

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DEL VIRUS DEL
DENGUE MEDIANTE ENSAYOS DE MOVILIDAD DE
HETERODUPLEX EN EL ESTADO DE QUERÉTARO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

VALERIA MARTÍN DEL CAMPO PÉREZ

DIRIGIDA POR

M. en IBB. JOSÉ CARMEN GUDIÑO ROSALES

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011.

FACULTAD DE
QUÍMICA



BIBLOTECA

No. Adq. JS1085

No. Titulo _____

~~No.~~ 616.921

C198c





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DEL VIRUS DEL DENGUE MEDIANTE ENSAYOS DE MOVILIDAD DE HETERODUPLEX EN EL ESTADO DE QUERÉTARO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

VALERIA MARTÍN DEL CAMPO PÉREZ

DIRIGIDA POR

M. en IBB. JOSÉ CARMEN GUDIÑO ROSALES

SINODALES

M. en IBB. JOSÉ CARMEN GUDIÑO ROSALES
DIRECTOR

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES
SINODAL

Dr. CARLOS FRANCISCO SOSA FERREYRA
SINODAL

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL.	i
ÍNDICE DE CUADROS.	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.	v
RESUMEN.	
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. ANTECEDENTES.	3
II.1 Virus del dengue.	3
II.2 Vectores del virus del dengue.	3
II.3 Ciclos de transmisión del virus del dengue.	5
II.4 Hospedero del virus del dengue.	6
II.5 Estructura molecular del virus del dengue.	7
II.5.1 Proteínas estructurales del virus del dengue.	8
II.5.2 Proteínas no estructurales del virus del dengue.	8
II.6 Ciclo infeccioso del virus del dengue.	10
II.6.1 Receptores celulares asociados al virus del dengue	10
II.6.2 Mecanismo de entrada del virus del dengue a células del hospedero.	10
II.7 Clasificación de las manifestaciones clínicas del dengue.	11
II.7.1 Dengue clásico.	11
II.7.2 Dengue hemorrágico.	13
II.7.3 Síndrome de coque por dengue.	14
II.8 Historia natural de la infección.	14
II.9 Patogénesis del virus del dengue.	15
II.10 Epidemiología del virus del dengue.	16
II.11 Definiciones operacionales de caso.	19
II.12 Diagnóstico y tipificación del virus del dengue.	20
II.12.1 Métodos de diagnóstico de infección por dengue.	20

II.12.2 Métodos de tipificación del virus del dengue.	22
II.13 Ensayo de movilidad por heteroduplex.	23
III. HIPÓTESIS.	26
IV. OBJETIVOS.	27
IV.1 General.	27
IV.2 Específicos.	27
V. METODOLOGÍA.	28
V.1 Materiales.	28
V.1.1 Reactivos	28
V.1.2 Equipos	29
V.2 Métodos.	29
V.2.1 Extracción total de ácidos nucleicos virales.	29
V.2.2 RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplado a Transcripción Reversa).	31
V.2.3 PCR estándar.	31
V.2.4 Electroforesis en poliacrilamida.	32
V.2.4.1 Preparación del gel de poliacrilamida.	32
V.2.4.2 Electroforesis de los productos de PCR.	33
V.2.4.3 Tinción y fotodocumentación.	33
V.2.5 HMA (Ensayo de Movilidad de Heteroduplex).	33
V.3 Diseño experimental.	34
VI. RESULTADOS.	35
VI.1 Análisis bioinformático de los genomas del virus del dengue.	35
VI.2 Muestras problema y virus de referencia.	37
VI.3 Determinación de los patrones de HMA con los virus de referencia.	37
VI.3.1 RT-PCR de los virus de referencia.	37
VI.3.2 PCR de los virus de referencia.	37
VI.3.3 HMA de los virus de referencia.	37
VI.4 Tipificación de muestras clínicas.	39
VI.4.1 RT-PCR de muestras clínicas.	39

VI.4.2 HMA de muestras clínicas.	40
VI.5 PCR específico de serotipos.	40
VII. DISCUSIÓN.	43
VII.1 Tipificación de los cuatro virus de referencia (DENV 1-4).	43
VII.2 Tipificación de las muestras clínicas históricas.	44
VII.3 RT-PCR específico de cada serotipo.	44
VII.4 Consideraciones sobre el HMA.	45
VIII. CONCLUSIONES.	47
IX. BIBLIOGRAFÍA.	49
ANEXOS.	55

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Oligonucleótidos usados en las reacciones de RT-PCR genérico y de serotipos.	32
2 Condiciones de RT-PCR y PCR estándar con oligonucleótidos genéricos y RT-PCR estándar con oligonucleótidos específicos de serotipos.	32
3 Porcentajes de homología de las secuencias consenso generadas para cada serotipo del virus del dengue (DENV 1-4).	44
4 Comparativo de los datos generados por el HMA y RT-PCR de serotipos.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> .	4
2 Áreas en riesgo de transmisión del virus del dengue.	5
3 Estructura y organización genómica del virus del dengue.	7
4 Replicación viral del dengue.	12
5 Historia natural de la infección por dengue.	15
6 Promedio de casos confirmados de dengue reportado por la OMS.	17
7 Distribución del mosquito <i>A. aegypti</i> en el continente Americano.	18
8 Casos de infecciones por dengue en México en los últimos 5 años.	19
9 Diagrama del HMA.	25
10 Diseño experimental para tipificación de los virus de referencia y de las muestras clínicas mediante HMA	34
11 Diagrama de la amplificación del fragmento genérico de 164 pb de la región C del genoma viral.	35
12 Alineación de las secuencias extraídas del GeneBank correspondientes a los cuatro serotipos del virus del dengue	36
13 Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% de la amplificación por RT-PCR de los virus de referencia.	38
14 Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% de la re-amplificación por PCR de los virus de referencia.	38
15 Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% del HMA de los virus de referencia.	39
16 Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% de la amplificación por RT-PCR genérico de muestras clínicas.	40
17 Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% del HMA de las muestras clínicas.	41
18 Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% del RT-PCR múltiplex específico de serotipos.	42

RESUMEN

Las infecciones por virus del dengue son un problema de salud pública importante. La enfermedad es provocada por cualquiera de los cuatro serotipos virales (DENV1-4) cuya tipificación es vital para una vigilancia epidemiológica adecuada que permita implementar acciones encaminadas a prevenir la aparición de casos de dengue clásico o sus manifestaciones graves. El presente trabajo tiene como objetivo la identificación de serotipos virales, utilizando la técnica de Ensayos de Movilidad de Heteroduplex (HMA). Se estudiaron sobrenadantes de cultivos de virales de los cuatro serotipos y 21 sueros de pacientes con infección confirmada por dengue. Se extrajeron los de ácidos nucleicos, seguido de amplificación por RT-PCR de un fragmento de 164 pb del gen de la cápside. Los amplicones de los 4 serotipos de referencia se analizaron por HMA, y posteriormente se utilizaron para la determinación del serotipo en las muestras clínicas. Para el HMA se combinaron los amplicones de cada muestra con los de los 4 virus de referencia, la mezcla se calentó a 95°C, y enfrió a 4°C. Posteriormente se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5%. El HMA con los virus de referencia mostró que es posible utilizar esta técnica para la identificación del serotipo. Con este ensayo se logró tipificar a 20 muestras del serotipo 1 y una del 3 (solo una muestra no fue tipificable). Esta técnica es una alternativa atractiva debido a que es económica, sencilla, rápida para el seguimiento de los virus circulantes del dengue y podría serlo para otros patógenos.

I. INTRODUCCIÓN.

El dengue es una enfermedad aguda febril producida por el arbovirus llamado virus del dengue, éste pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Las partículas virales, constan de una hebra de ARN (Ácido ribonucleico) de polaridad positiva con aproximadamente 11 kilobases, encerrado por una nucleocápside proteica, que a su vez, se encuentra rodeada de una membrana lipídica. El dengue se transmite al humano únicamente por picadura de la hembra hematófaga del mosquito *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Existen cuatro serotipos virales: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 y cada uno, genera una respuesta inmune que puede ser protectora contra los virus del mismo serotipo, pero no contra los otros. Las formas clínicas de la infección se clasifican en dengue clásico (DC), dengue hemorrágico (DH) y el síndrome de choque por dengue (SCD).

El diagnóstico y tipificación del virus, son prioridad de los sistemas nacionales de salud. La constante vigilancia epidemiológica pone en evidencia que el comportamiento de la enfermedad varía según el serotipo infectante, por tanto, la tipificación es un instrumento epidemiológicamente útil pues permite generar alertas enfocadas en prevenir la aparición de casos de dengue hemorrágico o choque por dengue en la población.

El Análisis de Movilidad por Heteroduplex (HMA, por sus siglas en inglés), es un método de tipificación viral, que no requiere altos niveles de bioseguridad en los laboratorios a diferencia de las técnicas basadas en cultivar al virus como los ensayos de neutralización viral. Además, es una metodología económica, rápida y sensible, en comparación con otros métodos usados como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), ya sea en punto final o en tiempo real, seguida de secuenciación. Para la aplicación del HMA, es necesario amplificar una región variable de ADN (Ácido desoxirribonucleico) que esté flanqueada por zonas conservadas. Así se puede utilizar un juego de oligonucleótidos comunes para los cuatro serotipos (PCR genérico) para obtener un amplicón con suficiente

variabilidad al interior del fragmento que permita la diferenciación entre los cuatro serotipos.

En los ensayos de HMA, se mezclan los productos amplificados por PCR genérico de las muestras problema y de los virus de referencia de cada serotipo. La desnaturalización y renaturalización de estas mezclas (por calentamiento-enfriamiento), permite la formación de heteroduplex (moléculas híbridas, donde una hebra del virus de referencia se une a su complementaria, pero de la muestra problema), además de homoduplex (donde ambas hebras son de un mismo origen viral). Las diferencias genéticas entre la muestra problema y los virus de referencia, se detectan por la reducción de la movilidad electroforética de las moléculas híbridas en un gel de poliacrilamida. El retardo en la migración es directamente proporcional a las diferencias en secuencia entre ambas hebras del heteroduplex.

II. ANTECEDENTES.

II.1 Virus del dengue.

El dengue es una de las enfermedades viral es transmitida por artrópodos (arbovirus) de mayor importancia en salud pública (Guha-Sapir y Schimmer, 2005). El agente causal, el virus del dengue, pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* que incluye al virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus del oeste del Nilo, entre otros. En general, los *Flavivirus* son patógenos causantes de fiebre hemorrágica y encefalitis (Koraka, 2007; Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005). El dengue es ocasionado por cualquiera de los cuatro serotipos virales (DENV-1, DENV-2, DENV-3 Y DENV-4) genómicamente relacionados pero serológicamente distintos. Cada serotipo crea inmunidad específica a largo plazo contra el mismo, pero la infección por un segundo serotipo no genera inmunidad protectora contra los otros (Balmaseda y col., 2006).

Los primeros registros que se tienen de un caso probable de dengue, fueron publicados en la enciclopedia China de la Dinastía Jin (265-420 D.C.), la cual refiere a “un veneno de agua” relacionado con insectos voladores además de síntomas como fiebre, erupciones cutáneas, artralgias, dolor retro-ocular y hemorragias (Gluber, 1998 y Capinera, 2008).

II. 2 Vectores del virus del dengue.

Los vectores del virus del dengue pertenecen al género *Aedes*, específicamente de las especies *A. polynesiensis*, *A. mediovittatus*, *A. albopictus* y *A. aegypti*, entre otras. Éstas últimas dos (Figura 1), son las de mayor importancia por su estrecha relación con los humanos en zonas tropicales y sub-tropicales (Cox y col. 2007). *A. aegypti* es considerado el principal vector del virus del dengue debido a la dispersión mundial que logró alcanzar en los últimos años (Figura 2) (Phillips, 2008), aunque raramente se encuentra más allá de los 1000 metros por encima del

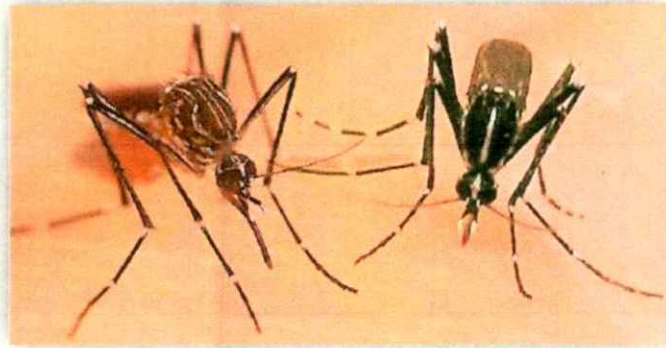


Figura 1. *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*: Izquierda y derecha respectivamente (FMEL, 1999).

nivel del mar (Gluber, 1998). En contraste, el *A. albopictus*, es un mosquito con dispersión restringida a zonas boscosas cercanas a humanos de ubicación rural, y ambas especies coexisten en zonas tropicales suburbanas (Cox y col., 2007). *A. aegypti* es uno de los vectores más eficientes para arbovirus debido a su carácter antropofílico. Cuando la hembra hematófaga infecta a los viajeros provenientes de zonas no endémicas, ellos participan en la dispersión del virus, llevándolo a áreas donde el vector se encarga de mantener la transmisión de la infección (OMS, 2009), como fue documentado en los brotes ocurridos en Canadá durante 1974 y 1996, donde se reportaron casos confirmados de dengue, después de la detección en las personas que habían viajado a países tropicales y que regresaron infectados a su lugar de origen, y quienes fueron la fuente de infección para los mosquitos locales (Schofield, 2009).

Son evidentes los cambios dramáticos de la forma, función y hábitat durante el ciclo de vida del mosquito. La hembra hematófaga deposita sus huevos en las paredes húmedas de contenedores con agua (llantas, tinacos, botellas, entre muchos otros). La larva eclosiona cuando el contenedor se inunda por la lluvia o por agua vertida por la gente. Durante los siguientes días, la larva aumenta de tamaño al alimentarse de microorganismos y materia orgánica en la superficie del agua. Posteriormente se transforma en pupa, la cual no se alimenta, pero continúa con su metamorfosis hasta el desarrollo del mosquito adulto (CDC, 2011).

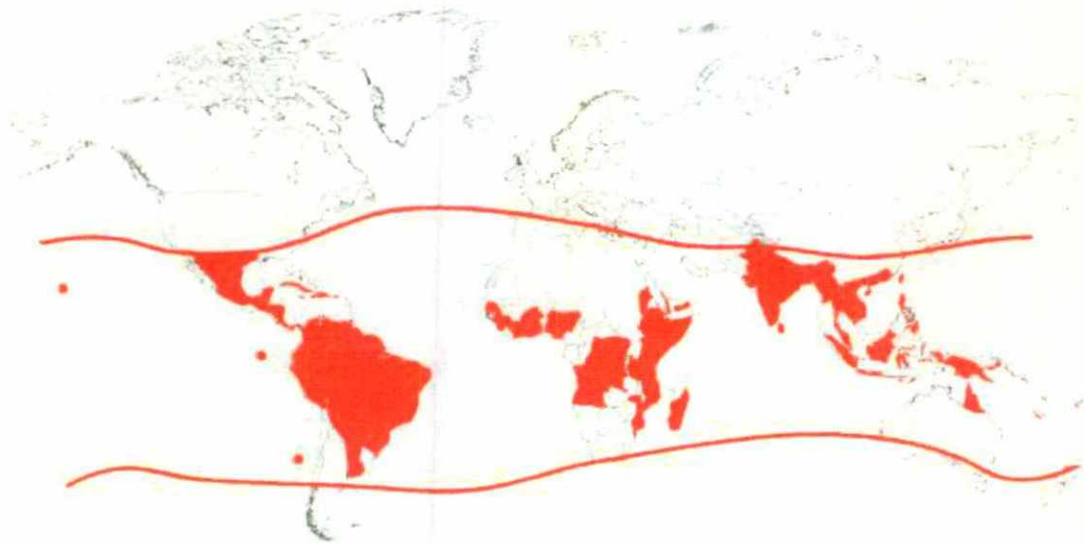


Figura 2. Áreas en riesgo de transmisión del virus del dengue. De acuerdo a las líneas isotermas de acuerdo a enero y julio (límite superior e inferior rojo, respectivamente), se muestran los límites geográficos potenciales para la sobrevivencia del *Aedes aegypti* (OMS, 2009).

El *A. aegypti* y los otros vectores del virus del dengue, han logrado adaptarse al ambiente, de manera que resulta difícil controlar las poblaciones de estos moscos. Sus huevos soportan la disecación por varios meses, lo que significa que aunque todas las larvas, pupas y moscos adultos fueran eliminados en un lapso de tiempo, ocurriría una rápida reinfestación, puesto que los huevos se activan al sumergirse en agua para continuar con su ciclo de vida (CDC, 2011).

II. 3 Ciclos de transmisión del virus del dengue

Existen evidencias genéticas comparativas que sugieren el origen Asiático-tropical del virus del dengue, con el aislamiento de los cuatro serotipos en primates no humanos y moscos *Aedes*. Para el ciclo de transmisión selvático o ciclo zoonótico (primates no humanos/mosquitos selváticos/primates no humanos), se han descrito a las especies *A. africanus*, y *A. furcifer* entre otros, como los vectores en el continente Africano. En Malasia se han logrado aislar los cuatro serotipos selváticos virales en moscos del dosel del bosque (*A. niveus*) y en primates no humanos (Cox y col., 2007 y Moncayo y col., 2004). El ciclo endémico implica la transmisión entre

humanos/mosquitos peridomésticos urbanos/humanos, considerado como una adaptación evolutiva del ciclo selvático, de acuerdo a Wang y colaboradores en el 2000, quienes indicaron que este cambio pudo haber ocurrido hace casi 1500 años, resaltando la evolución independiente de cada uno de los serotipos del dengue. La adaptación del virus a nuevos vectores y hospederos vertebrados no ocurrió de manera simultánea, según Gluber en 1997 y Wang en 2002, pues coinciden en la hipótesis sobre un cambio en la transmisión del virus, inicialmente con moscos del ciclo selvático a moscos del dosel del bosque, luego al *A. albopictus* y posteriormente al *A. aegypti*, de manera que el cambio ocurrió en función de la presión evolutiva por la urbanización de nuevas regiones y adaptación del virus a los nuevos hospederos.

La incubación extrínseca, o incubación del virus en el mosquito, toma de 10 a 12 días de desarrollo (Gluber, 1998), ésta depende del tipo de mosquito y de factores ambientales como humedad y temperatura. Cuando el mosquito ingiere sangre de un hospedero en estado virémico, el virus infecta el tejido digestivo donde se producen más partículas virales que se dispersan mediante la hemolinfa a todo el cuerpo, incluyendo glándulas salivales y gónadas sexuales (Xi y col., 2008). La hembra hematófaga es capaz de transmitir verticalmente el virus, es decir, puede infectar a su prole (transmisión transovárica) lo que aumenta la posibilidad de pandemias o al menos contribuye con la persistencia de casos de DH en áreas endémicas (Hartanti y Tirtadjaja, 2010). Después del periodo de incubación extrínseca, el virus puede transmitirse a otros seres humanos en subsecuentes lapsos de alimentación del mosquito y a partir de entonces, permanece infectante durante el resto de su vida (OMS, 2009).

II. 4 Hospedero del virus del dengue

Después que una persona es picada por un mosquito infectado, el periodo de incubación viral es de 3 a 14 días y posteriormente desarrollará sintomatología típica del dengue. Cabe resaltar que de un 50 a 90%, las infecciones por dengue son asintomáticas (Kyle y Harris, 2008). El virus del dengue es transmitido a

humanos de forma horizontal, es decir: humano-mosco-humano. Sin embargo, la transmisión vertical en humanos (perinatal), es un factor de riesgo para la generación de las formas graves de la infección y de muerte en neonatos, tal como lo reporta Chye y colaboradores en 1997, con los casos de dos madres infectadas por dengue, cuyos hijos nacieron infectados por el virus.

La transmisión mediante la lactancia materna en teoría es posible, pero aún no se tienen reportes. No obstante, en 2002 se documentó un caso de transmisión del virus del Oeste del Nilo (otro Flavivirus) de una madre a su lactante (CDC, 2002).

II.5 Estructura molecular del virus del dengue.

Al ser un *Flavivirus*, los viriones del dengue contienen una sola cadena de ARN dentro de una nucleocápside rodeada de la envoltura lipídica de tamaño de 45 a 55 nanómetros (Chambers y col., 1990). Su genoma es aproximadamente de 11,000 bases de largo (Figura 3), tiene polaridad positiva, es infeccioso, y con un solo marco de lectura que se traduce en una poliproteína, posteriormente escindida por proteasas (virales y celulares) para generar diez productos proteicos. Las primeras tres proteínas son de tipo estructural: La nucleocápside (C), la de membrana (M) que se sintetiza como un precursor "prM" que sufre proteólisis y la glicoproteína de envoltura (E).

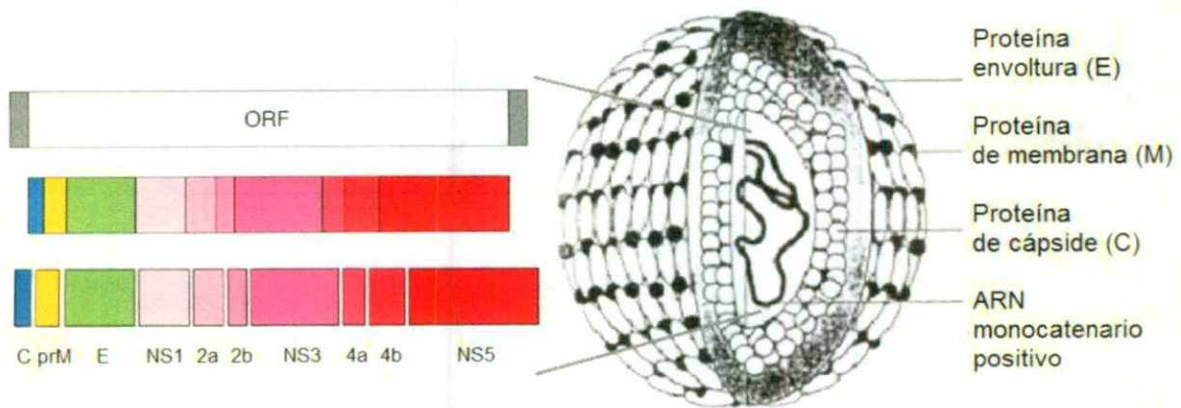


Figura 3. Estructura y organización genómica del virus del dengue (modificado de Rothman, 2004 y Cabezas y col., 2005).

El resto de las proteínas son de carácter no estructural respectivamente denominadas: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5, que están involucradas en la replicación viral además de otras funciones (Rothman, 2004). Los extremos 5' y 3' del genoma, son regiones no codificantes (UTR, por sus siglas en inglés), que se encuentran asociadas a la replicación del virus, traducción y virulencia, debido a la presencia de elementos de regulación de la expresión de los genes virales (Álvarez y col., 2005)

II.5.1 Proteínas estructurales del virus del dengue.

La proteína de la nucleocápside (C) tiene un peso molecular de aproximadamente 13 kD y es rica en residuos de arginina y lisina. C es la primer proteína sintetizada durante la traducción (Murray, 1993). La proteína de membrana (M) es de aproximadamente 8 kD, de tamaño pequeño y no glicosilada, que se forma después del corte proteolítico del precursor glicosilado prM durante la maduración del virus. La formación de M a partir de prM es crucial en la morfogénesis del virus, al incrementar la infectividad viral. (Koraka, 2007). La glicoproteína de envoltura (E) tiene un peso molecular variable entre los cuatro diferentes serotipos, desde los 51 a 59 kD, tiene al menos cuatro determinantes antigénicos, un grupo reactivo de para *Flavivirus*, el complejo y subcomplejo específico del virus del dengue y de los serotipos específicos (Henchal y col., 1982). La proteína E interviene en importantes procesos biológicos como la unión del receptor celular con la hemaglutinina viral que participa en el ensamblaje y fusión de las membranas. Tres dominios estructurales identificados en la región de la proteína E: DI y DII que incluyen péptidos de fusión y DIII que contiene los principales sitios antigénicos involucrados en la neutralización viral (Modis y col., 2004).

II.5.2 Proteínas no estructurales del virus del dengue.

La proteína NS1 es una glicoproteína de 48 kD, contiene dos señales del tipo Asn – X-/Thr, usada para la adición de carbohidratos en sitios específicos conservados en todos los *Flavivirus*. Se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso (RER) y una

vez formada se transporta al aparato de Golgi donde sufre modificaciones postraduccionales para después ser liberada al medio extracelular (Henchal y Putnak, 1990). La función de NS1 no ha sido aún descrita en su totalidad, se ha planteado que posee un papel en la replicación temprana del virus. Mutaciones de esta proteína afectan la virulencia de la partícula viral (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005). La célula infectada expresa la proteína en la superficie celular, siendo diana de la citólisis inmunológica, resultado interesante por su uso potencial en la protección del hombre contra la infección por *Flavivirus* (Chambers y col., 1990).

La proteína NS3 tiene un peso de entre 68 y 70 kD y se encuentra asociada a la membrana. Está altamente conservada en el genoma de los *Flavivirus* y es un componente de la maquinaria enzimática en la replicación del ARN viral, al ser trifuncional con actividad proteasa dirigida a la poliproteína, además de actividad helicasa, ARN trifosfatasa y para la formación de la estructura 5' Cap (Faulgout y col., 1991).

Las proteínas no estructurales NS2a, NS2b, NS4a y NS4b son regiones hidrofóbicas menos conservadas de la poliproteína. Se conoce poco de las funciones de sus funciones en el ciclo de vida de los *Flavivirus*, sin embargo se sabe que están asociadas a la membrana formando componentes de los complejos de replicación viral y también en la localización membranal de las proteínas NS3 y NS5 a través de interacciones proteína-proteína (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005).

La NS5 es la última proteína codificada por la poliproteína. Esta proteína es de carácter básico y tiene un peso entre 103 a 104 kD. Es una de las proteínas más conservadas de los *Flavivirus* que funciona como una ARN-polimerasa dependiente de ARN viral. Parte de ella, actúa como una metil transferasa que encapucha al genoma viral (Egloff y col., 2002).

II.6 Ciclo infeccioso del virus del dengue.

El primer contacto que establece el virus del dengue con su hospedero, es con células dendríticas en la piel (células de Langerhans) y en nódulos linfáticos con monocitos y macrófagos, a través del complejo de receptores de las células humanas y la glicoproteína E de la envoltura del virus. Mediante esta interacción, el virus entra a la célula para replicar su material genético y posteriormente forma nuevas partículas virales que promueven la diseminación de la infección en el hospedero (Rodenhuis-Zybert y col., 2010; Lin y col., 2002).

II.6.1 Receptores celulares asociados al virus del dengue.

En las células dendríticas, los receptores involucrados en la unión con el virus, incluyen a la lectina ICAM3, DC-SING o CD209 con los residuos de manosa de la asparagina (Asn) 67 de la glicoproteína E (Geijtenbeek y col., 2000). De igual manera, se han identificado receptores que interactúan con el virus del dengue en macrófagos y monocitos, como las proteínas de choque térmico Hsp70 y Hsp90, ampliamente distribuidas en la membrana celular. (Reyes-Del Valle y col, 2005). También se han identificado otro tipo de moléculas como las glicosaminoglicano heparán sulfato (SH) involucradas en la adsorción del virus en células endoteliales, hígado y riñón (Chen, 1997 y Del Ángel, 2006).

II.6.2 Mecanismo de entrada del virus del dengue a células del hospedero.

El mecanismo de fusión de la membrana viral con la membrana celular se debe a la interacción de la glicoproteína E con los receptores celulares. La proteína E está compuesta por tres dominios (I, II y III) que conforman toda la envoltura viral. Cuando la proteína E se une a un receptor en la superficie celular, el virión (nucleocápside) se internaliza por endocitosis mediada por clatrina. El endosoma que transporta al virión, sufre una acidificación que promueve la fusión de la nucleocápside viral con la membrana endosomal y así se libera la molécula de ARN de polaridad positiva al citoplasma celular. Inmediatamente se traduce a un polipéptido en la membrana del retículo endoplasmático rugoso (RER) donde es

procesado co y postraduccionalmente por proteasas virales y celulares, generando a las tres proteínas estructurales (C, prM y E) y las siete no estructurales (NS's). Para la producción del ARN genómico es necesaria la síntesis de la polimerasa dependiente de ARN, codificada en el gen NS5 quien copia el ARN original y genera una molécula de ARN con polaridad negativa, la cual sirve como molde para la síntesis de múltiples copias de ARN genómico de polaridad positiva (Clyde y col., 2006). Las réplicas de este ARN viral se empaquetan por la proteína C para formar la nucleocápside del virión quien se une al RER con las proteínas prM y E de la partícula viral orientadas hacia la luz del RER. Posteriormente, el heterodímero prM/E se asocia en trímeros y se cree que su interacción induce la formación de una curva membranal del RER que guía al virión en el proceso de maduración. En el tránsito por el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi, la partícula viral sufre modificaciones, principalmente la escisión del precursor prM/E a prM y E por el pH ácido del RER y la ruptura del dímero en "pr" y M, al ser catalizada por una furina endoproteasa en las cisternas del aparato del Golgi. Entonces, la partícula viral madura es liberada de la célula mediante exocitosis. Este proceso es representado en la Figura 4 (Rodenhuis-Zyberly col., 2010) y la partícula viral madura en la Figura 3.

II. 7 Clasificación de las manifestaciones clínicas del dengue.

Las infecciones por dengue, están acompañada de una variedad de síntomas, desde fiebre hasta manifestaciones hemorrágicas con o sin choque. En general, del total de infecciones sintomáticas por dengue, aproximadamente el 95% corresponde al nivel intermedio del cuadro benigno, denominado dengue clásico (DC). El 5% se consideran formas clínicas graves como la fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y el síndrome de choque por dengue (SCD), que deben ser tratadas oportunamente para evitar la muerte del paciente (Guzmán y Kouri, 1996).

II.7.1 Dengue clásico.

El dengue clásico (DC) es una enfermedad con mayor prevalencia en niños

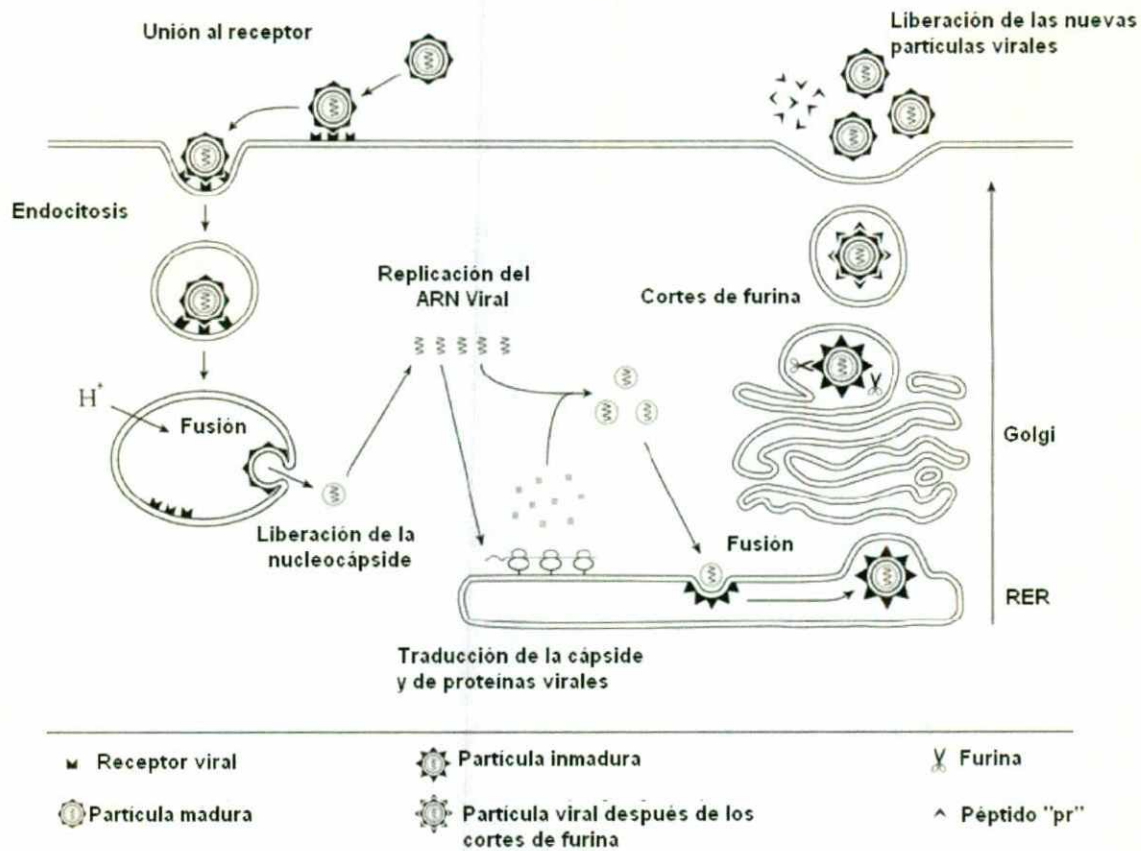


Figura 4. Replicación viral del dengue (Rodenhuis-Zybert, 2010).

mayores de 15 años y adultos. El DC es una enfermedad autolimitante con una fase crítica de sintomatología de 3 a 7 días, la fase de convalecencia se extiende a semanas y está asociada con tristeza y depresión especialmente en adultos (Gluber, 1998; Koraka, 2007). Se caracteriza por cuadros febriles y una variedad de síntomas no específicos: severo dolor frontal de cabeza, retro-orbital, corporal, náuseas, vómito, tristeza, erupciones cutáneas y pulso bajo. El cuadro febril comienza de los 38°C hasta 40°C con duración de 2 a 7 días. La fiebre puede disminuir después de unos días para comportarse de manera bifásica y regresar de 12 a 14 horas después. Los niños pueden presentar síntomas respiratorios tales como tos, dolor de garganta y rinitis (Gluber, 1998). La aparición de las erupciones

cutáneas es variable, se presenta aproximadamente en un 50% de los pacientes con cuadro febril, durante el primero o segundo día de fiebre. Una segunda aparición de erupciones cutáneas pueden manifestarse entre el día 2 y el 6 de la enfermedad, dispersas en el tronco, cara, extremidades y en algunos casos es observado un patrón eritematoso en piel normal. Durante la fase crítica de la enfermedad (2do al 6to día), el conteo de leucocitos totales sangre periférica se encuentran ligeramente por debajo de los 4,500 células/mm³ (Gluber, 1998), al mismo tiempo, es común encontrar un leve descenso del recuento plaquetario a partir de entre 150,000 y 100,000 células/mm³ (trombocitopenia). Los pacientes con DC tienen niveles elevados de las enzimas hepáticas alanin aminotransferasa y aspartato aminotransferasa, de 500 a 1000 U/Litro, tal como se reportó en la epidemia de DENV-4 en 1986 de Puerto Rico (Dietz y col., 1996).

II.7.2 Dengue hemorrágico.

El dengue hemorrágico (DH) generalmente se presenta en niños menores de 15 años y en adultos. Se caracteriza por un cuadro febril de más de 40°C con duración de 2 a 7 días con sintomatología no específica similar al DC o de enfermedades de zonas tropicales relacionadas con fiebres hemorrágicas como sarampión, rubéola y malaria (Gluber 1998). Durante la fase aguda de la enfermedad no es posible discriminar de DH de DC, solo se puede diferenciar por la fuga de plasma y por los niveles altos de hemoconcentración (entre un 20 y 50% del hematocrito). Los signos de fallo circulatorio o de manifestaciones hemorrágicas ocurren cerca de 24 horas antes o después que la temperatura se normaliza. El recuento total de leucocitos se encuentra con alrededor de 2,400 células/mm³ y el conteo plaquetario se muestra por debajo de las 100,000 células/mm³. Los síntomas incluyen hemorragias epiteliales, petequias, lesiones púrpuras, equimosis, hematuria, epistaxis, sangrando de encías, intestinal y gástrico, prueba del torniquete positiva a causas de micro-hemorrágicas de los capilares de la piel, ascitis, derrame pleural, hepatomegalia. Debido a la fuga de plasma hacia el espacio extravascular e intersticial (aumento en la permeabilidad vascular) se presenta el choque hipovolémico. El periodo de choque dura de uno a dos días, y la

mayoría de los pacientes responden rápidamente con oxigenoterapia, rehidratación y medidas de vigilancia médica (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005; Koraka, 2007; Gluber, 1998).

II.7.3 Síndrome de choque por dengue.

El síndrome de choque por dengue (SCD) es la forma clínica más grave, el paciente necesariamente requiere hospitalización pues el sistema circulatorio se ve comprometido. Se caracteriza por los altos niveles de extravasación del plasma (hematocrito elevado o aumento progresivo del mismo), derrame pleural, y adicionalmente pulso débil y rápido, hipotensión, piel fría y cianosis. Además, algunos pacientes pueden presentar letargo, después inquietud y luego entrar rápidamente a un periodo crítico de choque, caracterizado por pulso débil y acelerado. Muchos pacientes después del choque presentan dolor abdominal agudo por periodos cortos de tiempo (Gluber, 1998). La duración del choque usualmente es corta. De no corregir el choque, surgen complicaciones como acidosis metabólica, hemorragia grave del aparato digestivo, encefalopatía por alteraciones metabólicas o electrolíticas y finalmente el paciente puede morir de 12 a 14 horas si no es tratado adecuadamente o bien, puede recuperarse con rapidez después del tratamiento de solución salina o lactato de Ringer y expansores de plasma para los casos severos. (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005).

II.8 Historia natural de la infección.

El desarrollo de la infección primaria por dengue presenta un periodo de viremia donde el virus entra por el torrente sanguíneo y comienza a replicarse. Los pacientes desarrollan respuesta inmune primaria con títulos de anticuerpos bajos de inmunoglobulina M y G (IgM e IgG), siendo IgM, la primera en aparecer y detectada en el 50% de los pacientes durante los días 3-5 de la enfermedad, con incremento del 80% al día 5 y 99% al día 10. En una infección secundaria por dengue, se detectan altos niveles de IgG en la fase aguda de la enfermedad y

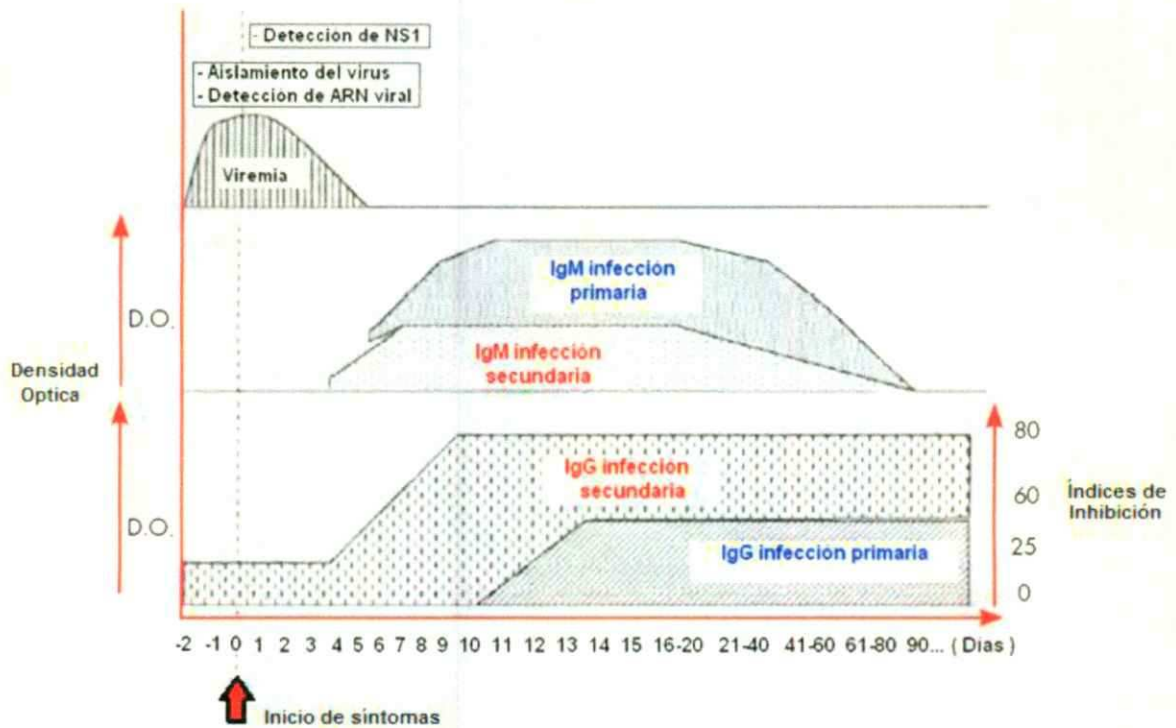


Figura 5. Historia natural de la infección por dengue (OMS, 2009).

persisten por periodos de aproximadamente 10 meses de vida (Figura 5). Los niveles de IgM en una infección secundaria, son significativamente bajos y en algunos casos no son detectables (OMS, 2009).

II.9 Patogénesis del virus del dengue

Cuando el mosquito se alimenta de la sangre humana, el virus del dengue es inyectado al torrente sanguíneo con efectos colaterales en la epidermis y dermis (Martina y col., 2009). El primer contacto con el sistema inmune, es con células de Langerhans (células dendríticas epidérmicas) y macrófagos. Dichos producen factor de necrosis tumoral, interferón alfa, beta y gama que promueven la activación de los linfocitos B y T. Es entonces que el sistema inmune comienza con la producción de anticuerpos dirigidos específicamente contra los determinantes antigénicos del serotipo infectante del virus del dengue (IgM) (Clyde y col., 2006) y en menor cantidad, son producidos anticuerpos dirigidos contra los antígenos del

grupo *Flavivirus* (IgG) que proveen de protección a corto plazo (máximo 6 meses) contra otros serotipos. En una infección secundaria, generada por un serotipo distinto del primero, los títulos de IgG se duplican, relacionándose así, con el desarrollo de las formas graves de la infección del virus del dengue como el DH y SCD (Huan-Yao y col., 2008), descrito como un potenciamiento de la infección, dependiente de anticuerpos (ADE, por sus siglas en inglés).

El fenómeno del ADE, es observado en personas que fueron infectadas por una segunda ocasión. Es entonces que los anticuerpos IgG, interactúan con el virus sin llegar a neutralizarlo. Esta interacción anticuerpo-virus es reconocida de manera aberrante por receptores Fc (RFc), expresados por monocitos y macrófagos (incluyendo a células dendríticas) (Clyde y col., 2006). Los híbridos virus-anticuerpo, adoptan un comportamiento de "Caballo de Troya", debido a que la partícula viral logra introducirse y replicarse dentro de ellos. Los monocitos infectados se vuelven blanco de los mecanismos de defensa del sistema inmune, y al ser atacados, liberan gran cantidad de mediadores químicos que aumentan la permeabilidad capilar, activan al complemento, tromboplastina y en conjunto provocan los cambios fisiopatológicos propios del DH y del SCD (Nielsen, 2009; Yun-Chi y Sheng-Yuan, 2002; Rodenhuis y col., 2010; y Huan-Yao y col., 2008).

II.10 Epidemiología del virus del dengue

El dengue, una enfermedad viral transmitida por mosquitos es considerada de alta velocidad de dispersión alrededor en mundo, según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Sus cifras aseveran que cerca de 2.5 mil millones de personas están en riesgo de ser infectados. Mundialmente son reportados de 50 a 100 millones de casos por año con aproximadamente 22 mil muertes, principalmente niños.

En los últimos 50 años, su incidencia se ha incrementado 30 veces junto con la expansión geográfica del vector (Figura 6). Después de la segunda guerra mundial, el aumento de infecciones por dengue, generó frecuentes epidemias causadas por la circulación simultánea de distintos serotipos (hiperendemicidad).

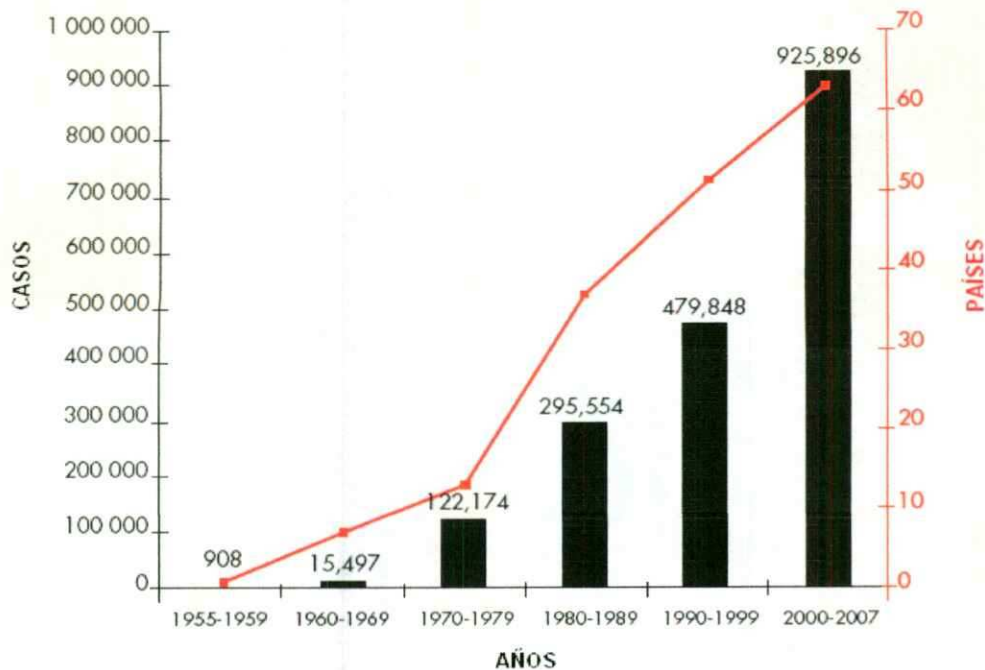


Figura 6. Promedio de casos confirmados de dengue (DC y DH) reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2009).

La primera de ellas, en los años cincuenta, tuvo lugar en el Sureste Asiático, generando así, un gran número de hospitalizaciones y muertes en la población. En la década de 1980, el DH comenzó su segunda expansión en el continente Asiático, sufriendo la India y las islas Maldivas sus primeras pandemias hiperendémicas con mayor presencia del serotipo 3. Hasta 1990, en el mundo se reportaron oficialmente 3 millones de casos de DH localizados principalmente en Asia (OMS, 2009). La vigilancia del dengue en África, en el pasado y presente, no tiene los alcances suficientes para control de los brotes, por tanto, los casos han aumentado dramáticamente, principalmente en el oriente del continente (Gluber, 1998). En América, durante los años 1930 (Figura 7), la alta dispersión del vector *A. aegypti*, elevó considerablemente los casos de infecciones por dengue. A partir de 1948, comenzaron las campañas para erradicar al mosquito en Centro y Sudamérica, sin embargo, el programa de control reproductivo del vector se discontinuó en los años 1970, y como consecuencia, el mosquito reinfestó las zonas libres de esta especie,

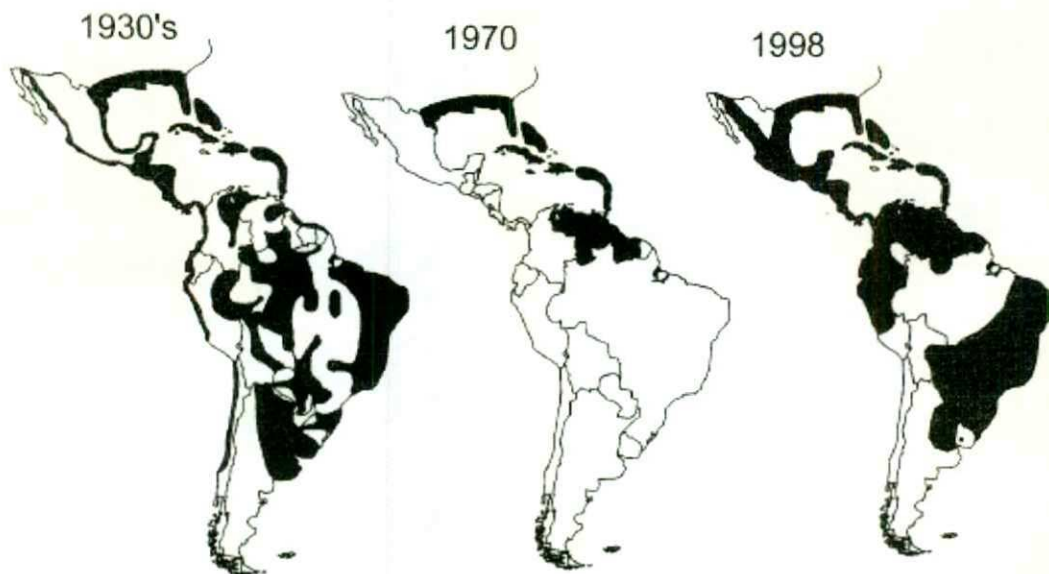


Figura 7. Distribución del mosquito *A. Aegypti* en el continente Americano (Gluber, 1997).

y por esto, durante la década de los 80's y 90's, América experimentó una de las epidemias de dengue más importantes en su historia, además de la introducción de los serotipos 2 y 4, aunado a la dispersión del serotipo 3 en 1994 (Pinheiro y Corber, 1997).

Durante los últimos 6 años, en México aumentaron 2.5 veces los casos confirmados de dengue (Figura 8). El periodo de mayor incidencia de infecciones en la década, colocó al 2009 como año puntero con 41,972 casos, y de los que fueron tipificados en ese mismo año, el 82% pertenecen al serotipo 1, 17% al 2, dos casos reportados del 3 en Jalisco y solo 1 caso del 4 en Chiapas. El estado de Querétaro se consideraba libre de riesgo de infecciones por dengue, sin embargo en los últimos años, la infección se extendió a nuevas zonas geográficas con mayor altitud por el cambio climático, lo que representa una seria amenaza para la salud pública en el Estado. Desde 2005, se reportan casos confirmados de dengue clásico con el serotipo 1, principalmente en los municipios de Jalpan y Arrollo Seco, siendo el año con el mayor número de casos en el Estado hasta la fecha (CENAVECE, 2009).

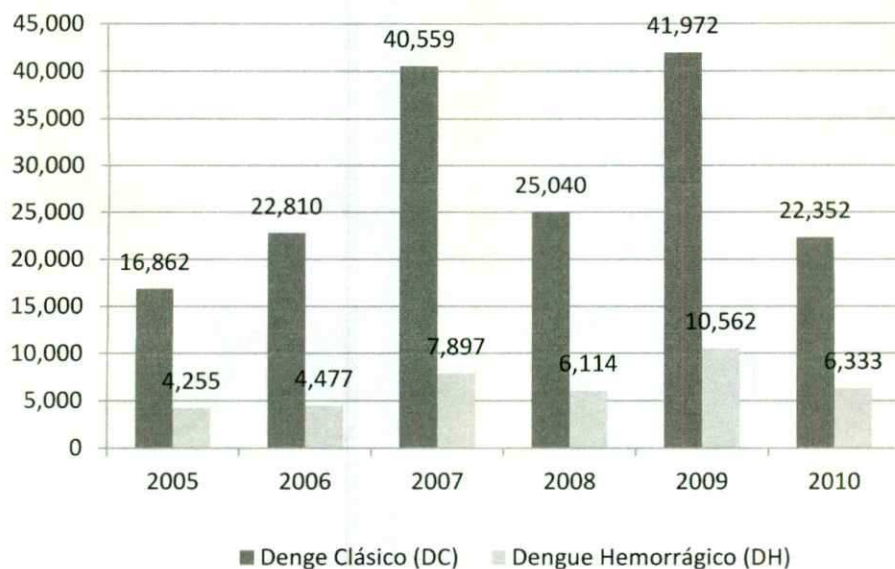


Figura 8. Casos de infecciones por dengue en México en los últimos 5 años (CENAVECE, 2009).

II.11 Definiciones operacionales de caso.

Para propósitos de vigilancia epidemiológica, se han definido los criterios para la detección, notificación y clasificación de casos de dengue. Las definiciones operacionales de caso permiten detectar a la gran mayoría de los casos a través de los signos y síntomas más frecuentes (Montesano, 1997).

Caso sospechoso de dengue: Es toda persona de cualquier edad que resida o proceda de una región en la que haya transmisión de la enfermedad y que presente cuadro febril inespecífico o compatible con infección viral.

Caso probable de dengue: Todo caso sospechoso que presente fiebre y dos o más de las siguientes características: cefalea, mialgias, artralgias, exantema o dolor retro-ocular. En menores de 5 años, el único signo a considerar puede ser la fiebre.

Caso confirmado por dengue: Todo caso probable en el que se confirme la infección reciente por dengue virus mediante técnicas de laboratorio o que esté

asociado epidemiológicamente a otro caso confirmado y del cual no se disponga de resultado de laboratorio.

II.12 Diagnóstico y tipificación del virus del dengue.

Un eficiente diagnóstico de las infecciones por dengue, seguido de la tipificación de los virus circulantes, son de suma importancia para tratamiento clínico del paciente y de evaluación epidemiológica que permite sistematizar las acciones de impacto en la población para el control de la enfermedad, con el objetivo de prevenir la aparición de las formas graves del dengue (DH y SCD).

II.12.1 Métodos de diagnóstico de infección por dengue.

Para diagnosticar serológicamente al virus, considerando los altos niveles de anticuerpos observados en los individuos que desarrollan la infección, el estudio de los sueros es gran utilidad para discriminar un caso probable o caso confirmado de dengue, sin embargo, no se tipifica al virus, solo se detecta. En los últimos años se han desarrollado métodos rápidos para el diagnóstico virológico, entre los que destaca el Inmunoensayo Enzimático Sobre Fase Sólida, conocido como ELISA (por sus siglas en inglés) constituida de conjugados formados por una enzima ligada a un antígeno o anticuerpo determinado, son útiles para la detección de anticuerpos como IgM e IgG. La ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA, por sus siglas en inglés), representa uno de los avances más importantes para el diagnóstico del dengue, siendo así que la mayoría de los laboratorios emplean esta técnica como herramienta de rutina. La IgM es producida transitoriamente durante las infecciones primarias, y en menor cantidad en infecciones secundarias (ver Figura 3). La detección de altos niveles de IgG, mediante la técnica de ELISA o pruebas de inmunocromatografía, ampliamente se utiliza para clasificar si la infección es primaria o secundaria (Guzmán y Kouri, 2004).

La detección antigénica del NS1 en suero de pacientes, es un método alternativo para el diagnóstico rápido del dengue. La presencia de proteína, refiere que el

paciente se encuentra en estado virémico (fase aguda de la infección), es decir, cuando el virus logra alcanzar altos títulos en sangre, con duración del día 0 (inicio de síntomas) al 3ero. Se ha propuesto que la detección de NS1, podría ser útil para determinar los niveles de viremia en sangre ya que niveles altos de NS1 han sido detectados en muestras de pacientes en estado virémico, y también puede emplearse como indicador, más no confirmación, de infección secundaria. Sin embargo, con esta técnica, no es posible tipificar al virus (OMS, 2009 y Young y col., 2000).

Otro método utilizado para el diagnóstico del dengue, es el aislamiento y cultivo viral, el cual requiere una toma de muestra de sangre durante el periodo febril. Posteriormente se aísla el virus y se cultiva en ratones recién nacidos, en células de mamíferos (Vero, LLCMK2 y BHK-21) o en células de mosquito C6/36, clonadas de *Aedes albopictus* o AP61 de *Aedes pseudoscutellaris*, siendo ésta últimas las más sensibles a infectarse por el virus. El aislamiento viral es seguido de un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con anticuerpos monoclonales específicos del complejo de dengue y del serotipo, o bien con anticuerpos policlonales para *Flavivirus*, del cual, las muestras que resulten positivas, se someten a un segundo ensayo con anticuerpos monoclonales para tipificar al serotipo. El aislamiento y cultivo viral, permite la detección del virus, así como su tipificación, sin embargo, requiere de infraestructura especializada en mantener el nivel de bioseguridad tipo III en el laboratorio y de al menos dos semanas para el cultivo del virus (OMS, 2009).

La detección molecular de ácidos nucleicos para el diagnóstico de la enfermedad, mediante la técnica de RT-PCR genérico o RT-PCR universal (Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplado a Retrotranscripción, por sus siglas en inglés) es un metodología de alta sensibilidad y de rápida generación de resultados que tiene por objeto la amplificación de un fragmento genómico conservando entre los cuatro virus del dengue. El primer trabajo con RT-PCR genérico para detección del virus del dengue, fue propuesto por Lanciotti y colaboradores en 1992, quienes

amplificaron una región entre los genes C y prM de 511 pb con el mismo juego de oligonucleótidos para cualquiera de los cuatro serotipos. Los productos de amplificación del RT-PCR genérico se visualizan en electroforesis de agarosa o poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio, donde se observan bandas de un mismo tamaño para cada una de las muestras y controles positivos en el gel. El RT-PCR genérico ha sido implementada y/o modificada por distintos investigadores o laboratorios relacionados con el diagnóstico del dengue (OMS, 2009).

II.12.2 Métodos de tipificación del virus del dengue.

La prueba de neutralización por reducción del número placas sigue siendo el estándar de oro para la tipificación del virus. Es ampliamente utilizada por su alta sensibilidad, especificidad y permite identificar el serotipo de la infección en curso, así como el de una infección pasada del virus del dengue. La neutralización por reducción del número de placas, requiere previo aislamiento del virus, ya sea en células de mamífero como las LLCMK2, BHK-21, Vero y las de mosquito C6/36 o AP61. El ensayo puede desarrollarse de dos maneras, ya sea usar el suero de pacientes para neutralizar a los virus de referencia previamente aislados, o bien usar sueros de referencia caracterizados de cada serotipo para neutralizar el virus aislado del paciente. Cuando el virus es neutralizado, se observa reducción en el número de placas líticas y por lo tanto mayor crecimiento celular, con lo cual se logra tipificar al serotipo infectante. La complejidad de este método recae en el tiempo de realización (cerca de dos semanas de trabajo en el aislamiento y cultivo del virus), además de requerir altos estándares de bioseguridad en la infraestructura del laboratorio (nivel III) para realizar los experimentos (OPS, 2011).

La tipificación a través del diagnóstico de ácidos nucleicos, se realiza mediante RT-PCR específico de serotipos (Harris y col., 1999) con la que se amplifica un fragmento de distinto tamaño para cada uno de los cuatro virus del dengue. La combinación de los cuatro juegos de oligonucleótidos en una misma reacción (RT-PCR múltiplex) con la extracción de ácidos nucleicos de una muestra clínica, genera una banda de tamaño conocido para cada serotipo y cuya visualización se

realiza con electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa, teñidos con bromuro de etidio. La sensibilidad del RT-PCR de serotipos varía del 80% al 100%, dependiendo de la región del genoma seleccionado por los oligonucleótidos (Guzmán y Kouri, 2004).

El RT-PCR específico de serotipos puede realizarse en punto final o en tiempo real, (rtRT-PCR), en éste último se utiliza SYBR Green en reacciones por separado con oligos específicos a cada serotipo, con un juego por muestra (Lai y col., 2007), y se interpretan las curvas disociación específica de cada producto mediante la temperatura de desnaturalización. Otra variante del rtRT-PCR específico de serotipos, utiliza oligos universales para *Flavivirus* o específicos para virus del dengue en conjunción de sondas fluorescentes para cada serotipo. Ambas metodologías en tiempo real, tipifican de manera rápida (aproximadamente 2 horas) sin necesidad de realizar electroforesis, sin embargo, su implementación es de alto costo debido a los estuches utilizados para retrotranscripción (OMS, 2009).

Otra manera para tipificar al virus del dengue es purificar los productos de RT-PCR y secuenciarlos, para así, analizar los resultados mediante bioinformática en las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). La secuenciación es 100% específica pero de alto costo, haciendo difícil su implementación como método de rutina para diagnóstico y de tipificación.

II.13 Ensayo de movilidad por heteroduplex (HMA).

Para agilizar la detección de la variabilidad genética a un número mayor de muestras, han sido desarrollado métodos que no utilizan secuenciación, reduciendo así, el costo de los ensayos. El análisis de movilidad por heteroduplex (HMA, por sus siglas en inglés) es un método sensible y al alcance de cualquier laboratorio de diagnóstico molecular, que permite tipificar cepas virales rápidamente en comparación con el aislamiento viral, la reducción de placas por neutralización y secuenciación (Delwart y col. 1995).

Uno de los casos más exitosos de la implementación del HMA, fue el desarrollo de un estuche para la tipificación de subtipos del VIH-1 (Virus de Inmunodeficiencia Humana-1), patrocinado por el programa ONU-SIDA, la OMS y por el Instituto Nacional de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) del gobierno de los Estados Unidos (Mullins, 2000). El HMA también ha sido utilizado para la tipificación de virus de la hepatitis C, influenza A, y varicela-zoster (Margraf. y col., 2004). En cuanto al dengue, se usó para identificar variabilidad genética entre los virus del serotipo 4 en las epidemias de dengue de 1978 y 1990 en China. (Yao y col., 2002).

El principio del HMA (Figura 9), consiste en amplificar una región variable de ADN, que esté flanqueada por zonas conservadas para poder utilizar un juego de oligonucleótidos comunes para cualquiera de los cuatro serotipos del dengue (PCR genérico) y así, obtener un amplicón dentro del cual existe suficiente variabilidad que permita la diferenciación entre cada virus del dengue (DENV 1-4).

En el HMA se mezclan los productos de PCR amplificados a partir de muestras problema y de virus de referencia de cada serotipo. La desnaturalización y re-naturalización de estas mezclas (por calentamiento y enfriamiento) permite la formación de heteroduplex (moléculas híbridas, donde una hebra del virus de referencia, se une a su complementaria, pero de la muestra problema), además de homoduplex (donde ambas hebras son de un mismo origen viral) (Mullins, 2000). Las diferencias genéticas entre la muestra problema y los virus de referencia se detectan por la reducción de la movilidad electroforética de las moléculas híbridas (heteroduplex) debido a la distorsión de la doble hélice de DNA que generan las bases no apareadas, que producen burbujas las cuales retardan la migración de la molécula híbrida en geles de poliacrilamida, a diferencia de los homoduplex, donde hay una total complementariedad de las bases. El retardo en la migración es directamente proporcional a las diferencias en las secuencias entre ambas hebras del heteroduplex (Delwart y col., 1994; Mullins, 2000).

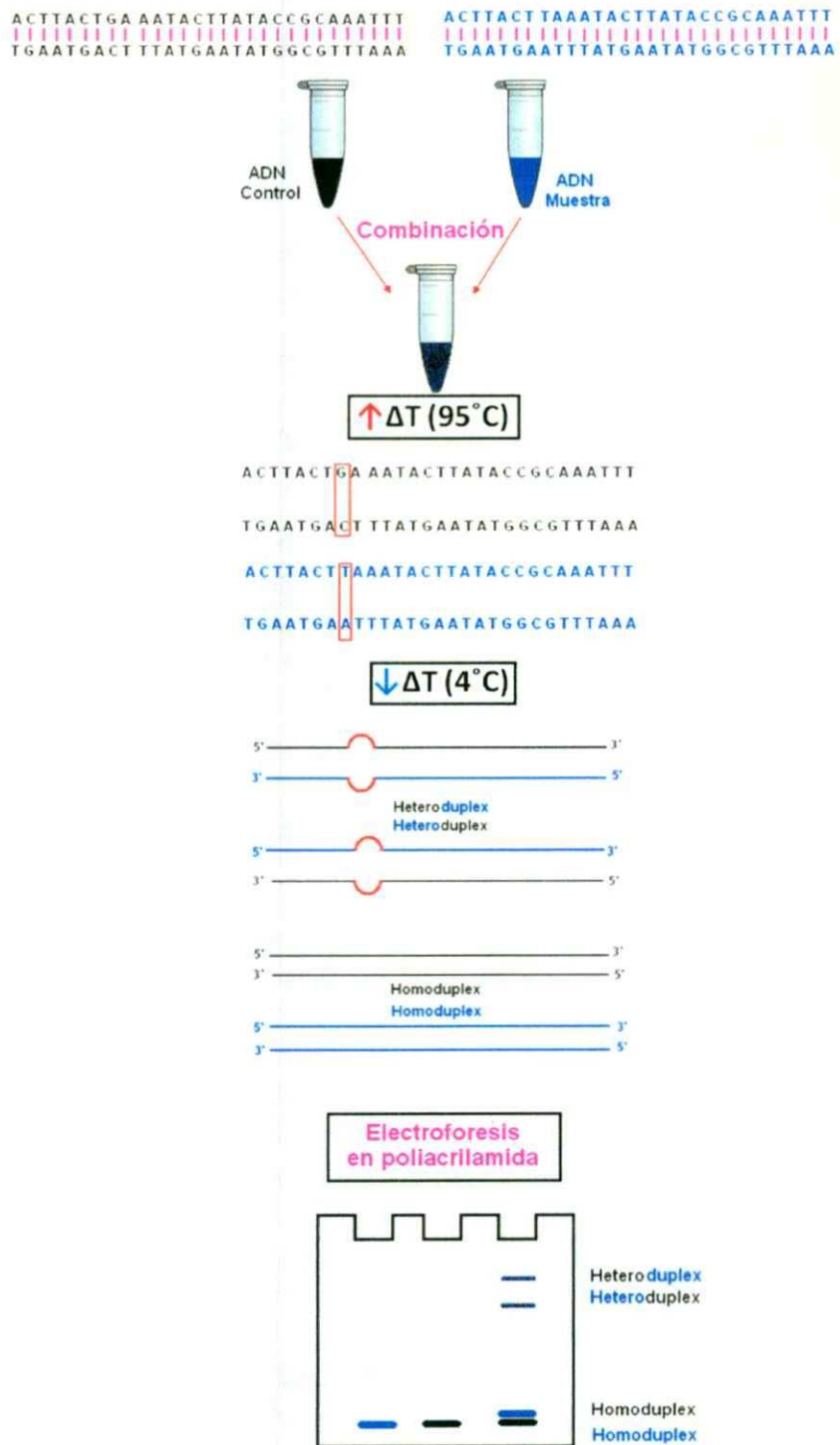


Figura 9. Diagrama del HMA. Se promueve la formación de heteroduplex (He) y homoduplex (Ho), debido al proceso de desnaturalización y re-naturalización en las mezclas de los amplicones de los virus de referencia y de las muestras problema.

III. HIPÓTESIS.

El ensayo de movilidad de heteroduplex (HMA) con el producto de PCR de la región C (164pb), permite la tipificación para cada uno de los cuatro serotipos del virus del dengue.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General.

Determinar en muestras clínicas de casos confirmados de dengue en el estado, a cuál de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV 1-4) pertenecen, mediante ensayos de movilidad de heteroduplex (HMA).

IV. 2 Específicos.

- Analizar por bioinformática la variabilidad genética del virus del dengue en la región (C) amplificada con oligonucleótidos comunes a los cuatro serotipos.
- Amplificar 164pb de la región C mediante RT-PCR, con el ARN de muestras clínicas de casos confirmados y con ARN de virus de referencia de los cuatro serotipos del dengue.
- Determinar el serotipo viral mediante HMA en las muestras clínicas.
- Comparar la tipificación por HMA contra la tipificación por RT-PCR específico de los 4 serotipos.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales.

- Tubos para PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés) de 200 μ L.
- Tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Micropipeta de 0.5-10 μ L
- Micropipeta de 20-200 μ L
- Micropipeta de 200-1000 μ L.
- Puntas para micropipetas de 10, 200 y 1000 μ L.
- Gradilla térmica para tubos de PCR.
- Gradilla térmica para tubos eppendorf.
- Guantes de nitrilo.
- Frascos 1 L (contenedores de amortiguadores).
- Parafilm.
- Cubrebocas
- Bata quirúrgica.

V.1.1 Reactivos

- Estuche MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation (Roche™).
- Estuche AmpliTaq® DNA Polymerase for Standar PCR (Applied Biosystems).
- Estuche OneStep RT-PCR (QIAGEN)®.
- Estuche SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen).
- Marcador de peso molecular (ϕ X174 cortado con Hae III, VIII Marker Roche y AmpliSizeRuler de BioRad).
- Amortiguador de carga (500 μ l glicerol 50%, 400 μ l TBE 10X, 100 μ l dH₂O, 100 μ L colorante 5X).
- Amortiguador TBE 10X (Tris 1M, ácido bórico 1M, EDTA 20 mM a pH 8.3).
- dNTP 10 mM.

- Amortiguador para HMA 1x (NaCl 100 mM, Tris pH 7.2 10 mM, EDTA 2 mM).
- Poliacrilamida 40% (Mezcla acrilamida-bisacrilamida 19:1).
- Agua bidestilada.
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina).
- PSA 10% (Persulfato de amonio).
- Tris base.
- Ácido bórico.
- EDTA
- Bromuro de etidio 1X (0.5 µg/mL).
- Glicerol 50%. Guantes de nitrilo.
- Sal (NaCl).

V.1.2 Equipos

- Microcentrífuga Eppendorf 5414.
- Gabinete de bioseguridad clase IIA Labconco.
- Gabinete para PCR Labconco.
- Vortex.
- Bloque caliente.
- Refrigerador Mabe -20°C.
- Refrigerador ThermoRevco -70°C.
- Termociclador C1000, Bio-Rad.
- Equipo para electroforesis en poliacrilamida con fuente de poder (Bio-Rad).
- Fotodocumentador Gel Doc. XR (Bio-Rad).

V.2 Métodos.

V.2.1 Extracción total de ácidos nucleicos virales.

Se extrajeron los ácidos nucleicos totales de las muestras clínicas (sueros) con

infección confirmada de dengue, y de cultivos virales del dengue (DENV 1-4), donados por el Laboratorio de Arbovirus del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), de la Secretaría de Salud, como virus de referencia. La extracción se llevó a cabo con los reactivos del propio del estuche (composición patentada de cada uno) de acuerdo al manual del fabricante. La extracción se realizó en un gabinete de bioseguridad clase IIA con las medidas acordes al proceso (utilización de bata, guantes y cubrebocas desechables en todo momento).

Se utilizó el estuche comercial MagNAPure LC Total Nucleic Acid Isolation de (Roche™). En un tubo eppendorf de plástico de 1.5 mL se colocaron 200 µL de la muestra, 200 µL de solución de lisis y 100 µL de proteinasa K. Posteriormente se mezclaron en vortex 10 segundos y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Se añadieron 150 µL de perlas magnéticas de sílice y a continuación se mezclaron en vortex 5 segundos y se dejaron reposar de 15-30 segundos. Se repitió el mezclado mencionado hasta completar 4 a 5 minutos. Se capturaron las perlas hacia la pared del tubo con ayuda de un magneto y se eliminó el sobrenadante con micropipeta de 1000 µL. Se añadieron 1000 µL de solución de lavado I a las perlas y se realizaron lavados mediante 10 pipeteos repetidos. Se capturaron las perlas con ayuda del magneto y se eliminó el sobrenadante. Se añadió 500 µL de solución de lavado II y se repitió el lavado mediante 10 pipeteos. Se capturaron las perlas con ayuda del magneto y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 1000 µL de solución de lavado III y se repitió el lavado mediante 10 pipeteos. Se capturaron las perlas con ayuda del magneto y se eliminaron el sobrenadante. Se añadieron 100 µL de solución de elusión. Se mezcló con micropipeta y se incubó a 60°C durante 5 minutos. Se colectaron los 100 µL de la elusión en un tubo eppendorf nuevo y se etiquetó con la clave de la muestra o con el serotipo correspondiente de los virus de referencia y la fecha de extracción.

Finalmente, el ARN se almacenó en congelador a -20°C o a -70°C, dependiendo de la necesidad de resguardo de la muestra o del ARN de referencia correspondiente.

V.2.2 RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada a Transcripción Reversa).

Se utilizaron los estuches OneStep RT-PCR y SuperScript II Reverse Transcriptase para el RT-PCR genérico y específico de serotipos respectivamente para reacciones individuales de 20 μL . Con el estuche OneStep RT-PCR, por muestra, se añadió a un tubo eppendorf: 5 μL del 5X mix (amortiguador con NH_4 y K^+ de concentración desconocida), 0.5 μL de mezcla de dNTP's (10 mM c/u), 1 μL de mezcla de oligonucleótidos de 10 pmoles c/u; Den-F + Den-R para PCR genérico, 1 μL de mezcla de enzimas (retrotranscriptasa Omniscript/Sensiscript y polimerasa HotStarTaq) y 12.5 μL de H_2O . Con el estuche SuperScript II Reverse Transcriptase, por muestra se añadió a un tubo eppendorf: 12.5 μL del 2x mix (dNTP's a 0.4 mM c/u, 1.2 mM MgSO_4), 0.75 μL de la mezcla de enzimas (retrotranscriptasa SuperScript y polimerasa PlatinumTaq), 5 pmoles c/u de Den-F + Den1-R o Den2-R o Den3-R o Den4-R2y 3.75 μL de H_2O (ver Cuadro 1). Posteriormente se sembraron 5 μL del ARN de cada muestra al tubo correspondiente y se llevaron al área de adición de controles positivos donde se sembraron 5 μL del ARN de cada uno de los virus de referencia. Los tiempos y temperaturas para el proceso de amplificación se describen en el Cuadro 2.

V.2.3. PCR estándar.

Para tener cantidades suficientes del ADN de cada virus de referencia para el HMA, se reamplificaron los productos de RT-PCR, con el estuche AmpliTaq® Gold DNA Polymerase for Standar PCR de Applied Biosystems. Las reacciones se prepararon en un área libre de ADN o ARN. Por cada serotipo, se añadió a un tubo eppendorf: 1.25 μL de dNTP's a concentración 10mM, 5 μL de Amortiguador 10X, 5 μL de MgCl_2 , 2.5 μL de la mezcla de oligonucleótidos para dengue genérico (10 pmoles c/u), 0.75 μL de la enzima TaqGold, 34.5 μL de H_2O . Se colocaron 49 μL de la mezcla de reacción en cada tubo y se llevaron al área de adición de controles positivos, en donde se sembró 1 μL de una dilución 1:100 del producto de RT-PCR

genérico de cada serotipo. Estos tubos se colocaron en el termociclador y se corrieron con el protocolo adecuado descrito en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Oligonucleótidos usados en las reacciones de RT-PCR genérico y de serotipos.

Oligo	Secuencia (5' a 3')	Tamaño del amplicón	Posición genómica	No. de acceso GeneBank
RT-PCR genérico				
Den-F	caa tat gct gaa acg cgh gag aaa ccg	164 pb	133 - 164	300828753
Den- R	twk yca rwa tyc ctg ctg ttg g		280 - 301	
RT-PCR específico de serotipos				
Den-1R	gct cca ttc ttc ttg aat gag	190 pb	304 - 324	310002699
Den-2R	tca aaa cat tga tag cyt ttg att	206 pb	317 - 340	300828845
Den-3R	cct tct tga agc ctt tra gga cc	221 pb	310 -332	281324818
Den-4R2	agg act cgc aaa aac gtg atg aa	132 pb	225 - 247	284432059

Cuadro 2. Condiciones del RT-PCR y PCR estándar con oligonucleótidos genéricos¹ y RT- PCR estándar con oligonucleótidos específicos de serotipos².

Proceso	RT	Activación	Desnat.	Alineación	Síntesis	Enfriamiento
RT-PCR ¹	50°C / 30'	95°C / 15'	95°C / 5"	58°C / 5"	72°C / 20"	4°C / 1'
RT-PCR serotipos ²		94°C / 2'	94°C / 5"	48°C / 5"	72°C / 15"	
Ciclos	1	1	39			1
PCR ¹		95°C / 12'	95°C / 10"	56°C / 5"	72°C / 20"	4°C / 1'
Ciclos	-	1	39			1

V.2.4 Electroforesis en poliacrilamida.

V.2.4.1 Preparación del gel de poliacrilamida.

Los ensayos de amplificación mediante RT-PCR y PCR estándar, así como los de HMA, fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5%. Para dicha preparación, se mezclaron: 1.4 mL, acrilamida al 40%, 0.75 mL de TBE 10X,

1.5 mL de glicerol al 50%, 3.80 mL de H₂O bidestilada, 15 µL de TEMED y 50 µL de APS al 10%. Esta mezcla se vertió entre los cristales previamente ensamblados y se dejó polimerizar al menos 10 minutos.

V.2.4.2 Electroforesis de los productos de PCR.

De los ensayos de amplificación por RT-PCR y PCR estándar, se colocaron en cada pozo del gel, 4 µL de la reacción de amplificación de cada muestra o control de ADN viral, mezclados con 3 µL del amortiguador de carga. Se incluyó un carril del marcador de peso molecular con 10 ng totales de φX174/HaeIII o 10 ng del marcador VIII de Roche o 10 ng del AmpliSize Ruler de BioRad. La electroforesis se realizó durante 45 minutos aplicando 175 volts con amortiguador de corrida TBE 1X en la cámara exterior como en la interior.

V.2.4.3 Tinción y fotodocumentación.

Finalmente el gel se tiñó en una charola con 20 µL del amortiguador de corrida TBE 1X con bromuro de etidio, 0.5 µg/mL, durante 5 minutos, posteriormente, el gel se visualizó y fotografió bajo iluminación con luz UV en un fotodocumentador Gel Doc XR de BioRad.

V.2.5 HMA (Ensayo de movilidad de heteroduplex).

Para cada muestra clínica, se numeraron cinco tubos del 1-5, y a cada uno se les colocaron 3.5 µL del producto de amplificación de la muestra. Al tubo 1 se le adicionaron otros 3.5 µL del mismo producto de PCR y a cada uno de los siguientes cuatro tubos se les adicionaron 3.5 µL del producto de amplificación de cada virus de referencia: D1 al tubo 2; D2 al tubo 3, D3 al tubo 4 y D4 al tubo 5. A cada uno se le agregó 1 µL del amortiguador para HMA, y 2 µL de agua. Los tubos se colocaron en el termociclador a 95°C por 5 minutos. Inmediatamente se pasaron a hielo. El análisis de la formación de heteroduplex se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% (punto V.2.4.1) a 165 volts durante 100 minutos. La tinción y documentación, se realizó de acuerdo al punto V.2.4.3.

V.3 Diseño experimental.

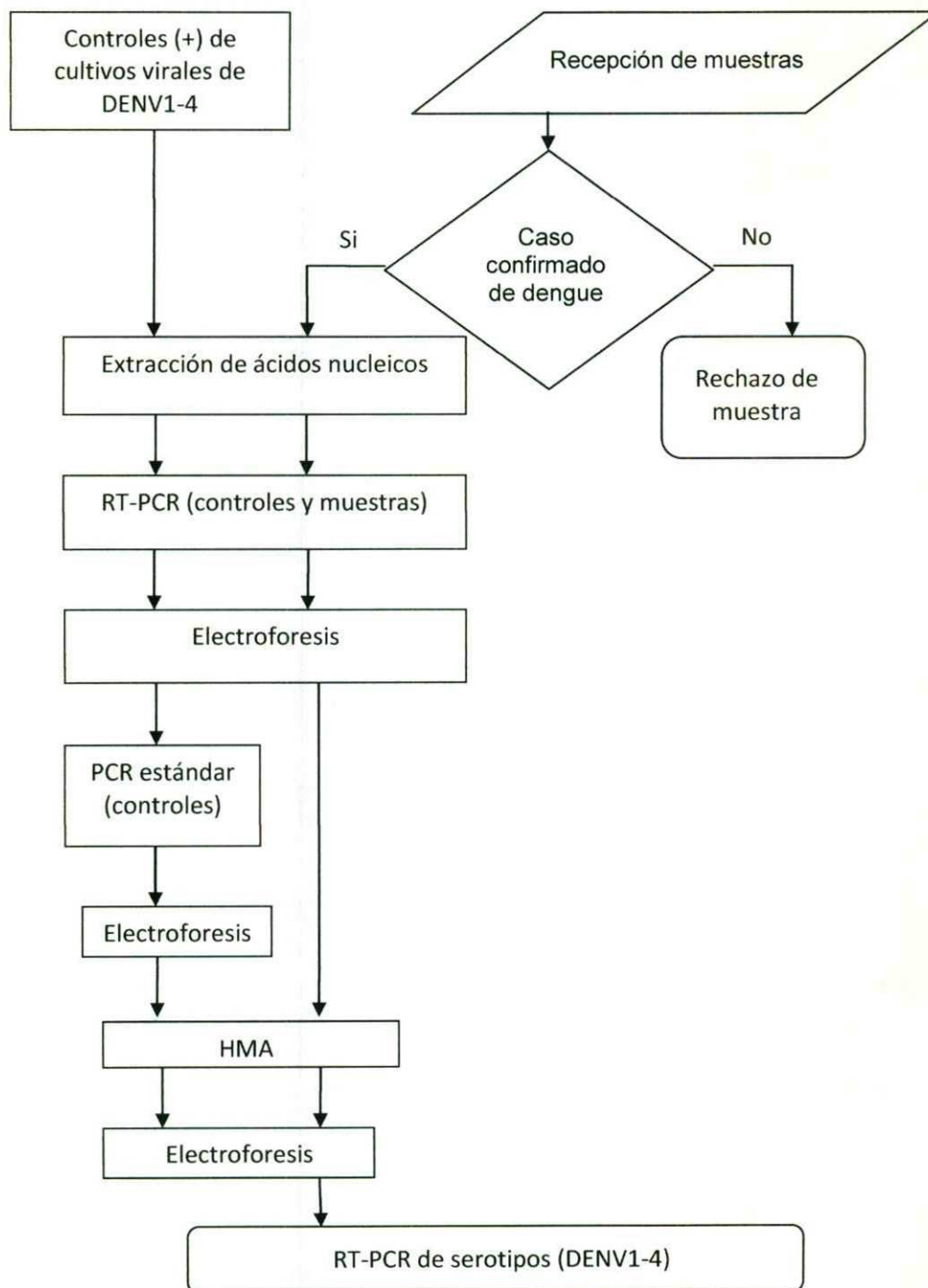


Figura 10. Diseño experimental para tipificación de los virus de referencia y de las muestras clínicas mediante HMA.

VI. RESULTADOS.

VI.1 Análisis bioinformático de los genomas del virus del dengue.

El objetivo de esta tesis fue comprobar o descartar la utilidad de la metodología de HMA para la tipificación del virus del dengue en muestras clínicas. Para ello se amplificó una región variable del gen de la cápside del virus (Figura 11), utilizando oligonucleótidos degenerados que permiten generar un fragmento de 164 pb, para cada uno de los diferentes serotipos virales (DENV 1-4).

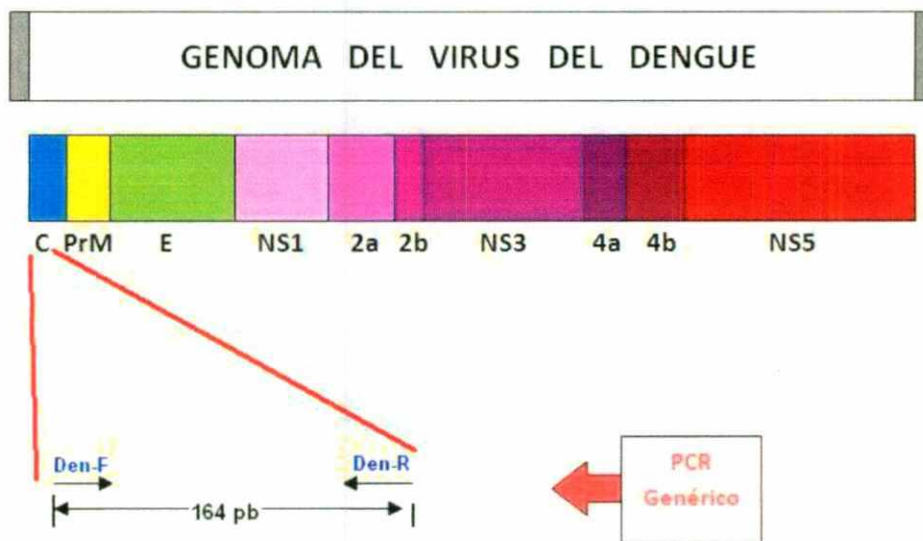


Figura 11. Diagrama de la amplificación del fragmento genérico de 164 pb, de la región C del genoma viral. Se utilizó un mismo juego de oligonucleótidos degenerados para cualquier serotipo del virus el dengue.

El juego de oligonucleótidos (Den-F y Den-R) se basaron en los estudios de Lanciotti y colaboradores (1992) y Pei-Yun y colaboradores. Para este estudio, se realizaron alineaciones de algunas secuencias del banco de genes (GeneBank) de los 4 serotipos del virus del dengue, empleadas para el diseño de oligonucleótidos degenerados (Gudiño-Rosales, datos no publicados). En la Figura 12 se muestran las secuencias utilizadas, y en las regiones sombreadas se observan las variaciones genómicas que fueron consideradas para la elección de las bases degeneradas.

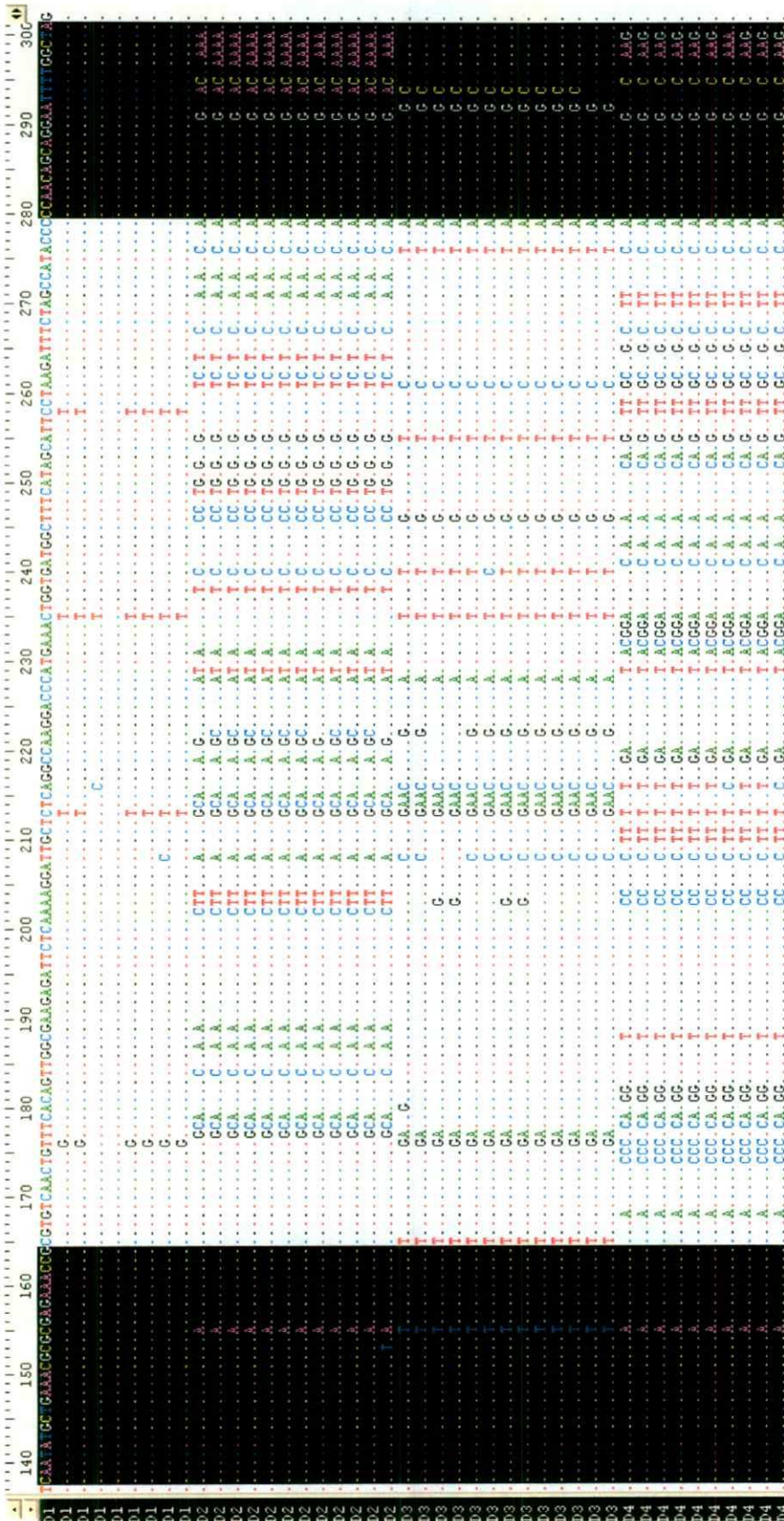


Figura 12. Alineación de las secuencias extraídas del GenBank correspondientes a los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV 1-4). Se empleó el software BioEdit Sequence Alignment Editor que utilizó la secuencia de DENV-1 (GI: 300828753) como referencia para la alineación, identificando a dos regiones conservadas (en la posición genómica 138 a 164 y de la 280 a 301) que generaron un fragmento de 164 ob. (Números de acceso de las secuencias en el GeneBank GI, en la sección de Anexos)

VI.2 Muestras problema y virus de referencia.

En total se estudiaron con 21 muestras clínicas colectadas durante el 2008 y 2009 en el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Querétaro, con diagnóstico confirmado de infección por virus de dengue por pruebas de laboratorio. Como controles positivos y virus de referencia se utilizaron sobrenadantes de cultivos virales de cada serotipo (DENV 1-4), donados por el Laboratorio de Arbovirus del Departamento de Virología del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico, (InDRE) de la Secretaría de Salud.

Se extrajeron los ácidos nucleicos totales tanto de las muestras clínicas como de los sobrenadantes de cultivos virales, con el estuche MagNAPure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, marca RocheTM. Las extracciones se almacenaron a -20°C hasta su uso.

VI.3 Determinación de los patrones de HMA con los virus de referencia.

VI.3.1 RT-PCR de los virus de referencia.

Se amplificó el fragmento de 164 pb a las extracciones de ácidos nucleicos totales de cada virus de referencia (DENV 1-4) mediante RT-PCR genérico. En la Figura 13 se muestra el gel con los amplicones de cada serotipo.

VI.3.2 PCR de los virus de referencia.

Con el fin de obtener mayor cantidad de las alícuotas de cada amplicón, se realizó PCR a los productos de amplificación de los virus de referencia. En la Figura 14 se muestra el gel con las bandas de amplificación para cada virus.

VI.3.3 HMA de los virus de referencia.

Para estandarizar la tipificación de cada serotipo del virus del dengue, se realizó un HMA con los amplicones de los ADN's de referencia de acuerdo a la sección V.2.5. Se realizaron 10 combinaciones por parejas de cada producto de amplificación de

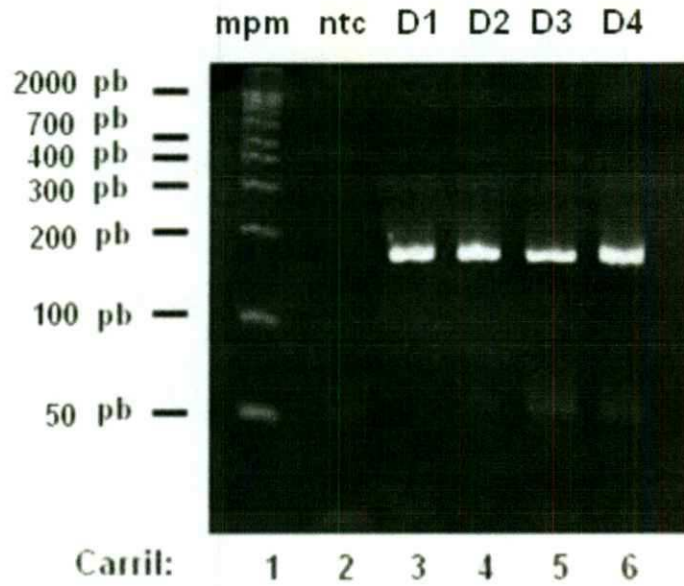


Figura 13. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% de la amplificación por RT-PCR de los virus de referencia. Carril 1: marcador de peso molecular (AmpliSize™ Molecular Ruler, BioRad); 2: control negativo (ntc); carriles 3 al 6; virus del dengue DENV 1-4 respectivamente.

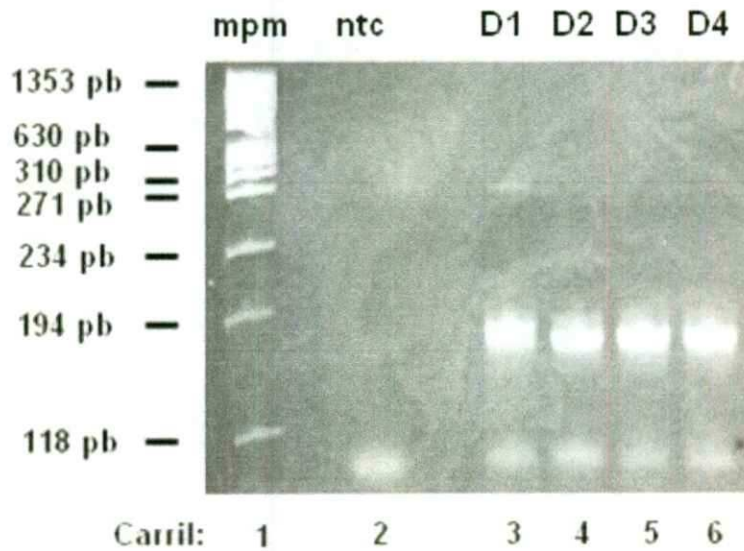


Figura 14. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% de la re-amplificación por PCR de los virus de referencia. Carril 1: marcador de peso molecular (ϕ X174/HaeIII, Roche); 2: control negativo (ntc); carriles 3 al 6; virus del dengue DENV 1-4 respectivamente.

los virus de referencia, según indica la Figura 15. Cada combinación generó bandas de heteroduplex (He) en los carriles 2, 3, 4, 6, 7 y 9. A sí mismo, la formación de homoduplex (Ho) se observó en los carriles 1, 5, 8 y 10, tal como indican las flechas de la figura.

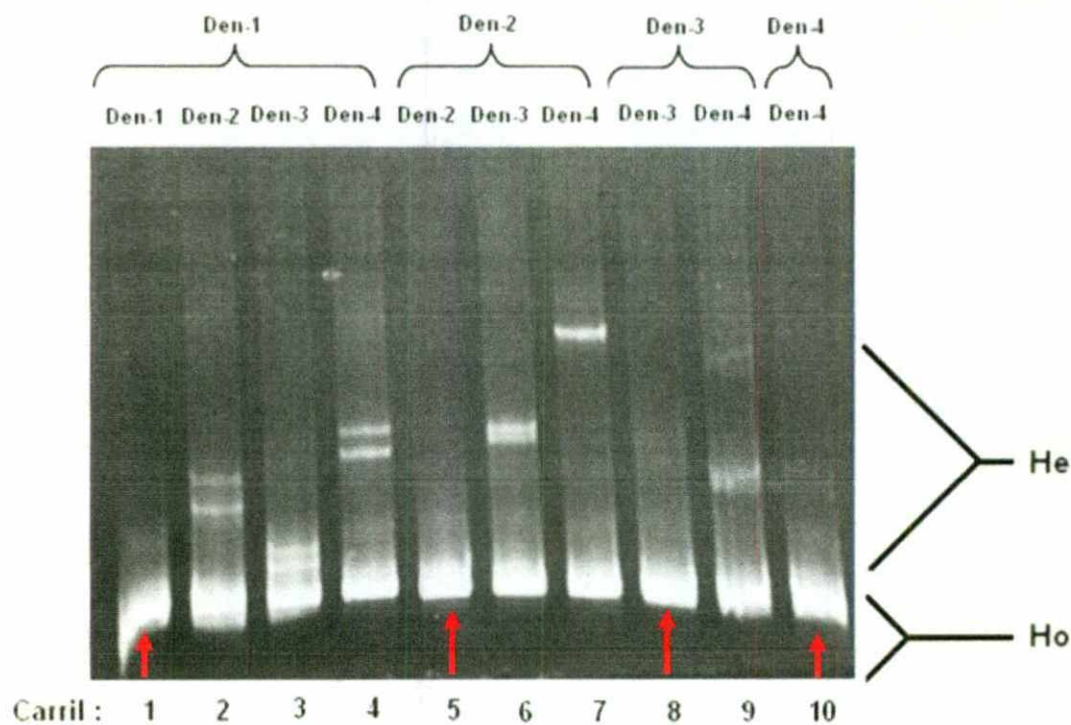


Figura 15. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% del HMA de los virus de referencia. Carril 1-4: Den-1 + (Den-1, Den-2, Den-3 y Den-4) respectivamente; 5-7: Den-2 + (Den-2, Den-3 y Den-4) respectivamente; 8 y 9: Den-3 + (Den-3 y Den-4) respectivamente; y 10: Den-4 + Den-4.

VI.4 Tipificación de muestras clínicas.

VI.4.1 RT-PCR de muestras clínicas

Las 21 muestras fueron sometidas a RT-PCR con el juego de oligonucleótidos genéricos, de las cuales 20 resultaron positivas y solo una negativa (muestra 5008). Para la Figura 16, se seleccionó a 7 de éstas, mostrando el producto de amplificación de cada una.

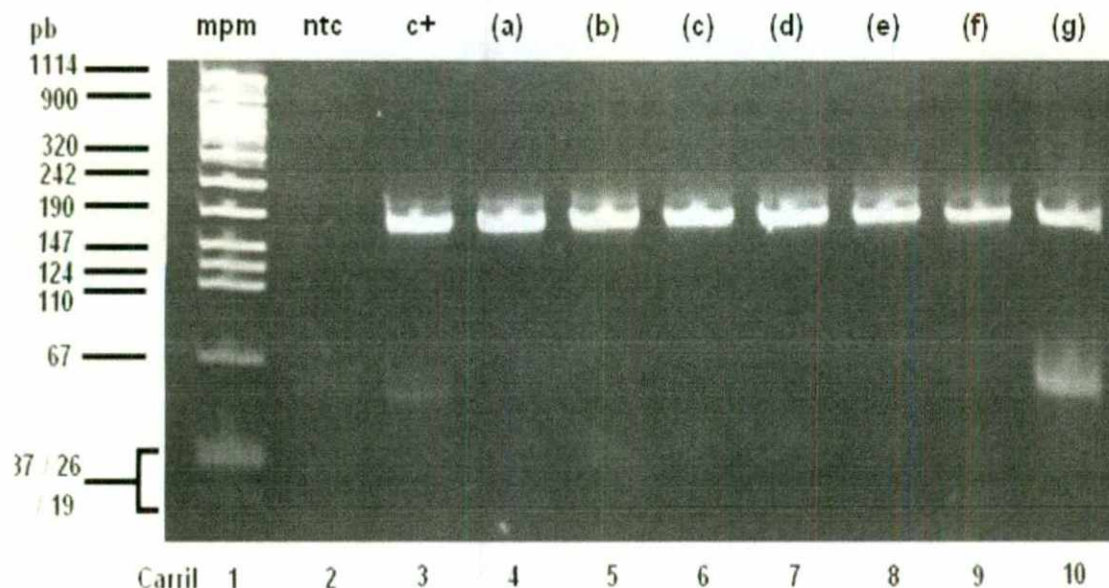


Figura 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% de la amplificación por RT-PCR genérico de muestras clínicas. Carril 1: marcador de peso molecular (Marker VIII de Roche); 2: control negativo (ntc); 3: control positivo (C+ Den-2); 4-10: muestras (a) 13414; (b) 13421; (c) 13674; (d) 14152; (e) 14205; (f) 14540 y (g) 14724, respectivamente.

VI.4.2 HMA de muestras clínicas.

El análisis de HMA con los productos de amplificación de las 20 muestras permitió la tipificación de ellas, de las cuales 19 correspondieron al DENV-1 y solo una al DENV-3. En la Figura 17 se presenta una selección representativa con 8 muestras, todas ellas analizadas en geles de poliacrilamida al 7.5%.

Cada muestra fue retada con un panel de amplicones de los cuatro virus de referencia, indicado en la parte superior de cada gel. El patrón de migración de las bandas observadas en las muestras "a"- "f" e "i" corresponden al serotipo 1, mientras que el de la "h" pertenece al serotipo 3, lo cual se indica con una flecha.

VI.5 PCR específico de serotipos.

Las muestras se analizaron con RT-PCR múltiplex, utilizando oligonucleótidos

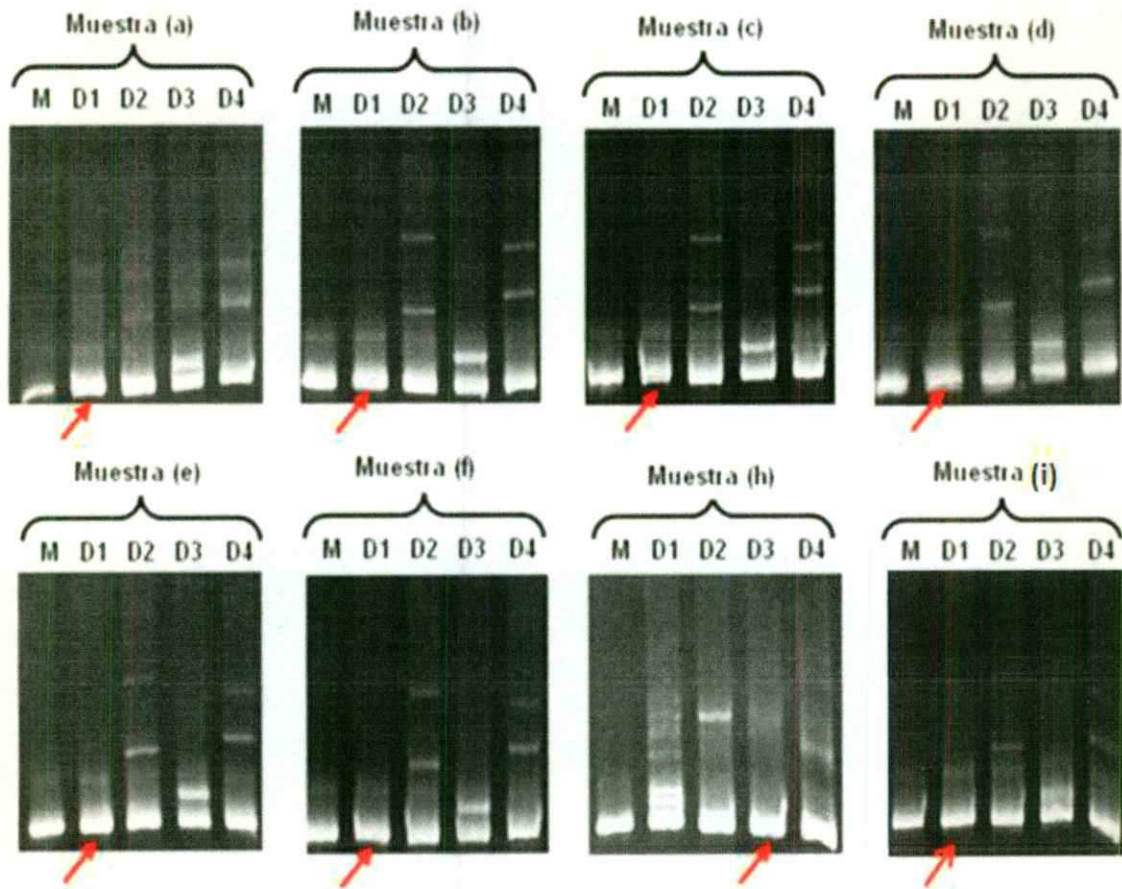


Figura 17. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% del HMA de las muestras clínicas. Cada gel: Carril 1: amplicón de las muestra: "a" - "f", "h" - "i" respectivamente; 2: muestra + Den-1; 3: muestra + Den-2; 4: muestra + Den-3 y 5: muestra + Den-4.

específicos para cada serotipo, con el fin de comparar los resultados con los del HMA. En la Figura 18 se presenta ejemplo de los resultados de la amplificación en 8 muestras. Se puede observar que la mayoría pertenece al serotipo 1 ya que se obtuvo la amplificación del fragmento de 190 pb correspondiente a este serotipo (muestras "a" - "g"). Sin embargo, la muestra "i", amplificó un fragmento de 132 pb, correspondiente al serotipo 4. Cabe destacar que la muestra "h" (serotipo 3 por HMA), no pudo ser analizada por esta metodología, ya que la cantidad recibida de ella no fue suficiente para someterla a este ensayo

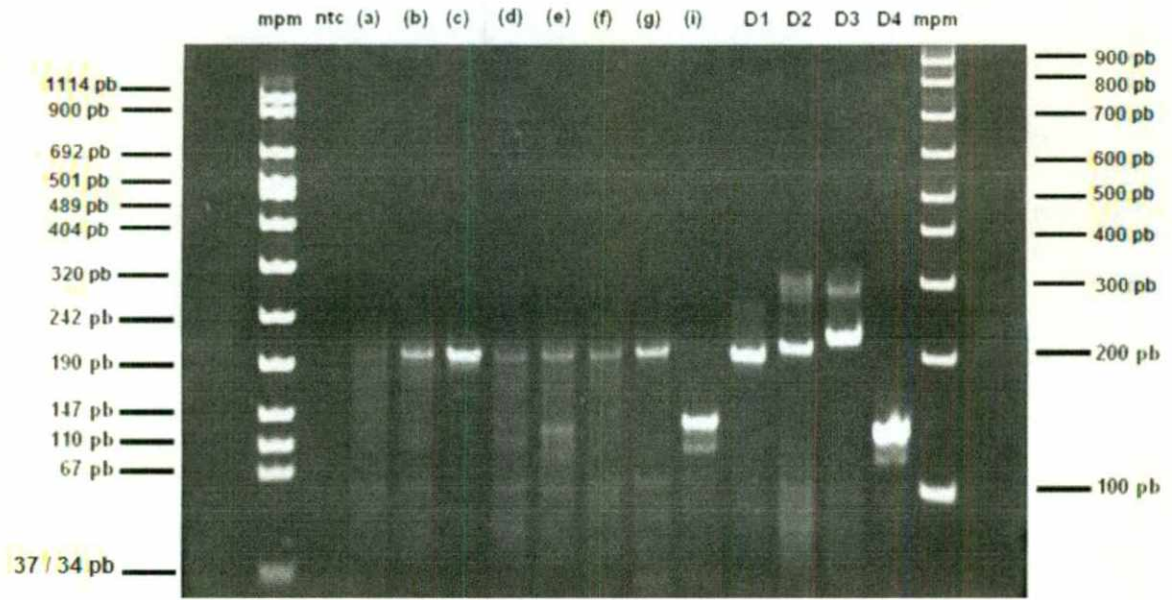


Figura 18. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% del RT-PCR multiplex específico de serotipos. Carril 1: marcador de peso molecular (Marker VIII de Roche); 2: control negativo (ntc); 3 – 9: las muestras "a" – "g" del serotipo 1; 11: control positivo (C+) DENV-1 (190 pb); 12: C+ DENV-2 (206 pb); 13: C+ DENV-3 (221 pb); 14: C+ DENV-4 (132 pb); 15: marcador de peso molecular (AmpliSize™ Molecular Ruler, BioRad).

VII. DISCUSIÓN.

Debido a la importancia del conocimiento en espacio y tiempo de los serotipos circulantes del virus del dengue, se han desarrollado métodos para su tipificación, cuyos datos son de utilidad para la generación de alertas epidemiológicas encaminadas en prevenir el número de casos de infecciones por dengue clásico y/o de sus formas graves (DH y SCD).

Esta tesis se realizó con el objetivo de tipificar el serotipo del virus del dengue en muestras clínicas con infecciones comprobadas en Querétaro utilizando la metodología del HMA, ya su vez, comparar los resultados con la tipificación basada en la amplificación específica de los fragmentos de cada uno de los serotipos por RT-PCR en las mismas muestras.

VII.1. Tipificación de los cuatro virus de referencia (DENV 1-4),

El HMA permitió tipificar correctamente a los virus de referencia (DENV 1-4), como lo indica la Figura 16. Esta observación fue el punto de partida por el cual determinamos que la metodología de HMA si lograría la tipificación de muestras clínicas, una vez que se obtuviera el producto de amplificación con los oligonucleótidos genéricos

De manera paralela, se analizaron cuatro secuencias consenso correspondientes a la región de 164 pb, a partir de la base de datos adquirida para esta tesis con las secuencias cada serotipo (Anexo). Estas secuencias consenso se utilizaron para calcular los índices de similitud entre pares de secuencias, utilizando la herramienta: *Calculate indentity/similarity for two sequences*, del menú: *Pairwise Alignments*, con el software BioEdit. En el Cuadro 3 se puede observar que las secuencias consenso con mayor grado de homología son Den1 y Den3, lo cual corresponde con los resultados de la figura 16, donde los heteroduplex con mayor migración en los ensayos de HMA son los que se forman entre virus Den1/3 (84.7% de identidad, carril 3), seguido de Den 1/ 2 (carril 2, 73.1%),posteriormente

las combinaciones Den 1/4 y Den 2/3 en los carriles 4 y 6(ambos con migración de heteroduplex a la misma altura y 72.5% de identidad), y finalmente las combinaciones Den 2/4 y 3/4(carriles 7 y 9) que a pesar de obtener el mismo valor de homología, no presentan las bandas de heteroduplex en la misma posición.

Cuadro 3. Porcentajes de homología de las secuencias consenso generadas para cada serotipo del virus del dengue (DENV 1-4).

Consenso 1	100%			
Consenso 2	73.1	100%		
Consenso 3	84.7	72.5	100%	
Consenso 4	72.5	67.6	67.6	100%
Secuencia	Consenso 1	Consenso 2	Consenso 3	Consenso 4

VII.2. Tipificación de las muestras clínicas históricas.

Del total de 21 muestras recolectadas, 20 resultaron positivas al RT-PCR genérico y sólo una negativa (muestras 5008). Éstas se analizaron mediante HMA y los resultados indicaron que 19 de ellas pertenecen al serotipo 1 y una al serotipo 3 (muestra "h").

Cabe destacar que en todas las muestras tipificadas con DENV-1, el patrón de migración de los "He" es idéntico, sugiriendo que el virus circulante ha sido el mismo durante el 2008 y 2009, años en los que se recibieron las muestras.

VII.3. RT-PCR específico de cada serotipo.

De las 21 muestras disponibles, fue posible analizar a 19 de ellas con el RT-PCR de serotipos, debido a que no hubo suficiente cantidad de la muestra "h" para someterla a este ensayo, y una que resultó negativa (muestra 5008), posiblemente por degradación. En 18 muestras se amplificó el fragmento de 190 pb correspondiente al DENV-1, pero, contrario a lo que se esperaba, la muestra "i", amplificó el fragmento de 132 pb, correspondiente al DENV-4.

En el Cuadro 4 se presenta una comparación entre los resultados de tipificación obtenidos mediante los ensayos de HMA, comparados contra la tipificación por RT-PCR específico de serotipos. Nótese que la muestra “h” tipificada como DENV-3 mediante HMA, es distinta de la “i” (detectada como DENV-4 por RT-PCR específico de serotipos). Es importante mencionar que la tipificación de la muestra “i”, fue corroborada como DENV-1 por el laboratorio de Arbovirus, del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), que es el Laboratorio de Referencia Nacional.

Cuadro 4. Comparativo de los datos generados por el HMA y RT-PCR de serotipos.

Resultado del HMA Vs RT-PCR de serotipos								
Tipificación HMA				-	Tipificación RT-PCR de serotipos			
DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	-	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
19	0	1	0	-	18	0	0	1

VII.4. Consideraciones sobre el HMA.

Si bien se comprobó que el HMA tiene la capacidad para tipificar a cualquier serotipo del virus del dengue (Figura 16), la eficiencia de esta metodología recae en el diseño de los oligos para el RT-PCR genérico, los cuales deben flanquear regiones conservadas entre las distintas variantes del patógeno que se quiera tipificar, pero debe existir variabilidad al interior del fragmento amplificado que, permita la formación de bandas de heteroduplex que puedan ser separados en geles de poliacrilamida (Delwart y col., 1995; Mullins, 2000 y Margraf y col., 2004).

Una de las características que hace al HMA una metodología atractiva para su utilización, se debe al bajo costo de implementación. Se estimó el precio del HMA por muestra, en base al costo de insumos y reactivos entre \$181.00 y \$ 245.00 pesos, dependiendo del estuche utilizado (“iScript DNA Sythesis” de BioRad y OneStep RT-PCR” de QIAGEN). El tabulador de los costos de los ensayos que realiza el Laboratorio de Referencia Nacional, señala que la detección y tipificación

de virus del dengue realizada por RT-PCR en punto final tiene un costo de \$2,461.00 pesos por muestra, mientras que la tipificación por RT-PCR en tiempo real se realiza a un costo de \$2,150.00 por prueba, cuyos precios están basados en los costos de insumos, reactivos y ganancia (datos desconocidos). Por ello consideramos que la implementación del ensayo de HMA para la tipificación de virus del dengue es una opción económica y eficiente para los sistemas de salud.

VIII. CONCLUSIONES

La utilidad del HMA como método de tipificación para el virus del dengue, quedó demostrada al determinar el serotipo de cada uno de los virus de referencia usados en este trabajo.

Se analizó mediante bioinformática a las secuencias del virus del dengue (DENV 1-4) obtenidas del Banco de Genes, en las que se identificó una región flanqueada por extremos conservados que permitieron la alineación del juego de oligonucleótidos degenerados utilizados en este trabajo. Así mismo, se identificó variabilidad entre cada serotipo al interior de esa misma región, haciéndolo un fragmento útil para la realización del HMA

Se amplificó el fragmento de 164 pb de la región C, con RT-PCR a los cuatro virus de referencia y a 20 muestras clínicas. Así mismo, se lograron tipificar mediante HMA a 20 muestras clínicas de las 21 recolectadas en el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Querétaro, encontrándose 19 del serotipo 1 y una sola del serotipo 3.

Al comparar los resultados del HMA, con los del RT-PCR específico de serotipos, podemos concluir un desempeño con mayor eficiencia por parte del HMA, debido a que en la muestra "i", no hubo correspondencia del resultado por RT-PCR específico de serotipos con los datos oficiales del InDRE, a diferencia del HMA, que tipificó correctamente a la muestra como DENV-1.

El HMA es una técnica eficiente y al alcance de cualquier laboratorio de diagnóstico molecular, debido a que no requiere altos niveles de bioseguridad, y el costo de su implementación es bajo.

Esta técnica resultó capaz de responder a la misma pregunta que el PCR en tiempo real, PCR de serotipos, secuenciación, aislamiento viral y la reducción de placas

por neutralización, lo que la hace una técnica eficaz para mantener la vigilancia epidemiológica del virus del dengue.

La presencia de 2 serotipos distintos en tan solo 21 muestras estudiadas sugiere la importancia de mantener la vigilancia de los serotipos virales en el estado, para poder establecer un panorama epidemiológico representativo con el que se pueda determinar el riesgo de contraer la infección por virus del dengue en la población del Estado de Querétaro.

Los alcances de esta metodología son muy amplios, a pesar de ser una técnica poco conocida. El HMA podría ser utilizado para la tipificación de diversos patógenos como: Brucelosis, Herpes, Tuberculosis entre otros, además de los ya reportados como VIH, Varicela-zoster, Hepatitis e Influenza. En concreto, el HMA representa una excelente alternativa para la vigilancia de la salud pública.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Baz, C., Gómez-Cordero, I. **2005.** Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Revista Biomédica.* Vol. 16: 113-137.

Álvarez, D. E., Lodeiro, M. F., Ludueña, S. J., Pietrasanta, L. I., Gamarnik, A. V. **2005.** Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *Journal Of Virology.* Vol. 79: 6631-6643.

Balmaseda, A., Hammond, S. N., Pérez, L., Tellez, Y., Saborío, I. S., Mercado, J.C., Cuadra, R., Rocha, J., Pérez, M. A., Silva, S., Rocha, C., Harris, E. **2006.** Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.* Vol. 3: 449-456.

Cabezas, C., Carrión, D., Gutiérrez, V., García, P. M., Mamani, E., Cobos, M., Cáceres, O., Balta, R., Palomino, M., Castemoque, R., García, N., Villesca, P. **2005.** Dengue en el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.* Vol. 22: 212-228.

Capinera, J. L. *Encyclopedia of Entomology.* **2008.** 2da. ed. Springer: 1776.

CDC. 2002. Center for Disease and Control Prevention. West Nile Virus activity- United States at September 26-October 2, 2002, and investigation of West Nile Virus infections in recipients of blood transfusion and organ transplantation. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* Vol. 51: 884-895.

CDC. 2011. Center for Disease and Control Prevention. Febrero 17 de 2011.

CENAVECE. 2009. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. Octubre 19 de 2010.

Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., Rice, C. M. **1990.** Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annual Revision Microbiology.* Vol. 44: 649-688.

Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., Marks, R. M. **1997.** Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to a target cell heparin sulfate. *Nature Medicine.* Vol. 3: 866-861.

Chye, J. K., Lim, C. T., Ng, K. B., Lim, J. M. H., George, R., Lam, S. K. **1997.** Vertical transmission of dengue. *Clinical Infections Diseases.* Vol. 25: 1374-1377.

- Clyde, K., Kyle, J., Harris, E. 2006.** Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *American Society for Microbiology*. Vol. 80: 11418-11431.
- Cox, J., Grillet, M. E., Ramos, O. M., Amador, M., Barrera, R. 2007.** Habitat segregation of dengue vectors along an urban environmental gradient. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 76: 820-226.
- Del Ángel, R. M. 2006.** Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogénia viral. *Gaceta CINVESTAV*. Vol. 2006: 38-43.
- Delwart, E. L., Sheppard, H. W., Walker, B. D., Mosley, J. W., Mullins, J. I. 1994.** HIV-1 evolution *in vivo* tracked by DNA Heteroduplex mobility assay. *Journal of Virology*. Vol. 68: 6672-6683.
- Delwart, E. L., Herring, B., Allen, Rodrigo, A. G., Mullinis, J. I. 1995.** Genetic subtyping of Human Immunodeficiency Virus using a heteroduplex mobility assay. *Genome Research*. Vol. 4: 202-216.
- Dietz, V., Gluber, D. J., Ortiz, S., Kuno, G., Casta-Vélez, A. Sather, G. E., Gómez, I., Vergne, E. 1996.** The 1986 dengue and dengue hemorrhagic fever epidemic in Puerto Rico: epidemiologic and clinical observations. *Puerto Rico Health Science Journal*. Vol. 3: 201-210.
- Egloff, M. P., Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J. L., Canard, B. 2002.** An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the Flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *European Molecular Biology Organization Journal*. Vol. 11: 2757-2768.
- Faulgout, B., Pethel, M., Zhang, Y. M., Lai, C. J. 1991.** Both non-structural proteins NS2B and NS3 are require for the proteolytic processing of Dengue virus non-structural proteins. *Journal of Virology*. Vol. 65: 2467-2467.
- FMEL. 1999.** (Florida Medical Entomology Laboratory). Abril 4 del 2011.
- Geijtenbeek, T. B. H., Torensma, R., Vilet, S. J., Duijnhoven, G., Adema, G. J., Kooyk, Y. Figdor, C. G. 2000.** Identification of DC-SING, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that support primary immune responses. *Cell*. Vol. 100: 575-585.

- Gubler, D. J. 1998.** Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 11:480-96.
- Guha-Sapir, D., Schimmer, B. 2005.** Dengue fever: new paradigms for changing epidemiology. *Emerging Themes in Epidemiology*. Vol. 2: 1-10.
- Guzman, M., Kouri, G. 1996.** Advances in dengue diagnosis. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol. 3: 621-627.
- Guzman, M., Kouri, G. 2004.** Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases*. Vol. 8: 69-80.
- Harris, E., Roberts, T. G., Smith, L., Selle, J., Kramer, L. D., Valle, S. 1998.** Typing of dengue virus in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 36: 2634-2639.
- Hartanti, M. D., Tirtadjaja, I. A. 2010.** Dengue virus transovarial transmission by *Aedes aegypti*. *Universa Medicina*. Vol. 29: 65-70.
- Henchal, E. A., Gentry, M. K, McCown, J. M., Brandt, W. E. 1982.** Dengue virus-specific and Flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 31: 830-836.
- Henchal, E. A., Putnak, J. R. 1990.** The dengue viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 3: 376-396.
- Huan-Yao, L., Kao-Jean, H., Yee-Shin, L., Trai-Ming, Y., Hsiao-Sheng, L., Ching-Chuang, L. 2008.** Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *American Journal of Infectious Diseases*. Vol. 4: 1-9.
- Koraka, P. 2007.** Dengue virus specific immune response: implications for laboratory diagnosis and vaccine development. Rotterdam. Erasmus University Rotterdam. Tesis para obtener el título de doctorado en virología molecular. 3-20.
- Kyle, J. L., Harris, E. 2008.** Global spread and persistence of dengue. *Annual Review of Microbiology*. Vol. 62: 71-92.
- Lai, Y. L., Chung, Y. K., Tan, H. C., Yap, H. F., Yap, G., Ooi, E. E., Ng, L. C. 2007.** Cost-effective Real-Time Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) to screen for

dengue virus followed by Rapid Single-Tube Multiplex RT-PCR for serotyping of the virus. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 45: 935-941.

Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gluber, D. J., Chang, G. Vordam, V. 1992. Rapid detection and typification of dengue virus form clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 30: 545-551.

Lin, Y. W., Wang, K. J., Lei, H. Y., Lin, Y. S., Yeh, T. M., Liu, H. S., Liu, C. C., Chen, S. H. 2002. Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *Journal of Virology*. Vol. 76: 12242-12249.

Margraf, R. L., Erali, M., Liew, M., Wittwer, C. T. 2004. Genotyping hepatitis C virus by heteroduplex mobility analysis using temperature gradient capillary electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 42: 4545-4551.

Martina, B.E., Koraka, P., Osterhaus, A. D. 2009. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 22: 564-581.

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S. C. 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. Vol. 427: 313-319.

Moncayo, A. C., Fernandez, Z., Ortiz, D., Diallo, M., Sall, A., Hartman, S., Davis, T., Coffey, L., Mathiot, C. C., Tesh, R., Weaver, S. C. 2004. Dengue emergence and adaptation to peridomestic mosquitoes. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 10: 1970-1976.

Montesano, R. 1997. Manual simplificado para la vigilancia epidemiológica de dengue. *Epidemiología de la Secretaria de Salud*. Vol. 2: 1-24.

Mullins, J. I. 2000. <http://ubik.microbiol.washington.edu/HMA/index.html>.

Murray, J. M., Aaskov, J. G., Wright, P. J. 1993. Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *Journal of General Virology*. Vol. 74: 175-182.

Nielsen, D. G. 2009. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *VirologyJournal*. Vol. 6: 211-217.

OMS. 2009. Organización Mundial de la Salud. Octubre 25 de 2010.

OPS. 2011. Organización Panamericana de la Salud /Técnicas de laboratorio para el diagnóstico y caracterización de los virus del dengue. <http://new.paho.org>

- Pei-Yun, S., Shu-Fen, C., Yu-Chung, K., Yi-Yun, Y., Li-Jung, C., Chien-Lin, S., Ting-Hsiang, L., Jyh-Hsiung, H. 2003.** Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 41: 2408-2416.
- Phillips, M. L. 2008.** Dengue reborn: widespread resurgence of a resilient vector. *Environmental Health Perspect*. Vol. 116: 382-388.
- Pinherio, F. P., Corber, S. 1997.** Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Statics Quartely*. Vol. 50: 161-169.
- Reyes-Del Valle, J., Chávez-Salinas, S., Medina, F., Del Ángel, M. 2005.** Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components dengue virus receptor complex in human cells. *American Society for Microbiology*. Vol. 79: 4557-4567.
- Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., Smit, J. M. 2010.** Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Molecular Life Science*. Vol. 67: 2773-2786.
- Rothman, A. L. 2004.** Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *Journal of Clinical Investigation*. Vol. 113: 946-951.
- Schofield, S. 2009.** Statement of dengue. *Canada Communicable Disease Report. Committee to advise on tropical medicine an travel (CATMAT)*. Vol. 35: 1-12.
- Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A. D., Watowich, S, J., Gluber, D. J., Weaver, S. 2000.** Evolutionary relationships of endemic/epidemic and Sylvatic Dengue Virus. *Journal of Virology*. Vol. 74: 3227-3234.
- Xi, Z., Ramirez, J. L., Dimopououlos, G. 2008.** The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLOS Pathogen*. Vol. 4: 1-12.
- Yao, H., Fang, M., Zhao, W., Duan, F., Lin, L., Chen, C., Guo, H. 2002.** Identification of genetic variation among dengue virus DEN-4 isolates with Heteroduplex analysis. *Dengue Bulletin*. Vol. 26: 118-124.
- Young, P. R., Hildtich, P. A., Bletchly, C., Halloran, W. 2000.** An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein

NS1 in the sera of infected patients. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 38: 1053-1057.

Yun-Chi, C., Sheng-Yuan, W. 2002. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: Productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *Journal of Virology*. Vol. 76: 9877:9887.

Chapter 10: The History of the United States

The history of the United States is a complex and multifaceted one, spanning over two centuries. It is a story of exploration, discovery, and the struggle for freedom and equality. The early years of the nation were marked by the quest for a better life in a new world, as settlers sought to establish a society based on the principles of the Declaration of Independence. The American Revolution was a pivotal moment in the nation's history, leading to the birth of a new country. The years following the Revolution were a time of rapid growth and expansion, as the United States stretched across the continent. The Civil War was a defining moment in the nation's history, as it fought to preserve the Union and to end slavery. The Reconstruction era that followed was a time of great challenge and opportunity, as the nation sought to rebuild and to ensure that the principles of the Constitution were fully realized. The 20th century was a time of great change, as the United States emerged as a world superpower. The Cold War was a defining feature of the era, as the United States and the Soviet Union vied for global dominance. The Vietnam War was a controversial and costly conflict that tested the nation's resolve. The 1960s and 1970s were a time of social and cultural revolution, as the United States grappled with issues of race, gender, and the environment. The 1980s and 1990s were a time of economic growth and technological advancement, as the United States became a global leader in science and technology. The 21st century has been a time of great challenge and opportunity, as the United States has faced the challenges of globalization, terrorism, and climate change. The future of the United States is uncertain, but the principles of freedom, equality, and justice remain the guiding light for the nation.

ANEXOS

Secuencias obtenidas del banco de genes de los genomas de los cuatro serotipos (DENV 1-4) del virus del dengue, utilizadas para la alineación.

No. de acceso GI	Serotipo	Lugar	Año
310002699	DENV-1	México	2008
310002697	DENV-1	México	2007
300828753	DENV-1	Singapur	2008
298388310	DENV-1	Cambodia	2007
289187578	DENV-1	Singapur	2008
281324822	DENV-1	México	2006
281324808	DENV-1	Colombia	2001
263612209	DENV-1	Venezuela	2004
263612069	DENV-1	Venezuela	2000

No. de acceso GI	Serotipo	Lugar	Año
300828845	DENV-2	Puerto Rico	1995
300675522	DENV-2	Nicaragua	2005
300675520	DENV-2	Nicaragua	2006
300675516	DENV-2	Nicaragua	2007
298388350	DENV-2	Brasil	2008
285013167	DENV-2	México	2002
228543234	DENV-2	Nicaragua	2000
228542361	DENV-2	Venezuela	1998
228542162	DENV-2	Belice	2002
228542139	DENV-2	Saint Kitts	2001
228541826	DENV-2	República Dom.	2003
228541811	DENV-2	Isla Virginia (E.U)	1990

No. de acceso GI	Serotipo	Lugar	Año
261362140	DENV-3	India	2008
281324818	DENV-3	Colombia	2004
281324812	DENV-3	Colombia	2001

Table of Contents

Page

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

263614310	DENV-3	Cambodia	2003
263614244	DENV-3	Cambodia	2008
263613096	DENV-3	Brasil	2007
263612342	DENV-3	Brasil	2006
259500458	DENV-3	Colombia	2007
259500456	DENV-3	Colombia	2005
259500454	DENV-3	Colombia	2005
259500452	DENV-3	Colombia	2004
259500446	DENV-3	Colombia	2003
259496322	DENV-3	Trinidad y Tobago	2002
259496320	DENV-3	Santa Lucía	2001

No. de acceso GI	Serotipo	Lugar	Año
284432059	DENV-4	Puerto Rico	1985
284432051	DENV-4	Puerto Rico	1990
187763168	DENV-4	Guyana Francésa	2005
259500472	DENV-4	Colombia	2005
259500470	DENV-4	Colombia	2004
259500466	DENV-4	Colombia	2001
259496312	DENV-4	Venezuela	2007
259496218	DENV-4	Filipinas	1956
228539144	DENV-4	Estados Unidos	1999
225691021	DENV-4	Venezuela	2000
221070359	DENV-4	Venezuela	2001

Year	1880	1890	1900	1910
Population	1,000,000	1,500,000	2,000,000	2,500,000
Area (sq. miles)	100,000	100,000	100,000	100,000
Population Density	10	15	20	25
Urban Population	500,000	750,000	1,000,000	1,250,000
Rural Population	500,000	750,000	1,000,000	1,250,000
Total Population	1,000,000	1,500,000	2,000,000	2,500,000
Urban Density	50	75	100	125
Rural Density	5	7.5	10	12.5
Total Density	10	15	20	25