step RT-PCR de Qiagen y los primers proveídos por Sigma-Aldrich (Tabla 3)

| Primer | Secuencia | Tm (°C) | Tamaño de amplificado |
|------------------|---|---------|-----------------------|
| Forward E | 5'GGGAATTCCATATGTCGATGCGTTGCATAGGAATA3' | 62.5 | 1500 pb |
| Reverse E | 5'CCGCTCGAGTATTTAGGCCTGCACCATAACTCC3' | 66.7 | |

Tabla 3. Primers específicos para amplificar la región codificante de la proteína E de DENV2. En rojo se marcan los sitios de reconocimiento para NdeI en el primer forward y para XhoI en el primer reverse.

Las reacciones que se llevaron a cabo se muestran a continuación en la tabla 4 y las condiciones establecidas en el termociclador GeneAmp PCR system 2700 de Applied Biosystems se muestran en la figura 16.

| Muestra 1 | | Muestra 2 | | Control negativo | |
|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
| Buffer 5X | 4.0 µL | Buffer 5X | 4.0 µL | Buffer 5X | 4.0 µL |
| dNTP mix | 0.8 µL | dNTP mix | 0.8 µL | dNTP mix | 0.8 µL |
| Primer Fwd | 1.0 µL | Primer Fwd | 1.0 µL | Primer Fwd | 1.0 µL |
| Primer Rev | 1.0 µL | Primer Rev | 1.0 µL | Primer Rev | 1.0 µL |
| Mix de enzima | 0.8 µL | Mix de enzima | 0.8 µL | Mix de enzima | 0.8 µL |
| Templado RNA | 5.0 µL | Templado RNA | 9.0 µL | Templado RNA | ----- |
| Agua | 7.4 µL | Agua | 3.4 µL | Agua | 12.4 µL |
| Total de reacción | 20.0 µL | Total de reacción | 20.0 µL | Total de reacción | 20.0 µL |

Tabla 4. Reacciones para RT-PCR

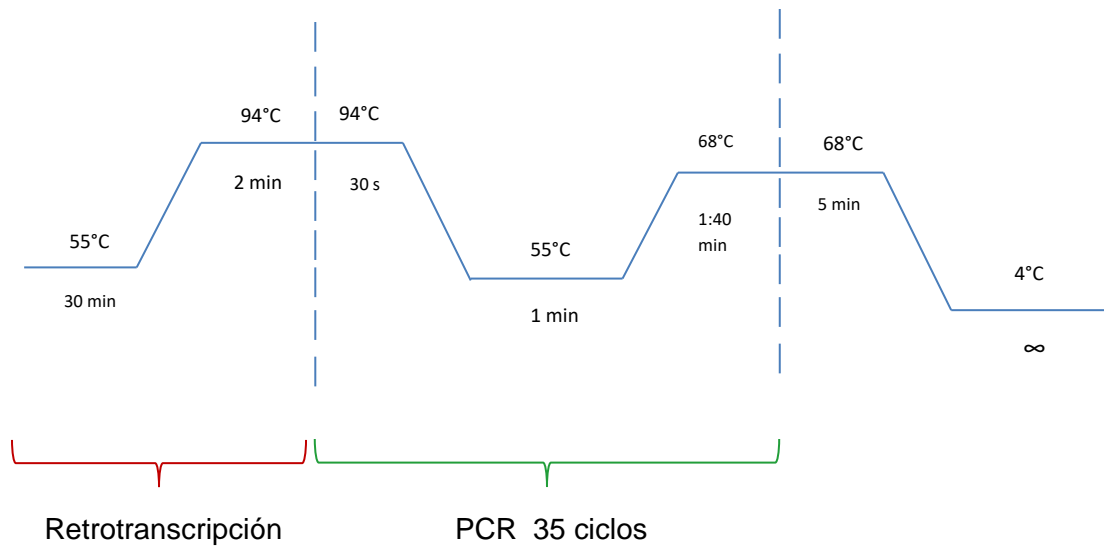


Figura 16. Condiciones para RT-PCR

D. Purificación del fragmento de cDNA correspondiente a la proteína E de DENV-2

El amplificado de la RT-PCR se corrió en un gel de agarosa al 1.5% con el marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder ready to use de Fermentas y se identificaron las bandas correspondientes a 1500 pb (proteína E).

Se pesaron 2 tubos Eppendorf de 1.5 mL vacíos; posteriormente las bandas de interés obtenidas se cortaron del gel y se puso cada una en un tubo Eppendorf diferente y se volvieron a pesar para tener una aproximación del volumen de gel que se iba a purificar.

A cada tubo Eppendorf se le añadieron 3 volúmenes de buffer QG por 1 volumen de gel y se incubaron los tubos a 50°C hasta que se disolvió por completo el gel y con una micropipeta se pasó todo el contenido de los tubos a columnas de purificación. Después se añadió a cada columna 1 volumen de isopropanol igual al volumen del gel y se mezcló bien por inversión de la columna.

Las columnas se centrifugaron por 1 minuto en una micro centrífuga y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 500 µL de buffer QG a cada columna

y se centrifugaron por 1 minuto, de nuevo se desechó el sobrenadante. Posteriormente se hizo un lavado añadiendo 750 μ L de buffer PE a cada columna y se centrifugaron por 3 minutos.

Cada columna se puso en un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo y se le agregó a cada columna 30 μ L de agua miliQ justo en el centro de la membrana de la columna teniendo cuidado de no picar la membrana, se dejaron reposar las columnas por 4 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugaron por 1 minuto. El producto purificado se cuantificó con el equipo NanoDrop 2000 de ThermoFisher y se guardó a -20°C para su posterior uso. Los reactivos QG y PE son los que vienen incluidos en el kit QIAquick Gel extraction.

E. Preparación de células competentes

De un cultivo de una noche de *E. coli* DH5 α en placas con medio LB, se picó una colonia y se inoculó un tubo con 5 mL de medio LB líquido y se dejó incubando toda la noche a 37°C con agitación constante.

Al día siguiente se hizo una dilución 1:100 del cultivo de una noche, se tomaron 100 μ L del cultivo y se agregaron 9.9 mL de medio SOC y se dejó crecer la bacteria hasta una densidad óptica de 0.3-0.6; una vez alcanzada la densidad el cultivo se dejó reposando en hielo por 5 minutos, después se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C , se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 10 mL de TSS a 4°C . Finalmente se hicieron alícuotas de 700 μ L y se dejaron en hielo seco por 1 hora, posteriormente se almacenaron las alícuotas a -70°C hasta su uso.

F. Ligación de secuencia de proteína E en el vector de clonación pJET1.2

El fragmento de 1500 pb purificado correspondiente a la proteína E se utilizó para hacer una reacción de ligación con el kit CloneJET PCR Cloning de Thermo Scientific.

Se siguió el protocolo especificado para la creación de extremos romos en el fragmento de DNA a insertar, llevándose a cabo la siguiente reacción (Tabla 5).

| Componente | Volumen (μL) |
|--------------------------|---------------------------|
| Buffer de reacción 2X | 5.0 |
| Producto de PCR | 0.5 |
| Agua libre de nucleasas | 3.0 |
| Enzima DNA blunting | 0.5 |
| Total de reacción | 9.0 |

Tabla 5. Mezcla de reacción para la formación de extremos romos en el fragmento a insertar

Los componentes de la reacción se incubaron a 70°C por 10 minutos y después se puso a reposar la reacción en hielo por 1 minuto. Inmediatamente después se prosiguió con la reacción de ligación, la cual se llevó acabo siempre en hielo y de acuerdo con la tabla 6.

| Componente | Volumen (μL) |
|--|---------------------------|
| Mezcla de reacción para extremos romos | 9.0 |
| pJETt1.2/Blunt cloning vector | 0.5 |
| T4 DNA ligasa | 0.5 |
| Total de reacción | 10.0 |

Tabla 6. Mezcla de reacción de ligación en el vector pJET1.2/Blunt cloning vector

Se mezclaron bien todos los componentes de la reacción y esta se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la reacción de ligación se usó directamente para la transformación de células competentes.

G. Transformación de células competentes

En tubos eppendorf de 1.5 mL, se usaron 100 μL de solución de bacteria en TSS (*E. coli* DH5 α competentes) a 4°C y se añadieron 100pg de plásmido y 100 μL de solución KCM a 4°C. Se mezclaron bien todos los reactivos y se dejó reposar la mezcla en hielo por 10 minutos.

Una vez terminado el tiempo de incubación, la mezcla se puso a 42°C por 45 segundos y se regresó de inmediato a hielo en donde se incubó por 2 minutos. Después, se añadió 1 mL de medio LB sin antibióticos a 37°C y se dejó incubar la mezcla a 37°C por una hora.

Al terminar el periodo de incubación, se tomó todo el contenido del tubo eppendorf y se usó para sembrar por plaqueo en cajas de LB con ampicilina, las cuales se dejaron secándose al lado de un mechero y una vez secas se taparon y se incubaron por una noche a 37°C. Se seleccionaron 4 candidatas al azar y se resembraron en placas de LB con ampicilina y se incubaron por una noche a 37°C.

H. Colony PCR

Las placas incubadas durante la noche se revisaron a la mañana siguiente y se hizo una Colony PCR a las candidatas para confirmar que los plásmidos que adquirieron las bacterias si contenían el fragmento de 1500 pb que corresponde a la proteína E.

Las colonias seleccionadas se picaron con una punta estéril, la cual se lavó en la mezcla de reacción que se preparó para la colony PCR (Tabla 7).

| Componente | Volumen (µL) |
|--------------------------|--------------|
| Polimerasa | 0.5 |
| Buffer 10X | 2.0 |
| Primer FWD Kit clonejet | 1.0 |
| Primer REV kit clonejet | 1.0 |
| dNTP's | 0.5 |
| Agua | 15.0 |
| Total de reacción | 20.0 |

Tabla 7. Mezcla de reacción para colony PCR.

La polimerasa utilizada fue la High fidelity Taq Polymerase de JennaBioscience. La reacción se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp PCR system 2700 de Applied Biosystems y las condiciones establecidas en el termociclador se describen en la figura 17.

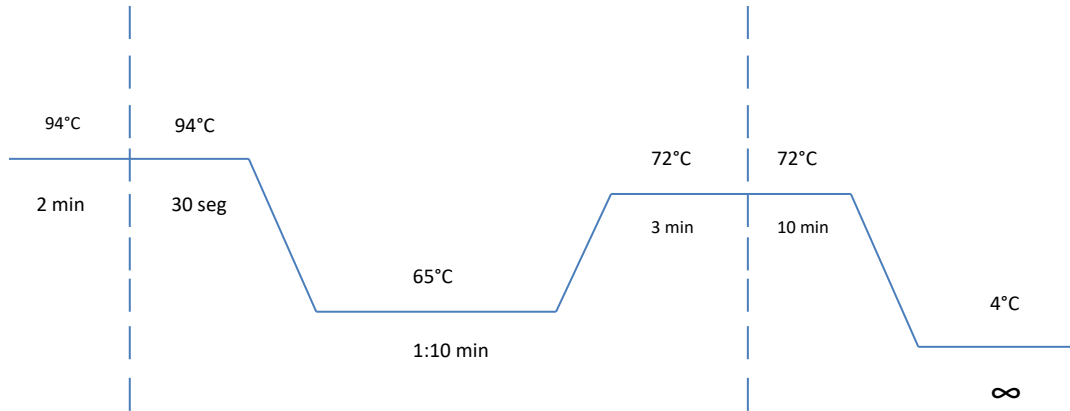


Figura 17. Condiciones de colony PCR para detectar fragmentos de 1500 pb (proteína E)

I. Extracción de plásmido

Las candidatas seleccionadas se sembraron en 5 mL de LB líquido con ampicilina y se dejaron incubando toda la noche a 37°C con agitación constante.

Al día siguiente los cultivos se pasaron a tubos eppendorf de 1.5 mL y estos se centrifugaron a 13400 rpm por 30 segundos en micro centrífuga a temperatura ambiente. Posteriormente se removieron los sobrenadantes y se resuspendió cada uno de los pellets en 100 μ L de solución GTE y se dejaron reposar 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añadió a cada tubo 200 μ L de NaOH/SDS, se mezclaron por inversión y se incubaron 5 minutos en hielo; después se agregaron 150 μ L de solución de acetato de potasio y se mezclaron los tubos poniéndolos en el vórtex por 2 segundos y luego se dejaron reposar en hielo 5 minutos.

Se centrifugaron los tubos a 13000 rpm a 4°C por 3 minutos, se transfirieron los sobrenadantes a tubos eppendorf nuevos y se mezclaron con 800 μ L de

etanol al 95%; se dejaron reposar por 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 13400 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente; se removieron los sobrenadantes y se lavaron los pellets con 1 mL de etanol al 70%, se volvieron a centrifugar los tubos a 13 400 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el etanol por decantación y se dejaron secar los pellets calentando los tubos en el termo block Multi-Blok heater Lab-line. Una vez secas las muestras los pellets se resuspendieron en 30 μ L de agua miliQ y se cuantificaron los plásmidos en el NanoDrop 2000 de Thermofisher. Se corrió un gel de agarosa al 1.0% para observar que el tamaño del plásmido fuera el indicado; se usó como marcador de peso molecular el marcador 1Kb plus ready to use de fermentas.

J. Restricción y ligación

Se comprobó la inserción del fragmento deseado en el vector pJET1.2 mediante restricción con EcoRI de los plásmidos extraídos de las cuatro candidatas seleccionadas (Tabla 8).

| Componente | Volumen (μ L) |
|--------------------------|--------------------|
| Buffer 10X | 2.0 |
| DNA | 6.0 |
| EcoRI | 1.0 |
| Agua | 11.0 |
| Total de reacción | 20.0 |

Tabla 8. Reacción de restricción con EcoRI

Los componentes de la reacción se mezclaron bien y se incubaron las reacciones a 37°C por una hora en el horno PersonaHyb de Stratagene. Se desactivaron las enzimas incubando las muestras a 65°C por 20 minutos y se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1.0%

Posteriormente se hizo la restricción del plásmido, de la única candidata que salió positiva para todas las pruebas realizadas, con las enzimas NdeI, XhoI de JennaBioscience y con ambas enzimas juntas (Tablas 9, 10 y 11).

| Componente | Volumen (μL) |
|--------------------------|---------------------------|
| Buffer 10X | 2.0 |
| DNA | 9.0 |
| NdeI | 1.0 |
| Agua | 8.0 |
| Total de reacción | 20.0 |

Tabla 9. Restricción con NdeI

| Componente | Volumen (μL) |
|--------------------------|---------------------------|
| Buffer 10X | 2.0 |
| DNA | 9.0 |
| XhoI | 0.5 |
| Agua | 8.5 |
| Total de reacción | 20.0 |

Tabla 10. Restricción con XhoI

| Componente | Paso 1 | Paso 2 |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|
| DNA | 10.0 μL | |
| NdeI | 1.0 μL | |
| XhoI | | 0.5 μL |
| Buffer universal 10X | 1.5 μL | 1.5 μL |
| Agua | 2.5 μL | 13.0 μL |
| Volumen total | 15.0 μL | 30.0 μL |

Tabla 11. Restricción de la construcción pJET1.2 por pasos con las enzimas NdeI y XhoI. En rosa se marca el volumen total de DNA utilizado para la reacción y el volumen total final de la reacción de restricción.

Los tubos que contenían cada una de las reacciones previamente descritas se incubaron por 15 minutos a 37°C. Para la reacción en dos pasos, primero se añadieron los componentes del paso 1, se mezclaron bien y se incubó la reacción a 37°C por 7:30 minutos, luego se agregaron al tubo los componentes del paso 2, se mezclaron bien todos los componentes y se dejó incubando la reacción a 37°C por 7:30 minutos más para alcanzar un total de 15 minutos de incubación.

Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando el marcador de peso molecular 1kb plus ready to use de Fermentas. La banda obtenida

con la restricción en 2 pasos fue cortada y purificada de acuerdo al protocolo mencionado en la sección D de metodología de esta tesis.

K. Caracterización y restricción de PPROEX 1 y ligación con la secuencia de la proteína E

El vector de expresión PPROEX 1 se utilizó para transformar bacterias *E.coli* DH5 α competentes, a las cuales se les extrajo el plásmido y este se utilizó para llevar a cabo la caracterización del vector de expresión mediante restricción con las enzimas Xbal y Xhol (Tablas 12, 13 y 14).

| Componente | Volumen (μ L) |
|--------------------------|--------------------|
| Buffer 10X | 2.0 |
| DNA | 5.0 |
| Xbal | 1.0 |
| Agua | 12.0 |
| Total de reacción | 20.0 |

| Componente | Volumen (μ L) |
|--------------------------|--------------------|
| Buffer 10X | 2.0 |
| DNA | 5.0 |
| Xhol | 1.0 |
| Agua | 12.0 |
| Total de reacción | 20.0 |

restricción de PPROEX1

Tabla 13. Restricción de PPROEX1 con Xhol

| Componente | Volumen (μ L) |
|--------------------------|--------------------|
| Buffer 10X | 2.0 |
| DNA | 5.0 |
| Xbal | 1.0 |
| Xhol | 0.5 |
| Agua | 11.5 |
| Total de reacción | 20.0 |

Tabla 14. Restricción de PPROEX 1 con Xbal y Xhol

Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1.0%. Una vez obtenido el resultado esperado se procedió a hacer la restricción de PPROEX 1 con las enzimas Ndel y Xhol. Los componentes de la reacción se muestran en la tabla 15; La reacción se dejó incubando 15 minutos a 37°C y la muestra se corrió en un gel de agarosa al 1.5%, la banda correspondiente al vector restringido

se cortó y se purificó de acuerdo a lo descrito en la sección D de metodología de la presente tesis.

| Componente | Volumen (μL) |
|--------------------------|---------------------------|
| Buffer 10X | 2.0 |
| DNA | 5.0 |
| NdeI | 1.0 |
| XhoI | 0.5 |
| Agua | 11.5 |
| Total de reacción | 20.0 |

Tabla 15. Restricción de PPROEX 1 con NdeI y XhoI.

La banda purificada del fragmento correspondiente a la proteína E restringido con NdeI y XhoI y la banda de PPROEX 1 restringido con NdeI y XhoI se utilizaron para llevar a cabo una reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa de JennaBioscience. Los componentes de la reacción se describen en la tabla 16.

| Componente | Volumen (μL) |
|--------------------------|---------------------------|
| Buffer 10X | 4.0 |
| DNA (E restringida) | 20.0 |
| DNA (PPROEX1 rest) | 11.9 |
| T4 DNA ligasa | 1.0 |
| Agua | 3.1 |
| Total de reacción | 40.0 |

Tabla 16. Componentes de la reacción de ligación de PPROEX 1 con el fragmento de proteína E

La mezcla de ligación se dividió en 2 partes de 10 μL y 30 μL respectivamente y con ellas se llevó a cabo la transformación de células competentes *E.coli* BL21 y *E.coli* DH5 α de acuerdo a lo especificado en la sección G de metodología de esta tesis.

Con las bacterias transformadas se plaqueo en agar LB con ampicilina y después de una noche de incubación a 37°C se verificó que hubieran crecido candidatas. De las bacterias *E.coli* BL21, se seleccionaron 4 candidatas al azar y se resembraron en placas de agar LB con ampicilina y se incubaron por 37°C por una noche, al siguiente día las candidatas se sembraron en medio líquido LB con ampicilina y se dejaron crecer toda la noche a 37°C con agitación constante para extraer los plásmidos de acuerdo a la sección I de metodología de esta tesis.

L. Comprobación de sitios EcoRI presentes en las construcciones obtenidas y PCR con primers para proteína E

Las construcciones PPROEX1-E obtenidas se restringieron con la enzima EcoRI de JennaBioscience. Los componentes de la reacción se muestran en la tabla 17. Estas reacciones se incubaron a 37°C por 1 hora. Después de transcurrido este tiempo se inactivo la enzima a 65°C por 20 minutos y las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1.0%.

| Componente | Volumen (µL) |
|--------------------------|--------------|
| Buffer 10X | 2.0 |
| DNA | 9.0 |
| EcoRI | 1.0 |
| Agua | 8.0 |
| Total de reacción | 20.0 |

Tabla 17. Reacción de restricción de PPROEX1-E con EcoRI

Después de hacer la restricción con EcoRI, se realizó una PCR para comprobar que se encontraba presente el inserto que se quería, para esto se seleccionó al azar solo una de las candidatas (C9) y se llevó a cabo la PCR utilizando la enzima Phusion Polymerase de Thermofisher con un gradiente de temperatura de 61°C a 62°C

M. Secuenciación

Se eligió uno de los plásmidos extraídos de las candidatas y se le hizo una reacción de secuenciación (Tabla 18).

| Componente | Volumen (μL) |
|----------------------------|---------------------------|
| Big Dye | 2.0 |
| Buffer5X | 4.0 |
| DNA (1 μg) | 1.3 |
| Primer (10 μM) | 1.0 |
| Betaina 5M | 1.0 |
| DMSO | 1.0 |
| Agua | 9.7 |
| Total de reacción | 20.0 |

Tabla 18. Componentes de la reacción de secuenciación de PPROEX1-E

Las condiciones que se programaron en el termociclador se muestran en la figura 18.

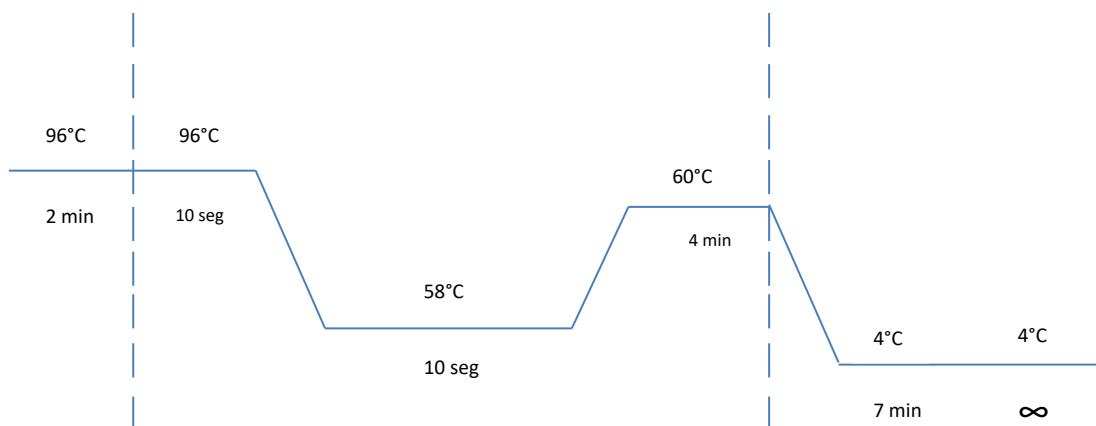


Figura 18. Condiciones establecidas en el termociclador SuperCycler Gradient Cycler de Kyratec Para llevar a cabo la reacción para secuenciación.

Después de que se terminaron los 30 ciclos para la reacción de secuenciación, el producto que se obtuvo se purificó con etanol y se llevaron a secuenciar las

muestras al laboratorio de secuenciación del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV Zacatenco.

N. Inducción de la expresión de la proteína E recombinante

La candidata seleccionada se cultivó en 5 mL de medio LB con ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C con agitación constante. Al día siguiente, 500 µL del cultivo se añadieron a 49.5 mL de medio LB con ampicilina y se dejó el cultivo a 37°C con agitación constante hasta que alcanzó una O.D₆₀₀=0.6 (de 3-4 horas aproximadamente), la cual se midió en el espectrofotómetro SmartSpec 3000 de BioRad.

Se tomaron 10 mL de muestra correspondiente al tiempo T₀, después se agregó IPTG hasta una concentración final de 0.6 mM y se tomaron 10 mL de muestra a las 3 y 6 horas (T₃ y T₆ respectivamente). A cada toma de muestra se midió la O.D en el espectrofotómetro SmartSpec 3000 de BioRad para hacer el ajuste de la cantidad de muestra que se cargaría en el gel de poliacrilamida.

Cada muestra se centrifugó por 15 minutos a 12000 x g a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el pellet obtenido se lavó 2 veces con 1 mL de PBS a 6000 rpm por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante las 2 veces y finalmente se resuspendió el pellet en 50 µL de buffer de lisis. Se centrifugó de nuevo la muestra a 12000 x g a 4°C pero ahora por 25 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se hizo el ajuste para cargar aproximadamente la misma cantidad de proteína en el gel de poliacrilamida. La composición del gel de poliacrilamida utilizado se muestra en la tabla 19.

| Gel separador 10% | | Gel concentrador | |
|--------------------|---------|--------------------|----------|
| Acrilamida-Bis 30% | 2.67 mL | Acrilamida-Bis 30% | 492.0 µL |
| Tris pH 8.8 | 2.00 mL | Tris pH 6.8 | 780.0 µL |
| Agua | 3.33 mL | Agua | 1.74 mL |
| APS 10% | 60.0 µL | APS 10% | 40.0 µL |
| TEMED | 6.0 µL | TEMED | 4.0 µL |

Tabla 19. Composición del gel de poliacrilamida 10%

Las muestras se cargaron en el gel de acuerdo a la tabla 20.

| Muestra | Volumen de muestra (mL) | Volumen de buffer (mL) |
|-----------|-------------------------|------------------------|
| T0 | 15.0 | 0.0 |
| T3 | 8.4 | 6.6 |
| T6 | 6.4 | 8.6 |

Tabla 20. Cantidad de muestra y de buffer cargada en el gel de poliacrilamida después de hacer el ajuste por absorbancia.

Se hicieron 2 geles de poliacrilamida y los 2 se cargaron de la misma forma. Una vez cargadas las muestras en los geles, estas se corrieron primero a voltaje constante de 80 por 15 minutos y después a voltaje constante de 120 por 75 minutos, utilizando un buffer de corrida 1X.

Una vez que se terminaron de correr las muestras se tiñó uno de los geles con azul de Coomasie por 2 horas y después se destiñó con una solución desteñidora compuesta de 100 mL de metanol, 14.4 mL de ácido acético glacial y 85.6 mL de agua y se observó el patrón de bandeo.

El otro gel se transfirió a una membrana utilizando un buffer de transferencia 1x con un amperaje constante de 250 mAmp por una hora. Una vez transcurrido el tiempo, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau 0.1% en ácido tricloroacético por 3 minutos para monitorear la eficiencia de la transferencia. Luego, se lavó la membrana con agua y luego 3 veces con TBST, cada una de ellas por 5 minutos. Después se bloqueó la membrana con una solución de leche al 5% durante hora y media. Una vez bloqueada se lavó 3 veces con TBST por 5 minutos cada vez.

La membrana se dejó en contacto con el anticuerpo primario anti-E monoclonal de ratón (1:1000) de Millipore durante toda la noche a 4°C con agitación constante. Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces con TBST, cada una por 5 minutos y se incubó por una hora a temperatura ambiente con el

anticuerpo secundario anti-HRP de ratón (1:5000) y 5% de leche. Después de la incubación se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBST. Se usó para revelar un kit de quimioluminiscencia de Promega y se dejó que se desarrollara la reacción por 20 segundos.

Ñ. Inducción de grandes cantidades de proteína recombinante

Se inocularon 250 mL de medio LB con ampicilina con una asada del cultivo de *E.coli* BL21 que contenían la construcción PPROEX1-E y se crecieron por 12 horas a 37°C hasta alcanzar una O.D₆₀₀ = 0.6 y se le adicionó 1 L de medio fresco e IPTG hasta una concentración final de 0.6 mM para inducir la sobreexpresión de la proteína E por 5 horas a 30°C.

Se separó el volumen total en 8 frascos de 150 mL y se centrifugaron en una centrífuga Allegra 64R Centrifuge de Beckman Coulter por 25 minutos a 12000 x g. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 22.5 mL de buffer de lisis 2. Se centrifugaron de nuevo las muestras a 12000 x g por 25 minutos y se recuperó el sobrenadante el cual se guardó a -20°C hasta su uso para la purificación con las columnas de níquel.

O. Purificación de proteína recombinante

500 µL de resina Ni-NTA de QIAGEN se equilibraron con un volumen igual de buffer de lisis 3 durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Una vez equilibrada, la resina se mezcló durante toda la noche a 4°C con agitación constante con 15 mL del lisado clarificado.

Al día siguiente se añadió la resina a una columna y se lavó 4 veces con el buffer de lavado, por 10 minutos cada vez a 4°C con agitación constante. La proteína recombinante se eluyó con 1 mL de buffer de elución y se obtuvieron 4 fracciones de elución que se separaron por SDS-PAGE 10% que se tiñó con azul de Coomasie.

RESULTADOS

1. Obtención de genoma viral y amplificadores de cDNA correspondientes a la proteína E

Se extrajo el RNA de 2 muestras de concentrado de DENV-2 4.4.11 y se cuantificó con el equipo NanoDrop 2000 de Thermofisher.

| Nombre | Muestra | Concentración (ng/mL) |
|--------|----------------------|-----------------------|
| M1 | DENV2 VER 080716 RNA | 141.9 |
| M2 | DENV2 VER 070716 RNA | 252.6 |

Tabla 21. Cuantificación de RNA viral extraído

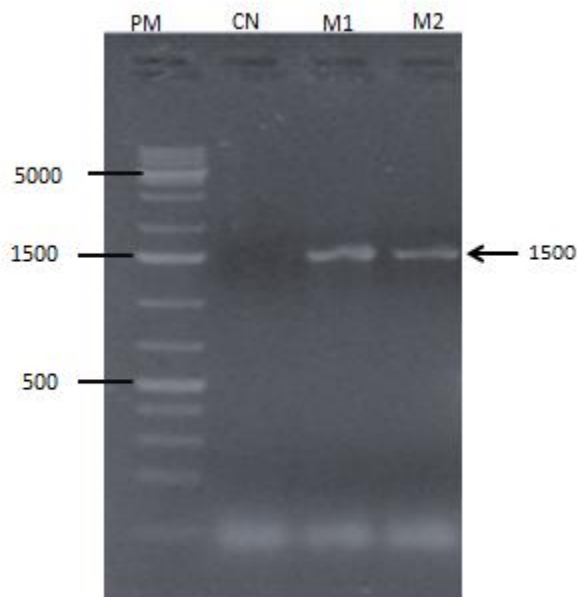


Figura 19. Amplificados correspondientes a la proteína E (1500 pb)

Los productos de RT-PCR obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 1.0%. En el carril 1 se observan las bandas del marcador de peso molecular, se especifican las bandas más marcadas en el marcador correspondientes a 500, 1500 y 5000 pb.

En el carril 2, se cargó la muestra correspondiente al control negativo sin RNA. En los carriles 3 y 4 se cargaron las muestras M1 y M2, en ambos carriles se observa una banda a la altura de 1500 pb.

2. Construcción PJET1.2-E

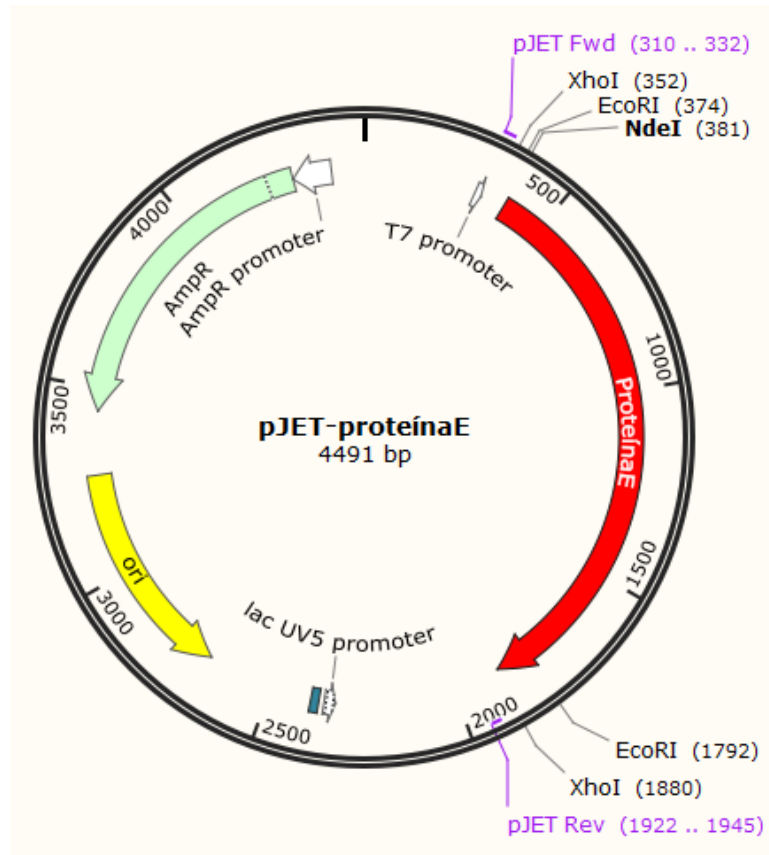


Figura 20. Construcción obtenida con la ligación del amplificado correspondiente a la proteína E y el vector de clonación PJET1.2 blunt. La imagen de la construcción se obtuvo con el programa SnapGene 1.1.3.

En la figura 20 se observan las características más importantes de la construcción obtenida como lo son el cassette de resistencia a ampicilina, el promotor lac UV5, el origen de replicación, el promotor T7, el inserto de proteína E, los sitios de restricción para las enzimas NdeI y XhoI y el tamaño aproximado de la construcción completa de 4491 pb.

3. Transformación de cepas *E.coli* DH5 α competentes

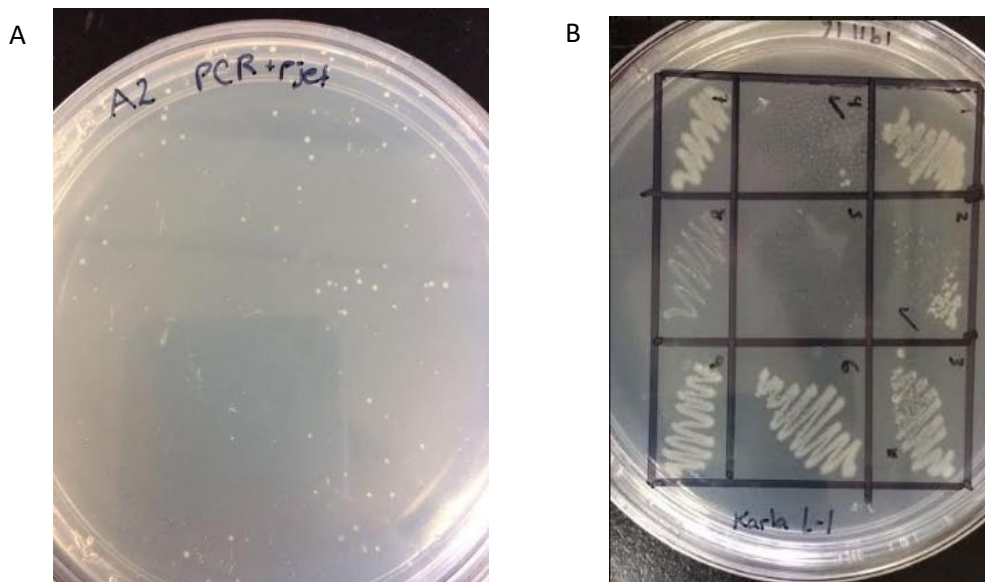


Figura 21. Candidatas obtenidas. A) Resultado del plaqueo posterior a la transformación. B) Segundo pase de las candidatas seleccionadas al azar.

En la figura 21 se observan las candidatas que se obtuvieron con la transformación de células competentes utilizando la construcción PJET1.2-E (Fig.21A). De estas candidatas se seleccionaron 9 al azar, estas se resembraron en placas de agar LB con ampicilina para obtener grandes cantidades de colonias puras (Fig.21B). De las candidatas resembradas se seleccionaron 4 al azar de las que se observó un buen crecimiento para llevar a cabo las siguientes pruebas.

4. Colony PCR

De las 4 candidatas seleccionadas se llevó a cabo una colony PCR para ver si las candidatas contenían el inserto de 1500 pb esperado. En la figura 22 se muestran los resultados de esta PCR.

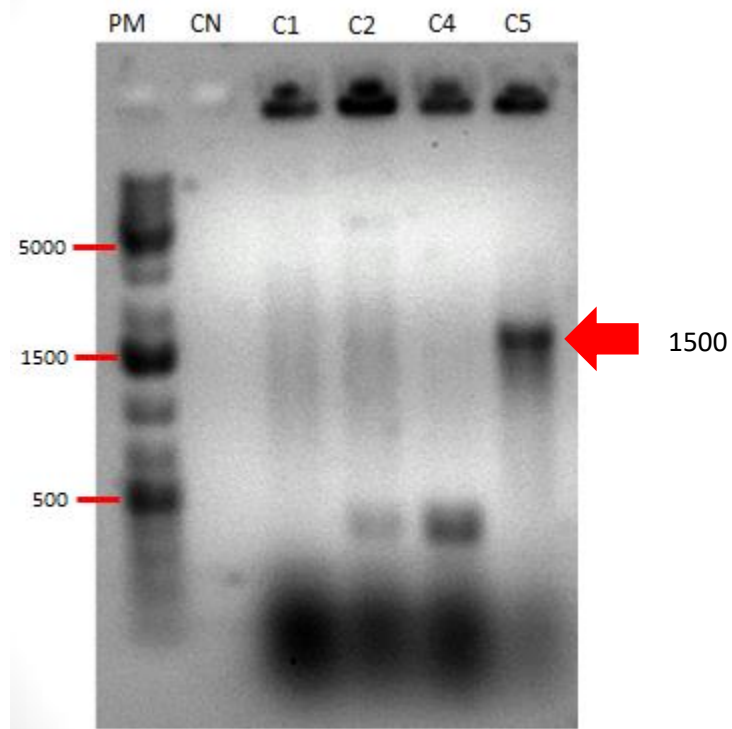


Figura 22. Bandas obtenidas de la colony PCR de las 4 candidatas seleccionadas en el segundo pase.

En la figura 22 se observa en el primer carril las bandas del marcador de peso molecular de 1 kb, se resaltaron las bandas de mayor intensidad. En el carril 2 se observa el control negativo con solo una banda muy tenue correspondiente a los primers. En el carril 3 se observa la banda de los primers y además un barrido en la parte inferior correspondiente a componentes de la bacteria. En los carriles 4 y 5 se observan bandas a la altura de casi 500 pb y bandas muy tenues de los primers además de los barridos intensos en la parte inferior.

El producto de PCR obtenido de la candidata 5 se cargó en el carril 6 y se puede observar una banda muy marcada a la altura de 1500 pb.

5. Cuantificación y restricción de plásmidos extraídos

| Muestra | Concentración (ng/mL) |
|---------|-----------------------|
| C1 | 194.9 |
| C2 | 251.4 |
| C4 | 283.1 |
| C5 | 227.7 |

Tabla 22. Cuantificación de plásmidos PJET1.2-E extraídos

Al extraer los plásmidos de las candidatas seleccionadas todos se obtuvieron en cantidades suficientes para poder llevar a cabo los ensayos de restricción.

Con el programa SnapGene 1.1.3 se hicieron simulaciones de las restricciones para saber el resultado que se debía esperar si el inserto que tenía la construcción estudiada era el adecuado.

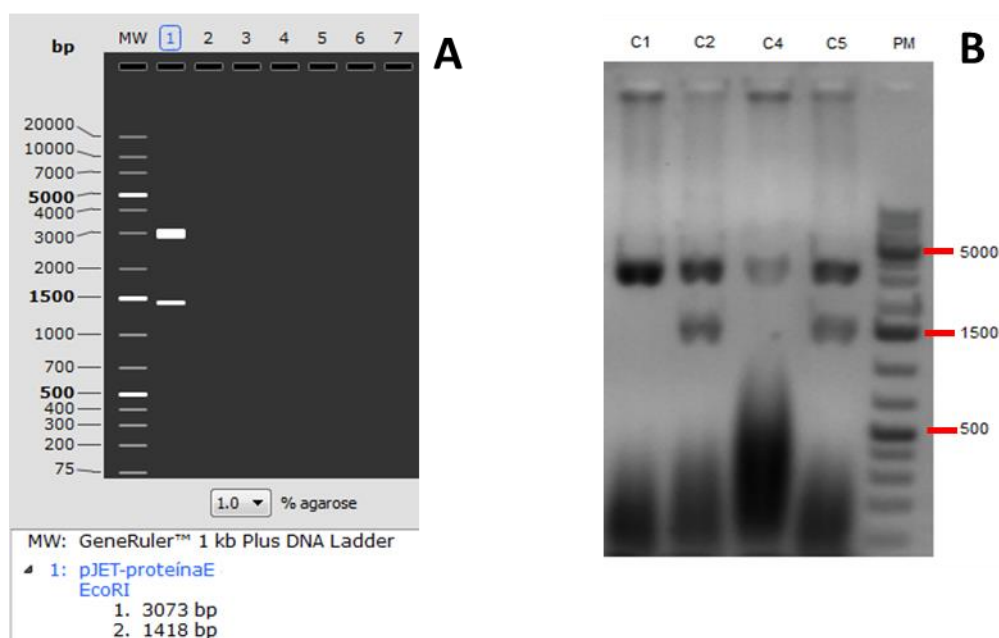


Figura 23. Resultados de la restricción con EcoRI. (A). Resultado teórico esperado. (B). Resultados obtenidos en donde se especifica el número de las candidatas analizadas y el marcador de peso molecular.

Como se observa en la figura 23 (A), el resultado esperado si se encontraba presente el inserto correcto era la liberación de un fragmento de 1418 pb y el

plásmido lineal con un tamaño aproximado de 3073 pb. En la figura 23 (B) se pueden observar los resultados obtenidos. En el carril 5, se observa el marcador de peso molecular de 1 Kb. En los carriles 1 y 3 no se obtuvieron los resultados esperados y no se liberó ningún fragmento. En los carriles 2 y 4, se observó el plásmido lineal a la altura esperada y la banda de los fragmentos liberados a la altura que se esperaban cerca de los 1500 pb.

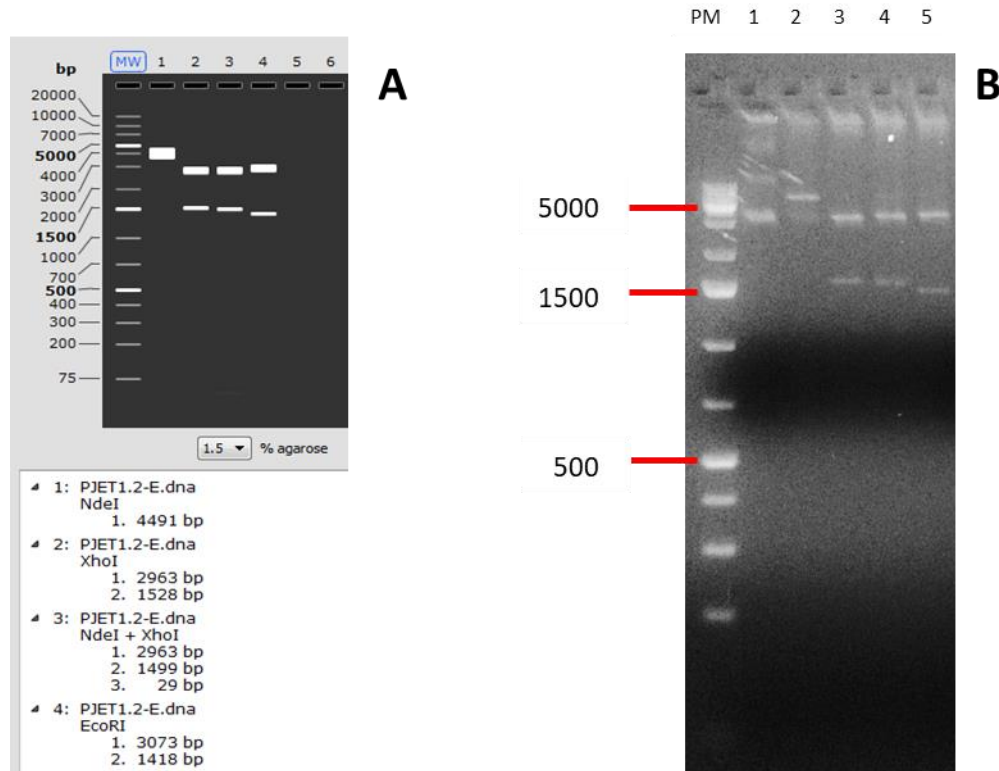


Figura 24. Restricciones de PJET1.2-E. (A) Resultado teórico esperado. (B) Resultado obtenido, en el carril 1 se observa la construcción sin restringir. Carriles 2, 3, 4 y 5 se observan las restricciones con NdeI, XhoI, NdeI+XhoI y EcoRI respectivamente.

En la figura 24A, se observan los resultados esperados para las restricciones con cada una de las enzimas. De lado derecho se muestran los resultados obtenidos con la restricción del plásmido extraído de la candidata 5 ya que esta fue la única que dio positiva en todas las pruebas anteriores.

En el carril PM se observa el marcador de peso molecular. En el carril 1 se observa el plásmido PJET1.2-E sin restringir. En el carril 2 se cargó el plásmido restringido con NdeI y se observa una sola banda a la altura esperada de 4500 pb aproximadamente. En el carril 3 se observan las 2 bandas esperadas para la restricción con XhoI de 2963 y 1528 pb aproximadamente. En el carril 4 se observa la restricción con NdeI y XhoI y se observan las bandas esperadas de 2963 y 1499 pb. En el carril 5 se Observa la restricción con EcoRI y las 2 bandas esperadas de 3073 y 1418 pb aproximadamente.

La banda de 1499 pb obtenida de la restricción con NdeI + XhoI se cortó y se purificó y fue la que se usó para la ligación con el vector de expresión PPROEX1.

6. Caracterización de PPROEX1

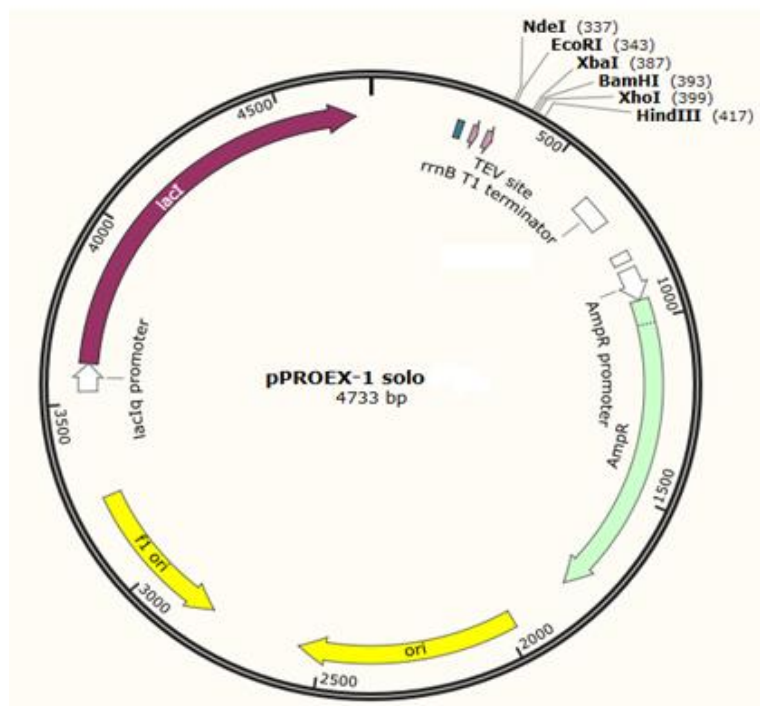


Figura 25. Mapa del vector de expresión PPROEX1. Se muestra el tamaño aproximado en pb y el sitio de reconocimiento de diferentes enzimas de restricción.

Para caracterizar el vector de expresión PPROEX1 se verificó que el vector utilizado tuviera el mismo tamaño y que se obtuvieran los resultados esperados al restringirlo con las enzimas XbaI y XhoI.

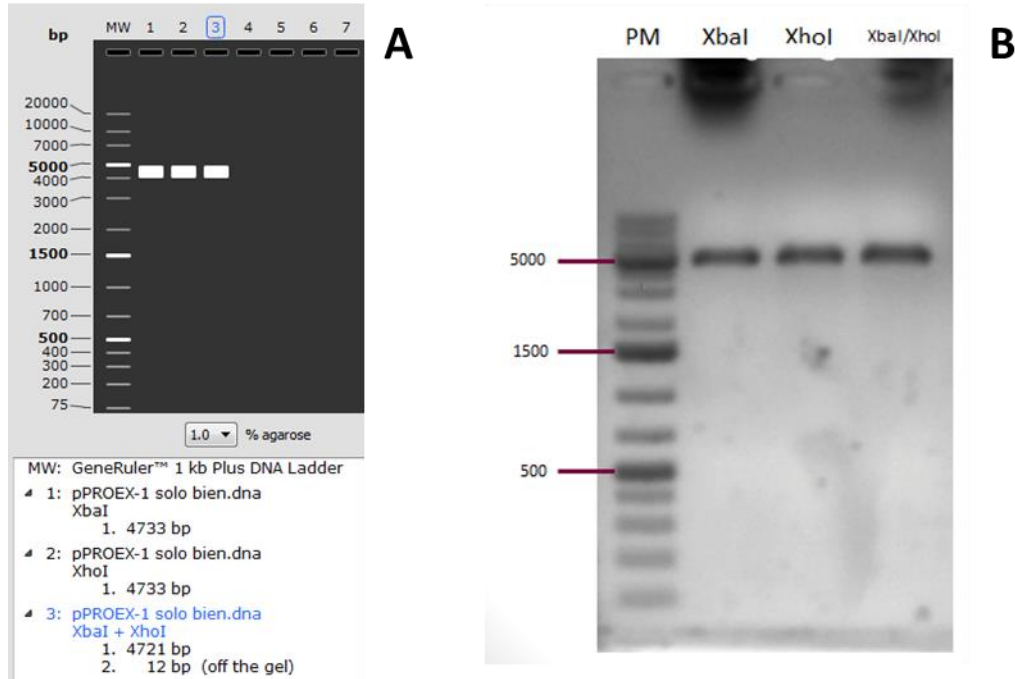


Figura 26. Caracterización de vector de expresión PPROEX1. (A) Resultado teórico esperado para la restricción con las enzimas XbaI, XhoI y XbaI+XhoI. (B) Resultado experimental obtenido, las muestras se cargaron siguiendo el mismo orden que en el panel A.

Los resultados obtenidos para la caracterización del plásmido fueron los que se esperaban para las 3 restricciones que se hicieron. Por encima de cada uno de los pozos se describe la muestra correspondiente a cada una de las restricciones. PM corresponde al marcador de peso molecular de 1Kb.

El vector PPROEX1 se restringió posteriormente con las enzimas NdeI y XhoI (Figura 27). La banda del vector linealizado obtenida con esta restricción se cortó y se purificó para ligarla con la banda correspondiente a la proteína E restringida con las mismas enzimas.

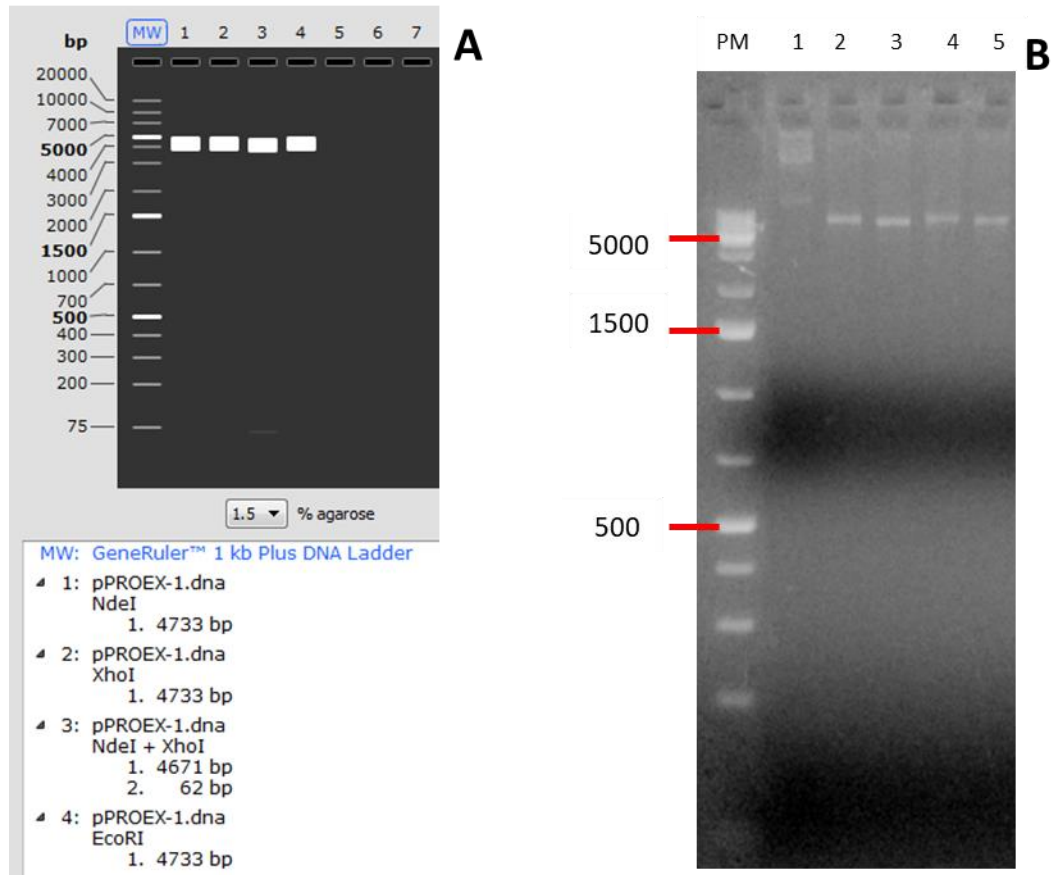


Figura 27. Restricción de PPROEX1 con NdeI, XhoI y NdeI + XhoI y EcoRI. (A) Resultados teóricos esperados. (B) Resultados experimentales obtenidos. En el carril 1 se observa el plásmido sin restringir.

En la figura 27A se observan los resultados esperados para la restricción con las enzimas NdeI, XhoI y NdeI+XhoI y EcoRI. En la figura 27B se observa el resultado obtenido. En el carril PM se observa el marcador de peso molecular de 1Kb; En el carril 1 el vector PPROEX1 sin restringir; En el carril 2 la restricción de PPOEX1 con la enzima NdeI; En el carril 3 la doble restricción de PPROEX1 con las enzimas NdeI y XhoI; En el carril 4 la restricción con la enzima XhoI. Finalmente en el carril 5 se observa la restricción con la enzima

EcoRI. Como se esperaba, la banda generada con la doble restricción es de menor tamaño que la del plásmido linearizado con la restricción individual con cada una de las 3 enzimas.

Las bandas de E y PPROEX1 restringidos con NdeI y XhoI se ligaron y el producto de la ligación se usó para transformar *E.coli* BL21 competentes.

7. Transformación de *E.coli* BL21 competentes y comprobación de obtención de la construcción adecuada

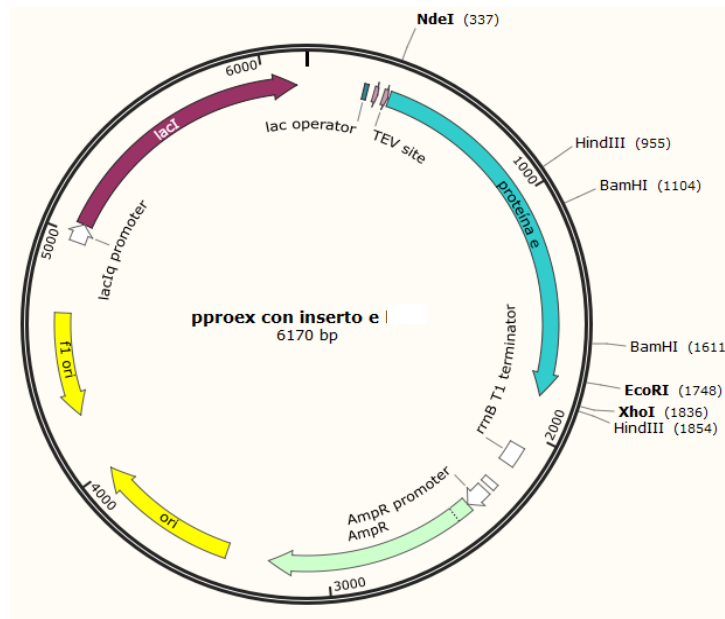


Figura 28. Mapa de la construcción PPROEX1-E utilizada para la transformación de competentes *E.coli* BL21

En la figura 28 se observa el mapa de la construcción que se hizo de PPROEX1 con el inserto de proteína E, esta construcción tiene un tamaño aproximado de 6170 pb. Se observan también los sitios de restricción para las enzimas NdeI, XhoI y EcoRI, este último se utilizó para comprobar que el inserto se encontrara presente en las candidatas seleccionadas.

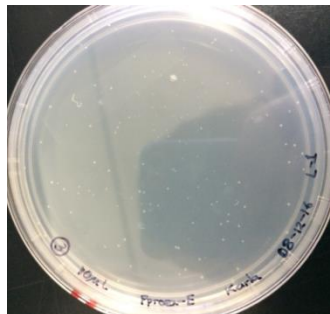


Figura 29. Candidatas obtenidas con la construcción PPROEX1-E

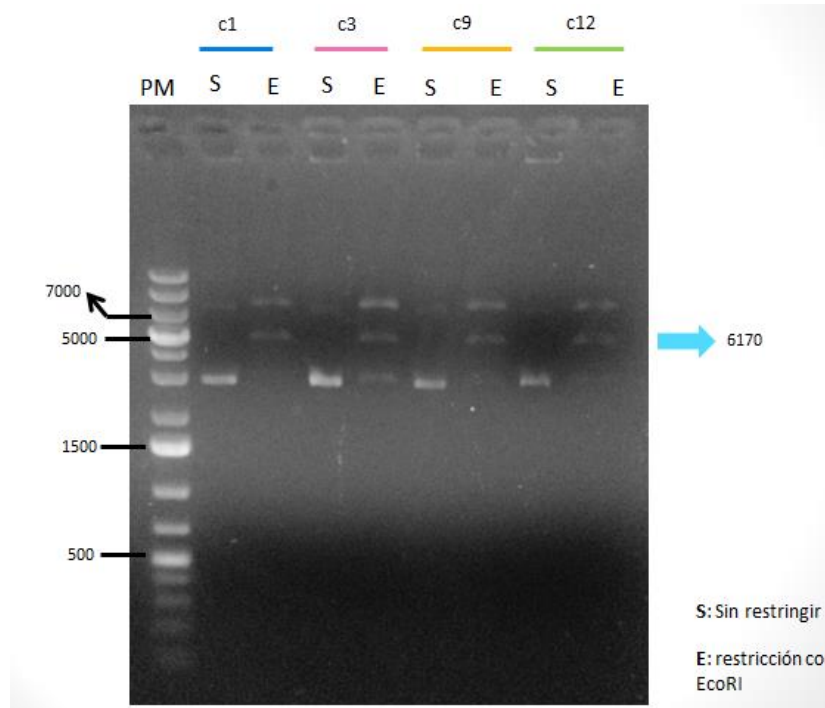


Figura 30. Restricción del plásmido extraído de las 4 candidatas seleccionadas transformadas con la construcción PPROEX1-E

En la figura 30 se observan las restricciones con EcoRI de los plásmidos extraídos de las 4 candidatas seleccionadas al azar. El resultado esperado era una banda de 6170 pb si se encontraba presente el inserto de proteína E. Como se observa en los carriles 3, 5, 7 y 9 todas las candidatas presentaron esa banda después de hacer la restricción con EcoRI. En los carriles 2, 4, 6 y 8 se observan los plásmidos extraídos sin restringir. En el carril 1 se observan las bandas del marcador de peso molecular de 1 Kb. Por encima de los carriles se especifica a que candidata corresponde cada muestra. Las candidatas analizadas fueron la C1, C3, C9 y C12.

Se seleccionó al azar una de las candidatas (C9) ya analizadas y se llevó a cabo una PCR a partir del plásmido para verificar que se encontrara presente el inserto que se quería (Figura 31).

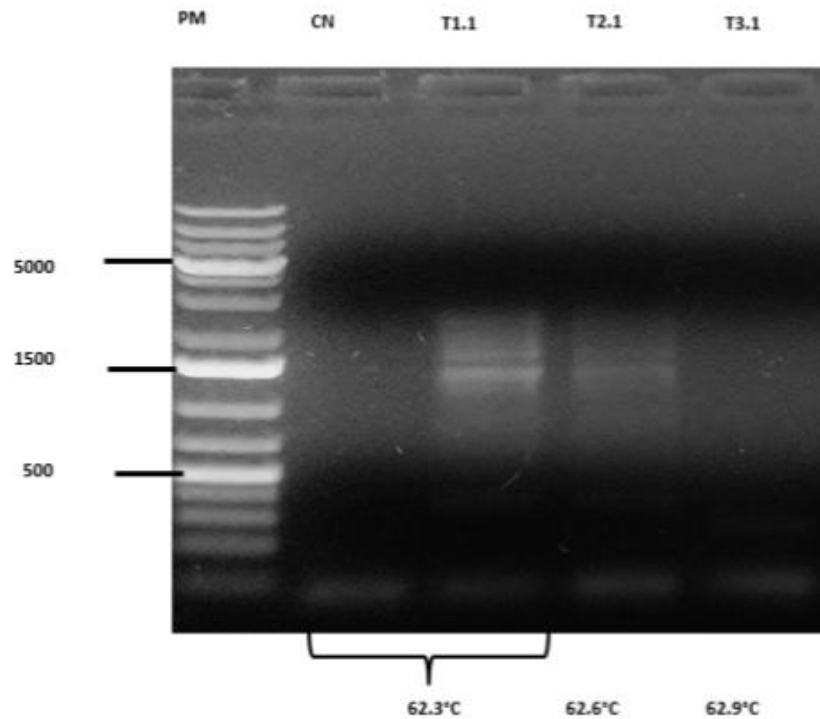


Figura 31. PCR con gradiente de temperatura para amplificar el fragmento correspondiente a la proteína E a partir de la construcción PPROEX1-E de la candidata C9.

Como se observa en la figura 31, la temperatura con la que se obtiene una banda en el tamaño esperado para la proteína E es de 62.3°C. Con una temperatura mayor esta banda comienza a desaparecer hasta ser nula a 62.9°C.

8. Secuenciación

Los resultados de la secuenciación se muestran a continuación en la figura 32, en donde se aprecian claramente los picos correspondientes a cada uno de

los diferentes nucleótidos que conforman la secuencia del fragmento insertado.

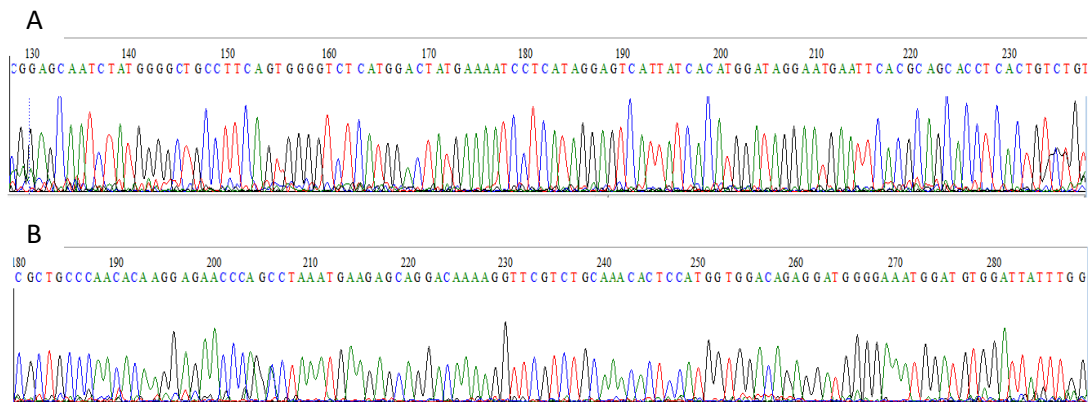


Figura 32. Electroferogramas obtenidos a partir de la reacción de secuenciación de la construcción PPROEX1-E. (A) Se muestran los resultados obtenidos con el primer reverse. (B) Se muestran los resultados obtenidos con el primer forward.

Una vez obtenida las secuencias mencionadas, se llevó a cabo un BLAST a partir de la secuencia nucleotídica y otro a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Los resultados se pueden observar en las figuras 33, 34 y 35.

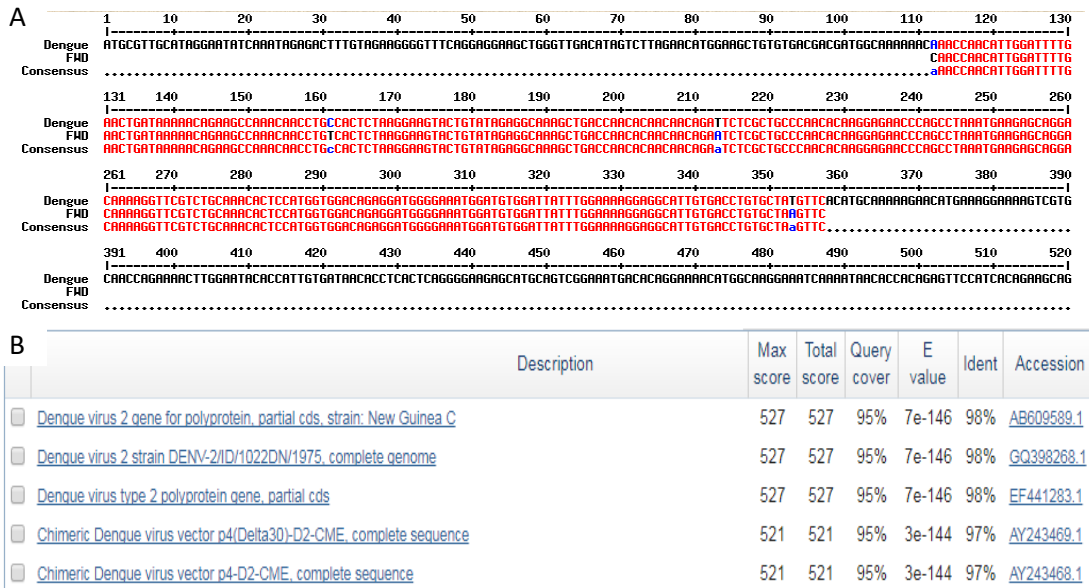


Figura 33. Alineamientos de la secuencia nucleotídica obtenida con el primer forward. (A) Se muestra la secuencia alineada con la herramienta multalin 5.4.1. (B) Se muestran los resultados obtenidos con BLASTn de NCBI.

Como se observa en la figura 33A, solo se detectaron 4 nucleótidos diferentes a los esperados y se obtuvieron porcentajes de identidad de hasta 98% con las secuencias reportadas para DENV-2. Los resultados del valor E (Fig.33B) muestran que se trata de un resultado confiable.

En la figura 34, se observan los resultados de los alineamientos para la secuencia obtenida con el primer reverse. Estos alineamientos corresponden a los hechos con la herramienta multalin 5.4.1 (Fig.34A) y con BLASTn de NCBI (Fig.34B).

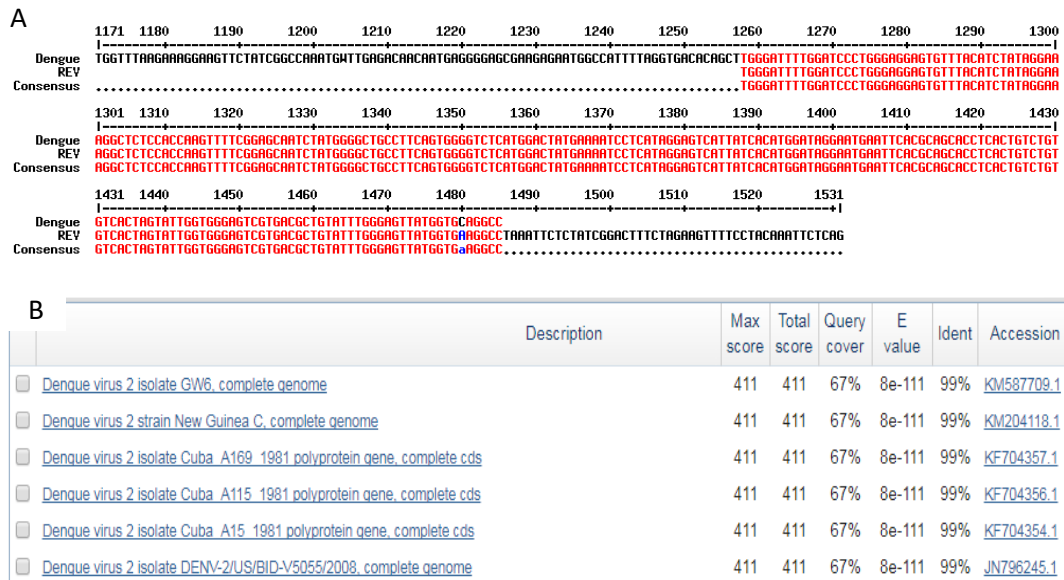


Figura 34. Alineamientos de la secuencia nucleotídica obtenida con el primer reverse. (A) Alineamiento de secuencia con multalin 5.4.1 (B) Alineamientos con BLASTn de NCBI.

Como se aprecia en la figura 34A, únicamente se detectó un nucleótido diferente al esperado, por lo que se obtuvieron mayores porcentajes (99%) de identidad con las secuencias reportadas para DENV-2. El resultado tan pequeño para el valor E muestra que se trata de resultados confiables (Fig. 34B).

9. Sobreexpresión de la proteína E recombinante

Se hizo un ensayo de sobreexpresión de la proteína recombinante y se tomaron muestras al tiempo cero, 3 horas y 6 horas. Las dos últimas muestras se obtuvieron después de inducir con IPTG (Figura 36).

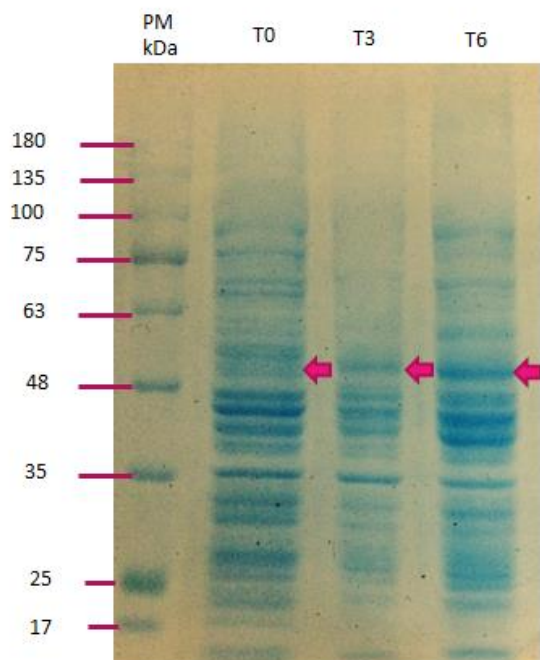


Figura 36. SDS-PAGE 10%. Gel teñido con Azul de Coomasie. Las flechas rosas muestran las bandas en el tamaño esperado para la proteína E.

En la figura 36 se observan las muestras tomadas a T0, T3 y T6. Se muestra como la intensidad de la banda va aumentando conforme aumenta el tiempo de toma de la muestra después de inducir con IPTG, lo que es indicativo de que si hay una sobreexpresión.

A las muestras se les midió la O.D₆₀₀ inmediatamente después de tomarlas para hacer el ajuste y cargar el equivalente de la misma cantidad de muestra en cada pozo del gel. Los resultados de esta medición se observan en la tabla 23 y el cálculo del ajuste se observa en la figura 37.

| Tiempo (H) | Absorbancia (nm) |
|------------|------------------|
| 0 | 0.670 |
| 3 | 1.188 |
| 6 | 1.560 |

Tabla 23. O.D₆₀₀ de cada una de las muestras tomadas.

$$15 \mu\text{L} \frac{(0.670 \text{ nm})}{(1000 \mu\text{L})} = 0.01 \text{ nm}$$

Figura 37. Cálculo para ajustar la cantidad de muestra. Se estableció que para cada muestra se cargaría un volumen equivalente al 0.01 nm de absorbancia.

El gel que se corrió simultáneamente se transfirió a una membrana para hacer el Western Blot. La eficiencia de la transferencia se verificó tiñendo la membrana con rojo de Ponceau 0.1% (Figura 38A).

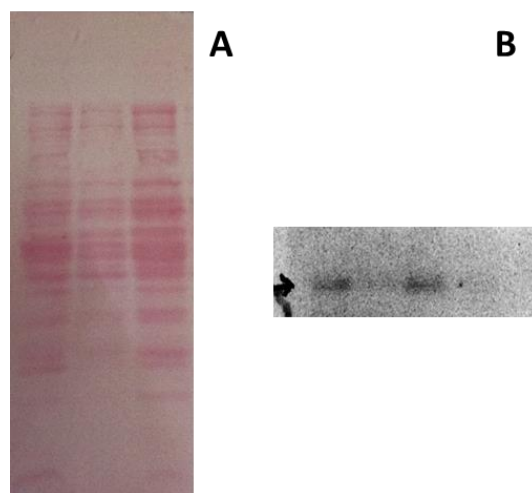


Figura 38. Transferencia a la membrana y WB. (A) Se observa la membrana transferida teñida con rojo de Ponceau 0.1%. (B) Se observa el resultado del WB, con anti-E (1:1000) como anticuerpo primario y anti-HRP ratón (1:5000) como anticuerpo secundario, para la zona correspondiente a la proteína E.

Como se observa en la figura 38B, el anticuerpo anti-E sí reconoció las bandas correspondientes a la proteína E, lo que comprueba la presencia de la proteína en la muestra.

10. Purificación de proteína E recombinante

Una vez comprobado que la proteína se encontraba presente y se estaba sobreexpresando, se llevó a cabo una inducción masiva de esta para poder purificarla mediante columnas de níquel. Una vez equilibrada, puesta en contacto con el lisado clarificado y después de los lavados, todo lo que se unió a la resina Ni-NTA se eluyó con buffers que contenían elevadas cantidades de imidazol. Se hicieron 4 eluciones, las cuales se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10%.

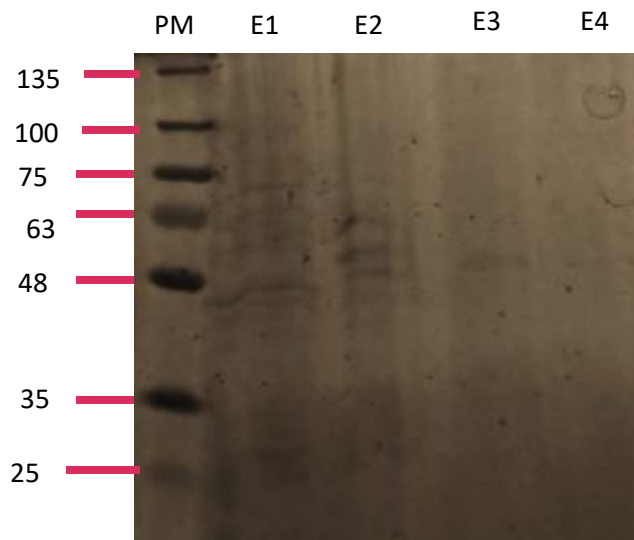


Figura 39. Purificación de proteína E recombinante mediante columnas de níquel.

En la figura 38 se observan las 4 eluciones que se hicieron (E1-E4), para la elución 1 (E1) se observa que hay muchas más bandas que en la fracción de elución 2 (E2). Esta segunda fracción aún tiene muchas bandas de proteínas que no se unieron eficientemente a la columna de níquel. En las eluciones 3 y 4 (E3, E4), se observa solo una banda la cuál es la que corresponde a las proteínas que se unieron con mayor fuerza a la columna y por lo tanto, las

fracciones de elución que pueden contener a la proteína E. Este resultado aún debe ser corroborado mediante un western Blot.

Discusión

La cantidad de RNA extraída de DENV2-VER fue la adecuada para poder obtener bandas muy intensas de cDNA correspondiente a la proteína E, esto era muy importante ya que al purificar las bandas se pierde una gran cantidad de la muestra, por lo que se requería que hubiera bandas muy intensas para que después de la pérdida que se da en la columnas de purificación aun así se obtuviera la cantidad suficiente para poder ligar el fragmento con el vector PJET1.2 blunt.

Como lo indica el nombre del vector, para llevar a cabo la ligación en este vector se necesitaba de un fragmento que tuviera extremos romos. La polimerasa utilizada para obtener el fragmento de DNA de la proteína E, no deja extremos romos, por tal razón se tuvo que hacer la reacción para formar extremos romos con la enzima que incluye el kit de clonación.

Una vez obtenidos los extremos romos se llevó a cabo la ligación del inserto deseado en el vector y esta reacción se usó para transformar bacterias *E.coli* DH5 α competentes. Se determinó el uso de esta cepa por que al tener la mutación el gen endA1 se prevenía que hubiera degradación por endonucleasas asegurando así un alto rango de transferencia del plásmido. Además esta cepa tiene también la mutación en el gen recA1, reduciendo la recombinación homóloga y dando de esta forma mayor estabilidad al inserto.

La transformación se llevó a cabo exitosamente y se pudieron seleccionar 4 candidatas al azar para analizarlas y asegurar que contenían la construcción PJET1.2-E. Como se observa en la figura 22, solo la candidata 5 demostró tener el inserto que se esperaba. Los resultados de la colony PCR no aseguraban que solo esta candidata tuviera el inserto ya que las otras podían tenerlo también pero la reacción podría haberse visto inhibida por la presencia

de material genético en exceso al tomar mayor cantidad de muestra para hacer la reacción. Por este motivo, se extrajeron los plásmidos de las 4 candidatas, se cuantificaron y se probaron mediante restricción con EcoRI.

El vector de clonación PJET1.2 no tiene por si solo sitio de reconocimiento para EcoRI, por este motivo fue que se seleccionó esta enzima ya que la proteína E si tiene en su secuencia un sitio de reconocimiento para EcoR1. Se analizó la construcción con el programa SnapGene y se comprobó que al momento de ligar el fragmento de la proteína E con el vector se creaba un sitio de reconocimiento para EcoRI (Fig. 20). De acuerdo con este análisis, se esperaba que al momento de restringir los plásmidos, solo aquellos que contuvieran el inserto adecuado liberarían un fragmento de aproximadamente 1418 pb. En la figura 23 se observa que solo las candidatas 2 y 5 liberaron los fragmentos esperados.

Al tener todos los resultados positivos de la candidata 5 para los ensayos realizados, se determinó seguir únicamente con esta candidata para los siguientes ensayos. Al plásmido extraído de la candidata 5 se le hizo una restricción con las enzimas NdeI y XhoI, esta restricción se llevó a cabo en 2 pasos ya que cerca del sitio de restricción de la enzima NdeI se encontraba un sitio para XhoI, por esta razón se cortó la construcción primero con la enzima NdeI y luego con la enzima XhoI asegurando de esta forma obtener el fragmento deseado para insertarlo en el vector de expresión PPROEX1. Esto se comprobó mediante el tamaño del fragmento liberado ya que de acuerdo a la figura 24, el tamaño del fragmento liberado con esta restricción tiene un tamaño aproximado de 1499 pb mientras que el que se libera con la restricción con la enzima XhoI sola es de 1528 pb por lo que el fragmento requerido se observa ligeramente por debajo del fragmento liberado con XhoI.

Una vez obtenido el fragmento deseado, se procedió a caracterizar el vector de expresión que se iba a utilizar, como se observa en la figura 25, este vector tiene en su secuencia sitios de reconocimiento para las enzimas XbaI y XhoI, por lo que se simuló con el programa SnapGene una restricción del plásmido

con estas 2 enzimas obteniéndose como resultados esperados las bandas correspondientes a los plásmidos linearizado como se observa en la figura 26 lado izquierdo y comprobado experimentalmente, lo que se observa en los resultados de la Fig.26, panel B.

Ya que el vector de expresión se encontraba caracterizado, se restringió con las enzimas NdeI y XhoI. Debido a que este vector tiene solamente un sitio de reconocimiento para estas enzimas se pudo llevar a cabo una doble restricción en un solo paso. Los resultados esperados se observan en la figura 27. Con el vector restringido y el inserto restringido se llevó a cabo la ligación y posteriormente la transformación de células DH5 α para obtener grandes cantidades del plásmido, con el cual se transformaron posteriormente las bacterias *E.coli* BL21.

A las candidatas seleccionadas se les extrajo el plásmido y se les hicieron ensayos de restricción con EcoRI para comprobar que el inserto presente era el correcto. En esta ocasión se esperaba que se linearizara el plásmido ya que el sitio de reconocimiento para esta enzima que se encontraba en el plásmido se pierde al momento de restringir con NdeI y XhoI pero el inserto contiene un sitio EcoRI por lo que si el plásmido tenía el inserto correcto se debía linearizar. Como se demuestra en la figura 30 todos los plásmidos dieron la banda del vector lineal, sin embargo dan también la banda del vector sin restringir porque se está llevando a cabo una restricción parcial, este resultado posiblemente se podría mejorar dejando la restricción por un tiempo mayor o agregando más enzima de restricción.

Para seguir comprobando la existencia del inserto correcto en el vector de expresión, se seleccionó al azar una de las candidatas (C9) y se hizo una PCR con gradiente de temperatura, en la figura 31 se observa el amplificado de 1500 pb que se esperaba y como la intensidad de este va disminuyendo conforme se aumenta la temperatura, esto se debe a que cuando la temperatura sobrepasa los límites para el alineamiento, entonces los primers no se unen y por lo tanto no hay amplificación.

Con la secuenciación se pudieron detectar 4 nucleótidos que diferían con la secuencia de referencia en el extremo inicial de la proteína E y solo uno que difería en el extremo terminal de la proteína E. Los cambios de nucleótidos eran esperados ya que por tratarse de un virus de RNA se sabía que el genoma tiene una mayor tasa de mutaciones. Para descartar que estas mutaciones dieran problemas en el plegamiento o funcionalidad de la proteína se hizo el alineamiento con la secuencia de aminoácidos y se detectaron solo dos cambios de aminoácido (Fig. 35). El primer cambio se observó en la secuencia amplificada con el primer forward en donde hay un cambio de una metionina por una lisina. El segundo cambio es de una glutamina por una lisina en la secuencia obtenida con el primer reverse. El cambio de metionina por lisina se da en la posición 119 la cual pertenece a la parte inicial del dominio II de la proteína E (Modis *et al.*, 2003), por lo que se trata de un cambio que no altera su funcionalidad ya que no se encuentra cerca del loop de fusión, sin embargo no se descarta que pudiera influir en la interacción que tenga la proteína E con otras proteínas una vez dentro de la célula hospedera. El segundo cambio se da en una región intermembranal de la proteína (Modis *et al.*, 2003), por lo que tampoco interfiere con su función de reconocimiento e interacción con los receptores.

Se sabe que los aminoácidos en las posiciones K291, K295, N67 y N153 del dominio III de la proteína E del virus interaccionan con receptores en células de mamíferos. Con los resultados que se obtuvieron de la secuenciación se puede descartar que haya una mutación en N67, sin embargo para descartar las otras mutaciones se deberá secuenciar por completo la proteína E recombinante utilizando primers internos.

En cuanto a la sobreexpresión de la proteína E recombinante, se logró ver una sobreexpresión hasta las 6 horas. Como se observa en la figura 36, conforme pasa más el tiempo aumenta la expresión de la proteína a 37°C. El western Blot confirmó la presencia de la proteína E como se demostró en la figura 38, sin embargo este resultado podría mejorarse ya que la banda intermedia

correspondiente a las 3 horas no alcanza a distinguirse, esto puede deberse a que se cargó menor cantidad de muestra en el gel o por que no se transfirió bien esa zona a la membrana.

Por último se observó que la proteína E recombinante al parecer si se está uniendo a la resina Ni-NTA y que la fracción de elución a partir de la cual se puede obtener la proteína purificada es desde la tercera elución. Estos resultados deben ser comprobados todavía mediante un western Blot para asegurar que se trata de la proteína E y proseguir con la el acoplamiento de la proteína purificada a las columnas de Sepharose 4B.

Conclusión

Se obtuvo la proteína E recombinante del DENV-2, la cual fue sobreexpresada. Asimismo los resultados sugieren que se obtuvo la purificación exitosa de la proteína con las columnas de níquel.

Perspectivas

- Secuenciar la proteína E completa
- Hacer western Blot de las fracciones de elución de la purificación con columnas de níquel
- Acoplar la proteína E a columnas de Sepharose 4B para pasar a través de las columnas los extractos proteicos de intestino medio de mosquito con diferente susceptibilidad a la infección por DENV
- Analizar las proteínas unidas a la columna mediante espectrofotometría de masas y análisis *in silico*

Referencias

- Acosta, E. G., Castilla, V., & Damonte, E. B. (2008). Functional entry of dengue virus into *Ae. albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of General Virology*, 89(2), 474–484. <http://doi.org/10.1099/vir.0.83357-0>
- Ammerman. (2009). NIH Public Access. *Curr Protoc Microbiol*, 1–10. <http://doi.org/10.1002/9780471729259.mca04es11.Growth>
- Arcy, A. D., Schiering, N., Villard, F., & Pheng, S. (2006). Crystallization communications Purification and crystallization of dengue and West Nile virus NS2B – NS3 complexes crystallization communications, (December 2005), 157–162. <http://doi.org/10.1107/S1744309106001199>
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507. <http://doi.org/10.1038/nature12060>
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Research*, 87(2), 125–148. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.009>
- Brady, O. J., Gething, P. W., Bhatt, S., Messina, J. P., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Hay, S. I. (2012). Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760>
- Brinton, M. A., Fernandez, A. V., & Disposito, J. H. (1986). The 3'???-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology*, 153(1), 113–121. [http://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90012-7](http://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90012-7)
- Carrington, L. B., & Simmons, C. P. (2014). Human to mosquito transmission of dengue viruses. *Frontiers in Immunology*, 5(JUN), 1–8. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00290>
- Chávez, J. H., Silva, J. R., Amarilla, A. A., & Moraes Figueiredo, L. T. (2010). Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. *Biologicals*, 38(6), 613–618. <http://doi.org/10.1016/j.biologicals.2010.07.004>
- Chang, C. J., Luh, H. W., Wang, S. H., Lin, H. J., Lee, S. C., & Hu, S. T. (2001). The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) interacts with dengue virus core protein. *DNA and Cell Biology*, 20(9), 569–577. <http://doi.org/10.1089/104454901317094981>

Crill, W. D., & Roehrig, J. T. (2001). Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *Journal of Virology*, *75*(16), 7769–73. <http://doi.org/10.1128/JVI.75.16.7769-7773.2001>

Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceicao, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A. R. B., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(2), 155–170. <http://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>

De Alwis, R., Williams, K. L., Schmid, M. A., Lai, C. Y., Patel, B., Smith, S. A., ... De Silva, A. M. (2014). Dengue Viruses Are Enhanced by Distinct Populations of Serotype Cross-Reactive Antibodies in Human Immune Sera. *PLoS Pathogens*, *10*(10). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004386>

De Lourdes Muñoz, M., Cisneros, A., Cruz, J., Das, P., Tovar, R., & Ortega, A. (1998). Putative dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS Microbiology Letters*, *168*(2), 251–258. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00434-0](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00434-0)

Denysiuk, R., Rodrigues, H. S., Monteiro, M. T. T., Costa, L., Santo, I. E., & Torres, D. F. M. (2015). Dengue disease: a multiobjective viewpoint, *7*(1), 70–90. Retrieved from <http://arxiv.org/abs/1512.09146>

DeRisi Joseph, Penland Lolita, B. P. O., Tyagi, S., Kramer, F. R., Group, N. P., & DeRisi Joseph, Penland Lolita, B. P. O. (1996). © 199 7 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturemedicine>. *Group*, *4*, 303–308. <http://doi.org/10.1038/nm0798-822>

Doolittle, J. M., & Gomez, S. M. (2011). Mapping protein interactions between dengue virus and its human and insect hosts. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *5*(2). <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000954>

Erbel, P., Schiering, N., D'Arcy, A., Rénatus, M., Kroemer, M., Lim, S. P., ... Hommel, U. (2006). Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nature Structural & Molecular Biology*, *13*(4), 372–373. <http://doi.org/10.1038/nsmb1073>

Fernandez-Garcia, M. D., Mazzon, M., Jacobs, M., & Amara, A. (2009). Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host and Microbe*, *5*(4), 318–328. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.001>

Fink, J., Gu, F., Ling, L., Tolfvenstam, T., Olfat, F., Chin, K. C., Hibberd, M. L. (2007). Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *1*(2). <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000086>

- Grove, J., & Marsh, M. (2011). The cell biology of receptor-mediated virus entry. *Journal of Cell Biology*, 195(7), 1071–1082. <http://doi.org/10.1083/jcb.201108131>
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., Peeling, R. W. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12), S7–S16. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2460>
- Hahn, C. S., Hahn, Y. S., Rice, C. M., Lee, E., Dalgarno, L., Strauss, E. G., & Strauss, J. H. (1987). Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *Journal of Molecular Biology*, 198(1), 33–41. [http://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90455-4](http://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90455-4)
- Halstead, S. B. (2007). Dengue. *Lancet*, 370(9599), 1644–1652. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61687-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61687-0)
- Halstead, S. B. (2008). Dengue Virus–Mosquito Interactions. *Annual Review of Entomology*, 53(1), 273–291. <http://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093326>
- Huerta, V., Ramos, Y., Yero, A., Pupo, D., Martín, D., Toledo, P., China, G. (2015). Novel interactions of domain III from the envelope glycoprotein of dengue 2 virus with human plasma proteins. *Journal of Proteomics*, 131, 205–213. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.003>
- Hung, J.-J., Hsieh, M.-T., Young, M.-J., Kao, C.-L., King, C.-C., & Chang, W. (2004). An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *Journal of Virology*, 78(1), 378–88. <http://doi.org/10.1128/JVI.78.1.378>
- Hung, Y.-F., Schwarten, M., Hoffmann, S., Willbold, D., Sklan, E., & Koenig, B. (2015). Amino Terminal Region of Dengue Virus NS4A Cytosolic Domain Binds to Highly Curved Liposomes. *Viruses*, 7(7), 4119–4130. <http://doi.org/10.3390/v7072812>
- Jitoboam, K., Phaonakrop, N., Libsittikul, S., Thepparit, C., Roytrakul, S., & Smith, D. R. (2016). Actin Interacts with Dengue Virus 2 and 4 Envelope Proteins. *Plos One*, 11(3), e0151951. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0151951>
- Jorge Reyes-del Valle, Salvador Chavez-Salinas, Fernando Medina, and R. M. del A. (2005). Heat Shock Protein 90 and Heat Shock Protein 70 Are Components of Dengue Virus Receptor Complex in Human Cells. *Journal of Virology*, 79(8), 4557–4567. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.8.4557>
- Joshi, V., Mourya, D. T., & Sharma, R. C. (2002). Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(2 SUPPL.), 158–161.

Kuadkitkan, A., Wikan, N., Fongsaran, C., & Smith, D. R. (2010). Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology*, *406*(1), 149–161. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.015>

Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, *108*(5), 717–725. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00660-8](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00660-8)

León-Juárez, M., Martínez-Castillo, M., Shrivastava, G., García-Cordero, J., Villegas-Sepulveda, N., Mondragón-Castelán, M., Cedillo-Barrón, L. (2016). Recombinant Dengue virus protein NS2B alters membrane permeability in different membrane models. *Virology Journal*, *13*(1), 1. <http://doi.org/10.1186/s12985-015-0456-4>

Lindenbach, B.D & Rice, C.M., (1990). Molecular Biology of flaviviruses. *Advances in virus research*, *59*(27), 23-61.

Lowenberger, C. (2001). Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *31*(3), 219–229. [http://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00141-7](http://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00141-7)

Mandl, C. W., Allison, S. L., Holzmann, H., Meixner, T., & Heinz, F. X. (2000). Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. *Journal of Virology*, *74*(20), 9601–9. <http://doi.org/10.1128/JVI.74.20.9601-9609.2000>

Manuscript, A., & Genetic, N. (2015). NIH Public Access, *1*(1), 21–31. <http://doi.org/10.1007/s40475-013-0007-2.Novel>

Martina, B. E. E. (2014). Dengue pathogenesis: A disease driven by the host response. *Science Progress*, *97*(3), 197–214. <http://doi.org/10.3184/003685014X14049173153889>

Mercado-Curiel, R. F., Black, W. C., & Muñoz, M. D. L. (2008). A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiology*, *8*(6), 118. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-8-118>

Mercado-Curiel, R. F., Esquinca-Avilés, H. A., Tovar, R., Díaz-Badillo, A., Camacho-Nuez, M., & Muñoz, M. D. L. (2006). The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC Microbiology*, *6*, 85. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-6-85>

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, *427*(6972), 313–319. <http://doi.org/10.1038/nature02165>

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(12), 6986–6991. <http://doi.org/10.1073/pnas.0832193100>

Morrison, J., Aguirre, S., & Fernandez-Sesma, A. (2012). Innate immunity evasion by dengue virus. *Viruses*, *4*(3), 397–413. <http://doi.org/10.3390/v4030397>

Mosso, C., Galván-Mendoza, I. J., Ludert, J. E., & del Angel, R. M. (2008). Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology*, *378*(1), 193–199. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2008.05.012>

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews. Microbiology*, *3*(1), 13–22. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1067>

Muñoz, M. D. L., Limón-Camacho, G., Tovar, R., Diaz-Badillo, A., Mendoza-Hernández, G., & Black, W. C. (2013). Proteomic identification of dengue virus binding proteins in *Aedes aegypti* mosquitoes and *Aedes albopictus* cells. *Biomed Research International*, *2013*. <http://doi.org/10.1155/2013/875958>

Olagnier, D., Peri, S., Steel, C., van Montfoort, N., Chiang, C., Beljanski, V., Hiscott, J. (2014). Cellular Oxidative Stress Response Controls the Antiviral and Apoptotic Programs in Dengue Virus-Infected Dendritic Cells. *PLoS Pathogens*, *10*(12). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004566>

OMS, 2009. (2009). Dengue Guías Para El Diagnostico, Tratamiento, Prevencion Y Control. *Oms Y Programa Especial Para Investigacion Y Capacitacion De Enfermedades Tropicales*, 113–115.

Paingankar, M. S., Gokhale, M. D., & Deobagkar, D. N. (2010). Dengue-2-virus-interacting polypeptides involved in mosquito cell infection. *Archives of Virology*, *155*(9), 1453–1461. <http://doi.org/10.1007/s00705-010-0728-7>

Pole, S. (2012). References and Notes 1., *335*(March), 1215–1220. <http://doi.org/10.1126/science.1229223>

Ramadona, A. L., Lazuardi, L., Hii, Y. L., & Holmner, Å. (2016). Prediction of Dengue Outbreaks based on Disease Surveillance and Meteorological Data, 1–26. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0152688>

Randolph, V. B., & Stollar, V. (1990). Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. *Journal of General Virology*, *71*(8), 1845–1850. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-71-8-1845>

- Randolph, V. B., Winkler, G., & Stollar, V. (1990). Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. *Virology*, *174*(2), 450–458. [http://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90099-D](http://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90099-D)
- Reddy, T., & Sansom, M. S. P. (2016). The Role of the Membrane in the Structure and Biophysical Robustness of the Dengue Virion Envelope. *Structure*, *24*(3), 375–382. <http://doi.org/10.1016/j.str.2015.12.011>
- Rockstroh, A., Barzon, L., Pacenti, M., Palù, G., Niedrig, M., & Ulbert, S. (2015). Recombinant Envelope-Proteins with Mutations in the Conserved Fusion Loop Allow Specific Serological Diagnosis of Dengue-Infections. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(11), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004218>
- Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(16), 2773–2786. <http://doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z>
- Simmons, M., Sun, P., & Putnak, R. (2016). Recombinant dengue 2 Virus NS3 helicase protein enhances antibody and T-Cell response of purified inactivated vaccine. *PLoS ONE*, *11*(4), 1–16. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0152811>
- Smit, J. M., Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I., & Wilschut, J. (2011). Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*, *3*(2), 160–171. <http://doi.org/10.3390/v3020160>
- Smith, D. R. (2012). An update on mosquito cell expressed dengue virus receptor proteins. *Insect Molecular Biology*, *21*(1), 1–7. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01098.x>
- Tang, Y. L., Chiu, C. Y., Lin, C. Y., Huang, C. H., Chen, Y. H., Destura, R. V., Wu, H. C. (2015). Establishment and comparison of two different diagnostic platforms for detection of DENV1 NS1 protein. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(11), 27850–27864. <http://doi.org/10.3390/ijms161126069>
- Tham, H.-W., Balasubramaniam, V. R. M. T., Chew, M.-F., Ahmad, H., & Hassan, S. S. (2015). Protein-protein interactions between *A. aegypti* midgut and dengue virus 2: two-hybrid screens using the midgut cDNA library. *The Journal of Infection in Developing Countries*, *9*(12). <http://doi.org/10.3855/jidc.6422>
- Torrentes-Carvalho, A., Azeredo, E. L., Reis, S. R. I., Miranda, A. S., Gandini, M., Barbosa, L. S., & Kubelka, C. F. (2009). Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*(8), 1091–1099. <http://doi.org/10.1590/S0074-02762009000800005>
- Upanan, S., Kuadkitkan, A., & Smith, D. R. (2008). Identification of dengue virus binding proteins using affinity chromatography. *Journal of Virological Methods*, *151*(2), 325–328. <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.05.001>

Wahala, W. M. P. B., & de Silva, A. M. (2011). The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses*, 3(12), 2374–2395. <http://doi.org/10.3390/v3122374>

Wang, Q.-Y., Dong, H., Zou, B., Karuna, R., Wan, K. F., Zou, J., Shi, P.-Y. (2015). Discovery of Dengue Virus NS4B Inhibitors. *Journal of Virology*, 89(16), 8233–8244. <http://doi.org/10.1128/JVI.00855-15>

Weaver, S. C., & Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), 523–540. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003>

Whitesides, G. M. (2004). Whitesides' Group: Writing a paper. *Advanced Materials*, 16(15 SPEC. ISS.), 1375–1377.

Xie, X., Zou, J., Puttikhunt, C., Yuan, Z., & Shi, P.-Y. (2015). Two Distinct Sets of NS2A Molecules Are Responsible for Dengue Virus RNA Synthesis and Virion Assembly. *Journal of Virology*, 89(2), 1298–313. <http://doi.org/10.1128/JVI.02882-14>

Yu, I., Zhang, W., Holdaway, H. A., Li, L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Chen, J. (2008). Conformational Changes Necessary for Mem-, 13(2005), 1834–1838.

Anexos

Al mismo tiempo que se trabajaba con la proteína E de DENV-2 completa se trabajó también con el dominio III de esta proteína (DIII).

A partir de la construcción PJET1.2-E se amplificó el DIII con los primers específicos obtenidos de Sigma-Aldrich (Tabla 24).

| Primer | Secuencia | Tm (°C) | Tamaño de amplificado |
|---------------------|----------------------------------|---------|-----------------------|
| Forward DIII | 5'AGGAATTC TCAAAGGAATGTCATAC3' | 57.3 | 336 pb |
| Reverse DIII | 5'AGAAGCTT TTTTCTTAAACCAGTTGAG3' | 59.4 | |

Tabla 24. Primers específicos para amplificar la región codificante del DIII de la proteína E de DENV2. En rojo se marcan los sitios de reconocimiento para EcoRI en el primer forward y para HindIII en el primer reverse.

La reacción de PCR que se llevó a cabo fue la siguiente (Tabla 25):

| Muestra 1 | | Control negativo | |
|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
| Componente | Volumen (µL) | Componente | Volumen (µL) |
| Buffer HF 5X | 4.0 µL | Buffer HF 5X | 4.0 µL |
| dNTPs 10mM | 0.4 µL | dNTPs 10mM | 0.4 µL |
| Primer Fwd | 1.2 µL | Primer Fwd | 1.2 µL |
| Primer Rev | 1.2 µL | Primer Rev | 1.2 µL |
| Phusion pol | 0.2 µL | Phusion pol | 0.2 µL |
| DMSO | 0.6 µL | DMSO | 0.6 µL |
| DNA | 2.0 µL | DNA | 0.0 µL |
| Agua | 14.4 µL | Agua | 16.4 µL |
| Total de reacción | 20.0 µL | Total de reacción | 20.0 µL |

Tabla 25. Componentes de la reacción de amplificación de DIII.

Las condiciones que se programaron en el termociclador fueron las que se muestran en la figura 40.

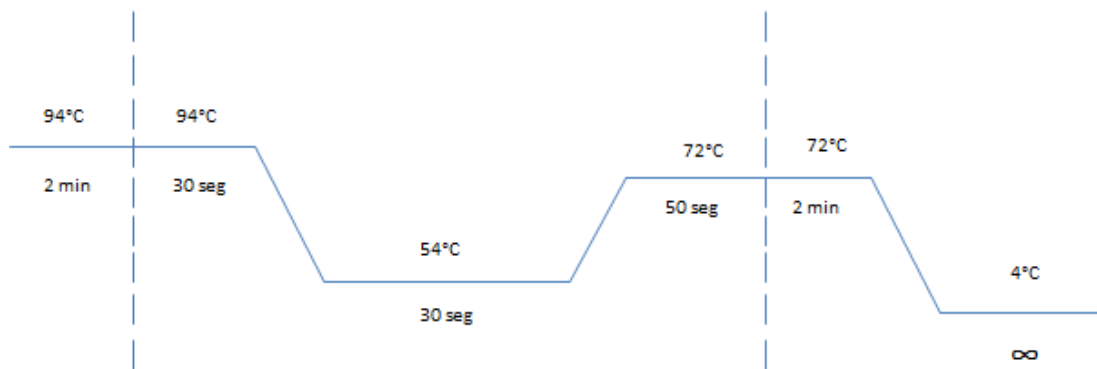


Figura 40. Condiciones para amplificar el DIII.

El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1.8%, el resultado obtenido se muestra en la figura 41.

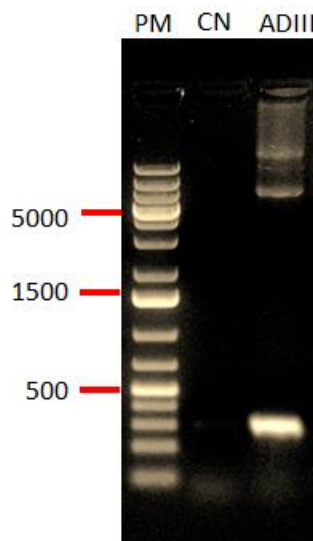


Figura 41. Amplificación de DIII (300 pb aproximadamente). En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 1kb. En el carril 2 se muestra el control negativo (CN) en donde no se observan amplificados. En el carril 3 se observa el amplificado de DIII (ADIII) en donde se observa muy intensa una banda a 300 pb aproximadamente.

La banda correspondiente al DIII se cortó, purificó y se ligó con el vector PJET1.2 BLUNT como se especifica en los apartados D y F de la sección de

materiales y métodos de esta tesis. Una vez concluida la ligación, se obtuvo la construcción ejemplificada en la figura 42.

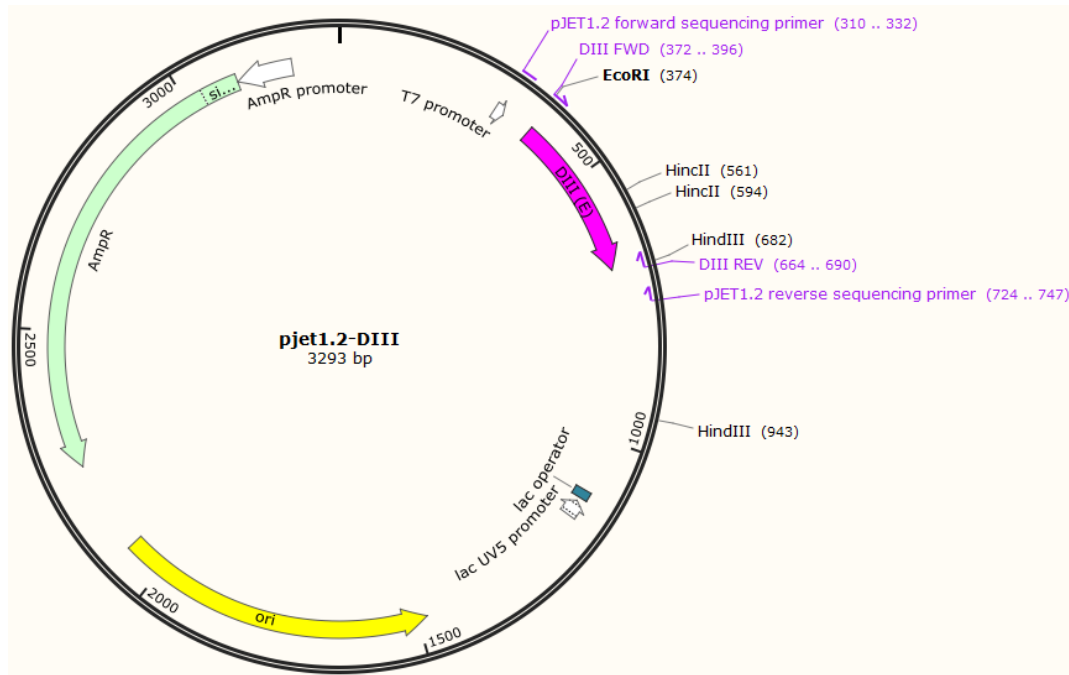


Figura 42. Mapa de la construcción PJET1.2-DIII con un tamaño aproximado de 3293 pb. Se ejemplifican también los sitios que abarcan los primers reverse y forward específicos para amplificar el DIII y la región que abarcan los primers contenidos en el kit CloneJET de QIAGEN para secuenciar. Pueden observarse también los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoRI y HindIII.

Con la construcción PJET1.2-DIII se transformaron bacterias *E.coli* DH5 α competentes obteniéndose las candidatas que se observan en la figura 43.

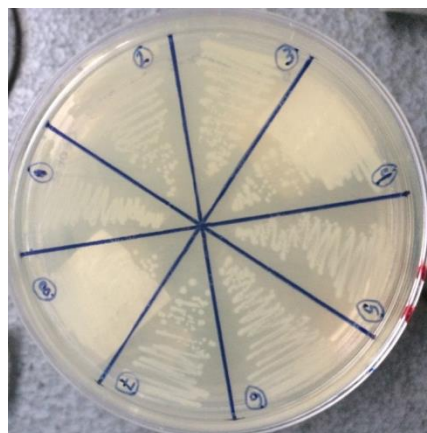


Figura 43. Candidatas transformadas con PJET1.2-DIII (segundo pase).

De las candidatas obtenidas de la transformación con PJET1.2-DIII se seleccionaron las 4 primeras candidatas y se les hizo una colony PCR de acuerdo a lo establecido en el apartado H de la sección de métodos y materiales de esta tesis.

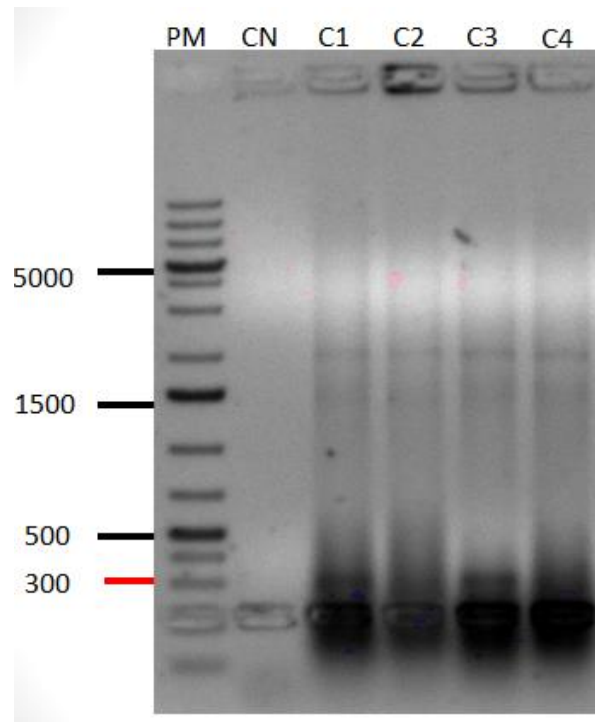


Figura 44. Colony PCR de 4 candidatas seleccionadas obtenidas de la transformación con la construcción PJET1.2-DIII. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular. En el carril 2 se observa el control negativo (CN) sin ningún amplificado. En los carriles 3-6 se observan las candidatas C1-C4 respectivamente. Únicamente para C1 y C3 se observaron amplificados claros a un tamaño aproximado de 300 pb.

A las candidatas 1 (C1) y 3 (C3) se les extrajo el plásmido de acuerdo a lo especificado en el apartado I de la sección materiales y métodos. Estos plásmidos se analizaron mediante restricción con la enzima HincII para comprobar que se encontraba presente el inserto deseado (Fig.45). Se utilizó un gel de agarosa al 1.8%.

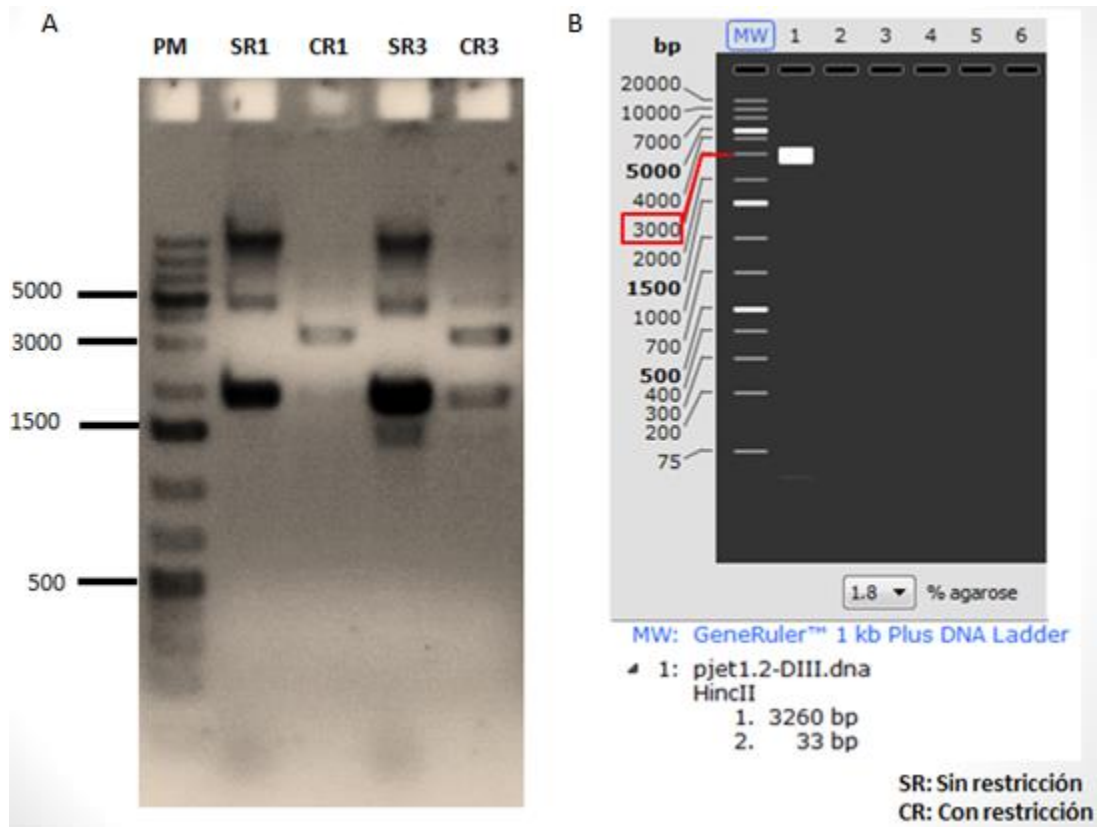


Figura 45. Restricción de PJET1.2-DIII con HincII. (A) Resultados obtenidos de la restricción con HincII. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 1kb. En los carriles 2 y 4 se cargaron las muestras sin restringir SR1 corresponde a la candidata 1, SR3 corresponde a la candidata 3. Los carriles 3 y 5 corresponden a las muestras restringidas. CR1 corresponde a la candidata 1 y CR3 corresponde a la candidata 3. (B) Resultado teórico esperado para la restricción con HincII si el plásmido contenía el inserto deseado.

Como se observa en la figura 45A solo la candidata 1 mostró el comportamiento esperado. Para la candidata 3 se obtuvo la banda esperada y además una banda extra no esperada.

Con ambas candidatas se hizo una PCR a partir del plásmido para ver si con las 2 se obtenía un amplificado correspondiente al DIII. Los resultados se observan en la figura 46.

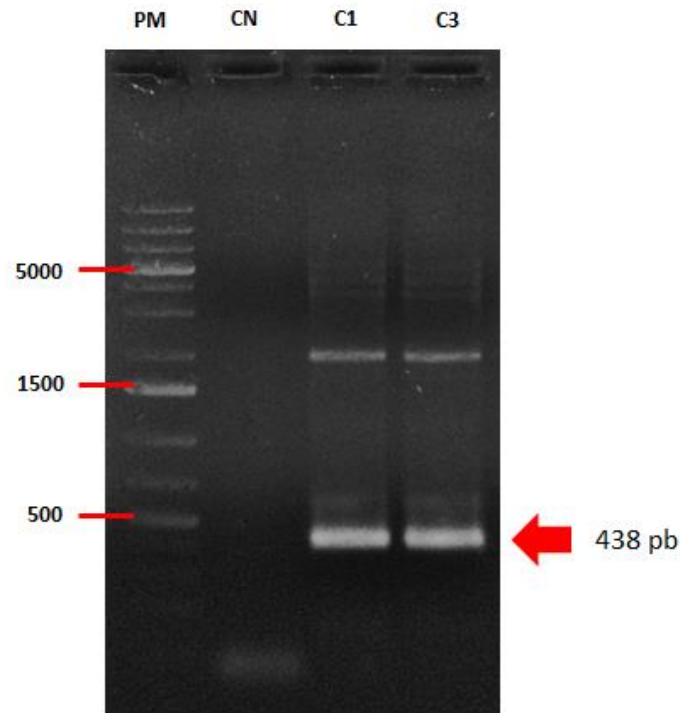


Figura 46. PCR a partir del plásmido extraído PJET1.2-DIII de las candidatas 1 y 3. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 1 kb. En el carril 2 se observa el control negativo (CN) sin ningún amplificado. En los carriles 3 y 4 se observan los productos de PCR obtenidos con C1 y C3 respectivamente.

Se observa un amplificado de 438 pb aproximadamente para ambas candidatas por que se utilizaron los primers para secuenciar del kit cloneJET, los cuáles agregan aproximadamente 100 pb más al amplificado obtenido.

Los ensayos de restricción con EcoRI y HindIII se llevaron a cabo con la candidata 1 que fue la que dio el resultado esperado para la restricción con HincII. Los resultados se observan en la figura 47.

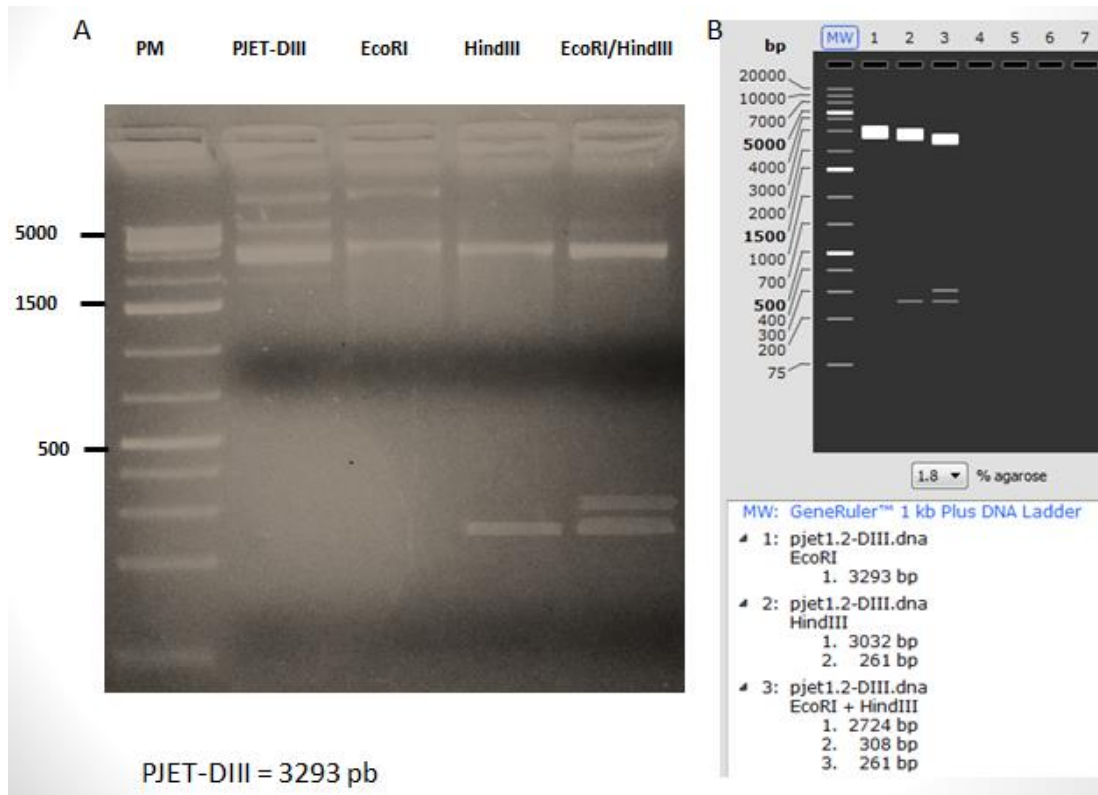


Figura 47. Restricciones con EcoRI y HindIII. (A) Resultados obtenidos con la candidata 1. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 1 kb. En el carril 2 se observa el plásmido PJET1.2-DIII sin restringir. En los carriles 3, 4 y 5 se observan las restricciones con EcoRI, HindIII y con ambas enzimas (EcoRI/HindIII) respectivamente. (B) Resultados teóricos esperados para las restricciones mencionadas.

En la doble restricción se observa el fragmento de 308 pb liberado que corresponde al DIII, esta banda se cortó, se purificó y se ligó con el plásmido de expresión PPROEX1 que también se restringió con las enzimas EcoRI y HindIII. Una vez ligado el DIII con PPROEX1 se utilizó la construcción PPROEX1-DIII (Fig. 48) para transformar células competentes *E.coli* DH5 α . De esta transformación se obtuvieron las colonias mostradas en la figura 49 y se seleccionaron 8 candidatas al azar.

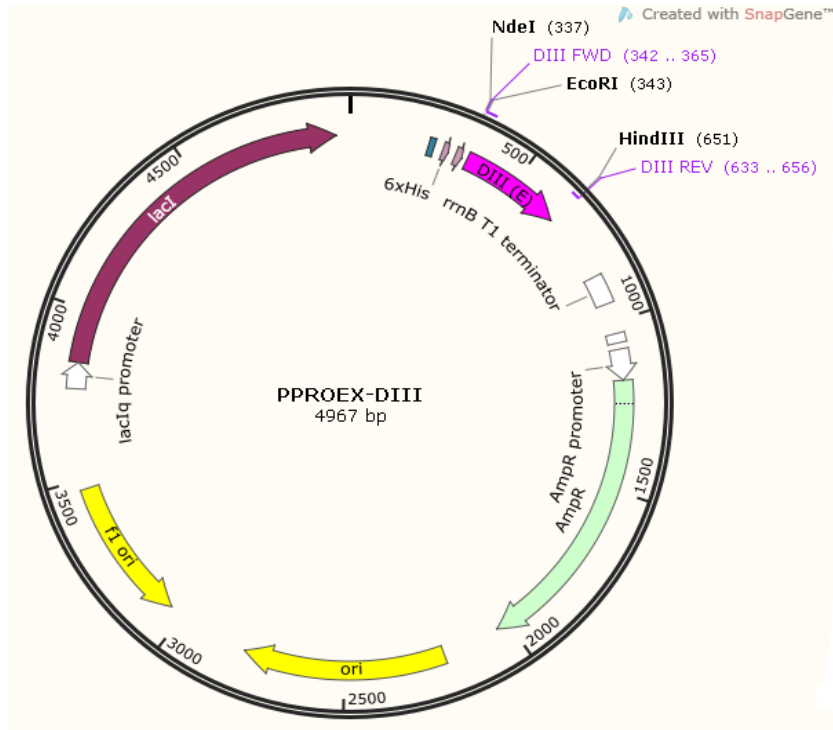


Figura 48.

Mapa de la construcción PPROEX1-DIII. Tamaño aproximado de 4967 pb. Se observa el sitio de restricción EcoRI y HindIII flanqueando los extremos del inserto correspondiente al DIII.

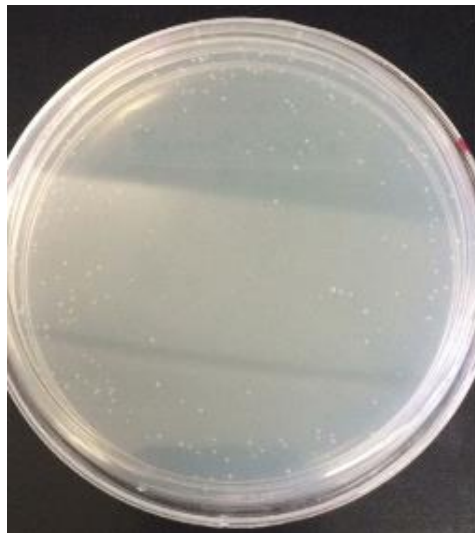


Figura 49. Colonias obtenidas de la transformación de *E.coli* DH5 α con la construcción PPROEX1-DIII, de las cuáles se seleccionaron 8 candidatas al azar.

Con las 8 candidatas seleccionadas se hizo una colony PCR siguiendo el protocolo descrito en el apartado H de la sección de métodos y materiales de la presente tesis.

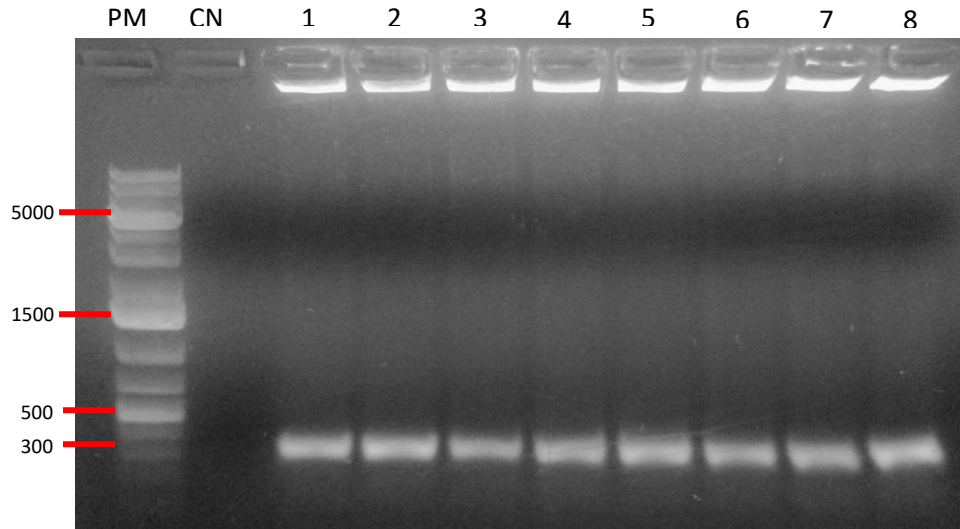


Figura 50. Colony PCR de las candidatas obtenidas de la transformación con PPROEX1-DIII. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular (PM); en el carril 2 se cargó el control negativo y no se observan amplificadas. En los carriles 1-8 se cargaron las muestras correspondientes a los productos de PCR de las candidatas C1-C8 respectivamente, para todas las candidatas se observan amplificadas de un tamaño aproximado de 300 pb correspondientes al DIII.

Con la construcción PPROEX1-DIII se va a secuenciar y se harán alineamientos para ver que se trate del DIII de DENV-2. Una vez confirmado esto se harán los ensayos de sobreexpresión y posteriormente se correrán los geles de SDS-PAGE al 12% y los correspondientes Western blots con anticuerpos específicos para el DIII para comprobar que si se está sobreexpresando el DIII para así poder purificarlo con columnas de níquel y posteriormente acoplarlo a columnas de sepharose B para poder pasar los extractos proteicos de intestino medio de mosquito con diferentes susceptibilidades a la infección por DENV-2 y así obtener las proteínas que estén interactuando específicamente con el DIII de la proteína E de DENV-2.