



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

POSGRADO EN TECNOLOGÍA AVANZADA

---

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE  
MICROARREGLOS DE cDNA PARA LA  
CARACTERIZACION DEL VIRUS DEL  
DENGUE

T E S I S

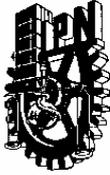
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
DOCTOR EN TECNOLOGÍA AVANZADA

P R E S E N T A

M. en C. **ALVARO DIAZ BADILLO**

MEXICO, D.F., DICIEMBRE DEL 2006.





**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO**

**ACTA DE REVISION DE TESIS**

En la Ciudad de México D.F. siendo las 11:00 horas del día 11 del mes de diciembre del 2006 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-IPN para examinar la tesis de grado titulada:  
DESARROLLO DE UN SISTEMA DE MICROARREGLOS DE cDNA PARA LA CARACTERIZACION DEL VIRUS DEL DENGUE.

Presentada por el alumno:

DIAZ BADILLO ALVARO  
Apellido paterno materno nombre(s)  
Con registro: 

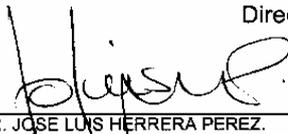
B	0	3	0	9	0	3
---	---	---	---	---	---	---

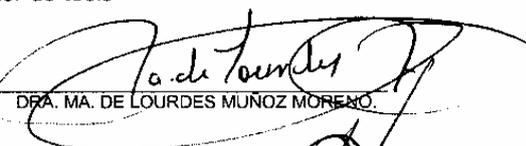
aspirante al grado de: **DOCTOR EN TECNOLOGIA AVANZADA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

Director de tesis

  
DR. JOSÉ LUIS HERRERA PEREZ.

  
DRA. MA. DE LOURDES MUÑOZ MORENO.

  
DR. JULIO G. MENDOZA ALVAREZ.

  
DR. JOSÉ R. CALDERÓN ARENAS.

  
DR. MIGUELLA AGUILAR FRUTIS.

  
DR. E. SANCHEZ SANCHEZ RAMIREZ

  
EL PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA DEL IPN  
DR. JOSÉ ANTONIO IRAN DÍAZ GÓNGORA



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de México D. F. el día 06 del mes de Diciembre del año 2006, el (la) que suscribe Álvaro Díaz Badillo, alumno (a) del Programa de Doctorado en Tecnología Avanzada con número de registro B-030903, adscrito a CICATA-IPN, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. José Luis Herrera Pérez, Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno y cede los derechos del trabajo intitulado Desarrollo de un Sistema de Microarreglos de cDNA para la Caracterización del Virus del Dengue, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección alvaro@cinvestav.mx, lmunoz@cinvestav.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

ALVARO DIAZ BADILLO

Nombre y firma

A la Divina Gracia de Dios y sus Ángeles,  
a mi Hermosa Patria y a su Gente,  
a mi querida Institución, sus Fundadores y sus Profesores,  
a la memoria de mis Ancestros, en especial a mis Abuelos,  
a mis Padres, compañeros ideales y a quienes tanto debo y quiero.  
a mis Hermanos, a sus Cónyuges y a mis Sobrinos,  
a mis Amigas y mis Amigos,

*Con todo mi cariño*

Es mi deseo hacer patente mi enorme agradecimiento a todas aquellas personas materiales y espirituales que me apoyaron en la realización de este trabajo.

A la Doctora María de Lourdes Muñoz Moreno, por contribuir a mi formación profesional y académica con su tiempo, su entusiasmo y confianza.

Al Dr. José Luis Herrera Pérez, por su gran paciencia y entusiasmo al compartir conmigo esta travesía por el mundo de los microarreglos.

A mis Asesores, Dr. Julio G. Mendoza Álvarez, Dr. Miguel A. Aguilar Frutis, Dr. José F. Sánchez Ramírez, Dr. José A. Calderón Arenas, Dr. Feliciano Sánchez Cinencio, Dr. Enrique Durán Páramo, Dr. C. J. Humberto Lanz Mendoza y Dr. Eduardo San Martín Martínez, por todos sus consejos y sugerencias en la realización de esta tesis, por compartir conmigo su experiencia y su entusiasmo.

Al personal Técnico y Administrativo del CICATA, especialmente a Leticia Cardona y Laura Yadira Vega.

Al personal de la sección de serología del LESPO.

Al personal de la delegación Veracruz Norte del IMSS.

A todos los integrantes del laboratorio Uno del Departamento de Genética y Biología Molecular por su apoyo y camaradería, Miguelito, Miguelón, Rosy, Dr. Alejandro Cisneros, M. en C. Jorge Pascual Martínez, Gerardop, Gerardor, Dra. Minerva Camacho, Dra. Gloria León, Dra. Isabel Salazar, Dr. Víctor Vega, Dra. Norma Gorrochotegui, Dr. Francisco García, Dra. Consuelo Gómez, Manuel, Gustavo, Ricardo, Alma, Diana, Evelyn, Mauro, Roberto Arellano, Hebert Cadena, Tony, Vero, Lety.

A todas las Familias que me han acogido en su seno, a la Familia Diaz Badillo, a la Familia Zarazúa Muñoz, a la Familia Torres Sánchez, a la Familia Escoto Hernández, por su apoyo, afecto y espacio.

Mi reconocimiento y admiración profunda para los integrantes de la Red Inter Institucional de Micro Arreglos, RIIMA, del CINVESTAV – CICATA – IPN.

María de Lourdes Muñoz  
Víctor Altuzar Aguilar  
Julio G. Mendoza Álvarez  
José Luis Herrera Pérez  
Feliciano Sánchez Sinencio  
Ma. Esther Orozco Orozco  
Patricio Gariglio Vidal  
Juan Pedro Luna Arias

Álvaro Díaz Badillo  
Gerardo Sánchez García  
Patricia Rodríguez Fragoso  
Lorena Ortega Delgado  
Carlos Acevedo Rocha  
Elizabeth Álvarez Ríos  
Rodolfo Ocádiz Delgado  
Joel Vega Badillo.

*“Plincess”, my” Plecious”, my Lady Blue... Was it  
worthwhile so much pain?*

*No regrets, no tears.  
Only a strange feeling,  
sleeping without falling.  
I'll try another World  
where the water is not blue anymore,  
another reallity.  
Oh, my baby I love you,  
My lady blue.  
I'm looking for something  
that I'll never reach.  
I seek eternity.  
No more sun, no more wind.  
Only a strange feeling,  
leaving without moving.  
I'll try another World  
and the sky slowly fades in my mind.  
Just like a memory.  
No more reasons, no fears  
Only this strange feeling,  
giving without thinking.  
Oh, my baby I love you,  
My lady blue.  
I'm looking for something  
I'll never reach.  
Baby, I love you  
my lady blue.  
I'm searching for something  
that I'll never reach.  
I seek eternity.*

*So, the question is... Was it worthwhile so much pain?*

El presente trabajo fue realizado conjuntamente en el laboratorio de Física Aplicada del CICATA-IPN, en el laboratorio número Uno del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN y en la Unidad de Microarreglos (R8) del Departamento de Física del CINVESTAV-IPN, bajo la co-tutoría del Dr. José Luis Herrera Pérez y la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno.

Durante el desarrollo de la presente investigación se contó con el apoyo económico de la Secretaría de Educación Pública y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para Posgrados del Padrón de Excelencia, a través de una beca para realizar los estudios de Doctorado.

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE  
MICROARREGLOS DE cDNA PARA LA  
CARACTERIZACION DEL VIRUS DEL  
DENGUE**

**ALVARO DIAZ BADILLO**  
POSGRADO EN TECNOLOGÍA AVANZADA

## RESUMEN.

El dengue es una infección viral transmitida por mosquitos del género *Aedes* y es considerada un problema global de salud pública. El virus del dengue (DENV) es el agente causante de la fiebre de dengue (DF) y la fiebre hemorrágica de dengue (DHF) e incluye cuatro distintos serotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4). El DEN-2 y el DEN-3 han sido asociados con la forma severa de la enfermedad, consecuentemente, pruebas de laboratorio para el virus del dengue son necesarias para confirmar el diagnóstico de la infección, serotipificar y diferenciar al dengue de otras enfermedades tropicales de tipo febril. Por otro lado, los mosquitos infectados por el virus en la naturaleza pueden significar un acercamiento al tipo de infección que está circulando en un área determinada y este dato puede ser útil en la predicción temprana de epidemias. En el presente trabajo nosotros desarrollamos un microarreglo para detectar simultáneamente la presencia del virus en muestras de RNA provenientes de Suero Humano y mosquitos infectados, usando sondas para la proteína NS3. Por tanto, el propósito de este método fue, i) tener un rápido y específico diagnóstico de las muestras, ii) serotipificar las muestras positivas para dengue, y iii) la verificación y circulación de mosquitos infectados con el virus del dengue en zonas endémicas del país. Nosotros usamos este microarreglo para determinar la presencia del Virus del Dengue en "pools" de mosquitos hembras grávidas capturadas durante el temporal de lluvias de 2005; treinta y un poblaciones de mosquitos provenientes de Yucatán, Campeche, Tabasco, Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Guerrero, Tamaulipas y Colima estaban infectadas con DEN-2, seis poblaciones de Yucatán, Tabasco, Morelos, Nayarit, Veracruz y Oaxaca estaban infectadas con DEN-1, tres poblaciones de Tabasco, Veracruz y Oaxaca estaban infectadas con DEN-3, finalmente dos poblaciones provenientes de Ciudad Mante (DEN1-DEN2) y Tavela (DEN-2-DEN3) estaban infectadas con dos serotipos al mismo tiempo. Este microarreglo también fue utilizado para confirmar la presencia de DEN-2 en noventa y siete muestras de sueros de pacientes provenientes de Oaxaca y Veracruz, el serotipo DEN-1 se localizó en 5 muestras de Veracruz y el DEN-3 en cuatro muestras de Oaxaca y Veracruz, adicionalmente se determinó la presencia de una muestra con dos serotipos al mismo tiempo, DEN-2-/DEN-3, proveniente de Juchitán, Oaxaca.

## SUMMARY

Dengue is a mosquito-borne viral infection, considered a major public health problem globally. Dengue virus (DENV) is the causative agent of dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF) and includes four distinct serotypes (DEN-1, DEN-2, DEN-3, and DEN-4). DEN-2 and DEN-3 have been associated with severe dengue disease, consequently, laboratory testing for dengue virus is needed to confirm the diagnosis of dengue virus infection, serotype and to differentiate dengue from other febrile tropical illnesses. In addition, surveillance of mosquitoes infected with dengue viruses is needed to monitor the infection rates within vector mosquito populations harboring specific serotype to provides an early warning sign to predict epidemics. In this work we have developed a microarray technique for simultaneous serotyping multiple RNA samples from human or mosquitoes through the NS3 genome. Thus, the proposed microarray method can be used for i) rapid and reliable dengue diagnosis; ii) serotyping; iii) surveillance of mosquitoes infected with dengue. In addition, using this microarray we determined DEN Viruses in pools of gravid females mosquitoes collected in 2005, thirty one mosquito populations from Yucatán, Campeche, Tabasco, Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Guerrero, Tamaulipas and Colima were infected with DEN-2, six mosquito populations from Yucatán, Morelos, Chiapas, Nayarit, Tamaulipas and Colima were infected with DEN-1, three from Tabasco, Veracruz and Oaxaca were infected with DEN-3 and two infected with two serotypes (Ciudad Mante with DEN-1 and DEN-2, and Tavela with DEN-2 and DEN-3). This microarray was also useful to confirm the presence of DEN-2 in 97 serum samples from Oaxaca and Veracruz, DEN-1 in 5 Samples from Veracruz, DEN-3 in 4 samples from Oaxaca and Veracruz, and one case with two DEN viruses (2 and 3) from Juchitan.

**ABREVIATURAS.**

A°, A	Angstrom (s)
aa	Aminoácido (s)
ADA	Amplificación Dependiente de Anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ae.	Mosquito del genero <i>Aedes</i>
ANS	Ácido 1,8 anilino naftaleno sulfónico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
bp (pb)	Pares de bases
BSA	Albúmina sérica bovina
C°, C	Grados celsius, centigrados
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CGH	Hibridación Genómica Comparativa
ChIP-chip	Inmunoprecipitación de la cromatina en Chip
DD	Expresión diferencial, Differential Display
D-MEM	Medio Eagle suplementado
DTT	Ditiotreitol
D (D1-D4)	Dengue (Dengue serotipo1-Dengue serotipo 4)
DEN (DEN1-DEN4)	Dengue (Dengue serotipo1-Dengue serotipo 4)
DO (OD)	Densidad Óptica (Optical Density)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático, Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FD	Fiebre del Dengue
FHD	Fiebre Hemorrágica del Dengue
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FR	Factor reumatoide
g, grs	Gramos
g (s)	Gravedad (s)
GdmCl	Clorhidrato de Guanidinio
GS	Grupo sanguíneo
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico
HLA	Antígenos Leucocitarios de Histocompatibilidad Histocompatibility Leucocyte Antigen
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgM	Inmunoglobulina M
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucinas
Kb	Kilobases
Kda	Kilodaltones
M	Molar
mA	Miliamperes
MEM	Medio esencial mínimo
Mg	Miligramos

MHC	Complejo principal de histocompatibilidad Major Histocompatibility Complex
min	Minutos
mM	Milimolar
µg	Microgramos
µl	Microlitros
N	Normal
NBT	Nitroazul de tetrazolium
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
nt	Nucleótido (s)
<sup>32</sup> P	Fósforo radiactivo
P:	Pase en cultivos de células
pb	Pares de bases
PBS	Solución Balanceada de Fosfatos
PCR (RCP)	Reacción en cadena de la polimerasa Polymerase Chain Reaction
PEG	Polietilenglicol
PEG	Patrón o Perfil de Expresión Génica
PM (MW)	Peso Molecular
p/v	Peso por volumen
RDA	Análisis de la Diferencia Representativa
RF	Reacciones febriles
RT (TC)	Temperatura de cuarto
RT	Retrotranscripción, Reverse Transcription
S	Coefficiente de sedimentación
SAGE	Análisis en serie de la Expresión Génica
SCD	Síndrome de Choque por Dengue
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SNP	Polimorfismo de un solo Nucleótido
STFI	Suero de ternera fetal inactivado
T	Temperatura
Th	T cooperadoras, T helper
TNF	Factor de necrosis tumoral, Tumoral necrosis factor
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
V	Volts
v/v	Volumen por volumen
www	World Wide Web (Red de Información Mundial)

## INTRODUCCION.

### LA HISTORIA DEL DENGUE Y SU EPIDEMIOLOGÍA.

El dengue es una enfermedad infecciosa de origen viral que se trasmite al hombre a través de un mosquito del género *Aedes*, provocando una enfermedad con un amplio espectro de formas clínicas que va desde la fiebre indiferenciada hasta las formas más graves con hemorragia y choque (33).

La primera descripción de una enfermedad compatible con dengue se publicó en la Enciclopedia China en el año 992 de nuestra era. Sin embargo, no fue hasta 1635 que en las Indias Francesas del Oeste se conoció un reporte similar, donde la enfermedad fue denominada "*Coup de Barre*" (34). En 1779, en Batavia, Indonesia se reportó una epidemia de casos febriles denominada "*Knockelkoorts*" (Fiebre de huesos) y en el mismo año en el Cairo, Egipto se le denominó "*Mal de Genoux*" (problemas de rodilla). En 1780 en Filadelfia, EUA se reportó la enfermedad febril como "*Escarlatina reumática*".

La ocurrencia casi simultánea de epidemias en Asia, África, y América del Norte indicó una distribución mundial de estos virus y su vector. En sus inicios, se consideró una enfermedad benigna de los visitantes a los trópicos (34). Las epidemias se producían a intervalos de 10-40 años, principalmente porque los virus y su vector transmisor sólo podían transportarse entre los centros de la población a través de la navegación (34).

Fueron varios los nombres asociados a esta enfermedad de acuerdo a la región geográfica (34). De esta forma se denominó "*La Piadosa*" en Cádiz, España (1784-86), "*Dengue*" en España (1809), "*Ki Dinga Pepo, Denga*" en Zanzíbar, África del Este (1823), "*Ephemeral fever*" en Calcutta, la India (1824), "*Dandy fever*" en Santo Tomas, Islas Virginias (1827), "*Dunga, Dengue*" en Cuba, 1828, "*Polka fever*" en Brasil, (1845-49), "*Three-day or Seven-day fever*" en la India, 1909, "*Ban-'Sha*" en Taiwan, 1916 y "*Five-day fever*" en Indonesia (1960s). A partir de la década de los años cincuenta se denominó FD a la forma clásica y FHD/SCD a las formas severas de la enfermedad (34).

Los estudios de la enfermedad comenzaron con la demostración por Graham en 1903 (35) de la capacidad de los mosquitos para transmitir el dengue. El virus dengue se aisló por primera vez en Hawai en 1944, al que se denominó DEN-1 y en el mismo año se aisló en Nueva Guinea otra cepa relacionada antigénicamente a la que se denominó DEN-2 (36, 37). En Manila, 1956 y 1960, se aislaron los serotipos 3 y 4 a partir de muestras clínicas de pacientes con un cuadro de dengue hemorrágico (38).

### EMERGENCIA MUNDIAL.

La pandemia global de dengue que empezó en el Sudeste de Asia después de la Segunda Guerra Mundial, se intensificó durante los últimos 30 años, siendo frecuentes las epidemias causadas por varios serotipos (hiperendemicidad) (39). En el Sudeste Asiático, la FHD en su forma epidémica apareció por primera vez en los años cincuenta (40, 41), en 1975 ya era una causa importante de hospitalización y muerte, fundamentalmente en niños. Hasta el año 1990, se habían reportado oficialmente alrededor de 3 millones de casos de FHD, la mayoría de estos en Asia. Tomando en consideración solamente a Tailandia, entre 1958 y 1990 se reportaron 874 207 casos, con una tasa de mortalidad del 1.57 % siendo en este país la quinta causa de morbilidad y la tercera causa de muerte (34). En Asia, la FHD es considerada una enfermedad de la niñez, observándose dos picos de mayor tasa de incidencia en edades específicas: niños menores de un año de edad y niños entre tres y cinco años. La enfermedad en recién nacidos

se asocia a infecciones primarias en presencia de anticuerpos maternos, mientras que la mayoría de los casos observados en niños mayores son el resultado de infecciones secundarias (33, 34).

En los años ochenta, la FHD comenzó su segunda expansión por Asia cuando Sri Lanka, la India, y las Islas Maldivas tenían sus primeras epidemias de FHD (34). Las recientes epidemias en Sri Lanka y la India han estado asociadas con múltiples serotipos de los virus del dengue, siendo el DEN-3 predominante y genéticamente distinto de los DEN-3 aislados previamente en esos países (42, 43). En otros países de Asia donde la FHD es endémica, las epidemias han sido progresivamente de mayor extensión en los últimos 15 años (34, 4447).

Los factores responsables de la emergencia de la FHD como una enfermedad epidémica (33, 34) en Asia en los años cincuenta y del reciente incremento en su incidencia incluyen:

1. Cambios demográficos (crecimiento poblacional y urbanización no planificada) que favorecen el contacto con el vector, el mosquito doméstico *A. aegypti*.
2. Cambios ecológicos relacionados a la urbanización (pobre saneamiento ambiental, inadecuado suministro de agua que implica el almacenamiento doméstico de la misma).
3. El rápido incremento de los viajes aéreos, que posibilita el movimiento de personas en fase virémica y la diseminación de múltiples serotipos y cepas del dengue.
4. Establecimiento de una situación de hiperendemicidad y aumento de la frecuencia de infecciones secuenciales en niños.

En el Pacífico, los virus del dengue fueron reintroducidos tempranamente en la década del setenta después de una ausencia de más de 25 años. La actividad epidémica causada por los cuatro serotipos se ha intensificado en los años recientes con epidemias de FHD en varias islas de esa región (44, 48-52).

La vigilancia del dengue en África ha sido extremadamente pobre, previo a los años 80 la mayoría de los brotes no eran reportados y actualmente aunque la vigilancia no ha mejorado, se ha incrementado el número de reportes. Más recientemente, la mayor actividad epidémica ha ocurrido en África Oriental (53-56).

Los factores descritos previamente como determinantes de la emergencia de la FHD en Asia, algunos años después, también fueron responsables de la emergencia en las Américas. Al final de la década de los años 70 la distribución de *Aedes aegypti* cambió dramáticamente debido al colapso de los esfuerzos para el control del vector. El patrón de las infecciones por dengue en la región latinoamericana cambió de brotes producidos por un simple serotipo con intervalos inter-epidémicos largos a brotes anuales y co-circulación de tres de los cuatro serotipos del dengue (34). En 1977, se introdujo el DEN-1 en América provocando epidemias de FD a lo largo de toda la región y aún se encuentra circulando(57). El DEN-3 por su parte estuvo circulando en la región entre los años 1963 y 1977, sin embargo se reportaban casos esporádicos de FHD.

En la década de los años 80, la FD/FHD se presentó como un problema de salud de gran envergadura. Específicamente en 1981, se reportó en Cuba una epidemia de FHD/SCD sin precedentes en las Américas, causada por una cepa de DEN-2 de origen asiático, relacionada genéticamente con la cepa NGC del año 1944 (8, 23, 58). En este mismo año también se introdujo el DEN-4 en la región. En este período, ambos serotipos causaron epidemias siendo relevantes las epidemias causadas por el DEN-2 en Venezuela y Brasil (59, 60). Por su parte, el DEN-4, afectó notablemente a Puerto Rico, México, Surinam y El Salvador (34).

En la década de los años 80 y 90 estuvo circulando en la región más de un genotipo de DEN-2, de esta forma otras epidemias fueron causadas por cepas relacionadas genéticamente con la cepa Jamaica/83 también de origen asiático (61, 62).

En 1994, tras una ausencia de 17 años, el DEN-3 fue reintroducido en Latinoamérica. Se realizaron aislamientos casi simultáneamente en Nicaragua y Panamá; posteriormente en Costa Rica en el año 1995 (32). Los estudios filogenéticos realizados muestran que el virus aislado tuvo su origen en Asia, relacionándose genéticamente con los virus aislados en la India y Sri Lanka en los años ochenta (43, 63), y por tanto diferente del que circuló previamente en la Región durante los años 1963-1977. Debido a la susceptibilidad de la población en los trópicos americanos, esta nueva cepa de DEN-3 se extendió rápidamente a lo largo de la región, causando epidemias de FD/FHD (29, 64).

La enfermedad es endémica en las Américas, Sudeste de Asia, Pacífico Oeste, África, Mediterráneo Oriental, con mayor carga en las tres primeras regiones (65).

Aunque los cuatro serotipos del dengue son capaces de producir casos de FHD, el DEN-2 y el DEN-3 son los más frecuentemente asociados con la enfermedad severa. La infección por DEN-1 seguida por DEN-2 ha sido asociada con epidemias de FHD, aunque en áreas hiperendémicas no es fácil definir el virus causante de la infección primaria.

## ORIGEN DE LOS VIRUS DEL DENGUE.

Dentro de los Arbovirus, los virus del dengue son los únicos que aparentemente han “escapado” de las ataduras de una existencia selvática. Estos evolucionaron con la capacidad de circular dentro de la población humana de todas las regiones tropicales y subtropicales, en un ambiente urbano. Esta característica los diferencia del virus de la Fiebre Amarilla que es capaz de producir epidemias urbanas sólo temporalmente (66). Las epidemias de Fiebre Amarilla aparecen cuando el virus selvático es reintroducido en áreas rurales o urbanas. Contrariamente, las cepas selváticas de dengue no han sido asociadas con epidemias en humanos (67-69). Algunos estudios experimentales han indicado que los vectores urbanos son más susceptibles a cepas de DEN-2 urbanas que a cepas selváticas, esto es consistente con la hipótesis que plantea que el dengue urbano emergió a través de la adaptación de mosquitos peridomésticos (70).

Los estudios antigénicos han demostrado que los virus del dengue deben ser clasificados como flavivirus. Sin embargo, para dar luz a la historia evolutiva de estos virus se ha requerido de un análisis filogenético molecular más detallado. Independientemente de la alta resolución de estos estudios, muchos aspectos relacionados con el pasado de los virus del dengue permanecen sin respuesta. Todos los análisis realizados hasta la fecha muestran que los cuatro serotipos del dengue son filogenéticamente distintos y frecuentemente con el mismo grado de divergencia con que es posible distinguir entre “especies” diferentes de flavivirus (68).

El análisis filogenético de más de 70 flavivirus realizado por Kuno y colaboradores (71) basado en la secuencia del gen NS5 permitió distinguir tres grupos fundamentales de flavivirus, esta división generalmente se relaciona con el modo de transmisión: virus transmitidos por garrapatas, por mosquitos y con vector desconocido.

Aunque el agrupamiento de los virus del dengue dentro de la rama de los virus transmitidos por mosquito está bien soportado, la cercanía relativa entre ellos no puede ser determinada con certeza, ya que se obtiene un débil soporte de re-muestreo (del inglés bootstrap) en los nodos críticos del árbol. Para la resolución de esta parte de la filogenia de los flavivirus se requiere de un análisis a partir de secuencias de genomas completos, las cuales no se han realizado aún, al menos a gran escala (68).

La mayoría de las filogenias muestran el DEN-4 como el primero en bifurcarse, indicando que fue el primer serotipo en emerger, seguido por DEN-2 y la partición final entre DEN-1 y DEN-3. No obstante, algunas filogenias muestran resultados diferentes. Por ejemplo, algunos árboles obtenidos a partir de la secuencia de NS5, aunque con un débil soporte de re-muestreo,

revelan que el DEN-2 se agrupa con el DEN-3. Utilizando el mismo tipo de análisis pero con en otras regiones del genoma, puede apreciarse que el DEN-2 se agrupa con el DEN-4 (Holmes EC, Universidad de Oxford, 2003, observaciones no publicadas). No está claro aun si esta ubicación de las ramas es enteramente estocástica o es una señal de recombinación muy antigua (68).

A pesar de la falta de resolución en los árboles filogenéticos de flavivirus, pueden hacerse algunas inferencias con relación al origen de los virus del dengue(68). Se han realizado observaciones claves en este sentido: a) la identificación de ciclos de transmisión selvática en Asia y África occidental que involucran monos y b) la ubicación de cepas selváticas específicamente de DEN-2 y DEN-4 en la base de árboles construidos con aislamientos provenientes de humanos (67). Esto podría ser así para DEN-1, aunque no se ha hecho todavía el análisis y en el caso de DEN-3, aún no se han identificado cepas selváticas; sin embargo, la presencia de anticuerpos a DEN-3 en monos de Malasia sugiere que también existe un ciclo selvático para este serotipo(68). De aquí se derivan fuertes evidencias de que el dengue fue un virus originalmente de monos y que la transmisión entre especies a humanos ha ocurrido independientemente para los cuatro serotipos (68).

Lo que no está definido de manera absoluta es donde se originó el dengue. Gaunt y colaboradores (72) sugirieron un origen africano, principalmente debido a que muchos de los flavivirus transmitidos por mosquitos, que revelan la mayor divergencia, circulan exclusivamente en África y con frecuencia infectan primates, lo que sugiere que este grupo tuvo su origen en África. Unido a esto, también se plantea que el *Aedes aegypti* tuvo su origen en África. No obstante, esta especie es probable que haya sido adoptada como vector para la transmisión a humanos en un pasado relativamente reciente.

Contrariamente, la presencia de los cuatro serotipos en Asia tanto en humanos como en monos y particularmente la profunda posición filogenética de las cepas selváticas asiáticas sugiere que el virus tuvo un origen asiático (67). La elevada prevalencia del dengue en esta región también podría apoyar la segunda hipótesis, pero no es menos cierto que sólo un pequeño número de muestras africanas (de humanos y monos) están disponibles para su análisis. Claramente, para determinar el lugar de origen de los virus del dengue se requerirá de un muestreo más amplio de cepas selváticas y de filogenias moleculares más precisas.

Una pregunta obligada con relación al origen de los virus del dengue es: ¿Por qué existen cuatro serotipos diferentes? Según la hipótesis planteada por Holmes y colaboradores (68), es muy probable que los virus del dengue se hayan separado en cuatro linajes debido a divisiones ecológicas o geográficas en diferentes poblaciones de primates y por tanto los cuatro serotipos evolucionaron de forma independiente.

Alternativamente, otros autores plantean que los virus del dengue pudieron evolucionar dentro de una única población, porque la presencia de cuatro serotipos antigénicamente diferentes facilitó la transmisión a través del fenómeno de ADA. Bajo este modelo, la selección natural favorece a los virus con un grado de disimilaridad antigénica que maximice la amplificación inmunológica (73).

Si la ADA fuese la fuerza fundamental que determina la diversidad genética de los virus del dengue; entonces debía esperarse que los virus estuvieran sometidos a una constante presión selectiva de tipo inmunológica. Los estudios de selección natural realizados hasta la fecha muestran que ese no es el caso de los virus del dengue (74, 75).

Consecuentemente, la ADA, más que una estrategia evolutiva a largo plazo, muy probablemente sea el resultado del contacto reciente entre los cuatro virus que evolucionaron por separado durante un período extenso y por casualidad tienen un nivel de disimilaridad antigénica, que permite la inmunoamplificación (68). Aunque existen numerosas evidencias que

relacionan la ADA con la patogénesis del dengue, su influencia en la diversificación genética de los virus del dengue requiere una mayor investigación.

### **El Vector.**

La infección por el virus del dengue es transmitida al humano por un piquete de sus vectores, los mosquitos *Aedes aegypti* y/o *Aedes albopictus*.

Los mosquitos del dengue son pequeños insectos blanquinegros con rayas (anillos blancos) en el dorso y las patas, pican de día y no zumban; pasan por 4 etapas: huevo, larva, pupa y adulto. La larva del mosquito solo puede vivir en agua. Las hembras depositan los huevecillos en cualquier parte ya que estos pueden sobrevivir de 3 a 5 años esperando el contacto con el agua, cuando esto ocurre los huevecillos empiezan a convertirse en larvas, atrapando burbujas de aire con una especie de espinas, para poder llevar a cabo la fase de crecimiento. (Fernández, 1999).

En el continente Americano, el virus del dengue persiste en la naturaleza mediante un ciclo de transmisión hombre-mosquito-hombre.

En América, incluyendo a México, el principal vector es la hembra del *Ae. aegypti*, especie vinculada también a la transmisión de la fiebre amarilla. Es hematófaga y adquiere el virus de una persona virémica al ingerir de ésta la sangre que necesita para el desarrollo de sus huevecillos. Una vez infectada existe un periodo de incubación extrínseca de 8 a 12 días (tiempo en el cual se multiplica el virus). Posteriormente las glándulas salivales se infectan, y el virus es transmitido a través de la saliva cada vez que el mosquito realiza una toma de sangre. Entre 5 y 8 días post-inoculación, el huésped desarrolla una viremia que dura aproximadamente cinco días. Estos vectores representan un serio problema desde el punto de vista de control de la enfermedad, ya que, experimentos de apareamiento entre mosquitos infectados macho con mosquitos hembra no infectados, han demostrado que después de treinta días del apareamiento, el virus está presente en los mosquitos hembra (transmisión horizontal). Este tipo de transmisión aunada a la transmisión vertical dificulta encontrar una solución eficaz para el control del virus del dengue, representando una seria amenaza para las Américas donde la incidencia de *Ae. aegypti* es muy alta. Así mismo, *Ae. albopictus* transmisor del dengue en Asia, ya se encuentra presente en diferentes regiones de Estados Unidos y recientemente ya se ha propagado al Norte y Sur de México. Esto último incrementa el riesgo de brotes epidémicos en todo el Continente Americano (WHO/OMS., 2001).

<http://www.monografias.com/trabajos/dengue/dengue.shtml>

El mosquito *Ae. albopictus* fué introducido a Texas en 1985, y en forma independiente se introdujo también en Brasil en 1991, este vector ha sido detectado en diferentes regiones de Estados Unidos (aproximadamente 26), en la República Dominicana, en la parte Norte de México, Guatemala, el Caribe y al menos en siete estados de Brasil. Un dato que es importante resaltar es el hecho de que hasta el momento solo existe un reporte en el que se ha detectado al virus del dengue en el mosquito *Ae. Albopictus*.

Desde el punto de vista epidemiológico, las infecciones con virus del dengue son un grave problema en todo el mundo sin embargo, este problema se agudiza en muchos de los países tropicales y subtropicales. Datos globales reportan que aproximadamente 2.5 billones de personas de más de 100 países se encuentran en riesgo de ser infectadas y según reportes de la Organización Mundial de la Salud, se presentan entre 30 y 60 millones de casos por año en todo el mundo (OMS. 1987, 2001).

En 1995, en Estados Unidos se volvió a reportar una transmisión endémica por el virus del dengue en su forma más severa. En las Américas, entre 1989 y 1994 los casos de Dengue Hemorrágico se han incrementado en casi un 80% más que hace 10 años y en los últimos 15 años, cinco países en América del Sur han experimentado las peores epidemias de los últimos 50 años. En 1995 Brasil, Venezuela y algunas otras regiones en Centro América tuvieron alarmantes brotes de casos de dengue al grado que, varias de estas regiones tuvieron que declararse en estado de emergencia, cabe mencionar que tan solo en Venezuela se reportaron 5,000 casos de Dengue Hemorrágico. Es importante mencionar que en 1994, Nicaragua y Panamá reportaron la presencia del virus del Dengue tipo 3 y que durante 1995, este serotipo se diseminó a otras regiones de Centroamérica, presentándose la primera reaparición de este serotipo en las Américas, después de una ausencia de 16 años. Aun más, en México, a la fecha, ya se encuentran los cuatro serotipos del dengue.

Hasta la fecha no se cuenta con vacunas, ni con tratamientos específicos para la infección causada por el virus del dengue. Esto, aunado a la falta de un sistema de diagnóstico confiable, que permita detectar oportunamente la enfermedad y el serotipo del virus, dificulta tomar las medidas necesarias para tratar al paciente adecuadamente y para establecer un control que disminuya la problemática ocasionada por el virus. (Zárate et al., 1995; Martínez, 1995).

<http://www.geocities.com/HotSprings/8131/dengueen.htm>

<http://www.bayerandina.com/bayerrand.nsf/Soluciones/picadurasdengue>

Especialmente sería muy importante detectar el serotipo del virus ya que se podría predecir la posibilidad de que la enfermedad evolucionara a dengue hemorrágico. De esta manera se podría tratar al paciente, adecuadamente, previniendo que la infección llegara hasta un estado de shock, el cual es irreversible y en el cual el paciente generalmente muere. Otro punto importante para la prevención del virus del dengue, es el control adecuado del vector. Tarea que se hace difícil debido a los cambios drásticos demográficos como son la urbanización incontrolada, crecimiento de la población, incremento de la pobreza en algunos países tropicales, el movimiento migratorio de áreas endémicas hacia Países donde no existe este virus, además de la falta de un buen conocimiento de la biología de los vectores y sus interacciones con el virus. En este caso un Kit para detectar al virus sería recomendable ya que se podría emplear para detectar al virus no solo en el paciente si no también en el mosquito vector, del cual se conoce su localización en áreas donde se han presentado brotes; y así, de esta manera, se podrían marcar como prioritarios para el control por insecticidas aquellos lugares donde tempranamente se detectara al virus en el mosquito.

Actualmente, nuestro laboratorio contribuye al entendimiento de la biología de los vectores *A. aegypti* y *A. albopictus* en México lo que forma otra parte de este proyecto. (Gorrochotegui-Escalante et al., 2000; Gorrochotegui-Escalante et al., 2002; García-Franco et al. 2002).

## VIRUS DEL DENGUE: CLASIFICACIÓN, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.

Los virus del dengue pertenecen a la familia Flaviviridae, género Flavivirus el cual agrupa alrededor de 70 miembros. Existen cuatro serotipos (DEN-1, 2, 3, 4), para los cuales se ha descrito una homología de secuencia de un 70% aproximadamente (76).

Los viriones maduros son partículas esféricas de 40-60 nm de diámetro, que contienen un núcleo electrodensito de 30 nm de diámetro rodeado por una bicapa lipídica. La envoltura es de 10 nm de espesor y contiene dos proteínas que dan lugar a proyecciones localizadas en la

superficie del virión de aproximadamente 7 nm de longitud (77). Esta bicapa lipídica se deriva de la membrana celular del hospedero. La nucleocápside icosaédrica contiene una molécula de ARN de simple cadena, con orientación positiva, de aproximadamente 11 kb de longitud y peso molecular de 4,2 kD (78).

La constitución lipoproteica de la envoltura de los viriones les confiere una elevada sensibilidad al tratamiento con cloroformo, formaldehído, peróxido de hidrógeno, alcohol y yodo. Además, son sensibles a enzimas hidrolíticas que generan pérdida de ciertas propiedades antigénicas. La infectividad viral se preserva bien a bajas temperaturas y a valores de pH entre 8,4 y 8,8. Son inactivados por la luz ultravioleta, las radiaciones gamma y las altas temperaturas. A 50 °C, se pierde el 50% de la infectividad en 10 min. Se pueden conservar por años a -70 °C y son estables de forma liofilizada a 4 °C (79).

## GENOMA VIRAL : ORGANIZACIÓN Y ESTRUCTURA.

La molécula de ARN (+) se comporta como ARN mensajero durante la síntesis de las proteínas virales. Posee una caperuzita m<sup>7</sup>G5'ppp5'A en el extremo 5'. No presenta cola poliadenilada en el extremo 3'. Presenta un marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína precursora que es procesada pre y post-traduccionalmente por proteasas celulares y virales. Los genes ubicados hacia el extremo 5' codifican para las tres proteínas estructurales: la proteína de la cápside (C) y dos proteínas de superficie: la de membrana (M), no glicosilada, la cual se forma durante la maduración a partir del precursor denominado prM y la proteína de envoltura (E), glicosilada. Las proteínas no estructurales son codificadas por genes situados hacia el extremo 3' y se denominan NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (77)

En ambos extremos, 5' y 3' están presentes secuencias no codificantes (NCR) -del inglés noncoding regions-. Estas regiones contienen secuencias conservadas, que dirigen el proceso de amplificación, traducción y empaquetamiento del genoma (77). La función más significativa de la NCR 5' probablemente reside en su complementariedad reversa con la NCR 3' de las cadenas negativas virales, la cual forma el sitio de inicio de la síntesis de la cadena positiva. La NCR 3' del genoma de los Flavivirus actúa como promotor de la síntesis de la cadena negativa (77).

## PROTEÍNAS VIRALES.

### Proteínas estructurales.

La proteína C es pequeña, de aproximadamente 12 kD con una elevada carga positiva y rica en residuos de lisina y arginina que le conceden un carácter altamente básico. Dicha composición permite su interacción con el ARN viral lo que favorece la formación de la nucleocápside. La homología de esta proteína entre los Flavivirus es baja; sin embargo, hay regiones muy conservadas que interactúan con las membranas celulares y puede participar en el ensamblaje del virión (77).

La proteína C, es el primer polipéptido viral sintetizado durante la traducción. Su dominio carboxilo terminal, se plantea que actúa como transductor de señales a través de la membrana que media la inserción del precursor prM dentro del retículo endoplasmático rugoso (80).

La proteína prM de 26 kD es escindida proteolíticamente, liberándose su extremo amino terminal para dar lugar a la proteína M de 8 kD. La formación de M a partir de prM parece ser crucial en la morfogénesis del virus, lo que implica un incremento en la infectividad y la reorganización de la estructura de la superficie viral. De esta forma el precursor se localiza en

los viriones inmaduros intracelulares y la proteína M en el virión extracelular, el clivaje coincide con la liberación de los viriones (77).

Durante la ruptura se genera a su vez un fragmento pr, cuyo papel no ha sido bien identificado. El fragmento pr es predominantemente hidrofílico, contiene seis residuos de cisteína conservados, de los cuales todos participan en puentes disulfuro y en un número variable de sitios potenciales de N-glicosilación. Los anticuerpos contra prM pudieran mediar inmunidad de tipo protectora, quizás por neutralización de los viriones liberados que contienen prM no clivada (77, 81).

La glicoproteína E forma parte de la envoltura viral. Tiene un peso molecular de 53-54 kD, constituye la principal proteína estructural de los flavivirus y la más conservada en este género (82). Un modelo estructural que se propone para esta proteína consiste en 3 dominios antigénicos no superpuestos designados como A, B y C, que contienen al menos 16 epítopes (83). Otro modelo propuesto es aquel donde en la cadena polipeptídica que conforma el fragmento soluble de la proteína se reconocen 3 dominios (I, II, III), en los cuales predomina la hoja plegada como estructura secundaria (84).

Generalmente la proteína E aparece intracelularmente como un heterodímero E-prM y como un homotrímero en la superficie del virión maduro (85). Para que ocurra el plegamiento apropiado, la asociación a membrana y el ensamblaje de la proteína E, se requiere de su cosíntesis y expresión con la proteína prM (86). Existen evidencias de que en el heterodímero prM-E, la proteína prM estabiliza los epítopes de la proteína E sensibles a valores bajos de pH, lo que evita cambios conformacionales irreversibles durante la secreción de la partícula viral a través del compartimento acidificado. Algunos de los cambios sufridos por la proteína E en las vesículas ácidas de la vía exocítica, parecen ser de gran importancia en la infectividad del virus por relacionarse con la actividad fusogénica de la proteína (87).

En la proteína E radican las principales funciones biológicas del virión tales como: inducción de anticuerpos neutralizantes, inmunoamplificadores e inhibidores de la hemaglutinación, tropismo tisular, maduración viral, enlace al receptor celular y fusión de membrana catalizada por ácidos, necesaria para la infección (31). En la misma se ha determinado la presencia de epítopes de células T, también de importancia en la inmunidad y la patogenia de la enfermedad. Los determinantes antigénicos de la proteína E han mostrado especificidad de grupo, complejo y tipo, también de subcomplejo, genotipo, cepa y subcepa (88).

### Proteínas no estructurales.

NS1 es una glicoproteína de 39-41 kD que existe asociada a la célula, en la superficie celular y en forma extracelular. Es capaz de inducir la formación de anticuerpos fijadores del complemento. La misma presenta dos sitios de glicosilación bien conservados (80).

Esta glicoproteína presenta un mosaico de determinantes antigénicos específicos de serotipo, así como algunos de reactividad cruzada. Es sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso como una glicoproteína monomérica y en un período corto se une formando un homodímero. Una vez formado este dímero, la glicoproteína es transportada al aparato de Golgi donde sufre modificaciones y de aquí a la superficie celular, liberándose al medio extracelular (77).

La función de NS1 en la replicación viral no ha sido dilucidada, aunque se ha involucrado en la morfogénesis viral. Algunas mutaciones de esta proteína afectan la virulencia de la partícula viral. Se conoce que la célula infectada expresa la proteína en la superficie celular, siendo diana de la citólisis inmunológica, (88) tanto la realizada por células T citotóxicas, como la mediada por anticuerpos específicos contra ella que la hacen blanco de la acción del complemento o de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Por esta razón resulta interesante el uso potencial de la proteína NS1 en la protección del hombre contra la infección por los Flavivirus.

Los estudios realizados por Libraty y colaboradores (89) muestran que es posible correlacionar los niveles elevados de NS1 circulante, encontrados en la fase temprana de la enfermedad con el desarrollo de la forma severa de la enfermedad (FHD).

NS2 está constituida por dos proteínas NS2A y NS2B. NS2A tiene un peso molecular de aproximadamente 22 kD, puede encontrarse atravesando la membrana y además ha sido localizada en posibles sitios de replicación del ARN. Esta proteína puede actuar en el reclutamiento de las copias de ARN por la replicasa unida a la membrana. La proteína NS2B está asociada a la membrana, tiene un peso molecular de 14 kD y presenta una región hidrofílica central conservada, que se encuentra flanqueada por segmentos hidrofóbicos. Forma un complejo con NS3 y es un cofactor requerido para la función de la serina proteasa de NS3. En el dominio central existe una región conservada constituida por 40 aminoácidos que es requerida para la actividad de la proteasa NS2B-NS3 (77, 90-92).

NS3 es la segunda proteína en tamaño del virus con un peso molecular de 70 kD y es altamente conservada entre los Flavivirus. Se piensa que es un componente de la maquinaria enzimática de replicación del ARN viral. La comparación de secuencias nucleotídicas y análisis bioquímicos sugieren que es trifuncional, con actividad de proteasa, helicasa y actividad de ARN trifosfatasa. Esta proteína se asocia a la membrana a través de su interacción con NS2B (93). Se ha demostrado que la misma es la fuente principal de epítomos de células T. El extremo N terminal de NS3 contiene el dominio catalítico de la proteasa NS2B-NS3, parecida a la proteasa serina de las subfamilias de la Tripsina. Se considera que esta enzima participa como proteasa en el clivaje de NS2B, NS3, NS4A y NS5 y del extremo carboxilo de la proteína C (94, 95).

NS4 da origen a NS4A y NS4B, que son proteínas relativamente pequeñas (aproximadamente 16 y 27 kD respectivamente). Teniendo en cuenta la distribución de NS4A y su interacción con NS1, se plantea que NS4A participa en la replicación del ARN, quizás anclando componentes de la replicasa a la membrana celular. NS4B se localiza en sitios de replicación del ARN, pero también aparece dispersa en la membrana citoplasmática y en el núcleo. Esta proteína sufre modificaciones post-traduccionales que aún son desconocidas (77).

NS5 es la última proteína codificada en el largo marco abierto de lectura, tiene un peso molecular de 103 a 104 kD y es una de las más conservadas en los Flavivirus. Es una proteína básica y se cree funciona como ARN polimerasa ARN dependiente, lo que aunque no se ha verificado directamente, se fundamenta en la presencia de una región altamente conservada, característica de este tipo de enzima presente en los virus de ARN de cadena positiva. Además, presenta homología con enzimas metiltransferasas involucradas en la formación de la caperuza del ARN, por lo que probablemente esta proteína participa en la metilación de la caperuza del extremo 5' del ARN viral (77, 96, 97).

## REPLICACIÓN VIRAL.

Los flavivirus pueden replicarse en cultivos celulares de mamíferos, aves y artrópodos. Inicialmente ocurre la unión al receptor celular específico que sigue con la penetración mediante endocitosis y posteriormente el virión es atrapado en una vesícula donde la membrana es fusionada a pH ácido y la nucleocápside es liberada al citoplasma celular. La liberación del ARN y el inicio de la replicación no han sido completamente estudiados. La traducción primaria del ARN mensajero da como resultado una poliproteína que luego de varios clivajes y procesos post-traduccionales da lugar al virión y los componentes replicativos. La replicación del ARN viral puede ser detectado tres horas después de la infección y parece ocurrir en la región perinuclear de la célula infectada asociada con membranas lisas. La replicación del ARN comienza con la síntesis de una cadena negativa complementaria que es

empleada como molde para la síntesis de nuevas moléculas de ARN positivo que pueden ser usadas para la traducción de nuevas poliproteínas, síntesis de cadenas negativas o pueden ser encapsidadas para la formación de nuevos viriones. El ARN de los virus del dengue contiene un marco abierto de lectura para una polimerasa que esta insertada dentro de la membrana del retículo endoplasmático (77, 84, 98, 99).

El ensamblaje de la nucleocápside a partir de la proteína C y el ARN, así como la adquisición de la envoltura, ocurren intracelularmente. Los viriones son llevados en vesículas de transporte que salen de la membrana del retículo endoplasmático y por un mecanismo específico son translocadas al pre-Golgi pasando posteriormente al aparato de Golgi. En las vacuolas de pre y post Golgi opera un transporte exocítico de glicoproteínas de membrana a la superficie celular. La liberación del virus puede ocurrir por fusión de las membranas de la vesícula exocítica con la membrana plasmática o por efecto citopático, a través de rupturas puntuales en la membrana que lo separan del espacio exterior (100).

#### CICLO DE TRANSMISIÓN DEL VIRUS.

El dengue es una enfermedad de transmisión vectorial, siendo el *Aedes aegypti* el vector principal. Dicho mosquito es esencialmente doméstico, de aguas limpias, diurno y antropofílico. Luego de la ingestión de sangre infestada, el mosquito puede transmitir el agente después de un período de 8 a 12 días de incubación extrínseca. La transmisión puede ocurrir de forma mecánica cuando se interrumpe la alimentación y el mosquito se alimenta de inmediato de un hospedero susceptible cercano (101).

Los virus del dengue persisten en la naturaleza mediante un ciclo de transmisión hombre-mosquito-hombre, aunque existe un ciclo selvático (68, 102, 103). El ciclo de transmisión selvático ha sido demostrado en Asia, principalmente entre especies de monos *Presbytis* y *Macaca* principalmente a través de mosquitos del género *Ochlerotatus*. También, ha sido demostrado en África, con los monos *Erythrocebus patas* y varios vectores selváticos incluyendo *Aedes taylori-furcifer*, *Aedes leuteocephalus* y *Aedes opok* (67).

#### CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD.

El dengue se manifiesta como una enfermedad infecciosa aguda, caracterizada por un amplio espectro de manifestaciones clínicas que oscilan desde formas leves de fiebre indiferenciada hasta formas graves con hemorragia y choque (104, 105).

La FD se considera una enfermedad autolimitada y raramente fatal. La convalecencia puede prolongarse a varias semanas, asociándose a depresión y debilidad fundamentalmente en adultos, aunque no existen evidencias de secuelas permanentes posterior a la infección (5, 106). La FD se caracteriza por la presencia de fiebre alta de inicio abrupto, cefalea severa, dolor retro-orbital, mialgias, artralgias, náuseas y erupción. Clínicamente la enfermedad se manifiesta después de un período de incubación que oscila entre tres y siete días, al cabo de los cuales comienzan a evidenciarse los primeros síntomas. La fiebre entre 38 y 39°C se mantiene de dos a siete días, desciende y reaparece. La erupción es variable y se presenta tempranamente en el 50 % de los pacientes, el enrojecimiento facial puede coincidir con la fiebre y desaparece generalmente entre el primero y el segundo día de instalado el signo. Una segunda erupción comienza entre el segundo y sexto día, variando de la forma máculopapular a la escarlatiforme, distribuyéndose en el tronco, las extremidades y apareciendo en zonas en las que se alterna un patrón eritematoso con áreas de piel normal. Las pruebas de laboratorio muestran neutropenia con linfocitosis, en ocasiones linfocitos atípicos, las enzimas hepáticas pueden elevarse de forma ligera en algunos pacientes (107, 108).

Aunque las manifestaciones hemorrágicas no son frecuentes, puede observarse sangramiento gingival, hematuria indicando la afectación del sistema genito-urinario e hipermenorrea por daño del sistema ginecológico así como lesiones petequiales y purpúricas en la piel; la trombocitopenia también ha sido reportada en algunos casos (109).

En la FHD sin choque, las manifestaciones clínicas son semejantes a las de la FD. La epigastralgia, la sensibilidad en el reborde costal derecho y el dolor abdominal son comunes. La temperatura es alta del segundo al séptimo día y posteriormente baja a nivel normal o subnormal, en ocasiones sube a 40°C o más y puede acompañarse de convulsiones febriles. La manifestación hemorrágica más común es una prueba del torniquete positiva. Un paciente es clasificado como caso de FHD sí, además de fiebre y hemorragia, presenta trombocitopenia (conteo plaquetario menor de 100 000 plaquetas/mm<sup>3</sup>) y hemoconcentración (aumento del hematocrito en un 20 % ó más). Pueden observarse la presencia de ascitis y el derrame pleural, como signos de hemoconcentración (5, 107, 108, 110).

En muchos casos se observan hemorragias en los sitios de venipunción. En la etapa inicial podemos ver petequias finas diseminadas por las extremidades, las axilas, la cara y el paladar blando. Puede verse erupción maculopapular al principio y al final de la enfermedad. Puede existir hepatomegalia de dos a cuatro centímetros, dolorosa a la palpación. La esplenomegalia es infrecuente en lactantes, pero a veces se observa un marcado aumento del bazo en la radiografía. Después de esta etapa viene la rápida recuperación que puede ser espontánea o seguida del tratamiento adecuado con fluidos (líquidos y electrolitos) (5, 65, 107, 111).

En la FHD/SCD se produce un deterioro súbito del paciente luego de una fiebre de corta duración, la temperatura desciende y más tarde entre el tercero y el séptimo día aparecen los signos indicadores de la insuficiencia del sistema circulatorio, constatándose frialdad de la piel y congestión, es frecuente la cianosis peri-labial y el pulso débil pero acelerado. Los pacientes aunque letárgicos se muestran inquietos. Con la entrada al estado de choque crítico, la tensión arterial desciende (20 mm Hg ó 2,7 kPa o inferior) la piel se nota fría y húmeda (112).

Los pacientes con FHD/SCD están en peligro de muerte, si no se les administra de inmediato el tratamiento adecuado. La mayoría de los casos se mantienen conscientes casi hasta la etapa final. La duración del choque es corta, el paciente puede morir de 12 a 24 horas o recuperarse con rapidez después del tratamiento. El choque no corregido puede llevar a la acidosis metabólica, hemorragia grave del aparato digestivo o cualquier otro órgano con un pronóstico desfavorable. En estos pacientes puede aparecer encefalopatía por alteraciones metabólicas y electrolíticas (2, 5, 65, 107).

La convalecencia en la FHD con o sin choque suele ser corta, aún en casos de choque profundo. Una vez corregido éste, los pacientes se recuperan entre 48 a 72 horas. En la convalecencia es común la bradicardia o las arritmias sinusales y una característica erupción petequial. En la FHD, el rango de síntomas neurológicos va desde irritabilidad y depresión hasta encefalitis y muerte (113). La encefalopatía en la FHD puede resultar de la anoxia cerebral, edema, hemorragia intracraneal y oclusión de los vasos. Existe una controversia acerca de si los virus del dengue producen una enfermedad neurológica, como una complicación no específica o invaden directamente el cerebro de la misma forma que otros Flavivirus como la encefalitis Japonesa y la encefalitis de San Luis (114)

## INMUNOPATOGENIA Y RESPUESTA INMUNE.

La respuesta inmune a la infección por los virus del dengue puede estar asociada tanto a la prevención y recuperación como a la inmunopatología de la FHD/SCD (115). La infección con un serotipo de dengue brinda inmunidad homóloga de larga duración, pero solamente hay protección cruzada transitoria contra el resto de los serotipos, por lo que el individuo que se

infectó primariamente en breve será susceptible a una infección secundaria por otro serotipo. Se ha comprobado que el desarrollo de la forma severa de la enfermedad, en un alto porcentaje de los casos, está relacionada con la presencia de anticuerpos heterotípicos debido a una infección anterior, de esta manera se han encontrado niños pequeños con anticuerpos maternos que han desarrollado FHD. Sin embargo, esto no es una regla, ya que la FHD se presenta aunque en un porcentaje menor, en pacientes con infección primaria. Por otra parte, de los pacientes que sufren una infección secundaria solamente una fracción relativamente pequeña (2-6 %) desarrolla FHD (16, 116).

Mediante diversos experimentos realizados *in vitro* se han constatado varias funciones de la respuesta inmune humoral generada contra los virus del dengue como son: la ADA (9), la neutralización (117), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (118) y la citólisis mediada por complemento (119). De esta forma la infección primaria por un serotipo determinado, origina anticuerpos capaces de neutralizar a los virus homólogos y por tanto deben proteger al individuo a largo plazo; pero igualmente origina anticuerpos neutralizantes heterólogos de corta duración, responsables del efecto de ADA (18).

La ADA es un fenómeno serológico demostrado *in vitro*, donde la infección viral de células susceptibles es modificada por la adición de anticuerpos que reconocen al virus. Este fenómeno podría estar relacionado con los procesos inmunopatológicos que ocurren *in vivo* (120). Los anticuerpos heterólogos formados durante la infección primaria, en concentraciones subneutralizantes son capaces de reconocer epítopes presentes en el virus que ocasiona la infección secundaria y pueden formar inmunocomplejos con el virus y facilitar la entrada a las células mononucleares. La infección se amplifica ya que los inmunocomplejos infecciosos pueden acceder con más facilidad a los receptores para Fc de los monocitos, provocando que un mayor número de células sean infectadas (18, 121).

La importancia de la ADA en el desarrollo de la FHD/SCD ha sido sustentada fundamentalmente por experiencias epidemiológicas (25, 122, 123).

Los anticuerpos son considerados el mecanismo más importante de protección en la infección por los virus del dengue; no obstante el cambio de los isotipos y el desarrollo de células de memoria son eventos dependientes de linfocitos T (124). Ante la infección primaria con un serotipo de los virus del dengue se genera un patrón linfocitario heterogéneo en el que se encuentran tanto los linfocitos T de memoria serotipo-específicos como los de reactividad cruzada. Ambos linfocitos juegan un papel importante en el desarrollo de la FHD/SCD y en la inmunopatogénesis de la enfermedad (4, 125).

Se ha observado que la respuesta es mayor contra el serotipo homólogo; sin embargo, después de una infección secundaria con uno de los virus del dengue los linfocitos T de memoria inducidos por la infección primaria muestran reactividad cruzada y proliferan rápidamente. Específicamente en Cuba, los estudios de Sierra y colaboradores muestran esta reactividad cruzada a 20 años de haber ocurrido la primera infección (115, 126, 127).

Las células T CD4+ y CD8+ de memoria son muy activas y de reactividad cruzada pudiendo contribuir con la patogénesis de la FHD/SCD. El desarrollo de anticuerpos que tienen reacción cruzada con el plasminógeno (debido a la similitud en una secuencia de 20 aminoácidos con la glicoproteína E del DEN y una familia de factores coagulantes), pueden tener relación con la causa de hemorragia en la FHD (128).

Una mayor destrucción de las plaquetas o una disminución en su producción pudieran ser la causa de la trombocitopenia. En este sentido, se ha detectado la presencia de complejos virus-anticuerpos en la superficie de las plaquetas de pacientes con FHD, lo que sugiere que la respuesta inmune desempeña algún papel en la destrucción de las plaquetas. En este sentido, se ha encontrado la presencia de anticuerpos IgM de reactividad cruzada contra las plaquetas

en los sueros de pacientes con FHD que podrían causar lisis de estas y por tanto estar involucrados en la patogénesis de la enfermedad (129).

La activación del complemento también pudiera estar involucrada en la patogénesis de la filtración capilar en la FHD. La cascada del complemento podría ser activada por los complejos inmunes formados por los virus circulantes y los anticuerpos específicos contra estos (130).

Otros autores han considerado que las formas graves de la enfermedad son el resultado de la infección por cepas muy virulentas de los virus del dengue (131, 132). Tales cepas podrían ser originadas en circunstancias de hiperendemicidad y circulación concomitante de múltiples serotipos virales y presentar mutaciones producto de sucesivas replications en hospederos filogenéticamente tan distintos, como hombre y artrópodo. Según esta hipótesis no sería necesaria una infección previa para desarrollar FHD/SCD. En tal sentido existen ejemplos, aunque escasos, de epidemias severas ocurridas en poblaciones primo infectadas (131, 132). Ciertamente, existen algunas evidencias que apuntan hacia la existencia de cepas con mayor o menor potencial virulento. Un ejemplo es la cepa DEN-2 (Genotipo Americano) que provocó la epidemia de Iquitos, Perú en 1995 en una población inmune a DEN-1 y no se reportó un solo caso de DHF (133, 134). Por el contrario la epidemia Cubana de 1981, provocada igualmente por una cepa de DEN-2, pero Genotipo Asiático, en el mismo contexto inmunológico (personas inmunes a DEN-1) ocasionó una epidemia extremadamente severa (8).

Leitmeyer y colaboradores (62) encontraron diferencias estructurales entre cepas de DEN2 de origen asiático y americano que pueden tener influencia sobre la virulencia y/o la patogenicidad de estas cepas. De acuerdo con las evidencias encontradas por estos autores (62), los determinantes principales de la severidad se encuentran en el aminoácido 390 de la proteína E que puede afectar la unión a la célula hospedera; los nucleótidos del 68 al 80 del lazo de la región 5' no codificadora, que podrían estar involucrados en la iniciación de la traducción; y en los primeros 300 nucleótidos de la región no codificadora 3', que pudieran participar en la regulación de la replicación viral.

De esta forma se postula que los virus del dengue del genotipo Americano podrían replicarse pobremente in vivo produciendo una enfermedad poco severa. Otros estudios apoyan esta hipótesis comprobando que un cambio en el aminoácido 390 de la proteína E afecta la neurovirulencia en ratones (135). Adicionalmente, Pryor y colaboradores (136) construyeron un DEN-2 recombinante con sustituciones en el residuo 390 de dicha proteína. La sustitución de N (genotipo Asiático) por D (genotipo Americano) resultó en una disminución en la habilidad para replicarse en monocitos humanos. Por otra parte, empleando un clon infeccioso de dengue, en el cual se sustituyó el aminoácido 390 se comprobó que dicho cambio tenía influencia sobre la replicación viral en monocitos humanos y células dendríticas (137).

Otros estudios recientes sugieren que hay diferencias en la habilidad de algunas cepas virales para unirse e infectar células diana y en su capacidad para generar una mayor progenie viral in vitro (138). Por otra parte, una mayor carga viral en las etapas iniciales de la infección viene aparejado con las formas más severas de la enfermedad, lo que podría estar dado por factores virales (139).

Estos resultados sugieren un papel esencial para la virulencia en la patogénesis de la FHD/SCD. Sin embargo, la falta de un modelo animal apropiado para reproducir la enfermedad del dengue ha dificultado un conocimiento más profundo de los efectos de la virulencia in vivo.

Actualmente, la mayoría de los autores acepta que existe una vinculación de muchos factores de riesgo donde se involucran los dependientes del hospedero, el vector, los factores epidemiológicos y ecológicos. Sin embargo, desde 1987 ya había sido planteada por Kourí y colaboradores la denominada hipótesis integral (8). En el citado artículo, tomando en cuenta la experiencia Cubana en FHD, así como las observaciones de otros países afectados por la

enfermedad, se le da un carácter multifactorial al desarrollo de la forma grave de esta enfermedad.

Poco se sabe aún acerca de qué tipo de hospedero y cuáles factores virus específicos, determinan por qué ciertos individuos solamente desarrollan FD mientras que otros FHD. Los factores de riesgo individuales tales como el sexo, la raza, la edad, estado nutricional, genético, las enfermedades crónicas como asma, diabetes y anemia drepanocítica hacen la enfermedad más frecuente en ciertos grupos poblacionales (58, 140, 141).

## DIAGNÓSTICO DE DENGUE.

### Muestras utilizadas en el diagnóstico.

Para el aislamiento del agente causal del dengue se recomienda la toma de muestras de sangre durante el período febril y sobre todo antes del quinto día de comienzo de la enfermedad. En los casos fallecidos, se pueden utilizar muestras frescas de tejidos (hígado, bazo, nódulos linfáticos, sangre del ventrículo) las que son homogenizadas y procesadas según el sistema diagnóstico a emplear. Además se pueden utilizar muestras de tejidos fijadas en formalina e incluidas en parafina para la detección de antígenos virales, con la utilización de métodos inmunohistoquímicos o la detección del genoma viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés) (142-144).

Para el diagnóstico serológico a partir de la determinación de anticuerpos IgM, se recomienda la toma de la muestra de suero después del quinto día de comienzo de los síntomas. Mientras que para determinar el incremento en título o la seroconversión de anticuerpos IgG se utilizan muestras pareadas de sueros (tomadas en los primeros siete días de comienzo de los síntomas y 14 a 21 días después). Adicionalmente, se ha demostrado la utilidad de las muestras de sangre seca sobre el papel de filtro, tanto para la detección de anticuerpos IgM como IgG específicos contra los virus del dengue; así como la utilidad de la saliva para la detección de dichos anticuerpos, IgM e IgG (145).

### Aislamiento viral.

Existen varios sistemas disponibles para el aislamiento viral: los ratones recién nacidos inoculados por la vía intracerebral, en los que la infección produce parálisis y otros signos de afectación del sistema nervioso central; los cultivos celulares, tanto líneas de mamíferos (Vero, LLCMK2 y BHK-21) como de mosquitos (C6/36 HT, AP-61 ) siendo estas últimas las más sensibles y por último los mosquitos del género *Aedes albopictus* y *Toxorhynchites amboinensis* han demostrado ser de gran utilidad en el aislamiento de estos agentes. Los cultivos celulares de mosquitos son el sistema de elección para diagnóstico de rutina del dengue, por su adecuada sensibilidad y la posibilidad de procesar un elevado número de muestras a relativamente bajo costo (143).

### Identificación viral.

Para la identificación viral se utiliza la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Henchal y colaboradores (146) han desarrollado anticuerpos monoclonales específicos de grupo (Flavivirus), complejo (dengue), subcomplejo y tipo. La identificación en la siembra primaria es en algunos casos imposible, por lo que se necesitan uno o dos pases en el mismo sistema celular con el objetivo de incrementar la concentración viral.

La utilización de un anticuerpo policlonal (líquido ascítico hiperinmune de ratón o un suero humano de alto título de anticuerpos contra los virus del dengue) permite realizar un pesquijaje inicial para detectar las muestras positivas mediante IFI. Un segundo ensayo, con la utilización de anticuerpos monoclonales específicos para cada uno de los cuatro serotipos del virus, permite la tipificación (147).

### Diagnóstico serológico.

El diagnóstico serológico del dengue es complicado, por causa de los determinantes antigénicos de reactividad cruzada compartidos entre los cuatro serotipos y los Flavivirus en general. Por otra parte, considerando los elevados niveles de anticuerpos observados en los individuos que desarrollan una infección de tipo secundaria, el estudio de monosueros tomados en la fase aguda o en la convalescente temprana puede ser de utilidad como criterio de caso probable o presuntivo de dengue (142).

Los virus del dengue son capaces de aglutinar los glóbulos rojos de ganso; esto ha permitido que la técnica de inhibición de la hemaglutinación sea aplicada en el estudio serológico de monosueros y pares de sueros, con la utilización de antígenos de los cuatro serotipos producidos en cerebro de ratón lactante y extraídos mediante el método de sacarosa-acetona (148).

La prueba de neutralización por reducción de placas es un ensayo sensible y específico, que permite la detección de anticuerpos neutralizantes. Se ha planteado que en un individuo con una infección de tipo secundaria, el título de anticuerpos neutralizantes al primer serotipo que produjo la infección primaria, es anamnesticamente mayor que contra el serotipo infectante durante la segunda infección (“fenómeno del pecado original”). La prueba de neutralización por reducción de placas es considerada de gran utilidad en estudios seroepidemiológicos por su elevada especificidad, lo que permite identificar el serotipo causante de una infección pasada. También ha sido utilizada en la identificación de los virus del dengue (142).

En los últimos años se han desarrollado diferentes sistemas ELISA para el diagnóstico del dengue. Estos sistemas son económicos, rápidos, fáciles de ejecutar y muestran a su vez elevada sensibilidad y especificidad cruzada, por lo que son gran utilidad como pruebas de “tamizaje”. Todas estas características permiten que puedan ser utilizados para determinar la presencia de anticuerpos totales anti-flavivirus en estudios seroepidemiológicos y en el diagnóstico serológico (149-151).

El ELISA de captura de IgM ha constituido uno de los sistemas más importantes y útiles para el diagnóstico y la vigilancia del dengue. Los anticuerpos IgM anti-dengue se producen transitoriamente durante las infecciones primaria y secundaria y su detección indica una infección activa o reciente por dengue. La detección de anticuerpos IgM se ha convertido en una herramienta de incalculable valor para la vigilancia del dengue y resulta el método de elección en la mayoría de los laboratorios (142, 144).

Recientemente se ha desarrollado un sistema visual de tira reactiva que se basa en una cromatografía (PanBio, Australia), el cual permite la detección de anticuerpos IgM en menos de 5 min. Dicho sistema muestra niveles de sensibilidad y especificidad de 99 y 96%, respectivamente (152-154).

Otro sistema que ha sido ampliamente utilizado en el diagnóstico es el ELISA de Inhibición, que permite detectar la presencia de inmunoglobulinas totales contra los virus del dengue, así como determinar los títulos de anticuerpos (149, 155).

### Detección molecular.

La hibridación de ácidos nucleicos ha sido aplicada tanto en el diagnóstico como en los estudios epidemiológicos (156). Por ejemplo se han realizado ensayos a partir del ARN extraído de células infectadas con el virus o de homogenizados de mosquitos *Aedes albopictus* infectados, utilizando para la hibridación sondas específicas biotiniladas o radiactivas marcadas con  $^{32}\text{P}$ . La detección utilizando sondas biotiniladas es menos sensible que la que utiliza sondas radiactivas y no es de gran utilidad en la identificación directa del virus en muestras clínicas, a menos que se haya realizado una amplificación previa del material genético (156).

La PCR ha sido ampliamente difundida y utilizada en el diagnóstico del dengue debido a la rapidez con que se obtienen los resultados, pudiéndose detectar el ácido nucleico viral de forma directa en muestras de suero, células infectadas, sobrenadantes celulares y en larvas infectadas, así como en muestras de tejidos frescos y embebidas en parafina tomadas de fallecidos por FHD (24, 157). A su vez, tiene como ventaja que permite determinar la presencia de infecciones concurrentes por dos serotipos (158). Lanciotti y colaboradores (159), desarrollaron una PCR rápida con la utilización de cebadores consenso localizados en los genes C y prM. La primera PCR produce un fragmento de 511 pb, la cual es seguida de una PCR anidada utilizando cebadores específicos para cada serotipo.

La PCR también es extremadamente útil en el estudio genómico de cepas, ya sea a través del análisis de los patrones obtenidos luego de la digestión con enzimas de restricción o mediante la secuenciación nucleotídica de los productos de PCR (23, 160, 161).

#### La Bioinformática como herramienta esencial en estudios de dengue en la era de la genómica y la proteómica.

La Bioinformática es el campo de la ciencia en donde la biología, la informática (computación) y la tecnología se fusionan en una sola disciplina. La meta: el descubrimiento de nuevas “penetraciones” biológicas así como la creación de una perspectiva global que permita analizar los principios de unificación en Biología y Salud. Dentro de la bioinformática, existen tres subdisciplinas: a) El desarrollo de nuevos algoritmos y estadísticas para establecer relaciones entre miembros de grandes grupos de datos. b) El análisis y la interpretación de varios tipos de datos incluyendo secuencias de nucleótidos y aminoácidos, dominios proteicos y estructuras de proteínas. c) El desarrollo y la implementación de herramientas que permitan acceso y manejo eficientes de diferentes tipos de información.

Los avances de la biología molecular permiten la generación de una gran cantidad de información cuyo análisis requiere el uso de herramientas de cálculo altamente especializadas. Desarrollar estas herramientas tiene por nombre bioinformática y es considerada una de las grandes revoluciones en la biología y la computación. La bioinformática, ha tenido expansión notoria en sus aplicaciones los últimos cinco años. Esta disciplina está siendo aplicada en problemas que implican evaluar y entender la dispersión y la variación de marcadores genéticos, modelaje molecular, genómica, proteómica, y minería de datos biológicos. Se pueden citar ejemplos de aplicaciones en medicina forense, antropología, manejo y control de plagas, conservación, desarrollo de vacunas y drogas, mejoramiento genético de animales y plantas, entre otros.

Nuestro país ha contado con pocos recursos bien formados que permitan realmente abordar los problemas genéticos poblacionales y de sistemática molecular relacionados con áreas como la epidemiología, la conservación y manejo de la biodiversidad, la biotecnología y las ciencias biomédicas en general (Zeeberg et al, 2003).

La bioinformática como una nueva área de conocimiento científico en biotecnología se ha desarrollado a partir de los avances en la genética y la biología molecular. Gracias a la

secuenciación de genomas completos este avance ha sido espectacular en la última década del siglo XX, abriéndose la llamada era de la genómica y la proteómica en los estudios biológicos y tecnológicos relativos al ser humano. Tanto genómica como proteómica, como genética y biología molecular, necesitan como herramienta fundamental de la bioinformática, que emplea tecnologías informáticas y computacionales para desarrollar métodos, estrategias y/o programas que permitan ordenar, manejar y estudiar la cantidad inmensa de datos biológicos que se han generado y se generan en la actualidad (Bussey et al, 2003; Jain, 2003).

[www.inmuno.org/pdf/bioinformatica.pdf](http://www.inmuno.org/pdf/bioinformatica.pdf)

### DengueNet.

Con el crecimiento explosivo de Internet y la terminación de la primera fase del Proyecto Genoma Humano, se está apreciando una tendencia, que corre en paralelo a la del comercio electrónico en otras áreas de actividad, consistente en la aparición de portales en Internet para facilitar el acceso de los investigadores a datos genéticos y a herramientas bioinformáticas. También en el ámbito del diagnóstico genético existen iniciativas para desarrollar servicios de teleconsulta mediante biochips a través de Internet o de captación de material genético de pacientes para la investigación desde portales médicos en Internet. Ya hay quien prevé que, dentro de pocos años, una persona podrá pedir su perfil genético en un laboratorio, obtenerlo en un CD-ROM y contrastarlo vía web con librerías genéticas que podrán informarle acerca de su predisposición a padecer ciertas enfermedades o de los fármacos a los que presente mejor tolerancia.

En relación al estudio del dengue los investigadores han creado un portal para documentar y dar seguimiento a los estudios que se hacen, se han hecho y se harán en relación a esta enfermedad, DENGUNET. En este portal se describen las iniciativas más importantes existentes en esta área, así como su posible interacción con los enfoques e-salud (se habla de e-salud para referirse a la aplicación de los principios del comercio electrónico en la prestación de servicios e información sobre salud) para tratar de avanzar en una medicina del dengue más individualizada, contemplando también los potenciales riesgos asociados en los ámbitos sociales, éticos y legales.

<http://oms.b3e.jussieu.fr/DengueNet/>

### Diseño de primers.

Las bases teóricas de la reacción de PCR son simples. En la reacción intervienen tres segmentos de ADN : el segmento de doble cadena que queremos amplificar, y dos pequeños fragmentos de cadena sencilla, los oligonucleótidos o primers, cebadores, iniciadores u oligos, que tienen la misma secuencia que los extremos flanqueantes del ADN molde. Además, participan en la reacción, la enzima Taq polimerasa (Taq), los deoxinucleótidos-trifosfato (dNTPs), sales, y un tampón o regulador. Los oligos se añaden a la reacción en exceso con respecto al ADN que desea amplificarse. Los oligos hibridarán con las regiones complementarias del ADN, quedando orientados con sus extremos 3' enfrentados, de modo que la síntesis mediante la ADN polimerasa (que cataliza el crecimiento de nuevas cadenas 5' - 3') se extiende a lo largo del segmento de ADN que queda entre ellas.

Parte importante de los estudios bioinformáticos aplicados en el estudio del dengue es el diseño de primers. Como se ha mencionado, los primers consisten en una secuencia de nucleótidos modelo, que son fragmentos complementarios que se van a unir a un sitio específico de una cadena de DNA.

Aunque es necesario optimizar muchas variables en el diseño de procedimientos basados en PCR para cada una de sus aplicaciones, el parámetro más crítico en todos los casos es el diseño correcto de los primers para la reacción misma de PCR. De hecho, la elección correcta de los primers frecuentemente dicta el éxito o el fracaso de las amplificaciones. Por lo tanto el diseño cuidadoso de los primers puede ahorrar tiempo de investigación muy valioso, y en adición puede permitir el ahorro significativo de costos ya que los primers generalmente representan el componente más caro en el PCR.

Una de las principales consideraciones que se debe de hacer es el diseño de un protocolo para obtener un único producto específico de acuerdo al diseño de los primers. Después de asegurar la especificidad, la manipulación del diseño de los primers es posible.

La mayor parte de las reglas para el diseño de primers es empírica y no está garantizado su éxito. Sin embargo seguir estas reglas aumenta significativamente la probabilidad de éxito en el PCR. Los programas de computación en especial son muy útiles en el diseño de primers.

#### Reglas Generales para el diseño de primers.

El éxito en el diseño de primers radica principalmente en la temperatura de alineamiento para la alta especificidad y alta eficiencia. Esto asegura que solamente el producto deseado se sintetice. El problema de no especificidad en las amplificaciones se intensifica durante los primeros ciclos cuando las cantidades de DNA blanco son muy bajas, el cual está frecuentemente inmerso en un exceso de secuencias no específicas. Por lo tanto las temperaturas de alineamiento son muy importantes para asegurar un error pequeño durante la amplificación. (Sharrocks 1994). Algunos parámetros se deben de tomar en cuenta cuidadosamente para asegurar el alineamiento correcto:

<u>Parámetro</u>	<u>Valores óptimos</u>
1. Secuencia única de oligonucleótidos	
2. Presencia de pares G-C en el extremo 3'	1-2 G/C nucleótidos
3. No complementariedad de bases	≤ 3 bases continuas
4. No complementariedad a la contraparte antisentido	≤ 3 bases continuas
5. Distribución y composición de bases al azar	45-55% contenido de G/C
6. Longitud del primer	18-25 bases
7. T <sub>m</sub> s del Juego de Primers	
8. Distancia y composición intraprimer de la secuencia	100-600 bases uno del otro

En general el primer punto corresponde a la elección de los primers que tienen una secuencia única dentro de la región que se amplificará. Lo más importante es checar la región del extremo 3' del primer ya que es donde inicia la síntesis del producto de PCR. Este procedimiento es muy tedioso si se hace a mano pero se facilita por el uso de algún programa. La segunda parte del procedimiento es asegurar la inclusión de un residuo G/C en el extremo 3' del primer. Este par G/C ayuda a asegurar el alineamiento correcto en el extremo 3' debido a la unión fuerte del hidrógeno utilizado por los pares de bases G/C.

Los primers también se deben de diseñar con ausencia de homología dentro de la secuencia ya que el doblamiento del primer sobre sí mismo pudiese hacer al primer incapaz de hibridar con el

templado. Una regla general es que no debe haber cuatro bases contiguas que tengan homología en el primer. Un parámetro relacionado es que los primers no deben mostrar homología con su contraparte antisentido. La formación de híbridos parciales entre pares de bases puede permitir la formación de dímeros de los primers en el PCR. La eliminación de este artefacto es esencial. Particular cuidado debe nuevamente tomarse en remover cualquier complementariedad entre los extremos 3' de dos primers.

La composición de bases debe también ser monitoreado de manera cercana. En general el contenido de G/C debe estar entre el 45 y 55 por ciento para que la unión específica directa permita el alineamiento eficiente durante el PCR. Esfuerzos deben hacerse para mantener la composición de bases cercanas a aquella exhibida por la región amplificada. Así mismo, la distribución de bases de los primers debe ser al azar, con la eliminación de secuencias con poli purinas y poli pirimidinas. Los repetidos de secuencias de nucleótidos también deben evitarse en el diseño de primers. La parte blanco de la parte de la secuencia específica debe ser idealmente entre 18 y 25 bases de largo. También es importante tener pares de primers con temperaturas de alineamiento similares ( $T_m$ ). Esto se puede calcular con exactitud usando el método del vecino más cercano con la fórmula  $T_{m\text{primer}} = \Delta H / [\Delta S + R \ln(c/4)] - 273.15^\circ\text{C} + 16.6 \log_{10}[K^-]$  donde  $\Delta H$  y  $\Delta S$  son la entalpía y entropía para la formación de la hélice, respectivamente,  $r$  es la constante molar de los gases, y  $c$  es la concentración de la sonda (cadena exploradora de nucleótidos). Sin embargo las  $T_m$ s se pueden calcular aproximadamente manualmente usando la fórmula  $T_m = 2AT + 4GC$  (Suggs et al. 1981). Una igualdad en las  $T_m$ s asegura alineamientos simultáneos de los primers. La  $T_m$  calculada puede entonces ser incorporada en el protocolo de PCR para optimizar la unión específica. Esto se puede explotar cuando dos grupos de pares de primers con diferentes  $T_m$ s son usados en un solo PCR para amplificar diferentes fragmentos específicos. Un parámetro adicional que puede ser incorporado en el diseño de primers es asegurar que la  $T_m$  de las regiones amplificadas entre los primers es lo suficientemente baja para asegurar el 100% de alineamiento a  $92^\circ\text{C}$ . Esto puede ser calculado usando la fórmula  $T_m = 81.5 + 16.6 (\log_{10}[K^+]) + 0.41(\%G+C) - 675/\text{longitud}$ . Esto se reduce a:  $T_m = 59.9 + 0.41(\%G+C) - 675/\text{longitud}$ , en las condiciones estándares de PCR.

En consecuencia a los parámetros mencionados arriba, el diseño de primers para la PCR ayuda a asegurar la especificidad de los productos. Tal especificidad es esencial en la aplicación donde el DNA no blanco está en exceso comparado con el DNA blanco (Chen et al, 2002; Kaderali et al, 2003; Baliga, 2001).

(Ver [http://www.afigen.com/espanol/2\\_biologia\\_molecular/calculo\\_oligos.htm](http://www.afigen.com/espanol/2_biologia_molecular/calculo_oligos.htm),  
<http://www.umdj.edu/~humayun/Oligo.html>,  
<http://www.gensetoligos.com/Calculation/calculation.html>)

### Diseño de primers utilizando las herramientas de la bioinformática y los programas de computadora.

El diseño de primers para PCR se basa en una serie de parámetros que mencionamos anteriormente. Contempla una serie de consideraciones empíricas para su diseño en aplicaciones específicas o modificación de productos. Como ya se ha visto, muchos de los parámetros pueden ser determinados manualmente. Sin embargo, es extremadamente laborioso y se consume mucho tiempo para optimizar todos los parámetros básicos para la selección de pares de primers. Algunos programas computacionales están disponibles para facilitar este análisis. Estos programas buscan primers basados en el tamaño óptimo y  $T_m$ s exactas calculadas usando el método del vecino más cercano. Búsquedas adicionales se hacen

para eliminar primers que tengan composición de bases no-estándares y que sean capaces de formar rizos. Se da una especial atención ha que sean secuencias únicas dentro del DNA blanco, teniendo cuidado para asegurar alineamientos estables y específicos en el extremo 3' del primer al DNA. Una vez que los primers están disponibles se seleccionan pares que empatan y que tienen una Tms compatible, tienen un espacio correcto y es deseable que no formen dímeros. (Breslauer et al., 1986).

A manera de referencia, el programa OLIGO (National BioSciences Inc.) es un paquete que puede ser usado para el diseño general de oligonucleótidos y también para la selección de pares de primers. Se encuentra disponible en sistemas Macintosh y PC. Las versiones de ambas plataformas son programas amigables que llevan a cabo todos los comandos básicos en el diseño de primers. Así mismo este programa calcula las temperaturas de alineamiento para las reacciones de PCR, tomando en cuenta la estabilidad de los productos de PCR también como los valores de Tm y optimizando estos parámetros puede aumentar la especificidad y la producción del amplificado. La versión para PC de OLIGO también tiene ventajas adicionales de traducir secuencias de proteínas de regreso. Esto puede facilitar el diseño de oligonucleótidos degenerado usados en el clonaje.

Otros paquetes similares y que resultan interesantes y muy útiles en este tipo de aplicaciones son: PCGene, GCG, Vector NTI, DNASTAR, BioEdit.

(Ver [http://www.philscience.co.kr/oligo/Oligo\\_6\\_tour.htm](http://www.philscience.co.kr/oligo/Oligo_6_tour.htm)  
[http://www.oligo.net/oligo\\_6\\_tour.htm](http://www.oligo.net/oligo_6_tour.htm)  
<http://www.accelrys.com/about/gcg.html>  
[http://www.accelrys.com/products/gcg\\_wisconsin\\_package/index.html](http://www.accelrys.com/products/gcg_wisconsin_package/index.html)  
<http://www.informaxinc.com/>  
<http://www.imb-jena.de/RNA.html>  
<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>  
<http://www.dnastar.com/>)

### Detección antigénica.

Un método alternativo para el diagnóstico rápido del dengue es la detección directa del antígeno viral en el suero del paciente o en muestras de tejidos de fallecidos, con la utilización de sistemas inmunoenzimáticos y técnicas inmunohistoquímicas. En general los sistemas inmunoenzimáticos diseñados para detección de antígeno viral muestran baja sensibilidad, sobre todo cuando se estudian muestras procedentes de individuos que sufren una segunda infección por dengue (162). En este sentido, Young y colaboradores (163) sugirieron que la detección de la proteína NS1 en suero de los pacientes pudiera servir como un marcador para medir la viremia.

## GENÉTICA EVOLUTIVA DE LOS VIRUS DEL DENGUE.

### Definición de evolución.

Un cambio evolutivo es un proceso temporal derivado del éxito reproductivo diferencial de los individuos y su fenotipo heredado, que altera el genotipo correspondiente entre las distintas generaciones (164). La evolución es por tanto algo inevitable en poblaciones de entidades que: a) se auto-repican y b) exhiben variaciones heredables en el fenotipo que afectan la reproducción (164).

Los virus del dengue, que se replican de manera autónoma y que pueden exhibir profundos grados de variación fenotípica con base genotípica, están por supuesto sometidos a las leyes

de la evolución. Los virus de hecho, usan los cambios evolutivos como estrategias de supervivencia a corto y largo plazo, lo que les permite “escapar” de la respuesta antiviral del hospedero, frecuentemente a través de condiciones impredecibles. Sin embargo, esto no quiere decir que los virus obligatoriamente tienen que evolucionar rápidamente para existir. Muchos virus cambian muy poco entre generaciones debido a una baja frecuencia de mutación (68).

### Proceso de evolución.

#### Variación natural.

La variación que ocurre naturalmente como diversidad fenotípica derivada genéticamente es un requisito evolutivo característico de las poblaciones. Esta variación tiene muchas bases pero las dos causas primarias de la diversidad genética viral son las mutaciones (incluyendo el intercambio genético) y el tamaño poblacional. En la medida en que las dos aumentan, también lo hace el espectro de características disponibles para ser heredadas por los descendientes virales (164).

La magnitud de esta variación difiere extraordinariamente entre los tipos virales. Muchos virus ARN, por ejemplo los virus del dengue, existen como quasiespecies, que son con frecuencia una amplia distribución de genomas virales mutantes, existiendo como una población dentro de un hospedero simple (165). Para los virus del dengue se han estimado tasas de sustitución nucleotídica en un rango de  $4.55 \times 10^{-4}$  a  $11.58 \times 10^{-4}$  sustituciones por sitio por año (166), lo que se traduce en una elevada heterogeneidad genética observable en aislamientos del virus.

#### Selección Natural.

La selección natural es una fuerza discriminante que permite la producción y supervivencia de una progenie a partir de una población parental. Esta selectividad es manejada por condiciones bióticas y abióticas específicas, bajo las cuales existe la población. Los fenotipos heredables apropiados para la reproducción, bajo estas condiciones, son los “permitidos” para ser transmitidos a una generación subsiguiente.

Se acepta que la selección natural conduce a algún tipo de cambio evolutivo denominado adaptativo. Adaptación se refiere tanto al proceso a través del cual la población se convierte en apropiada para la supervivencia y reproducción en un ambiente dado, así como al carácter fenotípico actual que aparece por la vía de la selección natural y que concede esta habilidad. La palabra adecuación (del inglés fitness), es el término relativo que describe la contribución genética que un individuo hace a la generación subsiguiente, comparada con la hecha por otros individuos de la misma población. La adecuación se basa en la selección natural y se incrementa con la adaptación (164, 167).

#### Deriva genética.

Los cambios en la constitución genética a través del tiempo (Ej. Cambio evolutivo) no necesitan ser adaptativos o conducidos por la selección natural. Las fluctuaciones en el tamaño poblacional ya sean de forma aleatoria o predecible que se traducen en un éxito reproductivo diferencial obviamente pueden tener influencia sobre futuras frecuencias genéticas. Una deriva genética (del inglés genetic drift) ocurre como resultado de cambios estocásticos en el tamaño poblacional independientemente de los rasgos reproductivos (164).

Los virus pueden ser particularmente susceptibles a los efectos de las derivas genéticas ya que las transmisiones hospedero-hospedero frecuentemente incluyen cuellos de botella (del inglés bottlenecks) por variaciones del tamaño poblacional que ocurren independientemente de la adecuación viral (168). En otras palabras, un tipo viral específico puede estar muy bien adaptado para replicarse en un medio particular pero debido a eventos ocurridos por casualidad puede impedirse su supervivencia o reproducción. El resultado puede ser que un virus de menor capacidad reproductiva puede sobrevivir a pesar de que disminuya la adecuación de esta población, ya que estará menos adaptada al medio. Este fenómeno está bien ejemplificado por virus que dependen de la ruta de transmisión. Todo esto ocurre debido a que estamos en presencia de un fenómeno estadístico elemental conocido como error de muestreo (164). Durante un evento de transmisión sólo unas pocas partículas podrían ser seleccionadas. El resultado es una nueva población establecida en un medio similar pero con miembros de una pequeña y menos adecuada clase de virus (164).

### Diversificación viral.

Los virus existentes se han formado a través de una extraordinaria secuencia de divergencias y cambios evolutivos, que se ejemplifica mediante la inmensa variedad que observamos en morfologías, estrategias de replicación, rango de hospederos, tolerancia al medio ambiente y estrategias de transmisión (164).

La diversidad genética es básicamente generada por mutaciones o recombinaciones. El número de mutaciones virales que ocurre por unidad de tiempo es ampliamente determinado por dos factores fundamentales: la fidelidad de la polimerasa y el tiempo de generación. La fidelidad de la polimerasa difiere grandemente entre los ácidos nucleicos. Las ARN polimerasas y las reverso transcriptasas carecen de mecanismos correctores, lo que resulta en un mayor número de errores por evento de copia (169, 170).

La recombinación se define como un proceso mediante el cual se intercambia material genético, que trae como resultado la formación de un descendiente de ácido nucleico compuesto de material de dos o más ácidos nucleicos parentales. La recombinación es también una fuente importante de variación genética, sin embargo esta última está frecuentemente asociada con divergencias rápidas. La recombinación entre virus puede ocurrir solamente durante la ocupación simultánea de un hospedero simple (164). Con relación a la importancia de la recombinación en la evolución viral, hay muchos aspectos aún desconocidos que son objeto de profundas investigaciones.

Un aspecto importante en la evolución de los virus ARN transmitidos por artrópodos es que debido a restricciones intrínsecas asociadas con la replicación dual en mamíferos y hospederos invertebrados, estos virus evolucionan más lentamente que los virus ARN transmitidos por otras rutas (171). Sin embargo, aunque esta teoría es comúnmente expuesta, la evidencia para soportarla es muy ambigua. Por ejemplo, los estudios filogenéticos a larga escala revelan que los arbovirus tienen velocidades de sustitución nucleotídica significativamente menor que otros virus ARN y están sometidos a una menor presión selectiva positiva sobre sus genes estructurales (171).

En contraste, el análisis de los hospederos individuales (humanos y mosquitos) infectados con los virus del dengue ha mostrado niveles de variaciones genéticas sinónimas y no sinónimas comparables con otros virus ARN altamente variables (165). Intentando resolver esta discrepancia Holmes diseñó un estudio comparativo a partir de tres grupos de datos que representaban distintos niveles de divergencia evolutiva: a) poblaciones de virus presentes dentro de un único hospedero humano b) poblaciones de virus epidemiológicamente

relacionados y c) poblaciones representativas de la extensión completa de diversidad genética de dos de los serotipos de dengue.

El resultado de esta comparación demostró que como promedio un 75% de las mutaciones observadas a nivel intra-hospedero eran no sinónimas. En contraste, al nivel interhospedero en poblaciones virales epidemiológicamente relacionadas era como promedio de un 14 %. Esto indica que existe gran diferencia entre las presiones selectivas que son impuestas sobre las poblaciones virales a corto y a largo plazo. Existen evidencias que prueban que la mayoría de estas mutaciones son letales. Al analizar estos sitios de mutación comparando grandes bases de datos de virus del dengue relacionados se puede apreciar que la mayoría de los cambios se encuentran en regiones usualmente conservadas para una larga lista de cepas de virus del dengue, lo que indica que estos sitios están sometidos a una mayor restricción selectiva y que por tanto la selección purificadora a largo plazo, elimina estas variaciones no sinónimas (172).

Es muy probable que los arbovirus de manera general, sean capaces de producir más mutaciones letales que otros virus ARN que se replican solamente en especies de hospederos filogenéticamente similares (172).

#### Respuesta a la selección.

La selección se manifiesta como supervivencia y reproducción diferencial de individuos que compiten por una fuente reproductiva limitada. Los individuos que son capaces de producir descendientes a una velocidad exageradamente mayor que otros que se replican simultáneamente son considerados de mayor adecuación (164, 167).

#### Adaptación.

La adaptación no es más que un carácter que aparece por la vía de la selección natural y por lo tanto confiere a su portador la habilidad de tener éxito genéticamente en un medio ambiente específico (173). La adaptación puede permitirle la entrada a un ambiente reproductivo inusual. Esto inicialmente puede sacarlo de competencia, ya que este virus se presentará en su nuevo ambiente, con una densidad poblacional baja. Como resultado aparecerá una nueva población (o eventualmente muchas poblaciones) con un estilo replicación completamente diferente. Esto ocurre frecuentemente cuando los virus cruzan barreras de tejidos, hospederos o vectores (164).

#### Aspectos relacionados con la evolución de los virus del dengue.

En los virus del dengue, esta variabilidad genética se manifiesta indiscutiblemente, en la existencia de cuatro serotipos antigénicamente diferentes, como ya se mencionó en el tópico de origen de los virus del dengue. Previo a que los datos de secuenciación nucleotídica estuvieran disponibles, ya se conocía que también existían variaciones genéticas dentro de cada serotipo (174, 175). Sin embargo, el análisis comparativo de secuencias de genes ha permitido estudiar la estructura genética de poblaciones de los virus del dengue y revelar los procesos que gobiernan la evolución viral. Ricco-Hesse y colaboradores (61), demostraron la variación intra-serotipo estudiando un fragmento de 240 pares de bases (pb) correspondientes a la región de unión de los genes E/NS1, el cual permitió determinar la diversidad genética existente para los DEN-1 y DEN-2. Mediante dicho análisis, se estableció la existencia de "genotipos", definidos arbitrariamente como "un grupo de virus del dengue que tenían menos de un 6% de divergencia en sus secuencias nucleotídicas".

Actualmente, los estudios genotípicos han sido muy expandidos, aunque la mayoría de los autores utilizan como marcador filogenético la secuencia del gen E (aproximadamente 1485 pb).

La extensión de la diversidad genética dentro de los virus del dengue ha sido estudiada con más rigor para el DEN-2. La variación genética observada dentro del DEN-2 es típica de los virus del dengue de forma general, ya que los genotipos de manera frecuente difieren de acuerdo a su distribución geográfica (74).

En particular, dos de los genotipos de DEN-2 se encuentran únicamente en poblaciones Asiáticas (Asiático 1 y Asiático 2), mientras que el genotipo denominado Cosmopolita se distribuye prácticamente por todo el mundo Tropical. Este genotipo que alberga virus tomados de localizaciones geográficas muy diferentes, es un fuerte indicador de cuan lejos un organismo infectado y el vector pueden propagar el virus (68).

Una pregunta de mayor importancia para los biólogos que estudian la evolución es si la diferencia en cuanto a distribución geográfica de cada uno de los genotipos de los virus del dengue tiene alguna clase de base selectiva; es decir, cabe preguntarse si algunos genotipos podrían tener un mayor "potencial virulento" que otros y por tanto, serían capaces de agravar un brote en una localización geográfica determinada. Twiddy y colaboradores (75), encontraron selección positiva esporádica en secuencias del gen E, para DEN-3 y DEN-4 y algunos genotipos de DEN-2, no así para el DEN-1.

Teniendo en cuenta que la proteína E es el mayor determinante antigénico de los virus del dengue, no es sorprendente encontrar que la mayoría de los sitios seleccionados están localizados en zonas de epítopes de células T o B, sugiriendo que la selección está relacionada con la evasión al sistema inmune. Por otra parte es de notar que las relaciones de sustituciones no sinónimas/sustituciones sinónimas calculadas para cepas selváticas y humanas de DEN-2 son similares y generalmente muy bajas (75). Esto implica que no hubo grandes cambios en el gen E o que no hubo grandes adaptaciones hospederoespecíficas mientras el virus cambió su ciclo de transmisión de mono a humano (68).

Consecuentemente, el hecho de que el genotipo Cosmopolita muestre la mayor presión selectiva al compararse con el resto de los genotipos DEN-2 pudiera asociarse con la habilidad de dispersión de este genotipo. Más aún, los virus correspondientes a los genotipos Cosmopolita y Americano tienen una mutación característica en el aminoácido 390 del gen E que ha sido identificado como un determinante de virulencia en estudios experimentales. Por lo tanto, estos estudios tentativamente implican que los genotipos virales pueden diferir en su adecuación (62).

Otra posible evidencia de la acción de la selección natural en los virus del dengue es la extinción y reemplazo de cepas. Por ejemplo, en Tailandia aparentemente hubo un cambio de cepa de DEN-2 entre 1980 y 1987 (176) y de DEN-3 durante los noventa (42, 43). Tal reemplazo de cepas podría ser esperado si los virus en cuestión difieren en adecuación, aunque esto no ha sido demostrado formalmente. Ciertamente, este patrón de extinción y reemplazo podría ser explicado por procesos enteramente estocásticos, tales como "cuellos de botella" poblacionales seguidos de una disminución en el número de mosquitos durante los años inter-epidémicos (68).

Las variaciones a gran escala de los tamaños poblacionales del vector también podrían significar que las derivas genéticas juegan un papel importante en la evolución de los virus del dengue, por tanto el destino de un virus en una población no siempre reflejará su adecuación. Cualquiera que sea el mecanismo, es muy probable que la extinción de cepas haya sido de una ocurrencia regular en la evolución viral, especialmente en momentos donde la cantidad de hospederos o mosquitos susceptibles fuera baja (68).

Con el conocimiento de que el mosquito *Aedes aegypti* es capaz de tener múltiples actos de alimentación, unido a las evidencias existentes de infecciones mixtas, no es sorprendente que exista recombinación para los virus del dengue.

La recombinación parece ocurrir a través de un mecanismo de selección-copia (del inglés copy-choice), en el cual la polimerasa cambia de una molécula parental a otra durante el proceso de replicación (177). Aunque este fenómeno ha sido documentado para los cuatro serotipos, no se ha encontrado recombinación inter-serotipo, como pudiera esperarse de acuerdo a su extensa divergencia genética (178-182).

No obstante, está menos esclarecida la importancia que dicha recombinación podría tener en términos de evolución a largo plazo. Aunque la recombinación podría contribuir a la eliminación de alelos letales, los niveles de recombinación relativamente bajos, observados hasta la fecha sugieren que este fenómeno es de ocurrencia esporádica, a merced de oportunidades ecológicas y no un rasgo selectivamente determinado que incrementa la adecuación viral (68).

## **BIOTECNOLOGIA MOLECULAR Y EL USO DE MICROARREGLOS.**

Desde sus orígenes, el ser humano siempre ha ido más allá del conocimiento empírico, no nada más en la investigación médica sino también en todas las áreas del conocimiento, que ahora nos permiten ver desde una perspectiva integral, el significado de la investigación biomédica.

Dentro de la investigación biológica surgieron los cazadores de microbios, vitaminas, proteínas, hormonas y genes. Ahora nos encontramos con científicos ansiosos de cazar genomas, transcriptomas, proteomas, metabolomas y epigenomas, entre otros; con la finalidad de poder seguir yendo más allá, comprendiendo en una totalidad para no evitar únicamente un estado de enfermedad, sino para poder seguir entendiendo los fenómenos inexorables al cuerpo humano. Actualmente vivimos en la era de la medicina genómica, que tiene como objetivo identificar las variaciones en el genoma humano relacionadas con enfermedades comunes dentro de las poblaciones humanas y de esta manera, dar lugar a una práctica médica individualizada. Esto se logrará, ya que la genómica ha dado lugar a la farmacogenómica, la cual facilitará la generación de medicamentos más efectivos y menos tóxicos para la población con base en su estructura genómica. INMEGEN, 2005.

Para poder entender más sobre nuestro genoma, tanto en la genómica como en la transcriptómica, la técnica de los microarreglos o biochips ha sido la mejor herramienta a elegir. Los microarreglos de DNA han tenido un profundo impacto en la investigación biológica, la farmacología y la medicina; por eso se cree que llegarán todavía a más laboratorios de investigación. Los microarreglos han permitido el estudio de los cambios fisiológicos y ambientales en programas transcripcionales eucarióticos, la identificación de genes involucrados en rutas bioquímicas, en las funciones celulares, en la evolución; la identificación de marcadores genéticos para el desarrollo de fármacos, el estudio de células idénticas sometidas a distintos estímulos, la detección de variaciones en el DNA y el mejoramiento del entendimiento molecular, diagnóstico, pronóstico y terapia tanto del cáncer como de las enfermedades infecciosas, principalmente. Young, 2000.

A través de la historia de la biología molecular, los científicos han tratado de estudiar y comprender en detalle como funciona el cuerpo humano. Éstos únicamente se han enfocado en estudiarlo de partes aisladas. Bien es cierto que la grandiosa máquina del ser humano - y de cualquier organismo - es asombrosamente compleja. Por eso, para poder comprenderlo en su totalidad se tiene que estudiar el sistema completo, es decir, estudiando el genoma. Watson, 2004.

La genómica es una ciencia que se encarga de estudiar todos los genes de un organismo y su función. Ahora nos encontramos en esta era, en la que gracias al esfuerzo de cientos de científicos, se ha generado una gran cantidad de datos que deben ser traducidos en beneficios para la humanidad. Collins, 2003.

La genómica se divide en estructural y funcional, ésta última acuñó un concepto que en los años 80s se consideraba surreal pero que ahora es totalmente real y pretende, no solo establecer un catálogo de genes con sus funciones y su organización, sino entender cómo es que todos estos genes interactúan para crear la vida. Lockhart y Winzeler, 2000. Recientemente, se ha podido llegar a un acercamiento de este concepto a través del estudio de miles de genes expresados por una célula en un tiempo y lugar específicos, determinando así la relación entre su fenotipo y su perfil de expresión génica en las condiciones utilizadas. El progreso de esta área va estrechamente relacionado con los biólogos informáticos, ya que cada vez más, se requiere de sistemas computacionales para el análisis y manejo de la gran cantidad de información.

Durante los últimos años se han utilizado diversos métodos para medir la expresión génica en una escala global, entre los más usados están:

-La Expresión Diferencial (DD o Differential Display), consiste en el uso de un conjunto de oligonucleótidos o iniciadores (primers), uno que se unirá a la cola poliadenilada de las moléculas del RNA mensajero (mRNA) y el otro u otros, que son de menor tamaño y se unirán arbitrariamente con distintas posiciones cerca del primero. Se realiza RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) y se resuelven en un gel los productos de la amplificación, que después deben ser secuenciados y así determinar la expresión génica. Liang y Pardee, 1992. Para el DD se comparan e identifican las diferencias entre dos condiciones experimentales o fenotípicas.

-El Análisis de la Diferencia Representativa (RDA o Representational Difference Analysis), consiste en la amplificación de las moléculas de RNA mensajero que se expresan en un tejido y no en otro, a través de un proceso de substracción acoplado a amplificación con el uso de distintos pares de oligonucleótidos. Los productos amplificados son clonados y posteriormente secuenciados. Esta técnica se utiliza para determinar qué genes se pueden expresar diferencialmente en dos células o tejidos distintos. Hunbank y Schatz, 1994.

-El Análisis en Serie de la Expresión Génica (Serial Analysis of Gene Expression), consiste en el aislamiento de los mensajeros con moléculas de timina en forma de polímeros (politimina) acopladas a un soporte sólido, se hace RT-PCR, después se cortan mediante enzimas de restricción unas secuencias o "tags", que pueden ser de 9 a 14 bases y son representativas de cada molécula de RNA mensajero; posteriormente, se unen estas pequeñas secuencias entre sí para formar concatámeros (moléculas largas de DNA), se amplifican por medio de un vector y se secuencian. La ventaja de este método (SAGE) es que se pueden encontrar genes nuevos que aún no se han reportado. Velculescu, 1995.

-Microarreglos. En general, los microarreglos son un conjunto de moléculas ordenadas en una pequeña superficie plana que generalmente es de vidrio. Estas moléculas pueden ser genes, proteínas, tejidos, anticuerpos y/o carbohidratos, entre otras. Los microarreglos de DNA son un dispositivo con un conjunto de genes ordenados, que pueden ser conocidos o no y que están fijos sobre un soporte sólido y plano en un orden definido, llegando hasta miles por centímetro cuadrado. Existen los microarreglos de DNA complementario (cDNA), Schena, 1995., y los microarreglos de oligonucleótidos. Lockhart, 1996., Singh-Gasson, 1999., Hughes, 2001. Para analizar la expresión génica, se realiza una cinética de hibridación por complementariedad entre las moléculas del RNA mensajero, cDNA o DNA del tejido de interés y los elementos que están fijos en el microarreglo. Gracias a esto y a diversos métodos de detección, se revela la identidad de los genes expresados en dicho tejido. La ventaja de los microarreglos de DNA sobre los otros métodos es que no se requiere de la secuenciación del DNA y permiten, en uno o dos experimentos, la cuantificación simultánea de miles de genes en varias muestras. Stears, 2003.

## MICROARREGLOS DE DNA.

### Generalidades.

Los microarreglos de DNA combinan efectivamente el desarrollo de: el uso de sustratos sólidos (sondas), los métodos de hibridación de la biología molecular, la fluorescencia y el uso de programas computacionales de la bioinformática. Stears, 2003.

Hay básicamente dos tipos de microarreglos de DNA, los de cDNA y los que emplean oligonucleótidos (Tabla). Para la fabricación de microarreglos de cDNA, clonas o productos de PCR de genes de interés son depositados sistemáticamente por medio de un robot sobre una superficie sólida, ya sea en laminillas de vidrio tratadas químicamente o en membranas de nitrocelulosa. Las principales características de los microarreglos de cDNA son:

1. Pueden ser diseñados y preparados por los propios investigadores.
2. Su costo es más bajo en comparación con los que emplean oligonucleótidos.
3. Sólo permiten medir los niveles relativos del mRNA entre varios tipos celulares.

Los microarreglos de oligonucleótidos son sintetizados in situ a partir de 20 hasta más de 100 bases mediante técnicas fotolitográficas o de inyección de tinta sobre una superficie plana de vidrio. Las principales características son:

1. El diseño depende de la secuenciación de los genes de interés.
2. Su costo es muy elevado en comparación con los que emplean cDNA.
3. Permiten medir los niveles absolutos de mRNA en uno o varios tipos celulares por separado, además permiten detectar polimorfismos de un solo nucleótido (Single-Nucleotide Polymorphisms o SNPs), discernir variantes de corte y empalme (Splice Variants), genotipificar o resecuenciar.

Tabla 1 . Diferencias entre los microarreglos de cDNA y oligonucleótidos.

Microarreglos de DNA	cDNA	Oligonucleótidos u Oligos
<b>Características de la sonda</b>	-El tamaño de los genes generalmente es de 300 a 2500 bases.	-El tamaño de los oligonucleótidos es generalmente de 20 a 100 bases.
<b>Ventajas</b>	-Fácil obtención de clonas en bibliotecas. -Fácil amplificación con primers universales. -Tienen buena especificidad. -Diseño y fabricación acorde al investigador. -Precios relativamente bajos. -Amplio uso por muchos laboratorios.	-Los oligos pueden modificarse. -Puede haber 2 oligos para un mismo gen. -Se pueden discernir familias génicas. -Se miden los niveles absolutos del mRNA. -Tienen alta reproducibilidad. -Se pueden crear arreglos de alta densidad.
<b>Desventajas</b>	-Se requieren altas concentraciones de las sondas. -El manejo de muchas clonas favorece una posible contaminación de éstas y el empleo de mucho tiempo para la fabricación del arreglo. -No se distingue entre familias génicas. -No se sabe la secuencia de algunas clonas. -Se miden los niveles relativos del mRNA.	-Menor especificidad si sólo se usa un oligonucleótido por gen. -Se tiene que conocer la secuencia de los genes de interés. -Es una tecnología muy cara que generalmente se vende por grandes compañías.

En general, los microarreglos de oligonucleótidos han usado el formato de un color (p. ej. Ficoeritrina) para marcar por un lado el mRNA experimental previamente biotinilado y por otro el control, para analizarlos cada uno en un microarreglo, (Figura ); mientras que los de cDNA han usado el formato bicolor o multicolor (p. ej. Cianina 3 y Cianina 5) para marcar dos mRNAs, el experimental y el control puestos en co-hibridación en un solo microarreglo. El principio de los microarreglos de DNA se basa en la cinética de hibridación de uno o más blancos marcados fluorescentemente, generalmente cDNA, con las sondas inmovilizadas en un soporte; después de la hibridación se miden las intensidades fluorescentes a través de un láser confocal. Las señales de la hibridación y de fondo son calculadas para cada elemento del microarreglo utilizando métodos matemáticos; éstos asocian las señales transformadas numéricamente con los niveles moleculares absolutos del mRNA para los microarreglos de oligonucleótidos y relativos para los microarreglos de cDNA. Después de la detección, cuantificación e integración de las señales, se normalizan los datos para determinar técnicamente mediante algoritmos un “Patrón de Expresión Génica” o “Perfil de Expresión Génica” basado en los genes y un “Retrato Molecular” o “Firma de expresión” propio de cada muestra. The Chipping Forecast I, 1999.

En la literatura existen dos nomenclaturas con respecto a los patrones de hibridación. Ambos usan los términos sonda y blanco arbitrariamente. Uno de estos, el cual tiene una identidad definida (sonda), tiende a estar unido a la fase sólida y la identidad del otro se revela con la hibridación (blanco). La estrategia de un microarreglo “estándar” se asemeja a la de un ensayo de “blot” reverso. Por eso, se realizó un consenso por parte de los especialistas y se estableció como sonda al ácido nucleico unido a la superficie sólida y como blanco al ácido nucleico libre.

La tecnología de microarreglos fue inicialmente descrita a mediados de los años 90 y ha tenido un desarrollo impresionante desde sus orígenes. Se han publicado miles de estudios relacionados con los microarreglos y resultaría muy difícil revisar con gran detalle, todos los aspectos que tienen que ver con ella. Tanto los laboratorios de iniciativa privada como los gubernamentales en todo el mundo se han interesado por esta tecnología, por lo que existen muchos métodos y distintos equipos para el proceso de fabricación y análisis de microarreglos. Esto ha dificultado el intercambio de información y la confiabilidad de los métodos empleados por cada laboratorio, debido a la variabilidad de los resultados. Sin embargo, los esfuerzos internacionales han creado sistemas para poder relacionar los resultados de un laboratorio a otro y para tener de esta manera, mayor confiabilidad, menor variabilidad y gran reproducibilidad en el uso de esta tecnología. Existen además muchas organizaciones y universidades (Apéndice A) para dar, a la gran información obtenida de los experimentos, un buen manejo a través de guías y recomendaciones que se tienen que tomar indiscutiblemente en cuenta.

La estandarización de los protocolos en todo laboratorio para cualquier experimento que involucre el empleo de microarreglos es muy importante, por eso a continuación se mencionan brevemente puntos interesantes que no deben pasar desapercibidos:

MIAME: En el 2002 la Sociedad de Datos de Expresión Génica de Microarreglos (MGED Society) estableció el “MIAME” o bien, la Mínima Información Sobre un Experimento de Microarreglos. Este es un conjunto de guías encaminadas a establecer los cuidados mínimos para interpretar sin ambigüedades y, potencialmente reproducir o verificar un experimento que mida la expresión génica. En general estas guías consisten en detallar toda la información posible que tiene que ver con el diseño del microarreglo, el diseño experimental, la preparación y marcaje de las muestras utilizadas, los procedimientos y parámetros de la hibridación, la medición de los datos y especificaciones del procesamiento de estos. Brazna, 2001.

Consorcio G.O. (Gene Ontology). Surgió con la finalidad de establecer un vocabulario en común para describir a los genes, así como para facilitar la búsqueda de información relevante

a cada uno de ellos. Los términos que describen a los genes son tres, la función molecular que desempeñan, el proceso biológico donde interviene y el componente celular donde se localiza. Existen además muchas bases de datos que se van actualizando periódicamente donde uno puede encontrar información útil para el análisis génico (Apéndice).

Anotación Génica (Gene Annotation). La habilidad para obtener información apropiada y confiable sobre cada gen es crítica para interpretar correctamente los experimentos de microarreglos. Lo ideal es tener una base de datos en la cual se encuentre toda la información relacionada al gen, como elementos del promotor, estructura de los intrones o exones, variantes de corte y empalme y regulación por otros genes. En el Apéndice A se mencionan algunas bases de datos relevantes para los microarreglos ya que ahí se pueden depositar los datos referentes a cada experimento y cualquier persona puede tener acceso a ellos. Esto es importante porque se pueden asignar funciones biológicas potenciales a los genes coregulados, siendo esto más útil cuando se utilizan ESTs.

Para poder sacar el mejor provecho del uso de la tecnología de los microarreglos de DNA, se tiene que diseñar cuidadosamente el experimento, Churchill, 2002., ya que son muchas las variables que juegan en torno al proceso y se pueden tener muchos problemas. Hwa y Speed, 2002. Ya establecida la pregunta biológica que uno pretende responder dentro del método científico, entonces se puede fabricar el microarreglo.

### **FABRICACIÓN DE MICROARREGLOS DE cDNA.**

El proceso del análisis de la expresión para los microarreglos de cDNA se puede describir brevemente en los siguientes pasos:

1. Fabricación del microarreglo. Consiste en la impresión de las sondas y controles sobre el soporte plano (generalmente de vidrio). La selección de las sondas depende estrictamente de la pregunta biológica que uno pretende contestar. La selección de los controles depende del número de sondas. Es importante tomar en cuenta la distribución y réplicas de las sondas y los controles.

2. Aislamiento del RNA y marcaje del blanco (cDNA). La obtención del RNA es un paso crítico ya que la eficiencia del marcaje está en función de la integridad del RNA y el éxito de la hibridación está en función de la calidad del marcaje con fluorocromos, entre otros factores.

3. Hibridación. Consiste en una reacción de cinética química donde las moléculas del blanco marcadas fluorescentemente o no, se unirán por complementariedad de bases ( $A=T$  y  $C=G$ ) a través de puentes de hidrógeno, con las moléculas de las sondas inmovilizadas sobre la superficie.

4. Detección, cuantificación, integración de las señales y normalización de datos.

La emisión de uno o varios láseres a una longitud de onda específica para cada fluorocromo, hace que estos emitan distintas intensidades en cada señal, dependiendo del número de moléculas de cDNA unidas a cada sonda. Las señales son amplificadas a través de un microscopio confocal integrado al sistema, teniendo la ventaja de aumentar la resolución de la imagen, ésta permitirá cuantificar e integrar las señales a través de programas computacionales que se verán reflejadas en datos numéricos. Al normalizar estos últimos respecto a un control de expresión, por ejemplo un gen constitutivo, se podrán estimar numéricamente los niveles relativos de las moléculas marcadas correspondientes a cada gen.

5. Minado de datos (Data Mining) y modelaje. Una vez que se han cuantificado y normalizado los datos, es necesario interpretarlos para poder determinar un patrón de expresión. Este se determina mediante una relación entre los datos obtenidos de los genes con toda la información conocida y disponible con relación a estos, proteínas, tejidos o células empleados

en los experimentos. Posteriormente, será posible determinar los perfiles de expresión génica de nuevas muestras al analizarlas con los patrones establecidos y así obtener en gran detalle la información relevante para cada muestra.

La tecnología de los microarreglos lleva indiscutiblemente el adjetivo de alta eficiencia o “highthroughput” que la define como una tecnología rápida y precisa para el análisis paralelo de miles de moléculas en un solo experimento. Estas características han puesto de “moda” a la tecnología (“Información General” Apéndice), desde el primer artículo publicado en 1995. Schena, 1995. La gran tendencia en su uso se ha extrapolado a numerosos laboratorios de investigación en todo el mundo. Es por eso que las inversiones mundiales en torno a esta tecnología sobrepasan los billones de dólares. Prueba de ello es el número de empresas que han sido creadas con relación a la tecnología, asegurando que ésta seguirá en desarrollo. Gershon, 2004.

Una de las características más importantes de las moléculas de DNA es su antiparalelismo debido a la complementariedad específica de sus bases. Esto se debe a la secuencia de sus monómeros (nucleótidos), lo que induce la unión de una cadena con otra de secuencia complementaria por medio de puentes de hidrógeno. Es bien conocido que una adenina forma dos puentes de hidrógeno con una timina o uracilo (en el caso de RNA) y una guanina forma tres con una citocina. Los ensayos de hibridación explotan esta característica para poder identificar secuencias específicas de ácidos nucleicos en muestras desconocidas. Los microarreglos se basan en este ensayo como también lo hicieron las técnicas de tipo “blot” como “Southern”, “Northern” o macroarreglos que les precedieron desde la década de los 70s. Los microarreglos se diferencian de los macroarreglos debido a que los primeros usan soportes planos de vidrio y no de nitrocelulosa, usan marcaje fluorescente en vez de radioactivo, tienen una densidad de sondas mucho mayor y los volúmenes utilizados para el análisis son mínimos. El padre de los microarreglos de cDNA se considera que es el Dr. Mark Schena, cuando en la Universidad de Stanford trabajando en el laboratorio del Dr. Patrick Brown, desarrolló esta tecnología para el estudio de la expresión génica de la planta *Arabidopsis thaliana*. Los microarreglos de oligonucleótidos surgieron a la par de la compañía “Affymetrix” de Santa Clara, California; la cual ha sido la líder desde el primer artículo publicado en 1996. Lockhart, 1996. Desde la década de los 80s se produjo un gran desarrollo en la biología molecular y celular, la química, física y la ingeniería; estas ciencias establecieron los antecedentes necesarios para la creación de la técnica de microarreglos de DNA. Cada año se reportan grandes avances para el uso múltiple en la investigación biológica. Xiang y Chen, 2000.

Desde 1995 ha habido un incremento mundial en el uso de la tecnología, esto se representa en el número de patentes y publicaciones que se han acumulado a lo largo de los últimos años. Una de las principales aplicaciones ha sido el estudio de enfermedades complejas genéticamente como el cáncer. Durante los 9 años comprendidos entre 1995 y 2004, el desarrollo de la tecnología de los microarreglos ha crecido notablemente. Lamentablemente, esta tecnología casi no se ha usado en países en vías de desarrollo como México.

## ANTECEDENTES.

La fiebre del dengue (FD) y la fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque por dengue (FHD/SCD) constituyen hoy la enfermedad viral transmitida por artrópodos de mayor importancia en humanos. Dicha enfermedad afecta a más de 100 países, fundamentalmente a los localizados en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Se estima que anualmente ocurren entre 50-100 millones de infecciones. Esta enfermedad es la causa de 300,000 a 500,000 hospitalizaciones anuales con una tasa de mortalidad del 1-5% (1, 2).

Los virus del dengue consisten en cuatro serotipos antigénicamente diferentes (DEN-1 al 4) asignados al género flavivirus (Familia Flaviviridae). El genoma de estos virus está constituido por una cadena sencilla de ARN(+) que codifica para tres proteínas estructurales C, PrM/M, E y siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (3).

La infección por cualquiera de los serotipos puede producir diferentes formas clínicas de la enfermedad, desde un cuadro clínico leve hasta la forma severa conocida como FHD que ocasionalmente conduce a la muerte por choque (4, 5). Aunque la patogénesis del dengue es controversial, las hipótesis (no mutuamente exclusivas) de ocurrencia de amplificación dependiente de anticuerpos (ADA) y existencia de cepas con mayor virulencia, son comúnmente invocadas para explicar la patogénesis de la forma severa de la enfermedad (1,6-8). Actualmente se plantean numerosos factores de riesgo que implican el desarrollo de la forma severa de la enfermedad, dentro de los que se incluyen las variaciones que experimentan los virus, factores dependientes del hospedero, factores relativos al vector, factores epidemiológicos y las condiciones ecológicas (8-15).

En particular, la infección secundaria con un virus de dengue de serotipo diferente al que ocasionó la infección primaria (virus heterólogo) se considera un factor de riesgo importante para el desarrollo de la FHD/SCD. Unido a esto, la introducción en las Américas de cepas de DEN-2 de origen Asiático ha sido asociado con un incremento del riesgo de desarrollo de FHD/SCD (12-14, 16-18).

Se conoce que los cuatro serotipos del virus dengue circulan en la región Latinoamericana y aunque en la mayoría de estos países el dengue es endémico, la situación epidemiológica de México se considera excepcional.

## SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA EN MÉXICO

A pesar de que en México se erradicó al mosquito *Aedes aegypti*, en 1963 durante la campaña mundial contra la fiebre amarilla (Torres-Muñoz, 1995), el abandono de estos programas permitió una rápida reinfestación por el mosquito. En México, el movimiento de la población de las áreas rurales hacia los centros urbanos, en un intenso proceso de industrialización, abarrotó a los contados centros urbanos que existían en la década de los cincuenta, los cuales mostraban sistemas precarios de abastecimiento, almacenamiento y desecho de agua. Además, la introducción y proliferación de envases no reciclables proporcionó numerosos y efectivos sitios para la proliferación del mosquito en áreas urbanas.

Como ejemplo, de 1960 a 1990, la producción de botellas desechables se incrementó de 500 mil a 3.5 millones y la producción de llantas se incrementó de 2 a 17 millones (Briseño y col., 1996). También, la promoción del turismo internacional hacia el país se incrementó aumentando el tránsito humano y por lo tanto, incrementado la probable importación de nuevas cepas virales. Adicionalmente, la precaria existencia de los programas de control, vigilancia y prevención de

enfermedades infecciosas, aunada con la falta de infraestructura y de personal calificado limita la detección de los casos anuales de la enfermedad (Gubler & Trent, 1993).

Los primeros brotes de dengue se presentaron en los estados de Chiapas, Quintana Roo y Oaxaca. También, se reportaron brotes ocurridos en áreas cercanas a las ciudades de Tampico en Tamaulipas y de Mérida en Yucatán. Se identificó al serotipo DENV-1 como responsable de ellos entre los años 1978-1980.

En 1982 se detectó en Tamaulipas y en Oaxaca la transmisión de los serotipos DENV-2 y DENV-4. En 1983 se reporta un brote causado por el serotipo DENV-1, que comenzó en el Estado de Puebla y abarcó la mayoría de los estados del sureste y parte media de la República, desde Chiapas en el sur, hasta Jalisco en la parte media. También fueron reportados casos en Veracruz y en Yucatán.

En 1984 el serotipo DENV-4 se asoció a un brote de FHD, ocurrido en Mérida y áreas rurales de Yucatán. En 1988 un brote de FD, ocasionado por el serotipo DENV-1, fue reportado en Taxco, Guerrero, y se presentaron 715 casos, siendo el primer reporte de la enfermedad a una altitud de 1,700 msnm, (rango altitudinal no reportado con anterioridad para el vector) (Herrera y col., 1992).

Entre 1984 y 1985 la enfermedad fue diagnosticada en 27 de los 32 estados de México y los serotipos DENV-1, 2 y 4 se reportaban a lo largo del país. Brotes ocasionados por el serotipo DENV-3 fueron reportados por primera vez durante 1995 y casos de FHD fueron confirmados. Finalmente, brotes de FD/FHD se reportaron en varias regiones del país, en donde el serotipo DENV-2 fue predominante en todos ellos y se le asoció a infecciones previas del serotipo DENV-1 para la manifestación del cuadro clínico de FHD.

El Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), responsable de las campañas de control y vigilancia de la transmisión de las enfermedades infecciosas, durante el periodo de 1986-1995 identificó 681 aislados con el virus del dengue. Los serotipos se identificaron por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales. (Briseño y col., 1996).

Hacia mediados de la década de los noventa los casos sospechosos de dengue en varios Estados de la República Mexicana, mostraban un comportamiento de incremento constante. Entre los años 1998-2002 se reportaron 52,876 casos de FD, de los cuales 1,637 se identificaron como FHD, (SSA, 2003), siendo los estados con mayor incidencia: Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz y Oaxaca (Martínez, 2002). Los siete estados de la República donde se presentaron el mayor número de casos durante los últimos años fueron: Nuevo León con 13,026; Veracruz con 9,063; Tamaulipas con 8,253; Oaxaca con 5,345; Tabasco con 2,424 y Coahuila con 2,250.

## TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y NECESIDAD DE UN SISTEMA DE DIAGNÓSTICO MÁS EFICIENTE PARA DETECTAR EL VIRUS DEL DENGUE Y SUS DIFERENTES SEROTIPOS.

En clínica el diagnóstico consiste en la determinación de una enfermedad o padecimiento por medio de los síntomas que presenta un paciente o individuo, dicho diagnóstico debería ser la parte más importante ante cualquier síntoma, enfermedad o patología, siempre de forma global, holística, es decir, en el historial se deberían reflejar todas las características del paciente: antecedentes familiares, enfermedades o accidentes de la infancia, vacunas, alimentación, entre otras., así como las costumbres actuales de hobbies, sexo, nutrición y por supuesto un análisis del carácter y uno fisiológico, además de rasgos o datos de la cara, uñas, pies, columna, piel, iris, etc., y si procede unas analíticas u otras pruebas complementarias, de ser posible, no agresivas. Solo a partir de ese momento se debería interpretar el diagnóstico y proceder a una correcta terapéutica, con las medicinas, nutrición, complementos, masajes, etc., mas

convenientes para el paciente, no sobra decir que sean profesionales de las áreas correspondientes para conseguir un buen fin de los tratamientos, y así conseguir la recuperación de la salud.

Las técnicas de Diagnóstico son invaluable desde el punto de vista del Sector Salud y en el caso del virus del dengue es de vital importancia el contar con un Kit de diagnóstico que permita identificar al agente que está ocasionando la infección, este diagnóstico necesita ser oportuno para prestar la atención más adecuada al paciente y evitar que la infección progrese hasta causar un daño irreversible. A la fecha existen diferentes sistemas por los cuales se diagnostica la presencia del virus del dengue, dentro de estos sistemas se encuentran los serológicos y los virológicos.

1.- Métodos Serológicos. Estos se emplean para confirmar el diagnóstico clínico, lo que permite evaluar el curso de la infección y determinar si la infección es primaria o secundaria. Los métodos más empleados son el ELISA, IFI (inmunofluorescencia), Neutralización e Inhibición de la hemaglutinación (IH). La producción de anticuerpos en respuesta a una infección primaria se identifica por la detección de anticuerpos de la clase IgM específicos para el virus del dengue. Estos anticuerpos pueden detectarse desde que aparece la fiebre hasta 3 ó 8 semanas después de iniciada la infección. (Gubler et al., 1997; Zarate-Aquino et al. 1995).

El ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) generalmente se lleva a cabo con una toma de muestra a los 8 días de haberse iniciado el cuadro de infección. La infección secundaria se determina por la presencia de inmunoglobulinas de la clase IgG.

Prueba de Hemaglutinación (IH). En ésta se determina la capacidad que tienen los virus de dengue para aglutinar eritrocitos de ganso. Los anticuerpos presentes en el suero del enfermo van a evitar que una cantidad estandarizada de virus se una a los eritrocitos y se aglutinen.

En el caso del Método Neutralizante se identifican anticuerpos específicos para los diferentes serotipos del virus y éstos persisten más que cualquier otra clase de anticuerpos. La capacidad neutralizante de un suero puede ser medida in vivo ó in vitro y el método más empleado es por reducción de placas. El título del Antígeno se mide en Unidades Formadoras de Placas por volumen inoculado y una reducción del 50%, comparado con el control, evidencia la presencia de anticuerpos. Así mismo es posible detectar anticuerpos aunque el paciente ya no presente la enfermedad. Este es un procedimiento bastante costoso además de consumir mucho tiempo.

El Diagnóstico por IFI sirve para cuantificar anticuerpos IgG e IgM, es un procedimiento relativamente rápido, pero requiere de laboratorios con por lo menos un microscopio de fluorescencia y experiencia en el manejo de la técnica de Inmunofluorescencia.

El diagnóstico del virus de dengue por los métodos serológicos antes mencionados presenta serias y numerosas limitaciones como en el caso de la detección de anticuerpos antivirales, los cuales nos refieren que hay o que hubo infección, ya que los anticuerpos se pueden mantener por largos periodos de tiempo, pero en terminos de diagnostico este fenómeno no es adecuado ni preciso pues no refiere precisión en la infección, evitando dar un posible tratamiento. Otro inconveniente de la serología es que no permite identificar el serotipo del virus que está causando la infección. Además, puede existir reacción cruzada de los anticuerpos con los diferentes serotipos del virus y con otros flavivirus, lo que puede confundir la identidad del agente infeccioso.

2.- Diagnóstico Viroológico. Dentro de estos sistemas se encuentran el cultivo de células y/o la inoculación intratorácica pasiva en mosquitos *Aedes albopictus* con el virus del dengue. (Gubler et al., 1997; Zarate-Aquino et al. 1995).

En el Cultivo Celular, el agente infeccioso se puede identificar mediante el aislamiento y cultivo del virus, a través de la observación de un efecto citopático inducido en cultivos celulares. Entre

las líneas celulares que han mostrado mayor susceptibilidad a los diferentes serotipos del virus dengue, se encuentran las células de mosquito (C6/36) o de riñón de mono (LLC-MK2, VERO). En el caso de Inoculación Intratorácica en mosquitos *Ae. albopictus* ó *Toxorhynchites splendens*, aproximadamente 0.34 ml de plasma sin diluir es inoculado en cualquiera de los dos mosquitos; posteriormente, estos mosquitos son mantenidos a 30° C entre 12 y 14 días, finalmente las cabezas de los mosquitos son trituradas y el virus se detecta con anticuerpos marcados con fluoresceína; ello sin implicar un riesgo de contaminación al medio externo debido a que se inocula en forma pasiva y atenuada, asegurando así que el virus no se vuelva más agresivo o resistente.

El vasto mundo del diagnóstico molecular día con día se hace mas interesante y específico; es evidente que los métodos de diagnóstico vírales que se describieron en paginas anteriores son métodos con poca utilidad por requerir de tanto tiempo en su determinación. Este tipo de diagnóstico se hace aun más inadecuado cuando se quiere detectar a los serotipos de dengue 3 y 4, ya que tanto el cultivo como las inoculaciones intratorácicas toman un promedio de tres semanas, tiempo en el que la enfermedad puede fácilmente evolucionar a Dengue hemorrágico (FHD), un shock (SCD) y morir el paciente antes de recibir el tratamiento mas adecuado.

Es notable, en este punto, la necesidad de desarrollar un sistema de diagnóstico rápido y efectivo. Una alternativa es haciendo uso de las herramientas de la Biotecnología Molecular con que se cuenta actualmente. En los últimos años, se han reportado diversos métodos para el diagnóstico del dengue, entre éstos, se encuentran las Pruebas de Hibridación de Ácidos Nucleicos por medio del desarrollo de sondas marcadas no radioactivamente. (Pierre et al. 1994). Esta tecnología consiste en la detección de partes específicas del RNA viral mediante sondas marcadas que a su vez, son detectadas por quimioluminiscencia o algún otro método sensible que permita detectar una señal. Aunque este sistema es bueno, tiene el inconveniente de ser una técnica muy laboriosa y por lo tanto tardada, además hay reportes de que este sistema muchas veces presenta problemas de sensibilidad por lo que los límites de detección son muy bajos. (Sang et al., 1998; Porter et al., 1999; Cuzzubbo et al., 1999; Palmer et al., 1999; Raengsakulrach et al., 2002).

Otra técnica en pleno auge utilizada para la detección del virus del dengue es por medio de RT-PCR, en donde inicialmente se lleva a cabo una transcripción reversa para obtener el cDNA y posteriormente se lleva a cabo una reacción de PCR. A grandes rasgos, este sistema consiste en diseñar "primers", los cuales pueden ser Universales o Degenerados que permitirán amplificar determinadas regiones del genoma del virus del Dengue. Una vez amplificada esa región, el producto de PCR se corre en un gel de agarosa y por electroforesis el fragmento amplificado se revela con Bromuro de Etidio, haciendose visible bajo una lampara de luz ultravioleta. Este método ha sido de mucha utilidad ya que cumple con los requerimientos de ser un sistema de fácil manejo, rápido, sensible y de gran especificidad. Los probables inconvenientes serian que para detectar el fragmento amplificado es necesario correr un gel de agarosa y esto implica el uso de equipo un poco "sofisticado" como lo son las camaras de electroforesis y las costosas fuentes de poder, además del uso de Bromuro de Etidio, que es un compuesto potencialmente carcinogénico (Lanciotti et al., 1994; Thayan et al., 1995; Rico-Hesse et al., 1998; Miagostovich et al., 2000).

Tratando de resolver todos estos inconvenientes se ha pensado en el desarrollo de un sistema de diagnóstico donde se combinen las ventajas que ofrece la técnica de RT-PCR con un sistema que permita detectar con facilidad el producto de PCR, que sea metodológicamente sencillo y que sea igual o más sensible y específico que la detección en un gel de agarosa. Esto es posible por medio de un sistema de RT/PCR + un "Sándwich" ELISA, el cual permitirá inicialmente capturar el producto de PCR específico para posteriormente ser detectado visualmente o por colorimetría en un lector de ELISA.

Las bases y la estrategia a seguir en el desarrollo del sistema de diagnóstico que permita detectar los cuatro serotipos de dengue (1,2,3 y 4) son las siguientes. Está perfectamente establecido que el genoma de los flavivirus está compuesto por aproximadamente 11,000 nucleótidos y que este material genético está compuesto por RNA de una sola cadena con sentido positivo, la cual no contiene una región 3'- poly (A). Se pueden diseñar un par de primers específicos que amplifiquen una región flanqueada dentro de la parte del genoma que corresponda a la región que codifica para las proteínas no estructurales. Esto basado en que la secuencia de ácidos nucleicos en genes del mismo virus presentan secuencias conservadas entre los diferentes serotipos del Dengue y dentro del mismo género de flavivirus. En estas proteínas no estructurales (5'-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3') se han encontrado también regiones variables específicas para cada uno de los serotipos, lo que nos dará la oportunidad de que al amplificar la región flanqueada, amplificarán tanto la región conservada del género del virus del Dengue como la región variable, específica de cada uno de los serotipos de Dengue (1,2,3 y 4). Las Pruebas de Captura (primers marcados) serán sondas de entre 22 y 30 bases, las cuales estarán compuestas por las regiones variables de cada uno de los diferentes serotipos, que darán la especificidad del serotipo. Estas sondas están marcadas cromogenicamente para que, por hibridación, se unan al producto de PCR pegado a una placa de ELISA o laminilla Xilanisada. Posterior a la hibridación, el producto de PCR será detectado por medio de colorimetría y la placa será puesta en un lector de ELISA para leer la densidad óptica, lo cual permitiría que el método sea cuantitativo además de cualitativo. En el caso de no contar con un lector de ELISA, la aparición de color en la prueba determinaría la presencia del virus y el serotipo. Para el caso de las laminillas el Cromogeno o Fluoroforo sera detectado en un Scanner con emisión laser.

Como puede observarse la metodología planteada es muy viable desde el punto de vista teórico molecular y vislumbra grandes expectativas para trabajos futuros. Nuestro trabajo consistió en fundamentar las bases teóricas y prácticas para decidir la viabilidad de esta metodología, la cual es muy importante desde el punto de vista de salud, el cual en México es una necesidad prioritaria y que ofrece grandes expectativas de factibilidad técnica y epidemiológica. Por último es importante enfatizar que nuestra metodología resuelve a corto plazo el problema del diagnóstico del dengue en México.

## JUSTIFICACION.

El Dengue es actualmente una de las más frecuentes arbovirosis que afectan al hombre y constituye un severo problema de Salud Pública en el mundo, especialmente en la mayoría de los países tropicales, donde las condiciones del medio ambiente favorecen el desarrollo y la proliferación de *Aedes aegypti*, el principal mosquito vector.

La prevalencia local del dengue ha crecido en forma dramática en las últimas décadas. Ahora ha pasado a ser una enfermedad endémica en más de 100 países de África, América, el este del Mediterráneo, el sudeste de Asia y el Pacífico occidental. La OMS calcula que actualmente existen más de 50 millones de casos de infectados del dengue mundialmente cada año. Algo como 2,500 millones de personas -dos quintas partes de la población mundial - se encuentran en áreas de riesgo para su transmisión. Sin un tratamiento apropiado, la tasa de mortandad de la FHD alcanza un 15% o más.

En la actualidad, el único método de control y prevención del dengue y de la FHD es combatiendo al mosquito vector. En Asia y América, el *aedes aegypti* se reproduce en recipientes hechos por el hombre como botellas, latas, neumáticos usados o en cualquier otro recipiente que retenga agua. En África se reproduce tanto en recipientes artificiales como en medios naturales, como en huecos de los árboles y en los peciolos de hojas. El control del vector se establece mediante campañas de limpieza comunitaria para eliminar los lugares de reproducción del vector, y a través de la aplicación de insecticidas. Es esencial verificar periódicamente la susceptibilidad del vector a los insecticidas que se usan en general.

El desarrollo de la vacuna para el dengue y FHD es muy difícil debido a que cualquiera de los cuatro diferentes virus pueden causar la enfermedad, y porque la protección contra sólo uno o dos virus del dengue podría de hecho incrementar el riesgo de una enfermedad más seria. Sin embargo, se han obtenido grandes avances en el desarrollo de vacunas que puedan proteger contra los cuatro virus del dengue. Estos productos podrán estar disponibles comercialmente en algunos años.

El diagnóstico de las entidades virales es uno de los mayores retos a los que se enfrenta la Biotecnología Molecular, particularmente en países como México donde el diagnóstico viral se hace de manera tradicional.

Durante las últimas décadas, el desarrollo progresivo de nuevas y mejores herramientas para evidenciar el tipo de virus causante de las diferentes enfermedades, hace posible que estas entidades se puedan descubrir y estudiar no sólo a nivel de laboratorios especializados, sino también en los comunes. Las pruebas diagnósticas simples, rápidas y de bajo precio para la demostración de antígenos han reemplazado las técnicas tradicionales, largas y costosas y esto ha producido una mayor agilidad en la definición del diagnóstico. Por otra parte, el determinar la especificidad de los anticuerpos es importante para documentar la sero-prevalencia de una infección en individuos y poblaciones. Además, las pruebas de demostración molecular han mejorado la probabilidad de evidenciar los agentes virales directamente pues se documenta la infección de modo categórico, y permite estudiar su progresión y seguimiento terapéutico.

La nanotecnología como manufactura molecular, es la construcción de cosas átomo por átomo o molécula por molécula mediante brazos de robot nanoscópicos, utilizando las propiedades químicas bien conocidas de los átomos y las moléculas, y cómo se unen entre ellos; la nanotecnología propone la construcción de aparatos moleculares novedosos con propiedades novedosas. El truco es manipular átomos individualmente y ubicarlos exactamente donde sea necesario para generar la estructura planeada.

Uno de los beneficios de dominar esta tecnología son los microarreglos. Los microarreglos de DNA son una nueva herramienta de la biología molecular y las ciencias genómicas y tiene como finalidad la creación de una matriz bidimensional de material genético, que permite la automatización simultánea de miles de ensayos encaminados a conocer en profundidad la estructura y funcionamiento de un consorcio genético, tanto en los distintos estados de desarrollo como patológicos del hombre.

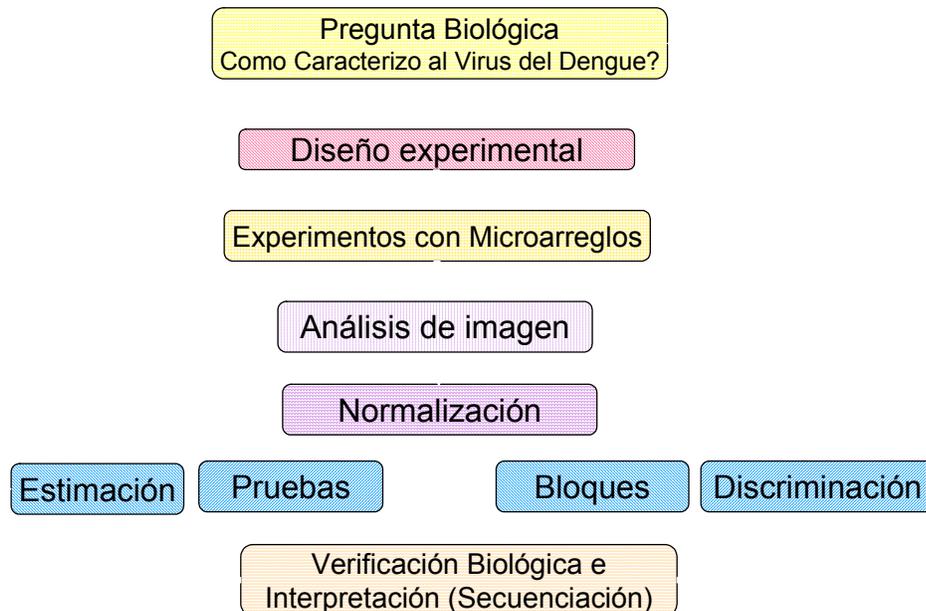
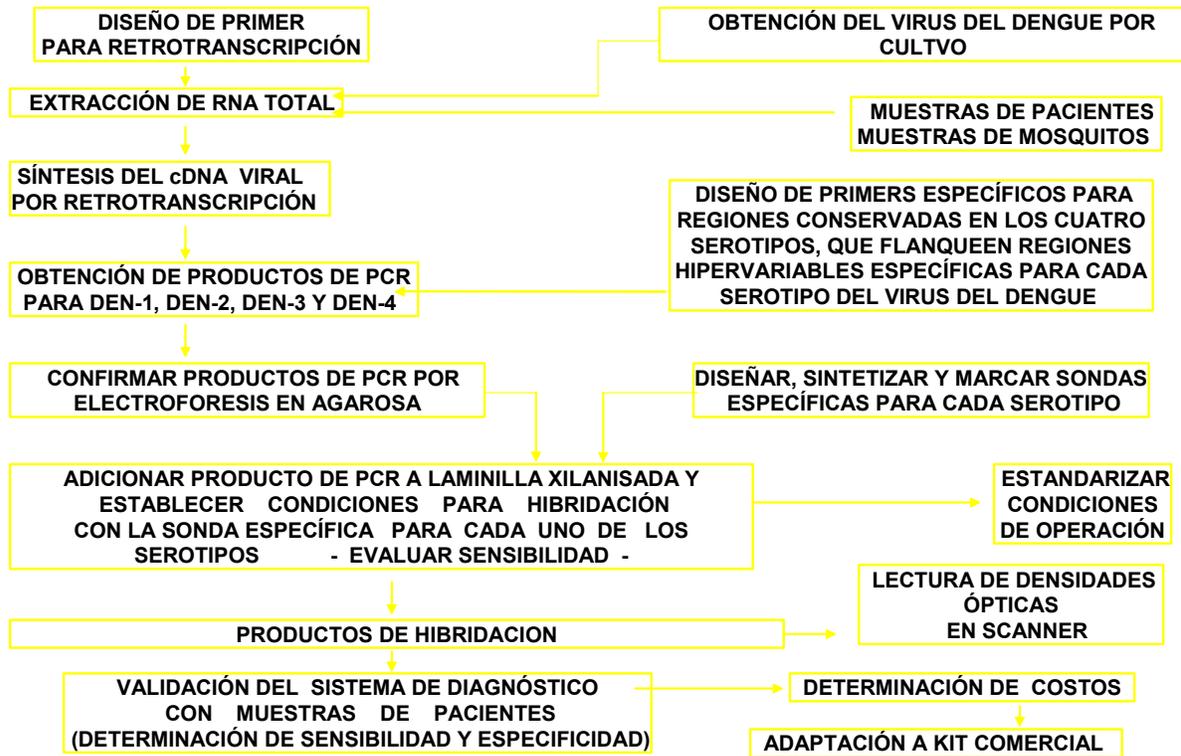
Hasta el momento no se ha podido establecer un autentico estándar en microarreglos de ADN, sino la coexistencia de distintas tecnologías con el mismo fin: el análisis de la expresión y la variabilidad génica. La decisión final sobre la tecnología a aplicar (cDNA-Oligos, depósito-Síntesis in situ de sondas), dependerá de la aplicación u objetivo final del ensayo.

En México es importante promover el manejo y ejecución adecuados y racionales de las técnicas disponibles, ya sean las tradicionales o las nuevas que mejoren los diagnósticos virales y diferenciales.

Es evidente la necesidad de estudios relacionados con el diagnóstico de esta enfermedad y el desarrollo de una vacuna o de estrategias adecuadas para su control. Para tener la posibilidad de trabajar con los diferentes aislados en el laboratorio nosotros estamos trabajando con microarreglos para por un lado desarrollar un método de diagnóstico con el objetivo de definir no solamente el serotipo sino también el genotipo dentro de cada serotipo, ya que este último dato nos diría cual es el potencial del virus para producir dengue hemorrágico, y con esto el médico tendría la posibilidad de mantener al paciente en observación y con un tratamiento mas adecuado. Por otro lado, con la elucidación de los marcadores de genotipo dentro del genoma del virus mediante los microarreglos tendremos la posibilidad de desarrollar a largo plazo una vacuna. Asimismo con la estrategia de los microarreglos estamos estudiando los receptores del virus en los mosquitos y determinando los marcadores de competencia vectorial (capacidad de los mosquitos para transmitir el dengue).

Este trabajo proporciona los avances obtenidos en la RED INTER-INSTITUCIONAL DE MICRO-ARREGLOS (RIIMA-CINVESTAV-IPN) en relación al diagnóstico molecular del virus del dengue.

## ESATRATEGIA EXPERIMENTAL.



A grandes rasgos la estrategia experimental se guió por los siguientes pasos y contemplando la premisa establecida en la hipótesis de trabajo:

- 1.- Se investigó la mejor forma de extracción de RNA de cultivos celulares y de las muestras de pacientes y mosquitos, evitando la extracción con Cloruro de Cesio más Fenol - Cloroformo, técnica que es muy laboriosa.
- 2.- Se preparó el cDNA por medio de una Transcripción – Reversa metodológicamente viable.
- 3.- Se diseñaron los oligonucleótidos (primers) adecuados para la amplificación del producto de PCR conservado en todos los serotipos del dengue.
- 4.- Se diseñaron las sondas específicas para cada uno de los 4 serotipos, dichas sondas serían marcadas con cromógenos específicos.
- 5.- Se desarrollaron las condiciones óptimas de hibridación, así como las concentraciones necesarias de reactivos para el sistema de Microarreglos.
- 6.- Se evaluó del sistema de Diagnóstico con cultivos celulares y posteriormente con muestras de pacientes.

### **Pregunta Científica:**

¿Cómo podría detectar diferencialmente a los serotipos del virus del dengue?

### **Hipótesis de trabajo:**

Cada serotipo del dengue tiene características genómicas específicas; de ahí que sea posible desarrollar métodos moleculares diferenciales para detectar cada uno de ellos y sus diferentes genotipos.

### **Objetivo General.**

Desarrollar un sistema de microarreglos de DNA para la caracterización de cepas del virus del dengue.

**Objetivos particulares y Metas del trabajo:** La descripción de un proceso para el desarrollo de una prueba de diagnóstico fundamentada en la tecnología de los microarreglos de DNA para la identificación específica del virus del dengue., la implementación y estandarización de la estrategia experimental; la puesta en marcha del sistema a fin de generar una evaluación, contemplando las siguientes metas:

- Diseño de oligonucleótidos específicos para el reconocimiento de los diferentes serotipos del dengue.
- La obtención de productos de cDNA a partir de RNA viral.
- Amplificación de fragmentos específicos para el virus del dengue vía PCR.
- Diseño de sondas marcadas específicas para cada uno de los diferentes serotipos del virus del dengue.
- Diseño de una laminilla de microarreglos usando sondas específicas para el virus del dengue.
- Establecimiento de las condiciones de operación de la prueba de diagnóstico con microarreglos.
- Validación del sistema de prueba con muestras de pacientes y mosquitos.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### MATERIAL SEROLOGICO.

El Sector Salud en el Estado de Oaxaca y el IMSS en el Estado de Veracruz reportaron casos con pacientes que cursaban por la enfermedad del dengue, estos fueron clasificados de acuerdo al curso sintomatológico y con los ensayos de detección de IgM (Mac-ELISA), por la propia Secretaría de Salud. (ver Tabla 2).

Debido a que al utilizar éste ensayo quedaban fuera una gran cantidad de muestras, con infección secundaria, se consideró tomar muestras negativas por este ensayo en un número considerable al de las muestras positivas reportadas por el ensayo Mac-ELISA. Y a partir del RT-PCR identificar la presencia del virus.

Un total de 197 muestras del Estado de Oaxaca y 64 del Estado de Veracruz fueron consideradas durante los años 2000-2005. Los sueros fueron separados en alícuotas de 100 µl. Una de ellas fue utilizado para obtener el RNA total de cada muestra, para realizar los ensayos de la reverso-transcriptasa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para tipificar y amplificar el fragmento bajo estudio de las muestras. Los amplificados obtenidos se purificaron, reamplificaron y secuenciaron.

Otra alícuota de 100 µl, se utilizó para infectar células de la línea celular C6/36 para posteriormente realizar los ensayos de inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo (para caracterizar inmunoquímicamente a las muestras).

Adicionalmente se trataron 10 muestras del Estado de Veracruz colectadas durante Julio-Agosto del 2006, y se les dio el mismo tratamiento.

Un grupo de 3 muestras correspondió a los controles negativos de personas sanas del Distrito Federal.

### COLECTAS DE MOSQUITOS.

Se realizaron colectas de mosquitos adultos, durante el periodo de Mayo a Octubre de 1995, en 77 localidades de 19 Estados de la Republica Mexicana (Ver Tabla 3). Estos mosquitos fueron capturados entre las 7 y las 11 de la mañana, y las 4 y las 8 de la noche, con aspiradores mecánicos y/o con trampas de luz U. V. de tipo CDC, usando como atrayente hielo seco, en el interior de vulcanizadoras, panteones y casas, y colocados en hielo para su posterior caracterización y colocados en jaulas separadas para su posterior caracterización entomológica en el Insectario del CINVESTAV-IPN.

Los mosquitos fueron anestesiados en refrigeración, identificados usando las claves taxonómicas y colocados en tubos eppendorf en grupos, pools, de 10 mosquitos, etiquetándolos con el lugar y día de captura, y se almacenaron a -70°C. El criterio para su selección y almacenamiento fue que fueran hembras de *Aedes aegypti*, o *Ae. Albopictus*, grávidas, que hubiesen consumido sangre recientemente, y se les quitaron alas y patas.

### CULTIVOS VIRALES.

Las siguientes cepas referenciales fueron utilizadas como controles positivos, y usadas para optimizar las técnicas de RT y PCR, y analizar su sensibilidad se usaron los stocks de virus de las cepas: dengue 1 (D1:Hawaiian strain-HAI-1944), dengue 2 (D2:New Guinea C strain-NGC-1944, D2:Mexican strain 200787-TRA234-1983), dengue 3 (D3:Philippines strain-H87-1956) y

dengue 4 (D4:Philippines strain-H241-1956), donados por la Dra. Blanca Ruiz del IBB-UNAM (Instituto de investigaciones Biomédicas) y por el Dr. Barry Beaty del AIDL-CSU. Los Virus fueron inoculados en células C6/36 para su propagación en botellas de cultivo (Igarashi, 1978; 1979). Los fluidos infectados fueron cosechados entre una y dos semanas después de la incubación a 36 °C y almacenados a -75 °C hasta su uso.

#### AISLAMIENTO VIRAL.

Para el aislamiento viral se aplicó el método de centrifugación rápida utilizando una línea celular de *Aedes albopictus* (C6/36 HT). Todos los ensayos de infección se llevaron a cabo en placas de 24 pozos. Las células se sembraron a un título de  $2 \times 10^5$  células/pozo, se formó la monocapa a las 24 horas. El sobrenadante se desechó y las células se lavaron 2 veces con medio sin suero fetal. Después se adicionaron 0.2 ml del inóculo del serotipo DENV-2 con un MOI de 200-600 pfu por célula.

Después de 60 min, de absorción el sobrenadante se desechó y se adicionó 1 ml de medio con suero fetal bovino y se incubaron las placas a 32° C durante 48 horas en ambiente saturado al 5% de CO<sub>2</sub>. Se observaron diariamente en búsqueda de efecto citopático (ECP). Si se observaba ECP o en caso contrario al cabo de 11 días de inoculadas, las células fueron lavadas con medio sin suero fetal bovino, se llevó a cabo la fijación utilizando 500µl de paraformaldehído al 4% frío, se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min y se permeabilizaron con TritónX 100 (0.001%).

#### ENSAYO DE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA (IFI).

Monocapas de células infectadas y no infectadas de la línea C6/36 fueron fijadas por 15 min. con 1.8% de formaldehído y 0.2% de glutaraldehído, lavadas con PBS e incubadas con 1 ml de glicina durante 15 min a 28° C. Posteriormente se incubaron en azul de Evans a una concentración de 0.002% en PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.3%. Para detectar la presencia del virus en células C6/36, se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-proteína E del DENV (ATTC clona HB46). Se incubaron durante 60 min y después con el anticuerpo cabra  $\alpha$ -ratón marcado con FITC, a una dilución 1:250, se incubaron durante 60 min. Se guardaron a 4° C para su posterior observación.

#### ENSAYO DE CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS).

Monocapas de células MCK2 crecidas en placas de 24 pozos fueron infectadas con sueros de pacientes reportados sospechosos de cursar dengue y con sueros de pacientes sanos, en una dilución de 1:10 durante 48 hrs. a 28° C. Después se desprendieron las monocapas utilizando una solución de EDTA 5mM en medio MEM sin suero y pipeteando con cuidado para evitar dañarlas o perderlas. Se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min, se lavó la pastilla dos veces con PBS.

Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min, se lavaron con PBS y se incubaron con Triton X100 durante 10 min, se volvió a lavar con PBS. Se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -dengue diluido 1:10.

Se lavó nuevamente con PBS y se volvió a incubar durante 1 hora a 37° C con el anticuerpo conejo  $\alpha$ -ratón fluoresceinado. Finalmente se pasaron por un tamiz de tela de organdí, se guardaron a 4° C para su posterior análisis.

El promedio utilizado como línea de corte fue de 10,000 células. Las muestras fueron analizadas utilizando el FACSsortscan B0333 con el software Cellquest versión 3.3 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.). El equipo fue calibrado con Calibraclon FACSCOMP. Los aislados utilizados fueron de muestras de suero de pacientes convalecientes de la enfermedad con un promedio de 7-10 días del inicio del cuadro sintomático, reportados por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Oaxaca (LESPO-SSA) durante los años 2000 y 2001.

#### EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL DE MUESTRAS DE SUERO.

El RNA total se obtuvo de las muestras colectadas de pacientes con dengue utilizando el método Trizol-LS (GIBCO-BRL Gaithersburg, Md.) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Brevemente, describimos la técnica que consistió en: Adicionar 100  $\mu$ l de suero a un tubo ependorff (1.5 ml) que contenía 1000  $\mu$ l de Trizol. Se agitó brevemente y se incubó la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente. Después se adicionaron 200  $\mu$ l de cloroformo. Se agitó y se incubó la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos a 4° C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio de 1.5 ml y se adicionaron 10  $\mu$ g de glicógeno (2  $\mu$ l) (Ambicon, Austin, Tex.). Enseguida se adicionaron 500  $\mu$ l de isopropanol y se mezcló por inversión el tubo varias veces. Después, se incubó la muestra a -20° C durante 60 min. (ó -70° C por 15 min.). Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4° C y posteriormente se desechó el sobrenadante.

En esta fase se observa una pastilla de RNA la cual se lavó con 1 ml de etanol al 75%. Se centrifugó nuevamente y se desechó el sobrenadante, por inversión del tubo hasta que la pastilla se seco. Finalmente, ésta se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua-DEPC (Harris y col., 1998). Se cuantificó la cantidad de RNA total en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (SmartSpect 3000, Bio-Rad), en un rango de 260-280 nm de longitud de onda. Se obtuvo una concentración promedio del RNA de 78 ng/ $\mu$ l por muestra analizada.

#### EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL DE MUESTRAS DE MOSQUITOS.

Se tomaron los tubos con los mosquitos y se agregó 100  $\mu$ l de buffer de lisis (7 M urea, 0.35 M NaCl, 0.1 M Tris hydrochloride pH. 8, 0.01 M EDTA, 2% SDS) triturando con pistilo "contes" hasta no tener órganos visibles de los mosquitos. Posteriormente se procedió a realizar la Extracción con Trizol como en el caso de las muestras de suero. Nosotros estandarizamos el protocolo para la extracción de RNA en grupos de mosquitos a fin de tener una alta sensibilidad en la detección del virus sin tener degradación del mismo o inhibición de la reacción de PCR cuando se aplicaba a la RT-PCR.

#### DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS (PRIMERS).

Analizamos los datos sobre las secuencias del virus del dengue en la base de datos del Gen Bank (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). Analizamos los genomas completos del virus y seleccionamos algunas de las regiones conservadas entre ellos, comparándolas entre sí. Se seleccionaron cuatro cepas de referencia a fin de realizar dicho estudio: DENGUE 1 (NCBI M87512, Fu et al., 1992; Medline 92263809, SINGAPORE S275/90), DENGUE 2 (NCBI M29095, Putnak et al., 1988; Medline 88150069, NEW GUINEA C), DENGUE 3 (NCBI M93130, Osatomi et al., 1990; Medline 90266483, H87) y DENGUE 4 (NCBI M14931, Zhao et al., 1986; Medline 87293881). Utilizando los programas de alineamiento GCG Versión 8.0, Vector NTI Suite Versión 6.0, y DNASTar Inc. y basándonos en

las regiones conservadas y específicas encontradas para los diferentes serotipos se diseñaron primers para las regiones conservadas y las regiones específicas para cada serotipo, considerando los puntos mencionados en la introducción.

Todos los primers utilizados en este trabajo fueron sintetizados por Invitrogen Life Technologies.

#### ENSAYOS DE REVERSO TRANSCRIPTASA-PCR.

Una importante variación del ensayo de PCR es la posibilidad de replicar RNA templado. Sin embargo, la polimerasa termoestable únicamente replica DNA, el RNA deberá ser convertido primero en DNA complementario (cDNA) por la acción de una enzima con actividad de reverso transcriptasa. Esta reacción de RT-PCR es realizada en dos etapas: conversión del RNA a cDNA en un tubo seguida por la amplificación del cDNA a través de PCR en otro tubo. Sin embargo, una alternativa es realizar los dos pasos en un solo tubo, donde la enzima utilizada presente actividad de reverso-transcriptas, así como de Taq polimerasa y todos los elementos necesarios para la reacción. Los fragmentos para la tipificación y la amplificación se obtuvieron utilizando el kit de SuperScrip One-Step RT-PCR con Platinum Taq (Invitrogen, Life Technologies).

La mezcla de reacción 2X contiene 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8.5), 0.4 mM de cada uno de los dNTP y 2.4 mM de MgSO<sub>4</sub>. Los primers se adicionaron en una concentración de 0.05 µM, se adicionó 5 µl de RNA (75 ng/µl), 1 µl de la enzima RT/Platinum y agua DEPC para llevarlo a un volumen final de reacción de 50 µl.

Las condiciones para la reacción de la Reverso Transcriptasa fueron 50° C durante 30 min, seguido de un paso de desnaturalización a 94° C durante 2 min y la amplificación por PCR fue de 40 ciclos, con una temperatura de desnaturalización de 94° C durante 15 seg, alineamiento a 55° C durante 30 seg y de extensión a 72° C durante 1 min, la extensión final se llevó a 72° C durante 7 minutos.

#### OLIGOS PARA TIPIFICAR SEROTIPOS.

La tipificación de los aislados se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite una amplificación rápida y selectiva de una secuencia corta del genoma que después puede ser identificada mediante hibridación con sondas de cDNA tipo específicas ó análisis del material amplificado (Deubel, 1990). Para la detección de los virus del dengue mediante la amplificación de regiones genómicas, se han utilizado 4 pares de iniciadores específicos o un par de iniciadores consenso que se utilizan en una primera ronda de amplificación seguida de un PCR anidado con iniciadores específicos para la identificación de cada serotipo del dengue (Lanciotti, 1992).

En el presente estudio se utilizaron los oligos propuestos por Henchal y col., 1991, Lanciotti y col., 1992, Seah y col., 1995, Chang y col., 1994; para realizar la tipificación de los serotipos del virus de dengue, se consideraron las regiones de los genes C/prM, NS1, NS3 y NS5, estos están flanqueados con 2 iniciadores consenso; AD3-AD4, D1-D2, CFDJ-FUDJ, DV1-DV3. Y sus correspondientes antisentidos que sustituyen al antisentido consenso y determinan al serotipo correspondiente ( VerTabla 4). Optamos por utilizar el juego de primers reportados por Seah, 1995 para los ensayos de hibridación con sondas. El oligonucleótido DV1 sentido, en el gen NS3, yace en la posición 4928 y DV3 antisentido en la posición 5415, ambos se encuentran en la parte media del este gen. Con sus correspondientes antisentidos para realizar la adecuada

tipificación de los serotipos. Esta región muestra una región variable flanqueada por una región altamente conservada, lo que permite una tipificación óptima (Ver Tabla), (Seah, 1994).

-NS1- Henchal 1991	(Sentido) Tamaño	Secuencia		Posición en Genoma	Tamaño Producto
		AD4 →	← AD3		
		● DSP1 → DSP2 → DSP3 → DSP4 → ● 5'-CTGATTTCCATNCCRTA-3' C TAYGGNATGGAAATCAG			
AD3	(-) 17	1	tacgg atgg aaatcag	3412-3428	
		2	ta cgggatgg aaatcag		
		3	ta tgg catgg aaatcag		
		4	ta tgggatgg aat ag		
		5'-GAYATGGGNTAYTGGATAGA-3'			
AD4	(+) 20	1	gat atggg g at c ggataga	3010-3029	419
		2	gat atggg tatt ggataga		
		3	ga cat ggg ctatt ggataga		
		4	ga cat ggg tatt ggataga		
		5'-GAGGACCAATATCTCAG-3'			
D1	(+) 17	1	g agg acca aat at c cag	3135-3151	265
		2	ct gg acc ag t c acaa		
		3	ct gg cc catt c caa		
		4	cg gg cc ct tt c acag		
		5'-AAGCTTGAGATGGACTTT-3'			
D2	(+) 18	1	a ag tt gga act g at ttt	3235-3252	194
		2	a ag ct gag at gg act tt		
		3	aa att gag ct gg act tc		
		4	aa att gag at g act tt		
		5'-GTCTAGCTGGTCCCATT-3'			
D3	(+) 17	1	t c at g g g g acca ata	3150-3166	271
		2	a tt c g c t g g acc a g g		
		3	g l c t a g c t g g l cc c att		
		4	ca at g c g g g cc ct tt		
		5'-ATCATATGCGGGCCCTT-3'			
D4	(+) 17	1	g at c at g g g g acca a	3155-3171	273
		2	g a att c g c t g g acc ag		
		3	g a g c t a g c t g g l cc ca		
		4	at ca t at g c g g g cc ct		

-C,PreM- Lanciotti 1992 Harris 1998	(Sentido) Tamaño	Secuencia		Posición en Genoma	Tamaño Producto
		D1 →	← D2		
		● TS1 ← TS2 ← TS3 ← TS4 ● 5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'			
D1	(+) 28	1	t ca at at g c t g aa ac g c g c g a g aa ac c g	134-161	
		2	t ca at at g c t g aa ac g c g a g aa ac c g		
		3	t ca at at g c t g aa ac g c g a g aa ac c g		
		4	t ca at at g c t g aa ac g c g a g aa ac c g		
		5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'			
		C GAACCTGAAGACATTGACTGTTGGTGCAA			
D2	(-) 29	1	g a acc g a g a g a c a t g a t t g g t g c a a	616-644	511
		2	g a acc g a g a g a c a t g a t t g g t g c a a		
		3	g a g c c t g a g a c a t t g a t t g g t g c a a		
		4	g a acc t g a g a c a t t g a t t g c t g g t g c a a		

			5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'		
			C CCCC GGATCACTGAGACG		
TS1	(-)	1	ccccggatcacigagacc	568-586	482
		19	tcctttctcaaggcagaat		
		3	ccccacattaccgaagtg		
		4	ccccctactggtaataacc		
			5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'		
			C CTGTT CATGGCCCTTGTGGCG		
TS2	(-)	1	ttgggatggccttcatagca	232-252	119
		21	cigtctcatggccctgtggcg		
		3	ttggctatggcgtttatagct		
		4	atggctctaggcaattcatcacc		
			5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'		
			C GCTCTGTCTCATGATGATGTTA		
TS3	(-)	1	gaccatgctcctcatgctgctg	400-421	290
		22	aggcatgatcaattatgctgatt		
		3	gctctgtctcatgatgatgta		
		4	gataacatggctgtgctgatt		
			5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'		
			5'-TGTTGTCTTAAACAAGAGAGTC-3'		
TS4	(-)		C GACCTCTCTTGTTTAAGACAACAGAG		
DEN4	22	1	agctcactctgtttaagacctctgta	506-527	392
	23	2	aaagtcttctgttcaaacagaggat		389
		3	aatccctacttttaagacagcctct		
		4	gacctctctgtttaagacacagag		

-NS5- Chang 1994	(Sentido) Tamaño	Secuencia		Posición en Genoma	Tamaño Producto
		FUDJ →	← CFDJ		
		● DEN1 → DEN2 → DEN3 → DEN4 → ●			
CFD2-4 CFDJ	(-) 26	5'-TTTGAGCATGTCTTCCGTCGTCATCC-3'	5'-GCATGTCTTCCGTCGTCATCC-3'	9952-9977	
		C GGATGACGACGGAAGACATGCTCAA			
		1 ggatgacaacagaagacatgtgtca			
		2 ggatgacgacggaagacatgctgca			
		3 ggatgactacagaagacatgcttact			
		4 ggatgaccactgaagatgctcaaa			
		5'-GATGACACAGCAGGATGGGAC-3'			
FUDJ	(+) 21	1 gatgacacagcggatgggat		9166-9186	838-832
		2 gatgacaccgaggatgggac			
		3 gatgacacagcgggtgggac			
		4 gatgacacagcaggcgggac			
		5'-GCCTGAACATGCTCTATTGGCT-3'			
DEN1	(+) 22	1 gcctgaacatgctctattggct		9243-9264	761
		2 aggagaacacaagaaactagcc			
		3 ccctgaacacaggcaactagcc			
		4 tcccaccacaagatcctagcc			
		5'-TCTTCAAAGCATTTCAGCACCT-3'			
DEN2	(+) 22	1 tctttcaccagcgatttga		9452-9473	546
		2 tcttcaaaagcattcagcacct			
		3 tgttgtaaaaggcagacctgga			
		4 tcatcacacaagatgacatgca			
		5'-CCCATCCGCTAGAGAAGAAAATTACAC-3'			
DEN3	(+) 27	1 caaatttagccgagagattctcg		9471-9497	522
		2 tcacaagagaaatcccggtgcaaa			
		3 cccatccgctagagaagaaattacac			
		4 caaaagggtgaaagaagagattgaga			

-NS3- Seah 1995	(Sentido) Tamaño	Secuencia	Posición en Genoma	Tamaño Producto
DEN4	(+) 26	5'-GGTTTGGCACTTCCCTCCTTCTTG-3' 1 ggTtcgcaacagcctaacagctctg 2 ggTtcgcaagcgcttaacagctcia 3 gaTtcgccaatgccctgcttcccctg 4 ggttTggcacttcccTcctctcttg	9580-9605	411
DV1	(+) 17	5'-GGRACKTCAGGWTCTCC-3' 1 ggGacatctggatctcc 2 ggaaccicaggatcggc 3 ggaacttcaggatctcc 4 ggaacttcaggctctcc	4918-4934	
DV3	(-) 17	5'-AARTGIGCYTCRTCCAT-3' C ATGGAYGARGCICAYTT 1 atggatgaagcacattt 2 atggacgaagcCattt 3 atggatgaaggCattt 4 atggatgaagcacattt	5368-5384	470
DSP1	(-) 23	5'-AGTTTCTTTTCCTAACACCTCG-3' C CGAGGTGTTTAGGAAAAGAACT 1 cgaggcttttaggaaagaaaaCt 2 tgacatttttcgaaagagaaaaT 3 agagatgttcaaaagcgaaatc 4 ggacatttttcgaaagaaaagat	5045-5067	169
DSP2	(-) 20	5'-CCGGTGTGCTCRGCTGAT-3' C ATCAGRGCYGAGCACACCGG 1 gtgaaagtgaacacacagg 2 atcagagctgagcacacagg 3 acaaaatctgaacacacagg 4 gtgaaatcagaacacacagg	5260-5279	362
DSP3	(-) 23	5'-TTAGAGTYCTTAAGCGTCTCTTG-3' C CAAGAGACGCTTAAGRACTCTAA 1 aagaaggaaagtgccgacactaa 2 aaaaaggggcctgaggacattaa 3 caagagacgcitaggactctaa 4 aaaaaggaggctaccgactttga	5152-5174	265
DSP4	(-) 23	5'-CCTGGTTGATGACAAAAGTCTTG-3' C CAAGACTTTTGTCAACAACCAGG 1 tgcgctcctgtcccgtgaga 2 tgaggctgctatcaccagttaga 3 tgcgcttgcgtcaccagtcagg 4 caagactttgtcatcaaccagg	5320-5342	426

**Tabla 4.** Alineamiento múltiple para los diferentes serotipos del virus del dengue (GCG Program v. 8.0), donde se muestran las regiones de alta homología y las regiones internas que presentan alta variabilidad.

\* La posición de los nucleótidos en los diferentes grupos de primers es aproximada y esta basada en la secuencia consenso. La zona gris indica la presencia de GAPs (Mutaciones por delección de una base).

La nomenclatura contenida en la figura es como sigue:

(+) = Orientación Sentido, (-) = Orientación Anti Sentido.

I=Inosina, K=G o T, W=A o T, Y=T o C, R=G o A, N= A, G, C o T (Degenerado al 25%)

## ELECTROFORESIS HORIZONTALES EN GELES DE AGAROSA.

El análisis de los amplificadores en geles de agarosa de DNA, se realiza mediante electroforesis en geles de agarosa. La agarosa es un polisacárido purificado del agar que usado a concentraciones del 1.5 y 3% separa fragmentos de entre 200 y 2000 pares de bases; Aunque hay agarosas especiales para una mejor resolución cuando se utilizan fragmentos más pequeños (Harris y col., 1998). Para hacer el gel de agarosa se disolvió en un matraz Erlenmeyer 1.8 g de agarosa (Ultra Pure DNA Grade Agarose, Bio-Rad ) en buffer TBE 1X (Tris-Borato-EDTA), junto con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma E-7637) y se calentó hasta la ebullición en un horno de microondas por 3 min hasta que quedo totalmente transparente y sin burbujas. Se vacían de 30 a 60 ml, dependiendo del tamaño del cargador y de la cámara donde se realizará la corrida electroforética.

Se colocó el peine para hacer los pozos y se deja polimerizar durante 15 min. Se retira el peine y se pone en la bandeja de electroforesis que contienen buffer TBE 1X. Una vez preparado se adicionan 10 µl del producto de amplificación mezclado con 2 µl de buffer de carga (glicerol 50%, EDTA 20%, azul de bromofenol 0.1%, xilen cyanol 0.1% y agua bidestilada para llevar a 1 ml).

Se incluyen dentro de la corrida electroforética marcadores de peso molecular (ΦX-174 ó de 100 pb), controles interno, positivo y negativo, para la reacción de RT-PCR. Se utiliza un voltaje de 90 V por 1 hora. Una vez hecha la corrida se visualiza el producto a través de un transiluminador de luz ultravioleta, UV (UV Transilluminator 2000, Bio-Rad) y para la obtención de las imágenes se utilizó el equipo Foto-Dye que consta del UVP mini-darkroom y un equipo fotográfico (UVP Solutions for the Science of life, UVP, Inc., Upland, CA, USA) asociado a su software (LabWorks, Image Acquisition and Análisis Software, UVP, Inc., Upland, CA, USA), en donde se analizará el tamaño del producto amplificado.

## REAMPLIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE RT-PCR.

Los productos de RT-PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1.8%, donde se observan los tamaños esperados de los amplificadores. En algunas ocasiones fue necesaria la reamplificación de los productos utilizando la enzima Taq DNA-Polymerase (5,000 U/ml) (Bio-Labs, Inc., New England). La reacción se llevó a un volumen final de 25 µl, adicionando 3 µl del amplificado, 2.5 µl del buffer de reacción 1X (10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100), 0.5 µl de la enzima (2.5 unidades) y el resto con agua destilada estéril. La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera: Un ciclo de desnaturalización a 94° C durante 1.30 min, y 30 ciclos de reamplificación, con una temperatura de desnaturalización a 94° C durante 15 seg, de alineamiento a 55° C durante 25 seg, de extensión a 72° C durante 30 seg, y un ciclo final de extensión a 72° C durante 3 min.

## PURIFICACIÓN DE LOS AMPLIFICADOS.

Para concentrar el DNA de las muestras, remover los dNTP's de las reacciones precedentes y purificar las muestras de proteínas ó sales, se utilizó el kit Wizard® DNA Clean Up System (Promega Co.), el cuál proporciona un forma simple y efectiva para purificar DNA linear o circular (200-50,000 pb), este procedimiento se puede realizar en 15 minutos, sin el uso de extracciones orgánicas o precipitaciones con etanol. El DNA es eluido de la resina del sistema Wizard® Clean Up utilizando agua estéril ó el buffer TE.

Para esto, en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se colocó 1 ml de resina Wizard® Clean Up, a un volumen de entre 30 a 50  $\mu$ l del amplificado, se mezcló por inversión varias veces. Enseguida la mezcla se vació en una jeringa hipodérmica de 3 ml, a la cual se le adaptó una minicolumna Wizard® de separación y con el émbolo se presiona cuidadosamente para que caiga lentamente la resina y el DNA quede fijado a la minicolumna. Posteriormente, se agregan 2 ml de isopropanol al 80%, se vuelve adaptar la minicolumna a la jeringa para lavar los restos de resina. Nuevamente se presiona con el émbolo y se desecha el líquido. Se realizaron 2 lavados. Se centrifugó la minicolumna previamente colocada en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, a 10,000 x g durante 2 min, para eliminar el exceso de isopropanol.

Luego la minicolumna se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf en donde se agregaron 20  $\mu$ l de agua bidestilada estéril a 70° C y se esperó 1 min. Volviéndose a centrifugar la minicolumna por 20 seg a 10,000 x g, para eluir el DNA unido. Finalmente, se removió la minicolumna. El DNA purificado se almacena en un tubo Eppendorf a 4° C.

#### REACCIÓN DE TERMINACIÓN DE LA SECUENCIACIÓN.

Después de realizar la purificación de las muestras de DNA, estas se pueden utilizar para llevar a cabo la secuenciación de los amplificados. La secuenciación se realizó en el secuenciador automático ABI PRISM® Sequencer y se utilizó el sistema de terminación de reacción de la secuenciación Big-Dye™ Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A un tubo Eppendorf de 250  $\mu$ l se le agregó: 8  $\mu$ l de la mezcla de reacción Big-Dye, 8  $\mu$ l del DNA del amplificado purificado (40 ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l del primer sentido ó del primer antisentido (12 pmol/ $\mu$ l) y 3  $\mu$ l de agua estéril, para llegar a un volumen final de 20  $\mu$ l.

El PCR consistió en 25 ciclos utilizando el Termociclador (Gene-Amp 9700; Applied Biosystem, Foster City, CA, USA.), con el siguiente protocolo de temperaturas; desnaturalización: a 96° C durante 10 seg, alineamiento: a 60° C durante 10 seg y una extensión: a 60° C durante 4 min.

#### PURIFICACIÓN EN COLUMNA DEL SECUENCIADO.

Inmediatamente después de la reacción de secuenciación se lleva a cabo la purificación de la muestra utilizando columnas CENTRI-SEP (Princeton Separations P/N CS-901), para remover el exceso de los fluorocromos de la reacción de terminación de la secuenciación Big Dye™. Para realizar el proceso se hidrato la columna Centri-Sep con 800  $\mu$ l de agua estéril o buffer TE, durante 30 min., a temperatura ambiente, removiendo las burbujas de aire de la columna por inversión cuidadosa varias veces.

Se quitó el exceso de líquido por gravedad, de la columna se vertieron entre 200-250  $\mu$ l. Para eliminar totalmente el líquido se centrifugó a 750 x g, durante 2 minutos, se vertieron 300  $\mu$ l. Se deben procesar las muestras inmediatamente, evitando que la columna se seque.

Se transfirieron los 20  $\mu$ l de la reacción de terminación de la secuenciación, se dirigieron exactamente al centro de la columna.

Después, se colocó la columna en un tubo Eppendorf de colecta, se centrifugó a 750 x g, durante 2 minutos. La muestra se colectó en tubo Eppendorf. Finalmente, la muestra se procesa para su secado en una centrifuga de vacío. No se debe aplicar calor. La muestra seca se guarda a 4° C para su posterior procesamiento en el sistema ABI PRISM®.

## DISEÑO Y FABRICACION DEL MICROARREGLO:

### Sondas.

Generalmente se amplifican clonas de una librería de expresión, muchas de estas incluyen secuencias “marcadas” que pueden corresponder a un gen no conocido (ESTs o Expressed Sequence Tags) o bien, pueden ser fragmentos amplificados por PCR de genes de interés. Dependiendo de la fuente de las clonas, es recomendable secuenciarlas ya que se han reportado muchos casos de contaminaciones. Knight, 2001. La ventaja de las clonas sobre los fragmentos de genes es que se pueden usar iniciadores universales, de esta manera se logra un ahorro de tiempo en la amplificación. Por otra parte, los fragmentos génicos amplificados se pueden emplear comúnmente para el uso de un microarreglo diagnóstico, que con un número pequeño de genes, permita rápidamente responder una pregunta biológica. Tomiuk y Hofmann, 2001.

Antes de ser depositados los productos de amplificación, estos deben de ser purificados para remover enzimas, nucleótidos, sales y otros compuestos, de lo contrario estos podrían interferir con la unión al soporte y comprometer la eficiencia de la hibridación. Esto se logra fácilmente con diversos “kits” comerciales. El tamaño de los fragmentos de DNA que se ha reportado va desde las 300 hasta 2,500 bases, pero es importante señalar que entre más grande es un producto, más moléculas se requerirán de éste para garantizar la eficiencia de la hibridación. Bowtell y Sambrook, 2003. Así mismo, la homología entre las sondas no debe de ser mayor al 80%, de otra manera podría haber falsos resultados positivos. Para poder garantizar la hibridación, el material genético debe estar en una cadena sencilla. Esto se puede lograr a través de distintos agentes desnaturizantes que servirán además para depositar el material genético sobre el sustrato. Un agente eficaz es el DMSO al 50% ya que además de desnaturizar al DNA, tiene baja velocidad de evaporación y produce puntos de tamaño y forma uniformes. A los puntos de material genético sobre la laminilla se les conoce como “spots” y al conjunto de “spots” se conoce como “patch”.

Los primers específicos para los serotipo 1, 2, 3 y 4 fueron marcados con 6FAM, TAMRA, Cy5 y 6FAM respectivamente, purificados y eluidos por HPLC (Grado RP) y utilizados como sondas. Todas las sondas fueron sintetizadas y marcadas por MIDLAND (The Midland Certified Reagent Company, Inc. TX).

### Controles.

El análisis de los microarreglos es complejo, por lo que es necesario imprimir controles efectivos que durante todo el procedimiento nos ayudarán a comprobar su éxito.

*Controles Positivos.* Aseguran que se detectará una señal:

1. DNA genómico marcado fluorescentemente. Durante todo el proceso éste podrá observarse fluorescentemente y dará información sobre el estado del material genético conforme se avanza. La desventaja radica en que la fluorescencia disminuirá con el tiempo.

2. Una mezcla o “pool” de todos los elementos en el arreglo. Así se asegura la presencia de una señal después de llevar a cabo la hibridación. Este control también puede diluirse sucesivamente y así permitirnos cuantificar la intensidad de la hibridación.

3. Genes que se expresan constitutivamente además de ser controles positivos de hibridación, pueden servir para determinar la normalización respecto a los demás genes.

*Controles Negativos.* Aseguran que no se detectará una señal:

1. Genes de organismos sin relación al experimento, de preferencia con el mismo contenido de guanina y citosina (G+C) y longitud similar a los demás genes. Una señal de hibridación con estos genes indicará que las condiciones de hibridación no son las óptimas.

2. Una solución en la que se mezcla el material genético pero sin este último, asegura que después de la hibridación no habrá señal en esa área. Esta área después puede servir para calcular la señal de fondo y continuar con el análisis de la imagen.

3. Material genético con secuencias repetitivas como "Cot-1-DNA", poli-dA o DNA de esperma de salmón sonicado. Se monitorea la eficiencia de la hibridación de manera que si en esta no se bloquean correctamente las secuencias repetitivas de los blancos, habrá una señal donde no se espera.

*Control de Rango Dinámico.* Detecta la sensibilidad de la hibridación:

1. mRNA de algún organismo sin relación al experimento, de manera que se pueda obtener su secuencia complementaria al DNA, ésta se imprime. Posteriormente, se adiciona (spiking) este mRNA (spike) en cantidades conocidas a las muestras antes de marcarlas y obtener el cDNA. Después de la hibridación, se podrán cuantificar las señales y determinar el rango dinámico lineal del escáner, que permite calcular la sensibilidad de la hibridación.

*Control de Radio o del Grado de Marcaje.* Detecta la eficiencia de marcaje con distintos fluorocromos:

1. Diferentes secuencias de mRNA en diferentes concentraciones que se adicionan a las muestras por separado antes de marcarlas. Posteriormente, se calcula la intensidad para cada señal (radio) y se comparan de acuerdo a lo adicionado para cada muestra.

*Control de Integridad del RNA.* Detecta la calidad del mRNA marcado:

1. Secuencias de la parte 5', central o 3' de un mismo gen. Después de la hibridación no debe haber diferencias significativas entre las señales de los distintos puntos, ya que corresponden al mismo gen.

### Concentración.

Para obtener resultados precisos durante la hibridación, las sondas deben estar en exceso respecto al blanco, o bien, en una concentración elevada para no saturar las señales pero a la vez en una concentración óptima para no exceder el número de moléculas y alterar la morfología del "spot". Dependiendo del sistema de cada laboratorio las concentraciones de material genético pueden ir desde 100 hasta 500 ng/μl pero la concentración óptima generalmente se determina empíricamente.

### Réplicas.

Para tener confiabilidad en los resultados se debe depositar un mismo gen o muestra al menos dos veces a lo largo del microarreglo y de esta manera reducir la variabilidad. El número de réplicas depende del número de genes representados, del espacio y características del arreglo. Pero debe tomarse en cuenta que a mayor número de réplicas, menor va a ser la intensidad de señal para cada una de éstas después de llevarse a cabo la hibridación, este fenómeno es conocido como "probe depletion". Usualmente se duplican los elementos del arreglo en diferentes posiciones.

### Distribución.

Es importante considerar la ubicación de los genes, los controles y sus réplicas; ya que no nada más se ha observado variación entre laminillas iguales, sino también entre distintos sitios de las sondas de una misma laminilla.

### Soporte.

La composición básica de la laminilla que sirve de soporte es vidrio a base de sílice, la diferencia radica en el recubrimiento químico de ésta. En los primeros trabajos publicados, se utilizó poli-L-lisina; con esta simplemente se sumergen las laminillas de vidrio en una solución especial bajo condiciones rigurosas y procedimientos delicados para que después de algunas semanas se obtengan laminillas de buena calidad, es decir, estas están totalmente planas, no dan señales de fondo y tienen buena retención de las moléculas de DNA. Eisen y BROS, 1999. Más adelante aparecieron los silanos, como el gama amino propil silano (GAPS) que gracias a su unión covalente con el vidrio ofrece una superficie muy uniforme, alta capacidad de unión con el DNA y durabilidad. Estas características son críticas para la reproducibilidad de los resultados. Estos compuestos permiten formar interacciones iónicas entre los nitrógenos de los grupos amino libres (cargados positivamente) y los oxígenos de los grupos fosfato (cargados negativamente) de los ácidos nucleicos.

La tecnología de los microarreglos va avanzando día con día y no es raro encontrar nuevas aplicaciones en cualquier parte del procedimiento para la fabricación y análisis de estos con el fin de mejorar la calidad de los resultados y/o abatir los costos de producción. Un simple ejemplo es el uso de otras superficies químicas, como el uso de pequeñas capas de polielectrolitos que forman una red tridimensional donde los ácidos nucleicos son atrapados e inmovilizados mediante adsorción electrostática, con este tipo de superficie se han observado resultados muy prometedores. Zhou, 2004.

### Impresión.

Consiste en depositar las sondas sobre la superficie a través de un equipo automatizado.

### Equipo.

Generalmente se usan impresores de contacto. Típicamente es un sistema que consta de un robot y de áreas donde se colocan las muestras en placas de 96 ó 384 pozos y donde se inmovilizan hasta cientos de laminillas, dependiendo del sistema. El sistema consta de un brazo robótico con un cabezal, el cual contiene los aplicadores, el brazo se desplaza con gran precisión horizontalmente sobre los ejes X e Y y verticalmente sobre el eje Z; de manera que al ser aplicadas las muestras en el rango de nanolitros mediante capilaridad, éstas reaccionan con la superficie química. Los aplicadores consisten generalmente en pequeñas puntas o agujas sólidas con una pequeña ranura en el interior, donde se carga la muestra. La precisión del robot permite la miniaturización, por ello se pueden crear puntos en el rango de micrómetros interseparados mínimamente para dar a los microarreglos una de sus principales características, una alta densidad de "spots".

### Características del "spot".

Los puntos deben ser uniformes en cuanto a tamaño y forma. Deben de contener cantidades iguales de ácidos nucleicos. Se deben de poder discernir bien entre ellos. Esto se logra

calibrando cuidadosamente cada una de las puntas ya que son determinantes en la morfología del “spot”.

#### Factores ambientales.

El control ambiental es determinante al momento de la impresión. Esta última se tiene que llevar a cabo en ambientes limpios que contengan el menor número posible de partículas suspendidas, ya que éstas pueden producir señales de fondo durante el análisis de los microarreglos. El uso de volúmenes tan pequeños, se ve altamente alterado por la humedad y la temperatura. Estos pueden provocar grandes cambios en la concentración debido a la evaporación cuando existe una muy baja humedad y muy alta temperatura. En forma inversa, los “spots” pueden tener una morfología alterada si la humedad es muy alta y la temperatura muy baja. Es por eso que es importante el control de estas variables. Se ha reportado una humedad relativa entre 45 y 55%, así como una temperatura entre 20 y 25°C como óptimo. Hedge, 2000.

#### Fijación.

Este procedimiento tiene la finalidad de inmovilizar fuertemente, por medio de un enlace covalente, las moléculas de ácidos nucleicos sobre la superficie.

#### Rehidratación.

Para poder distribuir uniformemente los ácidos nucleicos sobre el “spot”, después de la impresión se hidratan las laminillas con vapor de agua, después se secan sobre una superficie caliente y se procede a inmovilizar el DNA.

#### Inmovilización.

Un método para inmovilizar el DNA es usando un horno convencional a temperatura constante de 80°C durante dos horas. Un método más rápido y efectivo consiste en el entrecruzamiento por luz ultravioleta (UV), lo cual incrementa la unión de moléculas de ácidos nucleicos sobre la superficie, debido a que los grupos carbono de la laminilla forman enlaces covalentes con los grupos carbono de las bases nitrogenadas del DNA. Generalmente se usan desde 150 hasta 600 mJ.

#### Limpieza y bloqueo.

Las laminillas se colocan en soluciones de detergentes y agua ultrapura para remover los ácidos nucleicos libres. La presencia de grupos amino libres sobre la superficie puede provocar señales de fondo indeseables debido a uniones inespecíficas durante la hibridación, perdiendo además sensibilidad. Estos grupos se pueden bloquear mediante el uso de distintas sustancias químicas o moléculas de DNA o proteínas que no interfieran con el experimento. Al final se vuelven a limpiar las laminillas de la misma manera.

Como control de calidad dentro de la fabricación del arreglo, se tienen que verificar las sondas, controles y tener laminillas de la mejor calidad. Después se procede a la impresión de una de éstas y para poder observar la morfología de los “spots”, se pueden emplear varios métodos. Uno es hibridar la laminilla con oligonucleótidos marcados y complementarios al sitio común de amplificación de las sondas.

Otro método es teñir con algún colorante que sea sensible para la detección de ácidos nucleicos de cadena sencilla como el "SYBR Green II". La desventaja de este método es que no permite medir la disponibilidad de las sondas para los blancos.

## RNA Y MARCAJE DEL BLANCO.

### Aislamiento del RNA.

Como se vio previamente la calidad del RNA es determinante ya que su degradación se va a reflejar en la pérdida de expresión génica. Se tiene que poner énfasis en los métodos de aislamiento, purificación y almacenamiento.

Habíamos mencionado que existen diversos métodos para el aislamiento ya sea del RNA total o del mensajero. Entre estos se encuentran métodos básicos y muchos "kits" comerciales, que deberán ser elegidos dependiendo de los criterios del investigador. Los criterios de elección residen en la integridad, cantidad y pureza del RNA; así como los tiempos de operación y costos. Un método muy usado que cumple satisfactoriamente con estos criterios es el "TRIZOL", para la extracción total de RNA.

Cuando se trabaja con líneas celulares la cantidad de RNA no es un problema pero si se trabaja con muestras de pacientes, muchas veces la cantidad de RNA es un factor limitante. Debido a esto, ahora existen "kits" comerciales que permiten amplificar linealmente RNA en buenas cantidades. El método se basa en la obtención de cDNA, una posterior degradación del RNA, la adición de primers específicos que permitirán obtener cDNA de doble cadena; finalmente se amplifica con una RNA polimerasa dependiente de DNA.

Las moléculas de RNA mensajero llevan la información codificada por los genes para después ser traducida y formar proteínas. Estas moléculas corresponden entre el 1 y 2 % del RNA total. Los niveles de transcritos pueden representar desde una hasta miles de moléculas de un solo tipo, dependiendo de las condiciones ambientales de cada tipo de célula dentro de un organismo. Se dice que el tamaño de los transcritos va de cientos hasta 20,000 nucleótidos, con un promedio de 1,500. Esto resulta importante ya que el método ideal de marcaje tiene que representar preferencialmente, todos los niveles de los transcritos, así como el tamaño de estos.

### Marcaje fluorescente.

El uso de distintos fluorocromos permite el análisis simultáneo de distintas muestras, ofreciendo además seguridad, rapidez, durabilidad y gran sensibilidad para su detección. La desventaja en su uso radica en las precauciones que se tienen que tomar en cuenta porque su naturaleza química, le confiere un proceso continuo de pérdida de energía en forma de calor y por ello disminuye su fluorescencia. Esto se incrementa cuando hay condiciones de luz intensas, lo que se conoce como "photobleaching". Esto ocurre en la mayoría de los fluorocromos comunes pero los colorantes conocidos como carbocianinas (Cy) son muy resistentes a este fenómeno.

El uso de los colorantes Cy ha sido exitoso ya que sus longitudes de onda de excitación y emisión de fluorescencia son muy distintas entre sí, por lo que no hay traslape entre éstas y al usarlos en combinación, se pueden analizar varias muestras. Los colorantes se pueden conjugar fácilmente con varios grupos químicos de diversas moléculas tales como proteínas, lípidos o carbohidratos; en el caso de ácidos nucleicos los más empleados han sido los Cy3 y Cy5, los cuales se acoplan a una molécula de citosina o uracilo. Aunque ahora ya existen muchos otros colorantes como los llamados "Alexa" que han mostrado resultados satisfactorios.

### Métodos de marcaje.

Existen distintos métodos que permiten marcar fluorescentemente los ácidos nucleicos. Lo importante radica en el número de moléculas que deben estar incorporadas en el cDNA, ya que una baja densidad de marcaje resultará en baja sensibilidad para la detección y una alta densidad de marcaje provocará que los fluorocromos adyacentes entre sí, absorban su energía, mermando así la fluorescencia. A este fenómeno se le conoce como "fluorescent quenching". Otro punto importante es que sea cual sea el método de marcaje elegido, no debe existir una diferencia significativa entre la densidad y distribución de los fragmentos marcados provenientes de muestras distintas, a pesar de que se usen distintos colorantes. Esto se puede determinar mediante un cambio de colorante (dye-swap) para cada muestra.

Ya sea a partir de RNA total o mensajero, generalmente se realiza la síntesis in vitro de cDNA con oligo dT, ya que la mayoría de los transcritos expresados en una célula contienen cola de poli-A. Durante la síntesis se incorporan los nucleótidos normales y los modificados que pueden estar marcados fluorescentemente. Dependiendo del sistema, existen diferentes estrategias para el marcaje del blanco, ya sea cDNA o RNA. Para el marcaje de cDNA hay básicamente dos métodos de marcaje, el directo e indirecto.

#### Marcaje directo.

Consiste en la incorporación directa de los nucleótidos modificados y marcados en la reacción de transcriptasa reversa (RT). El método más conocido es el marcaje en la síntesis de la primera cadena de cDNA ya sea con oligo dT, iniciadores al azar o específicos. La ventaja en el uso de estos primers al azar, radica en que la longitud de los transcritos marcados es mayor que la de los obtenidos con primers específicos.

#### Marcaje indirecto.

Durante la RT se incorporan nucleótidos modificados que posteriormente se marcan fluorescentemente a través de una reacción química. Otra opción es que de la misma manera, se puede marcar el cDNA con agentes químicos. Un método muy empleado es el postmarcaje del cDNA, esto se logra con la incorporación de nucleótidos aminoalil, los que al contener un grupo amino libre, pueden reaccionar posteriormente con el fluorocromo.

Es importante la elección del método ya que la eficiencia de la incorporación directa de nucleótidos modificados de gran tamaño (colorantes Cy), disminuirá debido a que las enzimas tienen una especificidad natural por los nucleótidos normales. En la síntesis de la primera cadena no se producen moléculas largas de cDNA debido a la incorporación de moléculas grandes y esto resulta en bajo rendimiento de cDNA. Si se disminuye la frecuencia de incorporación de nucleótidos, se comprometerá la densidad de marcaje y por lo tanto la sensibilidad. Ahora, una alta frecuencia favorecerá el "quenching" entre los nucleótidos. Tiene que existir un balance óptimo entre estos factores mediante el uso de distintas concentraciones de nucleótidos marcados, y esto demanda mucho esfuerzo. La purificación es importante porque elimina los nucleótidos no incorporados y así no crea señales de fondo durante la hibridación.

En el post-marcaje de cDNA hay mayor eficiencia de incorporación respecto al método anterior ya que los nucleótidos son de menor tamaño y éstos, al no diferir en su estructura química, pueden producir cDNAs con una gran densidad de marcaje. Bowtell y Sambrook, 2003. Las precauciones que se tienen que tomar en cuenta, radican en la eliminación de todos los

componentes que son usados durante la primera reacción química porque los grupos amino libres pueden reaccionar con éstos. Después del marcaje, que también debe de optimizarse, se procede a eliminar los colorantes en exceso sino causarían grandes señales de fondo.

Como control de calidad se tiene que determinar la integridad, concentración y pureza del RNA. Esto se realiza generalmente mediante electroforesis y espectrofotometría. Respecto al marcaje de cDNA, se usan los mismos métodos; pero además se debe de determinar la eficiencia del marcaje. Un método es calculando la densidad de marcaje, que se expresa como los picomoles de colorante incorporado en microgramos de ácido nucleico, o bien, se puede convertir en número de moléculas de colorante por 100 nucleótidos.<sup>151</sup> Otro método empleado es la determinación de la frecuencia de incorporación (FOI). La FOI se define como el número de nucleótidos marcados e incorporados directamente por cada 1000 nucleótidos. Para tener sensibilidad en la hibridación, se recomienda que el valor mínimo de la FOI sea al menos de 20. Como ya se dijo, se tiene que optimizar el proceso de marcaje dentro de cada sistema. El experimento amarillo (yellow experiment), permite marcar una misma muestra por separado con distintos fluorocromos (generalmente Cy3 y Cy5) y después de la detección se puede obtener información no solo sobre el marcaje, sino también sobre el balance de las sondas representadas y en general, proporcionar información útil sobre el funcionamiento del sistema, como la hibridación.

Algo importante de señalar es que, dependiendo de la estrategia que se esté llevando a cabo, puede emplearse un RNA de referencia. Este se puede comparar con varias muestras que cambian su expresión conforme pasa el tiempo, por ejemplo, debido a la acción de una droga. Un RNA de referencia muy conocido se conforma de 11 líneas celulares bien establecidas. Este procedimiento fue propuesto por los investigadores de la Universidad de Stanford; sin embargo, existen sistemas de tipo comercial que sirven para el mismo fin. Bowtell y Sambrook, 2003.

## PROCESO DE HIBRIDACION.

### Prehibridación.

Sirve para remover los ácidos nucleicos que no pudieran estar unidos a la superficie y para bloquear los grupos reactivos libres que se pueden unir inespecíficamente a los blancos. Dependiendo de la superficie química se usarán soluciones amortiguadoras de pH (buffers), durante tiempos específicos con diferentes moléculas que reaccionarán con estos grupos libres bloqueándolos. Se ha usado eficazmente una solución de albúmina al 1% para este fin. Hedge, 2000.

### Hibridación.

Lo que se debe lograr idealmente en cada hibridación es alcanzar la máxima intensidad de la señal con el mínimo fondo fluorescente, alcanzar la mínima unión de blancos y sondas que comparten pequeñas regiones de homología (minimum cross-hybridization) y asegurar que la intensidad de la señal sea proporcional a la concentración de los transcritos.

La hibridación se realiza en pequeños volúmenes (no más de 100  $\mu$ l) por medio de un cubreobjetos, que permite la interacción de la solución con la laminilla en una pequeña área. De hecho el volumen ideal de hibridación según algunos investigadores debe ser de 0.033  $\mu$ l por cada mm<sup>2</sup> del cubreobjetos. Al colocar el cubreobjetos, se debe de tener mucha precaución porque la presencia de burbujas puede comprometer el experimento. Este método requiere de una cámara de hibridación con humedad y temperatura controladas, que prevenga que la solución se evapore y el área se seque.

### Componentes y factores.

La naturaleza de las moléculas de ácidos nucleicos determina qué componentes y factores se deben de tomar en cuenta para llevar a cabo una hibridación óptima. Un valor calculado a partir de las propiedades físicas de los ácidos nucleicos es la  $T_m$  (melting temperature) o temperatura de disociación, que se define como la temperatura a la cual el 50% de las moléculas de DNA están unidas con su cadena complementaria y el resto se encuentran libres. En el caso de los microarreglos, las sondas no se encuentran en solución sino unidas a la superficie, pero los parámetros termodinámicos tienen mínimas diferencias que permiten considerar los mismos factores y componentes críticos para una hibridación; éstos a su vez, están relacionados con la  $T_m$  de los ácidos nucleicos. Ésta depende del tamaño y del contenido de guanina y citosina (G+C) de la molécula de DNA, la fuerza iónica, temperatura, viscosidad y pH de la solución.<sup>159</sup> La  $T_m$  sirve para establecer la temperatura óptima de hibridación respecto a muchos parámetros y se puede determinar a través de “softwares”, pero sólo cuando se usan en el sistema oligonucleótidos de poco tamaño (hasta oligonucleótidos en el orden de 60 bases) ya que las diferencias van siendo mínimas conforme se incrementa la longitud de la cadena de DNA. Los híbridos de tamaño largo son más estables que los pequeños y a pesar de que tienen una alta  $T_m$ , no existen cambios considerables cuando se trata de híbridos de más de 100 pares de bases o con contenidos de G+C distintos, ya que son estabilizados por los otros componentes de la solución. Es por eso que en las hibridaciones de microarreglos de cDNA, usualmente se utiliza una temperatura de 65°C en soluciones acuosas y 42°C cuando se utiliza una solución de formamida al 50%. La formamida reduce la  $T_m$  de los ácidos nucleicos en solución, ya que interacciona débilmente con las bases de éstos, evitando que se formen los puentes de hidrógeno. Se dice que cada 1% de formamida reduce en 0.65°C la  $T_m$ . La ventaja de la formamida es que reduce la hibridación no específica y las señales fluorescentes de fondo. La elevada concentración de sales como el sodio y citratos (SSC o SSPE), estabilizan los híbridos al unirse a los grupos fosfato de ambas cadenas del DNA, debido a que reducen los efectos repulsivos entre las moléculas. Esto sólo se puede llevar a cabo si el pH de la solución es neutro, si el pH es ácido, se daña el DNA debido a la despurinación. En la solución también va presente un detergente que permite disminuir la tensión superficial, de esta manera los componentes fluyen fácilmente sobre el área expuesta.

Otros componentes que deben estar presentes en la solución son los bloqueadores. Muchas moléculas de cDNA contienen secuencias repetitivas que pueden unirse entre sí, pero además contienen la cola de poli-dT que se forma en la RT. Para evitar esto se adicionan secuencias repetitivas como Cot-1-DNA o esperma de salmón sonicado (con un tamaño óptimo de 50 a 100 pares de bases) y poli-dA para bloquear las colas de poli-dT.

Los blancos también deben ser adicionados a la solución en concentraciones que sean exactamente iguales si la intención es comparar los perfiles de expresión entre distintos tipos celulares. En algunos sistemas se recomiendan 30 pmoles de fluorocromo en cada muestra marcada.

Además de la temperatura que debe ser constante, el tiempo y el movimiento son factores determinantes. El tiempo mínimo de la hibridación debe ser de 16 horas pero se ha reportado que entre más tiempo se dejó, más sensibilidad se podrá observar hasta cierto tiempo donde la cinética de hibridación se encuentre en equilibrio.<sup>152</sup> De la misma manera ocurre con la agitación, ya que a pesar de estar en un área pequeña, muchas veces todos los blancos no logran desplazarse y encontrar a sus sondas respectivas; es por eso que muchas veces se observan variaciones en una misma laminilla con las mismas réplicas de las sondas.<sup>160</sup> La

sensibilidad de la hibridación está dada por la intensidad de las señales de hibridación y de fondo, así como de la sensibilidad del escáner.

#### Lavados post-hibridación.

El propósito de realizar lavados después de la hibridación es remover los blancos que no se hayan unido y que producen señales de fondo, así como despegar secuencias débilmente unidas que no son complementarias entre sí. Los lavados deben llevarse a cabo en condiciones óptimas de astringencia para evitar que se pierda la intensidad de las señales. Después de lavar las laminillas, se tienen que secar y analizar inmediatamente con un lector especial o escáner.

El control de calidad durante la hibridación reside en la perfecta preparación de las soluciones con el menor número posible de partículas. Cuando se manejan fluorocromos se debe de evitar cualquier fuente de luz. Los tiempos, temperaturas y concentraciones deben de ser perfectamente medidos. Gracias a los controles que lleva cada laminilla, se puede saber si las condiciones en las cuales se lleva a cabo la hibridación son las óptimas, de lo contrario se tiene que mejorar la metodología.

Otro punto muy importante son las réplicas técnicas, es decir, la repetición de las hibridaciones para cada muestra y así poder realizar un análisis estadístico, reduciendo la variabilidad entre cada experimento.<sup>161</sup> La técnica de "dye-swap" contribuye con esto ya que consiste en reproducir la hibridación de la misma muestra pero alternando los fluorocromos.

#### DETECCION, CUANTIFICACION E INTEGRACION DE LAS SEÑALES, NORMALIZACION.

##### Sistemas.

Existen los de movimiento rápido y estacionarios (scanners & imagers). Los primeros son los más comunes y para detectar la fluorescencia, deben de contar con una fuente de excitación dirigida hacia las muestras a través de un sistema óptico (lentes, espejos y filtros), para poder detectar y amplificar la luz emitida de cada fluorocromo mediante un tubo fotomultiplicador, que transforma la fluorescencia en señales análogas de energía eléctrica, proporcionales al número de fotones detectados. La digitalización convierte las señales análogas en valores discretos (a través del sistema binario 0 o 1), dependiendo de las diferentes intensidades de señal y basándose en la resolución de la imagen, y se representan en los "bits" de un tipo de imagen que se conoce como de formato TIFF (Tagged Image File Format). Los "bits" generalmente pueden ser de 4 hasta 16 dependiendo de los criterios de selección, pero las imágenes de 16 "bits" son más precisas ya que contienen 65,536 valores distintos. La resolución digital se define como la capacidad de discernir dos señales con intensidades similares. La resolución podrá ser mayor dependiendo del sistema confocal. Al haber mayor resolución en una imagen, habrá menor grado de error, por lo que se podrán distinguir mejor las intensidades de las señales. Pero en la mayoría de los sistemas, solo existe un número limitado de niveles de intensidad (en promedio hasta 50,000), esto introducirá inevitablemente un cierto grado de error, debido a que muchos valores llegan al orden de 60,000. Para evitar esto y poder distinguir con precisión las señales, los niveles de intensidad deben de corresponder al rango dinámico lineal del detector, que se define como la gama completa de las intensidades de las señales que un instrumento puede detectar. Esta constante se puede determinar fácilmente con el control de rango dinámico que se deposita sobre la laminilla, ya mencionado anteriormente.

### Procesamiento de la imagen.

El propósito principal del análisis de la imagen es la vasta adquisición de los valores numéricos a través de los “softwares”. Primero se tienen que identificar los distintos genes que tienen una señal y se tienen que eliminar los artefactos que interfieran con la calidad de la imagen. Es importante que para cada “spot” se calcule el fondo, de manera que este último se le restará a la intensidad de cada “spot” y se podrán calcular entonces las intensidades relativas para cada “spot” en los dos canales por separado.

### Normalización de datos.

Antes de identificar cambios en la expresión génica, se tienen que analizar los datos obtenidos después del procesamiento de la imagen. La normalización es el proceso necesario para poder comparar datos de canales o incluso biochips distintos. Estos datos corresponden a las intensidades relativas para cada “spot”, pero que deben ser normalizados en ambos canales. La normalización se realiza para ajustar las diferencias que pudieran existir en la cantidad de RNA utilizado, en la eficiencia del marcaje, de la hibridación, de los lavados y de la detección para cada muestra. Estas diferencias deben ser eliminadas para poder realizar una comparación. Una estrategia para este fin es el uso de controles como los genes constitutivos, que teóricamente no van a ser expresados diferencialmente entre ambas muestras y por eso se asume que su radio promedio de expresión medido debe ser 1 ( $Cy3/Cy5 = 1$ ). El radio es la relación que hay entre los valores de intensidad de dos canales para un mismo “spot”. Para los genes constitutivos, se ajusta el radio a 1, permitiendo así una comparación más confiable, después se calcula el radio para cada “spot”. Para considerar un gen como diferencialmente expresado se tiene que hacer uso de métodos estadísticos. El más usado es una simple desviación estándar que determine un valor de corte que depende de cada investigador, el más reportado ha sido de 2 “veces” (two-fold) tanto en regulación alta así como en baja (up-, as well as, down-regulation).

Se deben de tomar en cuenta la resolución, linealidad, uniformidad y sensibilidad del escáner ya que estos parámetros reflejarán la precisión de los datos. La resolución es la capacidad de un sistema óptico para discernir dos puntos, a una gran resolución el tamaño del píxel se reducirá, mejorando la calidad de la imagen. La resolución, así como los parámetros de selección, deben ser los mismos para cada experimento. La linealidad del láser es el rango de señal que tiene una respuesta lineal frente a la concentración del fluorocromo que permite cuantificarlo con precisión. Se determina mediante el rango dinámico lineal, que se puede determinar gracias a su control respectivo, ya mencionado. La uniformidad en la colección de las señales fluorescentes sobre toda la superficie a analizar es importante ya que los sistemas automatizados tienen movimiento. La sensibilidad es la capacidad del sistema para detectar la mínima cantidad de muestra fluorescente o bien, la eficiencia con la cual el dispositivo convierte fotones de una señal fluorescente en una señal electrónica. Cuando se analizan los canales para las cianinas Cy3 y Cy5 primero se debe emplear el canal para Cy5 ya que resiste menos el “photobleaching” a comparación de Cy3 (aproximadamente 1%).

### DATA MINING, MINADO DE DATOS Y MODELAJE.

Existen numerosos métodos matemáticos y algoritmos que han surgido por la necesidad de poder interpretar fácilmente cualquier experimento de microarreglos:

### Transformación de datos (Data transformation).

Los valores obtenidos de las imágenes de 16 “bits” van de 1 a 65,536. Es conveniente transformar estos grandes datos a una escala logarítmica, que corresponderán de 0 a 4.8 respectivamente. Bajo esta escala los datos exhiben una distribución más uniforme en comparación con la otra escala. Otra ventaja de transformar los datos es que muchos programas de análisis y visualización utilizan la escala en logaritmos.

### Puntos dispersos (Scatter plots).

Es una gráfica bidimensional que representa los valores numéricos para cada muestra (p. ej. problema y control) a lo largo de los ejes X e Y. La mayoría de los datos representarán una diagonal (línea de identidad) y a los lados de ésta, se encontrarán las señales con mayor o menor intensidad dependiendo de la señal y por lo tanto los niveles de expresión. Esta rápida y sencilla herramienta visual es útil cuando se analizan grandes cantidades de datos y cuando se hace el experimento amarillo para detectar fallas que se pudieran presentar en el proceso.

### Análisis del componente del principio (Principle Component Analysis).

Cuando se comparan 2 muestras se requiere una gráfica bidimensional pero si se quieren comparar hasta cientos de muestras es imposible crear una gráfica multidimensional para cientos de datos, esto no es imposible si se recurre a una técnica llamada reducción de la dimensionalidad. El análisis del componente del principio es una técnica (multivariada) que permite comparar muchas variables (genes) porque reduce el espacio de muchas dimensiones a tres, donde se pueden representar gráficamente los datos e interpretarlos fácilmente. Este método se usa ampliamente para identificar genes que son regulados de una manera similar a lo largo de muchos experimentos, dando pistas funcionales de ciertos genes cuya función no es conocida con base en la proximidad de los genes cuya función biológica si se conoce.

### Análisis de grupos (Cluster analysis).

Es un método que categoriza los datos basándose en su similitud. Se realiza a través de un algoritmo de agrupamiento, el cual acomoda generalmente los genes o grupos de genes similares, en un espacio vertical mientras que horizontalmente se agrupan las muestras analizadas. Esto permite la creación de un dendograma, que consiste en una representación gráfica del grado de similitud que existe entre las muestras analizadas. Los valores de los radios de expresión se colorean generalmente de verde para los genes desactivados, de rojo para los genes activados y de negro para los genes sin cambios significativos en su expresión. Los patrones de expresión para cada gen se analizan en todos los experimentos y, los genes que muestren un patrón similar, se agrupan juntos. Esto se repite para cada gen y grupo de genes, que después permitirán colocar las muestras en un dendograma. Los genes agrupados en el mismo grupo pueden tener funciones similares. Debido a la correlación entre la expresión génica y cada muestra, se podrá descubrir la funcionalidad de genes desconocidos.

Un vector es un valor matemático con magnitud y dirección que describe la expresión génica. La magnitud del vector corresponde al radio de la señal y la dirección puede ser la activación o desactivación. Existen varios métodos de agrupamiento para clasificar y organizar los datos de la expresión génica, el supervisado y no supervisado. El primero se basa en el conocimiento previo de los vectores mientras que el segundo no, el primero permite tener mayor confiabilidad sistemática cuando se agrupan genes. Otros dos métodos de agrupamiento son el jerárquico y

el no jerárquico, pero estos se basan en como son construidos los dendogramas. El primero establece un pequeño grupo de genes que comparten un patrón similar de expresión y después se construye el dendograma de una manera secuencial, a través del rango de los valores de los grupos (jerarquía). En el segundo caso, cada dato de la expresión génica es asignado a un grupo con base en su perfil de expresión. Un ejemplo de este método es el llamado acercamiento "kmeans" donde se especifican el número de grupos donde se van a clasificar a los genes y la computadora construye el dendograma de los grupos. Este método es más rápido y a veces más preciso que el primero.

Para poder observar los dendogramas y grupos en una gráfica bidimensional, se usan algoritmos como el tipo SOM (Self-Organizing Maps). Los mapas de organización propia son una herramienta de visualización poderosa que permiten acomodar genes que exhiben un patrón de regulación temporal. Un ejemplo puede ser cuando se observan cambios en la expresión de muchos genes que intervienen en el ciclo celular, ya que al medir la variable del tiempo se podrá ver como es que varios genes son regulados conforme avanza dicho ciclo. Los métodos que pertenecen al análisis de grupos han sido usados ampliamente desde su primera publicación en 1998. Eisen, 1998.

La fabricación y análisis de los microarreglos involucra muchos pasos que deben ser repetidos para disminuir la variabilidad, así como muchas variables experimentales que deben de ser controladas para poder obtener resultados con repetibilidad, reproducibilidad, precisión y exactitud. Para lograr estas metas, todos los métodos y protocolos en todo proceso deben de optimizarse y estandarizarse. Benes y Muckenthales, 2003. Esto no es fácil pero si es posible y se requiere tanto de buenos recursos humanos como de recursos económicos. Por ejemplo, la certificación ISO 9000 para la manufactura de microarreglos puede obtenerse tan solo con un procedimiento de 8 pasos.

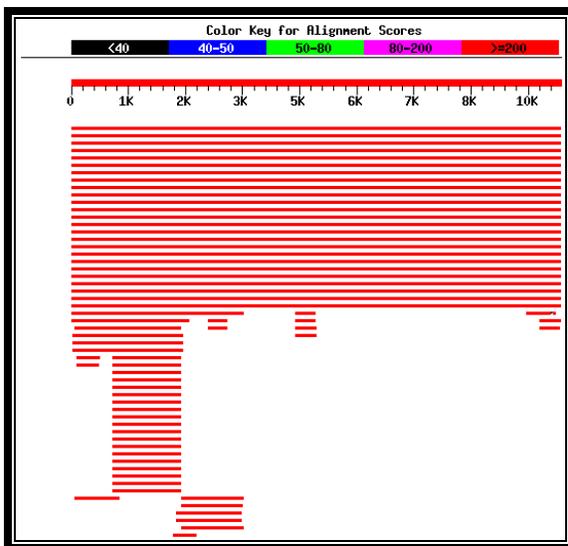
No se tiene que olvidar que esto nada más es parte del experimento donde está involucrado el microarreglo. Además, es importante validar los resultados obtenidos posteriormente con otros métodos como: RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR), "northern blot", ensayo de protección con ribonucleasa (RPA) o hibridación in situ, entre otros. Chuaqui, 2002.

## RESULTADOS.

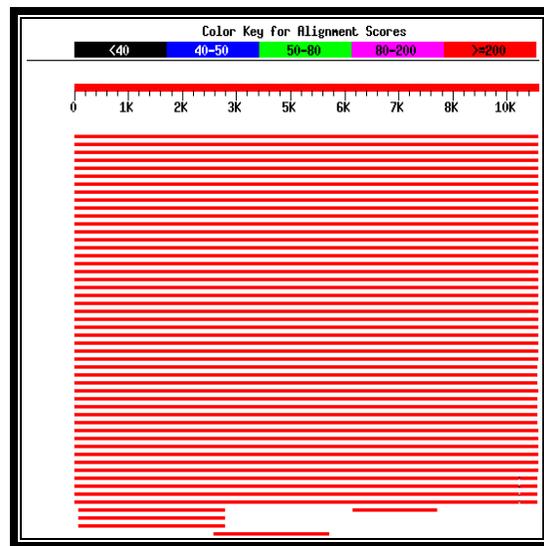
### Análisis de los genomas del virus del dengue.

El objetivo del proyecto a corto plazo fue desarrollar un método de diagnóstico, para la enfermedad del dengue, específico para cada uno de los serotipos y a largo plazo sería diagnosticar al mismo tiempo el genotipo de la virulencia.

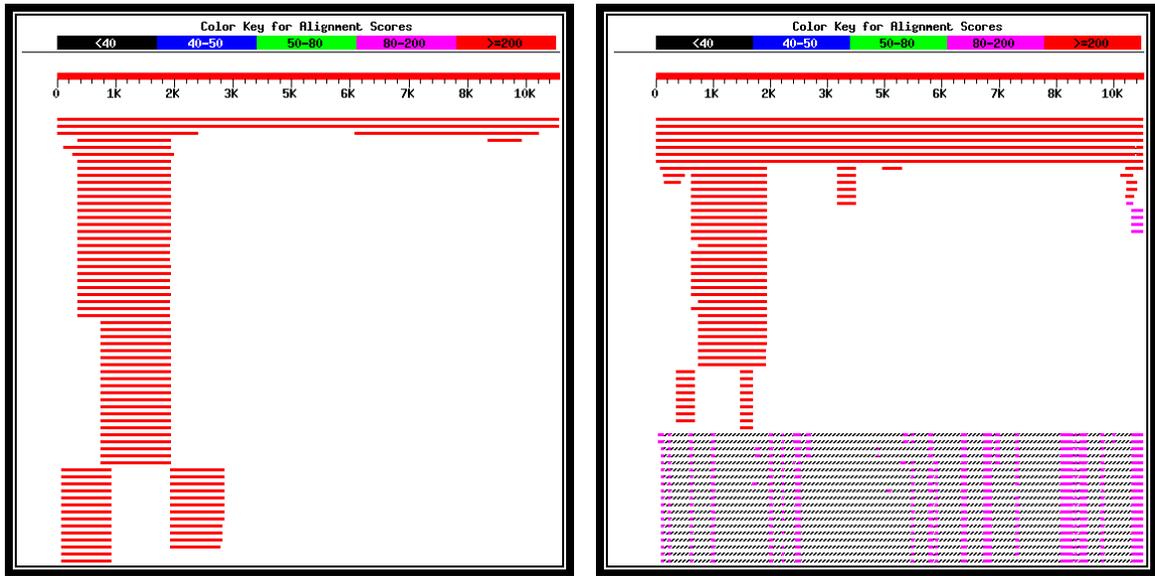
Para abordar nuestro objetivo sobre el desarrollo de la prueba de diagnóstico específico para cada serotipo alineamos todas las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (DENGUE 1 (NCBI M87512, Fu et. al., 1992, Medline 92263809, SINGAPORE S275/90), DENGUE 2 (NCBI M29095, Putnak et. al., 1988, Medline 88150069, NEW GUINEA C), DENGUE 3 (NCBI M93130, Osatomi et. al., 1990., Medline 90266483, H87) y DENGUE 4 (NCBI M14931, Zhao et. al., 1986, Medline 87293881), reportadas en la base de datos del Gen Bank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para cada uno de los serotipos del virus del dengue (Figuras 10 y 11), y utilizando los programas BLAST y Vector NTI. Esto nos permitió determinar la homología entre los genomas completos de los diferentes serotipos del virus del dengue (Tabla 1 y 2) y entre diferentes aislados de los diferentes serotipos (Tabla 3, 4, 5 y 6), usando el programa GeneStream align Home Page (<http://vega.igh.cnrs.fr>), y confirmando la homología en el programa de análisis Vector NTI Ver 5.0. para obtener finalmente un árbol filogenético del los cuatro serotipos, en el programa Phylo Draw V. 0.81 (Figura 1 ).



(a) Dengue 1



(b) Dengue 2



(c) Dengue 3

(d) Dengue 4

Figura 1. Alineamientos de nucleótidos, en BLAST, obtenidos en la búsqueda del Gen Bank, en donde se muestran el número de secuencias homólogas del mismo serotipo así como de aquellos fragmentos de proteínas a lo largo del genoma. El código de colores mostrado en la parte superior indica que las zonas rojas son las que presentan mayor homología, así mismo las áreas negras son las que dieron baja o nula homología.

```

      10      20      30      40      50      60
1  MNNQRKKTGRPSFNMLKRRERNRVSTGSQLAKRFSLGLLSGQGPKLKLVMAFIAFLRFLAIP 60
      70      80      90     100     110     120
61 PTAGILKRWGTFKKSKAIKVLRGFRKEIGRMLNILNRRKRTAGMLLMLIPTVMAFHLLTTR 120
      130     140     150     160     170     180
121 DGEPHMIVSKQERGKSLLFKTEGDGVMNCTLIAMD LGELCEDTVTYKCPFLTENE PEDIDC 180
      190     200     210     220     230     240
181 WCNLTSTWVTYGTCTQTGEHRRDKRSVALAPHVGMGLETRTETWMSSEGAWKQQRVETW 240
      250     260     270     280     290     300
241 ILRHPGFTILALFLAYTIGTHTQRAVIFILLMLVAPSMTMRCVIGNRDFVEGVSGGTW 300
      310     320     330     340     350     360
301 VDVVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELIKTEAKQPATLRKYCIEAKITNTTTDSRCPTQGEF 360
      370     380     390     400     410     420
361 SLNEEQDQNFVCKHTMVDRGWNGCGLFGKGLVTCAKFTCKKKIEGKVVQPENLEYTVV 420
      430     440     450     460     470     480
421 ITVHTGDQHAVGNDTGKHGVTAKITPQSSSTTEAELTDYGTLLTLECSPTGLDFNEMVLLT 480
      490     500     510     520     530     540
481 MKNKAWLVHRQWFLDLPLPWTSGADTSGSTWNRKELLVTFKNPHAKKQDVVVLGSEQEGAM 540
      550     560     570     580     590     600
541 HTALTGATEIQTSGGNLIFAGHLKCLRMDKLQLKGMSYSMCTGKFKLVKEVAETQHGTI 600
    
```





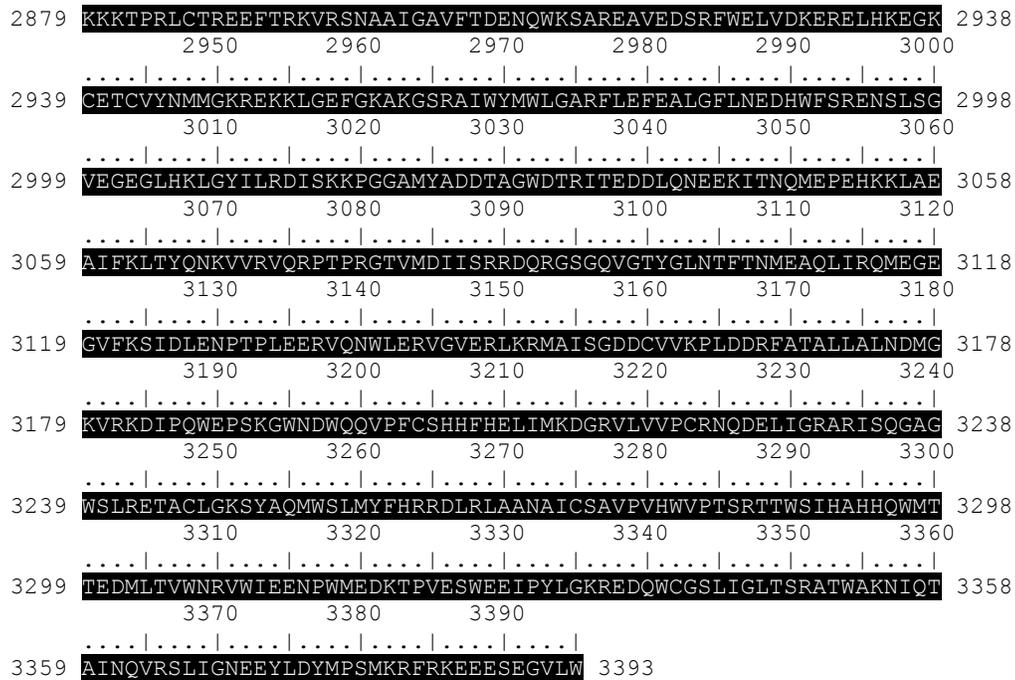


Figura 2 . Alineamiento consenso de aminoácidos para los distintos serotipos del dengue (Den1-Den4), obtenido por el programa Bio Edit y utilizando las secuencias obtenidas en la búsqueda del Gen Bank.

Tabla 1. Homología (%) del genoma del virus del dengue. Se alinearon las secuencias de nucleótidos del: Serotipo 1: 10717 nt; Serotipo 2: 10723 nt; Serotipo 3: 10696 nt; y Serotipo 4: 10648 nt del virus del Dengue y se determino su homología entre ellos. (\*nt= nucleótidos.)

	<i>DS-1</i>	<b>DS-2</b>	<b>DS-3</b>	<b>DS-4</b>
<i>DS-1</i>	100 %	68.8 %	72.5 %	66.8 %
<b>DS-2</b>	68.8 %	100 %	68.8 %	67.5 %
<b>DS-3</b>	72.5 %	68.8 %	100 %	67.1 %
<b>DS-4</b>	66.8 %	67.5 %	67.1 %	100 %

Tabla 2. Identidad (%) del genoma del virus del dengue. Se alinearon las secuencias de aminoácidos de los diferentes serotipos del virus del dengue y se determino su homología entre ellos. Serotipo 1: 3392 aa., Serotipo 2: 3391 aa; Serotipo 3: 3390 aa; Serotipo 4: 3387 aa. (aa= aminoácidos.)

	<i>DS-1</i>	<b>DS-2</b>	<b>DS-3</b>	<b>DS-4</b>
<i>DS-1</i>	100 %	71.6 %	77.8 %	68.8 %
<b>DS-2</b>	71.6 %	100 %	71.9 %	69.5 %
<b>DS-3</b>	77.8 %	71.9 %	100 %	70.0 %
<b>DS-4</b>	68.8 %	69.5 %	70.0 %	100 %

Tabla 3. Homología (%) del genoma del virus del dengue serotipo 1. Se alinearon las secuencias de nucleótidos de los diferentes genotipos del virus del dengue serotipo 1 y se determino su homología entre ellos. D11-Abi: AF298807-10721 nt; D12-Cam: AF309641-10721 nt; D13-Dji: AF298808-10721 nt; y D14-Moc: AB074760-10735 nt; D15-K13: AF180818-10735 nt; D16-45a: U88536-10735 nt; D17-A88: AB074761-10735 nt; D18-Br0: AF513110-10735 nt; D19-Del: AY145123-10705 nt; D10-Fga: AF226687-10735 nt; D111-Gz8: AF350498-10735 nt; D112-Wes: U88535-10735 nt. (\*DSG= Genoma del virus del Dengue Serotipo 1, 2, 3 o 4, Genotipo "X", según corresponda.)

	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D110	D111	D112
D11	100 %	91.8 %	91.6 %	92.9 %	92.9 %	92.4 %	92 %	94.4 %	92.1 %	94.7 %	92.1 %	92.3 %
D12	91.8 %	100 %	95.9 %	95.3 %	93.6 %	93.4 %	92.8 %	92.1 %	93.2 %	92.2 %	92.2 %	93.4 %
D13	91.6 %	95.9 %	100 %	95.2 %	93.5 %	93.4 %	92.7 %	91.9 %	93.1 %	92.1 %	98 %	93.3 %
D14	92.9 %	95.3 %	95.2 %	100 %	95.4 %	95.2 %	94.7 %	93.6 %	95 %	93.7 %	93.7 %	95.2 %
D15	92.9 %	93.6 %	93.5 %	95.4 %	100 %	94.7 %	94.2 %	93.4 %	94.6 %	93.5 %	94.1 %	94.7 %
D16	92.4 %	93.4 %	93.4 %	95.2 %	94.7 %	100 %	97.4 %	92.7 %	99.6 %	92.9 %	94 %	99.8 %
D17	92 %	92.8 %	92.7 %	94.7 %	94.2 %	97.4 %	100 %	92.2 %	97.1 %	92.3 %	93.3 %	97.2 %
D18	94.4 %	92.1 %	91.9 %	93.6 %	93.4 %	92.7 %	92.2 %	100 %	92.4 %	97.8 %	92.4 %	92.7 %
D19	92.1 %	93.2 %	93.1 %	95 %	94.6 %	99.6 %	97.1 %	92.4 %	100 %	92.6 %	93.8 %	99.5 %
D110	94.7 %	92.2 %	92.1 %	93.7 %	93.5 %	92.9 %	92.3 %	97.8 %	92.6 %	100 %	92.5 %	92.8 %
D111	92.1 %	92.2 %	98 %	93.7 %	94.1 %	94 %	93.3 %	92.4 %	93.8 %	92.5 %	100 %	94 %
D112	92.3 %	93.4 %	93.3 %	95.2 %	94.7 %	99.8 %	97.2 %	92.7 %	99.5 %	92.8 %	94 %	100 %

Tabla 4. Homología (%) del genoma del virus del dengue serotipo 2. Se alinearon las secuencias de nucleótidos de los diferentes genotipos del virus del dengue serotipo 2 y se determino su homología entre ellos. D21-Ngc: M29095-10723 nt; D22-S1v: M19197-10703; nt; D23-Thn: AF022434-10724nt; y D24-Ch0: AF119661-10723nt; D25-S44: AF204177-10723 nt; D26-Fj10: AF276619-10723 nt; D27-Tsv: AY037116-10723; nt; D28-J14: M20558-10723 nt; D29-Br6: AF489932-10722; nt; D210-Mar: AF208496-10722 nt; D211-Fj11: AF359579-10723 nt.

	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D210	D211
D21	100 %	91.9 %	95.4 %	95.2 %	99.5 %	94.2 %	95.3 %	95.3 %	94.6 %	94.5 %	94 %
D22	91.9 %	100 %	90.3 %	90.4 %	91.8 %	90.5 %	90.6 %	90.6 %	90.1 %	90.2 %	90.3 %
D23	95.4 %	90.3 %	100 %	93.1 %	95.3 %	92.4 %	93.2 %	93.2 %	92.8 %	92.6 %	92.2 %
D24	95.2 %	90.4 %	93.1 %	100 %	95.1 %	92.8 %	97.7 %	97.7 %	96.7 %	96.8 %	92.7 %
D25	99.5 %	91.8 %	95.3 %	95.1 %	100 %	94.2 %	95.2 %	95.2 %	94.4 %	94.4 %	94 %
D26	94.2 %	90.5 %	92.4 %	92.8 %	94.2 %	100 %	92.6 %	92.6 %	92.1 %	92.1 %	99.7 %
D27	95.3 %	90.6 %	93.2 %	97.7 %	95.2 %	92.6 %	100 %	100 %	98.3 %	98.3 %	92.5 %
D28	95.3 %	90.6 %	93.2 %	97.7 %	95.2 %	92.6 %	100 %	100 %	98.3 %	98.3 %	92.5 %
D29	94.6 %	90.1 %	92.8 %	96.7 %	94.4 %	92.1 %	98.3 %	98.3 %	100 %	97.4 %	92 %
D210	94.5 %	90.2 %	92.6 %	96.8 %	94.4 %	92.1 %	98.3 %	98.3 %	97.4 %	100 %	91.9 %
D211	94 %	90.3 %	92.2 %	92.7 %	94 %	99.7 %	92.5 %	92.5 %	92 %	91.9 %	100 %

Tabla 5. Homología (%) del genoma del virus del dengue serotipo 3. Se alinearon las secuencias de nucleótidos de los diferentes genotipos del virus del dengue serotipo 3 y se determino su homología entre ellos. D31-H87: M93130-10723 nt; D32-802: AF317645-10703 nt.

	D31	D32
D31	100 %	99.7 %
D32	99.7 %	100 %

Tabla 6. Homología (%) del genoma del virus del dengue serotipo 4. Se alinearon las secuencias de nucleótidos de los diferentes genotipos del virus del dengue serotipo 4 y se determino su homología entre ellos. D41-C2a: AF375822-10649 nt; D42-S81: AF326573-10649 nt.

	D41	D42
D41	100 %	100 %
D42	100 %	100 %

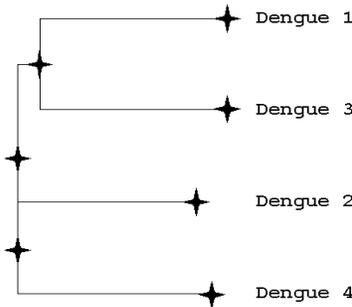


Figura 12. Árbol Filogenético de los cuatro serotipos del virus del dengue obtenido a partir de las homologías de las secuencias reportadas y rediseñado con el programa Phylo Draw v. 0.81.

**Diseño de primers.**

Como se mencionó en los objetivos, se tenía contemplado el diseño de diferentes oligonucleótidos (primers) para: 1) Obtener el cDNA de los cuatro serotipos a partir de muestras virales; 2) Diseñar un par de oligonucleótidos (primers) que nos permitan amplificar regiones que contengan secuencias específicas para cada uno de los serotipo (1, 2, 3 y 4) del virus del dengue; y 3) Diseñar cuatro oligonucleótidos (primers) específicos para dengue 1, dengue 2, dengue 3 y dengue 4 que fueran susceptibles de ser usados como sondas. A grandes rasgos este proceso se muestra en la figura 13.

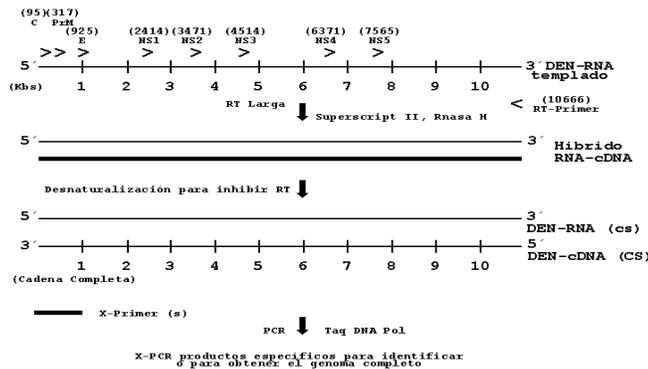




Figura 15. Alineamiento múltiple para los diferentes serotipos y genotipos del virus del dengue, donde se muestra en rojo y violeta las zonas de alta homología y en negro punteado aquellas zonas del genoma que tienen alta variabilidad.

Dentro de este análisis se localizaron cuatro zonas que previamente habían sido reportadas (Henchal et. al. 1991, Lanciotti et. al. 1992, Harris et. al. 1998, Chang et. al. 1994, Seah et. al. 1995) y que mostraban el protocolo requerido para nuestro estudio, dichas zonas contenían una región variable flanqueada por 2 regiones más conservadas para los cuatro serotipos (AD3-AD4, D1-D2, CFDJ-FUDJ, DV1-DV3).

Para poder continuar con nuestros objetivos realizamos un análisis de regiones específicas para cada uno de los serotipos, re-alineando las cadenas completas de los 4 serotipos e iniciamos este nuevo análisis en el extremo 5' con el primer nucleótido. Nuestro objetivo era encontrar todas aquellas regiones con secuencias específicas para cada uno de los serotipos y buscando respectivamente las dos regiones conservadas que flanquearan estas cuatro regiones específicas. Por lo tanto para amplificar estas regiones utilizamos los dos oligonucleótidos conservados (primers), uno complementario a la región del nucleótido y el otro idéntico a la región del genoma. Esto nos permitió establecer un set de primers que cumplieran con este objetivo y que se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Conjunto de primers seleccionados para ser susceptibles de ser usados como cadenas conservadas en el establecimiento de zonas de alta variabilidad. Por razones prácticas se muestra solamente la posición en la que se localizan dichos primers, la secuencia puede ser consultada en cualquiera de los accesos mencionados en materiales y métodos.

<b>Primer</b>	<b>Posición Aproximada</b>	<b>Primer</b>	<b>Posición Aproximada</b>
BAD 1	10	ALM8	5995
PD-BAD	80	ALM9	6698
BAD 2	770	BAD 10	6722
ALM1	1026	BAD 11	6940
BAD 3	1230	BAD 12	7070
ALM2	1710	ALM10	7250
ALM3	2175	BAD 13	7452
ALM4	2508	BAD 14	7680
BAD 4	2622	BAD 15	7831
BAD 5	2770	BAD 16	7938
BAD 6	3305	BAD 17	8230
DEN2 BAD	3538	ALM11	8484
ALM5	4165	BAD 18	8568
ALM6	4675	BAD 19	8942
BAD 7	4760	BAD 20	9010
ALM7	5311	BAD 21	9100
BAD 8	5432	BAD 22	10550
BAD 9	5470	BAD 23	10720

En particular y como complemento a este trabajo realizado, y debido a que en el planteamiento inicial nuestro objetivo principal era el dengue serotipo 2 (esto en función de que este serotipo es el que presenta mayor agresividad en la sintomatología, además de ser el más estudiado y reportado en las bases de datos), se realizó un análisis de las diferentes secuencias de dicho serotipo y se localizaron diferentes oligonucleótidos (primers) que son específicos para este

serotipo del virus, previendo que ello sustentara la base para continuar el trabajo con el resto de los serotipos en un futuro cercano (Tabla 8).

Tabla 8. Conjunto de primers específicos para dengue 2, seleccionados para ser susceptibles de ser usados como cadenas unicas para este serotipo en el establecimiento de zonas específicas.

SEROTIPO	SECUENCIA	POSICION
DEN 2	5'-ctg ttg gtg gga ttg tta agg aa-3'	262
DEN 2	5'-aacaca cgt aac gga gaa cca-3'	448
DEN 2	5'-tcc cac atg tgg aac gag tgc-3'	718
DEN 2	5'-tgg aga gcc gtc ccc ttc ata-3'	1642
DEN 2	5'- atg gcc att tta ggt gac aca agc ctg gga-3'	2170
DEN 2	5'-tcc caa gct gtg tct ccc aga atg gcc cat-3'	2190
DEN 2	5'-cca cat ttc agt tct tt-3'	2452
DEN 2	5'-tta ctg agc gga ttc cac aga tgc c-3'	2578
DEN 2	5'-cat ttt cgc ttt acc cca-3'	2773
DEN 2	5'-tct atc cag tac ccc-3'	3015
DEN 2	5'-gtg caa gat cgg cag cac cat tc-3'	3349
DEN 2	5'-caa aag gag gac cag gac acg aag a-3'	7880
DEN 2	5'-aat ttt cca cta agt tga gga ctc t-3'	8056
DEN 2	5'-tct tca aaa gca ttc agc acc t-3'	9452
DEN 2	5'-cgg atc aag cca tag tac gga aaa aac tat gct acc tgt-3'	10311
DEN 2	5'-aaa ctg tgc agc ctg tag-3'	10406
DEN 2	5'-tct ttc cca gcg tca ata-3'	10634

Todo el trabajo anterior se realizó utilizando las secuencias mencionadas en materiales y métodos, y manipuladas en los programas GeneStream (GeneStream align Home Page, <http://vega.igh.cnrs.fr>) y DNA\_MULTIPLE\_ALIGNMENT 1.0 [PileUp Of] (Genetic Computer Group, Inc. GCG, Wisconsin Sequence Analysis Package).

### Optimización de la extracción del RNA.

La segunda parte del proyecto consistió en purificar el RNA del virus cultivado en el laboratorio y el RNA viral incluido en los sueros de pacientes, para experimentalmente obtener la cadena de cDNA y en principio amplificar las diferentes regiones del virus, optimizando así la técnica de PCR con material virológico conocido. Teniendo las condiciones óptimas de extracción de RNA en virus cultivados en el laboratorio se aplicó la misma tecnología en la obtención del material genético del virus a partir de muestras de pacientes. Se extrajo el RNA total de cultivos de células C6/36 infectadas con el virus del dengue en sus diferentes serotipos [1, 2, 3 y 4], (ello en base a las especificaciones propuestas por Igarachi et al., 1978; Singh et al., 1999; Vezza et al., 1980; Kuno et al. 1983; Moreno-Altamirano et al., 2002); así como también el RNA total de algunas muestras de pacientes que previamente habían presentado la enfermedad, esto se hizo por el método del trizol. Esto nos permitió, validar el método propuesto. Es importante mencionar que cuando se obtiene RNA de muestras tan pequeñas no es posible visualizar este material en geles de agarosa; sin embargo se logró observar un barrido "clásico" en algunas muestras de cultivos celulares expuestas a electroforésis en un gel de agarosa al 2 % (figura 17), lo que coincide con los datos presentados en el la tabla 9 referente a las concentraciones de RNA obtenido a partir de la lectura de las muestras (extraídas y semipurificadas previamente) en un espectrofotómetro GeneQuant II (Pharmacia Biotech RNA/DNA calculator) a 230 y 320

nanómetros. Este RNA es debido no solamente al RNA del virus, sino también al RNA de las células hospederas infectadas por el virus.

Tabla 9. Concentraciones de RNA encontradas en muestras de los diferentes serotipos del virus del dengue.

SEROTIPO	RADIO	CONCENTRACION DE RNA	CONCENTRACION DE PROTEINA	ABSORBANCIA A 260 nm	ABSORBANCIA A 320 nm
DENGUE 1	1.962	1600.1 µg/ml	0.0 µg/ml	0.400 AU	0.008 AU
DENGUE 2	1.950	503.7 µg/ml	0.0 µg/ml	0.122 AU	0.000 AU
DENGUE 3	2.029	737.6 µg/ml	0.0 µg/ml	0.183 AU	0.000 AU
DENGUE 4	1.851	610.1 µg/ml	0.0 µg/ml	0.153 AU	0.010 AU
M-DEN3'	1.994	423.9 µg/ml	0.0 µg/ml	0.105 AU	0.000 AU
Muestra 1	1.756	542.9 µg/ml	0.0 µg/ml	0.126 AU	0.000 AU
Muestra 2	1.735	319.2 µg/ml	0.0 µg/ml	0.089 AU	0.000 AU
Muestra 3	1.640	426.9 µg/ml	0.0 µg/ml	0.107 AU	0.000 AU
Muestra 4	1.715	483.1 µg/ml	0.0 µg/ml	0.121 AU	0.000 AU
Muestra 5	1.846	419.8 µg/ml	0.0 µg/ml	0.103 AU	0.000 AU
Muestra 6	1.723	412.6 µg/ml	0.0 µg/ml	0.099 AU	0.000 AU
Muestra 7	1.749	359.6 µg/ml	0.0 µg/ml	0.092 AU	0.000 AU
Muestra 8	1.632	548.9 µg/ml	0.0 µg/ml	0.128 AU	0.002 AU
Muestra 9	1.789	437.7 µg/ml	0.0 µg/ml	0.117 AU	0.001 AU
Muestra 10	1.726	569.6 µg/ml	0.0 µg/ml	0.132 AU	0.002 AU

\* Las muestras correspondientes a los serotipos 1, 2, 3 y 4 son de cultivos celulares; la muestra del serotipo 3' corresponde a una extracción de suero en un paciente confirmado.

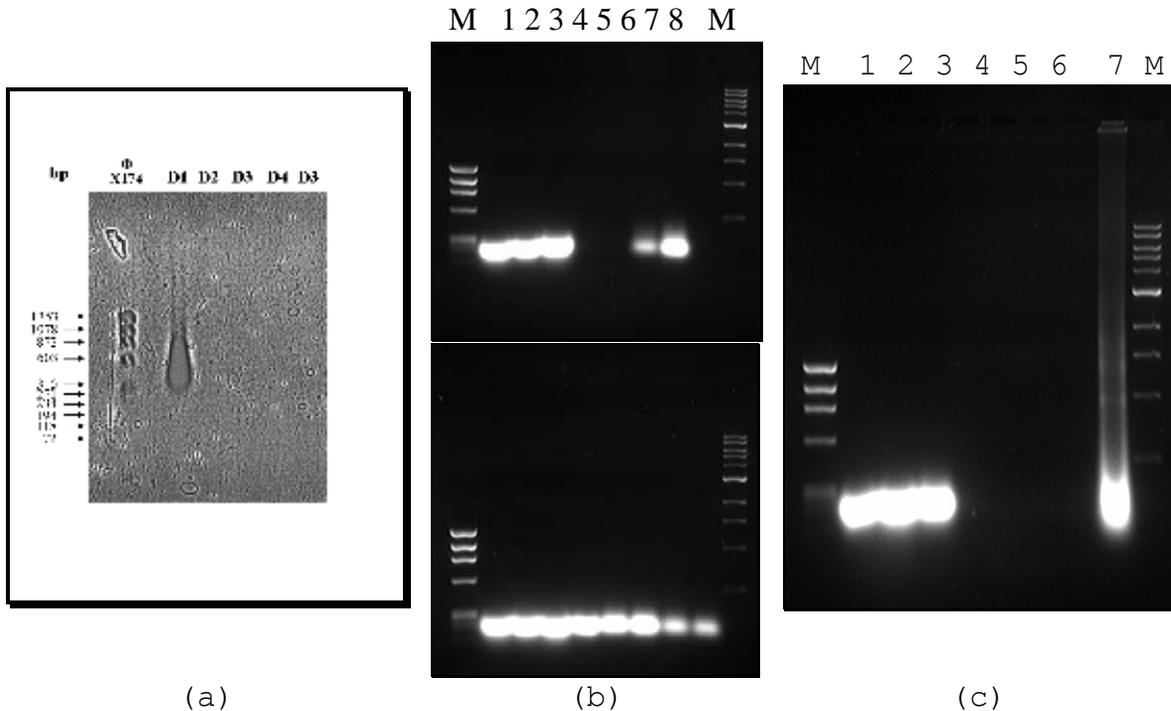


Figura 17. Electroforesis de RNA extraído y purificado de células infectadas con cada uno de los serotipos. Gel de agarosa (2%) que muestra un barrido "clásico", paneles a y c, en los carriles 2 y 9 respectivamente, indicativo de la presencia de altas concentraciones de RNA. En el panel A, en el primer carril se tiene el bandeo del marcador de peso molecular □X174 RF

DNA/Hae III Fragments (Gibco BRL). Del lado izquierdo del gel se muestran los marcadores de peso molecular en pb. D1, D2, D3, y D4 indica el carril donde se corrió el RNA extraído de células infectadas con cada uno de estos serotipos. Los paneles B y C muestran en los carriles primero y ultimo los bandeos característicos de los marcadores de peso molecular 1Kb y  $\square$ X174 RF DNA/Hae III Fragments (Gibco BRL).

### Manejo de Sondas y primers, para la obtención de productos de amplificación.

Para poder detectar los productos de PCR se mandaron sintetizar los oligonucleótidos (primers) diseñados (BIO-SYNTHESIS, lote No. C132-1/5, Invitrogen Life Technologies, lote No. 456953-01), lo que tomó un promedio de tres semanas para su entrega. En ese momento iniciamos las transcripciones y amplificaciones en función de lo establecido en materiales y métodos.

### Obtención de la cadena de cDNA.

Otro de nuestros objetivos fue obtener una cadena de cDNA para poder amplificar cualquiera de las regiones del genoma del virus del Dengue. Para esto se sintetizo, como ya se dijo, el primer RT-P(VD8) (Figura 14) que se empleo en el proceso de retrotranscripción utilizando la enzima RAV-2 que permite obtener cadenas de hasta 20000 pb (20 Kb); Inicialmente se abordó la obtención de la cadena total por retrotranscripción y se pudo obtener un producto de alto peso molecular utilizando el primer diseñado para retrotranscripción y tomando en cuenta las consideraciones establecidas en materiales y métodos. Los resultados se muestran en la figura 18, donde se pudo observar un producto ligeramente visible para los cultivos celulares pero no así para los sueros. Esto nos indica que la concentración de RNA para los sueros infectados es muy baja, el producto obtenido es muy aproximado al esperado, 11 kb; además aplicamos alternativamente el método establecido por Attatippaholkun et al. (2000), utilizando la enzima Superscript II Rnase H- Reverse transcriptase (GIBCO BRL) y los resultados fueron similares. Para demostrar la presencia de los productos esperados en nuestras muestras de cDNA obtenidas a partir del RNA extraído de células infectadas con los diferentes serotipos procedimos a obtener los productos de PCR para cada uno de los serotipos empleando los primers: D1S-D1C, D2S-D2C, D3S-D3C y D4S-D4S reportados por Morita et al. (1994); en la Figura 19 podemos observar los productos de amplificación. Esto nos permitió y nos permitirá a futuro obtener los productos de PCR de las muestras mediante RT-PCR y/o PCR. La conveniencia de obtener cDNA es también porque el cDNA es más estable que el RNA. Así mismo será posible hacer futuras amplificaciones de otras regiones importantes, como en este caso, para la elucidación de genotipos relacionados con la virulencia y estudios de filogenia.

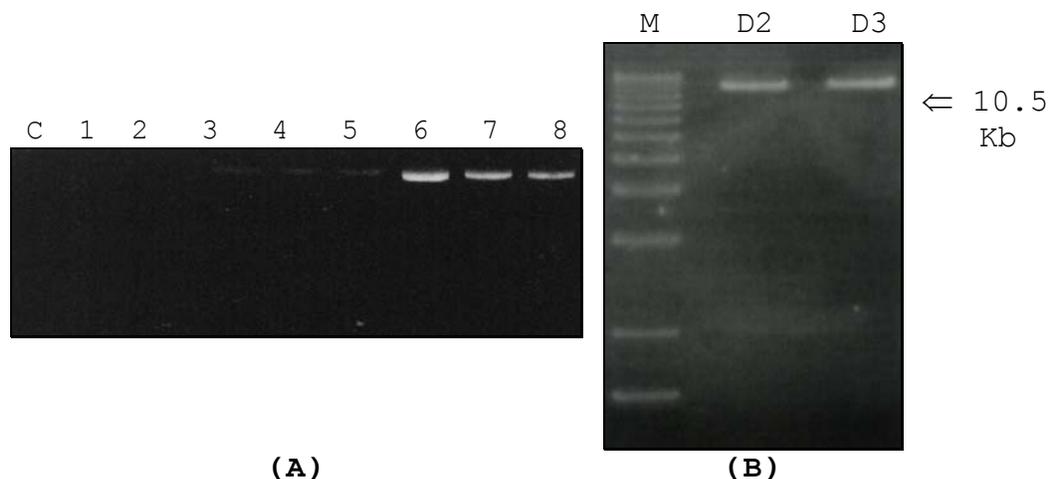


Figura 18. Electroforesis de los productos de Retrotranscripcion (Formación de cDNA), el gel de agarosa (1.5%) corrido a 80 V muestra en el panel A, C es un control sin RNA, de 1 a 4 muestras de RNA a partir de sueros de pacientes, 5 corresponde al cultivo celular del Dengue 1, 6 al serotipo 2, 7 al cultivo del dengue 3, y 8 al cultivo del serotipo 4; en el panel B se observa el mismo producto (10.5 Kb aproximadamente) del serotipo 2 y 3 pero concentrados al doble, M es el marcador de peso molecular (1Kb).

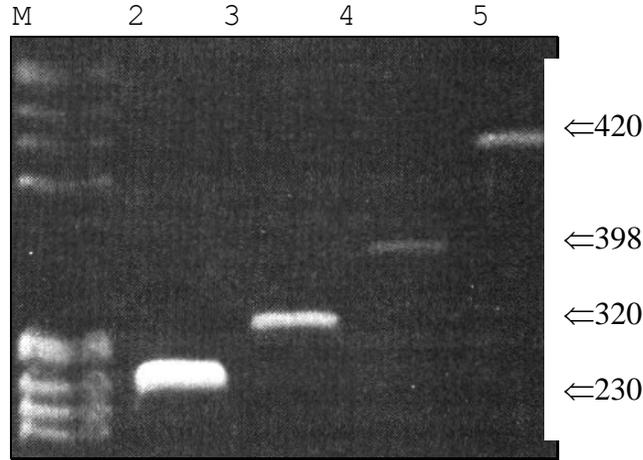


Figura 19. Amplificación por PCR, de las muestras de cDNA de los 4 serotipos del virus del dengue empleadas en la normalización y estandarización de la obtención de cDNA. De izquierda a derecha, el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, el carril 2 al serotipo 2 (230 pb), el carril 3 al dengue 3 (320 pb), el carril 4 al serotipo 4 (398 pb) y el carril 5 corresponde al dengue serotipo 1 (420 pb).

Amplificación de las regiones que contienen las RT-PCR de muestras de pacientes y mosquitos, determinación de especificidad. Inicialmente se tomaron cultivos celulares y algunas muestras de pacientes y mosquitos con la finalidad de iniciar el establecimiento de las condiciones de operación para la amplificación de productos, se utilizo el set de primers reportados por Lanciotti en 1992 (Ver figura 20) y se analizaron los resultados a fin de integrar una sola metodología para toda la batería de primers.

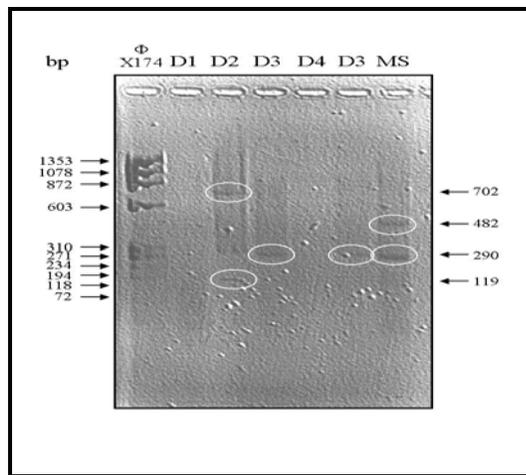


Figura. 20. Electroforesis de los productos de amplificación (RT-PCR) para cada serotipo del dengue. Gel de agarosa (2.0%) que muestra las bandas de las diferentes regiones específicas para cada uno de los serotipos del dengue. En el primer carril se tiene el bandeado del marcador de peso molecular  $\Phi$ X174 RFDNA/Hae III Fragments (Gibco BRL), en el carril número 2 se colocó el serotipo 1 y se esperaba una banda de 482 pares de bases; en el tercer carril se colocó el serotipo 2 el cual muestra la banda esperada de 119 pares de bases; el cuarto y sexto carril muestran al serotipo 3 exhibiendo bandas esperadas de 290 pares de bases; el

quinto carril corresponde a una muestra del serotipo 4, donde se esperaba una banda de 389 pares de bases. Por último, el carril número 7 muestra una mezcla de los serotipos mencionados anteriormente, observándose la presencia de los productos de PCR correspondientes a los pesos moleculares esperados para serotipos 1 y 3.

Posteriormente se procedió a emplear los oligonucleótidos (primers) diseñados para la región conservada para todos los serotipos (AD3-AD4, D1-D2, CFDJ-FUDH, DV1-DV3) y las regiones específicas de cada uno de los serotipos (D1-D4, TS1-TS4, DEN1-DEN4, DSP1-DSP4), y así determinar su especificidad. En la figura 21 y 22 se muestra un ejemplo de estas amplificaciones; donde se muestran, además, los pesos moleculares esperados para cada uno de los serotipos amplificados.

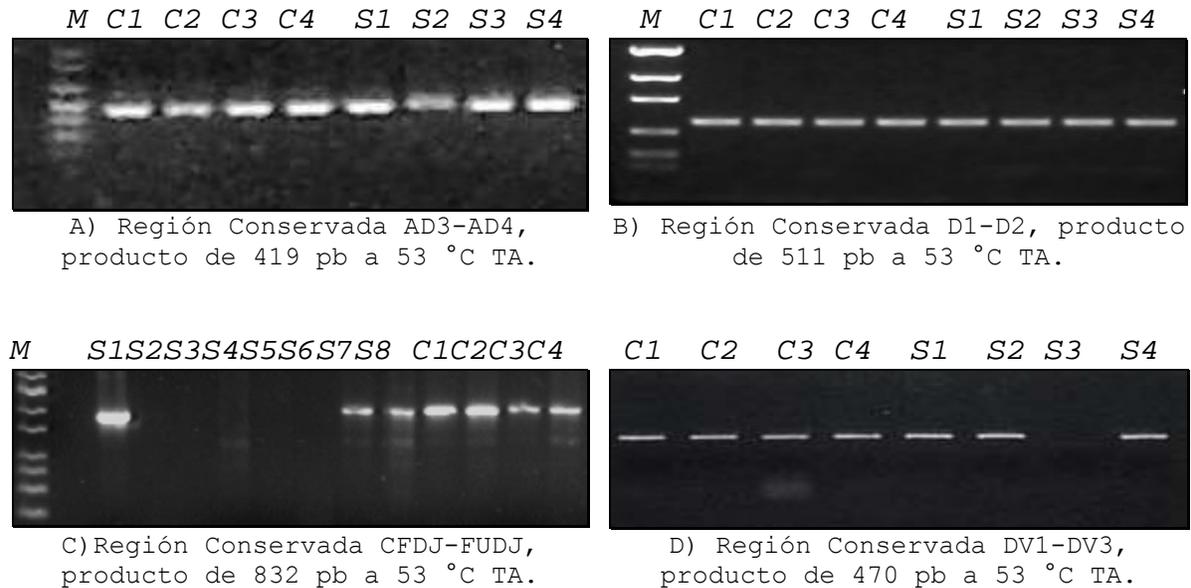


Figura 21. Electroforesis de los productos de amplificación (RT-PCR) para cada set de primers en regiones conservadas, los gels de agarosa (2.5%) corridos a 100 V muestran en A, B y D las bandas características de la porcion conservada de 8 muestras, 4 cultivos y 4 sueros de pacientes, en A y B el primer carril muestra el marcador de peso molecular; en C el primer carril muestra el marcador, las siguientes tres bandas visibles corresponden a sueros de pacientes y las 4 ultimas bandas a los cultivos celulares de los cuatro serotipos. En cada panel se muestra el tamaño del producto esperado asi como la temperatura de alineamiento a la cual se obtuvo el producto.

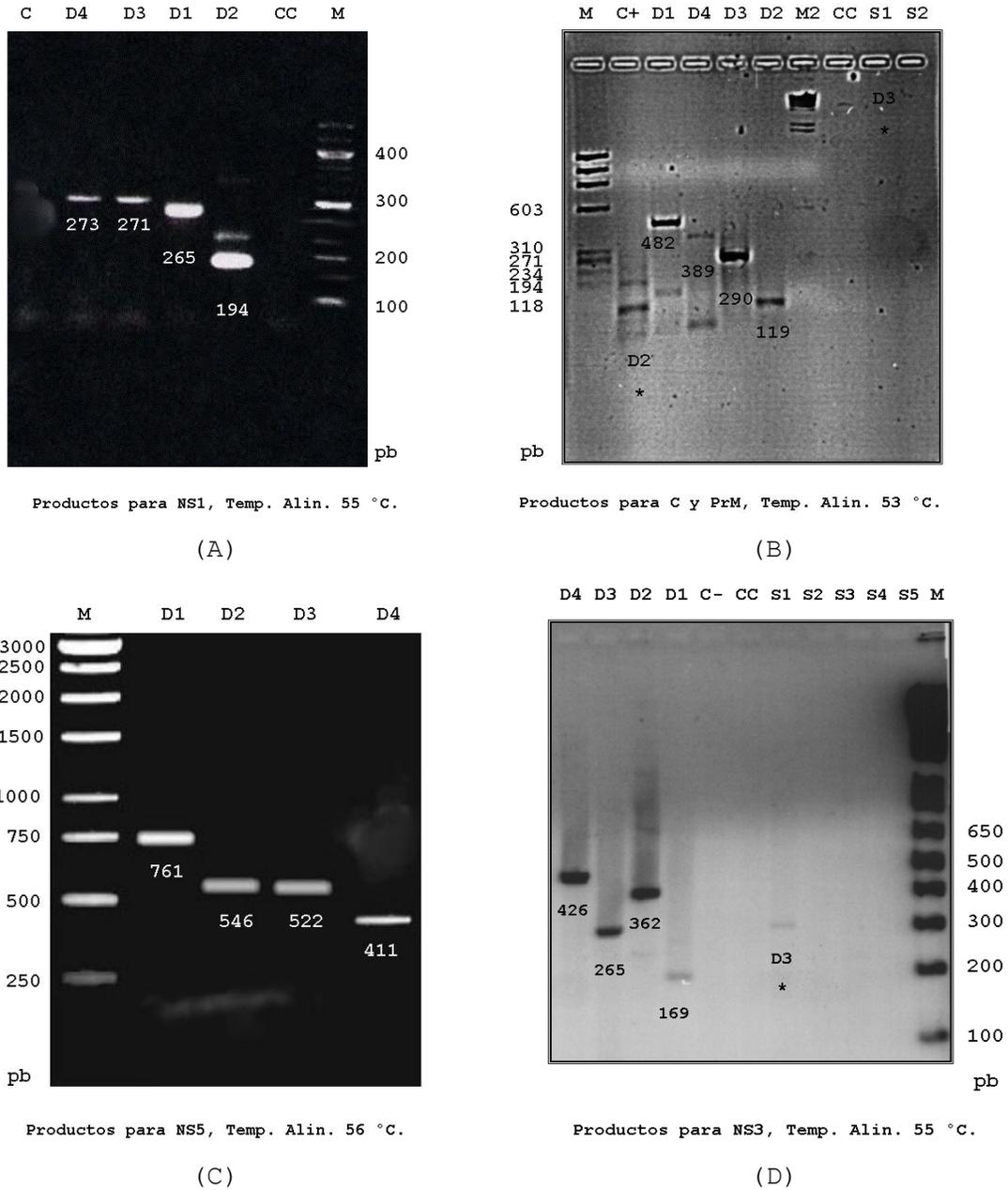


Figura 22. Electroforesis de los productos de amplificación (RT-PCR) para cada set de primers, los geles de agarosa (2.0%) corridos a 100 V muestran en A los productos específicos para las regiones AD3-D4, AD3-D3, AD3-D1, AD3-D2; en B los productos específicos para las regiones D1-TS1, D1-TS4, D1-TS3, D1-TS2; en C los productos específicos para las regiones CFDJ-D1, CFDJ-D2, CFDJ-D3, CFDJ-D4 y D las bandas características de la porcion variable para DV1-DSP4, DV1-DSP3, DV1-DSP2, DV1-DSP1; C son los controles respectivos, M muestra el marcador de peso molecular. En cada panel se muestra el tamaño del producto esperado asi como la temperatura de alineamiento a la cual se obtuvo el producto.

Finalmente para demostrar que nuestro método funcionaba en la amplificación de los fragmentos específicos para los serotipos en muestras de pacientes en el estado de Oaxaca procedimos a obtener cDNA en algunas de estas muestras para posteriormente obtener los amplificados (Figura 23 a-c). Asimismo se hizo RT-PCR directamente en muestras de pacientes y se determino su serotipo (Figura 23 b-d).

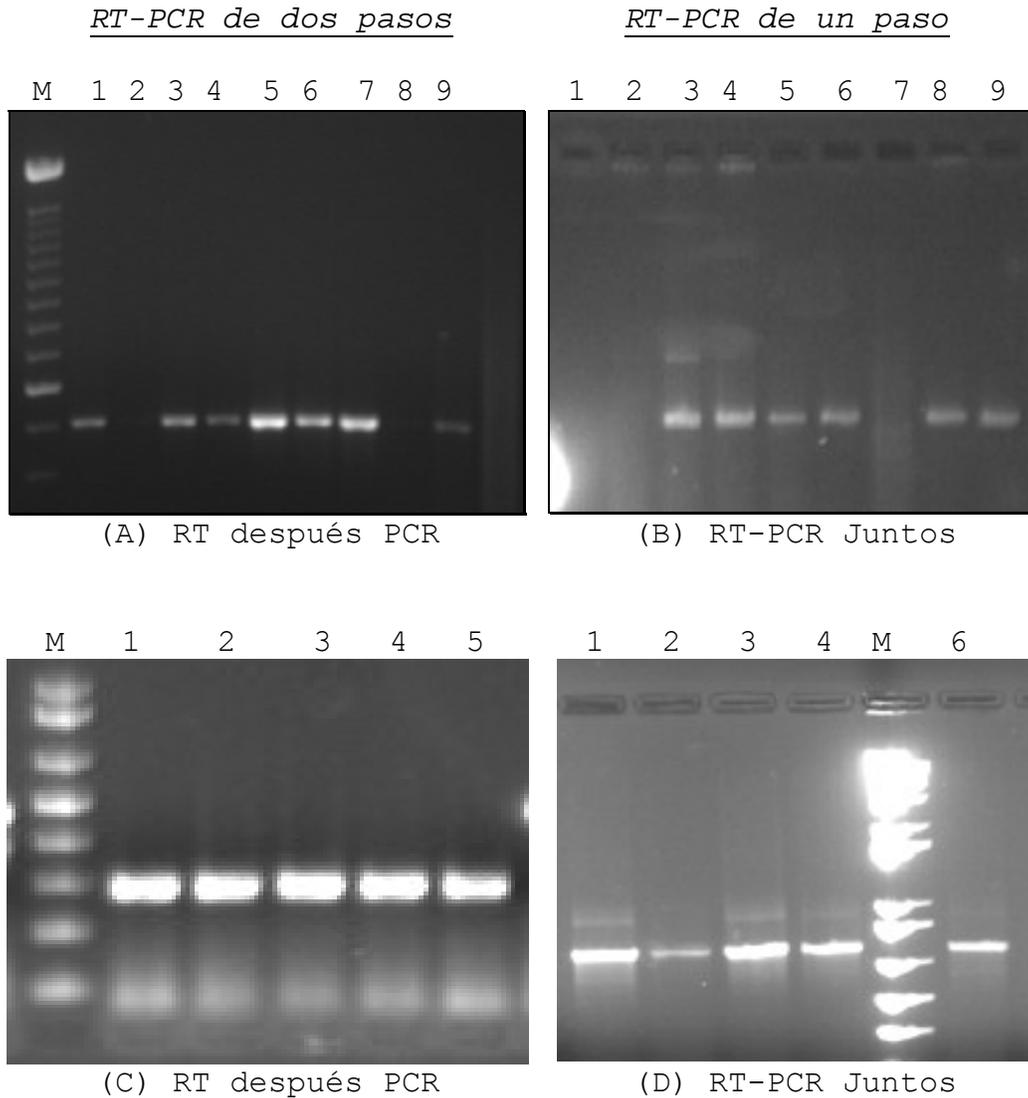


Figura 23. Amplificación por RT-PCR de un paso y dos pasos, de las muestras de RNA de los sueros de pacientes del estado de Oaxaca donde se detecto el serotipo 2. La banda exhibida en ambos geles (2.0 % con bromuro de etidio) corresponde al dengue serotipo 2 (119 pb) –panel A y B- usando los primers reportados por Lanciotti (1992), serotipo 2 (362 pb) –panel C y D- usando los primers reportados por Seah (1995).

Para concluir esta parte del trabajo experimental procedimos a organizar un set de sueros de muestras de pacientes, los cuales fueron caracterizados previamente como sigue: 10 casos reportados positivos para la presencia de IgM, 10 casos reportados como negativos para la presencia de IgM, 35 casos sin caracterización serológica pero que se recuperaron de la misma

zona de colecta. Adicionalmente se inocularon 10 mosquitos con el virus y fueron infectados; para demostrar la presencia del virus se procedio a observar inmunofluorescencia aplicando el conjunto Anticuerpo Policlonal-Antivirus Denge-IgG (ratón) / Anticuerpo-AntiIgG-Fluoresceinado (borrego), al constatar la presencia del virus se procedio a realizar la extracción de RNA. Al conjunto de 65 muestras se le aplico la metodología de extracción y se procedió a realizar RT-PCR a fin de determinar la especificidad del conjunto total de primers, los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Detección específica del virus del dengue en muestras de pacientes del Estado de Oaxaca.

	Método de detección	NS1 <i>Henchal</i>	C, PreM <i>Lanciotti</i>	NS5 <i>Chang</i>	NS3 <i>Seah</i>
Casos Positivos Serologicamente (IgM+)	Positivas	04/10	10/10	02/10	10/10
	Negativas	06/10	00/10	08/10	00/10
Casos Negativos Serologicamente (IgM-)	Positivas	00/10	02/10	00/10	03/10
	Negativas	10/10	08/10	10/10	07/10
Casos Con Indeterminación Serologica	Positivas	12/35	28/35	11/35	32/35
	Negativas	23/35	07/35	24/35	03/35
Mosquitos Infectados In Vitro	Positivas	05/10	09/10	06/10	09/10
	Negativas	05/10	01/10	04/10	01/10

En función de los resultados observados en la tabla y considerando las observaciones hechas en la parte de especificidad, se eligió el método reportado por Seah et al. (1995), como el mas propio para ser utilizado en el marcaje de sondas. Para confirmarlo se realizaron cultivos celulares de los sueros caracterizados como IgM positivos de los diferentes sueros, en medio de crecimiento y células C6/36 (medio esencial mínimo enriquecido con glutamina y aminoácidos no esenciales), se realizo RT-PCR y se pudo observar el amplificado característico para el serotipo dos. (Ver figura 24).

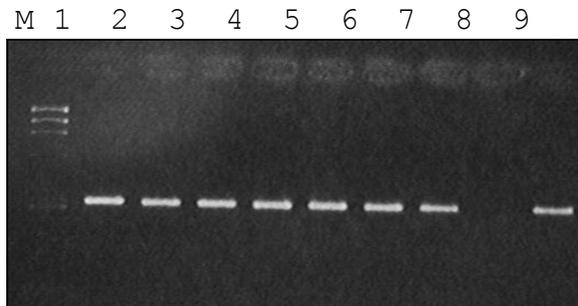


Figura 24. Amplificación por RT-PCR, de las muestras de RNA de los sueros de pacientes confirmados como IgM positivos del estado de Oaxaca donde se detecto el serotipo 2. La banda exhibida en el gel (2.0 % con bromuro de etidio) corresponde al dengue serotipo 2 (362 pb) usando los primers reportados por Seah en 1995.

### Sensibilidad de la RT-PCR.

Se realizaron diluciones decimales seriadas de las diferentes cepas del virus del dengue, en medio de mantenimiento de células C6/36 (medio esencial mínimo enriquecido con glutamina y aminoácidos no esenciales) y se sometieron 100 ml de cada dilución al procedimiento de extracción de ARN y el procedimiento de RT-PCR, y utilizando los primers DV1-DSP2 y D1-TS2, para evaluar la dilución límite. Después de 35 ciclos de amplificación se pudo detectar una banda en ambos geles de cDNA amplificada hasta la dilución 1:10 000 que corresponde aproximadamente a 2,5 ufp de virus por tubo de reacción (figura 25). La sensibilidad de la RT-PCR en general para todos los serotipos fue similar a la obtenida con la cepa del serotipo 2.

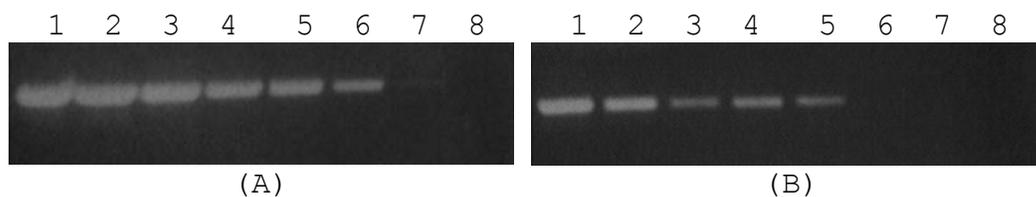


Figura 25. Curva de amplificación por RT-PCR, de las muestras de RNA de los cultivos celulares del serotipo 2. La banda característica exhibida en los geles (2.0 % con bromuro de etidio) corresponde a las diferentes diluciones del cultivo celular inicial. 1) 1:1, 2)1:10, 3)1:100, 4)1:1000, 5)1:10000, 6)1:100000, 7)1:1000000, 8)1:10000000. En el panel A se usaron los primers reportados por Seah en 1995, en el panel B se utilizaron los reportados por Lanciotti et. al. 1992.

Se pudo observar que la especificidad en el caso de los diferentes juegos de primers específicos para la detección de cada uno de los serotipos fue mayor en el caso de los primers reportados para C, PreM y NS3. Para el caso de la sensibilidad pudimos observar que los primers reportados para NS3 lograron detectar al virus en una dilución mayor a la detectada por los primers para C, Pre M; con estos resultados se optó por utilizar el juego de primers reportado por Seah et al. 1995 como el más indicado y susceptible de ser utilizado como juego de sondas.

### Secuenciación.

Para confirmar que las muestras que presentaron la banda de amplificación correspondiente al serotipo 2 y serotipo 3 corresponden en verdad a este serotipo, se procedió a realizar la secuenciación de dos de ellas aplicando la metodología ya explicada en materiales y métodos y utilizando el primer de sentido positivo DV1. La Figura 26 nos muestra la secuencia de estos fragmentos, lo cual nos permitió confirmar que efectivamente se trataba del serotipo 2 y 3. Esto se puede deducir del alineamiento mostrado con los 4 serotipos, ver figura 27, observando una mayor homología con el serotipo 2 y 3 respectivamente (figura 28).

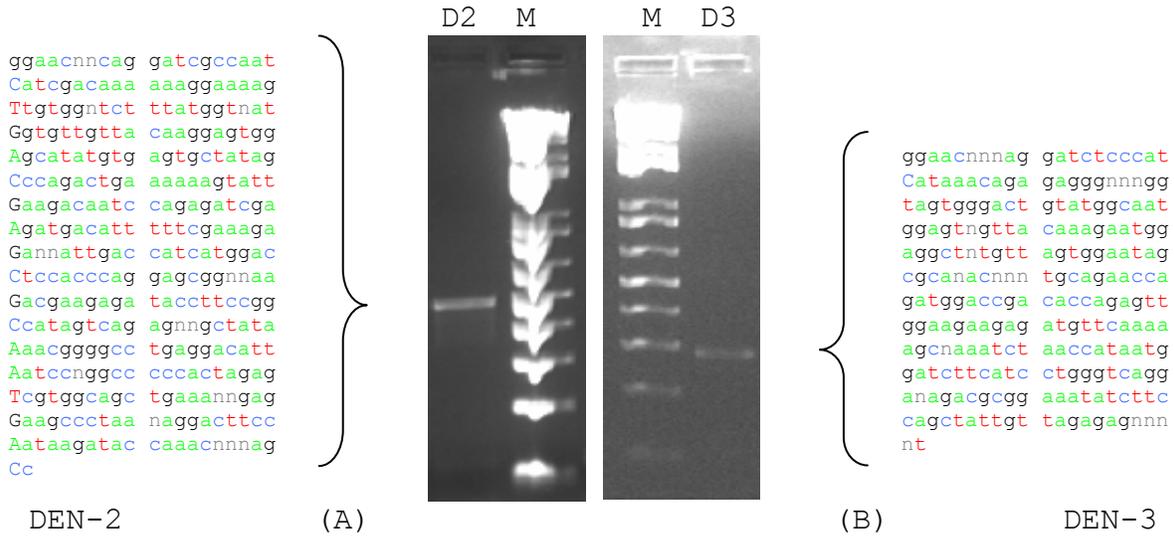


Figura 26. Secuencia obtenida de los fragmentos cortados y purificados para las muestras problema del estado de Oaxaca, en el panel A se muestra la electroforesis de este fragmento, característico del serotipo 2, junto con su secuencia respectiva obtenida en un secuenciador automático ABI PRISM modelo 310; el panel B muestra un fragmento característico para el serotipo 3 y su secuencia correspondiente.

```

FileUp
MSF: 453   Type: N   Check: 8068   ..
Name: D1   Len: 453   Check: 2346   Weight: 0
Name: D2   Len: 453   Check: 3220   Weight: 0
Name: D3   Len: 453   Check: 5337   Weight: 0
Name: D4   Len: 453   Check: 5004   Weight: 0
Name: M2   Len: 453   Check: 8390   Weight: 0
Name: M3   Len: 453   Check: 3771   Weight: 0
//
1
1
D1  GGCACATCTG GATCTCCCAT CGTGAACAGA GAAGGAAAAA TAGTAGGTCT
D2  GGAACCTCAG GATCGCCAAT CATCGACAAA AAAGGAAAAG TTGTGGGTCT
D3  GGAAC TTCAG GATCTCCCAT CATAAACAGA GAGGGAAAGG TAGTGGGACT
D4  GGAACGTCTG GTTCTCCCAT CATCAACAGG AAAGGAAAAG TCATCGGACT
M2  GGAACNNCAG GATCGCCAAT CATCGACAAA AAAGGAAAAG TTGTGGNTCT
M3  GGAACNNNAG GATCTCCCAT CATAAACAGA GAGGGNNNGG TAGTGGGACT
51
100
D1  TTATGGA AAT GGAGTAGTGA CAACAAGTGG AACCTACGTC AGTGCCATAG
D2  TTATGGTAAT GG TGTGTGTTA CAAGGAGTGG AGCATATGTG AGTGCTATAG
D3  GTATGGCAAT GGAGTGGTGA CAAAGAATGG AGGCTATGTT AGTGG AATAG
D4  CTATGGA AAT GGAGTAGTTA CCAAATCAGG TGATTACGTC AGTGCCATAA
M2  TTATGGTNAT GG TGTGTGTTA CAAGGAGTGG AGCATATGTG AGTGCTATAG
M3  GTATGGCAAT GGAGTNGTTA CAAAGAATGG AGGCTNTGTT AGTGG AATAG
101
150
D1  CCCAAGCCAA AGCATCACAA GAAGGGCCCC TACCAGAGAT TGAGGACGAG
D2  CCCAGACTGA AAAAAGTATT GAAG...ACA ATCCAGAGAT CGAAGATGAC
D3  CGCAAACAAA TGCAGAACCA GATGGACCGA CACCAGAGTT GGAAGAAGAG
D4  CGCAAGCCGA AAGAATTGGA GAGC...CAG ATTATGAAGT GGATGAGGAC
M2  CCCAGACTGA AAAAAGTATT GAAG...ACA ATCCAGAGAT CGAAGATGAC
M3  CGCANACNNN TGCAGAACCA GATGGACCGA CACCAGAGTT GGAAGAAGAG
151
200
    
```

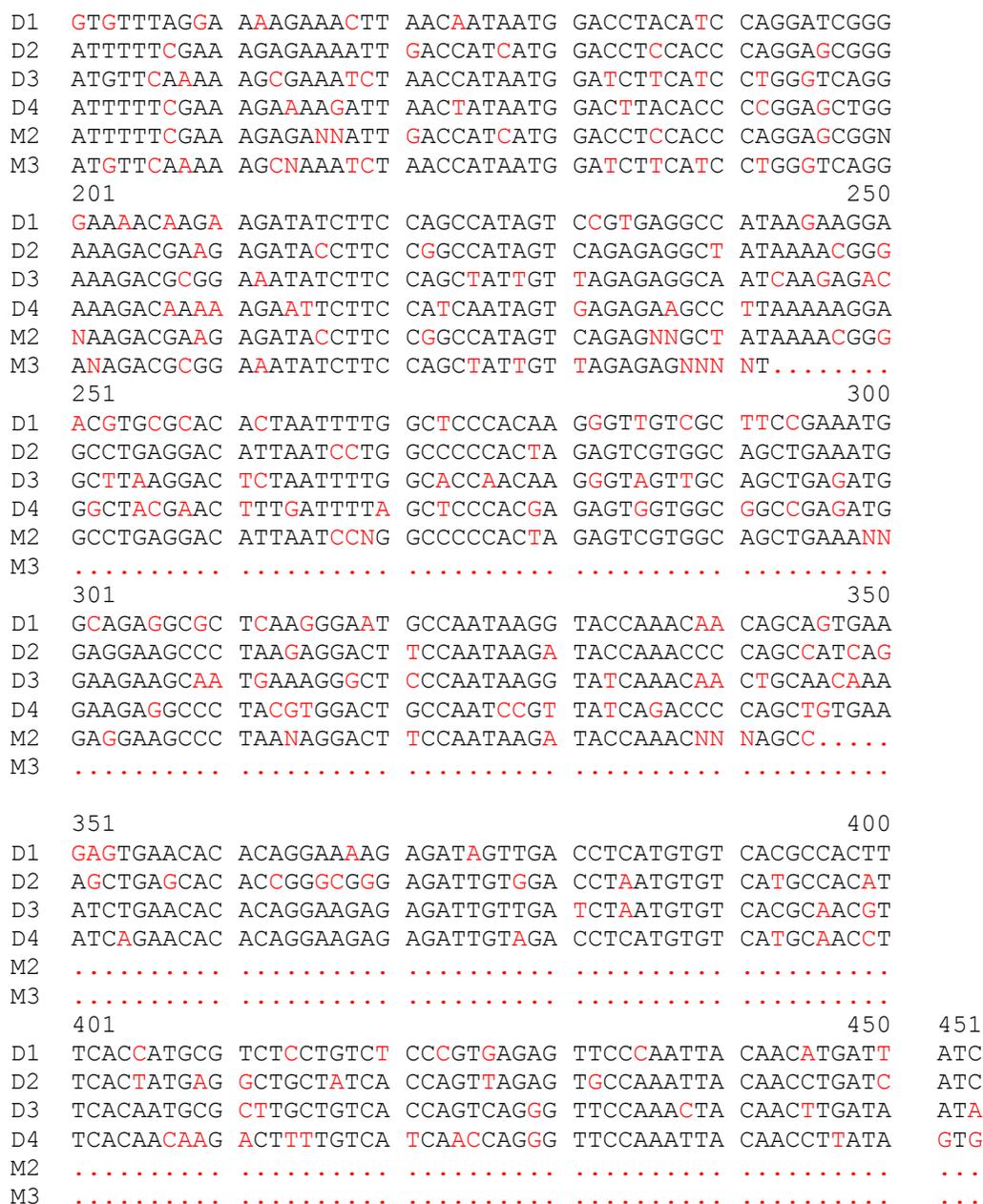


Figura 27. Alineamiento múltiple para las muestras secuenciadas obtenidas del estado de Oaxaca, comparadas con la porción NS3 de los diferentes prototipos de los serotipos del virus del dengue, donde se muestran las regiones de homología para cada una de las muestras secuenciadas (M2, M3).

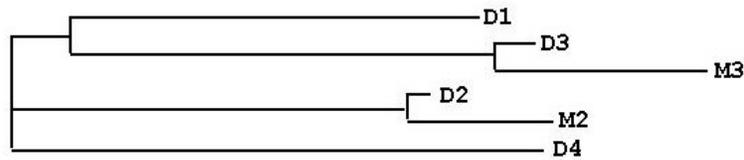


Figura 28. Árbol Filogenético de los cuatro serotipos del virus del dengue, comparando y alineando las muestras problema del estado de Oaxaca obtenidas, purificadas y secuenciadas para observar su homología.

### Secuencias específicas para cada serotipo.

Es evidente que el siguiente paso fue la amplificación de cada una de las muestras de los diferentes serotipos del virus del dengue, empleando los oligonucleótidos (primers P1-DV1+ y P3-DV3-) que flanquean la región del genoma que alberga las cuatro regiones específicas para cada serotipo (DSP1, DSP2, DSP3 y DSP4), Figura 29; así como también marcar las sondas específicas (primers P2-DSP1-Cy5, P2-DSP2-6Fam, P2-DSP3-Tamra-C6Ami y P2-DSP4-6Fam).

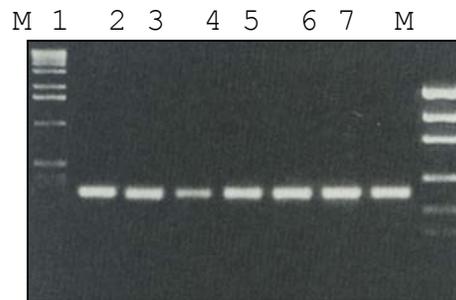


Figura 29. Electroforesis de los productos de amplificación (RT-PCR) para el set de primers en región conservada y muestras de sueros de pacientes del estado de Oaxaca., el gel de agarosa (2.0%) corrido a 100 V muestra el producto de amplificación para la Región Conservada DV1-DV3 de 470 pb y amplificado a 53 °C de Temperatura de Alineamiento.

### Marcaje de primers y su uso en los PCRs.

Para continuar con nuestro proyecto se marcaron los primers específicos para los serotipo 1, 2, 3 y 4 con Cy5, 6FAM, TAMRA-C6Amino y 6FAM respectivamente. En el Anexo 2 se muestra el espectro de masas de la purificación por cromatografía para cada uno de los primers marcados y purificados.

Con los primers para regiones conservadas y el set de primers marcados se amplificó cada uno de los serotipos del virus del dengue y se aplicó el proceso de amplificación como se describió en materiales y métodos. En la Figura 30 se observan estos productos de amplificación con los tamaños esperados y la marca incorporada.

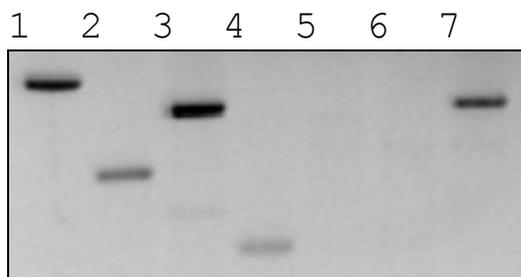


Figura 30. Electroforesis de los productos de amplificación (RT-PCR) para sondas marcadas con cromogenos, el gel de agarosa (2.0%) corrido a 100 V muestra los productos específicos para los cuatro serotipos, carril 1-D4-426 pb, carril 2-D3-265 pb, carril 3-D2-362 pb, carril 4-D1-119 pb, los carriles 5, 6 y 7 son muestras de sueros de pacientes del estado de Oaxaca.

### **RT-PCR de muestras de pacientes y Mosquitos para la detección del Dengue.**

Empleando el método de extracción de RNA optimizado para células infectas en cultivo se extrajo el RNA total de muestras de pacientes para determinar el serotipo y confirmar la presencia del virus directamente mediante RT-PCR. En la Figura 30 (carriles 5-7) podemos observar los productos de amplificación de 3 de las muestras de pacientes proporcionadas por la Secretaria de Salud del Edo. de Oaxaca (Ver Tabla 10 y anexo 1). Pudimos observar y confirmar que estas muestras contienen al serotipo 2, carriles 5, 6 y 7 respectivamente. En la muestra 4 (carril 7 en la Figura 30) vemos que el peso molecular que se observa corresponde al serotipo 2, y conforme se mencionó anteriormente esta muestra ya se había secuenciado para demostrar la especificidad de los primers.

### **Validación de la Prueba.**

Finalmente, la parte terminal de este proyecto incluyó una validación previa de la prueba diagnóstica en las muestras que resultaron positivas (Tabla 10) en pacientes que presentaron cuadro de infección por el virus del dengue, ya que no es lo mismo trabajar con muestras de células infectadas en el laboratorio que con el virus mismo de las muestras. Para cumplir con este objetivo se tomaron 22 de las muestras de pacientes, de las cuales se había detectado en algunas Dengue mediante la prueba de MAC Elisa por la SSA de Oaxaca y en las que no se detectó al patógeno por este método, pero sí por RT-PCR normal. Procedimos a aplicar la técnica de hibridación in situ y realizamos la prueba de detección. Como se vio anteriormente, cuando se amplificaron las muestras demostramos que todas las muestras positivas por MAC Elisa resultaron positivas para Dengue, y en caso de nuestro ensayo colorimétrico todas dieron positivas (Pozos M1-M10 de la figura 31); de las muestras que eran negativas por el método de MAC ELISA y positivas por RT-PCR tradicional, las tres demostraron ser positivas por nuestro método (Pozos M11-M13 de la figura 31); Ocho muestras con indeterminación serológica y que resultaron positivas por el RT-PCR tradicional también resultaron positivas con nuestro ensayo (Pozos M14-M21 de la figura 31); finalmente se sometió una de las muestras de mosquitos infectados y también resultó positiva con nuestro ensayo (Pozo M22 de la figura 31);. Esto demostró que nuestro método es específico, sensible y susceptible de un proceso de validación más riguroso con microarreglos.

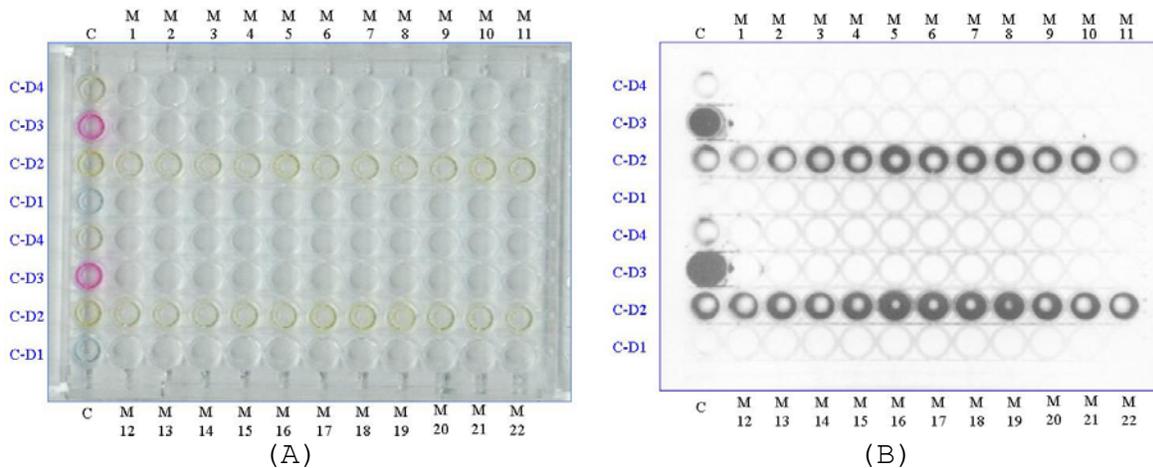


Figura 31. Ensayo colorimetrico de la prueba de detección especifica para el virus del dengue. El panel A muestra en la primera columna de pozos el color característico para cada uno de las sondas marcadas, dengue 1-Azul, dengue 2-amarillo, dengue 3-purpura y dengue 4 amarillo, que fueron hibridadas con células en cultivo; el panel B muestra el mismo ensayo pero bajo luz ultravioleta donde puede constatarse la presencia de producto hibridado. Los carriles tres y siete muestran los productos de hibridación para las muestras obtenidas en el estado de Oaxaca.

### Desarrollo de Tecnología de punta para el futuro.

Finalmente es importante mencionar que los primers específicos para cada serotipo fueron unidos covalentemente en placas de vidrio y posteriormente el producto de cDNA marcado se hibridó con estos oligos convirtiendo nuestro método en la tecnología de punta conocida como microchips (microarrays) para que se pueda aplicar el diagnóstico de dengue de cada uno de sus serotipos como de sus genotipos de manera simple, sistemática y práctica. Esta tecnología puede expandirse con otros juegos de primers y ello entonces permitiría manejar un gran número de muestras obteniendo resultados de gran certeza.

### Diseño del Microarreglo.

En la Figura se observa el diseño del microarreglo, cada uno cuenta con 10 MTs (negro), 3 controles positivos (amarillo) y 3 controles negativos (rosa) por duplicado (32 "spots"). Cada "patch" está en los extremos del área central del arreglo, donde cada uno de los 16 elementos está numerado. Cada "spot" tiene un diámetro aprox. de 300  $\mu\text{m}$  y están separados entre sí por 1000  $\mu\text{m}$  respecto a su origen. Este diseño permite imprimir 32 "patches" (512 "spots").

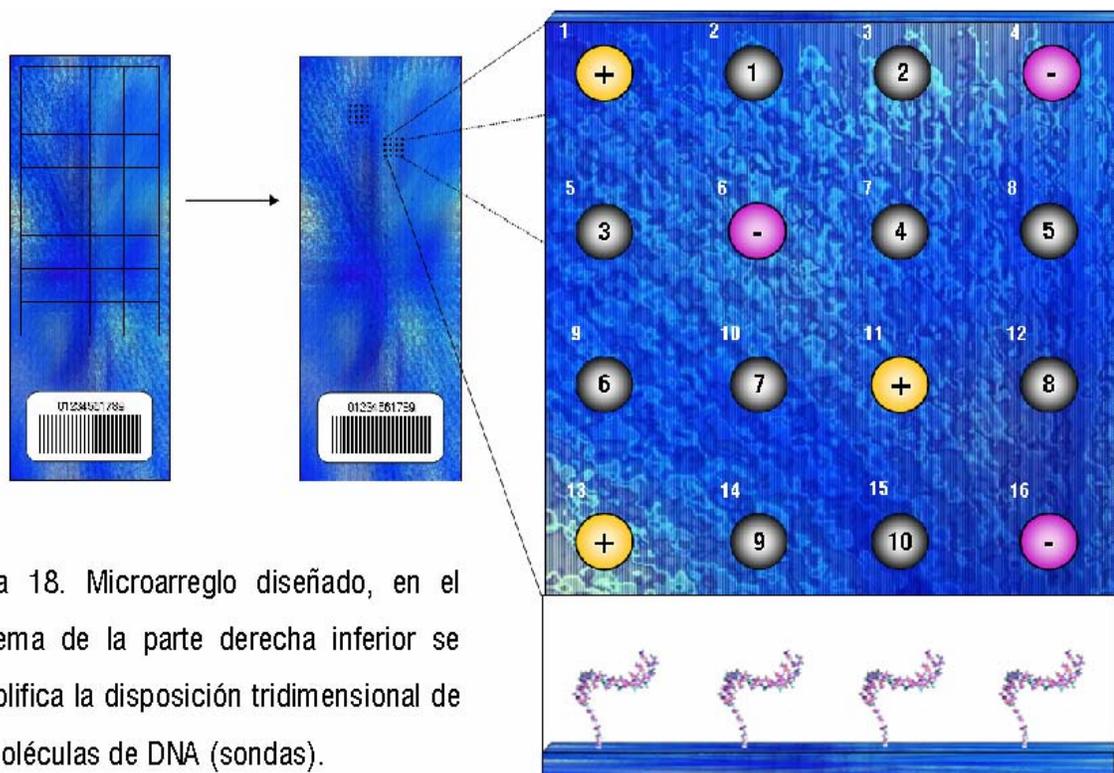


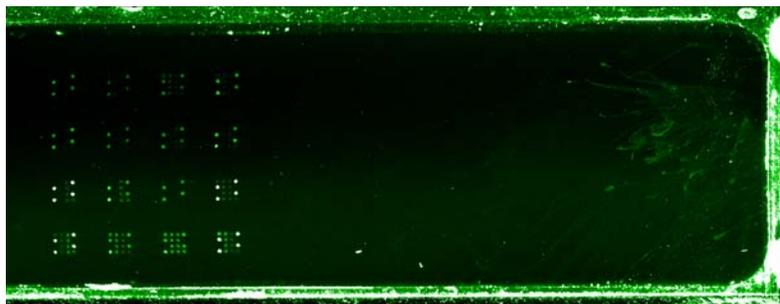
Figura 18. Microarreglo diseñado, en el esquema de la parte derecha inferior se ejemplifica la disposición tridimensional de las moléculas de DNA (sondas).

### Impresión, Fijación y tensión del microarreglo.

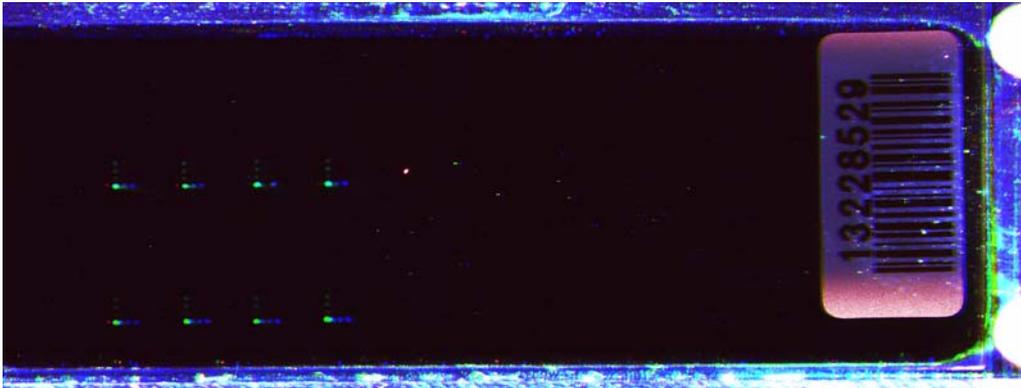
Todo el trabajo de impresión y visualización de los microarreglos se llevo a cabo en el laboratorio R-8 de la red Inter. Institucional de microarreglos del Cinvestav-Cicata-Ipn.



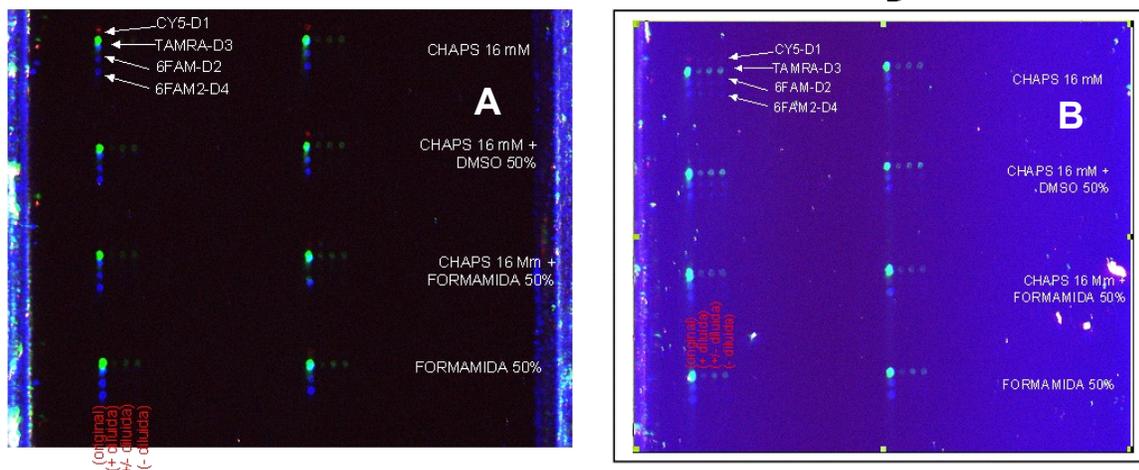
Después de la impresión y fijación del microarreglo, se hizo una tinción con el colorante “SyBr Green I”. Este colorante tiñe DNA de doble cadena, por lo que es posible observarlo de color verde cuando el colorante es excitado a una longitud de onda próxima a los 550 nm. En la Figura se observan las muestras teñidas de color verde, mientras que el único control negativo, sin DNA, que sólo contiene la solución de impresión (-DMSO 50%), no se observa teñido.



La expresión detectada para las diferentes sondas con las líneas celulares en el microarreglo se analizó visualmente.



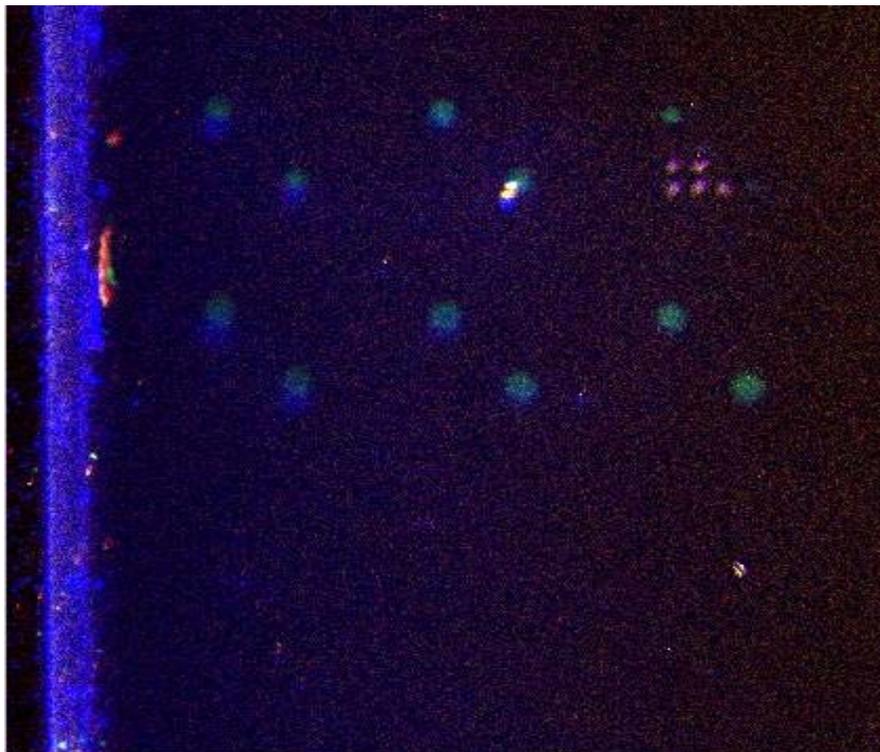
Las laminillas mostradas son ejemplos representativos de los resultados preliminares sobre la impresión e hibridación de moléculas de cDNA, productos de PCR, RT-PCR y sondas marcadas con diferentes fluorocromos (\_Cy5-DEN 1, \_6 FAM-DEN 2, \_TAMRA-DEN 3, \_6 FAM-DEN 4). Estos experimentos se han realizado con RNA de células infectadas C6/36 con los diferentes serotipos del virus Dengue (DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4) y aislados de dengue obtenidos de pacientes infectados. Para la impresión de los microarreglos se han empleado laminillas amino funcionalizadas comerciales (Corning) y laminillas preparadas por nuestro grupo de trabajo. En la figura se puede observar la impresión de las sondas de DEN marcadas por los diferentes fluorocromos. En A se empleó la laminilla comercial (Corning) y en B la preparada por nuestro grupo de trabajo.



Estos resultados preliminares demuestran la viabilidad de nuestras laminillas para la preparación de los microarreglos con un costo 10 veces menor que las comerciales. En la figura se imprimieron productos de PCR específicos para DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4 y se hibridaron

con las sondas específicas para los diferentes serotipos, se puede observar que la sonda para dengue 1 híbrido exclusivamente con los amplicones de DEN1 (fluoresciendo en rojo).

La viabilidad de las laminillas preparadas por nuestro grupo de trabajo esta dando muy buenos resultados en otras aplicaciones de diagnostico, con la posibilidad de optimizar aún más las condiciones. Así mismo una gran ventaja es que el costo en este momento se ha reducido 12 veces con respecto a las comerciales.



### **Tipificación del virus del dengue en muestras de campo utilizando el sistema de microarreglos.**

A pesar de que se ha implementado, por parte de las Secretarías Estatales de Salud, el ensayo Mac-ELISA como un método de diagnóstico primario, éste muestra poca sensibilidad, debido a que sólo detecta infecciones primarias de dengue, como se vio previamente. Exclusivamente en los pacientes que en sus reportes clínicos muestran la sintomatología del dengue hemorrágico se evalúan mediante el kit de diagnóstico IgG-ELISA (LESPO, 2003). Debido a esto en ocasiones hay una sub-notificación de casos en sus reportes lo que hace necesario el desarrollo de nuevos métodos de diagnósticos, tales como el RT-PCR que además de detectar directamente la presencia del patógeno tiene la ventaja de poder elucidar el serotipo y el genotipo. Debido a esto, desarrollamos una técnica de RT-PCR - Microarreglos para detectar, tipificar y genotipificar al DENV en las muestras de pacientes en el Estado de Oaxaca. Basados en trabajos previamente reportados por Seah et al. (1995) se desarrollo la técnica de serotipificación. Los primers-sondas

empleados para desarrollar estos métodos se mostraron anteriormente. Así mismo, después de diversas consideraciones técnicas y metodológicas se identifico y tipifico al virus en 147 aislados y 320 pools de mosquitos.

En los resultados (tablas IX y X) podemos observar que el serotipo DEN-2 fue el que se detecto con mayor frecuencia en las muestras obtenidas entre los años 2000-2006. Empleando este método pudimos detectar el reporte de falsos positivos y falsos negativos. Los aislados de dengue serotipo 2 estudiados con mayor profundidad se obtuvieron en células C6/36. El serotipo de estos aislados fue confirmado mediante las técnicas de IF y FACS empleando anticuerpos monoclonales anti-DEN2. Finalmente, como ya se mencionó, para identificar el serotipo de los aislados, se utilizó la secuenciación como medio de confirmación.

### Sitios y fechas colecta mosquitos infectados con el virus del dengue.

SITIO COLECTA	LOCALIDAD	COORDADAS GEOGRAFICAS (Norte/Oriente)	ALTITUD (MSNM)	POOLS OBTENIDOS	FECHA COLECTA	ESPECIE
<b>Quintana Roo</b>						
	Cancún	21°09'00.93" / 86°49'39.20"	7.35	(19)	07/08/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Cozumel	20°30'31.53" / 86°56'45.42"	3.5	(6)	08/08/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Felipe Carrillo Puerto	19°35'12.24" / 88°02'22.67"	12.5	(11)	09/08/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Puerto Arturo	19°39'51.45" / 89°04'57.21"	65	(13)	11/08/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
<b>Yucatán</b>						
	La Esperanza	21°02'09.70" / 87°38'33.46"	16.5	(14)	13/08/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Tinum	20°46'03.22" / 88°23'18.78"	30.5	(6)	15/08/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Ticum	20°08'50.65" / 89°12'54.87"	33	(11)	17/08/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Mérida	20°59'31.05" / 89°38'08.56"	12	(19)	19/08/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
<b>Campeche</b>						
	Hopelchén	19°44'37.80" / 89°50'38.49"	96	(9)	21/08/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Calakmul	18°21'18.04" / 89°32'15.35"	292.5	(19)	23/08/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Francisco Escárcega	18°36'00.02" / 90°43'41.11"	80	(13)	25/08/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Palizada	18°15'15.04" / 92°05'25.22"	3.5	(8)	27/08/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
<b>Tabasco</b>						
	Tenosique	17°28'54.38" / 91°24'59.10"	28.5	(19)	04/09/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Jalapa	17°43'25.45" / 92°48'44.87"	14	(11)	06/09/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Villahermosa	17°59'19.10" / 92°55'54.18"	24	(23)	08/09/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Paraíso	18°24'14.18" / 93°12'17.94"	11	(17)	10/09/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
<b>Chiapas</b>						
	Ocotingo	16°53'54.06" / 92°06'14.24"	1000	(21)	12/09/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Tapachula	14°52'03.61" / 92°16'18.06"	114	(7) (21)	14/09/2005	<i>Ae. albopictus</i> . <i>Ae. aegypti</i>
	Tuxtla Gutiérrez	16°45'48.19" / 93°06'09.98"	522	(9)	16/09/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Arriaga	16°14'24.01" / 93°54'34.13"	55.47	(14)	18/09/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
<b>Veracruz</b>						
	Acayúcan	17°57'92.90" / 94°55'15.11"	72.5	(39)	02/10/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Tierra Blanca	18°27'33.10" / 96°21'24.48"	60.5	(18)	04/10/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Xalapa	19°33'12.88" / 96°54'44.00"	1440	(11)	06/10/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Tantoyuca	21°21'10.21" / 98°13'08.71"	161.5	(22)	08/10/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
<b>Oaxaca</b>						
	Tavela	16°39'37.79" / 95°59'58.37"	778	(14)	10/10/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Pochutla	15°44'52.55" / 96°28'09.64"	149.5	(37)	12/10/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Oaxaca I	17°02'34.13" / 96°43'06.91"	1535	(22)	14/07/2004	<i>Ae. aegypti</i> .
	Oaxaca II	17°02'34.13" / 96°43'06.91"	1535	(17)	14/10/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Tuxtepec I	18°04'93.70" / 96°06'78.30"	32.5	(43)	17/07/2003	<i>Ae. aegypti</i> .
	Tuxtepec II	18°04'93.70" / 96°06'78.30"	32.5	(45)	02/09/2004	<i>Ae. aegypti</i> .
	Tuxtepec III	18°04'93.70" / 96°06'78.30"	32.5	(11)	16/10/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
	Nanahuatipan	18°07'21.42" / 97°06'45.81"	788	(17)	19/10/2005	<i>Ae. aegypti</i> .
<b>Puebla</b>						

	Venustiano Carranza	20°30'31.30" / 97°40'16.54"	140	(11)	16/07/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Acateno	20°07'59.74" / 97°12'18.12"	133	(9)	17/07/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Acatlan	18°12'00.94" / 98°02'53.64"	1176	(2)	18/07/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Izucar Matamoros	18°35'52.52" / 98°28'28.68"	1273	(13)	19/07/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
<b>Guerrero</b>						
	Ometepec	16°41'04.02" / 98°24'03.72"	306	(4)	21/10/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Huamuxtitlan	17°47'50.38" / 98°33'47.22"	887	(22)	22/10/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Huitzuco	18°18'31.09" / 99°20'37.98"	930	(12)	23/10/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Petatlán	17°32'12.48" / 101°16'09.65"	31	(17)	24/10/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
<b>Morelos</b>						<i>Ae. aegypti.</i>
	Tepalcingo	18°35'57.97" / 98°50'25.78"	1168	(8)	31/05/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Yautepec	18°52'52.76" / 99°04'02.78"	1222	(14)	31/05/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Xochitepec	18°48'07.18" / 99°14'08.09"	1167	(11)	30/05/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Puente Ixtla	18°36'43.83" / 99°19'58.28"	904	(9)	30/05/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
<b>Hidalgo</b>						<i>Ae. aegypti.</i>
	Huehuetla	20°31'37.64" / 98°01'15.78"	925	(4)	27/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Jaltocan	21°10'23.65" / 98°35'58.86"	172	(2)	28/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Metztlan	20°35'31.25" / 98°45'43.53"	1310.5	(6)	29/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Tlanalapa	19°49'38.55" / 98°36'15.79"	2478	(3)	30/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
<b>México</b>						
	Malinalco	18°46'49.23" / 99°32'59.21"	1635	(14)	02/07/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Nuevo Santo Tomas	19°10'26.34" / 100°17'18.95"	1084	(7)	03/07/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Tejupilco	18°53'23.32" / 100°08'25.64"	1309	(9)	04/07/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Tlatlaya	18°32'17.37" / 100°13'47.38"	911	(9)	05/07/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
<b>Tamaulipas</b>						
	Matamoros	25°50'36.99" / 97°27'45.08"	5	(8)	24/07/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Soto la Marina	23°46'09.07" / 98°12'44.45"	19	(9)	25/07/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Ciudad Mante	22°45'14.20" / 98°59'28.66"	75	(31)	27/07/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Nuevo Laredo	27°29'06.75" / 99°31'47.13"	135	(3)	29/07/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
<b>Querétaro</b>						
	Tancoyol	21°28'38.70" / 99°18'53.55"	1162	(4)	04/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Landa Matamoros	21°11'12.42" / 99°19'13.32"	1026	(8)	05/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Jalpan	21°10'17.79" / 99°25'14.23"	890	(3)	06/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Arroyo Seco	21°32'50.05" / 99°41'15.58"	993.5	(7)	07/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
<b>Guanajuato</b>						
	Guanajuato	21°01'12.33" / 101°15'56.92"	2048	(7)	09/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Irapuato	20°42'08.61" / 101°22'12.88"	1721.5	(13)	11/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Abasolo	20°27'04.59" / 101°32'04.86"	1725	(2)	13/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Penjamo	20°26'13.61" / 101°43'03.84"	1841	(6)	15/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
<b>Michoacán</b>						
	Huetamo	18°37'11.89" / 100°53'25.31"	318.5	(14)	19/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Tacambaro	19°14'29.25" / 101°27'13.96"	1617	(7)	21/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Lázaro Cárnas	17°58'21.82" / 102°13'41.12"	36	(5)	23/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Apatzingan	19°05'21.86" / 102°22'08.41"	310.5	(9)	25/06/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
<b>Colima</b>						
	Colima	19°14'43.90" / 103°42'23.33"	533	(21)	26/09/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Tecoman	18°54'54.16" / 103°53'12.38"	36.5	(9)	27/09/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Minatitlan	19°23'16.59" / 104°03'17.13"	756	(4)	28/09/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Manzanillo	19°03'35.47" / 104°17'18.53"	32	(8)	29/09/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
<b>Jalisco</b>						
	Pihuamo	19°15'24.83" / 103°22'33.15"	713	(9)	22/05/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Tequila	20°53'20.25" / 103°50'02.26"	1184	(21)	24/05/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Cihuatlan	19°13'58.41" / 104°34'17.31"	18.5	(4)	26/05/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Mismaloya	20°31'52.79" / 105°17'09.14"	24.5	(6)	28/05/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
<b>Nayarit</b>						
	Ixtlan del Río	21°01'52.83" / 104°22'30.69"	1040	(8)	14/05/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Tepic	21°30'04.94" / 104°53'04.03"	923.5	(16)	16/05/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Ixcuintla	21°48'04.57" / 105°12'13.70"	16.5	(6)	18/05/2005	<i>Ae. aegypti.</i>
	Acaponeta	22°29'23.95" / 105°22'29.68"	58.5	(4)	20/05/2005	<i>Ae. aegypti.</i>

**Número de casos reportados como positivos en sueros de pacientes infectados con el virus del dengue.**

Clave de la Muestra	Fecha	Sexo	Edad	Localidad	Diagnóstico Clínico	RT PCR	μARRAY
OAX 01	16/7/2000	Femenino	07	Tuxtepec	Dengue Clásico	2	2
OAX 02	18/7/2000	Femenino	01	Tuxtepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 03	18/7/2000	Masculino	07	Tuxtepec	Dengue Clásico	2	2
OAX 04	18/7/2000	Masculino	10	Tuxtepec	Dengue Clásico	2	2
OAX 05	31/7/2000	Masculino	40	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 06	15/8/2000	Masculino	17	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 07	5/9/2000	Masculino	44	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 08	20/9/2000	Femenino	88	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 09	27/9/2000	Masculino	09	Tuxtepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 10	27/9/2000	Femenino	77	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 11	27/9/2000	Masculino	66	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 12	30/7/2000	Masculino	51	Tuxtepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 13	23/9/2000	Masculino	8 mes	Salina Cruz	Dengue Clásico	2	2
OAX 14	23/9/2000	Masculino	7	Salina Cruz	Dengue Clásico	2	2
OAX 15	23/9/2000	Femenino	2	Salina Cruz	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 16	23/9/2000	Femenino	8 mes	Salina Cruz	Dengue Clásico	2	2
OAX 17	23/9/2000	Masculino	6	Salina Cruz	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 18	23/9/2000	Masculino	8	Salina Cruz	Dengue Clásico	2	2
OAX 19	23/9/2000	Masculino	8	Salina Cruz	Dengue Clásico	2	2
OAX 20	23/9/2000	Femenino	N/D	Salina Cruz	Dengue Clásico	2	2
OAX 21	30/9/2000	Femenino	7	Salina Cruz	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 22	1/10/2000	Femenino	21	Salina Cruz	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 23	18/9/2000	Masculino	4	Tehuantepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 24	18/9/2000	Femenino	9	Tehuantepec	Dengue Clásico	2	2
OAX 25	18/9/2000	Masculino	11	Tehuantepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 26	23/9/2000	Masculino	8	Tehuantepec	N/D	2	2
OAX 27	23/9/2000	Masculino	8	Tehuantepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 28	23/9/2000	Femenino	N/D	Tehuantepec	Dengue Clásico	2	2
OAX 29	30/10/2000	Femenino	7	Tehuantepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 30	1/10/2000	Femenino	21	Tehuantepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 31	24/7/2000	Masculino	N/D	CD. Oaxaca	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 32	30/8/2000	Masculino	18	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	2	2
OAX 33	29/9/2000	Femenino	36	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 34	29/9/2000	Masculino	67	CD. Oaxaca	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 35	1/10/2000	Femenino	8	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 36	1/10/2000	Femenino	44	CD. Oaxaca	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 37	30/9/2000	Femenino	28	Juchitan	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 38	1/10/2000	Femenino	65	Juchitan	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 39	1/10/2000	Femenino	10	Juchitan	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 40	1/10/2000	Femenino	6	Juchitan	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 41	1/10/2000	Femenino	34	Juchitan	Dengue Clásico	2	2
OAX 42	29/5/2001	Femenino	10	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 43	15/6/2001	Masculino	3	Tuxtepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 44	18/6/2001	Masculino	15	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	N/D	N/D
OAX 45	25/6/2001	Masculino	27	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	N/D	N/D
OAX 46	2/8/2001	Masculino	52	Tuxtepec	Dengue Clásico	2	2

OAX 47	13/8/2001	Masculino	13	Tuxtepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 48	30/8/2001	Femenino	14	Tuxtepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 49	10/9/2001	Masculino	15	Tuxtepec	Dengue Clásico	2	2
OAX 50	17/9/2001	Femenino	35	Tuxtepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 51	17/9/2001	Masculino	8	Tuxtepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 52	27/9/2001	Masculino	44	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 53	27/9/2001	Masculino	9 mes	Tuxtepec	Dengue Clásico	2	2
OAX 54	27/9/2001	Femenino	42	Tuxtepec	Dengue Clásico	2	2
OAX 55	27/9/2001	Masculino	37	Tuxtepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 56	27/9/2001	Masculino	8	Tuxtepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 57	4/6/2001	Femenino	N/D	Salina Cruz	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 58	21/2/2001	Masculino	38	CD. Oaxaca	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 59	28/5/2001	Masculino	65	CD. Oaxaca	Dengue Hemorrágico	N/D	N/D
OAX 60	18/6/2001	Masculino	2	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	2	2
OAX 61	25/6/2001	Masculino	30	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 62	27/6/2001	Femenino	49	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	2	2
OAX 63	29/6/2001	Femenino	51	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	2	2
OAX 64	2/7/2001	Femenino	39	CD. Oaxaca	N/D	N/D	N/D
OAX 65	18/9/2001	Femenino	55	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	2	2
OAX 66	24/9/2001	Femenino	25	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 67	27/8/2001	Masculino	4	Juchitan	Dengue Clásico	2	2
OAX 68	27/8/2001	Masculino	58	Juchitan	Dengue Clásico	3	3
OAX 69	27/8/2001	Femenino	13	Juchitan	Dengue Clásico	2	2
OAX 70	27/8/2001	Masculino	28	Juchitan	Dengue Clásico	2	2
OAX 71	27/8/2001	Femenino	44	Juchitan	Dengue Clásico	2 y 3	2 y 3
OAX 72	10/9/2001	Masculino	10	Juchitan	Dengue Clásico	2	2
OAX 73	10/9/2001	Femenino	23	Juchitan	N/D	2	2
OAX 74	10/9/2001	Masculino	14	Juchitan	N/D	3	3
OAX 75	10/9/2001	Masculino	38	Juchitan	Dengue Clásico	2	2
OAX 76	10/9/2001	Masculino	18	Juchitan	Dengue Clásico	2	2
OAX 77	13/9/2001	Femenino	13	Juchitan	Dengue Clásico	3	3
OAX 78	1/10/2001	Masculino	11	Juchitan	Dengue Clásico	2	2
OAX 79	1/10/2001	Masculino	6	Juchitan	N/D	N/D	N/D
OAX 80	1/10/2001	Masculino	7	Juchitan	Dengue Clásico	2	2
OAX 81	14/3/2001	Masculino	10	Huajuapán de León	Dengue Clásico	2	2
OAX 82	14/3/2001	Femenino	14	Huajuapán de León	Dengue Clásico	2	2
OAX 83	19/6/2001	Masculino	8 mes	Huajuapán de León	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 84	5/7/2001	Femenino	7	Huajuapán de León	Dengue Clásico	2	2
OAX 85	31/5/2001	Masculino	7	Huatulco	Dengue Clásico	2	2
OAX 86	31/5/2001	Masculino	43	Huatulco	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 87	31/5/2001	Masculino	22	Huatulco	Dengue Clásico	2	2
OAX 88	31/5/2001	Masculino	32	Huatulco	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 89	7/6/2001	Masculino	65	Huatulco	Dengue Clásico	2	2
OAX 90	7/6/2001	Femenino	17	Huatulco	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 91	7/6/2001	Femenino	23	Huatulco	Dengue Clásico	2	2
OAX 92	7/6/2001	Masculino	10	Huatulco	Dengue Clásico	2	2
OAX 93	7/6/2001	Masculino	18	Huatulco	Dengue Clásico	2	2
OAX 94	7/6/2001	Femenino	14	Huatulco	Dengue Clásico	2	2
OAX 95	7/6/2001	Masculino	36	Huatulco	Dengue Clásico	2	2
OAX 96	8/6/2001	Masculino	5	Huatulco	N/D	2	2
OAX 97	15/6/2001	Femenino	10	Huatulco	Dengue Hemorrágico	2	2

OAX 98	5/7/2001	Femenino	51	Huatulco	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 99	5/7/2001	Femenino	34	Huatulco	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 100	5/7/2001	Femenino	40	Huatulco	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 101	9/3/2001	Masculino	35	Tlacolula	Dengue Clásico	2	2
OAX 1002	5/7/2001	Femenino	N/D	Puerto Escondido	Dengue Clásico	2	2
OAX 103	30/8/2001	Femenino	58	Unión Hidalgo	Dengue Clásico	2	2
OAX 104	4/9/2001	Femenino	32	Pochutla	Dengue Clásico	2	2
OAX 105	4/9/2001	Femenino	21	Pochutla	Dengue Clásico	2	2
OAX 106	4/9/2001	Femenino	29	Pochutla	Dengue Clásico	2	2
OAX 107	4/9/2001	Femenino	10	Pochutla	Dengue Clásico	2	2
OAX 108	27/9/2001	Femenino	54	Huitzo	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 109	2004	Femenino	67	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 110	2004	Femenino	8	Tuxtepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 111	2004	Femenino	12	Tuxtepec	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 112	2004	Masculino	7	Tuxtepec	Dengue Clásico	2	2
OAX 113	2004	Femenino	12	Tuxtepec	Dengue Clásico	2	2
OAX 114	2004	Masculino	59	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 115	2005	Femenino	45	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 116	2005	Femenino	38	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 117	2005	Femenino	69	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 118	2005	Femenino	81	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 119	2005	Masculino	39	Tuxtepec	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 120	2005	Masculino	54	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	2	2
OAX 121	2005	Masculino	2	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 122	2005	Masculino	N/D	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 123	2005	Femenino	45	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	2	2
OAX 124	2005	Masculino	12	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	2	2
OAX 125	2005	Masculino	8	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	N/D	N/D
OAX 126	2005	Femenino	N/D	CD. Oaxaca	Dengue Hemorrágico	2	2
OAX 127	2005	Femenino	4 mes	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	2	2
OAX 128	2005	Femenino	12	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	2	2
OAX 129	2005	Femenino	72	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	2	2
OAX 130	2005	Femenino	46	CD. Oaxaca	Dengue Clásico	2	2
OAX 131	2006	N/D	N/D	Tuxtepec	N/D	2	2
OAX 132	2006	N/D	N/D	Tuxtepec	N/D	2	2
OAX 133	2006	N/D	N/D	Tuxtepec	N/D	2	2
OAX 134	2006	N/D	N/D	Tuxtepec	N/D	2	2
OAX 135	2006	N/D	N/D	Tuxtepec	N/D	2	2
OAX 136	2006	N/D	N/D	Tuxtepec	N/D	2	2
OAX 137	2006	N/D	N/D	Tuxtepec	N/D	2	2
VER 138	11/7/2006	Femenino	N/D	N/D	Dengue Hemorrágico	1	1
VER 139	27/7/2006	Masculino	N/D	N/D	Dengue Hemorrágico	1	1
VER 140	2/8/2006	Femenino	N/D	N/D	Dengue Hemorrágico	2	2
VER 141	10/8/2006	Femenino	N/D	N/D	Dengue Hemorrágico	2	2
VER 142	16/8/2006	Femenino	N/D	N/D	Dengue Hemorrágico	1	1
VER 143	16/8/2006	Femenino	N/D	N/D	Dengue Hemorrágico	3	3
VER 144	23/8/2006	Femenino	N/D	N/D	Dengue Hemorrágico	N/D	N/D
VER 145	25/8/2006	Masculino	N/D	N/D	Dengue Hemorrágico	1	1
VER 146	25/8/2006	Femenino	N/D	N/D	Dengue Clásico	1	1
VER 147	25/8/2006	Masculino	N/D	N/D	Dengue Clásico	2	2

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.

El diseño inicial de un microarreglo debe ser simple, es decir, que la ubicación de los controles y sondas específicas sea fácil de localizar. De esta manera, al observar una imagen después de la impresión y/o la hibridación, se puede saber en primera instancia, si las condiciones en las que se hicieron los experimentos son las adecuadas. Esto se puede lograr a través de una disposición simétrica de los elementos impresos; además, de esta manera se podrán analizar más fácilmente las señales registradas por el “software” y se podrá ahorrar tiempo con el análisis de las imágenes. Las infecciones por dengue se han convertido en un problema internacional de salud con epidemias explosivas que ocurren en muchas partes del mundo. Por lo tanto es muy importante contar con herramientas sensibles y específicas que tengan como propósito la determinación del diagnóstico y la epidemiología de esta enfermedad.

Así mismo tomando en cuenta que las infecciones ocasionadas por el virus del Dengue en la actualidad han resurgido en una forma alarmante a nivel mundial y que el número de personas infectadas es de entre 30 y 60 millones por año, se hace imperiosa la necesidad de contar con un sistema de diagnóstico efectivo, que permita distinguir al dengue de otras patologías ocasionadas por otros agentes infecciosos. Como lo indica la revisión bibliográfica hasta la fecha, los sistemas de diagnóstico utilizados para detectar infecciones por el virus del Dengue, no permiten emitir un diagnóstico adecuado, rápido y los resultados generalmente son confusos. Los métodos de Cultivo presentan ventajas en cuanto a que es posible detectar el serotipo responsable de la infección, sin embargo presentan los inconvenientes de ser muy tardados y tediosos (como se mencionó anteriormente). Además si comparamos estos métodos con el sistema de diagnóstico por PCR acoplado al sistema de Hibridación in situ en placa tipo ELISA (desarrollado en este proyecto), observamos que este último presenta muchas ventajas tales como, rapidez y confiabilidad, así como especificidad, ya que se puede detectar el serotipo involucrado en la infección. En cuanto a costos, resulta más barato montar un laboratorio de Biología Molecular con infraestructura básica, que un laboratorio con infraestructura para trabajar cultivos celulares, ya que mantener los cultivos celulares es exageradamente caro; esto debido a la gran cantidad de material desechable, medios de cultivo, suero y demás reactivos necesarios para los cultivos celulares.

En cuanto al entrenamiento de personal, también es menos tedioso y riesgoso trabajar técnicas de Biología Molecular que exponerse al virus en forma más prolongada, como es en el caso de cultivos celulares. Otra de las desventajas del diagnóstico por cultivo celular, es el número de muestras que se puede procesar. En zonas endémicas donde el número de infecciones con el virus del Dengue es elevado, una sola persona no podría evaluar un gran número de muestras, en cambio con el sistema de diagnóstico por PCR – Hibridación en placa tipo ELISA, una persona bien entrenada, podría determinar al menos 100 muestras en un solo día sin mayor dificultad.

Aunque en la literatura se han reportado varias metodologías para detectar este tipo de infecciones, en México y en la mayoría de los países en el mundo con problemas endémicos por virus de Dengue, no cuentan con un sistema de Diagnóstico confiable, por lo que el Desarrollo de un Sistema de Diagnóstico eficiente, y con posibilidades de adaptarlo a un Kit comercial, es invaluable para ayudar a resolver este grave problema de salud, a través de una campaña de diagnóstico y seguimiento global. Esto resultaría en beneficio de todas las personas con riesgo de infección.

Como ya mencionamos muchas de las técnicas descritas hasta el momento en la literatura han demostrado que en muchos casos son laboriosas, poco prácticas, caras y faltas de especificidad. Estas técnicas han servido para clasificar a los virus en serotipos basadas en sus características antigénicas como: la neutralización viral (Calisher et al., 1989); por inmunofluorescencia en cultivo de células (Henchal et al., 1983); y por fijación de complemento (Tesh, 1979). Así mismo se han descrito una serie de técnicas en la literatura con la visión muy propia de diagnosticar esta enfermedad, sin embargo éstas presentan diferentes problemas. Por ejemplo, no puede distinguir entre cepas, subtipos o genotipos; dan muy poca información acerca de la variación genética dentro de un serotipo del virus o acerca del origen epidemiológico o características fenotípicas de nuevos aislados virales; en un análisis comparativo de diferentes virus, prácticamente todo el RNA extraído de virus purificados o de células infectadas es empleado; Estas técnicas generalmente son tediosas y requiere grandes cantidades de virus y el manejo de expertos en el manejo del RNA. De aquí, nuevamente resaltar el interés de desarrollar una prueba de diagnóstico útil en el corto plazo para determinar el serotipo del virus y a largo plazo, siguiendo la misma estrategia, para determinar el genotipo o los genotipos dentro de cada serotipo, para de esta manera facilitar la clasificación de los virus por su virulencia.

Al iniciar este trabajo describimos un ensayo de RT-PCR, rápido, específico y sensible, para la detección y tipificación del virus del dengue. El método empleado consta básicamente de sólo 2 pasos: (a) la extracción del ARN a partir de sobrenadantes de cultivos celulares o sueros de pacientes infectados y (b) la generación, por retrotranscripción (RT), de un DNA copia-complementaria (cDNA), con amplificación subsecuente mediante la acción de la Taq DNA polimerasa. De esta forma, las 2 reacciones incluidas en el paso (b), se combinan en un solo tubo de reacción y se produce una reducción importante del tiempo del ensayo. Paralelamente, ello disminuye los riesgos de contaminación y es más factible la manipulación de un amplio número de muestras. El uso de primers específicos, que además determinan bandas de amplificación de diferentes tallas o tamaños para cada uno de los serotipos, permite la detección y al mismo tiempo la tipificación, de acuerdo con el tamaño de la banda amplificada (figura 22 en resultados). Por tanto, en este paso, la determinación correcta del tipo viral sólo requiere de la electroforesis del producto amplificado en gel de agarosa. Así se evitan otros procedimientos de biología molecular para la obtención del tipo viral, como es el caso de la hibridación con sondas radiomarcadas o de la segunda amplificación conocida como PCR anidada que, según se reporta, aumenta la sensibilidad pero complica la manipulación y demora el resultado. (Lanciotti et. al. 1992, Bélač et. al. 1993).

Se pudo comprobar la alta especificidad de uno de los juegos de primers utilizados. Los resultados se muestran en las figuras 22 y 30. La especificidad de los primers se debe a que ellos reconocen exclusivamente la secuencia específica de RNA del serotipo viral, a partir de la cual fueron diseñados. Los resultados del experimento de hibridación así lo confirman (figura 31). Comprobamos parcialmente, además, que no se produce reactividad cruzada con otros virus de la familia Flaviviridae que son transmitidos por mosquitos (datos no reportados).

El estudio de sensibilidad muestra resultados similares y para algunos serotipos, resultados superiores a los publicados por otros autores, quienes han trabajado con primers y diseños de ensayos semejantes a los que aquí mostramos. Esto puede deberse a que, a diferencia de dichos trabajos, empleamos un excelente método de extracción de RNA, que contribuye significativamente a los resultados obtenidos. En estudios anteriores comprobamos que, al menos en nuestras condiciones, la extracción simple empleada en trabajos hechos por otros autores

(Morita et. al 1991, Tanaka 1993) sólo permitió alcanzar una sensibilidad inferior a la que encontramos con la extracción de RNA descrita en este trabajo. Autores como Lanciotti muestran resultados de sensibilidad mejores que los nuestros, utilizando el mismo método de extracción de ARN, pero acoplado a una segunda re-amplificación de su producto de amplificación (RT-PCR) para lograr tales resultados e identificar el serotipo. Esto se podría aprovechar a futuro para optimizar aun nuestra propuesta de diagnóstico.

Como se mencionó previamente, en el laboratorio se cuenta con 5 de cepas pertenecientes a los 4 serotipos del virus del dengue. Por otra parte, los primers empleados al final de este trabajo sólo se habían utilizado antes por algunos cuantos grupos de trabajo para la identificación por RT-PCR de cepas circulantes localmente, no para el caso de cepas mexicanas. Los resultados que mostramos en las figuras 30 y 31, obtenidos con las cepas que describimos en la metodología, demuestran la gran reactividad de estos primers y su especificidad con los serotipos del virus del dengue que circulan en estas regiones del país (Oaxaca, Veracruz y sus alrededores) y, por tanto, queda abierta la posibilidad de emplearlos en estudios de diagnóstico, vigilancia y epidemiología molecular, realizados tradicionalmente por grupos locales de salud pública y/o en colaboración con laboratorios centralizados o países que tienen acceso a ellos. Si tenemos en cuenta que los mismos juegos de primers que empleamos han dado excelentes resultados en el diagnóstico durante epidemias de dengue en Singapur, podemos inferir que estos primers ofrecen la posibilidad de realizar estudios de epidemias de dengue y dengue hemorrágico, causadas por los serotipos que actualmente circulan en las regiones más afectadas de México y del mundo.

Como hemos referido anteriormente, las técnicas de PCR, con sus diferentes variantes, se han aplicado rápidamente y con propósitos diversos, fundamentalmente para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Sin embargo, son cada vez más frecuentes los reportes acerca de los problemas que la propia tecnología incorpora, entre ellos resaltan los de resultados falsos positivos y falsos negativos. (Sarkar et al., 1990; Bladbjerg et al., 2002). Con el propósito de disminuir estos riesgos, asumimos un grupo de medidas en la práctica diaria, semejantes a los descritos por Sarkar (1990) y Bladbjerg (2002), además del uso de al menos 2 controles negativos en cada ensayo: aquél que sustituye al material genético viral por el medio de cultivo de crecimiento de las células (5% suero), o bien células sin infectar, y el agua DEPC utilizada en la preparación de las reacciones. Por las características del virus que hemos estado estudiando y teniendo en cuenta la reactividad específica de los primers que empleamos, el uso de la combinación de los 4 juegos de primers en cada tubo de reacción contribuyo al control de las contaminaciones cruzadas entre los serotipos.

La hibridación "in situ" es la hibridación de fragmentos marcados de ADN de una hebra o de ARN con secuencias complementarias (sondas) a ADN/ARN celular, que en condiciones apropiadas forman híbridos estables. En general, la hibridación puede hacerse sobre soportes sólidos (filtros de nylon o nitrocelulosa), en solución (in vitro) o en cortes de tejido o preparaciones celulares (in situ). Se pueden utilizar sondas marcadas con elementos radioactivos, pero como se necesita protección y manipulación especiales, no son de elección para su uso rutinario, mucho menos en nuestro caso. Las técnicas no-isotópicas o colorimétricas son más rápidas y permiten la identificación más precisa de la reacción. Las sondas marcadas sin elementos radioactivos son más estables y más baratas. La sensibilidad es igual o levemente inferior a la de los métodos isotópicos. Se han utilizado sondas marcadas con biotina y digoxigenina, y mas recientemente se a propagado el uso de cromogenos como el Cy5, para PCR en tiempo real. La sensibilidad de la técnica depende de:

- 1) El efecto de la preparación de la muestra sobre la retención y accesibilidad de ADN celular blanco o ARN,
- 2) Los tipos de sondas, la eficiencia de la marcación de la sonda y la sensibilidad del método utilizado para la detección de la señal y
- 3) El efecto de las condiciones de hibridación in situ sobre la eficiencia de la hibridación.

La hibridación “in situ” se utiliza primordialmente en la detección de bajo número de copias de virus, en particular virus como agentes infecciosos (CMV) y como agentes carcinógenos (HPV, HBV, EBV). En la técnica de PCR-in situ se realiza primero amplificación de ADN blanco y luego detección mediante hibridación in situ convencional con sondas ADN/ARN. De esta manera pueden detectarse cantidades pequeñísimas de genoma viral.

Nosotros observamos que la marca fluorescente o lectura inicial es muy semejante (casi idéntica) a los datos tomados hasta dos días después de realizada la prueba, conservando esta a 4 °C y en la oscuridad.

La utilización de la técnica de PCR en tiempo real cada día toma mayor auge en los laboratorios de diagnóstico, pero resulta extremadamente caro, esta técnica tiene el mismo principio de nuestro ensayo, sin embargo es inalcanzable para los grupos locales de salud pública. Al observar los resultados obtenidos en nuestro ensayo consideramos que la técnica empleada aquí sería útil para emplearla en estudios de diagnóstico, a partir de aislados cuya identificación mediante anticuerpos monoclonales se haga difícil, bien por el bajo título viral o por pérdida de los epítopes específicos en las cepas estudiadas, para ciertos anticuerpos monoclonales tipo específicos, usualmente empleados con estos fines. Este último fenómeno aunque no parece tener una frecuencia significativa, ya ha sido reportado por otros autores en los serotipos 1 y 3. (Maneekarn et. al 1993, Monath et. al. 1986). Anexo a esto se puede hablar de futuras aplicaciones con el uso de Microarreglos y Biosensores, que equivale al siguiente paso en el diagnóstico molecular del virus del dengue (Bowtell 1999; Lipshutz et al., 1999; Duggan et al., 1999; Dolan et al., 2001; Schulze et al., 2001; Religio et al., 2002; Yu et al., 2002; Vercoutere et al., 2002; Baeumner et al., 2002; Hessner et al., 2003; THoen et al., 2003).

Si recordamos, el objetivo del presente trabajo fue el de desarrollar un método de diagnóstico diferencial sumando todas las herramientas existentes hasta el momento en la biotecnología y en la biología molecular. Como ya se demostró, una de estas herramientas es la reacción en cadena de la polimerasa que ha revolucionado el campo de la biotecnología y la biología molecular. Se había mencionado que previamente ya otros autores han basado sus estudios en esta tecnología para el desarrollo de algunas técnicas de diagnóstico. Retomamos como ejemplo nuestro punto de partida, Seah et al. (1995) desarrollaron una técnica de PCR semi-nested empleando primers específicos para la región NS3 del genoma viral, para tipificar así a los serotipos del virus del dengue en muestras de suero de pacientes con la enfermedad. Esta técnica esta basada en usar un par de primers externos para amplificar una determinada región aunada con un par de primers externos para reamplificar la región de interés. En la técnica de semi-nested se amplificó una región con primers conservados seguida de un PCR secundario usando un primer externo (sentido) río arriba y cuatro primers internos específicos (anti-sentido) río abajo. Mediante este ensayo pudieron detectar y tipificar al virus del dengue de manera específica. Con este procedimiento los autores lograron improvisar la especificidad y la sensibilidad ya que el molde para la segunda

ronda de amplificación en el primer producto amplificado de la primera ronda esta presente en bajo número de copias. La especificidad que mostraron estos autores fue similar a la mostrada previamente por Morita et al. (1991) y Lanciotti et al. (1992) quienes detectaron 2.5 pfu y 100 genomas virales equivalentes respectivamente. Es obvio que en esta técnica implica una mayor manipulación técnica comparado con los estudios mostrados para la detección de dengue con la prueba de un solo paso de RT-PCR (Seah et al., 1995). Aunque se puede decir que improvisaron la sensibilidad ya que con esta técnica se favorece la amplificación de RNAs que se encuentran en menor número de copias. Esto que parece una ventaja también podría representar una desventaja ya que cuando se aplica de manera rutinaria en el uso clínico se puede tener el riesgo de contaminación. Esto se puede prevenir mediante controles de astringencia adecuados para el trabajo de PCR clínico.

Por otro lado, es importante considerar que se han descrito las secuencias completas de diferentes cepas de virus que se han obtenido por el clonaje de cDNA, sin embargo este tipo de tecnología es poco práctica para el análisis de la comparación rápida y para el manejo de numerosas cepas de virus. También sabemos que el desarrollo de PCR asociado con la transcripción reversa (RT) de genes virales ha proveído una herramienta invaluable para el análisis rápido de genes y diagnóstico. Así mismo es importante mencionar la dificultad que existe en la purificación de RNA de virus de muestras clínicas por la presencia de RNAsas y de aquí la importancia de contar con inhibidores de esta enzima o de agentes caotrópicos los cuales desnaturalizan a las proteínas durante el proceso de purificación. Por lo que dentro de la optimización de los procedimientos de purificación empleados para la purificación de RNA total se incluyó el empleo del inhibidor de ribonucleasa RnasinR (Promega, USA) y tiocianato de guanidina, un fuerte desnaturalizante de proteínas. Con esto logramos purificar RNA viral intacto.

Otro aspecto importante es que para el estudio futuro de los genotipos no es suficiente con amplificar las regiones específicas para cada serotipo sino será necesario amplificar otras regiones dentro del genoma del virus, de ahí la importancia de amplificar el genoma completo del virus del dengue de los diferentes aislados o de las muestras de los pacientes. Para lograr esto empleamos Reverso transcriptasas de alta especificidad, RAV2 y Superscript II Rnase H- , que permiten la transcripción de cadenas largas de RNA. Para probar que habíamos logrado la amplificación de las cadenas largas después de obtener el cDNA se amplificaron las regiones para la tipificación de los virus del extremo 5' del genoma del virus, logrando la amplificación en todos los casos (Figuras 18 y 19).

Después de probar los diferentes primers específicos para amplificar cada uno de los serotipos reportados por diferentes autores encontramos que los primers reportados por Seah en 1995 (Figuras 22, 23 y 24) son los mas específicos, sensibles y con los que obtenemos resultados reproducibles. Por lo que nos dimos a la tarea de amplificar las regiones específicas para cada serotipo empleando los primers específicos para dengue 1, 2, 3 y 4 marcados con Cy5, 6 FAM, TAMRA, y 6FAM respectivamente para amplificar los diferentes fragmentos y aumentar la sensibilidad del ensayo. Los resultados nos mostraron que fuimos capaces de incrementar la sensibilidad considerablemente. De esta manera demostramos que nuestros ensayos podrían resultar mas sensibles comparados con los intentos de aislamiento del virus. El PCR con primers marcados con cromogenos puede así ser relevante en la clínica facilitando la identificación temprana de RNA de dengue viral en sueros virémicos. Mas aun este ensayo es mas rápido dando resultados en menos de 24 h, opuesto al tiempo que normalmente tarda el aislamiento del virus que es de 4 a 5 dias en el mejor de los casos y la necesidad de esperar de 10 a 15 dias para tener

títulos de anticuerpos lo suficientemente altos para su diagnóstico en el paciente. En adición, mientras el PCR puede detectar RNA viral de dengue en suero que se mantiene por periodos de tiempo prolongados, el aislamiento en cultivo de tejido falla en la recuperación de virus inactivados del mismo suero. Similarmente otros autores como Brown et al. (1994) encontraron que el virus de la fiebre amarilla almacenado a 27°C por 5 días no crece en células Vero, sin embargo pueden ser detectado por PCR, reiterando la habilidad del PCR de detectar incluso viriones no viables en muestras clínicas inadecuadas para el cultivo.

Es interesante hacer notar que de las muestras probadas, las ensayadas para el virus del dengue por RT-PCR en su mayoría se detectó al virus y por el ensayo de MacElisa empleado en el LESPO solo se detectó al virus en unas cuantas muestras. Esto demuestra también la sensibilidad y especificidad de nuestro ensayo.

Finalmente quiero mencionar que la caracterización de la variación genética entre cada serotipo de dengue requiere de la disponibilidad de su genoma entero (cDNA). Nosotros hemos transcrito el genoma completo (10,696 pares de bases) del RNA purificado de las muestras de paciente con las transcriptasas reversas RAV2 y Superscript II Rnase H-, que permiten la transcripción de cadenas largas de RNA. Como se vio anteriormente, se probó que se tenía la cadena completa mediante la transcripción del genoma completo con los juegos de primers descritos por Seah et al. (1995); Morita et al. (1994); y Lanciotti et al. (1992) y que se encuentran localizados en diferentes porciones del genoma, y mediante un PCR standard usando la Taq DNA polimerasa después de que la transcripción reversa fue inhibida completamente.

En términos generales hemos sido capaces de:

- 1) Amplificar el genoma completo del virus del dengue para tipificar al virus y para futuros estudios de los genotipos dentro de los serotipos.
- 2) Desarrollamos un ensayo para la tipificación del virus del dengue mediante el marcaje de sondas representadas por primers específicos para cada serotipo.
- 3) El ensayo de diagnóstico demostró ser igual o más sensible que los ensayos descritos hasta la fecha.
- 4) Se secuenciaron 2 de los aislados del virus del dengue 2 y 3 demostrando que nuestros amplificadores son realmente amplificadores del virus.
- 5) Se diseñaron primers siguiendo las recomendaciones de Sharrocks (1994) para futuros estudios en el diseño de kits para la determinación genotípica del virus.
- 6) Se montaron las bases para un futuro trabajo con Microarreglos de cDNA contemplando toda la familia Flaviviridae.

## CONCLUSIONES.

Los estudios realizados en el presente trabajo indican que es posible emplear las zonas variables específicas y aquellas conservadas para todos los serotipos, para identificar la presencia del virus del dengue y poder distinguir entre serotipos presentes en muestras de suero de pacientes o muestras virales. Se ha cumplido parcialmente, aunque con grandes resultados, con los objetivos y metas proyectados al inicio, y estos han arrojado resultados satisfactorios, hasta el momento. Se localizaron algunas regiones conservadas en los cuatro serotipos, diseñando un "primer" (oligonucleótido), el RT-VD8, que se utilizó en el proceso de retrotranscripción lo cual nos ayudará, con un banco de cDNA, a definir la enfermedad por dengue, así como distinguir el serotipo del virus causante de la infección en cualquier periodo del tiempo. Así mismo se localizaron zonas específicas para cada uno de los cuatro serotipos, DSP1-DSP2-DSP3-DSP4, lo cual nos permitió diseñar primers (oligonucleótidos) que sirvieron para definir el serotipo presente en la muestra viral. Este estudio implica, a largo plazo, la localización de todas aquellas regiones conservadas y específicas a lo largo del genoma del virus. Es importante destacar el gran apoyo que proporcionan las bases de datos y los bancos genómicos, así como el uso de programas computacionales que faciliten el establecimiento de dichas regiones.

El desarrollo de programas futuros de vacunación efectivos, la intensificación de sistemas de vigilancia seroepidemiológica y de control de vectores para aquellas zonas en donde se produce la enfermedad y/o el síndrome de fiebre, implicarán la disminución, y posiblemente la eliminación, del dengue.

Considerando que el dengue es una enfermedad reemergente en América, cuya incidencia se ha ido incrementando en los últimos años a pesar de los esfuerzos que se han realizado a nivel internacional para su control, se hace imprescindible contar con métodos diagnósticos que permitan descartar la presencia de otras entidades menos frecuentes, pero también asociadas a el virus del dengue y que pueden surgir como agentes de importancia en la producción de brotes. Este estudio representa uno de los avances en la implementación de estos métodos diagnósticos y debe servir de ayuda ante las nuevas situaciones epidemiológicas por las que se enfrenta el país.

Algunas acciones que ya han sido implementadas para apoyar este estudio incluyen la vigilancia epidemiológica, virológica y el control de su vector. Esta enfermedad por la sintomatología que presenta se ha confundido frecuentemente con otras enfermedades, lo que resalta nuevamente el carácter indispensable del desarrollo de métodos de diagnóstico para definir con certeza su etiología.

Resumiendo, podemos concluir que el análisis del genoma completo del virus del dengue nos permitió:

1. Diseñar un oligonucleótido (primer) para la obtención de la cadena complementaria del RNA (cDNA) del genoma completo del virus del dengue.
2. Diseñar dos oligonucleótidos (primers) para el reconocimiento de regiones conservadas en los cuatro serotipos, que permitieron amplificar las regiones específicas para cada serotipo del virus del dengue.
3. Diseñar oligonucleótidos (primers) específicos para el reconocimiento de cada uno de los serotipos del virus del dengue.

En relación a nuestros objetivos y nuestras metas podemos concluir que:

- A) Se cumplió con el Objetivo General, desarrollando un sistema de microarreglos para el diagnóstico del virus del dengue.
- B) Se describió el proceso de desarrollo de una prueba de diagnóstico para la caracterización específica del virus del dengue.
- C) Se obtuvo un set de primers altamente específicos y sensibles para lograr la tipificación del virus.
- D) Se estableció una metodología para la obtención de RNA total de células en cultivo y muestras de pacientes infectadas con el virus del dengue.
- E) Se validó parcialmente la prueba de diagnóstico desarrollada en este trabajo.
- F) Se realizaron publicaciones en relación a los resultados parciales y totales. (Ver Anexo 3).

Para el Bio Chip de Dengue,

- Se termino el análisis “in silico” de las secuencias del virus del dengue.
- Se formulo una batería de primers susceptibles de ser utilizados como sondas para el estudio filogenético del virus.
- Se confirmo la virulencia de los aislados con IFA y RT-PCR.
- Se caracterizaron y sintetizaron primers específicos y se marcaron como sondas específicas.
- Se verifico que el SybrGreen y el Bromuro de etidió son marcas susceptibles de ser utilizadas como medio de verificación del pegado del CDNA.
- Se determinaron las condiciones optimas para la elaboración de un sistema de microarreglo para la detección y caracterización especifica de los diferentes serotipos del dengue provenientes de cultivos celulares y muestras de pacientes.
- Se valido el sistema de microarreglos para el diagnóstico de dengue en 60 muestras de pacientes, provenientes de los estados de Oaxaca y Veracruz, usando cultivos celulares como controles positivos y muestras de pacientes no infectados como controles negativos.

## RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS PARA TRABAJO FUTURO.

Como se mencionó, el dengue es una enfermedad emergente a nivel mundial que solamente en los casos mas graves puede producir la muerte debido a la generación de múltiples hemorragias en el individuo. Esta enfermedad no tiene un tratamiento por medicamentos y no existe hasta la fecha una vacuna, por lo que es muy recomendable detectar los casos de dengue desde el inicio para evitar, mediante los tratamientos tradicionales, que la enfermedad clásica degenera a dengue hemorrágico y por lo tanto cause la muerte del paciente. Para resolver esto, en este trabajo se desarrollo un método de diagnóstico a corto plazo que permite la detección de la enfermedad desde sus inicios. Por otro lado sabemos que la tecnología sigue avanzando y por lo tanto en el futuro se podría no solo diagnosticar la enfermedad y su serotipo sino también determinar su genotipo y al mismo tiempo evaluar la existencia de otros virus como la Fiebre Amarilla (FA) y el West Nile (WN). Para esto sería necesario aplicar los conocimientos generados en este estudio y enfocarlos a la tecnología de los microarreglos, que ya se ha comentado. En la tecnología de los microarreglos se requiere del diseño de múltiples primers que nos muestren alguna característica del organismo o microorganismo que este en estudio. Dentro de las características particulares que nos interesan seria el definir el genotipo de mayor virulencia o el genotipo responsable de la fiebre hemorrágica para determinar los riesgos que corre cada paciente, dependiendo, primeramente del virus con el que esta infectado, después, del serótipo que tiene -si se trata de dengue- y finalmente del genotipo que nos muestre la virulencia del agente infeccioso. Consecuentemente, el futuro de este trabajo es el desarrollo de este prototipo de diagnóstico en un sistema de microarreglos que nos determine el serótipo y el genotipo del virus. En este trabajo ya se diseñaron primers para las diferentes regiones variables del virus del dengue y esta demostrado que podrían servir para detectar genotipos específicos del virus mismo en las muestras de los pacientes con la enfermedad. Así mismo en este ensayo se podrían incluir primers con secuencias específicas para otros virus, FA y WN por ejemplo, y que en la actualidad son de alto riesgo por la proliferación del mosquito *Aedes aegypti* en todo el mundo, y de otros mosquitos vectores que transmiten estas enfermedades. Podríamos pensar que una de las desventajas de los microarreglos en este momento es su alto costo así como el uso de aparatos muy sofisticados. Sin embargo, también es muy evidente que conforme se perfeccionan las tecnologías se van abaratando los costos quedando después de cierto tiempo accesibles a los laboratorios de diagnóstico.

## REFERENCIAS.

1. Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995; 1(2):55-7.
2. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 2003; 27(1):1-13.
3. Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 1985; 229(4715):726-33.
4. Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology* 1999;257(1):1-6.
5. PAHO. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Scientific publication no.548. Washington: PAHO. 1994.
6. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ* 1989;67(4):375-80.
7. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988;239(4839):476-81.
8. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81(5):821-3.
9. Halstead SB, O'Rourke EJ. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature* 1977;265(5596):739-41.
10. Halstead SB. Immune enhancement of viral infection. *Prog Allergy* 1982;31:301-64.
11. Gubler DJ, Reed D, Rosen L, Hitchcock JR, Jr. Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. *Am J Trop Med Hyg*. 1978;27(3):581-9.
12. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* 1988;38(1):172-80.
13. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 1997;230(2):244-51.
14. Holmes EC, Burch SS. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol* 2000;8(2):74-7.
15. Rosen L. Dengue hemorrhagic fever. *Bull Soc Pathol Exot* 1996;89(2):91-3.
16. Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg* 1990;42(2):179-84.
17. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M, Vazques S, et al. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol* 2000;152(9):793-9.
18. Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis* 1989;11 Suppl 4:S830-9.
19. Pittaluga G. Sobre un brote de dengue en la Habana. *Rev Med Trop Paras Bact Clin y Lab* 1945;11(1).
20. Mas P. Dengue fever in Cuba in 1977:some laboratory aspects. PAHO Scientific Publication 1979;375:40-43.
21. Cantelar de Francisco N, Fernandez A, Albert Molina L, Perez Balbis E. Survey of dengue in Cuba. 1978-1979. *Rev Cubana Med Trop* 1981;33(1):72-8.
22. Guzman MG, Kouri G, Martinez E, Bravo J, Riveron R, Soler M, et al. Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Bull Pan Am Health Organ* 1987;21(3):270-9.
23. Guzman MG, Deubel V, Pelegrino JL, Rosario D, Marrero M, Sariol C, et al. Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 1995;52(3):241-6.
24. Sariol CA, Pelegrino JL, Martinez A, Arteaga E, Kouri G, Guzman MG. Detection and genetic relationship of dengue virus sequences in seventeen-year-old paraffin-embedded samples from Cuba. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61(6):994-1000.
25. Kouri G, Guzman MG, Valdes L, Carbonel I, del Rosario D, Vazquez S, et al. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis* 1998;4(1):89-92.

26. Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez R, Rosario D, Vazquez S, Valdes L, et al. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis* 1999;3(3):130-5.
27. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Vazquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica* 2002;11(4):223-7.
28. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2002;2(1):33-42.
29. Pelaez O, Guzman MG, Kouri G, Perez R, San Martin JL, Vazquez S, et al. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerg Infect Dis* 2004;10(4):719-22.
30. Guzman MG, Kouri G, Halstead SB. Do escape mutants explain rapid increases in dengue case-fatality rates within epidemics? *Lancet* 2000;355(9218):1902-3.
31. Despres P, Frenkiel MP, Deubel V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology* 1993;196(1):209-19.
32. Guzman MG, Vazquez S, Martinez E, Alvarez M, Rodriguez R, Kouri G, et al. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. *Bol Oficina Sanit Panam* 1996;121(2):102-10.
33. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(3):480-96.
34. Gubler D. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler D, Kuno G, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*: CAB International; 1997. p. 1-22.
35. Graham H. The dengue. A study of its pathology and mode of propagation. *J Trop Med* 1903;6:209.
36. Sabin AB. The dengue group of viruses and its family relationships. *Bacteriol Rev* 1950;14(3):225-32.
37. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* 1952;1(1):30-50.
38. Hammon WM, Rudnick A, Sather G, Rogers KD, Morse LJ. New hemorrhagic fevers of children in the Philippines and Thailand. *Trans Assoc Am Physicians* 1960;73:140-155.
39. Gubler DJ. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Ann Acad Med Singapore* 1998;27(2):227-34.
40. Hammon WM. Dengue hemorrhagic fever--do we know its cause? *Am J Trop Med Hyg* 1973;22(1):82-91.
41. Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ* 1980;58(1):1-21.
42. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* 2003;9(7):800-9.
43. Messer WB, Vitarana UT, Sivananthan K, Elvtigala J, Preethimala LD, Ramesh R, et al. Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66(6):765-73.
44. Nuegoonpipat A, Berlioz-Arthaud A, Chow V, Endy T, Lowry K, Mai le Q, et al. Sustained transmission of dengue virus type 1 in the Pacific due to repeated introductions of different Asian strains. *Virology* 2004;329(2):505-12.
45. Klungthong C, Zhang C, Mammen MP, Jr., Ubol S, Holmes EC. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology* 2004;329(1):168-79.
46. Thomas SJ, Strickman D, Vaughn DW. Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. *Adv Virus Res* 2003;61:235-89.
47. Bartley LM, Donnelly CA, Garnett GP. The seasonal pattern of dengue in endemic areas: mathematical models of mechanisms. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002;96(4):387-97.
48. Saugrain J, Moreau JP, Rosen L. Dengue epidemic in Tahiti in 1971. Evolution of hemorrhagic tendency and comparisons with previous epidemics. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1973;66(3):381-5.
49. Maguire T, Miles JA, Macnamara FN, Wilkinson PJ, Austin FJ, Mataika JU. Mosquito-borne infections in Fiji. V. The 1971-73 dengue epidemic. *J Hyg (Lond)* 1974;73(2):263-70.
50. Barnes WJ, Rosen L. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. *Am J Trop Med Hyg* 1974;23(3):495-506.
51. Condon R, Taleo G, Stewart T, Sweeney T, Kiedrzyński T. Dengue surveillance in the Pacific Islands. *Pac Health Dialog* 2000;7(2):122-6.
52. Ashford DA, Savage HM, Hajjeh RA, McReady J, Bartholomew DM, Spiegel RA, et al. Outbreak of dengue fever in Palau, Western Pacific: risk factors for infection. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69(2):135-40.

53. Kanesa-athan N, Iacono-Connors L, Magill A, Smoak B, Vaughn D, Dubois D, et al. Dengue serotypes 2 and 3 in US forces in Somalia. *Lancet* 1994;343(8898):678.
54. Hyams KC, Oldfield EC, Scott RM, Bourgeois AL, Gardiner H, Pazzaglia G, et al. Evaluation of febrile patients in Port Sudan, Sudan: isolation of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35(4):860-5.
55. Calisher CH, Nuti M, Lazuick JS, Ferrari JD, Kappus KD. Dengue in the Seychelles. *Bull World Health Organ* 1981;59(4):619-22.
56. Rodier GR, Parra JP, Kamil M, Chakib SO, Cope SE. Recurrence and emergence of infectious diseases in Djibouti city. *Bull World Health Organ* 1995;73(6):755-9.
57. PAHO. Dengue in the Caribbean, 1977. Proceedings of a Workshop held in Montego Bay, Jamaica, 8-11 May, 1978. PAHO Scientific Publication 375. 1979.
58. Bravo JR, Guzman MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81(5):816-20.
59. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1983;25(1):53-4.
60. Hospedales CJ. An update on Dengue fever in the Caribbean. *West Indian Med J* 1990;39(2):131.
61. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990;174(2):479-93.
62. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 1999;73(6):4738-47.
63. Guzman MG, Rosario D, Mune M, Alvarez M, Rodriguez R, Kouri G. Genetic relatedness of the dengue 3 virus isolated in the outbreak of dengue hemorrhagic fever in Nicaragua, 1994. *Rev Cubana Med Trop* 1996;48(2):114-7.
64. Rocco IM, Kavakama BB, Santos CL. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001;43(1):55-7.
65. Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1998;352(9132):971-7.
66. Guzman MG, Kouri G, Pelegrino JL. Emerging viral diseases. *Rev Cubana Med Trop* 2001;53(1):5-15.
67. Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol* 2000;74(7):3227-34.
68. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* 2003;3(1):19-28.
69. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 2003;59:315-41.
70. Gould EA, de Lamballerie X, Zannotto PM, Holmes EC. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. *Adv Virus Res* 2003;59:277-314.
71. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol* 1998;72(1):73-83.
72. Gaunt MW, Sall AA, Lamballerie X, Falconar AK, Dzhivanian TI, Gould EA. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 8):1867-76.
73. Ferguson N, Anderson R, Gupta S. The effect of antibody-dependent enhancement on the transmission dynamics and persistence of multiple-strain pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(2):790-4.
74. Twiddy SS, Farrar JJ, Vinh Chau N, Wills B, Gould EA, Gritsun T, et al. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology* 2002;298(1):63-72.
75. Twiddy SS, Woelk CH, Holmes EC. Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 7):1679-89.
76. Arias CF, Preugschat F, Strauss JH. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology* 1993;193(2):888-99.
77. Condit RC. Principles of Virology. In: Howley PM, editor. *Fields Virology*. Fourth edition ed. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
78. Rice CM. Overview of flavivirus molecular biology and future vaccine development via recombinant DNA. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1990;21(4):670-7.

79. Burke DS, Monath TP. Flaviviruses. In: Knippe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1043-1125.
80. Murray JM, Aaskov JG, Wright PJ. Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *J Gen Virol* 1993;74(Pt 2):175-82.
81. Vazquez S, Guzman MG, Guillen G, Chinae G, Perez AB, Pupo M, et al. Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. *Vaccine* 2002;20(13- 14):1823-30.
82. Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields BM, editor. *Virology*. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven; 1996. p. 931-960.
83. Mandl CW, Guirakhoo F, Holzmann H, Heinz FX, Kunz C. Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model. *J Virol* 1989;63(2):564-71.
84. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann Rev Microbiol* 1990;44:649-88.
85. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 1990;3(4):376-96.
86. Konishi E, Mason PW. Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol* 1993;67(3):1672-5.
87. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 2002;108(5):717-25.
88. Young PR. Antigenic analysis of dengue virus using monoclonal antibodies. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1990;21(4):646-51.
89. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 2002;186(8):1165-8.
90. Shafee N, AbuBakar S. Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis. *J Gen Virol* 2003;84(Pt 8):2191-5.
91. Amberg SM, Rice CM. Mutagenesis of the NS2B-NS3-mediated cleavage site in the flavivirus capsid protein demonstrates a requirement for coordinated processing. *J Virol* 1999;73(10):8083-94.
92. Wu CF, Wang SH, Sun CM, Hu ST, Syu WJ. Activation of dengue protease autocleavage at the NS2B-NS3 junction by recombinant NS3 and GST-NS2B fusion proteins. *J Virol Methods* 2003;114(1):45-54.
93. Wengler G. The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology* 1993;197(1):265-73.
94. Preugschat F, Strauss JH. Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of dengue 2 virus in vitro and in vivo. *Virology* 1991;185(2):689-97.
95. Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol* 1991;65(5):2467-2475.
96. Brooks AJ, Johansson M, John AV, Xu Y, Jans DA, Vasudevan SG. The interdomain region of dengue NS5 protein that binds to the viral helicase NS3 contains independently functional importin beta 1 and importin alpha/beta-recognized nuclear localization signals. *J Biol Chem* 2002;277(39):36399-407.
97. Johansson M, Brooks AJ, Jans DA, Vasudevan SG. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 4):735-45.
98. Roehrig JT, Johnson AJ, Hunt AR, Bolin RA, Chu MC. Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. *Virology* 1990;177(2):668-75.
99. Heinz FX, Auer G, Stiasny K, Holzmann H, Mandl C, Guirakhoo F, et al. The interactions of the flavivirus envelope proteins: implications for virus entry and release. *Arch Virol Suppl* 1994;9:339-48.
100. Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. In: Fields BN, editor. *Virology*. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven; 1996. p. 961-1034.
101. Gubler DJ, Clark GG. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50(6 Suppl):50-60.
102. McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* 2000;2(9):1041-50.

103. Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. *Cad Saude Publica* 2000;16(1):205-11.
104. Kautner I, Robinson MJ, Kuhnle U. Dengue virus infection: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention. *J Pediatr* 1997;131(4):516-24.
105. Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *Bmj* 2002;324(7353):1563-6.
106. Martinez-Torres E. Dengue and hemorrhagic dengue: the clinical aspects. *Salud Publica Mex* 1995;37 Suppl:S29-44.
107. WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. WHO, Geneva; 1997.
108. Nimmannitya S. Dengue and Dengue Haemorrhagic fever. In: Cook GC, editor. *Manson's Tropical Diseases*. 20th ed. London: Saunders WB; 1998.
109. Harris E, Videz E, Perez L, Sandoval E, Tellez Y, Perez ML, et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2000;63(1-2):5-11.
110. Srichaikul T, Nimmannitya S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000;13(2):261-76.
111. Rigau-Perez JG. Clinical manifestations of dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico, 1990-1991. Puerto Rico Association of Epidemiologists. *Rev Panam Salud Publica* 1997;1(5):381-8.
112. Diaz A, Kouri G, Guzman MG, Lobaina L, Bravo J, Ruiz A, et al. Description of the clinical picture of dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) in adults. *Bull Pan Am Health Organ* 1988;22(2):133-44.
113. Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, Kneen R, Thao LT, Raengsakulrach B, et al. Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet* 2000;355(9209):1053-9.
114. Pancharoen C, Thisyakorn U. Neurological manifestations in dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32(2):341-5.
115. Kurane I, Ennis FE. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol* 1992;4(2):121-7.
116. Porter KR, Beckett CG, Kosasih H, Tan RI, Alisjahbana B, Rudiman PI, et al. Epidemiology of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in a Cohort of Adults Living in Bandung, West Java, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72(1):60-66.
117. Gentry MK, Henchal EA, McCown JM, Brandt WE, Dalrymple JM. Identification of distinct antigenic determinants on dengue-2 virus using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1982;31(3 Pt 1):548-55.
118. Kurane I, Hebblewaite D, Ennis FA. Characterization with monoclonal antibodies of human lymphocytes active in natural killing and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of dengue virus-infected cells. *Immunology* 1986;58(3):429-36.
119. Falgout B, Bray M, Schlesinger JJ, Lai CJ. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J Virol* 1990;64(9):4356-63.
120. Morens DM. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis* 1994;19(3):500-12.
121. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 1984;120(5):653-69.
122. Kliks SC, Nimmannitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg* 1988;38(2):411-9.
123. Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40(4):444-51.
124. Bielefeldt-Ohmann H. Pathogenesis of dengue virus diseases: missing pieces in the jigsaw. *Trends Microbiol* 1997;5(10):409-13.
125. Rothman AL. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv Virus Res* 2003;60:397-419.

126. Livingston PG, Toomey S, Kurane I, Janus J, Ennis FA. Modulation of the functions of dengue virus-specific human CD8+ cytotoxic T cell clone by IL-2, IL-7 and IFN gamma. *Immunol Invest* 1995;24(4):619-29.
127. Sierra B, Garcia G, Perez AB, Morier L, Rodriguez R, Alvarez M, et al. Longterm memory cellular immune response to dengue virus after a natural primary infection. *Int J Infect Dis* 2002;6(2):125-8.
128. Falconar AK. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol* 1997;142(5):897-916.
129. Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, et al. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J Med Virol* 2001;63(2):143-9.
130. Malasit P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1987;18(3):316-20.
131. Rosen L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1977;26(3):337-43.
132. Rosen L. The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. A critical appraisal of current hypotheses. *S Afr Med J* 1986;Suppl:40-2.
133. Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1999;354(9188):1431-4.
134. Kochel TJ, Watts DM, Halstead SB, Hayes CG, Espinoza A, Felices V, et al. Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 2002;360(9329):310-2.
135. Sanchez IJ, Ruiz BH. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol* 1996;77 ( Pt 10):2541-5.
136. Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson AD, Li P, Wright PJ. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65(5):427-34.
137. Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol* 2003;77(7):3929-38.
138. Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol* 2000;74(17):7814-23.
139. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000;181(1):2-9.
140. Guha-Sapir D, Schimmer B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol* 2005;2(1):1.
141. Guzman MG, Kouri G, Soler M, Bravo J, Rodriguez de La Vega A, Vazquez S, et al. Dengue 2 virus enhancement in asthmatic and non asthmatic individual. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992;87(4):559-64.
142. Guzman MG, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3(6):621-7.
143. Vorndam AV, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Kuno G, editor. *Dengue and Dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International; 1997. p. 313-333.
144. Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis* 2004;8(2):69-80.
145. Balmaseda A, Guzman MG, Hammond S, Robleto G, Flores C, Tellez Y, et al. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10(2):317-22.
146. Henchal EA, McCown JM, Seguin MC, Gentry MK, Brandt WE. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32(1):164-9.
147. Henchal EA, McCown JM, Burke DS, Seguin MC, Brandt WE. Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1985;34(1):162-9.
148. Clarke DH, Casals J. Techniques for Hemagglutination and Hemagglutinationinhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958;7:561-73.

149. Vazquez S, Bravo JR, Perez AB, Guzman MG. Inhibition ELISA. Its utility for classifying a case of dengue. *Rev Cubana Med Trop* 1997;49(2):108-12.
150. Kuno G, Cropp CB, Wong-Lee J, Gubler DJ. Evaluation of an IgM immunoblot kit for dengue diagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59(5):757-62.
151. Vazquez S, Valdes O, Pupo M, Delgado I, Alvarez M, Pelegrino JL, et al. MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. *J Virol Methods* 2003;110(2):179-84.
152. Sathish N, Manayani DJ, Shankar V, Abraham M, Nithyanandam G, Sridharan G. Comparison of IgM capture ELISA with a commercial rapid immunochromatographic card test & IgM microwell ELISA for the detection of antibodies to dengue viruses. *Indian J Med Res* 2002;115:31-6.
153. Parida MM, Upadhyay C, Saxena P, Dash PK, Jana AM, Seth P. Evaluation of a dipstick ELISA and a rapid immunochromatographic test for diagnosis of Dengue virus infection. *Acta Virol* 2001;45(5-6):299-304.
154. Groen J, Koraka P, Velzing J, Copra C, Osterhaus AD. Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7(6):867-71.
155. Vazquez S, Saenz E, Huelva G, Gonzalez A, Kouri G, Guzman M. Deteccion de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. Detection of IgM against the dengue++ virus in whole blood absorbed on filter paper. *Rev Panam Salud Publica* 1998;3(3):174-8.
156. Deubel V. The contribution of molecular techniques to the diagnosis of dengue infection. In: Kuno G, editor. *Dengue and Dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International; 1997. p. 335-366.
157. Rosario D, Alvarez M, Diaz J, Contreras R, Rodriguez R, Vazquez S, et al. Polymerase chain reaction for rapid detection and serotyping of dengue virus in clinical samples. *Rev Panam Salud Publica* 1998;4(1):1-5.
158. dos Santos CL, Bastos MA, Sallum MA, Rocco IM. Molecular characterization of dengue viruses type 1 and 2 isolated from a concurrent human infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003;45(1):11-6.
159. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30(3):545-51.
160. Alvarez M, Guzman MG, Rosario D, Vazquez S, Pelegrino JL, Sariol CA, et al. Secuenciación directa de un producto amplificado de una muestra de suero. Direct sequencing of an amplified product from a serum sample. *Rev Cubana Med Trop* 1996;48(1):53-5.
161. Rosario D, Alvarez M, Vazquez S, Amin N, Rodriguez-Roche R, Guzman MG. Application of Molecular Method to the diagnosis and Characterization of a dengue outbreak in Cuba. *Biotechnologia Aplicada* 2001;18(4):203-206.
162. Sithiprasasna R, Strickman D, Innis BL, Linthicum KJ. ELISA for detecting dengue and Japanese encephalitis viral antigen in mosquitoes. *Ann Trop Med Parasitol* 1994;88(4):397-404.
163. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzymelinked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol* 2000;38(3):1053-7.
164. De Filippis VR. Virus Evolution. In: Howley PM, editor. *Fields Virology*. Fourth ed. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
165. Wang WK, Lin SR, Lee CM, King CC, Chang SC. Dengue type 3 virus in plasma is a population of closely related genomes: quasispecies. *J Virol* 2002;76(9):4662-5.
166. Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol* 2003;20(1):122-9.
167. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutation and fitness for survival. *Ann Rev Microbiol* 1997;51:151-178.
168. Duarte E, Clarke D, Moya A. Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6015-19.
169. Holland JJ, De la Torre JC, Steinhauer DA. RNA population as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992;176:1-20.
170. Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with RNA virus Polymerase. *Gene* 1992;122:281-288.

171. Woelk CH, Holmes EC. Reduced positive selection in vector-borne RNA viruses. *Mol Biol Evol* 2002;19(12):2333-36.
172. Holmes EC. Patterns of intra- and interhost nonsynonymous variation reveal strong purifying selection in dengue virus. *J Virol* 2003;77(20):11296-8.
173. Sala M, Wain-Hobson S. Drift and conservation in RNA Virus evolution. Are they adapting or merely changing? In: Domingo E, Webster RG, Holland JJ, editors. *Origin and evolution of viruses*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 115-140.
174. Trent DW, Grant JA, Rosen L, Monath TP. Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology* 1983;128(2):271-84.
175. Monath TP, Wands JR, Hill LJ, Brown NV, Marciniak RA, Wong MA, et al. Geographic classification of dengue-2 virus strains by antigen signature analysis. *Virology* 1986;154(2):313-24.
176. Sittisombut N, Sistayanarain A, Cardoso MJ, Salminen M, Damrongdachakul S, Kalayanarooj S, et al. Possible occurrence of a genetic bottleneck in dengue serotype 2 viruses between the 1980 and 1987 epidemic seasons in Bangkok, Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 1997;57(1):100-8.
177. Lai MM. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol Rev* 1992;56(1):61-79.
178. Twiddy SS, Holmes EC. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J Gen Virol* 2003;84(Pt 2):429-40.
179. Uzategui NY, Camacho D, Comach G, Cuello de Uzategui R, Holmes EC, Gould EA. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *J Gen Virol* 2001;82:2945-2953.
180. Worobey M, Rambaut A, Holmes EC. Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(13):7352-7.
181. Holmes EC, Worobey M, Rambaut A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol Biol Evol* 1999;16(3):405-409.
182. Tolou HJ, Couissinier-Paris P, Durand JP, Mercier V, de Pina JJ, de Micco P, et al. Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 6):1283-90.
183. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Guzman MG, Morier L, Kouri G. Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C6/36-HT cells. *J Clin Microbiol* 2000;38(9):3508-10.
184. Uzategui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, Jimenez M, et al. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virol* 2003;84(Pt 6):1569-75.
185. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 1997;24:4876-4882.
186. Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998;14(9):817-8.
187. Swofford DL. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 2002.
188. Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol* 1994;75 ( Pt 1):65-75.
189. Foster JE, Bennett SN, Carrington CV, Vaughan H, McMillan WO. Phylogeography and molecular evolution of dengue 2 in the Caribbean basin, 1981- 2000. *Virology* 2004;324(1):48-59.
190. Singh UB, Maitra A, Broor S, Rai A, Pasha ST, Seth P. Partial nucleotide sequencing and molecular evolution of epidemic causing Dengue 2 strains. *J Infect Dis* 1999;180(4):959-65.
191. Lorono-Pino MA, Farfan-Ale JA, Zapata-Peraza AL, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Garcia-Rejon JE, et al. Introduction of the American/Asian Genotype of Dengue 2 Virus into the Yucatan State of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71(4):485-492.
192. Winkler G, Heinz FX, Kunz C. Studies on the glycosylation of flavivirus E proteins and the role of carbohydrate in antigenic structure. *Virology* 1987;159(2):237-43.
193. Kawano H, Rostapshov V, Rosen L, Lai CJ. Genetic determinants of dengue type 4 virus neurovirulence for mice. *J Virol* 1993;67(11):6567-75.
194. Guirakhoo F, Hunt AR, Lewis JG, Roehrig JT. Selection and partial characterization of dengue 2 virus mutants that induce fusion at elevated pH. *Virology* 1993;194(1):219-23.

195. Roehrig JT, Johnson AJ, Hunt AR, Beaty BJ, Mathews JH. Enhancement of the antibody response to flavivirus B-cell epitopes by using homologous or heterologous Tcell epitopes. *J Virol* 1992;66(6):3385-90.
196. Roehrig JT, Risi PA, Brubaker JR, Hunt AR, Beaty BJ, Trent DW, et al. Thelper cell epitopes on the E-glycoprotein of dengue 2 Jamaica virus. *Virology* 1994;198(1):31-8.
197. Lewis JA, Chang GJ, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW, Trent DW. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology* 1993;197(1):216-224.
198. Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 A resolution. *Nature* 1995;375(6529):291-8.
199. Bray M, Men R, Tokimatsu I, Lai CJ. Genetic determinants responsible for acquisition of dengue type 2 virus mouse neurovirulence. *J Virol* 1998;72(2):1647-51.
200. Chen WJ, Chen SL, Chien LJ, Chen CC, King CC, Harn MR, et al. Silent transmission of the dengue virus in southern Taiwan. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55(1):12-6.
201. Teixeira Mda G, Barreto ML, Costa Mda C, Ferreira LD, Vasconcelos PF, Cairncross S. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Trop Med Int Health* 2002;7(9):757-62.
202. Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci* 2001;8(5):377-88.
203. Stephens HA, Klaythong R, Sirikong M, Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens* 2002;60(4):309-18.
204. Valdes L, Guzman MG, Kouri G, Delgado J, Carbonell I, Cabrera MV, et al. Epidemiology of dengue and hemorrhagic dengue in Santiago, Cuba 1997. *Rev Panam Salud Publica* 1999;6(1):16-25.
205. Holmes EC. Molecular epidemiology of dengue virus--the time for big science. *Trop Med Int Health* 1998;3(11):855-6.
206. AbuBakar S, Wong PF, Chan YF. Emergence of dengue virus type 4 genotype IIA in Malaysia. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 10):2437-42.
207. Tolou H, Couissinier Paris P, Mercier V, Pisano MR, de Lamballerie X, de Micco P, et al. Complete genomic sequence of a dengue type 2 virus from the French West Indies. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277(1):89-92.
208. Blackwell JL, Brinton MA. BHK cell proteins that bind to the 3' stem-loop structure of the West Nile virus genome RNA. *J Virol* 1995;69(9):5650-8.
209. Men R, Bray M, Clark D, Chanock RM, Lai CJ. Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. *J Virol* 1996;70(6):3930-7.
210. Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol* 1999;73(6):4611-21.
211. Blok J, Gibbs AJ, McWilliam SM, Vitarana UT. NS 1 gene sequences from eight dengue-2 viruses and their evolutionary relationships with other dengue-2 viruses. *Arch Virol* 1991;118(3-4):209-23.
212. López L. Estudio de propiedades biológicas de cepas de Dengue de los serotipos 2 y 3 causantes de las epidemias de 1997 (Santiago de Cuba) y 2001-2002 (Ciudad de la Habana). Tesis de Maestría: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2003.
213. Moya A, Holmes EC, González-Candelas F. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature* 2004;2:1-10.
214. Innis BL. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. In: Porterfield JS, editor. *Exotic Viral Infections*. London: Chapman & Hall; 1995. p. 103-140.
215. Wang SH, Syu WJ, Huang KJ, Lei HY, Yao CW, King CC, et al. Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 12):3093-102.
216. Wang WK, Sung TL, Lee CN, Lin TY, King CC. Sequence diversity of the capsid gene and the nonstructural gene NS2B of dengue-3 virus in vivo. *Virology* 2002;303(1):181-91.
217. Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, et al. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology* 2002;301(1):148-56.
218. Lin SR, Hsieh SC, Yueh YY, Lin TH, Chao DY, Chen WJ, et al. Study of sequence variation of dengue type 3 virus in naturally infected mosquitoes and human hosts: implications for transmission and evolution. *J Virol* 2004;78(22):12717-21.

219. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol* 2005;79(2):853-9.
220. dos Santos CN, Rocha CF, Cordeiro M, Fragoso SP, Rey F, Deubel V, et al. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. *Virus Res* 2002;90(1-2):197-205.
221. Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, et al. Selection-Driven Evolution of Emergent Dengue Virus. *Mol Biol Evol* 2003;20(10):1650-58.
222. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 2003;9(7):921-7.
223. Rosen L. Disease exacerbation caused by sequential dengue infections: myth or reality? *Rev Infect Dis* 1989;11 Suppl 4:S840-2.
224. Pavon-Oro A. Anticuerpos neutralizantes en sueros humanos frente a diferentes aislamientos del virus dengue-3. Tesis de Diploma: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"; 2004.
225. Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, et al. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology* 2003;305(2):330-8.
226. Pybus OG, Rambaut A. Genie: estimating demographic history from molecular phylogenies. *Bioinformatics* 2002;18:1404-05.
227. Twiddy SS, Pybus OG, Holmes EC. Comparative population dynamics of mosquito-borne flaviviruses. *Infect Genet Evol* 2003;3(2):87-95.
228. Farci P, Shimoda A, Coiana A. The outcome of acute Hepatitis C predicted by the evolution of viral quasispecies. *Science* 2000;288:339-44.
229. Chao DY, King CC, Wang WK, Chen WJ, Wu HL, Chang GJ. Strategically examining the full-genome of dengue virus type 3 in clinical isolates reveals its mutation spectra. *Virol J* 2005;2(1):72.
230. <http://www.inmegen.org.mx>
231. Young, R.A. (2000) Biomedical discovery with DNA arrays. *Cell* 102, 9-15.
232. Watson, J. (2004) DNA: The secret of life. 1a ed. Knopf. USA Pp: 165 -193.
233. Collins, F. et al. (2003) A vision for the future of genomics research. *Nature* 422, 835-847.
234. Lockhart, D., & Winzeler, E. (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405, 827 – 836.
235. Liang, P., & Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.
236. Hunbank, M. & Schatz, D. (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Research* 22, 5640-5648.
237. Velculescu, V.E., et al. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* 276, 1268-1272.
238. Schena, M., et al. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
239. Lockhart, D.J., et al. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology* 14, 1675-1680.
240. Singh-Gasson, S., et al. (1999) Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nature Biotechnology* 17, 974-978.
241. Hughes, T.R., et al. (2001) Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nature Biotechnology* 19, 342-347.
242. Stears, R.L., et al. (2003) Trends in microarray analysis. *Nature Medicine* 9 (1), 140-145.
243. The Chipping Forecast I. (1999) *Nature Genetics Supplement* 21, 1-60.
244. <http://www.affymetrix.com>
245. Brazma, A., et al. (2001) Minimum information about a microarray experiment (MIAME)— toward standards for microarray data. *Nature Genetics* 29, 365-371.
246. Churchill, G. (2002) Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nature Genetics* 32, 490-495.
247. Hwa Yang, Y & Speed, T. (2002) Design issues for cDNA microarray experiments. *Nature Genetics* 3, 579-588.

248. Gershon, D. (2004) Microarrays go mainstream. *Nature Methods* 1(3), 263-270.
249. Xiang, C.C. & Chen, Y. (2000) cDNA microarray technology and its applications. *Biotechnology Advances* 18, 35-46.
250. Álvarez-Ríos, E. (2004) Estandarización del uso de microarreglos de cDNA en la detección de la expresión de algunos genes relacionados con apoptosis en cáncer cérvico uterino. Director: Dr. Patricio Gariglio Vidal. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Estado de México.
251. <http://arrayit.com/e-library>
252. Bernards, R. & Weinberg, R. (2002) A progression puzzle. *Nature* 418, 823.
253. Hanahan, D. & Weinberg, R. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
254. Parkin, D.M., et al. (2005) Global Cancer Statistics, 2002. *CA A cancer journal for clinicians* 55, 74-108.
255. Vogelstein, B., et al. (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
256. <http://p53.free.fr/>
257. Zhu, L. (2005) Tumour suppressor retinoblastoma protein Rb: A transcriptional regulator. *European Journal of Cancer* 42, 2415-2427.
258. [www.myc-cancer-gene.org](http://www.myc-cancer-gene.org)
259. Adhikary, S. & Eilers, M. (2005) Transcriptional regulation and transformation by myc proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 635-645.
260. Kirkin, V., et al. (2004) The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1644, 229-249.
261. Feinberg, A.P. & Tykocil, B. (2004) The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer* 4, 143-153.
262. Ciro, M., et al. (2003) Profiling cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 213-220.
263. Clarke, P.A., et al. (2004) Gene expression microarray technologies in the development of new therapeutic agents. *European Journal of Cancer* 40, 2560-2591.
264. Golub, T.R., et al. (1999) Molecular classification of cancer: Class prediction and class discovery by gene expression monitoring. *Science* 286, 531-537.
265. Perou, S.M., et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.
266. Alizadeh, A.A., et al. (2000) Distinct types of diffuse B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503-511.
267. Rosenwald, A., et al. (2002) The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine* 346, 1937-1947.
268. Shipp, M.A., et al. (2002) Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene expression profiling and supervised machine learning. *Nature Genetics* 8, 68-74.
269. Couzin, J. (2003) Tracing the teps to metastasis, cancer's menacing ballet. *Science* 299, 1002-1006.
270. van't Veer, L.J., et al. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536.
271. van de Vijver, M., et al. (2002) A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *New England Journal of Medicine* 347, 1999-2009.
273. Garber, K. (2004) Gene expression tests foretell breast cancer's future. *Science* 303, 1754-1755.
274. Bittner, M., et al. (2000) Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406, 536-540.
275. Weeraratna, A.T., et al. (2002) Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 1, 279-288.
276. Dhanasekaran, S.M., et al. (2001) Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412, 822-826.
277. Varambally, S., et al. (2002) The Polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419, 624-629.
278. MacDonald, T.J., et al. (2001) Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease. *Nature Genetics* 29, 143-152.
279. Khan, J., et al. (2001) Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nature Medicine* 7, 673-679.

280. Beer, D.F., et al. (2002) Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nature Medicine* 8, 816-824.
281. Pomeroy, S.L., et al. (2002) Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 415, 436-442.
282. Chen, X., et al. (2003) Variation in gene expression patterns in human gastric cancers. *Molecular Biology of the Cell* 14, 3208-3215.
283. Takahashi, M., et al. (2001) Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: Gene identification and prognostic classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98(17), 9754-9759.
284. Alon, U. et al. (2001) Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 6745-6750.
285. Chen, X., et al. (2002) Gene expression patterns in human liver cancers. *Molecular Biology of the Cell* 13, 1929-1939.
286. Thykjaer, T., et al. (2001) Identification of gene expression patterns in superficial and invasive human bladder cancer. *Cancer Research* 61, 2492-2499.
286. Orozco y Gariglio. (2000) *Genética y Biología Molecular*. "Series Biotecnológicas". Colección de Textos Politécnicos. Ed. Noriego Limusa. Pp: 181-198.
287. Tewari, D., et al. (2005) Gene expression profiling of in vitro radiation resistance in cervical carcinoma: A feasibility study. *Gynecologic Oncology* 99, 84-91.
288. Dimitroulakos, J. et al. (2002) Microarray and Biochemical Analysis of Lovastatin-Induced Apoptosis of Squamous Cell Carcinomas. *Neoplasia* 4(4), 337-346.
289. Ahn W.S., et al. (2004) Comparison of effects of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and As<sub>4</sub>O<sub>6</sub> on cell growth inhibition and gene expression profiles by cDNA microarray analysis in SiHa cells. *Oncology Reports* 12(3), 573-80.
290. Gatti, L., et al. (2004) Gene expression profiles in the cellular response to a multinuclear platinum complex. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 973-981.
291. Duffy, C.L., et al. (2003) Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. *Virology* 314, 196-205.
292. Chang, Y.E. & Laiminis, L.A. (2000) Microarray Analysis Identifies Interferon-Inducible Genes and Stat-1 as Major Transcriptional Targets of Human Papillomavirus Type 31. *Journal of Virology* 74(9), 4174-4182.
293. B de Kok, J., et al. (2005) Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Laboratory Investigation* 85, 154-159.
294. Masters, J.R. et al. (2002) HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer* 2, 315-319.
295. Knight, J. (2001) When the chips are down. *Nature* 410 (6831), 860-861.
296. Tomiuk, S & Hofmann, K. (2001) Microarray probe selection strategies. *Briefings in Bioinformatics* 2 (4), 329-340.
297. Bowtell, D & Sambrook J. (2003) *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual*. 1a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
298. [http://www4.amershambiosciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/orderonline\\_handbooks "Microarray Handbook"](http://www4.amershambiosciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/orderonline_handbooks%20Microarray%20Handbook)
299. [www.corning.com/lifesciences](http://www.corning.com/lifesciences): "UltraGAPS Coated Slides Instruction Manual".
300. Eisen, M.B., Brown, P.O. (1999) DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods of Enzymology* 303, 179-205
301. Zhou, X. et al. (2004) Fabrication of DNA microarrays on nanoengineered polymeric ultrathin film prepared by self-assembly of polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 20, 8877-8885.
302. Hedge, P., et al. (2000) A concise guide to cDNA microarray analysis. *BioTechniques* 29 (3), 548-562.
303. <http://www.sigmaaldrich.com>: "SYBR Green II Datasheet"
304. <http://www4.amershambiosciences.com>: "Cy3 & Cy5 Datasheets."
305. Meinkoth, J. & Wahl, G. (1984) Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Analytical Biochemistry* 138, 267-284.

306. Toegl, A., et al. (2003) Enhancing results of microarray hybridizations through microagitation. *Journal of Biomolecular Techniques* 14, 197-204.
307. Lee, M.L., et al. (2000) Importance of replication in microarray gene expression studies: Statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97 (18), 9834-9839
308. Schena, M. (2003) *Microarray Analysis*. Wiley-Liss 1a. ed USA
309. Eisen, M., et al. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95, 14863-14868.
310. Benes, V. & Muckenthaes, M. (2003) Standardization of protocols in cDNA microarray analysis. *Trends in Biomedical Sciences* 28(5), 244 – 249.
311. Chuaqui, R.F. et al. (2002) Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nature Genetics* 32, 509-514.
312. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
313. <http://genome.ucsc.edu/>
314. Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, Pp 365-386.
315. *Microarray Technology Training Manual* (2002), Genomic Solutions.
316. [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)
317. Wrobel, G., et al. (2003) Optimization of high-density cDNA-microarray protocols by design of experiments. *Nucleic Acids Research* 31(12), e6.
318. Vega-Badillo, J. (2005) Validación de microarreglos de DNA para la detección de variantes genéticas del virus del papiloma humano utilizando líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino. Director: Dr. Patricio Gariglio Vidal. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. México D.F.
319. Zhu, Z. & Waggoner, A.S. (1997) Molecular mechanism controlling the incorporation of fluorescent nucleotides into DNA by PCR. *Cytometry* 28, 206-211.
320. Yu, J., et al. (2002) Evaluation and optimization of procedures for target labeling and hybridization of cDNA microarrays. *Molecular Vision* 8, 130-137.
321. Berlier, J.E., et al. (2003) Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 51(12), 1699-1712.
322. Macville, M., et al. (1999). Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Research* 59(1), 141-150.
323. Quackenbush, J. (2003) Microarrays – Guilt by Association. *Science* 302, 240-241.
324. Weber, B.L. (2002) Cancer genomics. *Cancer Cell* 1, 37-47.
325. Irizarry, R.A., et al. (2005) Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. *Nature Methods* 2(5), 345-350.
326. Wie, C., et al. (2004) Sample size for detecting differentially expressed genes in microarray experiments. *BMC Genomics* 5(87).
327. Mei-Ling, T.L., et al. (2000) Importance of replication in microarray gene expression studies: Statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 97(18), 9834-9839.
328. Cronin, M., et al. (2004) Universal RNA reference materials for gene expression. *Clinical Chemistry* 50(8), 1464-1471.
329. Quackenbush, J. (2004) Data standards for 'omic' science. *Nature Biotechnology* 22(5), 613-614.
330. Coulton, G. (2004) Are histochemistry and cytochemistry “Omics”? *Journal of Molecular Histology* 35, 603-613.
331. Ewis, A.A., et al. (2005) A history of microarrays in biomedicine. *Expert Review in Molecular Diagnostics* 5(3), 315-328.
332. Brentani, H. et al. (2003) The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100(23), 13418-13423.

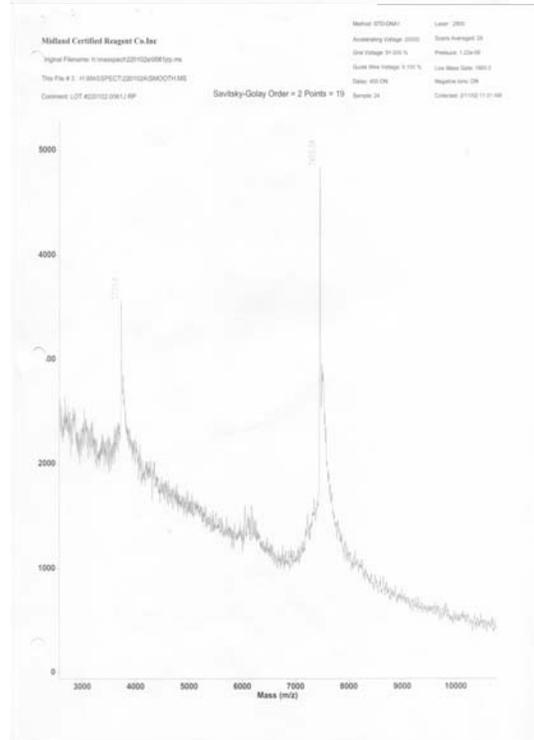
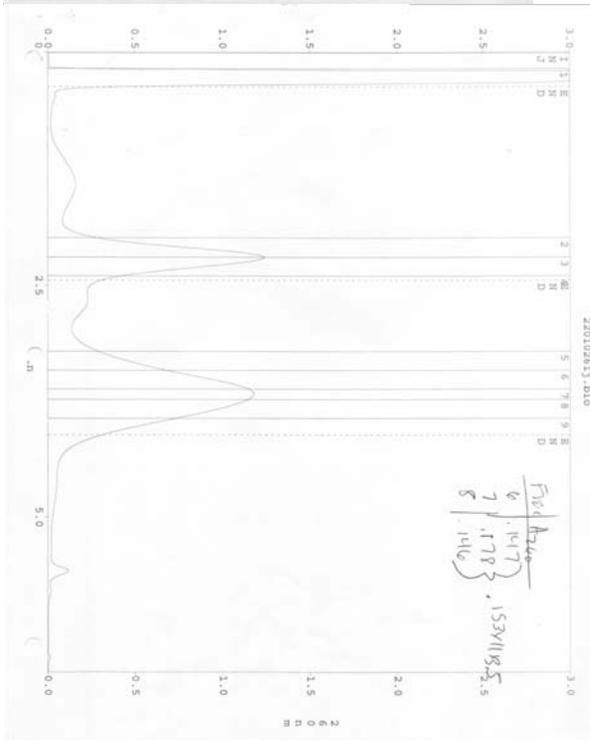
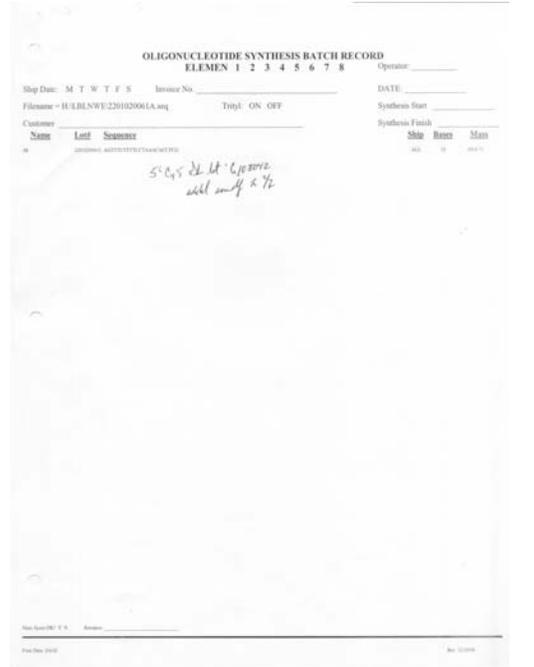
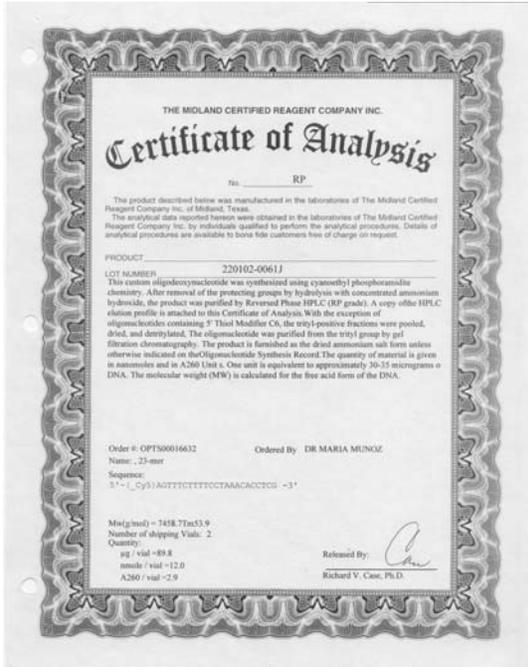
333. Mockler, T.C. & Ecker, J. R. (2005) Applications of DNA tiling arrays for whole-genome analysis. *Genomics* 85, 1-15.
334. China: Views from the West (2004) *Nature Supplement* 428(6979), 203-224.
335. Yick-Fu, W., et al. (2006) Genome-wide gene expression profiling of cervical cancer in Hong Kong women by oligonucleotide microarray. *International Journal of Cancer*. (en prensa)
336. Grant, G.M., et al. (2004) Microarrays in Cancer Research. *Anticancer Research* 24, 441-448.
337. Strausberg, R.L., et al. (2003) Sequence-based cancer genomics: Progress, lessons and opportunities. *Nature Reviews Genetics* 4, 409-418.
338. Bjornsson, H.T., et al. (2004) An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease. *Trends in Genetics* 20(8), 350-358.
339. Boyle, P., et al. (2003) European code against cancer and scientific justification: third version (2003). *Annals of Oncology* 14, 973-1005.
340. Jimenez-Sanchez, G. (2003) Developing a Platform for Genomic Medicine in Mexico. *Science* 300, 295-296.
341. McDonnell, J.M. (2001) Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Current Opinion in Chemical Biology* 5, 572-577.
342. Zambrano, P., et al. (2005) A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. *BMC Cancer* 5(44).
343. The Chipping Forecast II. (2002) *Nature Genetics Supplement* 32, 461-547.
344. The Chipping Forecast III. (2005) *Nature Genetics Supplement* 37, S1-S45.
345. Loi, S., et al. (2006) Molecular forecasting of breast cancer: time to move forward with clinical testing. *Journal of Clinical Oncology* 24(4), 721-722.
346. Sawiris, G.P., et al. (2002) Development of a highly specialized cDNA array for the study and diagnosis of epithelial ovarian cancer. *Cancer Research* 62 (10), 2923-2928.
347. Newton, S., et al. (2005) Production of custom microarrays for neuroscience research. *Methods* 37, 238-246

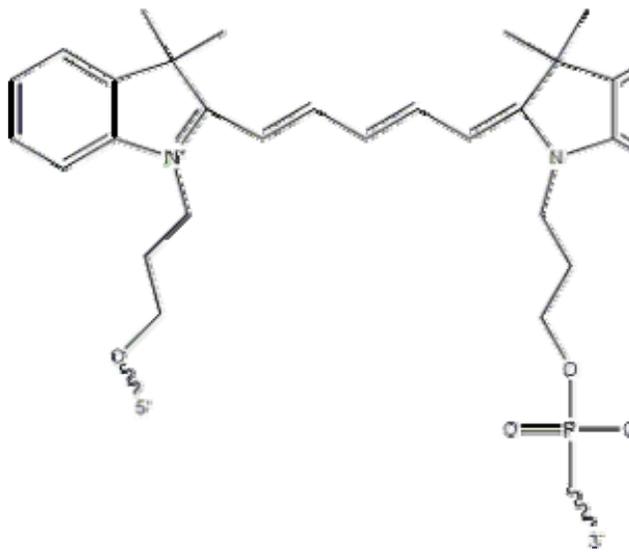
## **ANEXOS**

**ANEXO 1.**

Certificados de análisis y pureza de las sondas marcadas.

Para Dengue 1



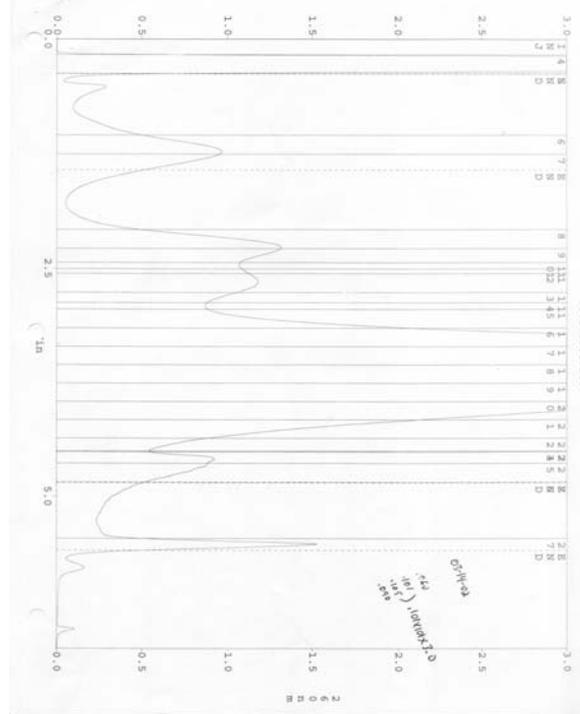
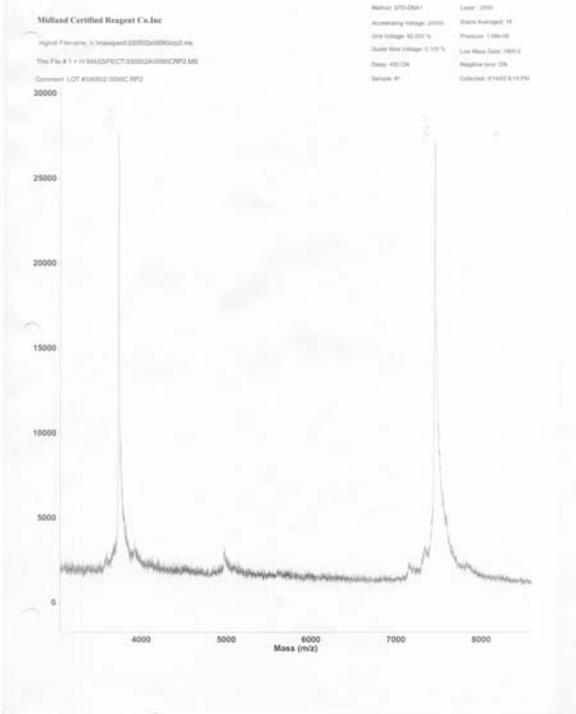




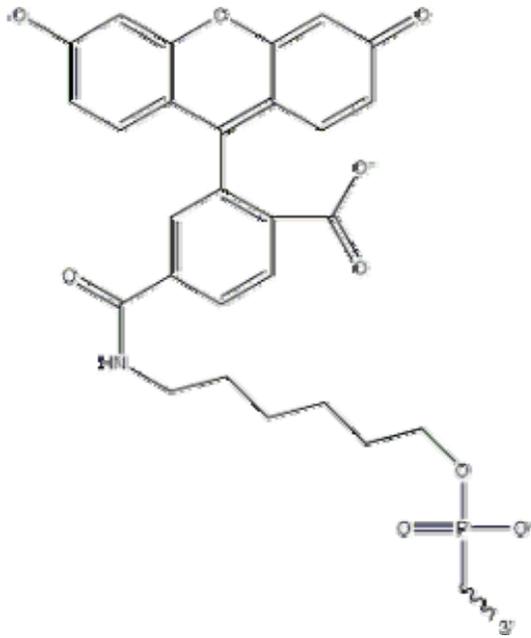
**OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS BATCH RECORD**  
 ELEMENT \_\_\_\_\_ Operator: \_\_\_\_\_  
 Ship Date: M T W T F S Invoice No. \_\_\_\_\_ DATE: \_\_\_\_\_  
 Filename = H:\BLNWE\3305020090A.seq      Trityl: ON OFF      Synthesis Start: \_\_\_\_\_  
 Customer \_\_\_\_\_      Synthesis Finish: \_\_\_\_\_  

Name	Lot	Sequence	Ship	Reas	Mass

 HPLC: 330502-0090C  
 Nov 2000 04:15:00      Nov 2000 04:15:00







THE MIDLAND CERTIFIED REAGENT COMPANY INC.

## Certificate of Analysis

No. \_\_\_\_\_ RP<sup>™</sup>

The product described below was manufactured in the laboratories of The Midland Certified Reagent Company Inc. of Midland, Texas. The analytical data reported herein were obtained in the laboratories of The Midland Certified Reagent Company Inc. by individuals qualified to perform the analytical procedures. Details of analytical procedures are available to bona fide customers free of charge on request.

PRODUCT \_\_\_\_\_  
 LOT NUMBER 330502-0090A

This custom oligodeoxynucleotide was synthesized using cyanoethyl phosphoramidite chemistry. After removal of the protecting groups by hydrolysis with concentrated ammonium hydroxide, the product was purified by Reversed Phase HPLC (RP grade). A copy of the HPLC elution profile is attached to this Certificate of Analysis. With the exception of oligonucleotides containing 5' Thiol Modifier C6, the trityl-positive fractions were pooled, dried, and de-tritylated. The oligonucleotide was purified from the trityl group by gel filtration chromatography. The product is furnished as the dried ammonium salt form unless otherwise indicated on the Oligonucleotide Synthesis Record. The quantity of material is given in nanomoles and in A260 Unit s. One unit is equivalent to approximately 30-35 micrograms of DNA. The molecular weight (MW) is calculated for the free acid form of the DNA.

Order #: OPTS00017107      Ordered By: DR MARIA MUNOZ  
 Name: 20-mer  
 Sequence: 5'-( \_ 6 FAM) CCGGTGTGCTCAGCTCAT-3'

Mw(g/mol) = 6639.07m55.4  
 Number of shipping Vials: 1  
 Quantity:  
 µg / vial = 826.3  
 nmole / vial = 124.4  
 A260 / vial = 26.8

Released By: \_\_\_\_\_  
 Richard V. Case, Ph.D.

### OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS BATCH RECORD

ELEMEN \_\_\_\_\_

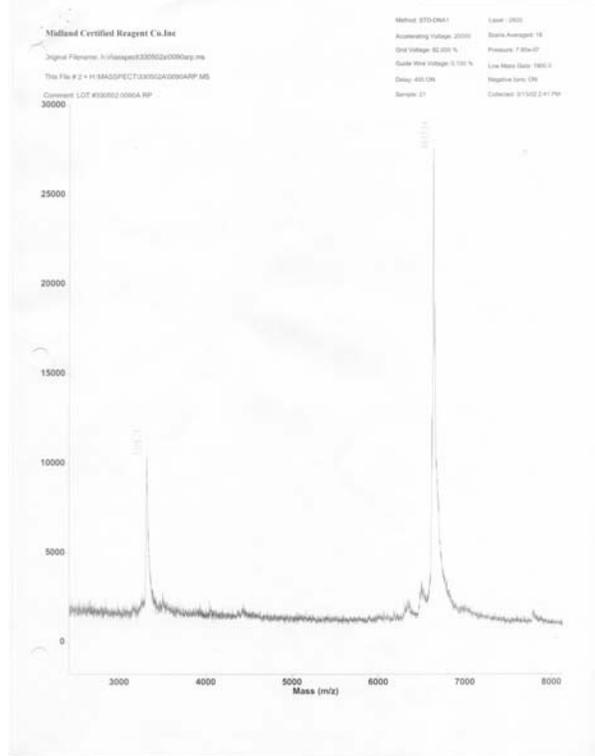
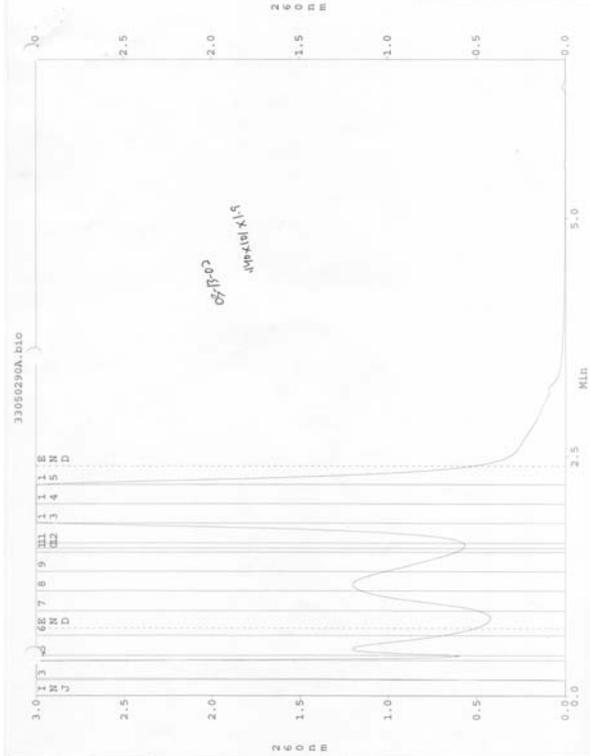
Ship Date: M T W T F S      Invoice No. \_\_\_\_\_      DATE: \_\_\_\_\_  
 File name: H-LBLNWE3305020090A.seq      Trityl: ON OFF      Synthesis Start: \_\_\_\_\_  
 Customer: \_\_\_\_\_      Synthesis Finish: \_\_\_\_\_

Name	Lot	Sequence	Ship	Base	Mass
1					

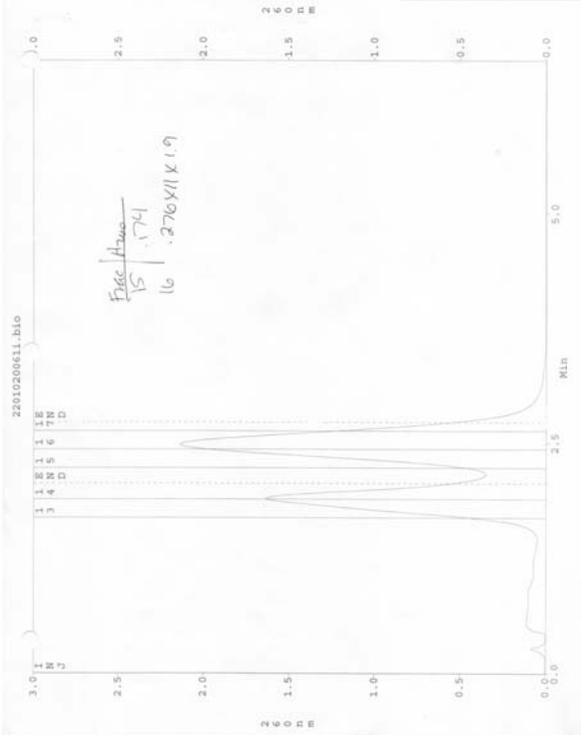
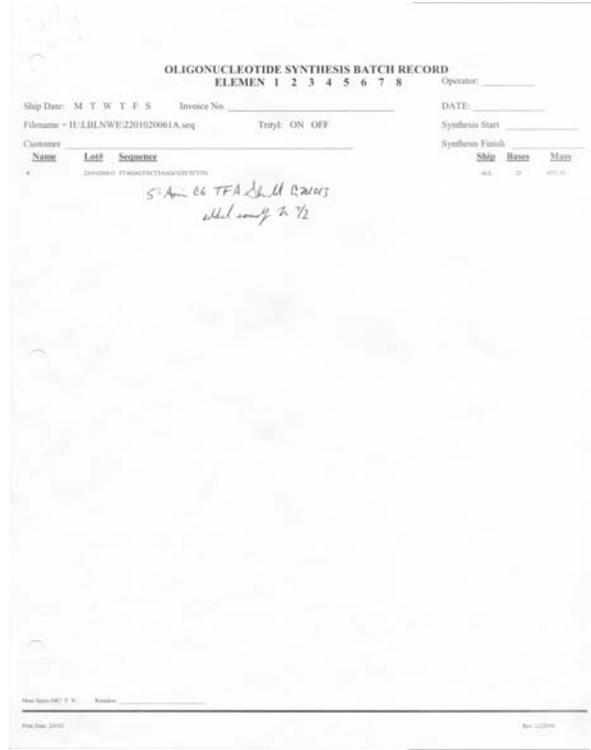
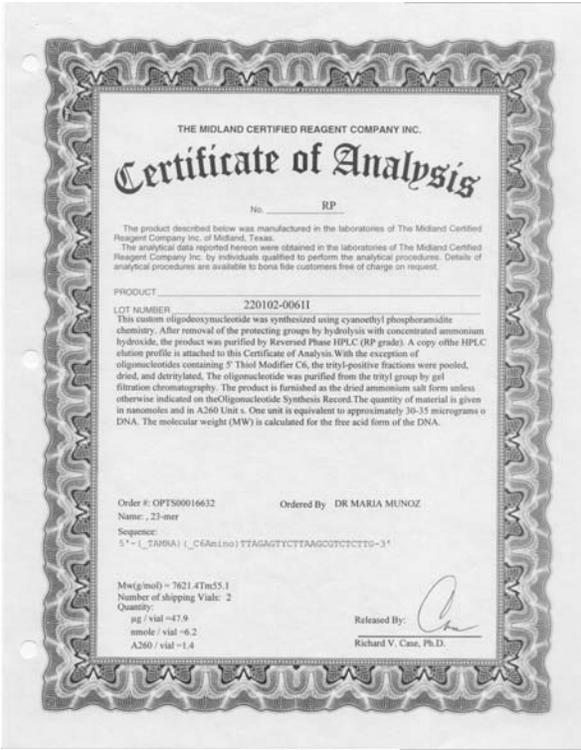
330502-0090A

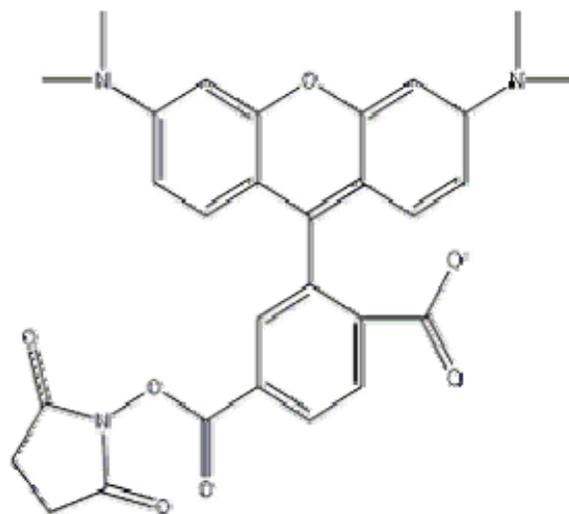
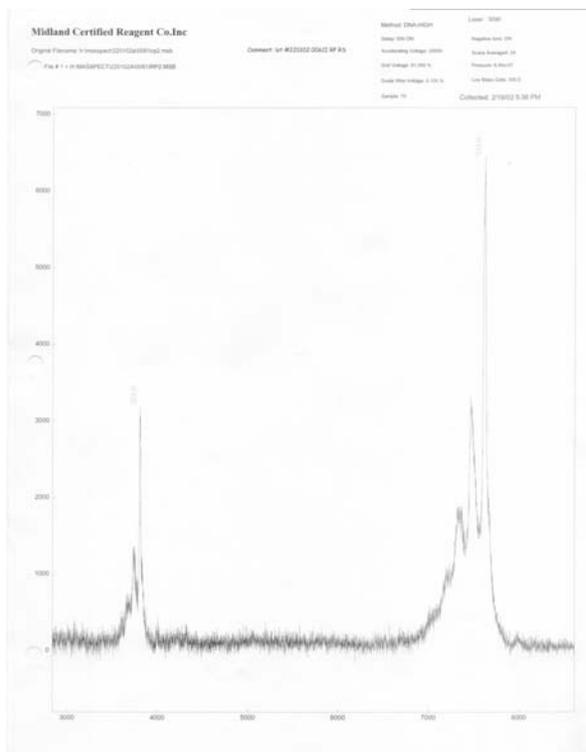
*5' 6 FAM C C 01067  
 MB 310102*

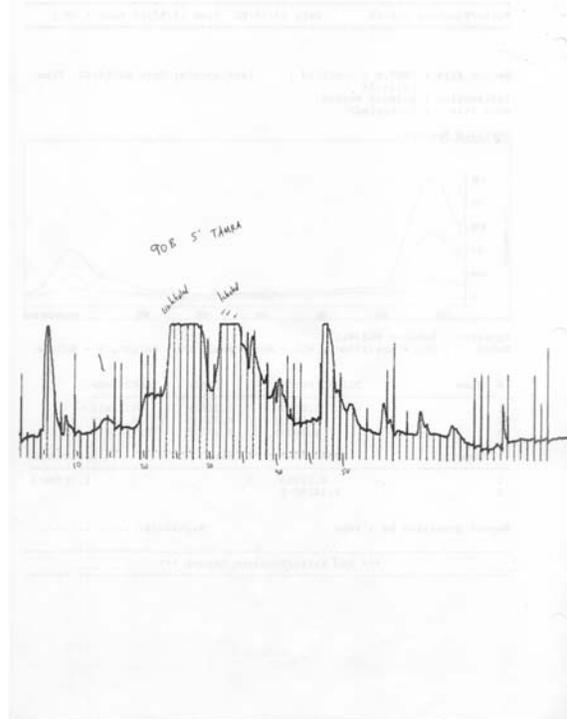
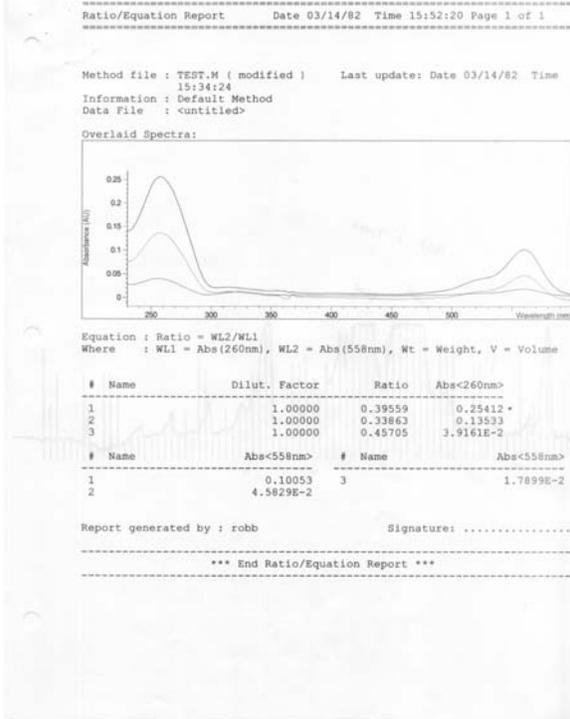
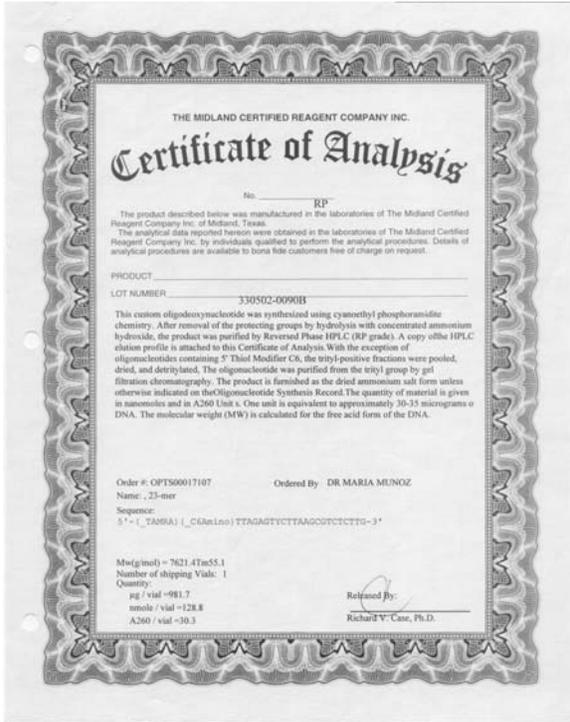
Min Scan 100: 1 11      Max Scan: \_\_\_\_\_  
 Run Date: 3/10/02      Run 02/004



Para Dengue 3





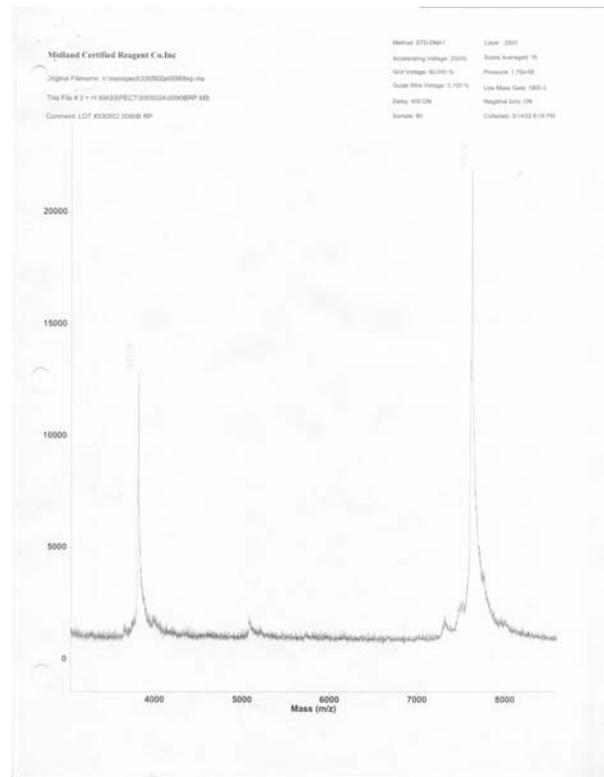


**POST SYNTHESIS LABELING LOG**

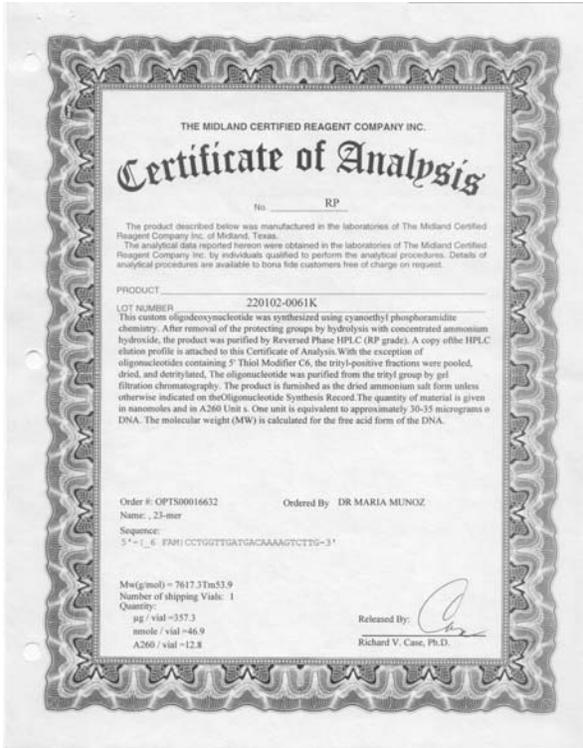
Tech initials AY Date 03-17-02 Time 3:15 P

Oligo Lot #: 330502-40B Scale 1.0 DS/Internal  
Dye Cy5 Form NHS / ITC / Other \_\_\_\_\_  
Manufacturer Molecular Probes Dye Lot #: 34A1-3 Product #: C-6123  
Labeling pH 8.25 Buffer: NaCO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> / Other \_\_\_\_\_  
Recovery procedure: Precipitation / DS column

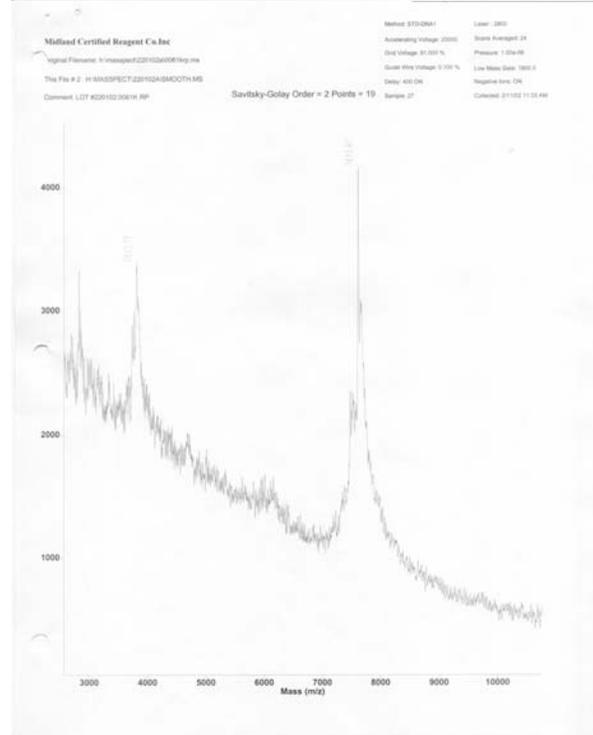
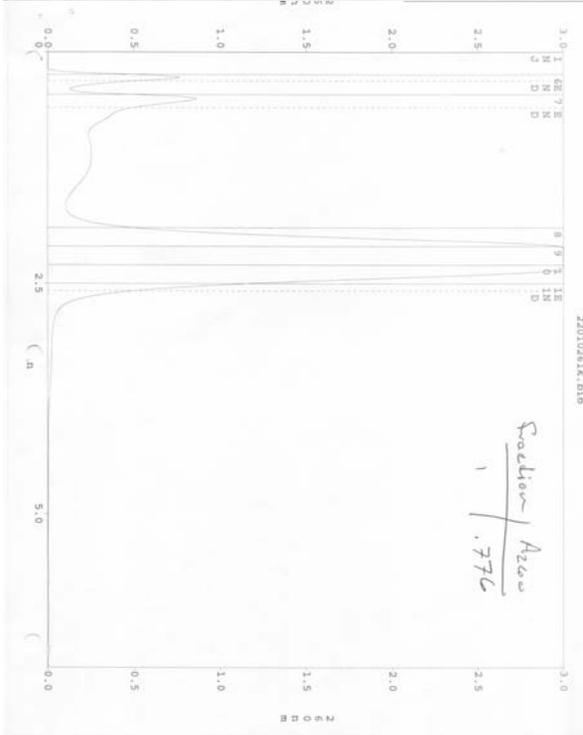
*Labeled in 2 separate tubes  
About 70 um per tube of  
350 mg dye and.*

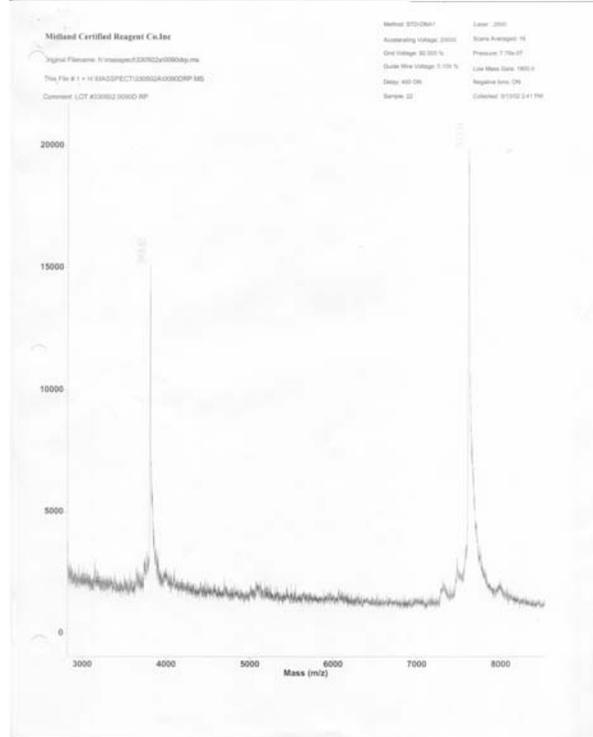
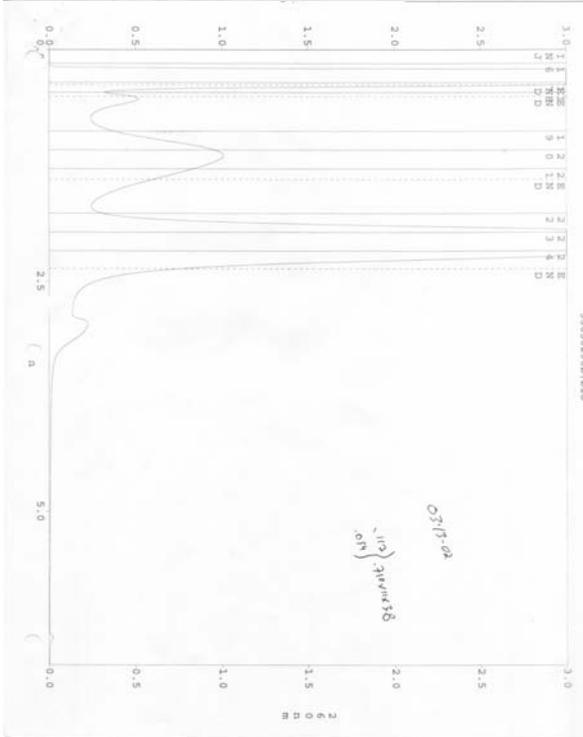
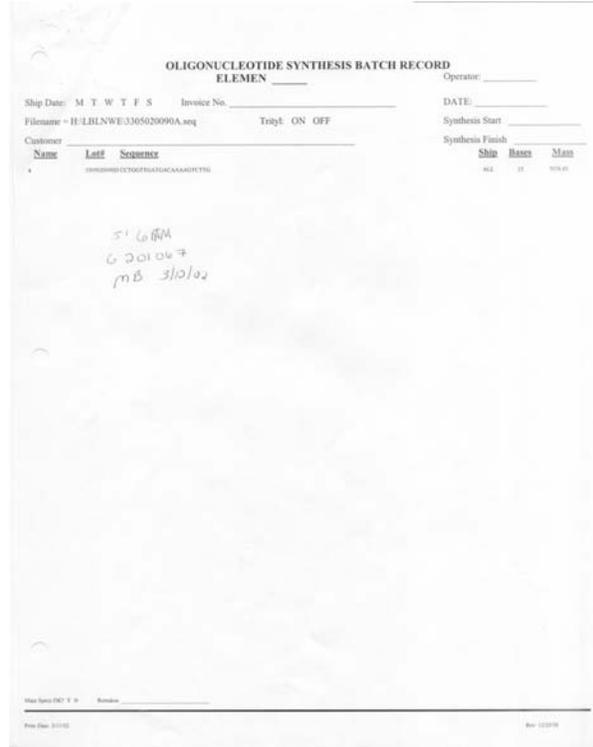
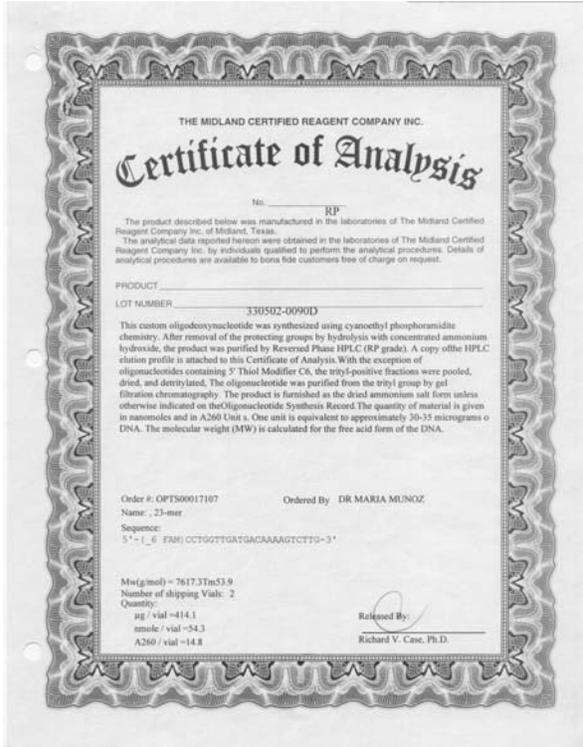


Para Dengue 4



**OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS BATCH RECORD**  
 ELEMENT 1 2 3 4 5 6 7 8      Operator: \_\_\_\_\_  
 Ship Date: M T W T F S      Invoice No. \_\_\_\_\_      DATE: \_\_\_\_\_  
 File Name: H:\LBN\WE\2201020061A.aq      Trial#: ON OFF      Synthesis Start: \_\_\_\_\_  
 Customer Name: \_\_\_\_\_      Synthesis Finish: \_\_\_\_\_  
 Ship Dates: \_\_\_\_\_  
 Mass: \_\_\_\_\_  
 5' EFM 2442, 110012  
 add manually to 72





**ANEXO 2.**

Presentaciones y Publicaciones relacionadas con el estudio.



Participan el CICATA, la ENMH y el Cinvestav

## Estudios genéticos sobre la fiebre del dengue

Determinarán la capacidad del mosquito *Aedes aegypti* en la transmisión del virus

**E**n una unión de esfuerzos y conocimientos, Alejandro Cisneros Solano, alumno de Doctorado en Biomedicina Molecular, de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía (ENMH); Álvaro Díaz Badillo, de la Maestría en Tecnología Avanzada en esa misma área, en el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA); así como los estudiantes de Maestría, Ricardo Mercado Curiel y Minerva Mata Rocha, y de Doctorado, Felipe López Chávez, del Departamento de Genética y Biología Molecular, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), trabajan para determinar la capacidad del mosquito *Aedes aegypti* en la transmisión del virus que ocasiona la fiebre del dengue, así como para desarrollar metodologías para su rápido diagnóstico.

El proyecto está dirigido por María de Lourdes Muñoz Moreno, del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav, quien detalló que cuentan con ejemplares vivos del insecto, que mantienen bajo estrictas condiciones de seguridad, y cuando termine la época de lluvias coleccionarán, en las diversas regiones del país, las larvas del mosquito a las que extraerán el DNA con el propósito de realizar estudios de genética y genómica poblacional. De ese modo establecerán en qué áreas del territorio nacional se encuentran los mosquitos con mayor capacidad para transmitir el virus del



dengue, lo cual servirá para reforzar las medidas sanitarias.

Aunque en algunos países se trabaja en buscar una vacuna, hasta el momento los resultados no han tenido éxito debido a que existen cuatro serotipos de virus. Otro de los factores que ha impedido el desarrollo de una vacuna son las mutaciones que tienen los virus y que dan origen a otras variedades genéticas.

Cuando un individuo es picado por el *Aedes aegypti* manifiesta fiebre y cuerpo cortado —que puede confundirse con gripe—, en los casos más leves; dolores de cabeza, musculares y articulares, erupciones cutáneas y náuseas, en los casos más clásicos; y cuando hay reinfección se presentan hemorragias internas y externas que se conocen como fiebre hemorrágica. En cualquier caso se recomienda evitar el uso de analgésicos, ya que facilitan las hemorragias.

María de Lourdes Muñoz indicó que a nivel mundial la incidencia anual es cada vez mayor y las regiones endémicas en México se localizan principalmente en lugares donde la altitud es inferior a los 1,400 metros, como Yucatán, Tabasco, Veracruz, Sinaloa, Colima, Guerrero, Oaxaca y Tamaulipas, pues el mosquito no puede reproducirse a una menor presión atmosférica.

## LISTA DE PUBLICACIONES.

FECHA DE PUBLICACIÓN	PUBLICACIÓN
2006	cDNA microarray to detect the serotype of dengue viruses in a large number of samples from mosquitoes or patients from México. ( <i>en proceso</i> )
2006	Desarrollo de un sistema de microarreglos para la detección del virus del dengue.
2006	V Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN.
2006	Desarrollo de microarreglos para el análisis molecular de la distribución de mosquitos del complejo <i>Culex pipiens</i> en la ciudad de México.
2006	XXVI Congreso nacional de bioquímica.
2006	Desarrollo de un sistema de microarreglos de cDNA para la tipificación del virus del dengue.
2006	II Congreso Nacional de Medicina Genómica.
2006	The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in <i>Aedes aegypti</i> midgut and <i>ae. albopictus</i> cells.
2006	BMC microbiology, volume 6, 2006.
2006	Dengue 2 genotypes in the State of Oaxaca, México.
2006	Archives of virology, volume 151, number 1 / January, 2006.
2005	Desarrollo de un sistema de microarreglos de cDNA para la genotipificación del virus del dengue.
2005	Primer Congreso Nacional de Investigación Estudiantil.
2005	Desarrollo de un sistema de microarreglos de cDNA para la tipificación del virus del dengue.
2004	Tercer Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Medicina Tropical.
2004	Phylogenetic analysis of dengue virus in Oaxaca, México
2004	Astmh 53 <sup>rd</sup> annual meeting.
2004	Sero-epidemiological and virological investigation of Dengue infection in Oaxaca, Mexico, during 2000-2001.
2004	Dengue Bulletin – Vol 28, 2004.
2004	Population genetics of <i>Aedes aegypti</i> in Oaxaca, Mexico
2004	Journal of the American Mosquito Control Association, Vol.20, no. 4. A fourteenth symposium LA. 70 annual meeting.
2003	Fiebre de dengue en el estado de Oaxaca, México.
2003	III Congreso Internacional de Epidemiología, Asociación Mexicana de Epidemiología.
2002	Evaluación y caracterización de primers específicos para el desarrollo de un sistema de diagnóstico para la detección del virus del dengue.
2002	Segundo Congreso Nacional de Virología.

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Copyedited and fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

## **cDNA MICROARRAYS TO DETECT THE SEROTYPE OF DENGUE VIRUSES IN A LARGE NUMBER OF SAMPLES FROM MOSQUITOES OR PATIENTS FROM MEXICO**

*BMC Bioinformatics* 2007,

doi:XXXXXXXXXXXXXXX

Alvaro Diaz-Badillo (alvaro@cinvestav.mx)  
Victor M. Altuzar-Aguilar (valtuzar@gmail.com)  
Joel Navarrete-Espinoza (joel.navarrete@imss.gob.mx)  
Julio G. Mendoza-Alvarez (jmendoza@fis.cinvestav.mx)  
Alejandro Cisneros-Solano (acisneros@gmail.com)  
Jorge P. Martínez Muñoz (monterrey2bios@hotmail.com)  
Fabiola Jimenez-Rojas (lespoax@salud.gob.mx)  
Jose L. Herrera-Perez (jherrerap@ipn.mx)  
Patricio Gariglio-Vidal (vidal@cinvestav.mx)  
Feliciano Sanchez-Sinencio (fsanchez@fis.cinvestav.mx)  
Maria de Lourdes Muñoz (lmuñoz@cinvestav.mx)

### **ISSN**

**Article type** Research

**Submission date** In process

**Acceptance date** In process

**Publication date** In process

**Article URL** <http://www.biomedcentral.com/>

© 2006 Rayner *et al.*, licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Like all articles in BMC journals, this peer-reviewed article was published immediately upon acceptance. It can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in BMC journals are listed in PubMed and archived at PubMed Central.  
For information about publishing your research in BMC journals or any BioMed Central journal, go to

<http://www.biomedcentral.com/info/authors/>

Submitted to:

Correspond with:

Dr. Maria de Lourdes Muñoz

Dept. of Genetics and Molecular Biology

CINVESTAV-IPN

Apartado Postal 14-740

D.F. 07000, MEXICO.

[lmunoz@cinvestav.mx](mailto:lmunoz@cinvestav.mx),

Tel. 525550613335; Fax, 525550613392.

Left running head: DIAZ-BADILLO AND OTHERS

Right running head: DIAGNOSIS OF DENGUE VIRUS BY cDNA MICROARRAYS

**cDNA MICROARRAYS TO DETECT THE SEROTYPE OF DENGUE VIRUSES IN A LARGE  
NUMBER OF SAMPLES FROM MOSQUITOES OR PATIENTS FROM MEXICO.**

<sup>1,3</sup>ALVARO DIAZ-BADILLO, <sup>4</sup>VICTOR ALTUZAR-AGUILAR, <sup>5</sup>JOEL NAVARRETE-ESPINOZA,  
<sup>2</sup>JULIO G. MENDOZA-ALVAREZ, <sup>6</sup>ALEJANDRO CISNEROS, <sup>7</sup>JORGE P. MARTINEZ-MUÑOZ, <sup>7</sup>F.  
JIMÉNEZ-ROJAS, <sup>3</sup>JOSE LUIS HERRERA-PEREZ, <sup>1</sup>PATRICIO GARIGLIO-VIDAL, <sup>2</sup>FELICIANO  
SANCHEZ-SINENCIO AND <sup>1</sup>MARIA DE LOURDES MUÑOZ.

<sup>1</sup>*Department of Genetics and Molecular Biology,* <sup>2</sup>*Department of Physics, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Ave. Instituto Politécnico Nacional 2508 Col San Pedro Zacatenco, México, D.F., C.P. 07360;* <sup>3</sup>*Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, Posgrado en Tecnología Avanzada, Legaria 694, Col. Irrigación, Delg. Miguel Hidalgo C.P. 11500 México D. F., México;* <sup>4</sup>*Universidad Veracruzana;* <sup>5</sup>*Instituto Mexicano del Seguro Social;* <sup>6</sup>*Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, México;* <sup>7</sup>*Laboratorio Estatal de Salud Pública de Oaxaca, Oaxaca, Servicios de Salud de Oaxaca, Oaxaca, México.*

## **SUMMARY**

Dengue is a mosquito-borne viral infection, considered a major public health problem globally. Dengue virus (DENV) is the causative agent of dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF) and includes four distinct serotypes (DEN-1, DEN-2, DEN-3, and DEN-4). DEN-2 and DEN-3 have been associated with severe dengue disease, consequently, laboratory testing for dengue virus is needed to confirm the diagnosis of dengue virus infection, serotype and to differentiate dengue from other febrile tropical illnesses. In addition, surveillance of mosquitoes infected with dengue viruses is needed to monitor the infection rates within vector mosquito populations harboring specific serotype to provides an early warning sign to predict epidemics. In this work we have developed a microarray technique for simultaneous serotyping multiple RNA samples from human or mosquitoes through the NS3 genome. Thus, the proposed microarray method can be used for i) rapid and reliable dengue diagnosis; ii) serotyping; iii) surveillance of mosquitoes infected with dengue. In addition, using this microarray we determined DEN Viruses in pools of gravid females mosquitoes collected in 2005, thirty one mosquito populations from Yucatán, Campeche, Tabasco, Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Guerrero, Tamaulipas and Colima were infected with DEN-2, six mosquito populations from Yucatán, Morelos, Chiapas, Nayarit, Tamaulipas and Colima were infected with DEN-1, three from Tabasco, Veracruz and Oaxaca were infected with DEN-3 and two infected with two serotypes (Ciudad Mante with DEN-1 and DEN-2, and Tavela with DEN-2 and DEN-3). This microarray was also useful to confirm the presence of DEN-2 in 97 serum samples from Oaxaca and Veracruz, DEN-1 in 5 Samples from Veracruz, DEN-3 in 4 samples from Oaxaca and Veracruz, and one case with two DEN viruses (2 and 3) from Juchitan.

Research article

Open Access

## The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells

Ricardo F Mercado-Curiel<sup>1</sup>, Héctor Armando Esquinca-Avilés<sup>1,4</sup>, Rosalinda Tovar<sup>1</sup>, Álvaro Díaz-Badillo<sup>1,2</sup>, Minerva Camacho-Nuez<sup>3</sup> and María de Lourdes Muñoz\*<sup>1</sup>

Address: <sup>1</sup>Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ave. Instituto Politécnico Nacional 2508 Col San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, México, D. F., México, <sup>2</sup>Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, Postgrado en Tecnología Avanzada, Legaria 694, Col. Irrigación, Delg. Miguel Hidalgo C.P. 11500 México D. F., México, <sup>3</sup>Genomic Sciences Program, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Fray Servando Teresa de Mier, # 99, Col. Centro, CP. 06080, México D. F., México and <sup>4</sup>Laboratory of Molecular Genetics, Universidad Autónoma de Chiapas, Chiapas, México

Email: Ricardo F Mercado-Curiel - rfmcmx@yahoo.com.mx; Héctor Armando Esquinca-Avilés - hesquinc@montebello.unach.mx; Rosalinda Tovar - sharim52@yahoo.com.mx; Álvaro Díaz-Badillo - alvaro@cinvestav.mx; Minerva Camacho-Nuez - mcamachonuez@yahoo.com.mx; María de Lourdes Muñoz\* - lmunoz@cinvestav.mx

\* Corresponding author

Published: 02 October 2006

Received: 01 June 2006

BMC Microbiology 2006, 6:85 doi:10.1186/1471-2180-6-85

Accepted: 02 October 2006

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/6/85>

© 2006 Mercado-Curiel et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** Dengue viruses (DENV) attach to the host cell surface and subsequently enter the cell by receptor-mediated endocytosis. Several primary and low affinity co-receptors for this flavivirus have been identified. However, the presence of these binding molecules on the cell surface does not necessarily render the cell susceptible to infection. Determination of which of them serve as *bona fide* receptors for this virus in the vector may be relevant to treating DENV infection and in designing control strategies.

**Results:** (1) Overlay protein binding assay showed two proteins with molecular masses of 80 and 67 kDa (R80 and R67). (2) Specific antibodies against these two proteins inhibited cell binding and infection. (3) Both proteins were bound by all four serotypes of dengue virus. (4) R80 and R67 were purified by affinity chromatography from *Ae. aegypti* mosquito midguts and from *Ae. albopictus* C6/36 cells. (5) In addition, a protein with molecular mass of 57 kDa was purified by affinity chromatography from the midgut extracts. (6) R80 and R67 from radiolabeled surface membrane proteins of C6/36 cells were immunoprecipitated by antibodies against *Ae. aegypti* midgut.

**Conclusion:** Our results strongly suggest that R67 and R80 are receptors for the four serotypes of dengue virus in the midgut cells of *Ae. aegypti* and in C6/36 *Ae. albopictus* cells.

### Background

Dengue (DEN) is distributed worldwide in tropical and subtropical countries including Mexico and the USA and is the most common vector-borne viral disease in

humans. Infection ranges from asymptomatic or mild self-limited illness (dengue fever, DF) to a severe disease with spontaneous hemorrhaging (dengue hemorrhagic fever, DHF), or, most seriously, to DEN shock syndrome

(DSS) characterized by circulatory failure. Fifty million DEN infections with 500,000 cases of DHF and 12,000 deaths occur each year [1]. In the years 2002 to 2004, 23,826 cases of DEN and 5,557 of DHF were reported in Mexico [2].

The Dengue virus (family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*, species *Dengue virus*) infects mammalian [3] and vector cells. Neutralizing antibodies facilitate the binding and penetration of DENV into human macrophages; the virus-antibody complex binds Fc receptors [4]. This mechanism does not explain virus entry in primary infections or in cells with non-Fc receptors. Transmission electron microscopy shows that DEN viruses must attach to the cells [5,6], suggesting that the cells must have virus receptor(s) on their surfaces to be susceptible to infection. Proteins [7-12], heparan sulfates [13], LPS/CD14-associated binding proteins [14] and other glycoproteins [15] have been proposed as cellular receptors for DENV. In addition, DC-SIGN [16-18] has been suggested as a mediator of DENV infection in dendritic cells and could participate in binding large numbers of other viruses such as HIV-1, Ebola and CytoMV to host cell surfaces [19].

In C6/36 cells, two major polypeptides have been described with apparent molecular weights of 67 and 80 kDa, which bind to DEN virus serotype 2 (DENV2) [9]. The mechanism by which the virus enters mosquito cells is unknown. The presence of receptor(s) on the surface does not necessarily render a cell susceptible to infection. In natural infection, DENV is first deposited in the mosquito vector and then in a human host bitten by the vector during a blood meal. Therefore, it is necessary to study receptors in the mosquito midgut (MG) to determine which binding proteins serve as true virus receptors; they may be relevant to treating DEN infection and in designing control strategies. This is especially important because mosquitoes differ in their susceptibilities to infection, resulting in different vector competences [20-22].

The present study shows that the proteins R80 and R67 are the putative receptors in the MG of *Ae. aegypti*. Moreover, proteins with the same apparent molecular weights were purified by DENV2 affinity chromatography from the MG of this mosquito and from C6/36 cells. In addition, a protein with molecular weight of 57 kDa was also purified from mosquito MG extracts by affinity chromatography. Immunoprecipitation of radiolabeled membranes using *Ae. aegypti* anti-MG antibodies showed that R80 and R67 are contained in mosquito cell membranes. Furthermore, the four serotypes of DENV recognized the same proteins on *Ae. aegypti* and C6/36 cells.

## Results

### Identification and purification of the putative DENV2 receptors in *Ae. aegypti* midgut by the virus overlay protein binding assay

Mosquito MG proteins were extracted with 0.05% of Triton X-100, separated by SDS-PAGE, blotted on to a PVDF membrane and incubated with biotinylated DENV2 virus to identify the putative receptors. Two prominent polypeptides with apparent molecular masses of 67 and 80 kDa were observed (Figure 1, panel A, lane 1). The negative control without virus showed no bands (data not shown).

To purify the putative receptors, DENV2 affinity chromatography was performed by passing cell membrane proteins from C6/36 cells from *Ae. albopictus* (Figure 1, panel A, lane 2) or MG proteins from *Ae. aegypti* through a DENV2-Sepharose™ 4B column. Representative patterns (from 8 experiments) of C6/36 cell membrane or midgut proteins retained and eluted by the column (EP) are shown in Figure 1 panel A, lane 3, and Figure 1 panel B, respectively. Two major proteins with molecular masses of 67 (R67) and 80 (R80) kDa were observed. Figure 1A lane 2 shows the total protein pattern of C6/36 cells. MG proteins eluted from the column showed an additional band with apparent molecular weight of 57 kDa (Figure 1, panel B). Fraction 2 showed the 80 kDa protein (Figure 1, panel B, lane 2).

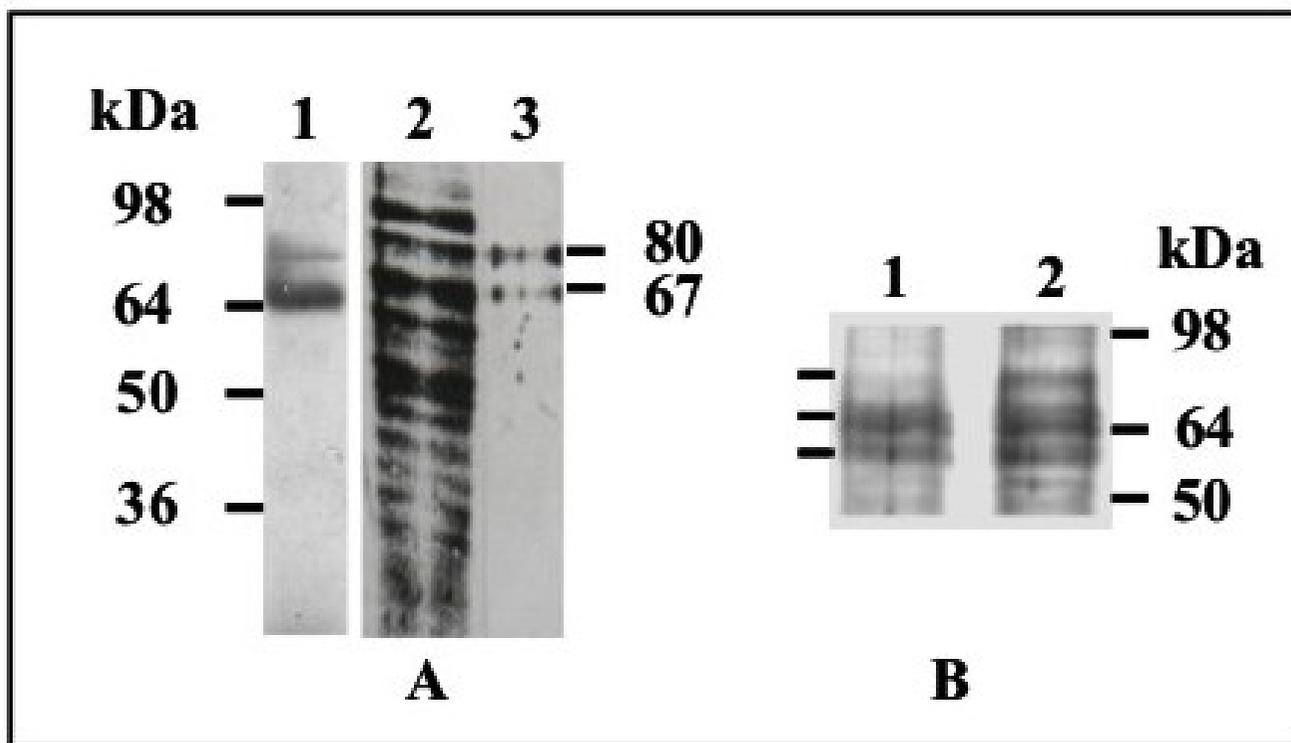
### Immunoprecipitation of the putative receptors from C6/36 cell apical surfaces

To confirm that the putative receptors in *Ae. aegypti* MG epithelial cells are similar to those in *Ae. albopictus* C6/36 cells, the apical surfaces of C6/36 cells were labeled with <sup>125</sup>I and precipitated with anti-C6/36 cell membrane and anti-MG antibodies. Antibody specificity was tested by immunoblotting (Figure 2, panel A, lanes 2, 4). Proteins with apparent molecular weights over 180 kDa were recognized. The negative control with pre-immune serum showed no bands (Figure 2, lanes 3 and 5).

Labeled proteins from the apical surfaces of C6/36 cells (Figure 3, lane 1) precipitated by polyclonal antibodies against *Ae. aegypti* MG (Figure 3, lane 2) or C6/36 cell membranes (Figure 3, lane 3-4) were separated by 10% SDS-PAGE. The immunoprecipitated labeled proteins had molecular masses of 80 and 67 kDa. The labeled proteins were not precipitated by an unrelated antibody, anti-actin (Figure 3, lane 5).

### Apical cell surface proteins bound the four serotypes of DEN virus

To determine whether different serotypes of DENV recognized the same receptors, labeled apical cell surface proteins from C6/36 cells were incubated with DENV1,



**Figure 1**

**VOPBA and DENV2 affinity chromatography of the virus dengue receptors.** Proteins from *Aedes aegypti* MGs were extracted with 0.05% Triton X-100, separated by 10% SDS-PAGE and blotted on to a PVDF membrane. The putative receptors were revealed after incubation with DEN2 virus and peroxidase-labeled goat anti-mouse antibody (panel A, lane 1) as described in the methods section. Receptors were purified from C6/36 cell membranes (panel A, lane 3) or MG (fractions 1 and 2, panel B) by DENV2 affinity chromatography using a DEN2-Sepharose™ 4B column as described in the methods section. The apparent molecular weights of these proteins are shown on the right side of panel A and on the left side of panel B. Proteins separated by SDS-PAGE were silver stained. The protein pattern of total C6/36 membranes is shown in panel A lane 2. Molecular weight markers are shown on the left side in panel A and on the right side in panel B.

DENV2, DENV3 or DENV4 (Figure 3 lanes 7–10, respectively) and precipitated by incubation with antibodies against each DENV serotype. All four serotypes led to the immunoprecipitation of proteins with molecular masses of 80 and 67 kDa (Figure 3, lanes 7–10). Labeled C6/36 apical membrane proteins were precipitated by anti-EP antibodies as a positive control (Figure 3, lane 11). The control without DEN virus showed no polypeptides (Figure 3, lane 6).

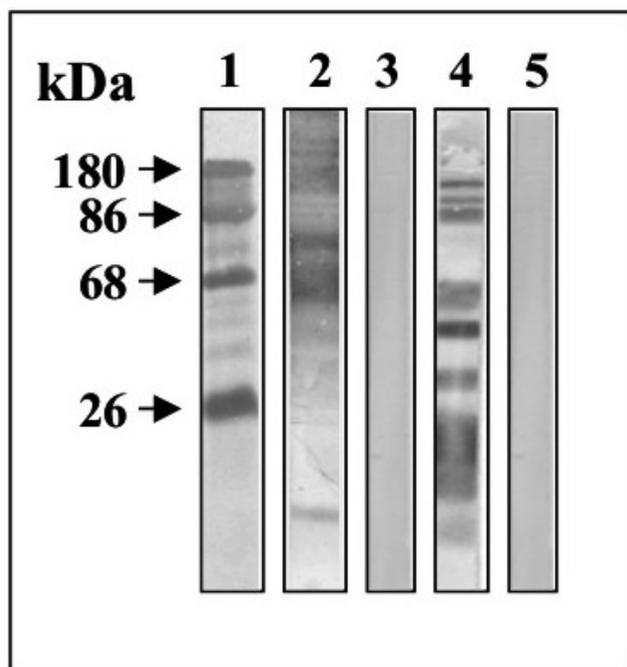
**Polyclonal antibody-mediated blocking of DENV2 binding and infection of C6/36 cells**

The specificities of anti-EP, anti-R80 and anti-R67 prepared to test inhibition of DEN virus binding and infection were assessed by immunoblotting (Figure 4) and immunofluorescence (Figure 5) as described in the methods section. Anti-EP recognized two polypeptides with molecular masses of 80 and 67 kDa (Figure 4, lane 2) and

anti-R80 and anti-R67 recognized polypeptides of 80 (Figure 4, lane 3) and 67 kDa (Figure 4, lane 4), respectively. Pre-immune mouse serum recognized no polypeptides (Figure 4, lane 1).

There was no immunofluorescence staining when C6/36 cells were incubated with pre-immune serum (Figure 5A). In contrast, anti-membrane, anti-MG, anti-EP, anti-R67 and anti-R80 antibodies all stained the C6/36 membranes (Figure 5B–F, respectively). Anti-R80 also stained the cytoplasm (Figure 5F).

In order to test antibody blocking of DENV binding, C6/36 cell monolayers were incubated with anti-EP, anti-R67, anti-R80 or anti-MG antibodies or pre-immune serum, then with <sup>125</sup>I- DEN2 virus as described in the methods section (Figure 6). Anti-EP, anti-R67 and anti-R80



**Figure 2**  
**Immunoblots of C6/36 total extracts.** Extracts of C6/36 cells (lanes 2, 3) or MG (lanes 4, 5) were subjected to 10% SDS-PAGE, blotted on to nitrocellulose and probed with anti-C6/36 membrane proteins (lane 2), pre-immune serum (lane 3), anti-MG (lane 4) or pre-immune serum (lane 5).

decreased virus binding by up to 40%. Binding was inhibited by 70% when anti-MG was diluted 1:10 (Figure 6).

To test the inhibition of DENV2 infection by the specific anti-receptor antibodies, C6/36 cell monolayers were incubated separately for 1 h in media containing pre-immune serum, anti-EP, anti-R67 or anti-R80 diluted 1:10 or 1:50, before being infected with DENV2. Infection was allowed to proceed for 8 days and the amount of infectious virus was determined by viral plaque assays in LLC-MK2 cells (Figure 7). Maximal inhibition of infection was obtained with anti-EP and anti-R67 diluted 1:10 (Figure 7). These antibodies inhibited DEN 2 replication in the C6/36 cells nearly 1000-fold. Anti-R80 showed a relatively minor inhibitory effect of approximately 100-fold. Anti-EP, anti-R67 or anti-R80 diluted 1:50, and pre-immune serum, did not inhibit DEN2 replication in these cells.

## Discussion

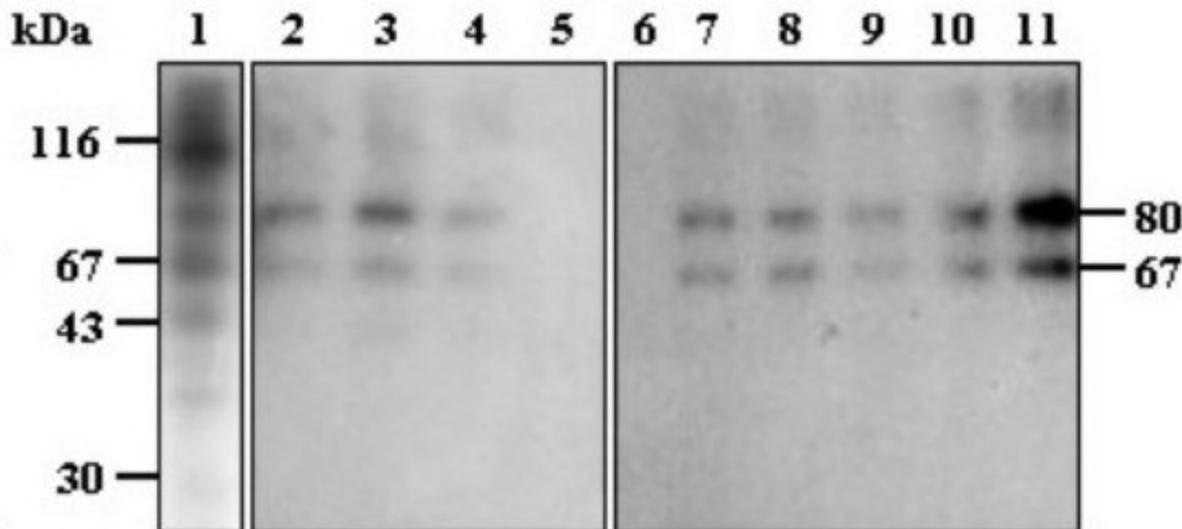
When a mosquito takes a viremic blood meal, virions interact with receptors on the midgut epithelial cells and penetrate and infect them. Arbovirus blocked at early stages of midgut infection is considered a midgut infec-

tion barrier (MIB). A midgut escape barrier (MEB) is considered when infectious virions do not disseminate to hemoceles, or disseminate but do not infect secondary target organs.

Most studies of flavivirus vector competence in *Ae. aegypti* indicate that MIB is a major determinant of transmission [23-25] and shows wide variation both among and within *Ae. aegypti* populations for flaviviruses including DENV [20,22,25]. Moreover, *Ae. aegypti* MG is generally considered the best candidate tissue for disrupting the virus life cycle within the mosquito because it is the earliest interface between insect and virus (see above). This strongly suggests that DENV attachment to MG epithelial cell receptors is critical for understanding the initial virus-vector interactions and will help to explain MIBs to DENV infection and variations in vector competence. Furthermore, we would expect that virus serotype and genotype would influence virus attachment to midgut receptors.

Thus, identification of viral receptors in the MG represents a critical step in understanding vector competence and designing possible targets for preventing viral entry to cells and therefore inhibiting the infection. Feasible approaches to intervention are monoclonal antibodies blocking the receptor, and synthetic peptides mimicking the viral receptor and thus competing with the host receptor for virus attachment. This will allow novel strategies for the control and prevention of DEN to be developed. Published data have shown that the viral E protein is involved in target cell recognition [6,26,27]. Recent structural and genetic evidence [28,29] suggests that the prM/M stem-anchor region is also likely to play a role in virion entry to cells. Purification by DENV 2 affinity chromatography using native virus is a novel approach to obtaining the putative protein receptors for DENV.

Several authors using the overlay assay have identified polypeptides with molecular masses of 27, 45, 67 and 87 in macrophages [8], 40 and 70 in myelomonocytes [30], 45 and 72 kDa in B and T cells from humans [31], and two heparan sulfate containing cell-surface binding proteins resolving at 19 and 37 kDa in hepatocytes [32]. The data in the present paper strongly support the view that the 67 and 80 kDa proteins are receptors for DENV 1, 2, 3 and 4 in MG cells from *Aedes aegypti*. Furthermore, we have purified these proteins for the first time from both *Ae. albopictus* C6/36 cells and *Ae. aegypti* MGs using DENV2 affinity chromatography; we also generated specific antibodies against them, which inhibited binding and infection of cultured cells by DENV 2. These results contrast with those of Yazi-Mendoza et al. [33], who showed that DENV 4 binds to a 45 kDa protein in mosquito tissues. The results in Figure 2 clearly demonstrate that DENV 4 recognizes R67 and R80 in C6/36 cell membranes. A plausible expla-



**Figure 3**

**Immunoprecipitation of labeled membrane proteins.** Proteins from C6/36 cell apical surfaces radiolabeled with  $^{125}\text{I}$  (lane 1) were immunoprecipitated with polyclonal anti-MG (lane 2) or anti-membrane (lane 3 and 4) and separated by 10% SDS-PAGE. The molecular weights of the immunoprecipitated proteins are shown on the left side. A negative control using an unrelated antibody (anti-actin) is shown in lane 5. Labeled apical cell surface proteins recognized by DEN1 (lane 7), DEN2 (lane 8), DEN3 (lane 9) and DEN4 (lane 10) were immunoprecipitated with specific anti-DENV as described in the methods section. A control without DEN virus was included (lane 6).  $^{125}\text{I}$ -labeled proteins immunoprecipitated by anti-EP were used as a positive control (lane 11). All proteins were separated by 10% SDS-PAGE and labeled proteins were detected by autoradiography. The molecular weights of these proteins are shown on the right side. Molecular weight markers are shown on the left side.

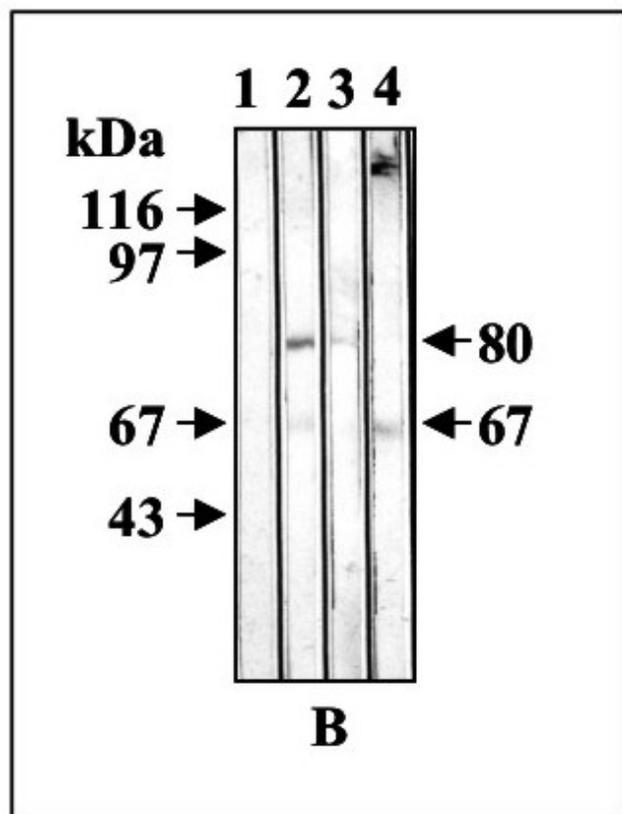
nation is that Yazzi-Mendoza et al. [33] used total cell extracts for their VOPBA, while our results were obtained from plasma membranes, although viruses are known to have several receptors [7]. In any event, further experiments are needed to settle the point. Interestingly, Jindadamrongwech & Smith [7] found a serotype-specific heterogeneity among DENV binding proteins on HepG2 human Liver cells. It is therefore possible that different cell lines have different specificities for virus serotypes.

The specific antibodies against R67 and R80 inhibited radiolabeled DEN virus binding and the highest inhibition was observed with anti-MG antibodies, suggesting that other cell membrane molecules may participate in virus binding. Candidates include non-sialic acid carbohydrates, since we previously showed that sialic acid does not participate in virus binding [9]. In agreement with our results, Zieler et al. [29] failed to detect sialic acid in *Ae. aegypti* MG. More recently, Thaisomboonsuk et al. [34] reported the inability of neuroaminidase to inhibit DEN-2 virus binding to insect cells.

As we mentioned earlier, DC-SIGN has also been reported as a functional receptor on human dendritic cells [15,16] for DENV and other flaviviruses. Further studies are needed to determine the involvement of DC-SIGN as receptor in DENV infection in *Ae. aegypti* mosquitoes.

Collectively, the results corroborate the notion that DENV utilizes multiple cell surface molecules for binding to and infection of target cells, some of which may be common to all cells and shared among several viruses [6]. Interestingly, Sakoontanyoo et al. [12] suggested that one of these protein receptors for DENV 2, 3 and 4 may be a laminin-binding protein with an apparent mass of 50 kDa. Although we failed to detect a protein with this molecular mass, this does not eliminate the possibility.

In summary, specific membrane molecules are required for DENV binding and the nature of these molecules seems to depend on cell type. Interestingly, our results show that R67 and R80 are the putative receptors in the MG of *Ae. aegypti* mosquitoes, the principal DENV vector



**Figure 4**  
**Immunoblotting of total C6/36 extracts.** Extracts from C6/36 cells treated as in Figure 2 were tested with pre-immune mouse serum (lane 1), anti-EP (lane 2), anti-R80 (lane 3) or anti-R67 (lane 4). Molecular weight markers are shown on the left side and the proteins detected by the antibodies on the right side.

in America, and in *Ae. albopictus* C6/36 cells. In addition, these receptors are specific for all four serotypes of DENV.

### Conclusion

This paper documents for the first time that the proteins R67 and R80 are putative receptors for dengue virus in the midgut of *Ae. aegypti* and in *Ae. albopictus* C6/36 cells, since specific antibodies against these proteins inhibited the binding and cytopathic effects of the virus. Furthermore, we have shown that these receptors are specific for all four serotypes of DENV.

### Methods

#### Mosquito culture

*A. aegypti* mosquitoes collected as larvae in Monterrey, Mexico were laboratory-reared and maintained at 28 ± 2°C and 80% RH under a 12:12 h (L:D) photoperiod using standard mosquito-rearing procedures [35]. After

day 4, adult MGs were dissected and stored at -80°C until use.

#### DENV infection cells

*Ae. albopictus* clone C6/36 cells were grown at 28°C as previously described [36]. After 18 h of culture, the cells (2 × 10<sup>6</sup>/100 mm plate) were infected with 0.2 ml DENV2 inoculum with an input MOI of 600 PFU per plate and incubated at 28°C for 10 days.

#### Virus purification

The flaviviruses used in this study were: DENV1, strain Hawaii; DENV2, strain New Guinea C (NGC); DENV3, strain H-87; and DENV4, strain H-341. They were obtained from Dr. D. J. Gubler (Division of Vector-borne Infectious Diseases, Centers for Disease Control, Fort Collins, CO, USA) and kindly provided by Dr. Blanca Ruiz (Biomedicas, UNAM).

Virus passage in Vero cells was clarified from cell culture supernatants. Viruses were concentrated and purified as described by Putnak et al. [37]. Titers of virus stocks made in LLC-MK2 cells [38] were 8 × 10<sup>8</sup> PFU/ml for each DENV strain. Control antigens harvested from uninfected Vero cells were prepared in the same manner.

The purified viruses were iodinated using 1 mCi of <sup>125</sup>I (Amersham Pharmacia Biotech) as described elsewhere [39]. The specific activity was 4.7 × 10<sup>9</sup> cpm/mg of protein.

Biotinylation was performed as described previously [9]. The viral pellet was stored at -70°C until use.

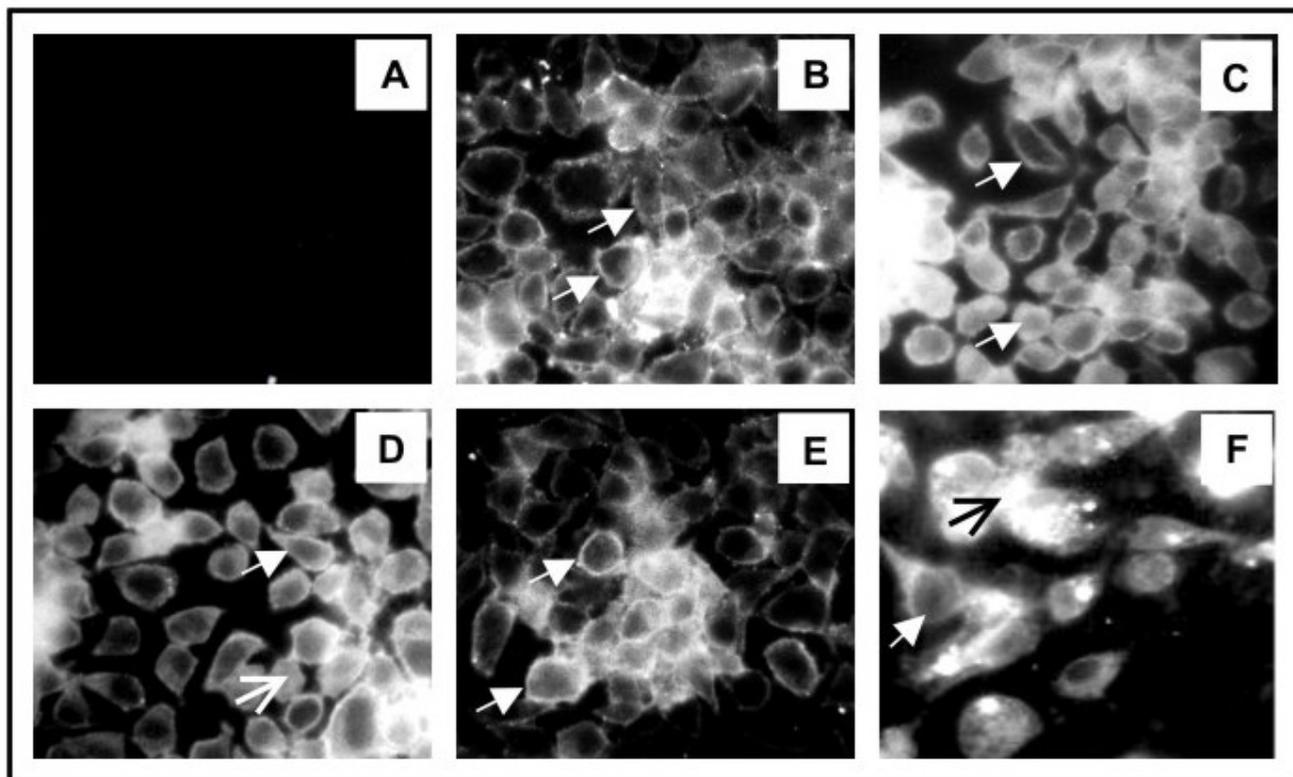
#### Membrane preparation

C6/36 cell membranes were prepared essentially as described elsewhere [40] by scraping the cells from confluent plates in the presence of PBS. This procedure has been described in detail for C6/36 cells [9]. Labeled membrane proteins were identified at the 20% interface of the gradient and verified by SDS-PAGE.

#### DENV2 affinity chromatography

DENV2 viruses (8 × 10<sup>8</sup> PFU/ml) were bound covalently to 1 g of CNBr-activated Sepharose™ 4B as recommended by the manufacturer (Amersham Biosciences). The DENV2-Sepharose™ column was stored in 0.002% sodium azide at 4°C until use.

The protein extract was obtained by homogenizing MGs (300/ml) in buffer E (50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 1 mM EDTA, 0.05% v/v Triton X-100) containing P 8340 protease inhibitor cocktail from Sigma. To obtain the soluble proteins, the homogenate was centrifuged for 10 min at 7245 × g at 4°C.



**Figure 5**

**Immunofluorescence microscopy of C6/36 cells.** Cell monolayers were stained with pre-immune serum (A), anti-cell membrane (B), anti-MG (C), anti-EP (D), anti-R67 (E) and anti-R80 (F) and then incubated with fluorescein-conjugated goat anti-mouse antibodies.

MG protein extract (2 mg), or 100  $\mu$ g C6/36 cell membranes [4,9], was applied to a DENV2-Sepharose™ 4B column (1 ml) equilibrated in buffer E and washed with the same buffer. The DENV2-binding proteins were eluted with buffer E containing 0.5 M NaCl. Fractions of 0.5 ml were collected, and the protein content was monitored by the Bradford method [41] and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate on 10% gels [42]. The eluted proteins (EP) were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **Radiolabeling of C6/36 cell membrane proteins**

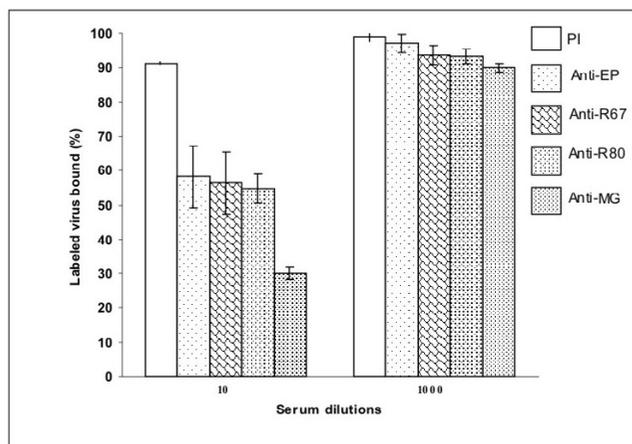
Proteins from the apical surfaces of confluent monolayers were iodinated by the lactoperoxidase method [39]. Labeled membrane proteins (specific activity  $1.4 \times 10^6$ cpm/mg) in buffer E were used immediately or stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **Antibodies**

Monoclonal anti-DENV2 antibodies were obtained from murine hybridomas (HB-46) from ATCC. Anti-DENV1,

DENV3 and DENV4 were kindly provided by Dr. Garry Clark from CDC-Puerto Rico.

To obtain specific anti-R80 and anti-R67, proteins retained by the DENV2-Sepharose™ 4B column were separated by 10% SDS-PAGE. After silver staining, each of the two main protein species (R80, R67) was excised from the gel, cut in small pieces, suspended in PBS and mixed with an equal volume of Titer-Max adjuvant (CyTRx Corporation) to immunize two groups of BALB/c mice. Pre-immune sera were obtained before immunization. Proteins eluted (EP) from the DENV2 affinity column were used to obtain specific polyclonal antibodies. A total of 10  $\mu$ g of this protein was used to immunize the mice. MG extracts (100  $\mu$ g), or C6/36 cell membrane extracts (50  $\mu$ g), were also used to immunize mice [9]. After fifteen days, the mice received a booster; they were bled after thirty days. Sera were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use. Antibody specificity was tested by ELISA and immunofluorescence. Negative controls using pre-immune sera were included in all assays.



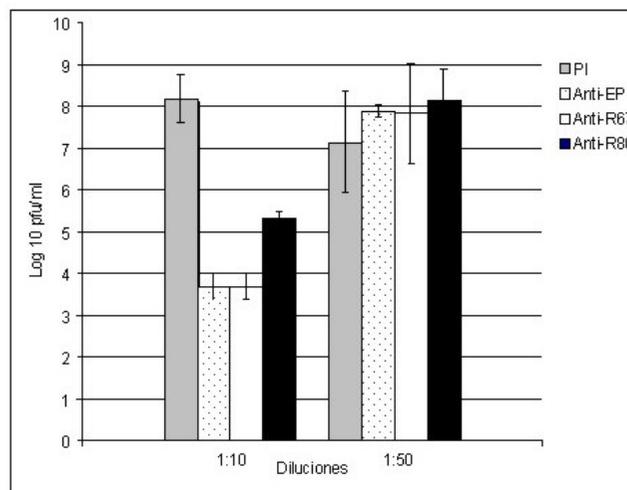
**Figure 6**  
**Blocking of DEN-2 virus binding by specific antibodies.** C6/36 cell monolayers were incubated with 1:10 or 1:1000 diluted pre-immune serum (PI), anti-EP, anti-R67, anti-R80 or anti-MG. To assay the binding of radiolabeled virus, cells were dissolved in 3% SDS in all experiments. The total [ $^{125}$ I]DENV2 virus bound was  $5,286 \pm 300$  cpm. The experiments were repeated at least 3 times in quadruplicate.

#### Binding and infection blocking assays

C6/36 cells ( $1.5 \times 10^4$ ) were cultured overnight in 96-well plates as described above. For binding assays, the cells were incubated for 60 min at 4°C with pre-immune serum, anti-EP, anti-R80, anti-R67 or anti-MG diluted 1:10 or 1:1000 in serum-free medium. Other cells were left untreated.  $^{125}$ I-DENV of each serotype was added (600 PFU/well) and incubated for 30 min at 4°C. After washing to remove non-bound labeled virus, cells containing the bound virus were solubilized in 3% SDS and the radioactivity was counted. For infection assays, cells were incubated for 60 min with pre-immune serum, anti-EP, anti-R80 or anti-R67 diluted 1:10 or 1:50 at 28°C and then DENV serotype 2 was added (600 PFU/well) followed by incubation for 30 min at 4°C. After washing, fresh culture medium was added and the cells were incubated for 8 days. The viral titer was determined in each supernatant by viral plaque assay in LLC-MK2 cells [43]. Four wells were assessed for each experimental condition.

#### Immunofluorescence

C6/36 cell monolayers were stained as previously described [9]. Pre-immune sera as well as each of the polyclonal antibodies (anti-R80, anti-R67 and anti-MG) were diluted 1:100 and incubated overnight at 4°C. After washing with PBS, the cells were incubated with fluorescein-conjugated goat anti-mouse (1:500) antibodies (Hyclone Laboratories, Inc., Utah). After further washing, they were



**Figure 7**  
**Inhibition of DENV2 infection by specific antibodies.** C6/36 cell monolayers were incubated separately in the presence of pre-immune serum, anti-EP, anti-R67 or anti-R80 at 28°C for 60 min and then DENV serotype 2 was added (600 PFU/well) and incubated for 30 min at 4°C. After washing, fresh culture medium was added and the cells were incubated for 8 days. Pre-immune serum and antibodies were diluted 1:10 and 1:50. Viral titers in the supernatants were determined by viral plaque assay in LLC-MK2 cells. The experiments were repeated at least 3 times in quadruplicate.

mounted in 50% glycerol and observed by fluorescence microscopy.

#### Electrophoretic blotting

Proteins were electrophoresed in 10% SDS-PAGE [42] and transferred to nitrocellulose paper [44]. Membranes were incubated with anti-EP, anti-R80, anti-R67 or anti-MG diluted 1:50. The goat anti/mouse IgG second antibody was conjugated to alkaline phosphatase and color development was measured as recommended by the manufacturer (Zymed Laboratories).

#### Virus overlay protein binding assay (VOPBA)

Mosquito MG proteins were separated by 10% SDS-PAGE as described above and blotted on to PVDF membranes (BioRad) by Towbin's technique [44]. The procedure was followed as previously described [9] with some modifications. Briefly, the electrophoretic blots were incubated overnight with unlabeled virus, washed with PBS and incubated overnight with monoclonal anti-flavivirus (diluted 1:100) at 4°C. After washing with PBS, they were incubated for 2 h at room temperature with peroxidase-labeled goat anti-mouse (Kirkegaard Perry Laboratories, USA) diluted 1:1000 in 5% skimmed milk in PBS. Finally, they were washed with PBS, and reactive proteins were visualized by developing with the chromogenic substrate 4-

chloro-1-naphthol/hydrogen peroxide. The reaction was stopped after 1 h by washing with water.

### Receptor-virus immunoprecipitation

Radiolabeled cell membrane proteins (5 µg) solubilized in buffer E containing protease inhibitors (see above) were incubated for 2 h at 37°C with 10 µl of each DENV serotype (6.0 × 10<sup>6</sup> PFU/ml) and anti-DENV 1, 2, 3 or 4 antibodies diluted 1:100. The mixture was centrifuged at 5,000 × g for 15 min and washed twice with PBS. The supernatant was discarded and the proteins from the pellet were suspended in SDS gel-loading buffer and separated by 10% SDS-PAGE. Labeled polypeptides were detected by autoradiography [45]. Negative controls were included by incubating the same preparations with anti-actin, an unrelated antibody.

### Authors' contributions

RFMC carried out the virus purification experiments, DENV infection of the cells, affinity purification of DENV2 MG receptor, electrophoretic blotting and the virus overlay protein binding assay. HAEA purified the receptors from C6/36 cell membranes, and carried out the binding and infection blocking assays and immunofluorescence studies. RT radiolabeled the membrane proteins and obtained the membrane preparations, raised antibodies and performed the receptor-virus immunoprecipitation. ADB cultured and field collected mosquitoes. MCN assembled the manuscript and participated in data analysis. MLM proof-read and assembled the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

We acknowledge the M.Sc. Gustavo Limón Camacho for the standardization of the protein receptor purification assay. This research was supported by United States Public Health Service Grant AI 45430 subgrant G-46321.

### References

- WHO (World Health Organization): **Dengue Haemorrhagic fever: early recognition, diagnosis and hospital management – an audiovisual guide for health care workers responding to outbreaks.** *Weekly Epidemiological Record* 2006, **81(38)**:362-363.
- DEGPI (Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud) 2004** *Boletín Epidemiología* [<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/>].
- Halstead SB: **Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage a pathogenetic cascade.** *Rev Infect Dis* 1989, **11(Suppl 4)**:S830-S839.
- Littau R, Kurane I, Ennis FA: **Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection.** *J Immunol* 1990, **144(8)**:3183-3186.
- Tu WC, Chen CC, Hou RF: **Ultrastructural studies on the reproductive system of male A. aegypti (Diptera: Culicidae) infected with dengue 2 virus.** *J Med Entomol* 1998, **35(1)**:71-76.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG: **A structural perspective of the flavivirus life cycle.** *Nat Rev Microbiol* 2005, **3(1)**:13-22.
- Jindadamrongwech S, Smith DR: **Virus Overlay Protein Binding Assay (VOPBA) reveals serotype specific heterogeneity of dengue virus binding proteins on HepG2 human liver cells.** *Intervirology* 2004, **47(6)**:370-373.
- Moreno-Altamirano MM, Sanchez-Garcia FJ, Muñoz ML: **Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2.** *J Gen Virol* 2002, **83(5)**:1123-1130.
- Muñoz ML, Cisneros A, Cruz J, Das P, Tovar R, Ortega A: **Putative dengue virus receptors from mosquito cells.** *FEMS Microbiol Lett* 1998, **168(2)**:251-258.
- Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ: **Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus.** *Nat Struct Biol* 2003, **10(11)**:907-912.
- Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM: **Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells.** *J Virol* 2005, **79(8)**:4557-4567.
- Sakoonwatanyoo P, Boonsanay V, Smith DR: **Growth and production of the dengue virus in C6/36 cells and identification of a laminin-binding protein as a candidate serotype 3 and 4 receptor protein.** *Intervirology* 2006, **49(3)**:161-172.
- Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM: **Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate.** *Nat Med* 1997, **3(8)**:866-871.
- Chen YC, Wang SY, King CC: **Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism.** *J Virol* 1999, **73(4)**:2650-2657.
- Marianneau P, Megret F, Olivier R, Morens DM, Deubel V: **Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs.** *J Gen Virol* 1996, **77(10)**:2547-2554.
- Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Despres P: **Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses.** *EMBO Rep* 2003, **4(7)**:723-728.
- Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumppfeller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Bix DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA: **DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells.** *J Exp Med* 2003, **197(7)**:823-829.
- Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, Rey FA, Despres P, Arenzana-Seisdedos F, Amara A: **Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals.** *J Biol Chem* 2005, **280(25)**:23698-23708.
- Halstead SB, Heinz FX, Barrett AD, Roehrig JT: **Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25–27 June Vienna, Austria.** *Vaccine* 2005, **23(7)**:849-856.
- Black WC 4th, Bennett KE, Gorrochotegui-Escalante N, Barillas-Mury CV, Fernandez-Salas I, Munoz ML, Farfan-Ale JA, Olson KE, Beaty BJ: **Flavivirus susceptibility in Aedes aegypti.** *Arch Med Res* 2002, **33(4)**:379-388.
- Lourenco-de-Oliveira R, Vazeille M, de Filippis AM, Failloux AB: **Aedes aegypti in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004, **98(1)**:43-54.
- Bennett KE, Olson KE, Munoz ML, Fernandez-Salas I, Farfan-Ale JA, Higgs S, Black WC 4th, Beaty BJ: **Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of Aedes aegypti from Mexico and the United States.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **67(1)**:85-92.
- Bosio CF, Beaty BJ, Black WC 4th: **Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in Aedes aegypti.** *Am J Trop Med Hyg* 1998, **59(6)**:965-70.
- Gubler DJ, Nalim S, Tan R, Saipan H, Sulianti Saroso J: **Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of Aedes aegypti.** *Am J Trop Med Hyg* 1979, **28(6)**:1045-52.
- Tabachnick WJ, Wallis GP, Aitken TH, Miller BR, Amato GD, Lorenz L, Powell JR, Beaty BJ: **Oral infection of Aedes aegypti with yellow fever virus: geographic variation and genetic considerations.** *Am J Trop Med Hyg* 1985, **34(6)**:1219-24.
- Chen Y, Maguire T, Marks RM: **Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells.** *J Virol* 1996, **70(12)**:8765-8772.
- Kaufman BM, Summers PL, Dubois DR, Eckels K: **Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection.** *Am J Trop Med Hyg* 1987, **36(2)**:427-434.

28. Pryor MJ, Azzola L, Wright PJ, Davidson AD: **Histidine 39 in the dengue virus type 2 M protein has an important role in virus assemble.** *J Gen Virol* 2004, **85(12)**:3627-3636.
29. Zieler H, Nawrocki JP, Shahabuddin M: **Plasmodium gallinaceum ookinetes adhere specifically to the midgut epithelium of Aedes aegypti by interaction with a carbohydrate ligand.** *J Exp Biol* 1999, **202(5)**:485-495.
30. Bielefeldt-Ohmann H: **Analysis of antibody-independent binding of dengue viruses and dengue virus envelope protein to human myelomonocytic cells and B lymphocytes.** *Virus Res* 1998, **57(1)**:63-79.
31. Bielefeldt-Ohmann H, Meyer M, Fitzpatrick DR, Mackenzie JS: **Dengue virus binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains.** *Virus Res* 2001, **73(1)**:81-89.
32. Hilgard P, Stockert OR: **Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes.** *Hepatology* 2000, **32(5)**:1069-1077.
33. Yazı Mendoza M, Salas-Benito JS, Lanz-Mendoza H, Hernandez-Martinez S, del Angel RM: **A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45-kDa glycoprotein.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **67(1)**:76-84.
34. Thaisomboonsuk BK, Clayson ET, Pantuwatana S, Vaughn DW, Endy TP: **Characterization of dengue-2 virus binding to surfaces of mammalian and insect cells.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72(4)**:375-383.
35. Ramasamy MS, Sands M, Kay BH, Fanning ID, Lawrence GW, Ramasamy R: **Anti-mosquito antibodies reduce the susceptibility of Aedes aegypti to arbovirus infection.** *Med Vet Entomol* 1990, **4(1)**:49-55.
36. Igarashi A: **Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses.** *J Gen Virol* 1978, **40(3)**:531-544.
37. Putnak R, Barvir DA, Burrous JM, Dubois DR, D'Andrea VM, Hoke CH, Sadoff JC, Eckels KH: **Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys.** *J Infect Dis* 1996, **174(6)**:1176-1184.
38. Polo S, Ketner G, Levis R, Falgout B: **Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast.** *J Virol* 1997, **71(7)**:5366-5374.
39. Morrison M: **Lactoperoxidase-catalyzed iodination as a tool for investigation of proteins.** *Methods Enzymol* 1980, **70(A)**:214-220.
40. Eichholz A, Crane RK: **Isolation of plasma membranes from intestinal brush borders.** *Methods Enzymol* 1974, **31(A)**:123-134.
41. Bradford M: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **7(72)**:248-254.
42. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227(5259)**:680-685.
43. Richardson J, Molina-Cruz A, Salazar MI, Black W 4th: **Quantitative analysis of dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual Aedes aegypti.** *Am J Trop Med Hyg* 2006, **74(1)**:132-141.
44. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proc Natl Acad Sci* 1979, **76(9)**:4350-4354.
45. Metsikko MK, Rajaniemi HJ: **Immunoprecipitation of the lutropin receptor. Loss of receptor molecules during down-regulation.** *Biochem J* 1984, **224(2)**:467-471.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



## Dengue 2 genotypes in the state of Oaxaca, Mexico

A. Cisneros<sup>2,3</sup>, Á. Díaz-Badillo<sup>1</sup>, G. Cruz-Martínez<sup>3</sup>, R. Tovar<sup>1</sup>,  
L. R. Ramírez-Palacios<sup>4</sup>, F. Jiménez-Rojas<sup>4</sup>, B. Beaty<sup>5</sup>,  
W. C. Black IV<sup>5</sup>, and M. de Lourdes Muñoz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Col San Pedro Zacatenco, México

<sup>2</sup>Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN, México

<sup>3</sup>Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, México

<sup>4</sup>Laboratorio Estatal de Salud Pública de Oaxaca, Oaxaca, Servicios de Salud de Oaxaca, Oaxaca, México

<sup>5</sup>Department of Microbiology, Immunology, and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, U.S.A.

Received February 21, 2005; accepted June 10, 2005  
Published online August 12, 2005 © Springer-Verlag 2005

**Summary.** To genetically characterize dengue 2 (DEN-2) viruses in Oaxaca, Mexico, the C protein, and a portion of the prM protein genes of 8 isolates from the 2001 DEN epidemic were sequenced. The sequences were compared to those of prototype DEN-2 viruses from various parts of the world. Phylogenetic analysis suggested that the 2001 isolates of DEN-2 were of the American/Asian genotype and were most similar to the Jamaica and Venezuelan isolates MARA3, LARD1996 and LARD1910. Molecular analyses confirmed the origin of the isolates. This study indicates that DEN-2 strains of American/Asian genotype probably from Southeast Asian are circulating in Oaxaca.

### Introduction

Dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever and shock syndrome (DHF/DSS) are mosquito-borne infectious diseases that have become major international public health concerns. DF and DHF/DSS occur in tropical and sub-tropical regions around the world, predominantly in urban and semi-urban areas. There are four dengue serotypes, which are transmitted to humans principally through the bites of *Aedes aegypti*. Recovery from infection by one serotype provides lifelong immunity against that serotype, but confers only partial and

transient protection against subsequent infection by the other three. Sequential infection increases the risk of DHF, and this may be also be associated with the order of serotypes infecting a patient [32]. DHF/DSS cases have also been associated with primary infections with virulent strains of DEN virus (DENV) [30].

Dengue virus (family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*, species *Dengue virus*) genotypes are defined in phylogenetic studies as having no more than 6% variation in the E/NS1 junction gene [27]. DEN-1 consists of five subtypes (I–V) [27] and DEN-2 virus contains six, although DEN-2 virus subtype III has been further divided into sublineages IIIa and IIIb [19]. Armstrong and Rico-Hesse [1] classified DEN-2 strains isolated from America in two major groups, Asian and American. Twiddy et al. [37] have proposed the following genotypes: American, Cosmopolitan, Asian Genotype 1, Asian Genotype 2, American/Asian, in addition to a Sylvatic lineage. DEN-3 and DEN-4 viruses are currently classified into four and two genotypes, respectively [16, 17].

Molecular epidemiological studies suggest that infections with viruses in the American DEN-2 genotype were not associated with DHF/DSS [27, 28, 40]. In contrast, DHF/DSS epidemics have been associated with the introduction of Southeast Asian DEN-2 genotypes, the first of which was the Cuban epidemic in 1981 [9, 28]. There were an estimated 10,000 cases of DHF/DSS [14]. Until recently virus isolates made during the Cuban epidemic were not generally available for study, however, isolates were made during that time in neighboring Jamaica, and phylogenetic analyses of these viruses revealed that their origin was Southeast Asia, presumably Vietnam, Malaysia or Thailand [6, 28]. Recently, Cuban isolates from the epidemic of 1997 were demonstrated to have a total conservation of the E gene sequence and have been classified as American/Asian genotype [29].

An epidemic of DHF in the New World took place in Venezuela in 1989; isolates of DEN-1, -2 and -4 were obtained during this epidemic, but the most severe cases were associated with DEN-2 infections [25, 26]. A DHF epidemic in Brazil in 1990, was also associated with DEN-2 virus [24, 26]. A major epidemic of DHF/DSS in Nicaragua in 1994 was associated with the introduction of DEN-3 virus, probably of Indian or Sri Lankan origin.

DHF was first reported in Mexico in 8 patients in 1985 and until 1994, only sporadic DHF cases were detected. However, in 1995, there were 358 DHF cases confirmed, and most virus isolates were DEN-2 [4]. In 1995–1996, 539 DHF cases and 30 deaths were reported. DHF cases were confirmed and reported in 14 countries in the Americas and DHF was endemic in many of these areas by 1995 [10]. Major epidemics of DEN-1 occurred in Mexico (Chiapas, Edo. De Mexico, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacan Oaxaca, Puebla, Queretaro, Quintana roo, San Luis Potosi, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán) from 1979–1983. DEN-2 appeared for the first time in Oaxaca and Tamaulipas in 1982, but was not associated with DHF/DSS. DEN-3 was introduced later in 1995. This serotype appeared in Chiapas, Puebla, San Luis Potosi, Tamaulipas and Veracruz. DEN-3 was reported in Oaxaca in 2002. Cases of DEN-4 were reported in 1982 in Tamaulipas, and Oaxaca and in the Yucatan in 1984. Clearly, the epidemiology of DEN in a geographic areas is complex and dynamic.

Phylogenetic studies provide powerful approaches to monitor the introduction, movement and trafficking of viruses as well as to predict the potential epidemiological consequences of such events [12, 28, 36]. Many studies indicate that dengue viruses are evolving and diverging rapidly via intramolecular changes and perhaps recombination [38, 39, 41]. This could result in the generation of new, more virulent dengue viral genotypes in the future. A number of genetic markers have been proposed to condition the increased virulence of dengue viruses from Asia [18]. Identification of genotypic markers correlated with increased virulence would be of public health importance.

To provide more information on DEN epidemiology and virulence, we characterized a number of DEN-2 viruses isolated in Oaxaca, Mexico in 2001. The nucleotide sequence of the C and a portion of the prM protein genes of 8 DEN-2 viruses isolated from patients with DF and DHF were sequenced. Phylogenetic and genetic analyses revealed the putative geographic origin of the viruses and potential molecular determinants of virulence.

## Materials and methods

### *Viruses*

Isolates of DEN-2 viruses were obtained from acute-phase plasma collected from patients in the epidemiologic surveillance program of the Secretaria de Salud Oaxaca, Mexico during 2000–2001 [4]. Eight isolates were kindly provided by the State of Oaxaca Public Health Laboratory. These were anonymous samples and only information on the clinical disease associated with the respective infection was provided (Table 1). All viruses were passaged once in C6/36 cells, and the resultant viruses were analyzed in the present studies.

### *Antibodies*

Murine hybridomas against human DENV antigens (anti-DEN-2 HB46) were obtained from the ATCC and grown in Dulbecco's modified Eagle medium (GIBCO-BRL) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, penicillin G (100 U/ml), and

**Table 1.** Dengue virus isolates from Oaxaca, Mexico used in this study<sup>a</sup>

Strain	Location	Date	Clinical status <sup>b</sup>	Localization in map
SALC9	Salina Cruz, Oaxaca	06-2001	DF	1
JUCH5	Juchitan, Oaxaca	04-2001	DHF	2
TUX19	Tuxtpepex, Oaxaca	06-2001	DHF	3
TON4	Tonala, Oaxaca	07-2001	DHF	4
HUAT2	Huatulco, Oaxaca	03-2001	DF	5
HUAT11	Huatulco, Oaxaca	07-2001	DHF	5
HUAT12	Huatulco, Oaxaca	07-2001	DF	5
HUAT17	Huatulco, Oaxaca	07-2001	DF	5

<sup>a</sup>Virus isolates are from one passage in C6-36 cells

<sup>b</sup>DF = dengue fever; DHF = dengue hemorrhagic fever

streptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Supernatants were collected from cell cultures that had reached >50% cell death, centrifuged, filtered, and stored at -20 or -70 °C.

#### *Immunofluorescence*

Infected and non-infected monolayers of C6/36 cells were fixed for 15 min with 1.85% formaldehyde and 0.125% glutaraldehyde at 37 °C, washed with PBS, and incubated with 1 ml glycine for 15 min at 28 °C. The cells were then stained as described previously [23].

#### *RNA extraction*

Total RNA was extracted from cell culture supernatant using Trizol LS (GIBCO BRL, Gaithersburg, Md.) according to the manufacturer's recommendations. Ethanol-precipitated RNA was recovered by centrifugation and air-dried. The RNA pellet was suspended in 50  $\mu\text{l}$  of H<sub>2</sub>O treated with diethylpyrocarbonate (DEPC, SIGMA-ALDRICH) and used as a template to obtain different DNA products by Reverse Transcription with the Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

#### *RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)*

Synthetic oligonucleotide primer pairs were designed based on published sequence data for DENV strains: 16681, New Guinea C, and Jamaica 1409, and were optimized over the course of the study. A fragment with the expected size of 594 bp (23 bp of the UTR-5' region, nucleotide 73–96, the structural C protein gene and nucleotides 438–572 of the prM gene) was amplified by RT-PCR using Super Script™ One-Step RT-PCR with Platinum<sup>R</sup> Taq (Invitrogen, Life Technologies). A mixture of 5  $\mu\text{l}$  of total RNA (0.1–1  $\mu\text{g}$ ), 50 pM of corresponding sense (CTACGTGGACCGACAAAGACAG) and antisense (TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTT) [15] PCR primers, and DEPC-treated water (in a total volume of 50  $\mu\text{l}$ ) was incubated at 85 °C for 5 min and chilled on ice. A one-tube reaction mixture containing 2  $\times$  PCR buffer, 0.4 mM of each deoxyribonucleotide triphosphates and stabilizers and 2.4 mM MgSO<sub>4</sub>, and Super Script™ RT/platinum<sup>R</sup> Taq Mix (Invitrogen TM Life Technologies) was added. The RT reaction was performed at 50 °C for 30 min. Thermocycling began with a hot start at 94 °C for 2 min, and the PCR conditions differed according to primer pairs and the expected fragment size. The PCR performed for amplification of the 594 bp fragment was: 40 cycles of 94 °C for 15 sec, annealing at 55 °C for 30 sec, and extension at 72 °C for one min.

The protocol of Seah et al. [33] was followed to confirm the DENV serotype with the thermocycler set to: 10 cycles of 95 °C for 30 sec, annealing at 50 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min with a ramp time of 1 min and 25 cycles of 95 °C for 30 sec, 50 °C for 30 sec and 72 °C for 5 min with a ramp time of 30 sec and a final extension at 72 °C for 7 min. Reaction mixtures were stored at 4 °C until further processing.

#### *Sequencing of PCR fragments*

For automated sequencing, spin column-purified (Quiagen, Chatsworth, Calif.) DNA fragments were analyzed by the cycle-sequencing dye terminator method. The Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, Calif) was chosen. Cycle sequencing parameters used were as described in the manufacturer's protocol (25 cycles of 96 °C for 30 sec, 50 °C for 60 sec, and 60 °C for 4 min). The reaction mixture was column purified (Centri-Sep, Princeton Separations, Adelfia, N.J.) and the DNA was dried in a vacuum centrifuge for 20 min. The pellet was suspended in 16  $\mu\text{l}$  of template suppression reagent, heated for 2 min at 95 °C, and kept on ice until sequenced using an

Applied Biosystems Prism 310, a short capillary (47 cm by 50  $\mu$ m [inside diameter]), and Performance Optimized Polymer 6 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems).

#### *Nucleotide and amino acid sequence analysis*

Prior to phylogenetic analysis, DEN-2 virus nucleic acid sequences of the C protein gene and nucleotides 438–572 of the prM protein were aligned with prototype DEN-2 strains (Table 2) by using the multiple sequence alignment methods CLUSTAL and JOTUN-HEIN, within the MEGAALIGN program (DNASTAR Inc.). The predicted amino acid sequences were analyzed by using algorithms within the PROTEAN software package (DNASTAR, Inc.).

#### *Phylogenetic analyses*

Distance/neighbor-joining, maximum parsimony, and maximum likelihood methods were used in phylogeny reconstruction. In all analyses, DEN-1 was used as an outgroup. Distances were estimated using the method of Tamura and Nei [35] because of unequal rates in the number and types of transitions and transversion. Neighbor-joining analysis (NJ) was performed [31] and support for the derived phylogenies was examined with bootstrapping over 1000 replications. Maximum parsimony analysis was included a bootstrap analysis with 1000 replications was performed to test support for the derived phylogeny. A maximum likelihood tree (ML) was derived using the method of Felsenstein [8]. All of these analyses were performed using PAUP 4.0 [34].

**Table 2.** Dengue virus reference strains used in the phylogenetic analyses<sup>a</sup>

Strain	Location	Year	Genotype [18]	Genotype [39]	Clinical status
JAM/1409	Jamaica	1983	III	American/Asian	DHF
MARA3	Aragua, Venezuela	1990	II	American/Asian	DHF
LARD1701	Marino, Venezuela	1997	I	American/Asian	DF
LARD1910	Marino, Venezuela	1997	II	American/Asian	DF
LARD1996	Marino, Venezuela	1997	II	American/Asian	DF
MARA4*	Aragua, Venezuela	1990	II	American/Asian	DHF
NGC	New Guinea	1944	I	Asian 1	DHF
THNH7/93	Nakhon Phanom, Thailand	1993	III	Asian 1	DHF
16681	Thailand	1964	III	Asian 1	DHF
16681PDK53	Vacunal strain	1964	–	Asian 1	–
IQT2913	Iquitos, Loreto, Peru	1996	NC	American	DF
PR159	Puerto Rico	1969	V	American	DF
MEX/200787	Mexico	1983	NC	NC	DHF
SON/0131	Navojoa, Sonora, Mexico	1992	NC	American	DF
CHNFJ10	China	NR	NC	NC	NR
VEN2	Venezuela	1987	NC	American	DF

<sup>a</sup>Genotypic classification reference was taken from: Lewis et al. [20] and Uzcategui et al. [39]

\*MARA is considered a recombinant, although it has been classified as American/Asian  
NC Not classified

*Nucleotide sequence accession number*

The nucleotide sequences reported in this study have been deposited in the GenBank database under the accession numbers: AY692465 (SALC9), AY692466 (JUCH5), AY692467 (TUX19), AY692468 (TON4), AY692469 (HUAT2), AY692470 (HUAT11), AY692471 (HUAT12), DQ070873 (HUAT17).

**Results***Dengue distribution*

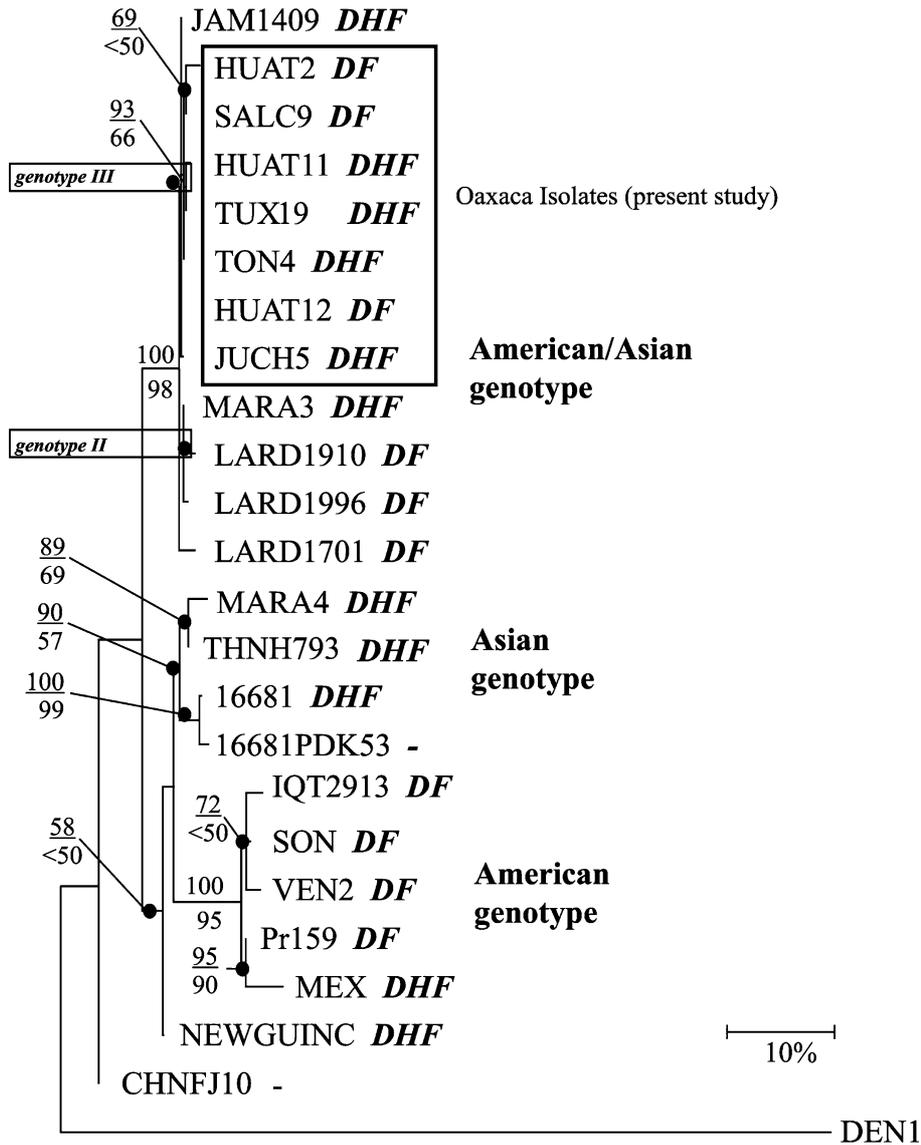
Dengue virus infections were evaluated in 12 Oaxaca sub-districts (Fig. 1) by Mac-ELISA (IgM Antibody Capture Enzyme Linked Immunosorbent Assay) and RT-PCR in an epidemiologic surveillance program of the Secretaria de Salud Oaxaca, Mexico during 2000–2001. Isolates of samples that were positive for both assays were obtained and tested by immunofluorescence. The Mac-ELISA test identified primary infections; consequently, some of the samples that were negative by this assay may have been positive for dengue secondary infection. Some of the negative samples were also tested by RT-PCR. Of the 95 samples tested by Mac ELISA; 32 were positive by RT-PCR, forty two were positive for DENV serotype 2, three for serotype 3 and four for serotype 1. Twenty four Mac-ELISA negative samples were positive by RT-PCR. DEN2 isolates were obtained from the positive samples and used in these studies (Table 1).



**Fig. 1.** Map of Mexico showing the state of Oaxaca. The 5 cities from which dengue viruses originated are noted. Each location is a site where virus was transmitted to patients

*Phylogenetic analysis of Oaxaca isolates*

In the 8 single passage isolates (Table 1), we amplified and sequenced the C protein gene and nucleotides 438–572 of the prM protein. A phylogenetic analysis



**Fig. 2.** Maximum likelihood tree derived using the method of Felsenstein [8]. DEN1 was used as an outgroup. Branch lengths are proportional to percentage divergence. For both distance/neighbor joining and maximum parsimony analyses, 1000 bootstrap replications were performed with PAUP 4.0 [33]. The percentage frequency with which each branch was supported using Tamura and Nei's [34] distance with gamma correction and neighbor joining appears above each branch. The percentage of replications supporting each branch when performing parsimony analysis with gaps included appear below each branch. Oaxaca isolates appear in the box

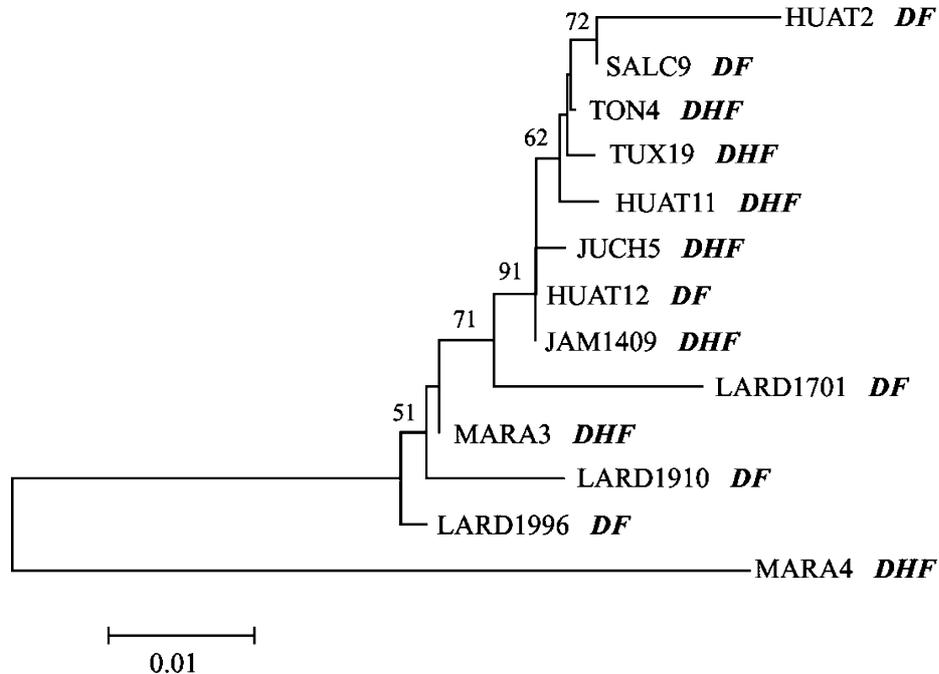
was then performed on these sequences and the sequences of other prototype characterized isolates. HUAT17 and TON4 were identical in sequence.

The Oaxaca isolates were most closely related to the Jamaica strain, subtype III (Fig. 2, Table) and occurred in a common clade with the 3 Venezuelan isolates, LARD (1996, 1910, 1701) and MARA 3. These strains previously reported have been classified as American/Asian genotype [12, 39].

The Mara 4 strain segregates with Asian genotype viruses in our study (Fig. 2). However, others classify it as an American/Asian genotype virus; this may be due to the fact that is a recombinant virus [39]. The American genotype strains cluster in a separate branch with a consistency of 100%. The relationships among the American/Asian strains are further revealed using MARA4 as an outgroup (Fig. 3). All Oaxaca isolates occur in the same branch as in Fig. 2. Our results support the view that these Asian/American strains are phylogenetically distinct from the main Asian and American genotypes [27].

#### *Molecular analysis of C-pM sequence of Oaxaca isolates*

We observed minor changes in nucleotide sequences of the C protein. The largest number of amino acid differences were associated with a change in nucleotide of the prM fragment (6.4%, 3/44 aa). Nucleotide changes in the sequence resulted in 3



**Fig. 3.** UPGMA phylogenetic tree for the C and premembrane locus of DEN-2 viruses from Oaxaca, Mexico. DEN2 MARA4 was used as an outgroup. The numbers displayed next to the nodes correspond to the bootstrap values (1000 replicates) supporting that clade. Tree was constructed as mentioned in Methods

**Table 3.** Summary of consistent amino acid change among Southeast Asian, American and American/Asian genotype viruses

Gene		Amino acid positions <sup>a</sup>													Accession number
C and prM	Genotype	3	9	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
				0	7	0	0	1	2	3	4	4	4	5	
						1	4	2	9	0	2	3	5	3	
Gene prM										1	2	2	3	3	
										5	8	9	1	9	
IQT-2913	American	N	R	N	F	T	M	V	S	R	K	D	T	M	AF100468
SON	American	N	R	N	F	T	M	V	S	R	K	D	T	M	AF100469
MEX	American	D	R	N	F	T	M	V	I	R	K	D	T	M	L04561
PR159	American	D	R	N	F	T	M	V	S	R	K	D	T	M	M19197
VEN2	American	N	R	N	F	T	M	V	S	R	K	D	T	L	AF100465
16681-PDK53	Asian	D	K	N	Y	S	M	V	S	R	E	V	V	M	M84728
16681	Asian	D	K	N	Y	S	M	V	S	R	E	D	V	M	M84727
ThNH793	Asian	N	K	N	F	S	M	V	S	I	E	D	V	M	AF022434
NEWGUINC	Asian	N	R	N	F	T	M	V	S	R	E	D	V	M	M29095
CHNFJ-10	NC	N	R	N	F	T	M	A	S	R	E	D	V	M	AF276619
MARA4*	American/Asian	N	K	S	F	S	M	V	S	I	E	D	V	M	AF100466
JAM	American/Asian	N	R	S	F	T	V	A	G	R	E	D	V	I	M20558
LARD1701	American/Asian	N	R	S	F	T	V	A	G	R	E	D	V	I	AF360861
LARD1910	American/Asian	N	R	S	F	T	V	A	G	R	E	D	V	I	AF360862
LARD1996	American/Asian	N	R	G	F	T	V	A	G	R	E	D	V	I	AF360863
MARA3	American/Asian	N	R	S	F	T	V	A	G	R	E	D	V	I	AY044442
TON4	American/Asian	N	R	S	F	T	V	A	G	R	E	D	V	I	AY692468
JUCH5	American/Asian	N	R	S	F	T	V	A	G	R	E	D	V	I	AY692466
TUX-19	American/Asian	N	R	S	F	T	V	A	G	R	E	D	V	I	AY692467
SALC-9	American/Asian	N	R	S	F	T	V	A	G	R	K	D	V	I	AY692465
HUAT12	American/Asian	N	R	S	F	T	V	A	G	R	E	D	V	I	AY692471
HUAT2	American/Asian	N	R	S	F	T	V	A	G	R	K	V	V	L	AY692469
HUAT11	American/Asian	N	R	S	F	T	V	A	G	R	K	D	V	I	AY692470

<sup>a</sup>Amino acid sequence was numbered starting from protein C or prM to the end of the last codon sequenced

\*Recombinant strain [39]

amino acid alterations. Table 3 summarizes amino acid changes among Southeast Asian, American and American/Asian Genotype viruses.

We compared amino acid composition (C and prM) of the Southeast Asian genotype viruses with American genotypes (Table 3). The former have greater potential to cause DHF and the latter are associated with DF [18, 28]. The Oaxaca isolates contain Valine at position 145 in the prM gene (prM-31). In contrast, the American genotype has a Threonine residue at this position. Furthermore Oaxaca isolates SALC9, HUAT2 and HUAT11 possessed a Glutamic acid at position 142 in the C-prM coding region (prM-28) (Table 3). In contrast JUCH5, TUX19, TON4, HUAT12 have a Lysine residue at this position, similar to the American genotype.

All American/Asian group viruses with the exception of HUAT2 had an Isoleucine at position 153 (prM-38). In contrast, the Asian and American genotype viruses encode a Methionine at this position.

To see the separation among the American/Asian strains an additional tree was constructed (Fig. 3) and strain MARA4 was selected as outgroup. All Oaxaca isolates occurs in the same branch as in Fig. 2.

### Discussion

The public health importance of DF and DHF/DSS is increasing worldwide and in areas where they were previously unreported. In Mexico, DHF/DSS emerged in 1995–1996. The global evolution of DEN-2 viruses has been studied by a number of investigators [3, 5, 6, 12, 19, 27, 28, 37, 39]. To investigate virus determinants of the emergence of epidemic DF and DHF/DSS in Mexico, we characterized 8 DEN-2 isolates obtained in Oaxaca, Mexico. The isolates appear to be descendants of an American/Asian genotype of DEN-2 virus [37], represented by the isolate Jam83, that was introduced into Latin America during the early 1980s, presumably from Vietnam, Malaysia or Thailand [6, 19, 27]. Closely related American/Asian genotype viruses were also recently detected in the Yucatan [21]. The close phylogenetic relationship between the Oaxaca isolates and Venezuelan viruses (LARD1910, LARD1996, and Mara3) suggests that our viruses may have been introduced into Mexico from Venezuela.

The more severe form of DHF/DSS has been associated with immune enhancement caused by infection by a second DENV serotype [11] and/or by infection with a more virulent DENV genotype or strain [30]. The appearance of DHF/DSS in the New World was associated with the introduction of a South East Asian strain of DEN-2 virus into the Caribbean region [28]. Indigenous Latin American strains of DEN-2 virus were not associated with DHF. These findings promoted studies to identify the viral genetic determinants of DENV virulence. A number of different nucleotide and amino acid substitutions have been associated with DHF or DSS [2, 13, 18, 22]. Previous studies have shown that the prM gene region has a greater genetic variation than E or NS5 gene regions [7]. In particular, Leitmeyer et al. [18] identified nucleotide substitutions that distinguish the American genotype from the Southeast Asian genotype as determinants of disease severity. For example, the prM-28 and prM-31 amino acids may be determinants of DHF. In addition, all American genotypes, which are not associated with DHF, possess K and T residues at position prM-28 and prM-31, respectively. All Asian strains, which have induced DHF have E and V residues in these positions respectively.

All of the strains from Oaxaca, Mexico sequenced possessed the typical Asian V residue at position 31. This amino acid substitution in the prM protein has been reported to be typical of Asian genotype DEN-2 viruses [18]. Furthermore, all American/Asian genotypes and all of the Oaxaca isolates except HUAT2 have an I at position prM-38 that may be typical for this genotype. All of this hints at the Asian ancestry of these Oaxaca strains similar to the Venezuelan isolates studied by Uzcategui et al. [39]. These results also suggests that all of

these genotypes have the potential to cause DHF, independently of the host or environment.

The same evolutionary relationships among DEN-2 viruses that we found by analyzing a portion of the C and prM genes are revealed when other regions of the viral genome were used (e.g., E or NS1) [1–3, 20], or portions of genes (e.g., 198 nucleotides of the E gene) [7]. This is interesting because previous studies have also shown that the prM gene region have a greater genetic variation than E or NS5 gene regions [8].

### Acknowledgments

This research was supported by the United States Public Health Service Grant AI 45430 subgrant G-46321 and FOSIBEJ/20000502010, Mexico.

### References

1. Armstrong PM, Rico-Hesse R (2003) Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 68: 539–544
2. Blok J, Gibbs AJ, McWilliam SM, Vitarana UT (1991) NS1 gene sequences from eight dengue-2 viruses and their evolutionary relationships with other dengue-2 viruses. *Arch Virol* 119: 209–223
3. Blok J, Samuel S, Gibbs AJ, Vitarana UT (1989) Variation of the nucleotide and encoded amino acid sequences of the envelope gene from eight dengue-2 viruses. *Arch Virol* 105: 39–53
4. Cisneros-Solano A, Moreno-Altamirano MMB, Martinez-Soriano U, Jiménez-Rojas F, Diaz-Badillo A, Muñoz ML (2004) Sero-epidemiological and Virological investigation of Dengue infection in Oaxaca, México, during 2000–2001. *Dengue Bull* 28: 28–34
5. Briseno-Garcia B, Gomez-Dantes H, Argott-Ramirez E, Montesano R, Vazquez-Martinez AL, Ibanez-Bernal S, Madrigal-Ayala G, Ruiz-Matus C, Flisser A, Tapia-Conyer R (1996) Potential risk for dengue hemorrhagic fever: the isolation of serotype dengue-3 in Mexico. *Emerg Infect Dis* 2: 133–135
6. Deubel V, Kinney RM, Trent DW (1988) Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus Jamaica genotype: comparative analysis of the full length genome. *Virology* 165: 234–244
7. Deubel V, Nogueira RM, Drouet MT, Zeller H, Reynes JM, Ha DQ (1993) Direct sequencing of genomic cDNA fragments amplified by the polymerase chain reaction for molecular epidemiology of dengue-2. *Arch Virol* 129: 197–210
8. Farfan JA, Olson KE, Black WC 4th, Gubler DJ, Beaty BJ (1997) Rapid characterization of genetic diversity among twelve dengue-2 virus isolates by single-strand conformation polymorphism analysis. *Am J Trop Med Hyg* 57(4): 416–422
9. Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17: 368–376
10. Guzman MG, Deubel V, Pelegrino JL, Rosario D, Marrero M, Sariol C, Kouri G (1995) Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 52: 241–246
11. Gubler DJ, Clark GG (1995) Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1: 55–57

12. Halstead SB (1992) The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. *World Health Stat Q* 45: 292–298
13. Holmes EC (2004) The phylogeography of human viruses. *Mol Ecol* 13: 745–756
14. Kinney RM, Butrapet S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapravati N, Gubler DJ (1997) Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology* 230: 300–308
15. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C (1989) Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ* 67: 375–380
16. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV (1992) Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 545–551
17. Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW (1997) Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol* 78: 2279–2284
18. Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW (1994) Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol* 75: 65–75
19. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, Ramos C, Rico-Hesse R (1999) Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 73: 4738–4747
20. Lewis JA, Chang GJ, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW, Trent DW (1993) Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology* 197: 216–224
21. Lorono-Pino MA, Farfan-Ale JA, Zapata-Peraza AL, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Garcia-Rejon JE, Diaz FJ, Blitvich BJ, Andrade-Narvaez M, Jimenez-Rios E, Blair CD, Olson KE, Black WC, Beaty BJ (2004) Introduction of a new genotype of Dengue-2 virus in Yucatan State, Mexico, 2002. *Am J Trop Med Hyg* 71: 485–492
22. Mangada MN, Igarashi A (1998) Molecular and in vitro analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. *Virology* 244: 458–466
23. Munoz ML, Cisneros A, Cruz J, Das P, Tovar R, Ortega A (1998) Putative dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS Microbiol Lett* 168: 251–258
24. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr HG (1993) Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990–1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect* 111: 163–170
25. Pan American Health Organization (1990) Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiol Bull* 11: 7–9
26. Pan American Health Organization (1992) Dengue and dengue haemorrhagic fever in the Americas: an overview of the problem. *Epidemiol Bull* 13: 9–10
27. Rico-Hesse R (1990) Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 174: 479–493
28. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT (1997) Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230: 244–251
29. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Rosario D, Halstead S, Kouri G, Gould EA, Guzman MG (2005) Dengue virus type 2 in Cuba, 1997: conservation of E gene sequence in isolates obtained at different times during the epidemic. *Arch Virol* 50: 415–425
30. Rosen L (1977) The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 26: 337–343
31. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425

32. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB (1984) Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 120: 653–669
33. Seah CLK, Chow VTK, Tan HC, Chan YC (1995) Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers. *J Virol Methods* 51: 193–200
34. Swofford DL (1996) “PAUP Phylogenetic Analysis Using Parsimony,” Version 4.0. Smithsonian Institution, Washington, D.C.
35. Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of the mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10: 512–526
36. Trent DW, Grant JA, Rosen L, Monath TP (1983) Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology* 128L: 271–284
37. Twiddy SS, Farrar JJ, Vinh CN, Wills B, Gould E, Gritsun T, Lloyd G, Holmes EC (2002) Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology* 298: 63–72
38. Twiddy SS, Holmes EC (2003) The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J Gen Virol* 84: 429–440
39. Uzcategui NY, Camacho D, Comach G, Cuello de Uzcategui R, Holmes EC, Gould EA (2001) Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *J Gen Virol* 82: 2945–2953
40. Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, Halstead SB (1999) Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 354: 1431–1434
41. Worobey M, Rambaut A, Holmes EC (1999) Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7352–7357

Author’s address: Dr. María de Lourdes Muñoz, Department of Genetics and Molecular Biology, CINVESTAV-IPN, Ave. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col San Pedro Zacatenco, México, D.F., C.P. 07360; e-mail: [lmunoz@cinvestav.mx](mailto:lmunoz@cinvestav.mx), [lmunoz@scientist.com](mailto:lmunoz@scientist.com)

# Sero-epidemiological and Virological Investigation of Dengue Infection in Oaxaca, Mexico, during 2000-2001

A. Cisneros-Solano\*, M.M.B. Moreno-Altamirano\*\*#, U. Martínez-Soriano\*\*\*, F. Jimenez-Rojas†, A. Díaz-Badillo‡ and M.L. Muñoz‡

\*Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía

\*\*Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional

\*\*\*Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca

†Lab. Est. Salud Pública de Oaxaca

‡Centro de Investigación y Estudios Avanzados-IPN

## Abstract

A sero-epidemiological-cum-virological investigation was carried out in Oaxaca, Mexico, during 2000-2001 to assess the incidence of dengue infection and the circulating viruses.

A total of 200 serum samples reportedly from dengue patients, based on clinical diagnosis, were collected from Oaxaca's Central Laboratory of Public Health (in the capital city of the state of Oaxaca). The samples were initially collected from ten regional health centres located across Oaxaca. The sample population for the study included both sexes and age groups with clinical signs compatible with dengue infection. All samples were tested for the presence of dengue virus, mainly by MAC-ELISA and RT-PCR.

Ninety-four out of 100 serum samples suspected of dengue were confirmed to be positive. Thirty-two were found positive by MAC-ELISA and 58 were positive by RT-PCR. In addition, the RT-PCR analysis showed that the prevalent serotype in the localities in the study area was DEN-2. However, one isolate of DEN-1 and another of DEN-4 were also detected. The number of infected females was higher than that of infected males and the most affected age group was of people aged under 35 years. The study also highlighted that the sensitivity and specificity of diagnostic tools were crucial for epidemiological studies.

**Keywords:** Serodiagnosis, MAC-ELISA, RT-PCR, DEN-2, Oaxaca, Mexico.

## Introduction

In recent years, dengue fever (DF) / dengue haemorrhagic fever (DHF) has emerged as major health problem in Mexico. In 1960, the *Aedes aegypti* mosquito was eradicated but it reappeared in 1965<sup>[1,2]</sup>. As pointed out

by Gubler<sup>[3]</sup>, factors such as demographic and social changes are responsible for the re emergence of dengue. Mexico is considered an endemic country for dengue and it is reported that major epidemics of DEN-1 occurred on the eastern coast of Mexico during 1979-1980. In 1984-1985,

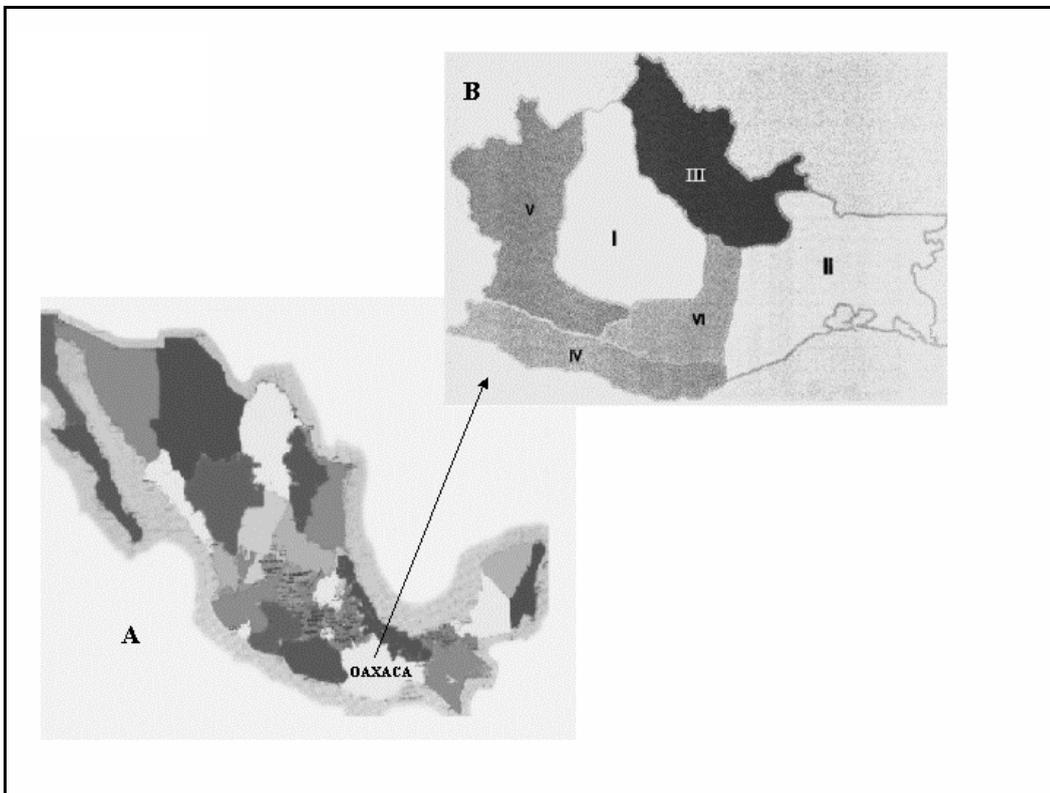
# E-mail: [mmoreno@encb.ipn.mx](mailto:mmoreno@encb.ipn.mx), [morsan846698716@aol.com](mailto:morsan846698716@aol.com); Tel. (5255) 55729-6300 Ext. 62370, Fax (5255) 55396-3503

dengue was diagnosed in 25 of the 32 states of Mexico. By then, DEN-1, DEN-2 and DEN-4 were present in the country, and in 1995, DEN-3 was circulating as well. Several cases of DHF were also confirmed<sup>[4]</sup>. In subsequent years dengue achieved endemicity in the country.

As per the records of the Mexican Health Office<sup>[5]</sup> (Secretaría de Salud, SS), a higher number of dengue cases were recorded in the states of Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz and Oaxaca during 1998-2001.

Oaxaca is located in the subtropical region of Mexico at about 1,600 metres above sea level (Figure 1A). There is high demographic pressure and migration to different urban zones is common, resulting in the establishment of scattered human settlements with deficient public services. All these factors contributed to the propagation of the *Aedes aegypti* mosquito, resulting in dengue outbreaks every year in most of Oaxaca's communities<sup>[6]</sup>.

Figure 1. **Oaxaca, Mexico**  
**(A) United States of México. Oaxaca is located in the west coast**  
**(B) Oaxaca is divided by the health authorities in six jurisdictions (I-VI)**



To assess the dengue situation, epidemiological studies were undertaken to make an estimate of the incidence of dengue virus infection and the circulating serotypes in some selected endemic areas of Oaxaca during 2000-2001.

## Materials and methods

### Population study

The state of Oaxaca is located on the west coast of Mexico. The Mexican Health Office has divided it into six jurisdictions: (I) Central Valleys, (II) Tehuantepec isthmus, (III) Tuxtepec, (IV) The Coast, (V) The Mixteca, and (VI) The Sierra. The presence of dengue virus has been registered in all six jurisdictions (Figure 1B). This study was carried out in ten municipalities distributed in five jurisdictions in the state of Oaxaca. The study population included both sexes and all age groups<sup>[7]</sup>. Two population groups were included in this study: one group consisting of 200 serum specimens from patients manifesting signs and symptoms of dengue infection, and another group of 50 serum samples from healthy controls, all from the same jurisdictions.

### Sample collection and diagnosis of dengue

Human sera were obtained from 200 patients presenting clinical manifestations of dengue and tested for anti-dengue IgM antibodies. Serum samples were collected by venipuncture, using Vacutainer tubes (Becton-Dickinson). The clinical samples corresponded with dengue cases reported during 2000-2001. Dengue-infected samples were obtained during the first five

days of the onset of fever and were processed for anti-dengue IgM detection using IgM capture ELISA (MAC-ELISA) as described by Vorndam et al.<sup>[8]</sup> Samples from healthy donors were obtained at about the same time.

As a routine practice and with the idea of recording epidemic data, the suspected dengue samples already clinically diagnosed in community health centres were sent to the Central Laboratories in the city of Oaxaca (Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Oaxaca, Secretaría de Salud). In this laboratory, the presence of dengue virus was confirmed by MAC-ELISA and RT-PCR.

### Dengue virus isolates

*Aedes albopictus* C6/36 cells were grown in 48-well tissue culture plates as described by Igarashi<sup>[9]</sup>. Briefly,  $2 \times 10^5$  cells were plated in 1 ml of minimum essential medium (Gibco-BRL, Grand Island, N.Y.) supplemented with 7% fetal bovine serum (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) and 1% glutamine, vitamins and nonessential amino acids. After 24 hours of culture, 100  $\mu$ l of every sera diluted 1:10 was added to the corresponding well. The mixture was then gently shaken and incubated for 60 minutes at room temperature. Cells were then washed with serum-free medium and cultured at 28 °C with complete medium for at least 10 days. Cells were harvested for RT-PCR diagnosis.

### RNA extraction

Total RNA was extracted either from 100  $\mu$ l of serum or from cultured cells by using Trizol LS (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD.) according to the manufacturers'

recommendations. Ethanol-precipitated RNA was recovered by centrifugation and air-dried. The RNA pellet was re-suspended in 50 µl of Diethyl-pyrocabonate (Sigma)-treated water (DEPC water) and used as a template for RT-PCR.

## RT-PCR

Synthetic oligonucleotide primer pairs were designed based on published sequence data for each of the four serotypes of dengue<sup>[10,11]</sup>. Four fragments of an expected size of 482 bp (DEN-1), 392 bp (DEN-4), 290 pb (DEN-3) and 119 bp (DEN-2) were obtained by using the SuperScrip™ One Step RT-PCR kit in conjunction with Platinum<sup>R</sup> Taq polymerase (Invitrogen, Life Technologies). A mixture of 5 µl of RNA, 25 µM of sense and anti-sense PCR primers, and DEPC water to a total volume of 50 µl was incubated at 85 °C for 5 minutes and then chilled on ice. The tubes-reaction mixture containing 2X PCR buffer containing 0.4 mM of each dNTP, 2.4 mM MgSO<sub>4</sub> and Super Scrip™ RT/platinum<sup>R</sup> Taq Mix, as recommended by the manufacturer (Invitrogen TM Life Technologies), was added to the RNA and primers-containing tube. The reverse transcription reaction was performed at 50 °C for 30 minutes. Thermocycling began with a hot start at 94 °C for 2 minutes followed by 40 cycles of annealing at 55 °C for 30 seconds, and extension at 72 °C for one minute and denaturing at 94 °C for 15 seconds.

The PCR conditions for serotype assessment were as follows: 40 cycles of denaturing at 94 °C for 30 seconds, annealing at 55 °C for 1 minute, and extension at 72 °C for 1 minute and, a final extension at 72 °C for 7 minutes. The

reaction mixtures were electrophoresed and visualised under UV light after ethidium bromide staining of the gels.

## Results

### Diagnosis of the samples by MAC-ELISA

Two hundred serum samples initially reported as suspected positive for dengue, based on clinical reports from the hospital where patients were hospitalised, were submitted for diagnosis based on anti-dengue IgM antibodies detection by MAC-ELISA. From these, only 34 samples were positive for IgM antibodies<sup>ψ</sup>. As expected, the 50 negative-control samples resulted negative for anti-dengue IgM antibodies (Table 1).

### Diagnosis by RT-PCR

Once the serum samples were tested for anti-dengue IgM antibodies, the results were confirmed by RT-PCR. In this case, only 25 samples from healthy donors were tested. By this method 58 samples proved to be positive for dengue, i.e. 24 more than by MAC-ELISA. Interestingly, all samples positive for MAC-ELISA were also positive by RT-PCR. Those samples showing positivity for DEN by RT-PCR were further tested for the four serotypes (DEN-1, -2, -3 and -4). It was found that the main circulating serotype in Oaxaca during 2000-2001 was DEN-2. Two other serotypes (DEN-1 and DEN-4) were also found (only one case each) (Table 1).

---

<sup>ψ</sup> Out of 200 samples, originally sent, only 100 samples were found in good condition for evaluation by MAC-ELISA or RT-PCR. Other samples deteriorated under transportation/storage conditions.

**Table 1.** Positivity for dengue by MAC-ELISA and RT-PCR

From one hundred samples tested, from patients with clinical diagnosis of dengue, 36% proved positive by MAC-ELISA and 61% by RT-PCR. DEN-2 was the prevailing circulating serotype

Date of collection	Jurisdiction	Locality	Number of cases	MAC-ELISA	RT-PCR	Serotype	Serotype
Nov 2000	II	Salina Cruz	18	13+/5-	9+/9-	DEN-2	DEN-2
Nov 2000	III	Tuxtepec	9	2+/7-	5+/4-	DEN-2	DEN-2
Nov 2000	II	Tehuantepec	10	4+/6-	5+/5-	DEN-2	DEN-2
Jul 2000	III	Temascal	8	3+/5-	5+/3-	DEN-2	DEN-2
Nov 2000	II	Juchitan	3	2+/1-	2+/1-	DEN-2	DEN-2
<b>Total cases</b>				<b>24+/24-</b>	<b>26+/22-</b>		
May-Jun 2001	IV	Huatulco	21	6+/15-	12+/9-	DEN-2	DEN-2
Jun-Nov 2001	I	Oaxaca	7	2+/5-	7+/0-	DEN-2	DEN-2
Apr 2001	II	Juchitan	2	0+/2-	2+/0-	DEN-2	DEN-2
May 2001	II	Salina Cruz	1	0+/1-	1+/0-	DEN-2	DEN-2
Feb 2001	III	Tuxtepec	7	2+/5-	2+/5-	DEN-2	DEN-2
Feb 2001	V	Tonalá	2	0+/2-	2+/0-	DEN-2	DEN-2
Feb 2001	V	Huajuapán	6	0+/6-	6+/0-	DEN-2	DEN-2
<b>Total cases</b>				<b>10+/36-</b>	<b>32+/14-</b>		

**Table 2.** Distribution of dengue cases by age and sex

Age (in years)	Male	Female
1	0	1
2-4	0	2
5-9	7	10
10-14	5	6
15-20	2	3
21-30	0	5
>30	6	6
Total	20 (38%)	33 (62%)

### Prevalence of infection by age and sex

An analysis by age and sex revealed a higher prevalence (61%) of infection in females than in males (39%) and that the most affected group of people was the under-35-year-olds (Table 2).

### Discussion

The *Aedes aegypti* mosquito's adaptability to changing environmental conditions has contributed significantly to the increase in dengue epidemics in the world. Mexico is considered an endemic country where the

four serotypes of the dengue virus are in circulation. This study provides some insight into the dengue epidemic situation in Oaxaca state, Mexico, in an attempt to contribute to the prevention and control of outbreaks of DF/DHF.

From the 200 serum samples collected from suspected dengue patients initially considered for the study, only 100 could be used. The remaining 100 samples were presumably subjected to non-appropriate storage conditions. From the 100 suspected samples tested, nearly 100% proved to be positive for dengue (36% by MAC-ELISA and 61% by RT-PCR). However, the data reported here could be an underestimation considering the several factors that could influence the laboratory determination outcome, such as sample handling and the diagnosis systems performed at local hospitals. In some localities of Oaxaca, the diagnosis for dengue was being simultaneously carried out with the diagnosis for rubella and toxoplasma in a monoclonal antibodies-based multiplex assay. In rural communities, however, only the presence of anti-dengue IgM antibodies was tested.

In this regard, it is possible that some patients presenting an early secondary infection in the absence of strong clinical manifestations had undetectable levels of anti-dengue IgM antibodies, since IgG is the prevalent Ig isotype at this stage of the infection. For these cases, it would be necessary to consider some other diagnosis techniques such as virus isolation or RT-PCR. Unfortunately, these are difficult to carry out in rural hospitals due to high costs and lack of suitably trained personnel.

Additional effort is needed to ensure appropriate sample collection, handling

and storage in order to send them to the reference laboratory for adequate diagnosis. It is worth noting that in several Mexican states, health authorities are working on vector control as well as on facilities for sample collections to be sent to the Instituto de Referencia Epidemiológica (InDRE) in Mexico City for a proper diagnosis. It is still, however, a long way for good quality medical care to reach most Mexicans.

This report shows that by MAC-ELISA, 36% of the tested samples were found positive for dengue, whereas by RT-PCR up to 64% of the samples proved to be positive. Although the sensitivity and specificity reported for MAC-ELISA is reported to be good enough for a diagnosis system, it is likely that as a result of inadequate handling and storage conditions, some samples reported as negative could in fact be positive for dengue when tested by RT-PCR. No false positive results were found. This raises the question as to how many laboratory assays must be carried out on a suspected dengue sample before reporting it as negative.

The use of RT-PCR makes it possible to identify the dengue serotype involved; in this regard this study shows that in Oaxaca, Mexico, the prevalent serotype of dengue virus was DEN-2, although isolated cases of DEN-1 and DEN-4 infections were also found. Some other local reports had also mentioned the presence of DEN-3 and several cases of DHF.

## **Acknowledgements**

We thank Dr F. Javier Sánchez-García for critically reviewing the manuscript. MMBMA is an EDI/IPN fellow.

## **References**

- [1] Novo S. Breve historia y antología de la fiebre amarilla. *Salud Pública de México*, 1995, 37: S99-S102.
- [2] Gómez H. Monografía sobre la epidemiología del dengue en México. Secretaría de Salud, 1992, Vol. 43.
- [3] Gubler JD. Epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21<sup>st</sup> century. *Trends in Microbiology*, 2002, 10: 100-103.
- [4] Briseño-García B, Gómez-Dantes H, Argott-Ramírez E, Montesano R, Vázquez-Martínez AL, Ibanez-Bernal S, Madrigal-Ayala G, Ruiz-Matus C, Flisser A and Tapia-Conyer R. Potential risk for dengue haemorrhagic fever: the isolation of serotype dengue-3 in Mexico. *Emerging Infectious Disease*, 1996, 2(2): 133-135.
- [5] Anonymous. Gaceta informativa de la Secretaría de Salud, SSA-Oaxaca, 1999.
- [6] Cisneros AS, Martínez US, Cruz GM, Tovar RG, Moreno MG, Díaz-Badillo A and Muñoz ML. Dengue fever in the state of Oaxaca, Mexico. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 50<sup>th</sup> Meeting, 2001, Atlanta, Georgia, USA.
- [7] Martínez-Soriano U. Tipificación Molecular del virus del dengue en el estado de Oaxaca. B.Sc. Thesis, 2002, 19-58.
- [8] Vorndam V and Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Gubler DJ and Kuno G (Eds.), *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International, New York, NY, 1997, 313-333.
- [9] Igarashi A. Mosquito cell cultures and the study of arthropod-borne togaviruses. *Advances in Virus Research*, 1985, 30: 21-39.
- [10] Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ and Vorndam V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, 30: 545-551.
- [11] Harris E. A low cost approach to PCR. Ed. Oxford University Press, USA, 1998, 96-105.

BUSCAR



AUTORIDADES

SOCIEDADES  
CIENTÍFICAS ALQUILADAS

WEBMASTER



## Uso de microarreglos para el diagnóstico de la enfermedad del dengue

María de Lourdes Muñoz y Álvaro Díaz Badillo, Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN.

El dengue es una enfermedad febril que inicia súbitamente, producida por un virus y es endémica en las zonas tropicales y sub-tropicales de todo el mundo. Los virus que ocasionan esta enfermedad son partículas pequeñas de entre 40 y 50 nm de diámetro y presentan una envoltura lipídica, que se origina en el retículo endoplásmico de las células huésped. Esta enfermedad es producida por cualquiera de los cuatro serotipos del virus dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 ó DEN-4) y transmitida a los humanos por la picadura de mosquitos hembras infectadas, principalmente de la especie *Aedes aegypti* y con menor frecuencia por *A. albopictus*. Algo notable de la enfermedad es la similitud con otras enfermedades hemorrágicas ocasionadas por los virus de otras familias, aunque las patologías, en estadios tardíos, pueden diferir diametralmente unas de las otras. Los brotes usualmente ocurren entre los meses de junio a noviembre en el hemisferio boreal y de diciembre a mayo en el hemisferio austral, cuando las condiciones ambientales son ideales para la proliferación del mosquito vector.



El diagnóstico de las entidades virales es uno de los mayores retos a los que se enfrenta la Biología Molecular. Durante las últimas décadas, el desarrollo progresivo de nuevas y mejores herramientas para evidenciar el tipo de virus causante de las diferentes enfermedades, hace posible que estas entidades se puedan detectar en laboratorios no especializados. Las pruebas simples, rápidas y de bajo costo para la detección de antígenos han reemplazado a las técnicas tradicionales, largas y costosas y esto ha producido una mayor agilidad en la definición del diagnóstico. Por otra parte, el determinar la especificidad de los anticuerpos permite documentar la seroprevalencia de una infección en individuos y poblaciones. Además, las pruebas moleculares hacen posible detectar a los agentes virales directamente y diagnosticar la infección de modo categórico permitiendo estudiar su progresión y seguimiento terapéutico.

Los microarreglos de DNA son una nueva herramienta de la biología molecular y las ciencias genómicas y consisten en una matriz bidimensional de material genético, que permite realizar de manera simultánea y automatizada, miles de ensayos encaminados a conocer en profundidad la estructura y funcionamiento de un conjunto de genes, en situaciones normales o patológicas. Es evidente la necesidad de realizar estudios relacionados con el diagnóstico del dengue, con el desarrollo de una vacuna y para encontrar estrategias adecuadas para su control. En el laboratorio, estamos trabajando con microarreglos para, por un lado, desarrollar un método de diagnóstico que permita definir no sólo el serotipo viral, sino también el ge-notipo dentro de cada serotipo, ya que este último dato indicaría el potencial del virus para producir dengue hemorrágico y se tendría la

posibilidad de mantener al paciente en observación y con un tratamiento más adecuado. Por otro lado, con la elucidación de los marcadores de genotipo dentro del genoma del virus, mediante los microarreglos, tendremos, a largo plazo, la posibilidad, de desarrollar una vacuna. Asimismo, con los microarreglos, estamos estudiando los receptores para el virus en los mosquitos y determinando los marcadores de competencia vectorial (capacidad de los mosquitos para transmitir el dengue).

Para fabricar los microarreglos, utilizamos un robot de impresión por contacto, GeneTac G3. El robot libera con gran precisión, minúsculas gotitas de cDNA –cada una con espesor de un cabello humano– en un portaobjeto de microscopio, pudiendo colocar hasta 9260 muestras (gotitas) por laminilla. Las muestras de cDNA se adhieren a los portaobjetos, que están cubiertos con un reactivo de naturaleza aldehídica.

El sistema de producción y análisis de microarreglos de la Red interinstitucional de microarreglos (RIIMA-CINVESTAV-IPN) funciona satisfactoriamente.

Con base en el microarreglo diseñado, se han determinado diferencias en los perfiles de detección de sueros de pacientes infectados con dengue. Nuestro trabajo está enfocado al desarrollo de un microarreglo que contenga un número mayor de marcadores para el análisis de líneas celulares y muestras derivadas de pacientes, que permita el diagnóstico oportuno de esta enfermedad.[Z](#)



## [ÍNDICE DE LA GACETA](#)

11/2006