

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**“Desarrollo de un sistema reportero para la detección
de la infección por DENV y ZIKV”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

MARÍA KARINA MANUEL ARIAS

DIRECTORA

DRA. ROSA MARTHA EUGENIA YOCUPICIO MONROY

POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS

Ciudad de México, septiembre de 2019.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR: Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy

Profesor investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

LECTORES

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

Profesor investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Lilia López Cánovas

Profesor investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Sofía Alcaraz Estrada

Jefa de División de Medicina Genómica

Centro Médico Nacional, 20 de noviembre ISSSTE

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el apoyo económico otorgado mediante la beca de impresión y empastado de tesis, así como las demás becas otorgadas durante mi estancia.

A la Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy por aceptarme en su equipo de trabajo, por el apoyo académico como personal.

A las Dras. Claudia Selene Zárate Guerra, Lilia López Cánovas por tomarse el tiempo de leer mi tesis.

A la Dra. Sofía Alcaraz Estrada por abrirme las puertas de su laboratorio.

A todos mis profesores del posgrado en Ciencias Genómicas por sus enseñanzas a lo largo de este proceso.

A la Dra. Olga Nohemí Hernández de la Cruz, por ser comprensiva y apoyarme en todo momento con el desarrollo de esta tesis.

Al maestro Cristhían Sánchez Cruz, por el apoyo brindado tanto académico como personal.

DEDICATORIA

A mis padres

Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer una vida de lucha, sacrificio y esfuerzos constantes, solo deseo que entiendan que el logro mío es logro de ustedes, que mi esfuerzo es inspirado en ustedes y que mis únicos ideales son ustedes.

Le doy gracias a Dios y a la vida por compartir esta etapa de mi vida con mi cómplice, amiga y confidente, aquella mujer que me ha enseñado a nunca rendirme y sobre todo a luchar día a día... Te amo mamá.

Te agradezco por siempre apoyarme y darme tus sabios consejos en todo momento... Te amo papá.

A mi familia, Hermanos, Tíos, Padrinos, Sergio, Tía Juana, Maribel, Eugenia y Lic. Monse y sobre todo a mis mejores amigos Vanessa, Héctor y Alicia por apoyarme cuando más lo he necesitado, por brindarme su cariño y confianza.

A mis amigos de laboratorio, Gabriel, Selene, Carlitos, Fani, Martha, Dani, Sofía y Víctor por su apoyo y comprensión, fue un placer conocerlos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ABREVIATURAS	10
RESUMEN.....	14
I. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Los virus.....	15
1.2 Familia Flaviviridae.....	15
1.2.1 Estructura y organización genómica.....	16
1.2.2 Ciclo replicativo viral de los flavivirus	18
1.2.3 Poliproteína viral de los flavivirus	20
1.3 El vector.....	24
1.3.1 Morfología y distribución geográfica del mosquito <i>Ae. aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i>	25
1.3.2 Ciclo biológico de <i>Ae. aegypti</i>	27
1.4 Infección por DENV	29
1.5 Infección por ZIKV	31
1.6 Métodos serológicos y moleculares para el diagnóstico y detección de la infección por DENV y ZIKV.....	32
II. ANTECEDENTES PARTICULARES.....	34
III. JUSTIFICACIÓN	40
VI. HIPÓTESIS.....	41
V. OBJETIVOS	41
5.1 Objetivo general.....	41
5.2 Objetivos particulares	41
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	42
.....	42
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	43

7.1 Células y virus.....	43
7.2 Extracción de ARN.....	43
7.3 Amplificación y purificación del genoma de DENV y ZIKV.....	44
7.4 Clonación de la región NS4B-NS5 de DENV y ZIKV en el vector TOPO.....	46
7.5 Transformación de células DH5 α con el vector pCMV-GLuc2.....	48
7.6 Subclonación de la región NS4B-NS5 de DENV y ZIKV en el vector de expresión pCMV-GLuc2.....	48
7.7 Secuenciación tipo Sanger de las construcciones virales.....	49
7.7.1 Análisis de las secuencias obtenidas por electroforesis capilar.....	50
7.8 Transfección de las construcciones pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc en células Vero51	
7.8.1 Transfección transitoria.....	51
7.8.2 Transfección estable.....	51
7.8.3 Ensayo de selección de clones de células establemente transfectadas mediante dilución limitante.....	52
7.8.4 Infección de las células transfectadas.....	53
7.8.5 Detección de la actividad de la proteína luciferasa de <i>Gaussia</i>	53
7.8.6 Análisis estadísticos.....	53
VIII. RESULTADOS.....	54
8.1 Construcción y caracterización DENV y ZIKV en un plásmido reportero.....	54
8.2 Clonación del amplicón NS4B-NS5 de DENV y ZIKV en el vector TOPO.....	55
8.3 Subclonación de la región NS4B-NS5 en el Plásmido Reportero pCMV-GLuc2.....	57
8.4 Determinación de la infección por DENV y ZIKV usando pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc.....	64
IX DISCUSIÓN.....	71
X. CONCLUSIONES.....	75
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	76

XII ANEXO	84
12.1 Diseño de iniciadores	84
12.2 Preparación de soluciones	85
.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura y organización genómica de los flavivirus	17
Figura 2: Ciclo replicativo viral.....	19
Figura 3: Estructura cristalina de la proteasa viral NS2B-NS3.....	23
Figura 4. El vector	26
Figura 5: Ciclo biológico de <i>Aedes Aegyti</i>	28
Figura 6: Desarrollo de un sistema reportero NoroGluc.....	36
Figura 7: Construcción de plásmidos del sistema DENPADS.....	37
Figura 8: Sitios de corte de la proteasa viral NS4B3 en la poliproteína de los flavivirus ..	38
Figura 9: Caracterización de la eficiencia del sistema DENPADS en la detección de la infección de los flavivirus	39
Figura 10: Mapa de restricción del vector pCR4 TOPO y pCMV-Gluc2	47
Figura 11: Amplificación de la región de NS4B-NS5 de DENV y ZIKV mediante RT-PCR...	54
Figura 12: Extracción y purificación del amplicón NS4B-NS5 de DENV y ZIKV.....	55
Figura 13: Extracción de ADN plasmídico de DENV y ZIKV del vector TOPO	56
Figura 14: Amplificación de la región NS4B-NS5 de DENV y ZIKV de las clonas candidatas	56
Figura 15: Digestiones de las construcciones TOPO-NS4B-NS5-DENV y TOPO-NS4B-NS5-ZIKV y el vector pCMV-GLuc2	58
Figura 16. Esquema de la posición en la que se insertó la secuencia de NS4B-NS5 en el plásmido pCMV-GLuc2	59
Figura 17: Análisis de restricción de la construcción pDENV4B5-GLuc con las enzimas <i>StuI</i> y <i>BamHI</i>	60
Figura 18: Análisis de la secuencia obtenida del vector pDENV4B5-GLuc.....	62
Figura 19: Análisis de la secuencia obtenida del vector pZIKV4B5-GLuc.....	63

Figura 20: Detección de la infección por DENV y ZIKV en las células transfectadas transitoriamente.....	65
Figura 21: Amplificación de NS4B-NS5 mediante RT-PCR en células establemente transfectadas	67
Figura 22: Detección de la infección por ZIKV en células establemente transfectadas....	68
Figura 23: Detección de la infección por DENV en células establemente transfectadas .	69
Figura 24: Producto de amplificación de la región del genoma correspondiente a la proteína E y NS4B-NS5 en la línea celular establemente transfectada e infectada con DENV y ZIKV	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Fases de la infección por DENV	30
Tabla 2: Técnicas para la detección de la infección por DENV	33
Tabla 3. Iniciadores utilizados para RT-PCR.....	45
Tabla 2A: Preparación de antibiótico	85
Tabla 3A: Preparación de medio de cultivo líquido.....	85
Tabla 4A: Preparación de medio de cultivo sólido	85
Tabla 5A: Preparación de medio de cultivo celular	86
Tabla 6A: Preparación de buffer de corrida	86
Tabla 7A: Preparación de buffer de fosfato salina	86

ABREVIATURAS

- % Porcentaje
- CO₂ Dióxido de carbono
- MgSO₄ Sulfato de Magnesio
- +ssRNA Ácido ribonucleico monocatenario de polaridad positiva
- °C Grados centígrados
- µg Microgramos
- µl Microlitro
- 3'UTR Región 3' no traducida
- 5'CAP Caperuza 5'
- 5'CS Secuencia cíclica
- 5'UTR Región 5' no traducida
- ADN Ácido desoxirribonucleico
- ARN Ácido ribonucleico
- Asp75 Aspartato 75
- AUG Codón que codifica metionina
- C Cápside

- Cap 1 Caperuza 1
- DENV Virus Dengue
- DENV-1 Virus Dengue serotipo 1
- DENV-2 Virus Dengue serotipo 2
- DENV-3 Virus Dengue serotipo 3
- DENV-4 Virus Dengue serotipo 4
- E Envoltura
- ELISA Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- ER Retículo endoplásmico
- FDA Administración de Drogas y Alimentos
- FHD Fiebre hemorrágica por dengue
- GLuc Luciferasa de *Gaussia*
- His51 Histidina 51
- ICTV Comité Internacional de Taxonomía de Virus
- IgM Inmunoglobulina M
- IRES Sitio de entrada de ribosoma interno
- JEV Virus de la encefalitis japonesa
- kb Kilobase

- kDa Kilodaltones
- KUN Encefalitis Kunjin
- mg Miligramos
- mM Milimolar
- NaN3 azida sódica
- ng Nanogramos
- nm Nanómetros
- NS1 Proteína no estructural 1
- NS2A Proteína no estructural 2A
- NS2B Proteína no estructural 2B
- NS2B3 Proteasa no estructural 3
- NS3 Proteína no estructural 3
- NS4A Proteína no estructural 4A
- NS4B Proteína no estructural 4B
- NS5 Proteína no estructural 5
- NTPasa Nucleósido trifosfatasa
- OMS Organización Mundial de la Salud
- OPS Organización Panamericana de la Salud

- ORF Marco de lectura abierto
- PCR Reacción en cadena de la polimerasa
- pPCR Producto de reacción en cadena de la polimerasa
- PrM Proteína precursora de membrana
- RNAsas Ribonucleasas
- rpm Revoluciones por minuto
- RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
- Ser135 Serina 135
- SLE Encefalitis de St. Louis
- STAT1 Transductor de señal y activador de la transcripción 1
- TBE Encefalitis transmitida por garrapatas
- URL Unidades relativas de luz
- V Volts
- WNV Virus del oeste nilo
- YFV Virus de la fiebre amarilla
- ZIKV Virus Zika

RESUMEN

Los *Flavivirus* son virus de ARN de cadena sencilla con polaridad positiva, generalmente son transmitidos por vectores artrópodos, siendo los mosquitos hembras del género *Aedes*, su principal vector. Estos arbovirus se encuentran en todo el mundo y provocan un número significativo de casos de enfermedades humanas, que van desde infecciones leves o subclínicas hasta fiebre hemorrágica letal o encefalitis.

El virus Dengue (DENV) y el virus Zika (ZIKV), son considerados los arbovirus patógenos emergentes más importantes y representan una amenaza de salud mundial. A pesar de que DENV y ZIKV son transmitidos por el mismo vector, su naturaleza patógena es poco conocida y las infecciones que causan, no tienen tratamientos específicos o vacunas efectivas.

En este trabajo, se empleó la proteasa viral NS2B3, generada durante el ciclo replicativo de DENV y ZIKV, como una herramienta para la detección temprana de la infección, por medio de un sistema reportero denominado pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc. La presencia del sitio de corte en el plásmido reportero en células transfectadas e infectadas, permite el procesamiento proteolítico mediado por NS2B3 en el sitio de corte entre NS4B y NS5, y de esta forma se detectará la infección viral, mediante la expresión de la proteína GLuc.

Nuestros datos confirman, que nuestro sistema reportero pDENV4B5-GLuc/pZIKV4B5-GLuc y la proteasa viral NS2S3 proveen una herramienta prometedora para la detección de la infección por DENV y ZIKV mediante cambios en la expresión de GLuc.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Los virus

A finales del siglo XIX se había avanzado en el conocimiento de muchas enfermedades infecciosas, sin embargo, quedaban muchas otras en el hombre, animales y plantas en las cuales no se identificaba el patógeno causante. No fue hasta el siglo XX que se descubrieron los virus, los cuales se pueden transmitir por diferentes vías de acuerdo al tipo y forma de infección. Los virus son entidades estrictamente celulares y potencialmente patogénicas con una fase infecciosa; contienen un solo tipo de ácido nucleico (ADN o ARN), son incapaces de crecer y reproducirse por fisión binaria, carecen de enzimas para producir energía y el tamaño de la mayoría de ellos se encuentra alrededor de los 20-300 nm (Cann, 2005).

1.2 Familia Flaviviridae

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), los virus de la familia *Flaviviridae* (del latín *flavus* amarillo) se componen de cuatro géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* y *Pegivirus* (Davidson, 2009; Stapleton et al., 2011). Aunque los genomas de los diferentes géneros comparten un orden de genes similares y algunos motivos proteicos no estructurales conservados, divergen en los elementos reguladores de ARN que actúan en cis, situados en los extremos 3' UTR y 5' UTR. Por ejemplo, la traducción de la poliproteína de los genomas de pestivirus, hepacivirus y pegivirus se inicia desde el AUG, situado en el extremo 3' UTR del sitio de entrada del ribosoma interno (IRES), mientras que la traducción de la poliproteína de los flavivirus depende de Cap 1, situado en el extremo 5' UTR (Brinton y Basu, 2015).

1.2.1 Estructura y organización genómica

Los virus de género flavivirus son un grupo de arbovirus de importancia médica en todo el mundo (Huang et al., 2014) que comparten una estructura común. El virión maduro es una partícula con un diámetro aproximado de 50 nm con envoltura esférica. La capa más externa del virión está conformada por una capa de glicoproteínas con unidades repetitivas de 180 copias de la proteína de envoltura E en combinación con la proteína de membrana M. La superficie revela una simetría icosaédrica (Barrows et al., 2018).

Los flavivirus tienen un genoma de ARN de sentido positivo monocatenario (+ssRNA), con un solo marco de lectura abierto (ORF) de ~11 Kb que codifica una sola poliproteína de aproximadamente 3,430 aminoácidos (Brecher et al., 2013) flanqueada por dos regiones no codificantes (5' UTR y 3' UTR) (Fig. 1A). La 5' UTR contiene una estructura de tallo-burbuja (SLA), la cual sirve como promotor para la replicación viral, probablemente a través del reclutamiento directo de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (Barrows et al., 2018). La 5' UTR es de aproximadamente 100 nucleótidos poco conservados entre los flavivirus, contiene una estructura de Cap 1; la cual tiene como función reclutar factores de inicio de la traducción, además de proteger a los ARNm virales de la degradación por la exonucleasa Xrn1, una secuencia conservada denominada 5'CS (del inglés *cyclization sequence*); que permite la circularización del genoma viral, la cual es obligatoria para la replicación y está mediada por la interacción directa de las secuencias de ARN y las estructuras presentes en las regiones terminales 5' y 3' (Fields et al., 2007; Villordo et al., 2009). Por otro lado, la 3' UTR tiene una longitud entre 340 a 700 nucleótidos, y termina con un dinucleótido CU_{OH}, el cual tiene un papel análogo a la cola de poli A (Brinton y Basu, 2015; Göertz et al., 2017).

El genoma codifica para una poliproteína de 350 kDa, la cual es procesada proteolíticamente mediante proteasas celulares de tipo furina y proteasas virales NS3, para generar tres proteínas estructurales (C, prM, E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Fig. 1) (Mukhopadhyay et al., 2005; Bollati et al., 2010, Oliveira et al., 2017).

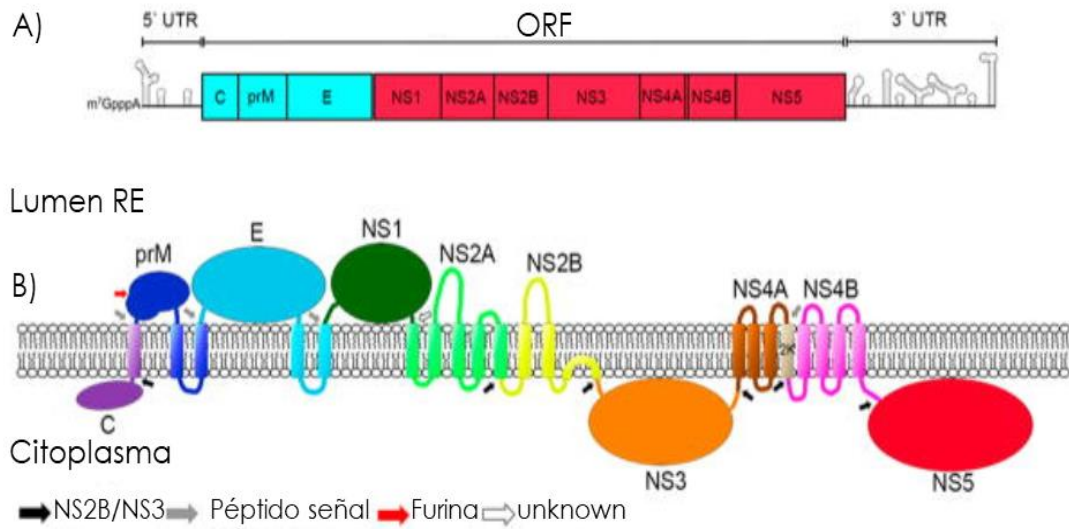


Figura 1: Estructura y organización genómica de los flavivirus

(A) El genoma de los flavivirus es un +ssARN de ~11 kb, el cual codifica una poliproteína viral que es procesada por proteasas celulares y virales para generar tres proteínas estructurales (azules) y siete no estructurales (rojas) que se traducen de un único ORF. (B) Topología de la poliproteína viral y dominios transmembrana. La poliproteína viral está integrada en la membrana del retículo endoplásmico, la cual es cortada en múltiples sitios, en el lado citoplásmico se realizan mediante la proteasa viral NS2B3 y en el lado de la luz del retículo endoplásmico por el complejo peptidasa señal. Las proteínas virales prM, E y NS1 se encuentran en el lado luminal y C, NS3 y NS5 en el lado citoplásmico. Las proteínas NS2A, NS2B, NS4A y NS4B tienen varios dominios transmembrana que se extienden a través del retículo endoplásmico (ER). El péptido 2K se inserta en la membrana ER (Modificada de Barrows et al., 2018).

1.2.2 Ciclo replicativo viral de los flavivirus

Los flavivirus interaccionan con la célula huésped a través de la unión específica a diferentes receptores de superficie celular. Los receptores de flavivirus mejor caracterizados hasta la fecha incluyen las integrinas $\alpha_v \beta_3$, receptores de lectina de tipo C (CLR), receptores de fosfatidilserina, receptores de manosa, y los glicosaminoglicanos, como el heparán sulfato que aumentan la unión del virus mediante interacciones con aminoácidos con carga negativa en la superficie de la proteína de envoltura (Dowd y Pierson, 2018).

Los viriones son internalizados por los receptores mediante endocitosis normalmente con la participación de vesículas revestidas de clatrina, posteriormente el ambiente ácido del endosoma activa la trimerización irreversible de la proteína E, lo que resulta en la fusión de las membranas celulares y virales para que se lleve a cabo la liberación de la nucleocápside al citoplasma celular, a la vez que la proteína de la cápside y el ARN se disocian. Enseguida el genoma viral que es un ARN de polaridad positiva se traduce a una poliproteína viral que está integrada en la membrana del retículo endoplásmico, la cual es cortada de forma conjunta y posterior a la traducción en múltiples sitios por proteasas virales y del huésped para generar tres proteínas estructurales (C, prM, E), y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Fields, 2007; Barrows et al., 2018). Las escisiones en el lado citoplásmico se realizan mediante la proteasa viral NS2B3, y las escisiones en el lado de la luz del retículo endoplásmico se realizan mediante el péptido señal. Las proteínas virales prM, E y NS1 se encuentran en el lado luminal y C, NS3 y NS5 en el lado citoplásmico. Las proteínas NS2A, NS2B, NS4A y NS4B tienen varios dominios transmembranales que se extienden a través del retículo endoplásmico (ER) y, por lo tanto, una gran parte de estas proteínas están en cada lado de membrana del ER. En el caso de ZIKV, el péptido 2K se inserta en la membrana ER (Fig. 2B) (Barrows et al., 2018).

Una vez que se han producido las proteínas virales, el ARN del virus se replica a una cadena intermediaria de polaridad negativa que sirve como molde para la producción de grandes cantidades de progenie de polaridad positiva. El proceso de replicación del genoma ocurre en las membranas intracelulares, mientras que en el ensamblaje del virus ocurren en la superficie del retículo endoplásmico, cuando las proteínas estructurales y el ARN recién sintetizado

geman en el lumen del mismo. Como se muestra en la figura 2, inicialmente las partículas inmaduras se forman en el lumen del retículo endoplásmico, dichas partículas contienen a las proteínas E, prM, C, y al genoma, los cuales constituyen al virus no infeccioso. Posteriormente, el corte de prM a M se lleva a cabo en la red trans-golgi por la serina proteasa furina, lo que conduce a la formación de partículas virales maduras infecciosas. Cabe mencionar que los virus deben sufrir posteriormente modificaciones postraduccionales para finalmente ser liberados de la célula huésped por exocitosis al medio extracelular (Yun y Lee, 2017; Barrows et al., 2018).

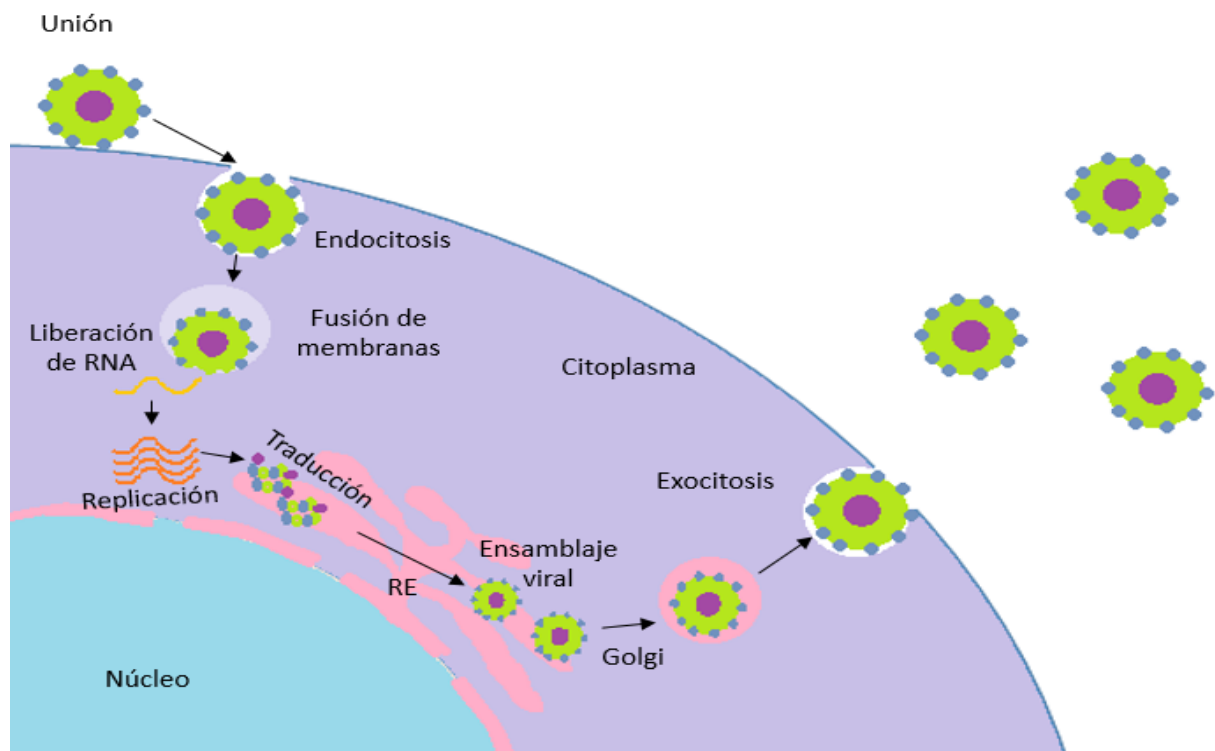


Figura 2: Ciclo replicativo viral

El virus, contacta con la célula hospedera a través de la unión específica a diferentes receptores de superficie. La partícula viral entra a la célula hospedera mediante endocitosis. En el endosoma ocurre la fusión de membranas y el ARN es liberado al citoplasma, donde es replicado y traducido en una poliproteína, la cual es escindida por proteasas celulares y virales, los nuevos viriones ensamblados en el retículo endoplásmico son liberados mediante exocitosis al medio extracelular (Modificada de Yun y Lee, 2017).

1.2.3 Poliproteína viral de los flavivirus

El virión de los flavivirus contiene a la nucleocápside en la que se encuentra el genoma está cubierta por una envoltura lipídica derivada de membranas celulares del huésped donde emerge el virus. El virión completo tiene alrededor de 50 nm de diámetro y contiene tres proteínas estructurales: proteína del core de la nucleocápside (C), una proteína asociada a membrana (M) y la proteína de la envoltura (E), las cuales conforman la partícula viral. El virus codifica para siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) las cuales forman el complejo de replicación viral dentro de la célula huésped (Lindenbach et al 2001; Fields, 2007; Yun y Lee, 2017).

Proteínas estructurales

Proteína de la Cápside (C): Es una proteína básica de aproximadamente 11 kDa que interacciona con el genoma viral para formar la nucleoproteína y prevenir la degradación del genoma viral. Los residuos cargados positivamente están agrupados en el extremo amino e interactúan con el ARN viral, mientras que el extremo carboxilo con las membranas virales y quizás con la proteína E (Lindenbach et al 2001; Velandia y Castellanos, 2011; Barrows et al., 2018).

Proteína de Membrana (M): La proteína M de aproximadamente 7-9 kDa, se produce inicialmente como precursor de aproximadamente 26 kDa llamado prM que se transloca al retículo endoplásmico (ER) por el dominio hidrofóbico del dominio carboxilo terminal de la proteína C. La forma inmadura prM se encuentra presente en viriones inmaduros intracelulares. Una de las funciones de la proteína prM es la de formar heterodímeros con la proteína E para evitar que esta última sufra cambios conformacionales en compartimientos ácidos durante el proceso de exocitosis viral (Lindenbach et al 2001; Velandia y Castellanos, 2011; Li et al., 2018).

Proteína de la envoltura (E): Es una proteína de aproximadamente 53 kDa que intervienen en procesos como: fusión de membranas e interacción con receptores específicos de la célula huésped. Es el antígeno viral más importante en la inducción de anticuerpos neutralizantes (Lindenbach et al 2001; Velandia y Castellanos, 2011).

Proteínas no estructurales

Proteína no estructural 1 (NS1): La proteína NS1 de 46 kDa, es una molécula con diversas funciones. Algunos estudios han asociado a la glicoproteína NS1 en el ensamblaje y maduración del virión, además, le fue atribuida la función de “chaperona” durante el ensamblaje del virus dengue. Forma dímeros o hexámeros asociados a balsas lipídicas (rafts) de la membrana plasmática. Se puede hallar soluble en el citoplasma y en el espacio extracelular; por esta razón, NS1 puede estimular al sistema inmunitario (Velandia y Castellanos, 2011).

Proteína no estructural 2A (NS2A): Es una proteína de membrana de 22 kDa que promueve el ensamblaje y la replicación viral. Coordina de un modo en el que aún no se describe por completo si el ARN genómico producido en cada ciclo de replicación se utiliza como molde o si se asocia dentro de la nucleocápside durante el ensamblaje viral (Velandia y Castellanos, 2011).

Proteína no estructural 2B (NS2B): Es una proteína de 14 kDa. Posee una región hidrofóbica que ancla al complejo NS2B-NS3 a la membrana del retículo endoplásmico. Por un procesamiento proteolítico, un pequeño dominio hidrofílico de NS2B interactúa con el dominio proteasa de la proteína NS3 para actuar como cofactor de ésta y asegurar que la proteasa esté unida al retículo endoplásmico (Velandia y Castellanos, 2011).

Proteína no estructural 3 (NS3): Es una proteína multifuncional de aproximadamente 70 kDa, y está bien conservada entre los flavivirus con una identidad de secuencia de aproximadamente el 65% (Luo et al., 2008). La proteasa NS3 es una serina proteasa que pertenece a la superfamilia de la tripsina. Contiene una triada catalítica His51, Asp75 y Ser135 que se encuentra en la hendidura central del dominio proteasa (Fig. 3) (Lee et al., 2017) y es, después de la proteína NS5, la proteína más grande codificada por flavivirus (Brecher et al., 2013). Posee en el extremo N-terminal un dominio proteasa similar a la tripsina (NS3pro) y en el extremo C-terminal un dominio con diferentes actividades enzimáticas; que actúa como trifosfatasa de nucleótidos estimulada por ARN (NTPasa), helicasa del ARN (NS3Hel) y ARN trifosfatasa (RTPasa); que son indispensables en la replicación viral. El dominio NS3Pro actúa hidrolizando los complejos NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5 del polipéptido. La

función del dominio NS3Pro depende de su asociación con NS2B, que le confiere estabilidad durante su actividad proteolítica, mientras que la función helicasa permanece inhibida. NS3Hel actúa como helicasa al desenrollar las estructuras secundarias que se forman en el extremo 3' del ARN viral, para favorecer la unión de la polimerasa NS5 sobre el ARN y dar inicio a la replicación (Velandia y Castellanos, 2011).

El extremo N-terminal de la proteína NS3 constituye el dominio proteasa, el cual contiene cuatro residuos, los tres primeros constituyen una triada catalítica (H51, D75 y S135), la cual está conservada entre los diferentes flavivirus, mientras que el cuarto residuo tiene como función unirse al sustrato. Se ha sugerido que la especificidad del sustrato se debe a un residuo de ácido aspártico (Bazan et al., 1989). Para formar una proteasa activa, el cofactor NS2B es esencial, ya que la cadena β de la región hidrófila central de NS2B se pliega en el extremo N-terminal de la proteasa NS3 para estabilizarla. Además, el dominio C-terminal de NS2B experimenta un cambio conformacional al unirse al sustrato para formar una hoja β que se convierte en parte del sitio activo (Brand et al., 2017).

El dominio helicasa de la región C-terminal de NS3 lleva a cabo las siguientes actividades enzimáticas: ARN helicasa, nucleósido trifosfatasa (NTPasa) y ARN trifosfatasa (RTPasa). La reacción de la RTPasa constituye el primer paso en la síntesis de Cap 1 en el extremo 5' de los genomas virales, que también sirven como ARNm, eliminando el γ -fosfato del ARN recién sintetizado y generando ARN defosforilado en el extremo 5'. La actividad de la ARN helicasa desenrolla el dsARN para liberar el genoma viral recién generado (cadena positiva) y hacer que la cadena negativa esté disponible como molde para otra ronda de síntesis del genoma viral. Además, la actividad helicasa elimina las estructuras secundarias del ARN viral, especialmente en las regiones no traducidas 5' y 3'. Las proteínas NS4A y NS4B, sirven como cofactores alostéricos para el dominio helicasa y mejoran su actividad al reducir la cantidad de ATP requerida, además de facilitar la disociación del genoma viral (Mastrangelo et al., 2012).

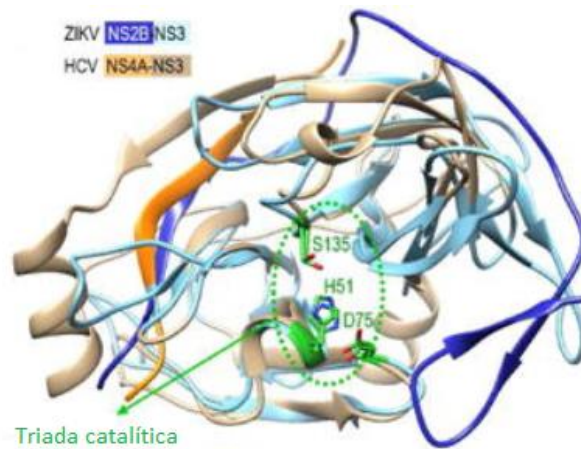


Figura 3: Estructura cristalina de la proteasa viral NS2B-NS3

Se muestra la estructura cristalina de la proteasa viral de ZIKV y VHC (Virus de la hepatitis C). De color verde se encuentra la triada catalítica (S135, H51, D75). NS2B se muestra de color azul rey, mientras que NS3 de color azul cielo (Lee et al., 2017).

Proteína no estructural 4A (NS4A y NS4B): Son proteínas de membrana, unidas a un péptido señal de 23 aminoácidos (2K). Desempeñan múltiples funciones en la replicación viral y en las interacciones virus-huésped. En WNV, NS4A una proteína de 16 kDa que regula la actividad de ATPasa de la helicasa NS3, mientras que la proteína NS4B de 27 kDa de DENV interactúa con el dominio helicasa de NS3 y la disocia del ARN viral (Zou et al., 2013).

Proteína no estructural 5 (NS5): Es una proteína multifuncional de aproximadamente 104 a 106 kDa; en el dominio N-terminal posee actividad enzimática de metiltransferasa y guanidiltransferasa, responsables del capping y la metilación del extremo 5' del RNA genómico y en el dominio C-terminal se ubica el dominio de la ARN polimerasa dependiente de ARN. Aunque estos procesos suceden exclusivamente en el citoplasma de la célula infectada, se ha identificado una señal de localización nuclear en la proteína NS5 que facilita su importación al núcleo. La posible función de NS5 en el núcleo es desconocida (Velandia y Castellanos, 2011).

1.3 El vector

Los flavivirus, se transmiten principalmente por la picadura de artrópodos hematófagos, como mosquitos o garrapatas siendo los mosquitos hembras del género *Aedes*, específicamente *Aedes Aegypti* y *Aedes albopictus*, los responsables de la transmisión de muchos arbovirus en todo el mundo (Goddard et al. 2007).

A nivel mundial, *A. aegypti* y *A. albopictus* son dos de las especies más importantes de mosquitos, convirtiéndolos en un blanco de estudio como transmisor de diversas enfermedades que afectan al humano (Kraemer et al., 2015). Ambas se consideran especies invasoras, ya que han colonizado exitosamente muchos sitios fuera de sus ámbitos nativos. *Ae. aegypti*, originario de África, migró al Nuevo Mundo durante el siglo XV al XVII a bordo de los barcos que transportaban esclavos. Las múltiples invasiones de *Ae. albopictus* en América son de origen mucho más reciente y han ocurrido durante las últimas dos o tres décadas. Esta especie, originario del Oriente e India, se extendió hacia el oeste hasta las islas Mauricio, las Seychelles y Madagascar, transportada por humanos hace más de un siglo, e invadió islas del Pacífico Sur cien años antes de llegar al Nuevo Mundo a bordo de buques que transportaban neumáticos. Estas especies comparten varias características que les confieren ventajas adaptativas sobre otras, convirtiéndolas en invasoras exitosas. Una de las más importantes es que sus huevos son resistentes a la desecación, lo cual les permite sobrevivir en ambientes inhóspitos, además de favorecer su transporte a través de los humanos (Rey y Lounibos, 2015).

El mosquito *Ae. aegypti*, es un vector mucho más eficiente para la propagación de los flavivirus como DENV y ZIKV, debido a varios factores: ha evolucionado para vivir todo su ciclo de vida desde larvas hasta adultos, prefiere alimentarse de seres humanos incluso en presencia de otros mamíferos, y se alimentará de varios humanos en el curso de una sola comida de sangre, provocando la transmisión rápida del virus (DENV y ZIKV) a múltiples hospederos en un corto período de tiempo, propagando la enfermedad de manera más eficiente. En cambio, el mosquito *Ae. albopictus*, carece de esta convivencia altamente preferencial con los humanos, viviendo en un ambiente más variado, debido a que se alimenta de otros huéspedes (es decir, perros, gatos, ardillas), esto constituye un obstáculo para la rápida propagación de la

enfermedad. El mosquito *Ae. albopictus* tiene una mayor tolerancia a los ambientes fríos (Patterson et al., 2016).

Ambas especies pican durante el día, con un período de alimentación más activo 2 h antes del amanecer y 2 h después del atardecer (OPS, 2010). Una vez que el mosquito está en contacto con una persona infectada, el virus infecta el intestino medio del mosquito y luego se extienden hasta las glándulas salivales en un periodo de incubación de 8 a 12 días, probando que el mosquito pueda transmitir el virus a otra persona (Chico et al., 2001).

Después de la picadura del mosquito infectado, el virus se deposita en la epidermis de la piel del hospedero a través de la saliva del mosquito infectado, donde se encuentran células permisivas a la infección, como los queratinocitos y las células dendríticas (células de Langerhans). Se ha demostrado que DENV y ZIKV infectan células dendríticas de la piel (Hamel et al., 2015). Las células dendríticas en particular parecen ser un objetivo inicial común para los flavivirus, cuando están infectados, estas células migran a los órganos linfoides donde tiene lugar la replicación viral, lo que permite la difusión del virus en el torrente sanguíneo y en los órganos internos (Hamel et al., 2015).

1.3.1 Morfología y distribución geográfica del mosquito *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*

El mosquito *Ae. aegypti* es el principal vector de las infecciones ocasionadas por DENV y ZIKV. Este mosquito posee características morfológicas que lo hacen fácilmente distinguible por ejemplo: el cuerpo es de coloración oscura, el tórax muestra rayas longitudinales en el escudo, en el escutelo todos los lóbulos presentan escamas blancas formando una banda transversal. Así mismo, el fémur exhibe una raya longitudinal de escamas blancas, la tibia no presenta escamas blancas y es hasta el tarsomero 1 en donde empiezan las bandas blancas a lo largo del resto de las patas (Fig. 4) (Red Nacional de Laboratorio de Salud 1997; Rueda, 2004). Actualmente este mosquito se encuentra distribuido en África, América del sur y central, Oriente Medio, sudeste de Asia, el Pacífico, Islas de la India, norte de Australia y esporádicamente en Europa (Goddard et al. 2007).

El mosquito *Ae. albopictus*, era originalmente nativo del sudeste asiático, pero se extendió a las Américas y varios países europeos y africanos (Goddard et al. 2007). Este insecto es considerado el vector secundario de DENV en el sureste de Asia, el Pacífico Occidental y crecientemente en Centroamérica y Sudamérica (Kyle y Harris, 2008). Contiene una sola línea blanca-plateada en el centro del dorso del tórax, es de color negro con marcas blancas en las patas (Fig. 4) (Goddard et al. 2007).

Los problemas de abastecimiento de agua potable, así como un inadecuado sistema de eliminación de aguas residuales y desechos sólidos, son problemas que facilitan en gran medida la proliferación de criaderos del mosquito (OPS, 2010), sin embargo, los esfuerzos de control de vectores se han utilizado durante décadas, principalmente con el uso de insecticidas, como son los piretroides (Smith et al, 2016).



Figura 4. El vector

De lado derecho se encuentra el mosquito vector *Ae. albopictus* y de lado izquierdo *Ae. aegypti*, los responsables de transmitir DENV y ZIKV (OMS, 2019).

1.3.2 Ciclo biológico de *Ae. aegypti*

El ciclo biológico de *Ae. aegypti* es holometábolo, es decir, pasan por una metamorfosis completa teniendo una fase acuática y otra terrestre. El ciclo de vida consta de 4 estadios: huevo, cuatro estadios larvales, pupa y adulto (Fig. 5) (Chico et al., 2001).

Los huevos

Los huevos miden aproximadamente 1 mm de longitud, tienen forma de cigarro y son tersos. Se encuentran por encima del nivel del agua de las paredes del recipiente. Al momento de la oviposición son blancos, pero rápidamente cambian a negro brillante. Si el ambiente es húmedo y cálido son fecundados en 48 h, pero a bajas temperaturas puede prolongarse a 5 días. Algunos hacen eclosión en los primeros 15 minutos de contacto con el agua.

La fase larvaria

Es el período de alimentación y crecimiento. Se mantienen en la superficie del agua casi vertical y nadan en movimiento serpentino. Se identifican por dos prominentes espinas laterales del tórax y una hilera recta de siete a doce escamas del peine en el octavo segmento abdominal. La duración del desarrollo larvario depende de la temperatura, la disponibilidad de alimento y la densidad de larvas en el recipiente. En condiciones óptimas, este periodo desde la eclosión hasta la fase de pupa, puede ser de 5 días, pero comúnmente es de 7 a 14 días. La mayor parte de los recipientes de desechos (latas, neumáticos y botellas), sirven como sitio de reproducción.

Fase de pupa

Se caracteriza por ser acuáticos y no se alimentan, cumplen con la metamorfosis del estadio larvario al adulto, esta etapa tiene una duración de 2 a 3 días.

La fase adulta

Es la fase reproductora. Los adultos tienen una mortalidad diaria de 10%, la mitad de los mosquitos morirá durante la primera semana y el 95% durante el primer mes. A pesar de la gran reducción en número, si la población emergente original es grande, será suficiente para transmitir la enfermedad y mantener una epidemia.

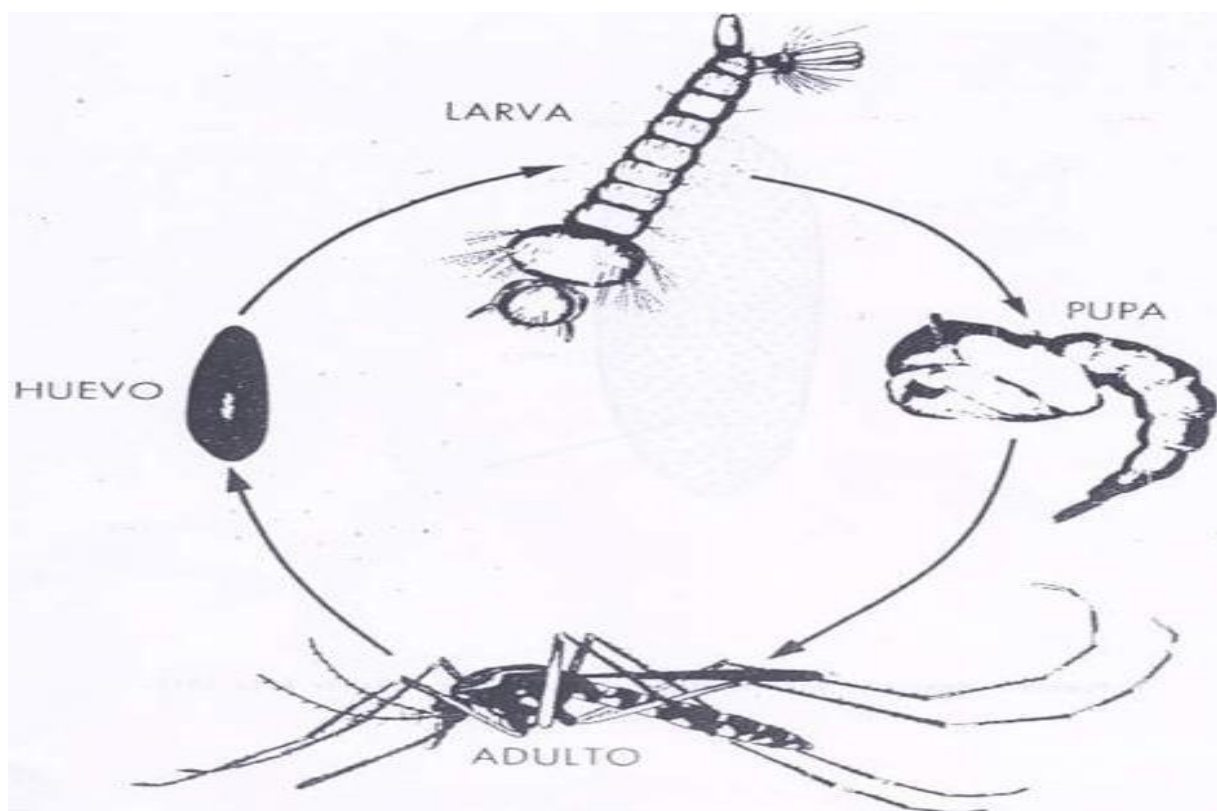


Figura 5: Ciclo biológico de *Aedes Aegyti*

Es un díptero holometábolo que pasa por una metamorfosis completa. A partir de los huevos se producen las larvas que pasan por 4 estadios para después convertirse en pupas. Posteriormente las pupas sufren una metamorfosis que da lugar a mosquitos adultos, los cuales se reproducen después de 24 h. Las hembras necesitan alimentarse de sangre para poder poner huevos y así se repita el ciclo (Chico et al., 2001).

1.4 Infección por DENV

El DENV, es epidemiológicamente importante ya que se calcula que existen 390 millones de infecciones por dengue al año, de las cuales 96 millones se manifiestan clínicamente con un rango de 500,000 casos por fiebre hemorrágica, lo que contribuye aproximadamente 20,000 muertes, principalmente en niños (OMS, 2018; FDA, 2019). En México, en el 2016 se confirmaron un total de 13,820 casos de infecciones por DENV (Secretaría de Salud, 2017). DENV se encuentra principalmente en zonas tropicales y subtropicales del mundo; los casos de infección por este virus parecen ir en aumento, y en países como México, la transmisión ocurre durante todo el año, siendo mayor en los meses de lluvia (Martins et al., 2012; Uribarren-Berrueta T., et al 2016; Patterson et al., 2016).

Cuatro eventos zoonóticos dieron origen a los cuatro serotipos de DENV (DENV 1–4), siendo DENV-2 la cepa más virulenta (Patterson et al., 2016). Estos serotipos son filogenéticamente distintos, compartiendo una identidad de secuencia del 65-70% del genoma viral (Lin et al., 2016), están estrechamente relacionados, pero son distintos antigénicamente (Gubler et al., 2014). Los serotipos virales divergieron en diferentes tiempos siendo DENV-4, el primero en divergir, seguido por DENV-2 y finalmente la división de DENV-1 y DENV-3 (Holmes y Twiddy, 2003). Cada uno de estos serotipos consta de diversos genotipos los cuales difieren en menos del 6% entre ellos (Holmes y Twiddy, 2003; Weaver y Vasilakis, 2009). Los 4 serotipos con sus diversos genotipos se encuentran distribuidos mundialmente (Allicocl et al., 2012; OMS, 2014). La infección por un serotipo produce inmunidad permanente contra la reinfección por ese serotipo, en cambio la infección sucesiva con dos serotipos diferentes es un factor de riesgo para desarrollar las formas graves de la enfermedad (Messina et al., 2014; OPS, 2019).

Hasta el día de hoy, no hay disponible ninguna vacuna o terapia antiviral aprobada clínicamente para combatir la infección por DENV (Leyssen et al., 2008; Monath, 2008; Noble et al., 2010), sin embargo, la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU (FDA), anuncio la aprobación de Dengvaxia, la primera vacuna tetravalente viva atenuada, la cual contiene los genes de replicación y el gen de la cápside de la fiebre amarilla, además de los genes PrM y E de cada uno de los cuatro serotipos de DENV. La vacuna fue administrada a personas de 9 a 16

años que vivan en zonas endémicas en los territorios estadounidenses de Samoa Americana, Guam, Puerto Rico, las Islas Vírgenes y México. Dengvaxia no está aprobada para su uso en personas que no han sido infectadas previamente por ningún serotipo de DENV, esto se debe a que en personas que no han sido infectadas, la vacuna parece actuar como una primera infección por DENV, de modo que una infección subsiguiente puede resultar en las formas grave de DENV (FDA, 2019). Alrededor del 50% de las infecciones por DENV son sintomáticas. La presentación clínica de la enfermedad ocasionada por la infección por DENV es muy variada, lo que dificulta el diagnóstico y el tratamiento. Existen tres fases distintas de la infección por DENV: febril, crítica y de recuperación (Tabla 1) (Patterson et al., 2016). Las manifestaciones clínicas de la infección van desde asintomáticas a una enfermedad febril aguda, a menudo se asocia con escalofríos, dolor de cabeza, dolor retroorbital, mialgia, altriaga, además de, manifestaciones hemorrágicas (FDA, 2019).

Tabla 1: Fases de la infección por DENV

Se han descrito tres fases distintas de la infección por dengue: febril, crítica y de recuperación (Modificado de Patterson et al., 2016).

Fase	Duración	Síntomas	Problemas
Febril	2 a 7 días	Fiebre alta, mialgias, artralgias, cefalea, erupción cutánea, náuseas, vómito y dolor retro-ocular.	Deshidratación; la fiebre alta puede asociarse a trastornos neurológicos, y convulsiones en niños.
Crítica	1 a 2 días	Aumento a la permeabilidad capilar, trombocitopenia y posible progresión a hemorragia.	Los capilares con fugas conducen a una pérdida de volumen de plasma, comprometiendo a los órganos.
Recuperación	3 a 5 días	Hay una mejoría del estado general, se recupera el apetito, mejoran los síntomas gastrointestinales se estabiliza el estado hemodinámico, y se incrementa la diuresis.	Hipervolemia (si la terapia intravenosa de fluidos ha sido excesiva).

1.5 Infección por ZIKV

El ZIKV, es un flavivirus transmitido por mosquitos el cual se identificó por primera vez en 1947 en una zona selvática llamada Zika, cerca del lago Victoria en Uganda, en macacos de la India a través de una red de monitoreo de la fiebre amarilla selvática (Li et al., 2018). Posteriormente en 1952, en Uganda y la República Unida de Tanzania se identificó la infección por este virus en humanos (Dick et al., 1952). El virus mostró su potencial epidémico por primera vez en un brote en la isla Yap en 2007 y más tarde en otras islas del océano Pacífico, para terminar con su aparición en 2015 en las Américas (OMS, 2017). Esta epidemia ocasionada por ZIKV, no solo sorprendió por su propagación geográfica, sino también porque proporcionó pruebas de características de patogenicidad que no se habían observado previamente en las infecciones por flavivirus. En particular, se demostró que ZIKV podía cruzar la barrera placentaria para causar infecciones congénitas así como ser transmitida sexualmente entre humanos (Rey et al., 2017).

Durante décadas, ZIKV fue de poca preocupación para los clínicos, sin embargo, desde que se descubrió una correlación entre la infección por ZIKV y la microcefalia fetal, la OMS la declaró como una “Emergencia de salud pública de interés internacional, estimando un registro en México de 7,320 casos de infección por ZIKV (Gulland, 2016).

Al igual que DENV, ZIKV se transmite mediante mosquitos del género *Aedes*, compartiendo las especies *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, como vectores en el ciclo de vida epidérmico, en el cual el humano es el hospedero vertebrado: además se sabe que las especies *Ae. vitattus*, *Ae. fulcifer*, *Ae. africanus*, *Ae. apicoargenteus* y *Ae. luteocephalus*, pueden transmitirlo en el ciclo de vida selvático en donde los primates no humanos es el hospedero (Faye et al., 2014).

Las principales vías de exposición a la infección por ZIKV son: la picadura por mosquitos infectados con el virus, transmisión sexual, transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos, materno-fetales e intraparto y por exposición en el laboratorio. Una vez que el mosquito *Aedes* ha infectado al ser humano, el período de incubación de ZIKV aún no está claramente definido, pero actualmente se hipotétiza que corresponde a menos de dos semanas. Durante la viremia, puede desarrollarse una enfermedad leve con síntomas como fiebre, conjuntivitis no

purulenta, erupción maculopapular, artritis / artralgias, cefalea y vómitos. Se estima que el 80% de las infecciones por ZIKV son asintomáticas (Patterson et al., 2016).

Las infecciones por ZIKV recientemente se han asociado con trastornos patológicos graves, como la microcefalia en neonatos y el síndrome de Guillain-Barré, una rara polineuropatía aguda de inicio rápido, causada por una respuesta autoinmune al sistema nervioso periférico, que provoca insuficiencia respiratoria además de parálisis en adultos (Oehler et al., 2014; Shiryayev et al., 2017). Actualmente, no existe una vacuna aprobada por la FDA o un medicamento antiviral para combatir las infecciones por ZIKV (Li et al., 2018).

1.6 Métodos serológicos y moleculares para el diagnóstico y detección de la infección por DENV y ZIKV

Debido a las similitudes en sus estructuras antigénicas, los flavivirus reaccionan de forma cruzada en pruebas serológicas, donde se detectan los anticuerpos IgM al final de la primera semana del inicio de la infección, seguido del aumento de los anticuerpos IgG. El diagnóstico específico de una infección por flavivirus más usado requiere de la detección del ARN viral; mediante muestras de sangre, suero u orina por medio de RT-PCR o aislamiento viral, lo cual es posible en la fase aguda de la enfermedad (Tabla 2).

El diagnóstico de la infección por ZIKV asociado al síndrome Guillain-Barré y otras complicaciones neurológicas, se puede realizar mediante una muestra de líquido cefalorraquídeo para un análisis virológico por RT-PCR, o detección de anticuerpos IgM (ELISA). Por otro lado, para mujeres embarazadas se obtiene muestra de líquido amniótico para la detección por PCR (OPS, 2016).

Tabla 2: Técnicas para la detección de la infección por DENV (Modificada de OPS, 2016).

Pruebas	Características
Serológica	Prueba de inmunocaptura enzimática de la inmunoglobulina M (MAC-ELISA) e inmunoglobulina indirecta G (ELISA). Inhibición-hemaglutinación (IH), fijación de complemento (FC), neutralización (NT) y detección de la proteína no estructural NS1 de DENV (ELISA).
Aislamiento viral	Inoculación intracerebral en ratones de 1-3 días de edad, cultivos de células de mamíferos (LLC-MK2), inoculación intratorácica de mosquitos adultos y el uso de cultivos de células de mosquito
RT-PCR	Detecta el ARN viral en muestras de humanos, tejidos y mosquitos.
Inmunohistoquímicas	Detecta el antígeno viral en tejidos.

II. ANTECEDENTES PARTICULARES

Las proteínas reporteras basadas en la proteína luciferasa, son herramientas esenciales para llevar a cabo ensayos de procesos biológicos *in vivo* e *in vitro* y se emplean principalmente para monitorear los cambios en la expresión génica y los niveles de proteína en una gran variedad de procesos biológicos (Masser et al., 2016). La ventaja de este sistema es monitorear la expresión de múltiples genes. En el área de virología, se han empleado para distinguir células infectadas por virus, obteniéndose imágenes de células vivas, así como la detección y cuantificación de la infección en cultivos celulares (Jones et al., 2010).

Las proteínas reporteras *in vivo* reflejan la expresión de diversos genes a partir de promotores, dando como resultado diferentes niveles de ARNm y finalmente los cambios en la cantidad de la proteína reportera. Por ejemplo, la fusión de promotores o genes como el gen *LacZ* bacteriano permite la detección de la actividad de la β -galactosidasa y ha sido esencial en estudios de expresión génica (Juers et al., 2012). Sin embargo, los ensayos de la actividad de β -galactosidasa requieren mucho tiempo. Otros ejemplos de proteínas reporteras incluyen proteínas fluorescentes y bioluminiscentes, debido a su alta sensibilidad y rango dinámico y a la facilidad de uso de los instrumentos de detección (Jones et al., 2010).

Gaussia princeps es un copépodo marino que segrega naturalmente una luciferasa (GLuc), la cual es una proteína monomérica de 185 aminoácidos (19.9 kDa) y es la luciferasa más pequeña conocida y la más brillante (Goerke et al., 2008), esta luciferasa se ha detectado en un gran grupo de organismos que incluyen bacterias, hongos, insectos y animales marinos (Weissleder, 2003).

GLuc es una enzima oxidativa que cataliza reacciones moleculares dependientes de oxígeno para producir luz (en un pico de 480 nm), mediante la oxidación del sustrato coelenterato luciferina (coelenterazina). Además, posee un elevado grado de especificidad y solo emite luz al reaccionar con luciferasas de la misma especie o muy afines a ésta. El sustrato puede penetrar las membranas celulares y difundirse en todos los compartimentos celulares, permitiendo el análisis cuantitativo en células vivas (Remy y Michnick, 2006), además exhibe

una actividad hasta 1,000 veces mayor que la luciferasa de *Renilla reniformis* (Rluc), luciferasa de luciérnaga (Fluc) o luciferasas bacterianas (LuxAB) (Wille et al., 2012). Esta proteína no es tóxica y se secreta naturalmente en forma activa cuando se expresa en células de mamíferos, ya sea impulsado por promotores activos o bajo el control de factores de transcripción (Qu et al., 2014). Los enlaces disulfuro, contribuyen a la estabilidad de GLuc a temperaturas elevadas. Estas propiedades la convierten en un gen indicador ideal, ya sea como un monitor de expresión independiente o al unirse con otras proteínas (Goerke et al., 2008).

Lin Qu y colaboradores en 2014, desarrollaron un sistema reportero basado en células, el cual se aplicó para el estudio de la replicación de los norovirus, además de la detección y evaluación de la efectividad de agentes antivirales. La comprensión del ciclo de vida y patogénesis de los norovirus sigue siendo limitada, debido a la incapacidad de propagarse en cultivos celulares y a la falta de un modelo animal para determinar los niveles de infección (Qu et al., 2014). Este sistema denominado NoroGLuc, se basó en la fusión de la proteína viral p41 (proteína asociada a la membrana) codificada por el marco de lectura 1 (ORF1) de los norovirus y GLuc. En este sistema la proteasa viral (Pro) reconoce la secuencia FQLQ/GP en p41, provocando la liberación y secreción de GLuc (Fig. 6). En este sistema, se pueden estudiar las actividades de la proteasa de HuNoV (Norovirus humano) y así servir como un biosensor para monitorear la replicación de los Norovirus al ser transfectado en células HEK293 (Qu et al., 2014).

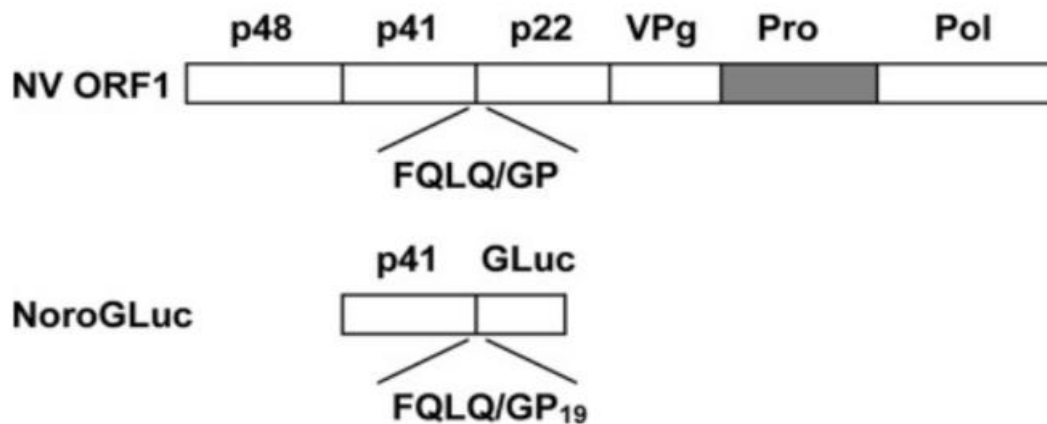


Figura 6: Desarrollo de un sistema reportero NoroGLuc

Esquema del ORF1 de NV en el plásmido pCMV-GLuc fusionado a la proteína NoroGLuc. La proteasa viral corta entre los aminoácidos Q/G o E/G, con una especificidad preferida por la secuencia FxLQ, donde x es H, Q, N, A (Qu et al., 2014).

Durante el desarrollo del presente proyecto, Ming-Shu y colaboradores en el 2017, publicaron un estudio para la detección y cuantificación de DENV, utilizando un sistema reportero llamado DENPADS, el cual fue diseñado para determinar la infección por DENV en células de riñón de hámster recién nacidos (BHK-21), mediante el procesamiento proteolítico en el sitio de escisión entre NS4B y NS5 por la proteasa viral NS2B-NS3 (NS2B3) de DENV, lo cual es muy similar al diseño de este trabajo de tesis.

El sistema DENPADS se construyó con dos plásmidos, uno fue denominado sensor (pSen-Cre) y otro reportero (pRep-EGFP). El primer plásmido pSen-Cre; contiene el sitio de corte reconocido por la proteasa viral, entre las dos proteínas no estructurales NS4B y NS5 fusionadas con la señal de localización nuclear del virus SV40 (NLS) además de la recombinasa Cre. El segundo plásmido pRep-EGFP; se construyó mediante el ADN complementario que codifica para la proteína mCherry, flanqueado por sitios de recombinación LoxP y 3 codones de paro río arriba de la cadena complementaria de EGFP (Fig. 7) (Hsieh et al., 2017).

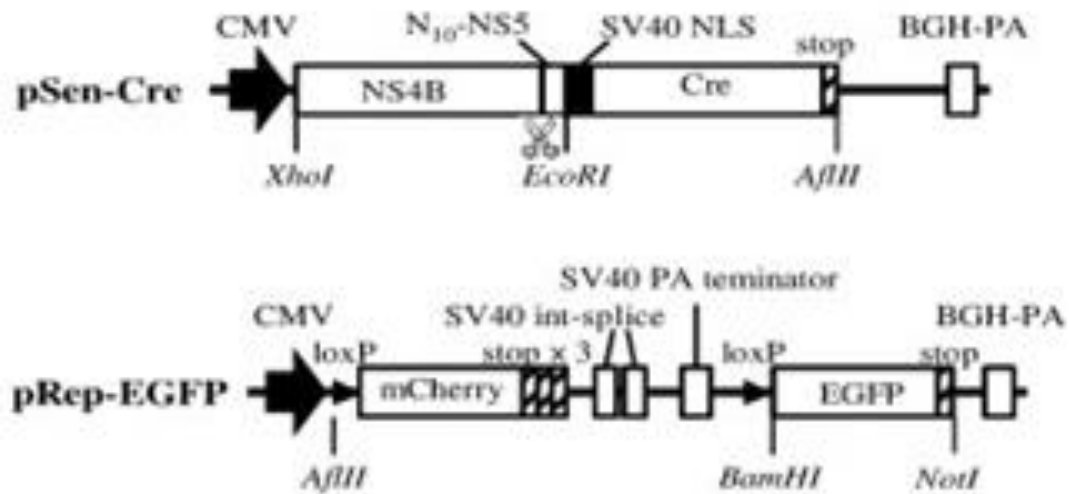


Figura 7: Construcción de plásmidos del sistema DENPADS

Esquema del plásmido pSen-Cre y pRep-EGFP; se construyeron como plásmido sensor y plásmido reportero, respectivamente. El sitio de escisión para la proteasa viral (NS2B3) de DENV está indicado en el esquema (Hsieh et al., 2017).

Ambos reporteros se transfectaron en células BHK-21 para el desarrollo de la línea celular estable F-DENPADS, basada en fluorescencia. Así durante la presencia de infección por DENV, la proteasa viral NS2B3 corta en el sitio de corte entre las dos proteínas no estructurales NS4B-NS5 provocando la translocación de la recombinasa Cre hacia el núcleo (mediante la señal de localización nuclear). En el núcleo la recombinasa Cre cortará entre los sitios de recombinación LoxP para promover la expresión EGFP mediante el promotor de citomegalovirus (CMV) obteniendo como resultado la detección de células infectadas por DENV (Hsieh et al., 2017).

La proteasa viral NS2B3, codificada por la poliproteína de DENV, contiene más del 70% de identidad en su secuencia de aminoácidos con respecto a los diferentes serotipos de DENV (1-4) y la identidad de la secuencia de aminoácidos de la proteasa NS2B3 de DENV-2 entre diferentes flavivirus como ZIKV, JEY, YFV y WNV, corresponde aproximadamente al 56 % (Fig. 8) (Hsieh et al., 2017 y Shiryaev et al., 2017).

Utilizando el sistema F-DENPADS en células BHK-21 se puede detectar la infección con los cuatro serotipos de DENV mediante la expresión de EGFP, sin embargo, dicho sistema no es útil para la detección de la infección por otros flavivirus como ZIKV, JEV y VHC (Fig. 9) (Hsieh et al., 2017).

Es necesario recalcar que la proteasa viral NS2B3 es responsable de escindir a la poliproteína viral codificada por los flavivirus, para generar proteínas individuales que constituyen al virión infeccioso. Estos pasos de escisión son necesarios para la maduración de la partícula viral; así que este sistema además de la detección de la infección puede ser aplicado para el desarrollo de fármacos que contengan como blanco a la proteasa NS2B3 (Wu et al., 2015).

Virus	Cápside	NS2A/NS2B	NS2B/NS3	NS3/NS4A	NS4B/NS5
ZIKV	V ¹²⁵ TRR↓GSAY ¹³²	S ¹³⁶⁹ GKR↓SWP ¹³⁷⁶	T ¹⁴⁹⁹ GKR↓SGAL ¹⁵⁰⁶	A ²¹¹⁶ GKR↓GAAF ²¹²³	V ²⁵¹⁷ KRR↓GGGT ²⁵²⁴
DENV1	R ⁹⁷ RKR↓SVTM ¹⁰⁴	W ¹³⁴¹ GRK↓SWPL ¹³⁴⁸	K ¹⁴⁷¹ KQR↓SGVL ¹⁴⁷⁸	A ²⁰⁹⁰ GRR↓SVSG ²⁰⁹⁷	G ²⁴⁸⁹ GRR↓GTGA ²⁴⁹⁶
DENV2	R ⁹⁷ RRR↓TAGV ¹⁰⁴	S ¹³⁴² KKR↓SWPL ¹³⁴⁹	K ¹⁴⁷² KQR↓AGVL ¹⁴⁷⁹	A ²⁰⁹⁰ GRK↓SLTL ²⁰⁹⁷	N ²⁴⁸⁸ TRR↓GTGN ²⁴⁹⁵
DENV3	K ⁹⁷ RKK↓TSLC ¹⁰⁴	L ¹³⁴⁰ KRR↓SWPL ¹³⁴⁷	Q ¹⁴⁷⁰ TQR↓SGVL ¹⁴⁷⁷	A ²⁰⁸⁹ GRK↓SIAL ²⁰⁹⁶	T ²⁴⁸⁷ GKR↓GTGS ²⁴⁹⁴
DENV4	G ⁹⁶ RKR↓STIT ¹⁰³	A ¹³⁴¹ SRR↓SWPL ¹³⁴⁸	K ¹⁴⁷¹ TQR↓SGAL ¹⁴⁷⁸	S ²⁰⁸⁹ GRK↓SITL ²⁰⁹⁶	T ²⁴⁸⁴ PRR↓GTGT ²⁴⁹¹
WNV	Q ¹⁰¹ KKR↓GGTA ¹⁰⁸	N ¹³⁶⁷ RKR↓GWPA ¹³⁷⁴	Y ¹⁴⁹⁸ TKR↓GGVL ¹⁵⁰⁵	S ²¹¹⁷ GKR↓SQIG ²¹²⁴	G ²⁵²² LKR↓GGAK ²⁵²⁹
JEV	Q ¹⁰² NKR↓GGNE ¹⁰⁹	N ¹³⁷⁰ KKR↓GWPA ¹³⁷⁷	T ¹⁵⁰¹ TKR↓GGVF ¹⁵⁰⁸	A ²¹²⁰ GKR↓SAVS ²¹²⁷	S ²⁵⁶⁴ LKR↓GRPG ²⁵⁷¹
YFV	R ⁹⁸ KRR↓SHDV ¹⁰⁵	F ¹³⁵¹ GRR↓SIPV ¹³⁵⁸	G ¹⁴⁸¹ ARR↓SGDV ¹⁴⁸⁸	E ²¹⁰⁴ GRR↓GAAE ²¹¹¹	T ²⁵⁰³ GRR↓GSAN ²⁵¹⁰

Figura 8: Sitios de corte de la proteasa viral NS2B3 en la poliproteína de los flavivirus

Sitios de corte para la proteasa viral NS2B3 en las diferentes posiciones de la poliproteína de los flavivirus. Los residuos homólogos se muestran en negritas. (Modificada de Shiryaev et al., 2017).

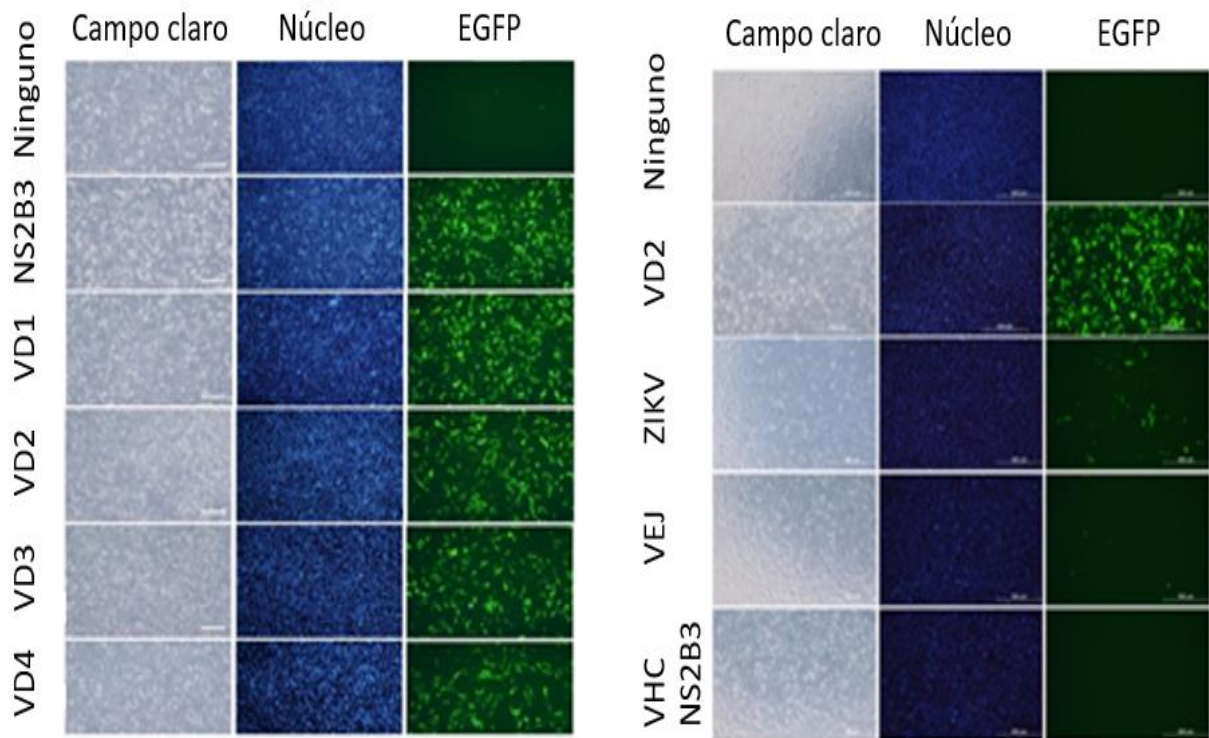


Figura 9: Caracterización de la eficiencia del sistema DENPADS en la detección de la infección de los flavivirus

En el lado izquierdo se muestra la expresión de EGFP en células F-DENPADS, infectadas con los 4 serotipos de DENV. En el lado derecho se muestra la expresión de EGFP en células transfectadas con el sistema F-DENPADS, infectadas con diferentes flavivirus por ejemplo: VEJ (Virus de la Encefalitis Japonés), VHC (Virus de la Hepatitis C) (Modificada de Hsieh et al., 2017).

III. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones por DENV y ZIKV ocasionan enfermedades emergentes transmitidas por la picadura de mosquitos hembras del género *Aedes*, específicamente *A. egypti*, el cual tiene el potencial de propagarse dramáticamente en áreas tropicales y subtropicales del mundo, provocando miles de infecciones al año. Hasta el día de hoy, no se dispone de vacunas o terapias antivirales aprobadas clínicamente para eliminarlos eficientemente.

El procesamiento proteolítico de la poliproteína viral, provocada por la proteasa viral NS2B-NS3, es un paso crucial en la replicación, propagación y progresión de la infección por DENV y ZIKV.

En este trabajo, se empleó la proteasa viral NS2B3, generada durante el ciclo replicativo de DENV y ZIKV, como una herramienta para la detección temprana de la infección, por medio de un sistema reportero denominado pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc. La presencia del sitio de corte en el plásmido reportero en células transfectadas e infectadas, permite el procesamiento proteolítico mediado por NS2B3 en el sitio de corte entre NS4B y NS5, y así modular la expresión de la proteína GLuc.

Estos dos sistemas podrían ser de utilidad tanto para protocolos de investigación científicos y/o de diagnóstico clínico.

VI. HIPÓTESIS

La proteína recombinante NS4B-NS5 fusionada con la luciferasa de *Gaussia* forman parte de un sistema reportero, el cual detecta la infección por DENV y ZIKV tras el procesamiento proteolítico mediado por la proteasa viral NS2B3.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

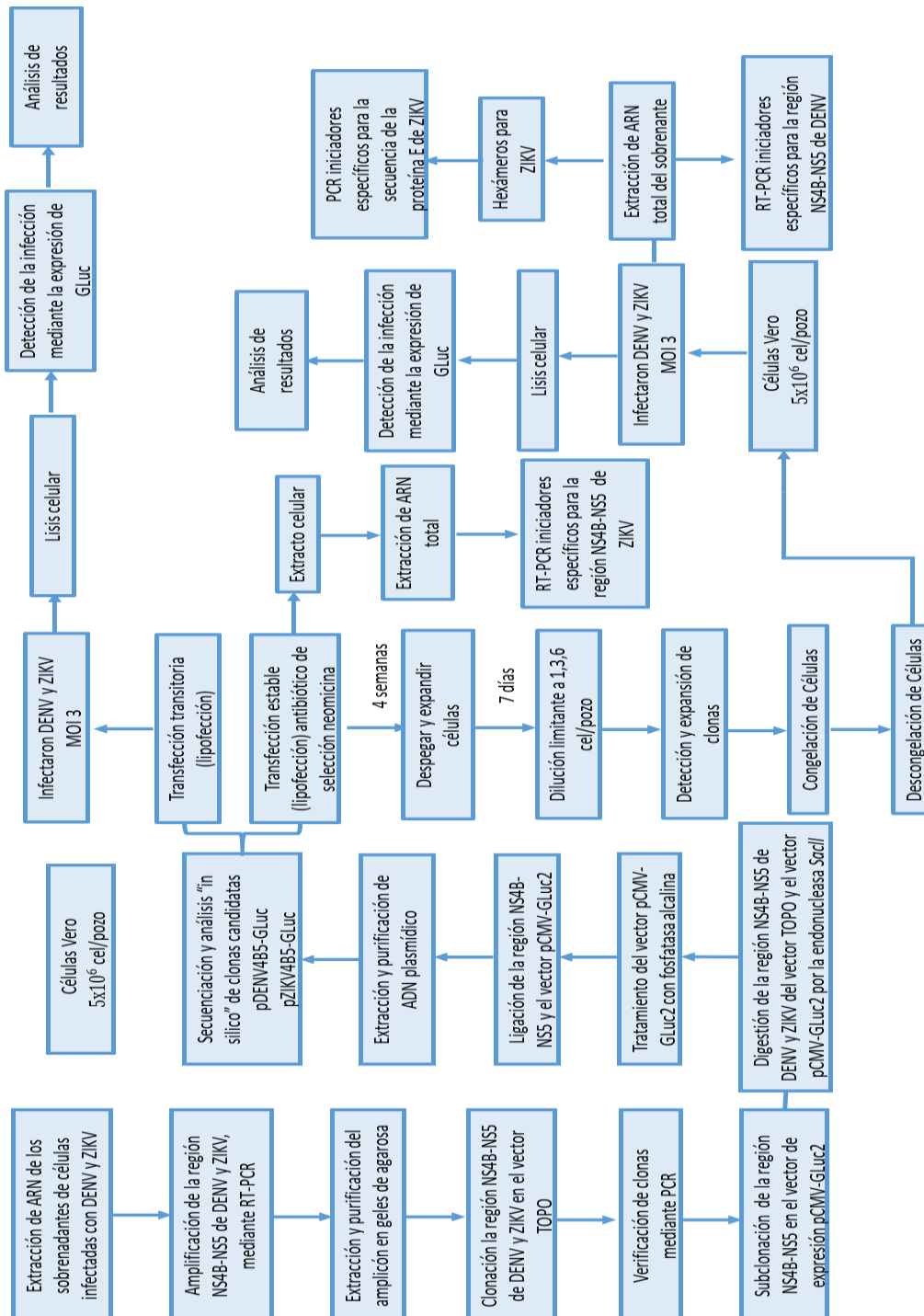
Desarrollar un sistema reportero basado en luciferasa que detecte el nivel de infección por DENV y ZIKV.

5.2 Objetivos particulares

1. Construir plásmidos con la secuencia de corte de la proteasa de DENV y ZIKV en un vector que contiene luciferasa como reportero.
2. Determinar las condiciones de transfección del plásmido reportero que permitan detectar la infección viral.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo, seguimos la siguiente estrategia experimental.



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Células y virus

Las células Vero, que provienen de mono verde africano, se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10%, glutamina (200 mM) y penicilina-estreptomicina (1×10^8 U/ml) a 37° C y 5% de CO₂. Para los experimentos de transfección transitoria, se sembraron a una densidad de 5×10^6 cel/pozo en placas de 24 pozos en el medio descrito sin la adición de antibiótico y posteriormente para la transfección estable, el medio estaba suplementado en 700 ng/ml de G418 Neomicina (Roche).

Las cepas de DENV-2 (NewGuinea C) y de ZIKV (MEX_CIENI551), se utilizaron para este estudio. Todos los virus se propagaron en células Vero.

7.2 Extracción de ARN

El ARN total se obtuvo a partir de los sobrenadantes de células Vero infectadas con DENV y ZIKV, así como de los extractos celulares y del sobrenadante de células transfectadas con el plásmido pZIKV4B5-GLuc, los cuales se usaron para amplificar la región NS4B-NS5 de ambos virus. Además se utilizaron para determinar que las células estuvieran transfectadas con el plásmido pZIKV4B5-GLuc e infectadas con DENV y ZIKV.

Para esto, a los volúmenes iniciales del trabajo se le agregó la solución de lisis en proporción 3:1, mezclando por vortex durante 15 s y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 4,500 rpm durante 5 min y se recuperó la fase acuosa. A estos clarificados se les agregó etanol al 100% en una relación de volumen 1:1, se mezcló por pipeteo y se pasó a través de columnas de afinidad (Zymo-Spin) a 8,000 rpm durante 30 s. Se realizaron dos lavados con 600 µl de buffer de lavado (Tris 10 mM, HCL 10 mM, EDTA 1 mM y etanol 75%), y se centrifugaron a 8,000 rpm durante 1 min. Se eliminó el exceso de buffer de lavado, centrifugando a 10,000 rpm durante 2 min, y se agregaron 30 µl de buffer de elución

caliente, por último, se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 min. El eluido se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.3 Amplificación y purificación del genoma de DENV y ZIKV

Para amplificar la región NS4B-NS5 y detectar la presencia del plásmido pZIKV4B5-GLuc en células establemente transfectadas, se utilizó el ARN total de DENV y ZIKV mediante la técnica de RT-PCR utilizando el kit AgPath-ID One-Step RT-PCP (Applied Systems). Los iniciadores para este propósito se diseñaron a partir de la secuencia NS4B-NS5, añadiendo en los extremos la secuencia de corte para la endonucleasa de restricción *SacII* (Tabla 3). En tubos de 1.5 ml, se agregó la siguiente mezcla de reacción: 5 µl de RT-PCR master mix (2X), 200 ng de ARN, 0.5 µl de cada iniciador (1:100), 0.4 µl de enzima AgRT, hasta completar un volumen final de 10 µl con agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación de la región NS4B-NS5 fueron las siguientes: dos temperaturas a 45°C por 25 min y 95°C por 10 min; seguido de 40 ciclos de tres temperaturas 95°C por 15 s, 68°C por 30 s y 60°C por 30 s; una temperatura final de 60°C por 3 min. Para determinar la presencia de infección por DENV y ZIKV en las células establemente transfectadas se llevó a cabo el procedimiento de RT con el kit HighCapacity RT (Applied Biosystems) usando como iniciadores hexámeros al azar para ZIKV, 200 ng del ARN, 1 µl de buffer (10X), 0.4 µl de dNTPs (100mM), 1 µl de hexámeros al azar (10X), 0.5 µl de RT high capacity, hasta completar un volumen final de 7.5 µl con agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 25°C durante 10 min, 37°C durante 120 min y 85°C durante 5 min. Posteriormente, se realizó una reacción de PCR usando Taq DNA polimerasa (Invitrogen) para lo cual, se hizo la siguiente mezcla de reacción: 0.5 µl de iniciadores específicos para la proteína E (10 µM) de ZIKV, 1 µl de buffer (10X), 0.2 µl de dNTPs (10 mM), 0.3 µl de MgCl₂, 0.5 µl de la enzima Taq Polimerasa, 1 µl de cDNA hasta completar un volumen final de 10 µl con agua de ampolleta. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 96°C por 6 min; seguido de 40 ciclos a tres temperaturas: 96°C por 10 s, 50°C por 5 s y 60°C por 4 min, una temperatura final de 60°C por 10 s. El producto de amplificación se corroboró mediante un gel de agarosa al 1%. Por otro lado, el ARN aislado y purificado de células establemente transfectadas e infectadas con DENV, se amplificó mediante el kit

AgPath-ID One-Step RT-PCR (Applied Systems). Los productos de amplificación se corroboraron en un gel de agarosa al 2%.

Tabla 3. Iniciadores utilizados para RT-PCR

Se describe su secuencia en dirección 5' a 3', temperatura de asociación (Tm) y tamaño en pares de bases del fragmento que amplifica el par de iniciadores. En negritas se encuentra el sitio de corte para la enzima de restricción *SacII*.

INICIADORES				
	Sentido	Antisentido	Tm	Amplicón
DENV (NS4B-NS5)	5'- TCCC CGCGG GGGGCCCATCTCCACATTGTG -3'	5'- AGG CGCGG CGTTTTCTCCTCTTTTAATGC -3'	68°C	300 Pb
ZIKV (NS4B-NS5)	5'- TCCC CGCGG CACTTTGTGGGAAGG-3'	5'-CAG GCGCGG CTGCCACACCGTT-3'	68°C	290 Pb
ZIKV E	5'-TGATACTGCTGATTGCCCG-3'	5'-CAGTGTTCAGCCGGGATCT-3'	56° C	994 Pb

La banda correspondiente a la amplificación de la región NS4B-NS5 de ambos virus, se purificó a partir de geles de agarosa al 2%, usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). El fragmento de gel se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se registró el peso. Se agregó 10 µl de solución de membrana por cada 10 mg de gel de agarosa, se homogenizó mediante vortex durante 15 s y se incubó de 50°C– 60°C. Una vez disuelto, la solución resultante se colocó en una minicolumna SV, y se incubó por 1 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min y se desechó el sobrenadante, el producto retenido en la columna se lavó con 700 µl de solución de lavado de membrana, previamente diluida con etanol al 95% y se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min, se desechó el sobrenadante, se repitió el paso de lavado, y se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min con la tapa abierta para permitir la evaporación de etanol. Se transfirió la columna a un tubo nuevo y se agregaron 50 µl de agua libre de nucleasas directamente al centro de la columna, se incubó 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min y se almacenó a 4°C o -20 °C hasta su uso. Se determinó la concentración de ADN mediante espectrofotometría en el equipo NanoDrop

2000 (Thermo Scientific). Se realizaron lecturas de absorbancia a 230/260 nm y se observó su integridad mediante un gel de agarosa al 2 %.

7.4 Clonación de la región NS4B-NS5 de DENV y ZIKV en el vector TOPO

Para realizar la clonación de la región NS4B-NS5 de DENV y ZIKV se usó el TOPO TA Cloning (Invitrogen) (Fig. 10) y para la subclonación se utilizó el vector de clonación luciferasa de *Gaussia* pCMV-Gluc2 (New England BioLabs) (Fig. 10).

La reacción de clonación se realizó de la siguiente manera: 0.5 µl de la solución de sales, 0.5 µl del vector TOPO y por cada clonación 2 µl del amplicón de la región NS4B-NS5 previamente purificada de DENV y ZIKV, obteniendo un volumen final de 3 µl, a cada reacción se agregaron 50 µl de células competentes, seguido de incubación en hielo durante 30 min. Después las células fueron sometidas a un choque térmico a 42°C por 90 s, e inmediatamente se incubaron en hielo durante 3 min. Luego a las células se les agregaron 250 µl de medio S.O.C y se incubaron a 37°C y 200 rpm durante 1 h. La mezcla se espatuló en placas de medio LB con ampicilina (100 mg/ml), y se incubaron a 37°C toda la noche.

Las clonas seleccionadas se sembraron por separado en 3 ml de medio LB líquido con ampicilina (100 mg/ml), durante toda la noche a 37°C y 200 rpm. Al día siguiente, se tomaron 1.5 ml de cada cultivo y se colocaron en tubos de microcentrifuga, se empastillaron las células centrifugándolas a 4°C por 5,000 rpm durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y las pastillas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 15 min, posteriormente se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante el kit GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo Fisher).

La pastilla se trató con 250 µl de solución de resuspensión, se agitó por 3 s, y después se adicionaron 250 µl de la solución de lisis, se invirtió el tubo de 4 a 6 veces hasta obtener una consistencia viscosa. Se añadieron 350 µl de la solución de neutralización e inmediatamente se invirtió el tubo 4 a 6 veces, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min, y el sobrenadante se transfirió a la columna GeneJET, se centrifugó a 14,000 rpm por 1 min, se descartó el sobrenadante, se agregó 500 µl de la solución de lavado, se centrifugó a 14,000 rpm 1 min y se volvió a descartar el sobrenadante. Este último paso se repitió y se transfirió la columna a

un tubo nuevo. Se agregó 50 µl de buffer de elución en el centro de la columna incubándose por 2 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min, y finalmente se almacenó el ADN plasmídico a -20°C. El contenido de la elución se cuantificó por espectrofometría en el equipo NanoDrop 2000 y se observó su integridad en un gel de agarosa al 0.8 %.

Una vez obtenido el ADN plasmídico se realizó una reacción de PCR usando Taq DNA polimerasa (Invitrogen). En tubos de 1.5 ml, se agregó la siguiente mezcla de reacción: 0.5 µl iniciadores específicos para la región NS4B-NS5 de DENV y ZIKV (1:100), 1 µl de Buffer PCR (10X), 0.2 µl de dNTPs (10 mM), 0.3 µl de MgCl₂, 0.5 µl de la enzima Taq Polimerasa, 1 µl de DNA plasmídico hasta completar un volumen final de 10 µl con agua de ampollita. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una temperatura a 94°C 6 min; seguido de 40 ciclos a tres temperaturas 94°C por 45 s, 68°C por 30 s y 72°C por 30 s, una temperatura final de 72°C por 10 s.

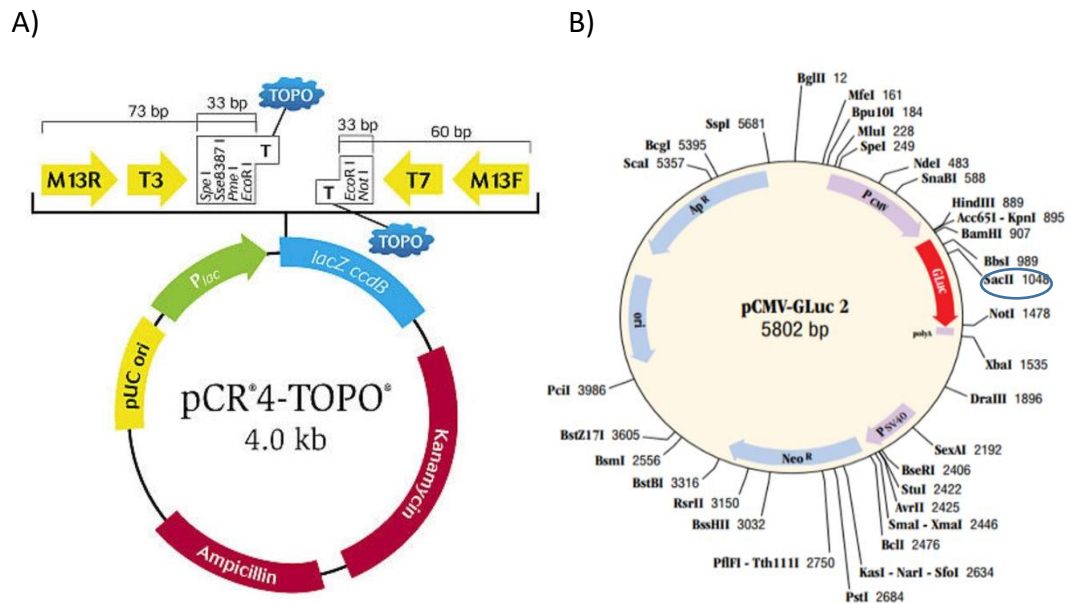


Figura 10: Mapa de restricción del vector pCR4 TOPO y pCMV-Gluc2

A) Mapa de restricción del vector Topo. B) Mapa de restricción del vector pCMV-Gluc2. El círculo azul se señala el sitio de corte para la enzima de restricción *SacII*.

7.5 Transformación de células DH5α con el vector pCMV-GLuc2

La transformación de células competentes de *E. Coli* se realizó mediante la técnica de choque térmico. Para esto, en tubos de microcentrifuga se mezclaron 50 µl de células competentes (DH5α) y 0.2 µg de ADN plasmídico pCMV-GLuc2. Los tubos se incubaron durante 30 min en hielo. Luego las células fueron sometidas a un choque térmico a 42°C durante 90 s, e inmediatamente se incubaron en hielo por 3 min. Posteriormente se añadió a cada tubo 200 µl de medio LB líquido y se incubaron a 37°C a 200 rpm por 45 min, para permitir la recuperación de las células sometidas a choque térmico y la expresión del fenotipo resistente a ampicilina que se manifiesta en células que han adquirido el plásmido. Toda la mezcla se espatuló en placas con medio LB con ampicilina para seleccionar a las transformantes resistentes y se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente se observó la selección de las clonas resistentes que han adquirido el plásmido y de éstas se extrajo el ADN plasmídico mediante el kit GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo Fisher), descrito anteriormente.

7.6 Subclonación de la región NS4B-NS5 de DENV y ZIKV en el vector de expresión pCMV-GLuc2

El vector pCMV-GLuc2 y la construcción de NS4B-NS5 en el vector TOPO se sometieron a restricción con la endonucleasa *SacII* (Biolabs). En tubos de 1.5 ml se agregó la siguiente mezcla de reacción: 1 µl de buffer CutSmart (10X), 1 µl de la enzima de restricción *SacII*, 1 µl de ADN plasmídico, hasta completar un volumen final 10 µl con agua libre de nucleasas. Se incubaron a 37° C durante toda la noche. Posteriormente se analizó la migración electroforética en geles de agarosa al 0.8%. Posteriormente, el vector pCMV-Gluc2 digerido, se trató con la enzima fosfatasa alcalina utilizando el kit de Thermo Scientific fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase. Se tomó toda la reacción de digestión, 2 µl del buffer FastAP (10X), 1µl de la enzima fosfatasa alcalina (1 U/ 1µl), más la adición de agua libre de nucleasas para un volumen final de 20 µl. Se incubó a 37°C durante 10 min y a 80°C durante 20 min y se purificó a partir de geles de agarosa al 0.8%.

Para la ligación del vector pCMV-GLuc2 y la región NS4B-NS5 liberada del vector TOPO, se realizó una reacción tomando en cuenta una relación vector: inserto 1:3, 1 µl de enzima T4 DNA ligasa (1 U/L) (Invitrogen), 4 µl de buffer de ligasa T4 (5X) y se llevó a un volumen final de 10 µl con agua libre de nucleasas. Como control negativo se preparó una reacción de ligación sin inserto. Las reacciones de ligación se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente. Los productos de las reacciones de ligación fueron empleadas para transformar células *E.coli* DH5α competentes. Todas las construcciones fueron expandidas y purificadas mediante el kit GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo Fisher) mencionado anteriormente.

Para confirmar que se insertó la región NS4B-NS5 en el vector pCMV-Gluc2, todas las construcciones fueron digeridas con enzimas de restricción *StuI* y *BamHI* (Biolabs). En tubos de 1.5 ml se agregó la siguiente mezcla de reacción: 1 µl de buffer CutSmart (10X), 1 µl por cada enzima de restricción, 1 µl BSA (1:10), 1 µl de ADN plasmídico, hasta completar un volumen final de 10 µl con agua libre de nucleasas. Se incubaron a 37°C durante 2 h y media. Posteriormente se analizó la migración electroforética en geles de agarosa al 1%. Una vez que se observó un fragmento del tamaño esperado se procedió a identificar la secuencia de cada construcción. Las construcciones para DENV se nombraron pDENV4B5-GLuc, mientras que las construcciones para ZIKV se nombraron pZIKV4B5-GLuc.

7.7 Secuenciación tipo Sanger de las construcciones virales

El ADN purificado de todas las construcciones se marcó con el kit Big Dye Versión 3.1 (Thermo Fisher cat: 4337455). Para esto se hizo la siguiente mezcla de reacción: 3.2 pmol de primer T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'), 350 ng de ADN plasmídico, 3 µl de Buffer (5X), 2 µl del Big Dye v3.1, hasta completar un volumen final de 20 µl con agua libre de nucleasas. A esta mezcla de reacción se sometió a las siguientes temperaturas en un termociclador (Applied Biosystems): 96° por 6 min; seguido de 40 ciclos de tres temperaturas: 96°C por 10 s, 50°C por 5 s, 60°C por 4 min; y dos temperaturas finales de 60°C por 10 s y 60°C por 30 s.

Una vez terminado el marcaje del ADN, se realizó una cromatografía de exclusión con las columnas DyeEx 2.0 (Qiagen) para la remoción de los dideoxinucleótidos no incorporados a la

secuencia de ADN de todas las construcciones virales durante el proceso de ciclado, para lo cual las columnas se centrifugaron a 2,700 rpm durante 3 min en una centrifuga refrigerada (Beckman), para empaquetar la columna, posteriormente, se les retiró el borde inferior y se centrifugaron nuevamente para desechar el buffer de hidratación de la resina, las columnas se depositaron en tubos de 1.5 ml, y se añadió los 20 µl de la reacción de PCR de secuenciación, por último, se centrifugaron una vez más para eluir el ADN purificado. El ADN eluido y purificado se colocó en una centrifuga de vacío con rotor fijo (Eppendorf) por una hora a temperatura ambiente con el objetivo de deshidratar el ADN, por último, se almacenó a -20°C, cubierto de la luz hasta su uso.

El ADN liofilizado se resuspendió con 15 µl de formamida desionizada (Applied Biosystems) para llevar a cabo la electroforesis capilar, las muestras resuspendidas se agregaron en microplacas ópticas de 96 pozos (Applied Biosystems). En el secuenciador ABI Prism 3130 (ThermoFisher), se programó en la computadora las coordenadas de cada muestra en el software genetic analyzer Data Collection, así como el protocolo de electrocinesis el cual se realizó con un módulo estándar para un capilar de 50 cm con polímero tipo 7 (Applied Biosystems) por 2 h aproximadamente.

7.7.1 Análisis de las secuencias obtenidas por electroforesis capilar

La secuencia obtenida de los plásmidos pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc, se analizó utilizando el software Clustal W y se hizo la comparación con la secuencia del genoma de DENV (NC_001474.2) y ZIKV (KY120349.2).

7.8 Transfección de las construcciones pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc en células Vero

7.8.1 Transfección transitoria

Una vez que se amplificaron y purificaron las construcciones pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc. 5×10^5 cel/pozo se sembraron en placas de 24 pozos y se incubaron en condiciones normales, al día siguiente las células fueron transfectadas mediante lipofección en condiciones de estabilidad: (reacción de transfección para un pozo), en un tubo de 1.5 ml se colocó 1 μ g de las construcciones pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc y se mezclaron con 25 μ l de medio MEM, por otro lado, en otro tubo se colocó 2 μ l de lipofectamina 2000 (invitogen) y se mezcló con 25 μ l de medio DMEM, ambos tubos se mezclaron por pipeteo, incubándose por 5 min a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos de transfección. Durante el tiempo de incubación, se retiró el medio a las células y se lavaron 2 veces con PBS a pH 7.0. Se adicionaron los complejos de transfección (100 μ l) correspondientes a cada pozo más 150 μ l de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y glutamina (200mM), incubándose a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% por 24 h.

7.8.2 Transfección estable

Para establecer líneas celulares estables, las construcciones pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc se transfectaron en células Vero mediante lipofección, siguiendo el protocolo antes mencionado.

Las células transfectadas se sembraron en placas de 24 pozos a diferentes densidades (50,000 - 100,000 y 200,000 células/ml) más la adición de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y glutamina (200mM) y se incubaron al 5% CO₂ por 24 h. Al día siguiente se desechó el medio y se reemplazó por medio nuevo más antibiótico G418 Neomicina (Roche) 700, 800, 1000 ng/ml. Se reemplazó el medio selectivo cada tercer día, observando el porcentaje de células sobrevivientes. Obteniendo como resultado que la gran mayoría de

células mueren en un tiempo de 4 semanas a una concentración de 700 ng/ ml. Esta concentración debe usarse para la selección de una línea celular establemente transfectada.

7.8.3 Ensayo de selección de clones de células establemente transfectadas mediante dilución limitante

Una vez que las células se transfectaron con éxito, el siguiente paso fue sembrar y seleccionar la línea celular transfectada en una placa de 96 pozos para obtener colonias puras mediante dilución limitada. Se sembraron 1, 3 y 6 células transfectadas en placas de 96 pozos más la adición de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y glutamina (200 mM) y 0.7 µg/ml de G418 Neomicina (Roche), las placas se cultivaron a 37°C en una incubadora al 5% CO₂ durante 7 días, revisando todos los días las placas y cambiando el medio selectivo cada tercer día. En el caso de que se observará una sola colonia por pozo se transfirió a una placa de 24 pozos, hasta obtener suficientes células para congelar y almacenar a -70°C.

A las células transfectadas establemente se les retiró el medio y se lavaron con PBS a pH 7.0. Se añadió 1.5 ml de tripsina-EDTA (0.025% Tripsina, 0.5 mM EDTA pH 7.2) y se dejó actuar por 2 min a 37°C, se retiró la tripsina y se incubó por 2 min a 37°C. Para inactivar la tripsina se añadió 1.5 ml de medio de cultivo conteniendo SFB al 10%, y se mezcló por pipeteo. La mezcla, se centrifugó a 1,000 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante y se agregó el medio de congelación compuesto por 90% de suero fetal bovino y 10% de DMSO, hasta completar un volumen de 10 ml. En cada criotubo se añadió 1 ml de la mezcla y se almacenó a -80°C en el ultracongelador dentro de un recipiente de congelación, el cual contenía isopropanol (Thermo Scientific). Para la descongelación de células, inmediatamente los criotubos se introdujeron en baño maría a 37°C. Una vez descongeladas las células, se resuspendieron en 9 ml de medio de cultivo, se centrifugaron a 1,000 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante y la pastilla resultante de células se resuspendió en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y glutamina (200 mM) más 0.7 µg del antibiótico neomicina (50 mg/ml) y se cultivaron a 37°C en una incubadora al 5% CO₂.

7.8.4 Infección de las células transfectadas

Las células transfectadas, se lavaron con PBS a pH 7.0, se infectaron con DENV y ZIKV a una multiplicidad de infección (MOI) de 3, se incubaron a 37°C en una incubadora al 5% de CO₂, homogenizando cada 15 min durante 1 h. Posteriormente se eliminó el medio y se reemplazó por medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 2% y glutamina (200mM) más 0.7 µg del antibiótico G418 (50 mg/ml) solo en las células transfectadas establemente y se cultivaron a 37°C en una incubadora al 5% de CO₂. Después de 24 h de infección se determinó la infección de cada virus mediante la detección de la actividad de GLuc en lisados celulares.

7.8.5 Detección de la actividad de la proteína luciferasa de *Gaussia*

Para determinar la actividad de la luciferasa se utilizó el kit Renilla Luciferase Assay System (Promega). Es importante aclarar que tanto la proteína luciferasa de *Gaussia* como la de Renilla pueden utilizar el mismo sustrato. Las células establemente transfectadas (1x10⁵ de células/pozo en placa 96 pozos) e infectadas con DENV y ZIKV se lavaron con PBS a pH 7.0 y se lisaron con 100 µl del buffer de lisis y se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente 20 µl del lisado celular se mezclaron con el mismo volumen del sustrato, se mezcló por pipeteo e inmediatamente se determinó el nivel de luminiscencia en el Luminómetro Glomax (Promega) con 2 s de retardamiento antes de cada lectura.

7.8.6 Análisis estadísticos

El análisis estadístico fue realizado usando el Software package GraphPad Prism 8.0. Las medias se compararon mediante la prueba de t-student. Las diferencias se consideraron significativas a partir de p<0.05.

VIII. RESULTADOS

8.1 Construcción y caracterización DENV y ZIKV en un plásmido reportero

Los plásmidos reporteros de DENV (pDENV4B5-GLuc) y de ZIKV (pZIKV4B5-GLuc), se diseñaron con la finalidad de detectar el nivel de infección por dichos virus, utilizando como indicador el procesamiento proteolítico realizado por la proteasa viral NS2B3. En las células transfectadas con los plásmidos e infectadas con el virus, deberá darse el procesamiento proteolítico mediado por NS2B3, en el sitio de corte entre NS4B y NS5 y así se podrán detectar cambios en la expresión de GLuc que nos indican que las células están infectadas.

Para la construcción de ambos reporteros, se eligió uno de los sitios de corte de la proteasa viral presente en la poliproteína viral, se utilizó la secuencia de dos proteínas no estructurales, NS4B (últimos 150 nt) y NS5 (los primeros 150 nt) para DENV y NS4B (últimos 150 nt) y NS5 (los primeros 140 nt) para ZIKV. Dichas secuencias se insertaron en el plásmido reportero pCMV-GLuc2 (Promega), como se indica en la sección de materiales y métodos. La región NS4B-NS5 se amplificó mediante RT-PCR, utilizando como molde el ARN de DENV y ZIKV y los iniciadores específicos para DENV y ZIKV, obteniendo los productos de amplificación esperados, en el caso de DENV de 300 pb y de ZIKV de 290 pb (Fig. 11).

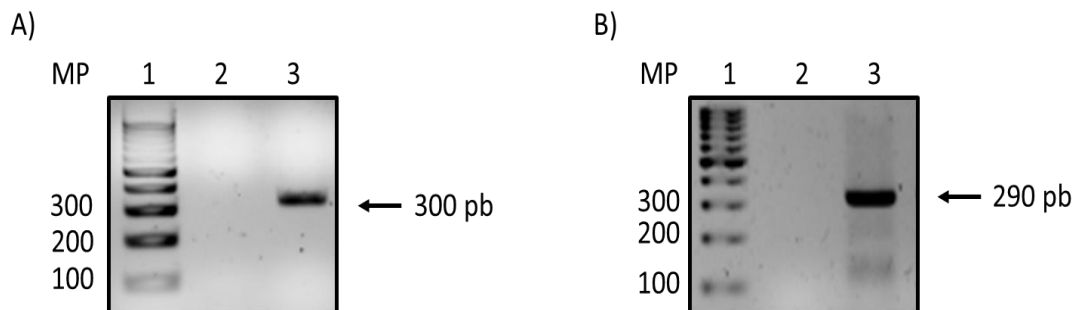


Figura 11: Amplificación de la región de NS4B-NS5 de DENV y ZIKV mediante RT-PCR

A) Productos de amplificación de la región de NS4B-NS5 de DENV. **1:** Marcador de tamaño molecular, escalera de 100 pb, **2:** Control negativo, **3:** Productos de amplificación de la región de NS4B-NS5 de DENV. B) Producto de amplificación de la región de NS4B-NS5 de ZIKV. **1:** Marcador de tamaño molecular, escalera de 100 pb, **2:** Control negativo, **3:** Productos de amplificación de la región de NS4B-NS5 de ZIKV. A la derecha se indica el tamaño aproximado del amplicón.

En ambos casos, se consideró en el diseño de los iniciadores la secuencia del sitio de corte para la enzima de restricción *SacII*, el cual se utilizará para el procedimiento de subclonación. El amplicón correspondiente a la región NS4B-NS5 de DENV y ZIKV se purificó y una alícuota de dicho material se separó en un gel de agarosa 2%, dando como resultado una banda del tamaño esperado de 300 pb para DENV y de 290 pb para ZIKV (Fig. 12).

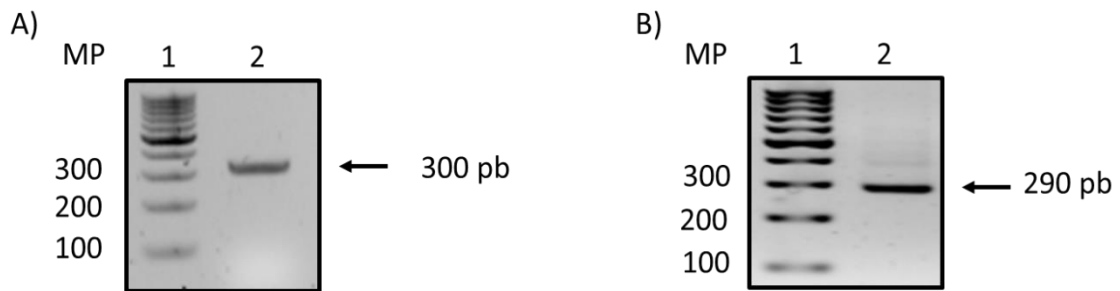


Figura 12: Extracción y purificación del amplicón NS4B-NS5 de DENV y ZIKV

A) Extracción y purificación del amplicón NS4B-NS5 de DENV. **1:** Marcador de tamaño molecular, escalera de 100 pb, **2:** Purificación del amplicón NS4B-NS5 de DENV. B) Extracción y purificación del amplicón NS4B-NS5 de ZIKV. **1:** Marcador de tamaño molecular, escalera de 100 pb, **2:** purificación del amplicón NS4B-NS5 de ZIKV. A la derecha se indica el tamaño aproximado del amplicón.

8.2 Clonación del amplicón NS4B-NS5 de DENV y ZIKV en el vector TOPO

El amplicón correspondiente a la región NS4B-NS5 de DENV y ZIKV, se clonó en el vector TOPO, como se describe en la sección de materiales y métodos. Este vector de tránsito fue empleado debido a que es muy rápido y eficiente, dando como resultado la obtención de hasta el 95% de clonas recombinantes. Las colonias que crecieron en el medio con ampicilina fueron utilizadas para hacer minipreparaciones de ADN y así verificar la presencia del plásmido, obteniendo una banda de 4,300 pb y de 4,290 pb correspondiente al tamaño del vector TOPO y la región NS4B-NS5 de DENV y ZIKV (Fig. 13).

Los plásmidos purificados se utilizaron para corroborar que la región NS4B-NS5 de DENV (TOPO-NS4B-NS5-DENV) y de ZIKV (TOPO-NS4B-NS5-ZIKV) estuviera clonada en el vector TOPO. Así, se realizó una PCR utilizando los iniciadores específicos para el fragmento de NS4B-NS5 de DENV o de ZIKV mencionadas en la sección de materiales y métodos. Como se puede

observar en la figura 14, a partir de ADN plasmídico de las colonias candidatas se obtuvo un amplicón de 300 pb que corresponde al tamaño específico de la región NS4B-NS5 para DENV, así como un amplicón de 290 pb correspondiente a la región NS4B-NS5 de ZIKV (Fig. 14).

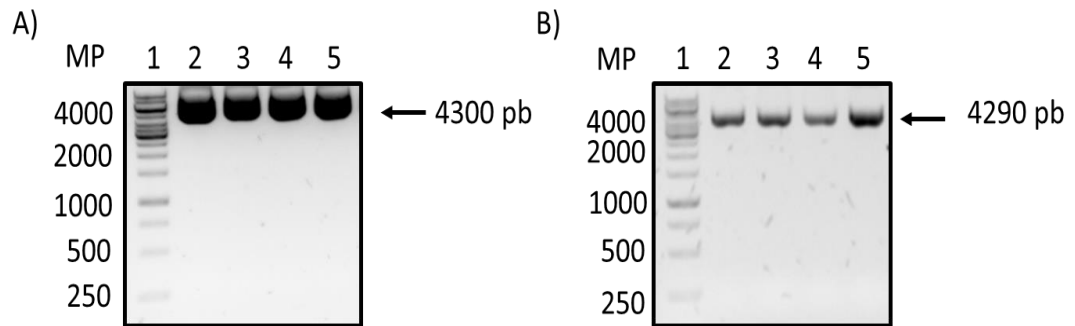


Figura 13: Extracción de ADN plasmídico de DENV y ZIKV del vector TOPO

A) Extracción de ADN plasmídico de DENV. **1:** Marcador de tamaño molecular, escalera de 1Kb, **2-5:** ADN plasmídico obtenido a partir de clonas candidatas TOPO-NS4B-NS5-DENV. B) Extracción de ADN plasmídico de ZIKV. **1:** Marcador de tamaño molecular, escalera de 1Kb, **2-5:** ADN plasmídico obtenido a partir de clonas candidatas de TOPO-NS4B-NS5-ZIKV. A la derecha se indica el tamaño aproximado del plásmido de TOPO-NS4B-NS5-DENV y TOPO-NS4B-NS5-ZIKV.

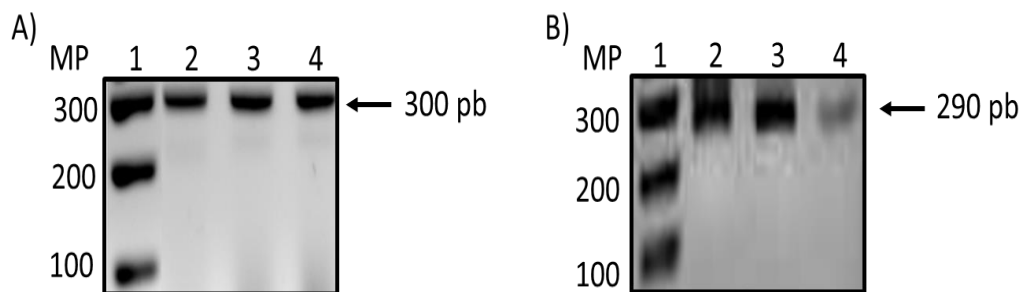


Figura 14: Amplificación de la región NS4B-NS5 de DENV y ZIKV de las clonas candidatas

A) Amplificación de la región NS4B-NS5 de DENV a partir del ADN plasmídico de las candidatas. **1:** Marcador de tamaño molecular, escalera de 100 pb, **2:** Clonas positivas para TOPO-NS4B-NS5-DENV. B) Amplificación de la región NS4B-NS5 de ZIKV a partir del ADN plasmídico de las candidatas. **1:** Marcador de tamaño molecular, escalera de 100 pb, **2:** Clonas positivas para TOPO-NS4B-NS5-ZIKV. Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. A la derecha se indica el tamaño aproximado del amplicón.

8.3 Subclonación de la región NS4B-NS5 en el Plásmido Reportero pCMV-GLuc2

Los plásmidos que resultaron positivos a la amplificación de la región de interés se utilizaron para llevar a cabo el procedimiento de subclonación en el vector de expresión pCMV-Gluc2. Primeramente, se liberó el ADN que codificaba para la región NS4B-NS5 DENV y ZIKV del vector TOPO en el que fueron clonados inicialmente, para la cual se utilizó la enzima de restricción *SacII*. Como resultado de las digestiones, se obtuvieron bandas de 300 y 290 pb, que correspondían al tamaño esperado de la región de NS4B-NS5 DENV y ZIKV (Fig. 15 A y B).

Por otro lado, el plásmido pCMV-Gluc2 se trató con fosfatasa alcalina, para remover los grupos fosfatos y obtener el vector linearizado, dado que rio arriba de dicho sitio de restricción se encuentra la secuencia de luciferasa de *Gaussia*, el cual se utilizó como gen reportero, obteniendo un tamaño esperado de 5802 pb. El ADN resultante de las digestiones de las construcciones TOPO-NS4B-NS5-DENV y TOPO-NS4B-NS5-ZIKV y pCMV-Gluc2 se purificaron mediante geles de agarosa y se ligaron para después transformar bacterias DH5 α y posteriormente se seleccionaron las clonas candidatas reconocidas por su resistencia a ampicilina.

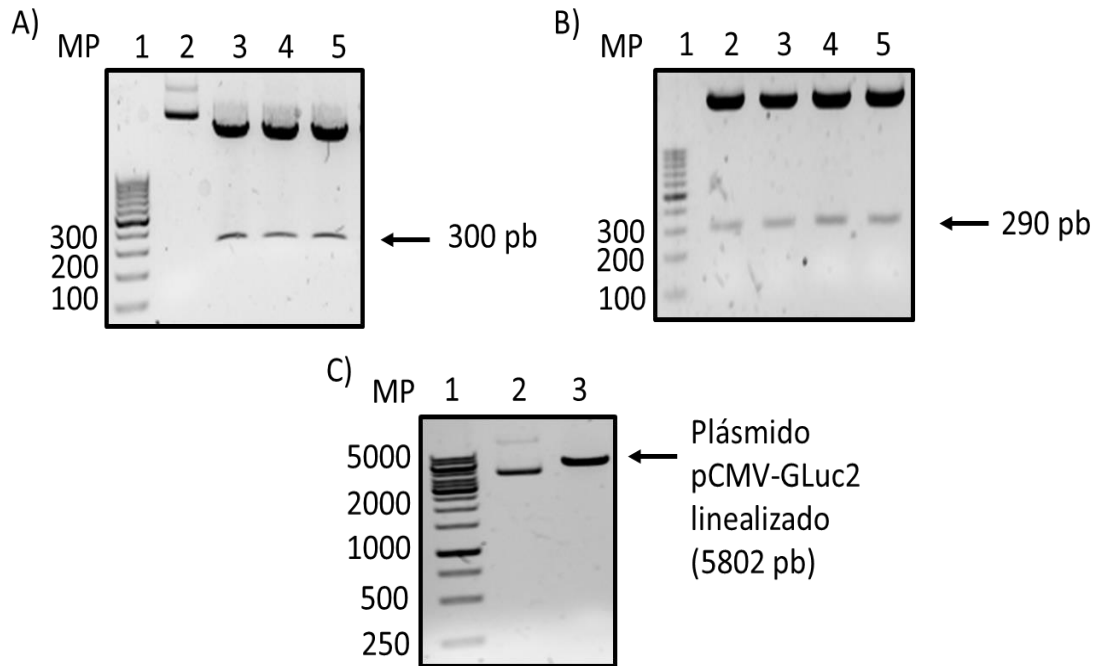
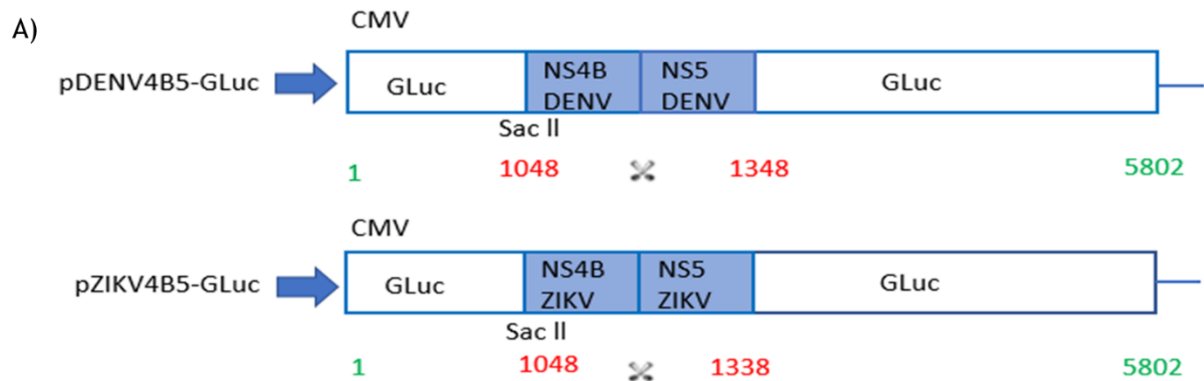


Figura 15: Digestiones de las construcciones TOPO-NS4B-NS5-DENV y TOPO-NS4B-NS5-ZIKV y el vector pCMV-GLuc2

A) Liberación de la región NS4B-NS5 DENV. **1:** Marcador de tamaño molecular, escalera de 100 pb, **2:** TOPO-NS4B-NS5-DENV sin digerir. **3-5:** TOPO-NS4B-NS5-DENV digerido con la enzima de restricción *SacII*. B) Liberación de la región NS4B-NS5 ZIKV. **1:** Marcador de tamaño molecular, escalera de 100 pb, **2-7:** TOPO-NS4B-NS5-ZIKV digerido con la enzima de restricción *SacII*. C) Digestión del vector pCMV-Gluc2. **1:** Marcador de tamaño molecular, escalera de 1 kb, **2:** pCMV-Gluc2 sin digerir, **3:** pCMV-Gluc2 linealizado con la enzima *SacII* tratado con fosfatasa alcalina. A la derecha se indica el tamaño aproximado de la digestión.

Las clonas de NS4B-NS5 para DENV y ZIKV en el vector pCMV-Gluc2 se denominarán en adelante pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc respectivamente. En la figura 16, se encuentra un esquema de la localización del inserto en el vector pCMV-Gluc2.



B)

Secuencia de aminoácidos en la región NS4B-NS5 insertada en GLuc

PRGPISLWEGNPGRFWNTTIAVSMANIFRGSYLAGALLFSIMKNTTNT**RRGTGN**IGETLGEKWKSRLNALGKSEFGIYKKSGI
QEVDRTLAKEGIKRGET

Secuencia de aminoácidos en la región NS4B-NS5 insertada en GLuc

PRHFVGRLESEQVLELLYSHFTVHFGKLLGWSFNSNLHSNKKRWLGQETWGW**NRDPGR**EMEGPLEPDVGPVLLQKVRHHR
GVQRRGPPRPQGRCG

Figura 16. Esquema de la posición en la que se insertó la secuencia de NS4B-NS5 en el plásmido pCMV-GLuc2

A) Esquema de la construcción del plásmido pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc, que dirige la expresión de la proteína GLuc bajo el promotor de CMV. B) Secuencia de aminoácidos para los cuales codifica el inserto NS4B-NS5 en el caso de DENV y ZIKV, en negritas se encuentra el sitio de corte para la enzima de restricción *SacII* y de color rojo se encuentra el sitio de corte de la proteasa viral NS2B3.

Las clonas candidatas de pDENV4B5-GLuc se utilizaron para llevar a cabo un análisis de restricción mediante una doble digestión, usando enzimas de restricción *StuI* y *BamHI*. La reacción de restricción mencionada liberará en la clonas positivas un fragmento de 1815 pb correspondiente a 1500 pb del vector pCMV-GLuc2 más 300 pb DENV que constituyen la región NS4B-NS5. Aquellas clonas en la que la doble digestión resultó en un fragmento de una longitud de 1500 pb se consideraron como vector vacío ya que no contenía en su interior la región NS4B-NS5 (Fig. 17).

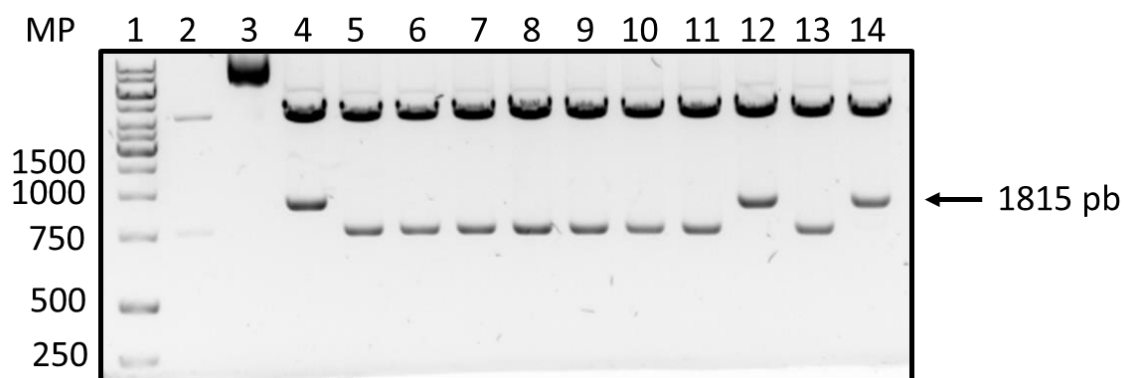


Figura 17: Análisis de restricción de la construcción pDENV4B5-GLuc con las enzimas *StuI* y *BamHI*
Análisis de restricción de las construcciones de pDENV4B5-GLuc. **1:** Marcador de tamaño molecular, escalera de 1 kb, **2:** pCMV-GLuc2 vacío, control positivo, **3:** pDENV4B5-GLuc sin digerir, **4-14:** Doble digestión de las construcciones con las enzimas *StuI* y *BamHI*. Las muestras se separaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio. A la derecha se indica el tamaño aproximado de la digestión.

Las clonas que resultaron positivas en el análisis de restricción fueron secuenciadas y los resultados de la comparación de la secuencia obtenida con la secuencia reportada para DENV o ZIKV, se puede observar en la figura 18-19. La secuencia de DENV tiene algunos cambios sinónimos con respecto a la secuencia del genoma viral (NC_001474.2) sin embargo, ninguno de estos cambios afecta la secuencia que codifica para los aminoácidos reconocidos por la proteasa viral. En el caso de ZIKV se encontró que la secuencia de nucleótidos insertada en el vector pZIKV4B5-GLuc es idéntica a la reportada para el genoma viral (KY120349.2).

En resumen, los resultados del análisis de la secuenciación, muestran que la región NS4B-NS5 está clonado en el vector pCMV-GLuc2 en sentido, así se tiene una proteína GLuc modificada, la cual será utilizada en la siguiente etapa del proyecto para la detección temprana de células infectadas por DENV y ZIKV.

```

pDENV4B5-GLuc   CAGCAACTTCGCGACCACGGATCTCGATGCTGACCGCGGGGGCCCATCTCCACATTGTGG
NS4B-NS5        -----GGGGCCCATCTCCACATTGTGG
                                     *****

pDENV4B5-GLuc   GAAGGAAATCCAGGGAGGTTTTGGAACACTACCATTGCAGTGTCAATGGCTAACATTTTT
NS4B-NS5        GAAGGAAATCCAGGGAGGTTTTGGAACACTACCATTGCAGTGTCAATGGCTAACATTTTT
                                     *****

pDENV4B5-GLuc   AGAGGGAGTTACTTGGCCGGAGCTGGACTTCTCTTTCCATCGTGAAGAACACAACCAAC
NS4B-NS5        AGAGGGAGTTACTTGGCCGGAGCTGGACTTCTCTTTCTATTATGAAGAACACAACCAAC
                                     *****

pDENV4B5-GLuc   ACGAGAAGGGGAACTGGCAACATAGGAGAGACGCTTGGAGAGAAATGGAAAAGCCGATTG
NS4B-NS5        ACAAGAAGGGGAACTGGCAACATAGGAGAGACGCTTGGAGAGAAATGGAAAAGCCGATTG
                                     ** *****

pDENV4B5-GLuc   AACGCATTGGGGAAAAGTGAATTCCAGATCTACAAGAAAAGTGGAAATCCAGGAAGTGGAT
NS4B-NS5        AACGCATTGGGGAAAAGTGAATTCCAGATCTACAAGAAAAGTGGAAATCCAGGAAGTGGAT
                                     *****

pDENV4B5-GLuc   AGAACCTTAGCAAAAGAAGGCATTAAGAGGAGAAACGCCGCGGGAAGTTGCCCGCAA
NS4B-NS5        AGAACCTTAGCAAAAGAAGGCATTAAGAGGAGAAACG-----
                                     *****

pDENV4B5-GLuc   GAAGCTGCCGCTGGAGGTGCTCAAAGAGATGGAAGCCAATGCCCGGAAAGCTGGCTGCAC
NS4B-NS5        -----

```

Figura 18: Análisis de la secuencia obtenida del vector pDENV4B5-GLuc

Alineamiento de la región NS4B-NS5 del genoma de DENV (NC_001474.2) comparada con la secuencia obtenida del plásmido pDENV4B5-GLuc. En rojo se señalan los cambios de nucleótidos entre ambas secuencias, en verde se encuentra el sitio de corte para la enzima de restricción *SacI* y en azul el sitio de corte de la proteasa viral NS2B3.

```

pZIKV4B5-GLuc   CCGTGGCCAGCAACTTCGCGACCACGGATCTCGATGCTGACCGCGGCACCTTTGTGGGAAG
NS4B-NS5        -----CCGCGGCACCTTTGTGGGAAG
                *****

pZIKV4B5-GLuc   GCTCTCCGAACAAGTACTGGAACTCCTCTACAGCCACTTCACTGTGTAACATTTTTAGGG
NS4B-NS5        GCTCTCCGAACAAGTACTGGAACTCCTCTACAGCCACTTCACTGTGTAACATTTTTAGGG
                *****

pZIKV4B5-GLuc   GAAGTTACTTGGCTGGAGCTTCTCTAATCTACACAGTAACAAGAAACGCTGGCTTGGTCA
NS4B-NS5        GAAGTTACTTGGCTGGAGCTTCTCTAATCTACACAGTAACAAGAAACGCTGGCTTGGTCA
                *****

pZIKV4B5-GLuc   AGAGACCTGGGGGTGGAACAGGAGAGACCCTGGGAGAGAAATGGAAGGCCCGCTTGAACC
NS4B-NS5        AGAGACCTGGGGGTGGAACAGGAGAGACCCTGGGAGAGAAATGGAAGGCCCGCTTGAACC
                *****

pZIKV4B5-GLuc   AGATGTCGGCCCTGGAGTTCTACTCCTACAAAAAGTCAGGCATCACCGAGGTGTGCAGAG
NS4B-NS5        AGATGTCGGCCCTGGAGTTCTACTCCTACAAAAAGTCAGGCATCACCGAGGTGTGCAGAG
                *****

pZIKV4B5-GLuc   AAGAGGCCCGCCGCGCCCTCAAGGACGGTGTGGCAACCGCGGGAAGTTGCCCGGCAAGAA
NS4B-NS5        AAGAGGCCCGCCGCGCCCTCAAGGACGGTGTGGCAA-----
                *****

pZIKV4B5-GLuc   GCTGCCGCTGGAGGTGCTCAAAGAGATGGAAGCCAATGCCCGGAAAGCTGGCTGCACCAG
                -----

```

Figura 19: Análisis de la secuencia obtenida del vector pZIKV4B5-GLuc

Alineamiento de la región NS4B-NS5 del genoma de ZIKV (KY120349.2) comparada con la secuencia obtenida del plásmido pZIKV4B5-GLuc. En verde se encuentra el sitio de corte para la enzima de restricción *SacII* y en azul el sitio de corte de la proteasa viral NS2B3.

8.4 Determinación de la infección por DENV y ZIKV usando pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc

La siguiente etapa del estudio consistió en utilizar la función de la proteasa viral NS2B3 generada durante el ciclo replicativo de DENV y ZIKV como una herramienta en la detección de la infección. Lo anterior es posible mediante la transfección de los plásmidos reporteros pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc que se han generado y así usar los cambios en la expresión de GLuc para determinar que las células están siendo infectadas por estos virus.

La línea celular Vero, proveniente de riñón de mono verde africano, consiste de células de mamífero altamente susceptibles a la infección por flavivirus que se usarán como modelo celular para la detección de la infección por DENV y ZIKV.

Las células Vero se transfectaron con los plásmidos pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc; para obtener un sistema en el que se expresa de manera transitoria a la proteína GLuc, mediado por el promotor de citomegalovirus (CMV). Se espera que las células transfectadas en ausencia de infección sean capaces de secretar GLuc, debido a que la proteína GLuc contiene en el extremo amino una señal de secreción extracelular de tal manera que se puede detectar en el sobrenadante de las células transfectadas sin la necesidad de lisis celular.

Por otro lado, los plásmidos pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc se transfectaron en células Vero, dichas células se infectaron y a las 24 h post-infección se recogió el sobrenadante, en el cual no fue posible detectar la señal de luciferasa en ninguno de los tres experimentos independientes que se realizaron. Una de las posibles explicaciones de este resultado es que debido a la inserción de la región NS4B-NS5 se inhiba la secreción de la proteína GLuc.

Por lo anterior, se llevaron a cabo los experimentos de transfección, lisando las células 24 y 48 h postransfección y en estos casos tampoco se encontró a GLuc secretada, por lo que es muy probable que la inserción de los aminoácidos para DENV y para ZIKV correspondientes a la región de las proteínas no estructurales NS4B-NS5 más la secuencia de la enzima de restricción *SacII* inhibía la secreción de GLuc. Por lo tanto, los experimentos posteriores se llevaron a cabo incluyendo el paso de lisis celular antes de la detección de la actividad de GLuc.

Los plásmidos pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc se transfectaron en células Vero y a las 24 h postransfección se llevó a cabo la infección con DENV y ZIKV a una multiplicidad de infección (MOI) de 3. Después de 24 h se detectó la infección de cada virus mediante la actividad de GLuc en los extractos celulares y se comparó con la actividad en las células no infectadas. Como se muestra en la figura 20, la infección viral tanto en el caso de DENV como ZIKV produjo una disminución de actividad de GLuc de aproximadamente el 50%.

Nuestros datos muestran que la infección viral en células transfectadas con pZIKV4B5-GLuc e infectadas con ZIKV disminuye la expresión de GLuc en aproximadamente 51.24%, con respecto a las células transfectadas con dicho plásmido no infectadas.

Por otro lado, las células transfectadas con pDENV4B5-GLuc e infectadas con DENV disminuye al 59.78% la actividad de GLuc comparada con la actividad registrada en células solo transfectadas con dicho plásmido.

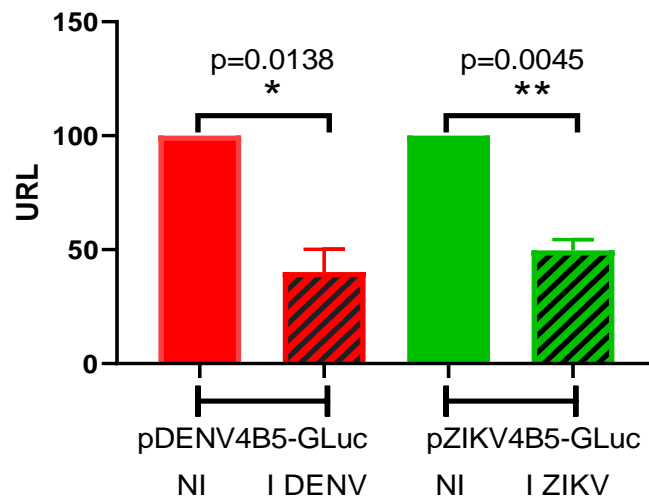


Figura 20: Detección de la infección por DENV y ZIKV en las células transfectadas transitoriamente

Los plásmidos reporteros pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc transfectados en células Vero, se infectaron con DENV y ZIKV durante 24 h, las células se infectaron con DENV y ZIKV a una MOI de 3. A las 24 h después de infección las células se lisaron. La infección se determinó mediante la actividad de GLuc. La grafica muestra el porcentaje de expresión de GLuc con respecto a cada plásmido no infectado (NI) o infectado (IF). Los datos mostrados corresponden a la media de los resultados obtenidos de 2 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos con las células transfectadas transitoriamente nos sugieren que la proteína GLuc modificada no puede ser secretada, aunque presente actividad y que dicha actividad se pierde o inhibe cuando es procesada en el extremo amino por la serin proteasa viral NS2B3 en el contexto de la infección.

En este estudio, el sistema desarrollado nos permite detectar de manera directa la infección viral de las células transfectadas transitoriamente con los plásmidos construidos, sin embargo, uno de los principales inconvenientes de las transfecciones transitorias es la diferencia en las eficiencias de transfección que se pueden tener entre cada experimento, lo cual nos llevó al desarrollo de líneas celulares establemente transfectadas con cada uno de los plásmidos.

El protocolo de la obtención de clonas de células Vero transfectadas con el plásmido que fueron resistentes al antibiótico de selección G418, nos permitió obtener al menos una clona de las células Vero establemente transfectadas con el plásmido pZIKV4B5-GLuc. Lo anterior se llevó a cabo usando el método de dilución limitante descrito previamente en la sección de materiales y métodos, dicha clona fue establecida usando 0.7 µg/ml de G418 durante 4 semanas.

Para determinar la presencia del plásmido pZIKV4B5-GLuc en células Vero, se obtuvo un extracto celular para extraer el ARN total, el cual se utilizó para amplificar la región NS4B-NS5 (contenida en el plásmido transfectado) mediante una reacción de RT-PCR. El producto de amplificación obtenido tenía el tamaño esperado para la región NS4B-NS5 de 290 pb (Fig. 21), lo que nos indica que las células Vero de la clona propagada contiene en su interior el sitio de corte de la proteasa viral, el cual corresponde a la región NS4B-NS5 clonada en el vector pZIKV4B5-GLuc.

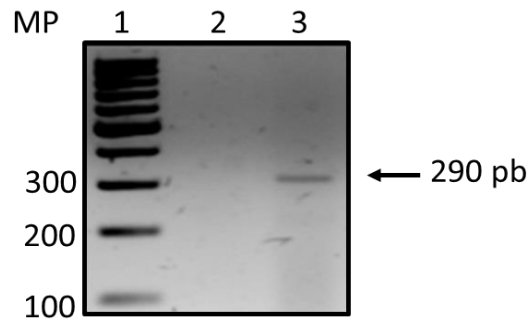


Figura 21: Amplificación de NS4B-NS5 mediante RT-PCR en células establemente transfectadas

Producto de amplificación de la región NS4B-NS5 de ZIKV, mediante RT-PCR. **1:** Marcador de tamaño molecular, escalera de 100 pb, **2:** Control negativo, **3:** Producto de amplificación de NS4B-NS5 de células establemente transfectadas. A la derecha se indica el tamaño aproximado del amplicón.

Posteriormente las células Vero establemente transfectadas con pZIKV4B3-GLuc se infectaron con ZIKV a una MOI de 3. A las 24 h de infección, las células se lisaron y enseguida se determinó la actividad de GLuc. Como se puede observar en la figura 22, el nivel de actividad de GLuc en células infectadas con ZIKV disminuyó en 37.9% cuando se compara con las células establemente transfectadas no infectadas.

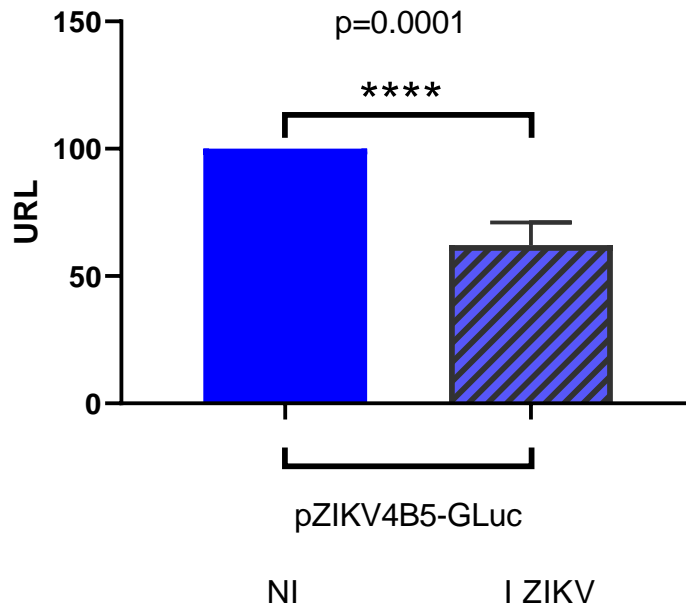


Figura 22: Detección de la infección por ZIKV en células establemente transfectadas

Se estableció una línea celular establemente transfectado con pZIKV4B5-GLuc usando 0.7 $\mu\text{g/ml}$ de G418 durante 4 semanas. Las células se infectaron con ZIKV a una MOI de 3. A las 24 h después de infección las células se lisaron. La infección se determinó mediante la actividad de GLuc. La grafica muestra el porcentaje de expresión de GLuc con respecto a línea celular establemente transfectada no infectada (NI) o infectada (I). Los datos mostrados corresponden al promedio de los resultados obtenidos de 4 experimentos independientes ($p > 0.05$).

Con el objetivo de determinar si la proteasa de DENV podría procesar la secuencia de corte contenida en NS4B-NS5 del plásmido reportero pZIKV4B5-GLuc en células transfectadas establemente. Dichas células fueron infectadas con DENV a una MOI de 3 y 24 h después de la infección, las células se lisaron y posteriormente se determinó la actividad de GLuc. Como se puede observar en la figura 23, el nivel de actividad de GLuc en células establemente transfectadas e infectadas con DENV disminuyo 38.78% con respecto a las células establemente transfectadas con el plásmido mencionado pero no infectadas.

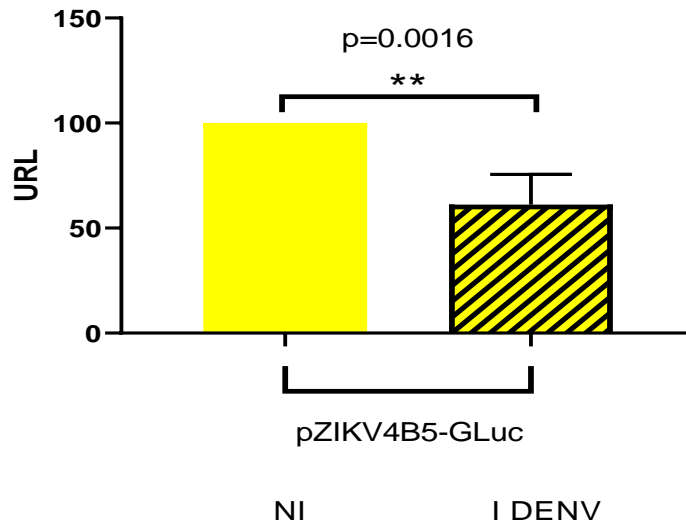


Figura 23: Detección de la infección por DENV en células establemente transfectadas

Línea celular establemente transfectada con pZIKV4B5-GLuc e infectada con DENV a una MOI de 3. A las 24 h después de la infección las células se lisaron. La infección se determinó mediante la actividad de GLuc. La grafica muestra el porcentaje de expresión de GLuc con respecto a línea celular establemente transfectada no infectada (NI) o infectada con DENV (I). Los datos mostrados corresponden el promedio de los resultados obtenidos de 4 experimentos independientes ($p > 0.05$).

Nuestros resultados indican que la proteína GLuc recombinante producida en las células Vero establemente transfectadas con pZIKV4B5-GLuc puede ser reconocida por la proteasa viral de DENV y realiza su actividad de corte entre las proteínas no estructurales NS4B-NS5 de ZIKV. Por lo tanto, es posible el uso de esta clona de células en la detección de la infección por DENV y así disminuir la actividad de GLuc en los lisados celulares.

Para corroborar esta hipótesis y descartar que los stocks virales usados hayan estado mezclados, decidimos analizar los sobrenadantes de células establemente transfectadas con pZIKV4B5-GLuc e infectadas con DENV y ZIKV. A partir de dicho material se realizó la extracción de ARN total de los sobrenadantes y luego se amplificó por RT-PCR, utilizando iniciadores específicos para la secuencia de la proteína estructural E del genoma de ZIKV, obteniendo un producto de amplificación de 994 pb, en el caso de los sobrenadantes de la infección por ZIKV. En las células transfectadas establemente e infectadas con DENV no se observó ningún amplificado correspondiente a la proteína E (Fig. 24A), así como en células no infectadas.

Por otro lado, se llevó a cabo una RT-PCR usando iniciadores específicos para NS4B-NS5 de DENV, con los cuales se obtuvo un amplicón de 300 pb solo en el caso de los sobrenadantes de las células establemente transfectadas e infectadas con DENV, mientras que en células establemente transfectadas e infectadas con ZIKV no se observó fragmento alguno (Fig. 24B), así como en células no infectadas.

Lo anterior nos confirma, que nuestro sistema de células establemente transfectadas con pZIKV4B5-GLuc puede detectar la infección por DENV y ZIKV, mediante la detección de la actividad de GLuc.

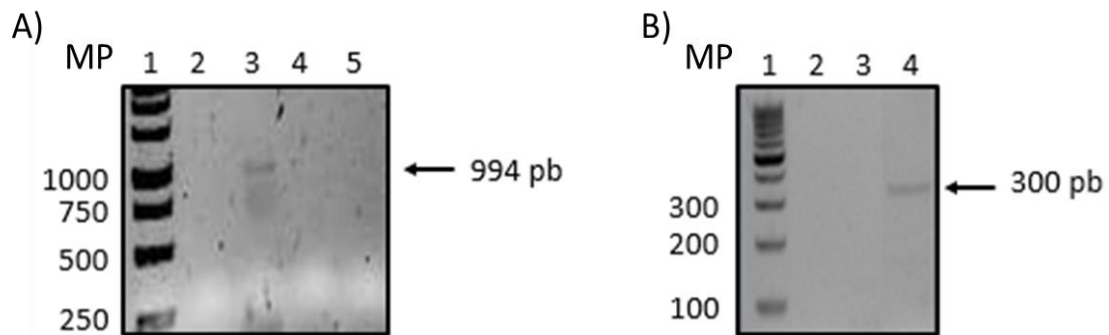


Figura 24: Producto de amplificación de la región del genoma correspondiente a la proteína E y NS4B-NS5 en la línea celular establemente transfectada e infectada con DENV y ZIKV

A) Producto de amplificación de la secuencia para la proteína E de ZIKV. **1:** Marcador de tamaño molecular, escalera de 1 Kb, **2:** Control negativo, **3:** Línea celular establemente transfectada e infectada con ZIKV, **4:** Línea celular establemente transfectada e infectada con DENV, **5:** Línea celular establemente transfectada sin infectar. B) Producto de amplificación para la región NS4B-NS5 de DENV. **1:** Marcador de tamaño molecular, escalera de 100 pb, **2:** Línea celular establemente transfectada sin infectar **3:** Línea celular establemente transfectada e infectada con ZIKV **4:** Línea celular establemente transfectada e infectada con DENV.

IX DISCUSIÓN

DENV y ZIKV son arbovirus que representan una grave carga sanitaria en zonas tropicales y subtropicales del mundo. Actualmente no existen medicamentos o vacunas eficaces para el tratamiento o la prevención de las infecciones por DENV o ZIKV.

Se ha demostrado que el procesamiento proteolítico de la poliproteína viral por la proteasa viral NS2B3, es un paso crucial en la replicación, propagación y progresión de la enfermedad por DENV y ZIKV, por lo tanto, es considerado un objetivo potencial para el desarrollo de fármacos contra arbovirus (Kang et al., 2017).

Las proteínas reporteras reflejan la expresión de diversos genes a partir de promotores, dando como resultado diferentes niveles de ARNm y finalmente cambios en la cantidad de proteína reportera. Por ejemplo, la fusión de promotores o genes como el gen *LacZ* bacteriano permite la detección de la actividad de la β -galactosidasa y ha sido esencial en estudios de expresión génica, sin embargo, los ensayos de actividad de β -galactosidasa requieren mucho tiempo (Juers et al., 2012).

La detección de la infección por DENV es difícil porque el virus no crece a títulos altos en cultivo celular y los ensayos para valorar el virus requieren más tiempo. Los métodos tradicionales para la detección de la infección por flavivirus, incluyen los ensayos de placa; que se basan en la lisis de la monocapa celular que se deriva del efecto de la infección del virus en la línea celular. Los resultados obtenidos tardan de 3 a >12 días (Malewicz et al., 1979).

Existen otros ensayos que se basan en observar el efecto citopático después de la infección en cultivo celular durante un periodo de 5 a 20 días, mientras que las células permanezcan viables, los resultados se expresan mediante la dosis infecciosa del cultivo celular al 50% (TCID₅₀), sin embargo, no todos los virus o cepas virales causan efecto citopático en cultivo celular (Che et al., 2009). Un método mejorado es el ensayo de formación de focos infecciosos, el cual emplea la inmunotinción utilizando anticuerpos marcados con fluorescencia específicos para un antígeno viral y así detectar células infectadas, es útil para cuantificar los virus que no lisan las membranas celulares y los resultados se producen en menos tiempo (2 a 3 días) que los

ensayos de placa, pero puede ser más costoso en términos de reactivos (como anticuerpos en grandes cantidades) y equipos requeridos como el microscopio de fluorescencia (Payne et al., 2006). De tal manera que evaluar una gran cantidad de muestras usando los métodos anteriores requiere mucho tiempo y trabajo.

Recientemente, se han desarrollado métodos basados en ELISA para la titulación de DENV, estos métodos tienen la ventaja de procesar una gran cantidad de muestras, pero requieren varios días de incubación antes de que el virus pueda cuantificarse en cultivo celular (Li et al., 2011).

Un enfoque cuantitativo se puede llevar a cabo mediante RT-qPCR, el cual permite detectar y cuantificar el genoma viral, es un método rápido y preciso que permite realizar varias muestras a la vez, pero los resultados obtenidos determinan el número de copias del genoma, que no representan completamente el número de partículas infecciosas (Li, et al., 2013).

Otros métodos, como la citometría de flujo se han utilizado para medir los títulos virales. En este se usan anticuerpos y, por lo tanto, requieren procesos de inmunotinción, que resultan en un alto costo (Lambeth et al., 2005). Otros ejemplos para la detección de la infección por diversos virus, incluyen los genes reporteros mediante proteínas fluorescentes y bioluminiscentes, debido a su alta sensibilidad, bajo costos y la facilidad de uso de los instrumentos de detección, lo hace un método rápido y preciso (Jones et al., 2010).

En este trabajo, se empleó la proteasa viral NS2B3 generada durante el ciclo replicativo de DENV y ZIKV como una herramienta para la detección temprana de la infección, por medio de un sistema reportero denominado pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc. La presencia del sitio de corte en el plásmido reportero en células transfectadas e infectadas, permite el procesamiento proteolítico mediado por NS2B3 en el sitio de corte entre NS4B y NS5, y de esta forma se detectará la infección viral, mediante cambios en la expresión de la proteína reportera GLuc.

Para la construcción de ambos sistemas reporteros, se eligió uno de los sitios de corte de la proteasa viral NS2B3 en la poliproteína viral, el cual se encuentra entre las dos proteínas no estructurales NS4B-NS5, dichas secuencias se insertaron en el plásmido pCMV-GLuc2 y se transfectaron células Vero de riñón de mono verde, tomando en cuenta que, estas células son altamente susceptibles a la infección por flavivirus.

Nuestros resultados muestran que el plásmido pDENV4B5-GLuc y pZIKV4B5-GLuc se pueden usar para obtener una expresión transitoria de la proteína GLuc, mediado por el promotor de citomegalovirus (CMV). De este modo, se esperaba que las células transfectadas en ausencia de infección serán capaces de secretar GLuc, debido a que la proteína contiene en el extremo amino una señal de secreción extracelular de tal manera que puede ser detectada en los sobrenadantes de células transfectadas sin la necesidad de lisis celular, sin embargo, al parecer la proteína reportera fusionada con los 94 aminoácidos que representan la región clonada conteniendo el sitio de corte de la proteasa viral entre las proteínas no estructurales NS4B-NS5, no puede ser secretada al medio extracelular.

Sin embargo, como se observa en los resultados obtenidos, la proteasa se expresa de manera intracelular, lo cual se puede detectar mediante la lisis de células transfectadas. En este caso, la infección en células transfectadas transitoriamente con los plásmidos reporteros se detectó mediante la disminución en la actividad de GLuc en aproximadamente 50%.

Por otro lado, uno de los principales inconvenientes de las transfecciones transitorias es la diferencia en las eficiencias de transfección que se pueden tener entre cada experimento, es por eso que se decidió realizar los ensayos para obtener líneas celulares establemente transfectadas y esta estrategia fue exitosa solamente en el caso de la obtención de células Vero establemente con el plásmido pZIKV4B5-GLuc. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que dichas células establemente transfectadas pueden emplearse para la detección de la infección tanto por DENV como por ZIKV.

De esta forma se sugiere que la proteasa producida durante la infección con DENV reconoce el sitio de corte entre NS4B y NS5 de ZIKV en la proteína GLuc recombinante contenida en lisados celulares. En ambos casos la infección viral produjo una disminución en la detección de GLuc de aproximadamente 40%.

Durante el desarrollo del presente proyecto, Ming-Shu et al., en el 2017, publicaron un estudio para la detección y cuantificación de DENV, mediante el procesamiento proteolítico del sitio de escisión entre NS4B y NS5 por la proteasa viral NS2B3 de DENV. Utilizando el sistema DENPADS y al transfectarlo en células BHK-21 y en presencia de infección con los 4 serotipos de DENV se puede detectar la infección viral mediante la expresión de la proteína verde

fluorescente, el cual no fue sensible para la detección de la infección por otros flavivirus como ZIKV, JEV y VHC. Los autores mencionaron que las homologías de la proteasa NS2B3 de DENV-2 entre otros serotipos de DENV son $\geq 70\%$ y por el contrario, las homologías de la proteasa NS3 de DENV-2 entre otros flavivirus que probaron son $\leq 56\%$. En dicho reporte explican que tales diferencias pueden ser parte de la razón por la que DENPADS es eficiente en la detección de los 4 serotipos DENV, pero no en otros flavivirus.

Es necesario aclarar que existen diferencias importantes entre el sistema DENPADS y el desarrollado en nuestro laboratorio, estas se relacionan principalmente con la proteína recombinante. En nuestro sistema el sitio clonado correspondiente a las proteínas no estructurales NS4B-NS5 de ambos virus en la proteína de fusión que consistió en 94 aminoácidos de los cuales la mitad correspondían a la región carboxilo terminal de NS4B y la otra mitad a la región amino terminal de NS5, mientras que en el sistema DENPADS, se utilizaron 258 aminoácidos, de los cuales solo 10 aminoácidos corresponden a la región amino terminal de NS5 y los restantes al extremo carboxilo de NS4B.

Los resultados indican que en nuestro sistema, ambas proteasas (DENV y ZIKV) pudieron reconocer y procesar las dos proteínas de fusión. Por lo tanto, suponemos que las diferencias entre las proteínas de fusión de nuestro estudio, así como otras diferencias con respecto al sistema DENPADS permiten un uso más versátil de nuestro protocolo en la detección de ambos virus.

En conclusión, nuestro sistema en comparación con los descritos anteriormente no requiere de pasos de inmunotinción con anticuerpos, además, de ser un sistema fácil y rápido obteniendo resultados a partir de 24 h, para la detección de la infección viral.

La perspectiva de la aplicación para sistemas como el que se ha desarrollado en nuestro laboratorio es extensa, ya que el uso de la actividad de la proteasa viral NS2B3 permite la detección de la infección por DENV y ZIKV, lo cual, puede aplicarse en la búsqueda de métodos de diagnóstico, determinación de la eficiencia de vacunas y antivirales para ambos flavivirus, especialmente los que tengan como blanco a la proteasa viral.

X. CONCLUSIONES

- Los plásmidos reporteros de DENV (pDENV4B5-GLuc) y de ZIKV (pZIKV4B5-GLuc) detectan la infección viral utilizando como indicador el procesamiento proteolítico entre las proteínas no estructurales NS4B y NS5 realizado por la proteasa viral NS2B3.
- La transfección transitoria de los plásmidos permitieron la detección de la infección por dichos virus mediante la disminución de la actividad de GLuc en aproximadamente 50%.
- Las células establemente transfectadas con el plásmido pZIKV4B5-GLuc, permitieron la detección de la infección por ZIKV y DENV, determinado mediante la disminución de la actividad de GLuc en aproximadamente 40%, con respecto a los controles no infectados.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Administración de drogas y alimentos (2019) <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-issues/zika-virus-diagnostic-development>
2. Allicock, O. M., Lemey, P., Tatem, A. J., Pybus, O. G., Bennett, S. N., Mueller, B. A., ... Carrington, C. V. (2012). Phylogeography and population dynamics of dengue viruses in the Americas. *Molecular biology and evolution*, 29(6), 1533–1543. doi:10.1093/molbev/msr320
3. Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K. C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S. C., ... Garcia-Blanco, M. A. (2018). Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chemical reviews*, 118(8), 4448–4482. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00719
4. Bartok, E., Bauernfeind, F., Khaminets, M. G., Jakobs, C., Monks, B., Fitzgerald, K. A., ... Hornung, V. (2013). iGLuc: a luciferase-based inflammasome and protease activity reporter. *Nature methods*, 10(2), 147–154. doi:10.1038/nmeth.2327
5. Bazan JF, Fletterick RJ. (1989). Detection of a Trypsin-like Serine Protease Domain in Flaviviruses and Pestiviruses. *Virology*, 171(2):637–9.
6. Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., ... Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral research*, 87(2), 125–148. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.11.009
7. Brand, C., Bisailon, M., & Geiss, B. J. (2017). Organization of the Flavivirus RNA replicase complex. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 8(6), 10.1002/wrna.1437. doi:10.1002/wrna.1437
8. Brecher, M., Zhang, J., & Li, H. (2013). The flavivirus protease as a target for drug discovery. *Virologica Sinica*, 28(6), 326–336. doi:10.1007/s12250-013-3390-x
9. Brinton, M. A., & Basu, M. (2015). Functions of the 3' and 5' genome RNA regions of members of the genus Flavivirus. *Virus research*, 206, 108–119. doi: 10.1016/j.virusres.2015.02.006
10. Cann, A.J., Principles of Molecular Virology. 4th ed. 2005: Elsevier Academic Press

11. Che, P., Wang, L., & Li, Q. (2009). The development, optimization and validation of an
12. assay for high throughput antiviral drug screening against Dengue virus. *International journal of clinical and experimental medicine*, 2(4), 363–373.
13. Chico Aldama, P., Hidalgo García Felipe de Jesús., Ochoa Esquivel Rosa del Carmen & CIAP560128MDFHLT01. (2001). Ciclo de vida del Aedes aegypti y manifestaciones clínicas del dengue. *Acta Pediátrica de México* 22(2):114-117. Retrieved from <http://189.203.43.34:8180/handle/20.500.12103/1532>
14. Davidson, A. D. (2009). *Chapter 2 New Insights into Flavivirus Nonstructural Protein 5. Advances in Virus Research*, 41–101. doi:10.1016/s0065-3527(09)74002-3
15. Dick, G. W., Kitchen, S., & Haddow, A. (1952). *Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 509–520. doi:10.1016/0035-9203(52)90042-4
16. Dowd, K. A., & Pierson, T. C. (2018). *The Many Faces of a Dynamic Virion: Implications of Viral Breathing on Flavivirus Biology and Immunogenicity. Annual Review of Virology*, 5(1), 185–207. doi:10.1146/annurev-virology-092917-043300
17. Faye, O., Freire, C. C. M., Iamarino, A., Faye, O., de Oliveira, J. V. C., Diallo, M., ... Sall, A. A. (2014). Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), e2636. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636>
18. Fields, B. N., Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2007). *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
19. Goddard, J., & Zhou, L. (2007). Physician's Guide to Arthropods of Medical Importance, 5th Edition. *Emerging Infectious Diseases*, 13(9), 1442. doi:10.3201/eid1309.070706
20. Goerke, A. R., Loening, A. M., Gambhir, S. S., & Swartz, J. R. (2008). *Cell-free metabolic engineering promotes high-level production of bioactive Gaussia princeps luciferase. Metabolic Engineering*, 10(3-4), 187–200. doi: 10.1016/j.ymben.2008.04.001
21. Göertz, G. P., Vogels, C., Geertsema, C., Koenraadt, C., & Pijlman, G. P. (2017). Mosquito co-infection with Zika and chikungunya virus allows simultaneous transmission without affecting vector competence of Aedes aegypti. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(6), e0005654. doi: 10.1371/journal.pntd.0005654

22. Gulland, A. (2016). *Zika virus is a global public health emergency, declares WHO*. *BMJ*, *i657*.doi:10.1136/bmj. i657
23. Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., ... Missé, D. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of virology*, *89*(17), 8880–8896. doi:10.1128/JVI.00354-15
24. HOLMES, E., & TWIDDY, S. (2003). *The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus*. *Infection, Genetics and Evolution*, *3*(1), 19–28. doi:10.1016/s1567-1348(03)00004-2.
25. Hsieh, M. S., Chen, M. Y., Hsieh, C. H., Pan, C. H., Yu, G. Y., & Chen, H. W. (2017). Detection and quantification of dengue virus using a novel biosensor system based on dengue NS3 protease activity. *PloS one*, *12*(11), e0188170. doi: 10.1371/journal.pone.0188170.
26. Huang, Y. J., Higgs, S., Horne, K. M., & Vanlandingham, D. L. (2014). Flavivirus-mosquito interactions. *Viruses*, *6*(11), 4703–4730. doi:10.3390/v6114703
27. In Gubler, D. J., In Ooi, E. E., In Vasudevan, S., In Farrar, J., & C.A.B. International, (2014). *Dengue and dengue hemorrhagic fever*.
28. Jones, CT, Catanese, MT, Law, LM, Khetani, SR, Syder, AJ, Ploss, A., Rice, CM (2010). Imágenes en tiempo real de la infección por el virus de la hepatitis C utilizando un sistema informador basado en células fluorescentes. *Bioteconología de la naturaleza*, *28* (2), 167-171. Doi: 10.1038 / nbt.1604
29. Juers, D. H., Matthews, B. W., & Huber, R. E. (2012). LacZ β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein science: a publication of the Protein Society*, *21*(12), 1792–1807. doi:10.1002/pro.2165
30. Kang, C., Keller, T. H., & Luo, D. (2017). *Zika Virus Protease: An Antiviral Drug Target*. *Trends in Microbiology*, *25*(10), 797–808. doi:10.1016/j.tim.2017.07.001
31. Ketteler, R., Sun, Z., Kovacs, K. F., He, W. W., & Seed, B. (2008). A pathway sensor for genome-wide screens of intracellular proteolytic cleavage. *Genome biology*, *9*(4), R64. doi:10.1186/gb-2008-9-4-r64

32. Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., ... Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife*, 4, e08347. doi:10.7554/eLife.08347
33. Kyle, J. L., & Harris, E. (2008). *Global Spread and Persistence of Dengue*. *Annual Review of Microbiology*, 62(1), 71–92. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.163
34. Lambeth, C. R., White, L. J., Johnston, R. E., & de Silva, A. M. (2005). Flow cytometry-based assay for titrating dengue virus. *Journal of clinical microbiology*, 43(7), 3267–3272. doi:10.1128/JCM.43.7.3267-3272.2005.
35. Lee, H., Ren, J., Nocadello, S., Rice, A. J., Ojeda, I., Light, S., ... Johnson, M. E. (2017). Identification of novel small molecule inhibitors against NS2B/NS3 serine protease from Zika virus. *Antiviral research*, 139, 49–58. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.12.016
36. Leyssen, P., De Clercq, E., & Neyts, J. (2008). *Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses*. *Antiviral Research*, 78(1), 9–25. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.01.004
37. Li, A., Yu, J., Lu, M., Ma, Y., Attia, Z., Shan, C., ... Li, J. (2018). A Zika virus vaccine expressing premembrane-envelope-NS1 polyprotein. *Nature communications*, 9(1), 3067. doi:10.1038/s41467-018-05276-4
38. Li, J., Hu, D. M., Ding, X. X., Chen, Y., Pan, Y. X., Qiu, L. W., & Che, X. Y. (2011). Enzyme-linked immunosorbent assay-format tissue culture infectious dose-50 test for titrating dengue virus. *PLoS one*, 6(7), e22553. doi:10.1371/journal.pone.0022553.
39. Li, X.-Q., Chen, J., Huang, Y.-F., Ding, X.-X., Liu, L.-D., Qiu, L.-W., ... Che, X.-Y. (2013). *Evaluation and analysis of dengue virus enhancing and neutralizing activities using simple high-throughput assays*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6503–6511. doi:10.1007/s00253-013-5021-8.
40. Lin, K. H., Nalivaika, E. A., Prachanronarong, K. L., Yilmaz, N. K., & Schiffer, C. A. (2016). Dengue Protease Substrate Recognition: Binding of the Prime Side. *ACS infectious diseases*, 2(10), 734–743. doi:10.1021/acsinfecdis.6b00131
41. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM (2001). In *Fiel Virology* (eds Knipe, D. M. & Howley, P.M.) 1102-1152.

42. Luo, D., Xu, T., Hunke, C., Grüber, G., Vasudevan, S. G., & Lescar, J. (2008). Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *Journal of virology*, *82*(1), 173–183. doi:10.1128/JVI.01788-07
43. Malewicz, B., & Jenkin, H. M. (1979). Development of dengue virus plaques under serum-free overlay medium. *Journal of clinical microbiology*, *9*(5), 609–614.
44. Martins, V. E., Alencar, C. H., Kamimura, M. T., de Carvalho Araújo, F. M., De Simone, S. G., Dutra, R. F., & Guedes, M. I. (2012). Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PloS one*, *7*(7), e41386. doi:10.1371/journal.pone.0041386
45. Masser, A. E., Kandasamy, G., Kaimal, J. M., & Andréasson, C. (2016). Luciferase NanoLuc as a reporter for gene expression and protein levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, *33*(5), 191–200. doi:10.1002/yea.3155
46. Mastrangelo, E., Bolognesi, M., & Milani, M. (2012). *Flaviviral helicase: Insights into the mechanism of action of a motor protein*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *417*(1), 84–87. doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.060
47. Messina, JP, Brady, OJ, Scott, TW, Zou, C., Pigott, DM, Duda, KA, ... Hay, SI (2014). La diseminación global de los tipos de virus del dengue: mapeo de los 70 años de historia.
48. Monath, T. P. (2008). *Treatment of yellow fever*. *Antiviral Research*, *78*(1), 116–124. doi: 10.1016/j.antiviral.2007.10.009
49. Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). *A structural perspective of the flavivirus life cycle*. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(1), 13–22. doi:10.1038/nrmicro1067
50. Noble, C. G., Chen, Y.-L., Dong, H., Gu, F., Lim, S. P., Schul, W., ... Shi, P.-Y. (2010). *Strategies for development of dengue virus inhibitors*. *Antiviral Research*, *85*(3), 450–462. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.12.011
51. Oehler E, Watrin L, Larre P, Lepercq-Goffart I, Lastere S, Valor F, y col. Infección por el virus del Zika complicada por el síndrome de Guillain-Barré - informe de un caso, Polinesia Francesa, diciembre de 2013. *Euro Surveill* .2014; 19: 20720. [[PubMed](#)]

52. Oliveira, E. R. A., Mohana-Borges, R., de Alencastro, R. B., & Horta, B. A. C. (2017). *The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design*. *Virus Research*, 227, 115–123. doi: 10.1016/j.virusres.2016.10.005
53. Organización mundial de la salud, distribución de los 4 serotipos del virus Dengue en las Américas (2014). (consultada en https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=6251&Item=dengue&cat=statistics&type=mapas-6251&Itemid=40734&lang=es)
54. Organización Mundial de la Salud. (2018) (consultada en <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>)
55. Organización panamericana de la salud (2010) (consultada en https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4493:2010-informacion-general-dengue&Itemid=40232&lang=es)
56. Organización panamericana de la Salud (2016). Diagnóstico para la detección de la infección por ZIKA. (consultada en <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2015-cha-deteccion-algoritmo-zikv.pdf>)
57. Patterson, J., Sammon, M., & Garg, M. (2016). Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *The western journal of emergency medicine*, 17(6), 671–679. doi:10.5811/westjem.2016.9.30904
58. Payne, A. F., Binduga-Gajewska, I., Kauffman, E. B., & Kramer, L. D. (2006). *Quantitation of flaviviruses by fluorescent focus assay*. *Journal of Virological Methods*, 134(1-2), 183–189. doi:10.1016/j.jviromet.2006.01.003.
59. Qu, L., Vongpunsawad, S., Atmar, R. L., Prasad, B. V., & Estes, M. K. (2014). Development of a Gaussia luciferase-based human norovirus protease reporter system: cell type-specific profile of Norwalk virus protease precursors and evaluation of inhibitors. *Journal of virology*, 88(18), 10312–10326. doi:10.1128/JVI.01111-14
60. Red Nacional de Laboratorio de Salud (1997) Guía práctica para la identificación de *Aedes aegypti*. Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública. Ministerio de Salud. Lima. *Serie de Guías Entomológicas 2*.

61. Remy, I., & Michnick, S. W. (2006). *A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase*. *Nature Methods*, 3(12), 977–979. doi:10.1038/nmeth979
62. Rey, F. A., Stiasny, K., & Heinz, F. X. (2017). Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. *Current opinion in virology*, 24, 132–139. doi: 10.1016/j.coviro.2017.06.009
63. Rey, Jorge R y Lounibos, Philip. (2015). Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y transmisión de enfermedades.
64. Rueda L.M (2004) Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Dipteraa: Culicidae) associated with Dengue Virus transmission. *Zootaxa*, 589.
65. Secretaria de Salud (2017) Boletín epidemiológico 34 (49), (Consultado en <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico-el-19/diciembre/2017>).
66. Shiryayev, S. A., Farhy, C., Pinto, A., Huang, C. T., Simonetti, N., Elong Ngonu, A., ... Terskikh, A. V. (2017). Characterization of the Zika virus two-component NS2B-NS3 protease and structure-assisted identification of allosteric small-molecule antagonists. *Antiviral research*, 143, 218–229. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.04.015
67. Smith, L. B., Kasai, S., & Scott, J. G. (2016). *Pyrethroid resistance in Aedes aegypti and Aedes albopictus: Important mosquito vectors of human diseases*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 133, 1–12. doi: 10.1016/j.pestbp.2016.03.005
68. Stapleton, J. T., Fong, S., Muerhoff, A. S., Bukh, J., & Simmonds, P. (2011). The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *The Journal of general virology*, 92(Pt 2), 233–246. doi:10.1099/vir.0.027490-0
69. Uribarren Berrueta T.(2016) Dengue, fiebre chikingunya y otros arbovirus. Departamento de microbiología y parasitología- Recursos en virología. UNAM. (consultado en agosto 2016 en <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/dengue.html>)
70. Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Dengue virus: structure and viral cycle. *ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE INFECTOLOGÍA*, 15(571), 33–43.

71. Villordo, S. M., & Gamarnik, A. V. (2009). Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus research*, *139*(2), 230–239. doi:10.1016/j.virusres.2008.07.016
72. Weaver, S. C., & Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, *9*(4), 523–540. doi:10.1016/j.meegid.2009.02.003
73. Weissleder, R., & Ntziachristos, V. (2003). *Shedding light onto live molecular targets*. *Nature Medicine*, *9*(1), 123–128. doi:10.1038/nm0103-123
74. Wille, T., Blank, K., Schmidt, C., Vogt, V., & Gerlach, R. G. (2012). *Gaussia princeps* luciferase as a reporter for transcriptional activity, protein secretion, and protein-protein interactions in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Applied and environmental microbiology*, *78*(1), 250–257. doi:10.1128/AEM.06670-11
75. Wu, H., Bock, S., Snitko, M., Berger, T., Weidner, T., Holloway, S., ... Bodem, J. (2015). Novel dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *59*(2), 1100–1109. doi:10.1128/AAC.03543-14
76. Yun, S.-I., & Lee, Y.-M. (2017). *Zika virus: An emerging flavivirus*. *Journal of Microbiology*, *55*(3), 204–219. doi:10.1007/s12275-017-7063-6
77. Zou, J., Xie, X., Wang, Q. Y., Dong, H., Lee, M. Y., Kang, C., ... Shi, P. Y. (2013). Characterization of dengue virus NS4A and NS4B protein interaction. *Journal of virology*, *89*(7), 3455–3470. doi:10.1128/JVI.03453-14

XII ANEXO

12.1 Diseño de iniciadores

Para el diseño de los iniciadores, se tomó en consideración dos proteínas no estructurales, NS4B y NS5 para DENV (número de acceso NC_001474.2) y ZIKV (número de acceso KY120349.2). Ambas contienen el sitio de corte para la proteasa viral NS3. Adicionando en los extremos de cada iniciador la secuencia de corte para la enzima de restricción *SacII* (**CCGCGG**) y tres bases adicionales.

Para amplificar el fragmento de NS4B-NS5 de DENV, se consideró una región de 300 pb. (**CCGCGG**GGGGCCCATCTCCACATTGTGGGAAGGAAATCCAGGGAGGTTTTGGAACACTACCATTGCG GTGTCAATGGCTAACATTTTTAGAGGGAGTTACTTGGCCGGAGCTGGACTTCTTTTTCTATTATGAA GAACACAACCAACACAAGAAGGGGAACTGGCAACATAGGAGAGACGCTTGGAGAGAAATGGAAAA GCCGATTGAACGCATTGGGAAAAAGTGAATTCCAGATCTACAAGAAAAGTGGAAATCCAGGAAGTGG ATAGAACCTTAGCAAAAAGAAGGCATTAAGAGAGGAGAAACG) y para amplificar el fragmento de NS4B-NS5 de ZIKV, se consideró una región de 290 pb. (**CCGCGG**CACTTTGTGGGAAGGCTCTCCGAACAAGTACTGGAACCTCTACAGCCACTTCACTGTGT AACATTTTTAGGGGAAGTTACTTGGCTGGAGCTTCTCTAATCTACACAGTAACAAGAAACGCTGGCTT GGTCAAGAGACGTGGGGGTGGAACAGGAGAGACCCTGGGAGAGAAATGGAAGGCCCGCTTGAACC AGATGTCGGCCCTGGAGTTCTACTCCTACAAAAAGTCAGGCATCACCGAGGTGTGCAGAGAAGAGGC CCGCCGCGCCCTCAAGGACGGTGTGGCAA).

12.2 Preparación de soluciones

Tabla 2A: Preparación de antibiótico

Antibiótico (100 mg/ml)	
Volumen	Ampicillin sodium salt
20 ml	2 g
10 ml	1 g

Tabla 3A: Preparación de medio de cultivo líquido

Se esterilizó por autoclave y se almacenó a 4° C hasta su uso.

Medio de crecimiento líquido	
Volumen	LB Broth
1 L	25 g
500 ml	12.5 g

Tabla 4A: Preparación de medio de cultivo sólido

Se esterilizó por autoclave y se añadió antibiótico a una concentración de 100 µg/ml (ampicilina), se vertió de 30 a 35 ml de medio de crecimiento en placas Petri de 85 mm de diámetro, se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron a 4° C hasta su uso.

Medio de crecimiento sólido		
Volumen	Agar bacteriologico	LB Broth
1 L	14 g	25 g
500 ml	7 g	12.5 g

Tabla 5A: Preparación de medio de cultivo celular

Se almacenó a 4° C hasta su uso.

Medio de cultivo celular sin antibiótico			
Volumen	Glutamina 100X	Suero fetal bovino 100%	Medio DMEM
50 ml	1 ml (2X)	5 ml (10%)	44 ml

Tabla 6A: Preparación de buffer de corrida

TBE (10X)	
Tris-base	108g
Ácido bórico	55g
EDTA(0.05M) pH 8	40 ml
H₂O	1L

Tabla 7A: Preparación de buffer de fosfato salina

Ajuste el pH a 7.4 con HCl (1M) o NaOH (10 M). Filtre la solución a través de unidades de filtración o discos de 0.45 µm para eliminar partículas suspendidas.

PBS (10X) pH 7.4	
NaCl (1M)	80.6 g
NaOH (30mM)	2.2 g
Na₂HPO₄ (81mM)	11.5 g
KH₂PO₄ (15mM)	2.0 g
H₂O	1L

Residuos de aminoácidos de la región NS4B-NS5 del sistema pZIKV4B5-Gluc

HFVGRLESEQVLELLYSHFTVHFGKLLGWSFSNLHSNKKRWLGQETWGWNRRDPGREMEGLEP
DVGPGVLLLLQKVRHHRGVQRRGPPRPQGRCG

Los aminoácidos subrayados corresponden a la región amino terminal de la proteína no estructural NS5, los restantes pertenecen a la región de la proteína no estructural NS4B dando un total de 94 aminoácidos.

Residuos de aminoácidos de la región NS4B-NS5 del sistema DENPADS (DENV-2 cepa 16681)

NEMGFLEKTKKDLGLGSIATQQPESNILDIDLRPASAWTLYAVATTFVTPMLRHSIENSSVNV
SLTAIANQATVLMGLGKGWPLSKMDIGVPLLAIGCYSQVNPTTLTAALFLLVAHYAIIIGPALQ
AKASREAQKRAAAGIMKNPTVDGITVIDLDPIPYDPKFEKQLGQVMLLVLCVTQVLMMRRTWL
CEVLTLATGPISTLWEGNPGRFWNTTIAVSMANIFRGSYLAGAGLLFSIMKNTTNARRGTGNI
GETLG

Los aminoácidos subrayados corresponden a la región amino terminal de la proteína no estructural NS5, los restantes pertenecen a la región completa de la proteína no estructural NS4B dando un total de 258 aminoácidos (Hsieh et al., 2017).