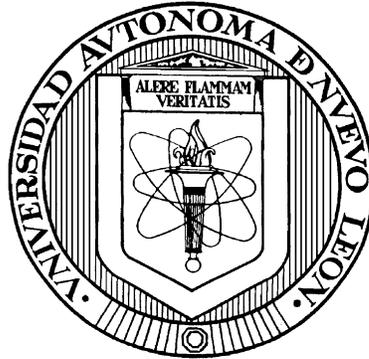


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS VARIANTES GENÓMICAS  
DEL VIRUS DEL DENGUE Y SU ASOCIACIÓN CON LA  
PRESENTACIÓN CLÍNICA EN UNA ZONA DE BAJA Y  
OTRA DE ALTA ENDEMICIDAD EN MÉXICO**

**Por:**

**M.C.P. KAME ALBERTO GALÁN HUERTA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS  
con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

**Diciembre, 2013**

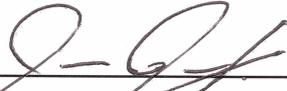
**Identificación y análisis de las variantes genómicas del virus del dengue y su asociación con la presentación clínica en una zona de baja y otra de alta endemicidad en México.**

Aprobación de la Tesis:



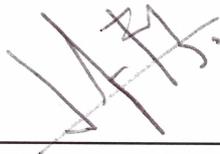
---

**Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla**  
Directora de Tesis



---

**Dr. med. Javier Ramos Jiménez**  
Co-Director de Tesis



---

**Dr. C. Ildelfonso Fernández Salas**  
Miembro de la Comisión



---

**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León; en el Laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán y en los laboratorios del Dengue Branch, del Center for Disease Control and Prevention, en San Juan, Puerto Rico. Bajo la dirección de la Dra. Ana María Guadalupe Rivas Estilla

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, primeramente, por haberme concedido poder realizar la maestría entre muchas otras más.

A mi familia por su apoyo incondicional. Gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A la Dra. Ana María Rivas Estilla por su apoyo y todas las facilidades prestadas. Gracias por haberme hecho un lugar en su laboratorio y acogerme.

Al Dr. Javier Ramos Jiménez. Gracias por todas sus enseñanzas y por su tiempo. Por no haber negado atender alguna duda.

Al trío de tres, Mariel y Alex por estar a mi lado siempre. Gracias por todos los momentos felices y tristes que compartimos. Gracias por su apoyo y sus consejos.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Daniel, Angel, Eduardo, Vero, Sonia, Tanya. Gracias por su consejo, ayuda, tiempos de diversión.

A mis compañeros de generación: Geo, Liz, Carlos, Paola y Moni. Gracias por esos momentos especiales que compartimos.

A Igor Villanueva por todas sus atenciones en Mérida. Gracias por haber confiado en mi y permitirme ser parte de tu familia.

A todo el personal del UUIS. A los M.C. Julio Farjat, Cristy Ortiz, Carlos Kantún, Carlos Pantoja y Jorge López. A los directivos del UUIS, Lic. Candila y M.C. Carlos Peniche. Gracias por hacerme sentir como en casa, por todo su trabajo y apoyo con el proyecto.

Al personal del Laboratorio de Arbovirología en el CIR Dr. Hideyo Noguchi: Dra. María Alba, Lula, Rosy, Dra. Nubia, Dr. Julián. Gracias por su disponibilidad, actitud de servicio y por integrarme al laboratorio.

A todo el personal del CDC Dengue Branch: Dr. Jorge Muñoz, Dr. Gilberto Santiago, por abrirme las puertas de su laboratorio. Gracias por incluirme en las actividades del laboratorio y su gran acogida.

A Omar Vélez por haber estado siempre para ayudarme durante mi vida cotidiana en Puerto Rico.

A Heriberto Villanova por haberme abierto su casa para que yo pudiera dormir.

A Juany Hinojos por haberme conseguido hospedaje y atenciones en Puerto Rico.

A las secretarias de Bioquímica, Juany, Ariadna, Normita, Irazema, Cristy por todo su apoyo.

Al Dr. Adrián Rosas Táraco. Por su apoyo y consejo en la realización de la tesis y su apoyo en la petición de beca mixta en el extranjero de CONACyT.

A la Dra. Gloria González, por las facilidades prestadas y su apoyo en la petición de la beca mixta en el extranjero de CONACyT.

Al Dr. Roberto Montes de Oca y a la Dra. María Loera, por su ayuda y cooperación en la estandarización de la inmunohistoquímica.

## COLABORACIONES

**Dra. María Alba Loroño Pino**

Laboratorio de Arbovirología  
Centro de Investigaciones Regionales  
“Dr. Hideyo Noguchi”  
Universidad Autónoma de Yucatán



**M.C. Julia Candila Celis**

**Dr. Carlos Peniche Salazar**

Unidad Universitaria de Inserción Social  
San José Tecoh  
Universidad Autónoma de Yucatán



**Dr. Miguel Alcocer Selem**

Centro de Salud: Santa Rosa  
Secretaría de Salud Yucatán



**M.D. Else García García**

**Q.B.P. Isabel Tavitas Aguilar**

**Dra. Jessica Saucedo Garza**

Laboratorio Estatal de Salud Pública  
de Nuevo León



**Dr. Jorge Muñoz-Jordan**

**Dr. Gilberto Santiago**

Dengue Branch

Division of Vector-Borne Diseases  
Center for Disease Control and Prevention



## TABLA DE CONTENIDO

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABLAS

### ABREVIATURAS

### RESUMEN

<b>CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Epidemiología Mundial.....	1
1.2 Epidemiología en México.....	3
1.3 Agente etiológico.....	9
1.3.1 Genoma del virus del dengue.....	9
1.3.2 Ciclo viral del virus del dengue.....	10
1.3.3 Serotipos y genotipos del virus del dengue.....	11
1.3.3.1 DENV-1.....	12
1.3.3.2 DENV-2.....	12
1.3.3.3 DENV-3.....	12
1.3.3.4 DENV-4.....	13
1.4 Factores ambientales involucrados.....	18
1.4.1 Precipitación.....	18
1.4.2 Temperatura.....	18
1.4.3 Índice de vegetación.....	19
1.5 Mecanismo de transmisión de DENV.....	19
1.6 Nueva clasificación propuesta por la OMS 2009.....	21
1.7 Manifestaciones clínicas.....	22
1.8 Pruebas diagnósticas.....	24
1.8.1 Aislamiento viral.....	24
1.8.2 Pruebas serológicas.....	25
1.8.2.1 ELISA MAC.....	25
1.8.2.2 ELISA IgG.....	25
1.8.3 Pruebas moleculares.....	26
1.8.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa .....	26
1.8.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.....	26
1.8.4 Detección de antígeno viral NS1.....	26
1.9 Tratamiento.....	27

1.9.1 Tratamiento convencional.....	27
1.9.2 Tratamientos en estudio.....	27
1.9.2.1 Inhibidores virales.....	27
1.9.2.2 Inhibidores del hospedero.....	28
1.10 Prevención.....	28
1.10.1 Control de vectores.....	28
1.10.2 Vacunas en desarrollo.....	29
1.10.2.1 Virus vivos atenuados.....	29
1.10.2.2 Virus inactivados.....	30
1.10.2.3 Subunidades recombinantes.....	30
1.10.2.4 Vectores adenovirales.....	31
1.10.2.5 ADN.....	31
<b>CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES.....</b>	<b>32</b>
2.1 Alteraciones estructurales relacionadas con patogénesis.....	32
2.2 Epidemiología molecular.....	35
<b>CAPÍTULO 3 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>38</b>
<b>CAPÍTULO 4 OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
4.1 Objetivo general.....	39
4.2 Objetivos específicos.....	39
<b>CAPÍTULO 5 METODOLOGÍA.....</b>	<b>40</b>
5.1 Estrategia General.....	40
5.2 Identificación de casos.....	40
5.2.1 Identificación de casos Yucatán.....	41
5.2.1.1 Toma de muestra.....	42
5.2.1.2 Separación de muestra.....	42
5.2.2 Identificación de casos Nuevo León.....	43
5.3 Detección del antígeno NS1 mediante método inmunoenzimático...	44
5.4 Detección de anticuerpos IgM contra el virus del dengue.....	45
5.5 Detección de anticuerpos IgG contra el virus del dengue.....	46
5.6 Extracción de ARN.....	47
5.6.1 Extracción de ARN con MagNA Pure.....	47
5.6.2 Extracción de ARN con TRIzol LS.....	47
5.6.3 Extracción de ARN con columna QIAGEN.....	48
5.7 Detección de ARN viral.....	48

5.7.1 Detección de ARN viral por PCR I.....	49
5.7.2 Detección de ARN viral por PCR II.....	51
5.7.3 Detección de ARN viral por RT-qPCR I.....	54
5.7.4 Detección de ARN viral por RT-qPCR II.....	56
5.8 Cultivo de células C6/36.....	58
5.8.1 Infección células C6/36.....	58
5.8.2 Cosecha viral.....	59
5.9 Inmunohistoquímica.....	59
5.10 Amplificación del gen de proteína de envoltura.....	60
5.10.1 RT-PCR Un paso.....	60
5.10.2 RT-PCR Dos pasos.....	61
5.10.2.1 Síntesis de ADNc.....	61
5.10.2.2 Protocolo PCR.....	63
5.10.3 Electroforesis Amplificación de gen E.....	63
5.11 Purificación de Amplificado.....	64
5.11.1 Extracción de ADN a partir del Gel.....	64
5.11.2 Cuantificación de ADN Extraído.....	64
5.12 Secuenciación.....	65
5.13 Ensamble de secuencias.....	66
5.14 Análisis de secuencias.....	67
5.14.1 Alineamiento de secuencias.....	67
5.14.2 Modelaje de Estructura Terciaria.....	67
5.14.3 Comparación de manifestaciones con cambios en secuencia	68
5.14.4 Análisis filogenético.....	68
5.14.5 Inferencia rutas de desplazamiento.....	72
5.15 Pruebas estadísticas.....	72
<b>CAPÍTULO 6 RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
6.1 Geomorfología.....	73
6.1.1 Geomorfología de Yucatán.....	73
6.1.2 Geomorfología de Nuevo León.....	75
6.2 Identificación de casos.....	76
6.2.1 Yucatán.....	76
6.2.2 Nuevo León.....	77
6.3 Manifestaciones clínicas evaluadas.....	78
6.3.1 Yucatán.....	78
6.3.2 Nuevo León.....	79
6.4 Comparación de manifestaciones en ambos estados.....	80

6.5 Anticuerpos anti-DENV.....	82
6.6 Antígeno NS1.....	82
6.7 Diagnóstico.....	82
6.8 Detección ARN viral.....	83
6.8.1 Detección de ARN viral por PCR I.....	83
6.8.2 Detección ARN viral por PCR II.....	85
6.8.3 Detección ARN viral por PCR tiempo real I.....	86
6.8.4 Detección de ARN viral por PCR tiempo real II.....	87
6.9 Infección de células C6/36.....	89
6.10 Inmunohistoquímica.....	90
6.11 Amplificación gen de proteína de envoltura.....	92
6.12 Secuenciación.....	95
6.13 Comparación de secuencias.....	95
6.13.1 DENV-1.....	96
6.13.2 DENV-2.....	97
6.14 Modelaje estructura terciaria.....	99
6.14.1 DENV-1.....	99
6.14.2 DENV-2.....	101
6.15 Comparación de manifestaciones con cambios en secuencia.....	102
6.16 Análisis filogenético.....	104
6.16.1 DENV-1.....	104
6.16.2 DENV-2.....	106
6.17 Inferencia rutas de desplazamiento.....	106
6.17.1 DENV-1.....	106
6.17.2 DENV-2.....	109
<b>CAPÍTULO 7 DISCUSIÓN.....</b>	<b>111</b>
<b>CAPÍTULO 8 CONCLUSIONES.....</b>	<b>113</b>
<b>CAPÍTULO 9 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>114</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
1	Mapa de consenso de evidencia de transmisión del dengue en 2010.	2
2	Comportamiento histórico de infecciones por mes de ocurrencia en México.	5
3	Proporción de serotipos de virus del dengue circulantes en México 1995 – 2010.	6
4	Casos de dengue probables y confirmados en México 2012 – 2013.	7
5	Incidencia y serotipos aislados de casos de dengue por entidad federativa 2013.	8
6	Estructura del virus del dengue por microscopía electrónica.	9
7	Genoma de virus del dengue.	10
8	Ciclo viral esquemático de los flavivirus.	10
9	Relación filogenética de cepas de DENV-1 de GenBank.	14
10	Relación filogenética de cepas de DENV-2 de GenBank.	15
11	Relación filogenética de cepas de DENV-3 de GenBank.	16
12	Relación filogenética de cepas de DENV-4 de GenBank.	17
13	Clasificación de casos de dengue sugerida y niveles de gravedad.	22
14	Estrategia general	40
15	Algoritmo diagnóstico para casos probables de fiebre por dengue.	44
16	Distribución geográfica de casos identificados en Yucatán.	77
17	Distribución geográfica de casos identificados en Nuevo León.	78
18	Manifestaciones clínicas presentadas en Yucatán.	79
19	Manifestaciones clínicas presentadas en Nuevo León.	80
20	Manifestaciones clínicas presentadas en los dos estados.	81
21	Gel de muestras positivas por PCR con protocolo de Seah I	84
22	Gel de muestras positivas por PCR con protocolo de Seah II	84

<b>23</b>	Gel de muestras positivas por PCR con protocolo de Lanciotti I	85
<b>24</b>	Gel de muestras positivas por PCR con protocolo de Lanciotti II	85
<b>25</b>	Gel de muestras positivas por PCR con protocolo de Lanciotti III	86
<b>26</b>	Gel de muestras positivas por PCR con protocolo de Lanciotti IV	86
<b>27</b>	Células C6/36 infectadas con la muestra 694 a diferentes días postinfección.	90
<b>28</b>	Inmunohistoquímica contra Flavivirus realizada en células C6/36 infectadas con DENV	91
<b>29</b>	Gel amplificación gen proteína E un paso I	92
<b>30</b>	Gel amplificación gen proteína E un paso II	92
<b>31</b>	Gel amplificación gen proteína E un paso III	93
<b>32</b>	Gel amplificación gen proteína E un paso IV	93
<b>33</b>	Gel amplificación gen proteína E un paso V	94
<b>34</b>	Representación gráfica de alineamiento de proteína E de DENV-1	97
<b>35</b>	Representación gráfica de alineamiento de proteína E de DENV-2	99
<b>36</b>	Modelo de proteína E nativa de DENV-1	100
<b>37</b>	Modelo de proteína E de muestra 696	100
<b>38</b>	Modelo de proteína E nativa de DENV-2	101
<b>39</b>	Modelo de proteína E de muestra 9878	101
<b>40</b>	Árbol filogenético DENV-1	105
<b>41</b>	Árbol filogenético DENV-2	107
<b>42</b>	Posible trayectoria del DENV-1 por America Latina	108
<b>43</b>	Posible trayectoria del DENV-2 por Latino América	110

## LISTADO DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
1	Infecciones por dengue estimadas en el 2010	3
2	Datos clínicos evaluados en los casos de Yucatán	41
3	Secuencia de iniciadores utilizados en la PCR I	49
4	Condiciones de reacción de PCR I	50
5	Programas de temperatura PCR I	50
6	Secuencia de iniciadores utilizados en la PCR II	51
7	Condiciones de reacción para síntesis de ADNc I	52
8	Condiciones de reacción para síntesis de ADNc II	52
9	Programa de temperatura síntesis de ADNc	52
10	Condiciones de reacción de PCR II	53
11	Programas de temperatura PCR II	53
12	Secuencias de iniciadores y sondas utilizadas RT-qPCR I	54
13	Condiciones de reacción de RT-qPCR I	55
14	Programa de temperaturas RT-qPCR I	56
15	Secuencias de iniciadores y sondas utilizadas RT-qPCR II	57
16	Condiciones de reacción de RT-qPCR II	57
17	Programa de temperaturas RT-qPCR II	58
18	Secuencia de iniciadores utilizados para la amplificación del gen E	60
19	Condiciones de reacción de amplificación gen E Un paso	61
20	Programa de temperatura de amplificación gen E Un paso	61
21	Condiciones de reacción para síntesis de ADNc I	62
22	Condiciones de reacción para síntesis de ADNc II	62
23	Programa de temperatura síntesis de ADNc	62
24	Condiciones de reacción amplificación gen E Dos pasos	63
25	Programa de temperatura amplificación gen E Dos pasos	63
26	Iniciadores secuenciación gen E de DENV	65
27	Componentes de la reacción de secuenciación	66
28	Programa de temperaturas utilizado en secuenciación	66
29	Secuencias DENV-1 de GenBank utilizadas en el análisis filogenético	68

<b>30</b>	Secuencias DENV-2 de GenBank utilizadas en el análisis filogenético	70
<b>31</b>	Relación de muestras obtenidas de Yucatán	83
<b>32</b>	Muestras obtenidas de Nuevo León	87
<b>33</b>	Resultado RT-qPCR para DENV-1 y DENV-2	88
<b>34</b>	Muestras que tuvieron CT $\leq$ 24	89
<b>35</b>	Muestras amplificadas para E	94
<b>36</b>	Lista de muestras de las que se obtuvieron secuencia nucleotídica	95
<b>37</b>	Cambios presentados en las secuencias de DENV-1	96
<b>38</b>	Cambios presentados en las secuencias de DENV-2	98
<b>39</b>	Manifestaciones clínicas presentadas por pacientes infectados con DENV-1	102
<b>40</b>	Manifestaciones clínicas presentadas por pacientes infectados por DENV-2.	103

## ABREVIATURAS y SÍMBOLOS

<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>Ala</b>	Alanina
<b>Asn</b>	Asparagina
<b>Asp</b>	Aspartato
<b>Arg</b>	Arginina
<b>ARN</b>	Acido Ribonucleico
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>CDC</b>	Centro de Control y Prevención de Enfermedades
<b>CO<sub>2</sub></b>	Bióxido de carbono
<b>DENV</b>	Virus del dengue
<b>DENV-1</b>	Virus del dengue serotipo 1
<b>DENV-2</b>	Virus del dengue serotipo 2
<b>DENV-3</b>	Virus del dengue serotipo 3
<b>DENV-4</b>	Virus del dengue serotipo 4
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
<b>dpi</b>	Días postinfección
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoenzimático
<b>FHD</b>	Fiebre hemorrágica por dengue
<b>g</b>	Gramos
<b>GIDEON</b>	Red Global En Línea de enfermedades infecciosas y epidemiología
<b>Gln</b>	Glutamina
<b>Glu</b>	Glutamato
<b>Gly</b>	Glicina
<b>His</b>	Histidina
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina de isotipo G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina de isotipo M
<b>Ile</b>	Isoleucina
<b>IND</b>	Indeterminado
<b>LESP</b>	Laboratorio Estatal de Salud Pública

<b>Leu</b>	Leucina
<b>Lys</b>	Lisina
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Magnesio
<b>M</b>	Molar
<b>mL</b>	mililitros
<b>μM</b>	Micromolar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MAC</b>	Captura de anticuerpos
<b>Met</b>	Metionina
<b>min</b>	Minutos
<b>N</b>	Normal
<b>NL</b>	Nuevo León
<b>NCBI</b>	Centro Nacional de Información Biotecnológica
<b>NEG</b>	Negativo
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>Ni<sup>2+</sup></b>	Ión nickel
<b>nM</b>	Nanomolaridad
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>Phe</b>	Fenilalanina
<b>Pro</b>	Prolina
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Transcripción reversa
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retrotranscripción
<b>RT-qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
<b>s</b>	segundos
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal
<b>SINAVE</b>	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

<b>Ser</b>	Serina
<b>TBE</b>	Tris/borato/EDTA
<b>TMB</b>	3,3',5,5'- tetrametilbencidina
<b>Thr</b>	Treonina
<b>UTR</b>	Región no traducida
<b>UUIS</b>	Unidad Universidad de Inserción Social
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Val</b>	Valina
<b>V</b>	Volts
<b>Yuc</b>	Yucatán

## RESUMEN

M.C.P. Kame Alberto Galán Huerta      Fecha de graduación: diciembre 2013

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

**Título del Estudio: “IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS VARIANTES GENÓMICAS DEL VIRUS DEL DENGUE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRESENTACIÓN CLÍNICA EN UNA ZONA DE BAJA Y OTRA DE ALTA ENDEMICIDAD EN MÉXICO”**

Número de páginas: 130

**Introducción:** El dengue es una enfermedad febril infecciosa, de etiología viral (DENV 1 – 4), transmitida por mosquitos, de presentación clínica variable. Se estima que cada año ocurren 300 millones de infecciones en todo el mundo. Existen reportes que relacionan cambios en la proteína E con desenlace clínico desfavorable. El estudio de las variaciones genéticas podría ayudar a entender los cuadros clínicos presentados y asociaciones en áreas con diferente endemicidad. **Objetivos:** Identificar y analizar si existen variantes genómicas del virus del dengue que puedan estar relacionadas con una presentación clínica en particular, en una zona de baja y alta endemicidad en México. **Metodología:** Se recolectaron pacientes con fiebre por dengue de Yucatán y Nuevo León, a los cuales se les recabó la historia clínica y se les obtuvo muestra de suero. La muestra fue evaluada para anticuerpos contra DENV y antígeno NS1. Asimismo se hizo extracción de ARN viral y detección de genoma viral. Se amplificó el gen de la proteína de envoltura de los genomas virales obtenidos y se secuenció el fragmento. Se hizo modelaje de estructuras terciarias de las secuencias traducidas. Se compararon las manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes de ambos estados. Se buscó relación de manifestaciones clínicas con los cambios presentados en el gen de la proteína E. Se realizó análisis filogenético de las muestras secuenciadas para determinar el origen de los virus y su probable desplazamiento. **Resultados:** Se obtuvieron 12 pacientes de Yucatán y 16 pacientes de Nuevo León. Las manifestaciones clínicas presentadas en los pacientes de los dos estados fueron diferentes. En Yucatán se presentaron signos de alarma con mayor frecuencia. Los serotipos detectados en ambos estados fueron DENV-1 y DENV-2. Se lograron secuenciar 7 muestras de Nuevo León y 3 muestras de Yucatán. Se encontraron 20 mutaciones en las muestras de DENV-1 y 11 en DENV-2. No se relacionaron las manifestaciones clínicas con las mutaciones en el gen de la proteína E. Se encontraron dos sustituciones no sinónimas, pero solamente una presentó cambio en la conformación de la proteína E (DENV-2). Se infiere que hubo una reintroducción de DENV-1 en Nuevo León en el 2012 y el DENV-2 circulante está presente desde el 2011. **Conclusiones:** No se observó relación entre las manifestaciones clínicas y la diversidad del gen de la proteína E-DENV en los pacientes infectados analizados. Los virus que circularon durante el 2012 en Nuevo León y Yucatán tienen una gran homología, por lo tanto se puede inferir que tienen el mismo origen. Se confirmaron dos introducciones del DENV-1 en el estado de NL y Yucatán, sin embargo solo un clado sigue en circulación. Asimismo, se confirmaron dos introducciones de DENV-2 en NL donde se identificó la cocirculación de los virus.

---

Dra. Ana María Rivas Estilla  
Directora de Tesis

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

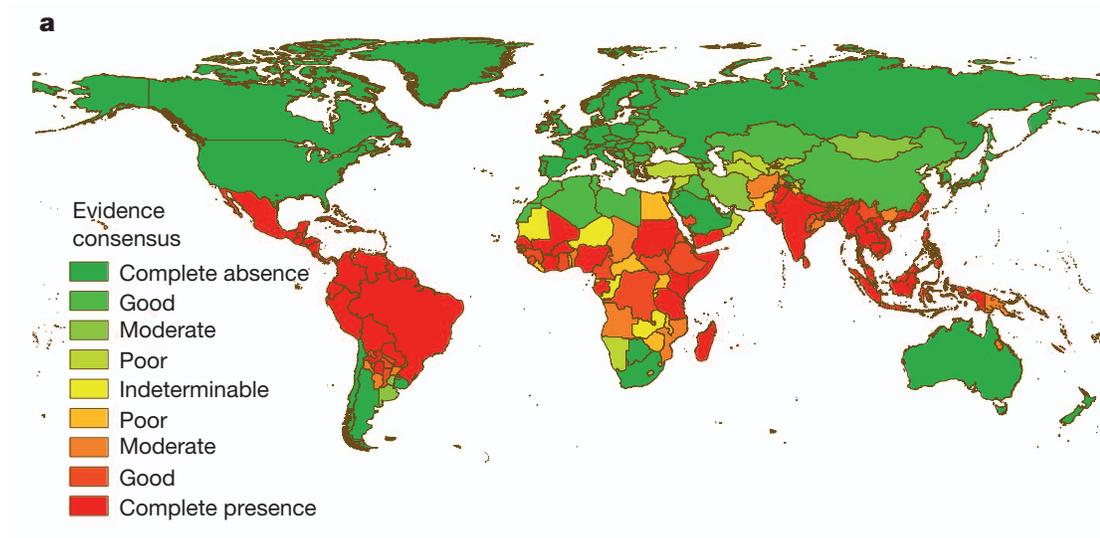
El dengue es una enfermedad febril infecciosa, de etiología viral, transmitida por mosquitos del género *Aedes sp*, de presentación clínica variable, evolución poco predecible, autolimitada y temporalmente incapacitante.<sup>1</sup>

### 1.1 Epidemiología mundial

Las primeras estimaciones globales del total de infecciones por virus del dengue se basaron en una tasa de infección anual constante asumida entre una cruda aproximación de la población en riesgo dando cifras de 80 a 100 millones de infecciones anuales en todo el mundo en 1988.<sup>2</sup> A medida que se obtuvo más información referente a la relación de casos de dengue hemorrágico y fiebre por dengue y la proporción de defunciones de casos de dengue hemorrágico, la cifra global fue modificada a 50 a 100 millones de infecciones anuales.<sup>3, 4</sup> Estas estimaciones se aplican solo como aproximaciones pero en ausencia de mejor evidencia, la cifra de 50 a 100 millones de infecciones por año es citada ampliamente y es la utilizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS).<sup>5</sup> Como la metodología utilizada fue informal, las estimaciones fueron reportadas sin intervalos de confianza y no se hizo intento de evaluar la variación geográfica o temporal en la incidencia o los reservorios de infecciones aparentes.

Publicaciones recientes han revelado la presencia del virus del dengue a través del mundo. Estas aproximaciones se hicieron analizando información de las Organizaciones de Salud (OMS, Centers for Disease Control [CDC], y

Global Infectious Disease and Epidemiology Online Network [GIDEON]), evidencia revisada por pares, casos publicados y evidencia suplementaria.<sup>6</sup> La distribución global de transmisión del virus del dengue definida por consenso de evidencia se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Mapa de consenso de evidencia de transmisión del dengue en 2010.

La escala de color del mapa va desde consenso completo de presencia del dengue (rojo oscuro) a consenso indeterminado (amarillo) después a consenso completo de ausencia del dengue (verde oscuro). Se identificaron 128 países donde el dengue estaba presente, comparado a los 100 reportados por la OMS, 104 del CDC y 118 de GIDEON.

Actualmente se realizó un mapa de riesgo de infección de dengue basado en evidencias y la estimación de infecciones aparentes e inaparentes en base a la población mundial del 2010.<sup>7</sup> Este mapa fue generado gracias a la elaboración de una base de datos que constó de 8,309 registros geolocalizados de casos de dengue.

Utilizando aproximaciones cartográficas, se estima que existen 390 millones de infecciones por dengue anuales, de las cuales solo 96 millones son infecciones aparentes.<sup>7</sup> En la Tabla 1 se muestran las infecciones aparentes e inaparentes por continente.

**Tabla 1.** Infecciones por dengue estimadas en el 2010 por continente.<sup>7</sup>

	Aparentes	Inaparentes
	Millones	Millones
África	15.7	48.4
América	13.3	40.5
Asia	66.8	204.4
Oceanía	0.18	0.55
Global	96	293.9

Asia cuenta con el 70% de las infecciones y está caracterizada por grandes extensiones de zonas densamente pobladas coincidiendo con una alta aptitud para la transmisión de la enfermedad.<sup>7</sup> Solamente India contribuyó con el 34% de las infecciones globales.<sup>8</sup> América contribuyó con 14% de infecciones aparentes a nivel mundial, de las cuales la mitad ocurrieron en Brasil y México. El número de infecciones en África es casi equivalente al de América, representando un número mayor al reportado anteriormente. Los países de Oceanía contribuyeron con menos de 0.2% de infecciones globales aparentes.<sup>7</sup>

## 1.2 Epidemiología en México

En México, el dengue fue eliminado durante el programa de erradicación de la fiebre amarilla en 1963, sin embargo para 1965 se reintrodujo el vector por la frontera norte del país.<sup>9</sup>

A finales de 1978 el serotipo DENV-1 llegó al sureste de México y desde entonces es considerado como endémico por un brote detectado en Tapachula, Chiapas. Para 1979 afectaba ya afectaba los estados de Quintana Roo, Oaxaca, Tamaulipas y Yucatán. Para 1980 seis ciudades fronterizas reportaron casos y se registró el primer caso por DENV-1 en México.<sup>10</sup>

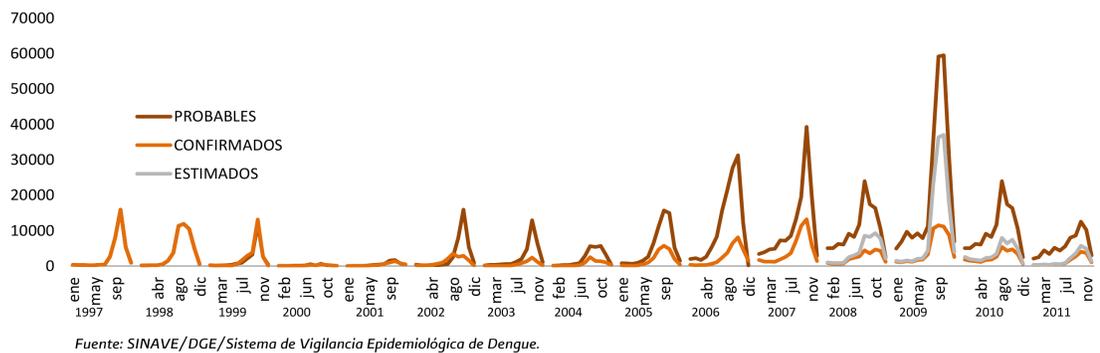
En 1981 se reportó el primer caso por DENV-2 en México y el siguiente año se detectó la circulación de los serotipos DENV-2 y DENV-4 en Tamaulipas y Oaxaca. Al siguiente año ocurrieron brotes a lo largo del país, iniciando en Puebla que después se diseminó desde el sur de Chiapas al norte de Jalisco, Veracruz y Yucatán, afectando también la zona de la costa Este.<sup>10</sup>

En el verano de 1988 se presentó un brote en Taxco, Guerrero, ocasionado por el serotipo 1, donde se documentó la mayor altitud donde se puede dar la transmisión del dengue.<sup>10</sup> Durante 1994 se registraron 30 casos de fiebre hemorrágica por dengue (FHD) con siete defunciones y se demostró la circulación de serotipos 1, 2 y 4.<sup>11</sup> Para 1995 se registraron 539 casos con 30 defunciones. Ese mismo año se registró la circulación del serotipo 3<sup>12</sup> presentando una rápida diseminación desde la frontera, a lo largo del Golfo de México, dando brotes explosivos de dengue hemorrágico en 20 estados. Posteriormente se mantuvo una transmisión constante durante los siguientes tres años.<sup>10</sup>

Durante 1996, se registró el mayor número de casos de FHD (1,456 casos). Se aislaron los cuatro serotipos con predominio del DENV-3. Al siguiente año comenzaron a decrecer los casos de FHD y a disminuir la distribución geográfica de los serotipos DENV-1 y DENV-4.<sup>10</sup>

Para 1999 comienza a disminuir el serotipo 3 y a incrementar el 2. Asimismo se registraron los primeros casos de FHD asociados al serotipo 2 en el estado de Chiapas.<sup>10</sup> En el 2000, se invirtió la proporción de serotipos circulantes; DENV-2 representó el 55.2% y el DENV-3 el 44.1%.<sup>10</sup>

En la Figura 2 podemos observar el comportamiento histórico de los casos de dengue por mes de ocurrencia en el país. La gráfica toma en cuenta desde el año 1997 hasta el año 2011.<sup>10</sup> A partir del 2008 se inició la estrategia de estimación de casos como un método inferencial para la aproximación al número de casos confirmados reales en la población.<sup>10</sup>

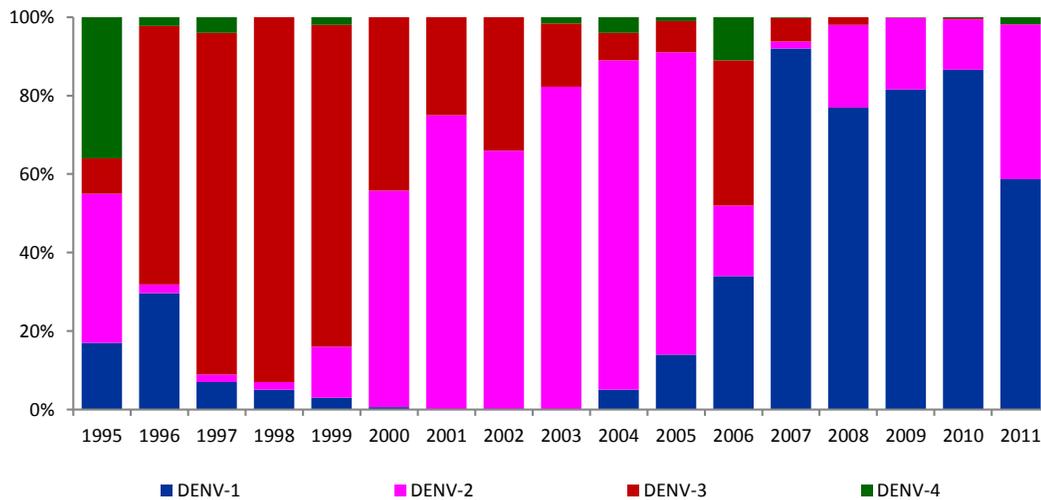


**Figura 2.** Comportamiento histórico de infecciones por mes de ocurrencia en México.

Aunque se tiene registro de los serotipos circulantes en años previos, no fue sino hasta el año 2000 en que el replanteamiento de la vigilancia empezó a ir de la mano con la vigilancia virológica lo que permitió establecer panoramas puntuales de comportamiento de esta enfermedad en México.<sup>10</sup> Como resultado de la vigilancia virológica se ha observado que los serotipos circulantes muestra predominio de diseminación en lapsos que van de 3 a 5 años.<sup>10</sup>

El comportamiento porcentual (Figura 3) muestra que en 1995 circularon de manera simultánea los cuatro serotipos, posterior a este periodo hubo un predominio en la circulación del DENV-3.

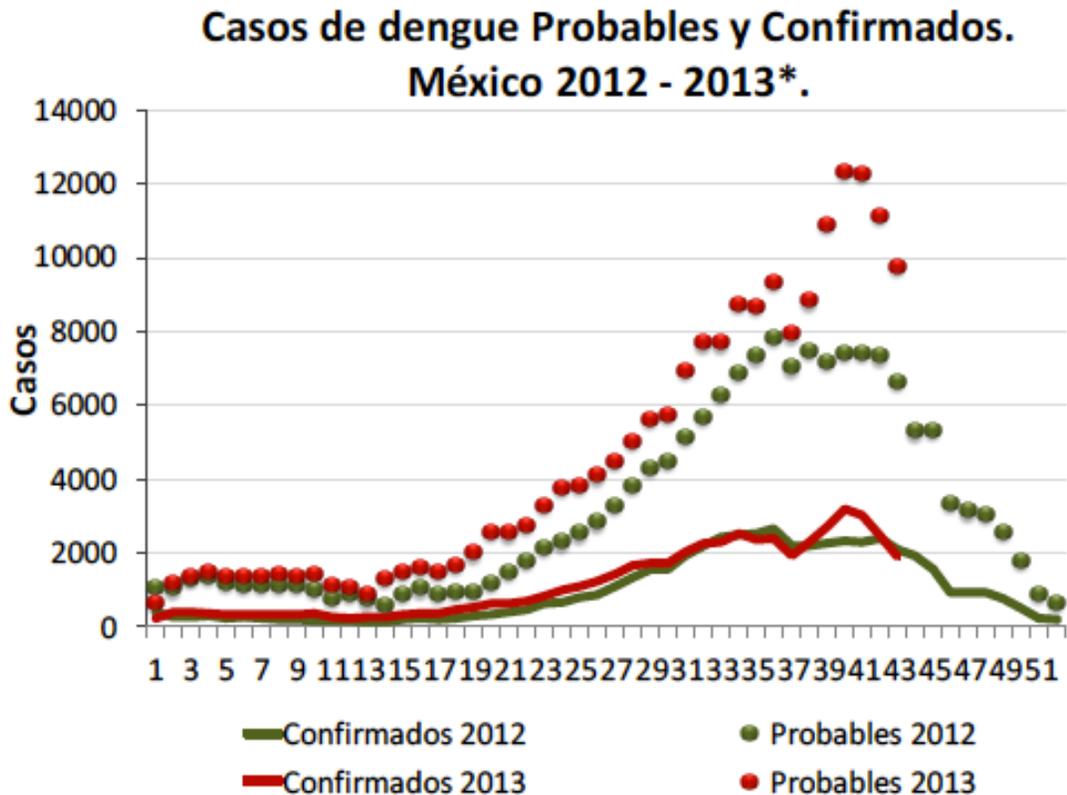
Posteriormente en 1999 se volvió a observar circulación simultánea de los 4 serotipos con predominio posterior del DENV-2. Esto sucedió hasta el 2006 cuando nuevamente circularon los cuatro serotipos y un predominio posterior de DENV-1.<sup>10</sup>



Fuente: SINAVE/InDRE/Laboratorio de arbovirosis.

**Figura 3.** Proporción de serotipos de virus del dengue circulantes en México 1995 – 2010.

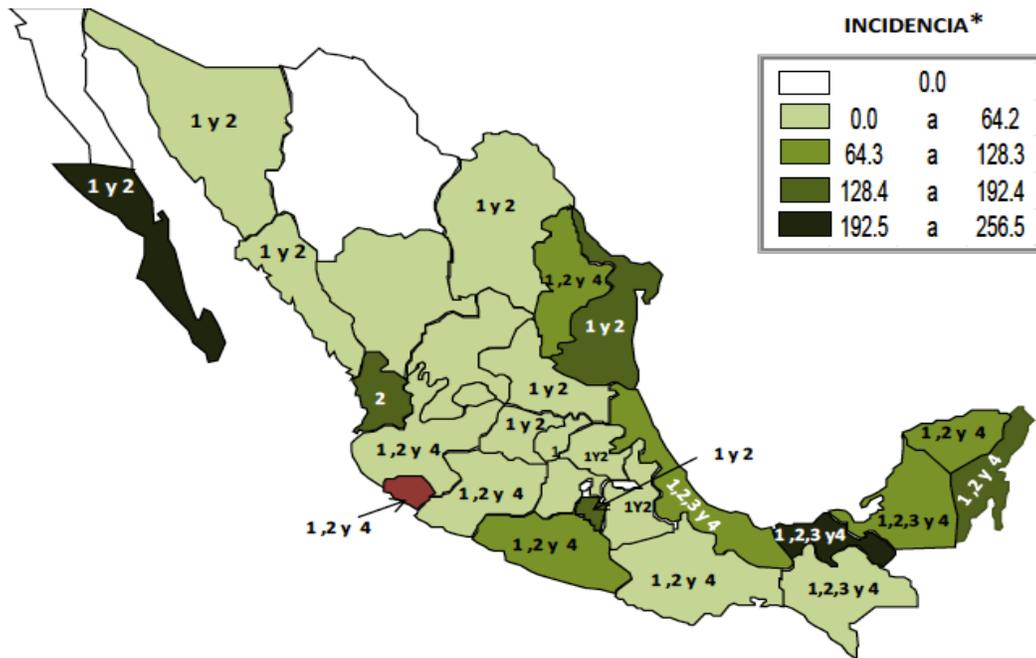
En base a información actualizada el 11 de noviembre de 2013, se han reportado durante este año 51,577 casos confirmados de dengue. De los cuales 36,013 fueron fiebre por dengue y 15,565 casos de fiebre hemorrágica por dengue. Se han presentado 66 defunciones por dengue durante este año.<sup>13</sup> Comparado con el año pasado se registró un aumento del 44% de casos probables y un aumento del 24% en casos confirmados de dengue (Figura 4).<sup>13</sup>



**Figura 4.** Casos de dengue probables y confirmados en México 2012 – 2013.<sup>13</sup>

De la totalidad de los casos confirmados, el 45% corresponde a: Veracruz, Tabasco, Tamaulipas, Nuevo León y Morelos. En Veracruz se confirmaron 7,382 casos, de los cuales 4,270 fueron fiebre por dengue y 3,112 fiebre hemorrágica por dengue.<sup>13</sup> El porcentaje de incremento en comparación del año pasado fue de 30% en los dos casos. En lo que respecta a Nuevo León, se confirmaron 3,608 casos, de los cuales 3,464 fueron fiebre por dengue y 122 fiebre hemorrágica por dengue.<sup>13</sup> El porcentaje de incremento en comparación del año pasado en lo que respecta a fiebre por dengue fue del 64.8% y el incremento de casos de fiebre hemorrágica fue de 206%. Estas cifras son alarmantes.<sup>13</sup>

Sin embargo, el estado con mayor tasa de incidencia por cada 100 mil habitantes es Colima con 330.49, seguido por Tabasco con 256.47 y Baja California Sur con 218.76. La tasa de incidencia en Yucatán es de 101.75 y en Nuevo León es 73.09. Lo anterior puede observarse en la Figura 5.<sup>13</sup>



Colima presentó la incidencia más alta con 330.49

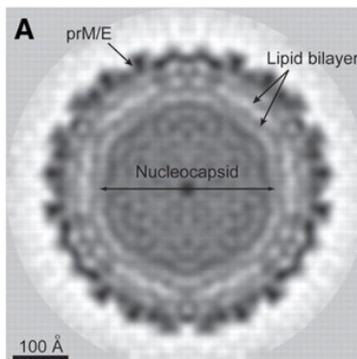
\*Incidencia de casos de FD y FHD por cien mil habitantes

**Figura 5.** Incidencia y serotipos aislados de casos de dengue por entidad federativa 2013

Podemos observar en la Figura 5 que la distribución de serotipos del dengue no es homogénea a lo largo del país. Hay estados que tienen un solo serotipo circulando como Querétaro y Nayarit; así como estados con la circulación de los cuatro serotipos, tal es el caso de Veracruz, Tabasco, Chiapas y Campeche.<sup>13</sup>

### 1.3 Agente Etiológico

El virus del dengue (DENV) es un miembro de la familia Flaviviridae y del género *Flavivirus*.<sup>14</sup> La partícula viral contiene un genoma de ARN de cadena de polaridad positiva, dentro de una cápside con simetría icosaédrica, rodeado por una envoltura externa en la cual se encuentran insertas las proteínas prM y E.<sup>15, 16</sup> Dispone de una membrana de naturaleza lipídica, que envuelve completamente al virión. Físicamente, el virus es esférico, con un tamaño que varía de 40 a 50 nm de diámetro, presentando pequeñas proyecciones superficiales de 5 a 10 nm.<sup>16, 17, 18</sup>

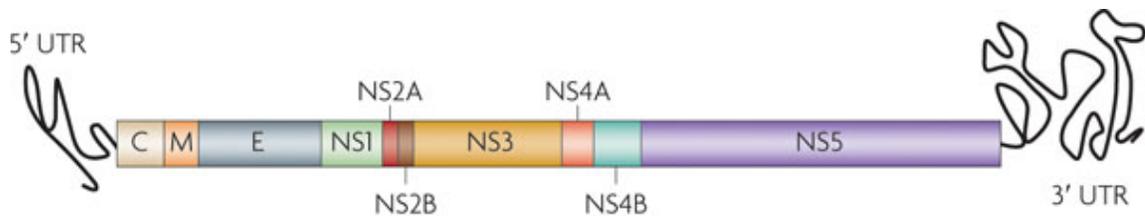


**Figura 6.** Estructura del virus del dengue por microscopía electrónica.<sup>19</sup>

#### 1.3.1 Genoma del virus del dengue

El genoma del virión tiene un tamaño de aproximadamente 11Kb y un marco de lectura abierto (ORF) único, flanqueado por dos regiones 5' y 3' no traducidas (UTR). El ORF codifica para una sola poliproteína, la cual sufre diversos procesos de corte para generar proteínas virales individuales.<sup>15</sup> Las tres proteínas estructurales (C, M y E) están localizadas en el extremo amino terminal, mientras que las proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) están en el extremo carboxilo de la poliproteína (Figura 7).

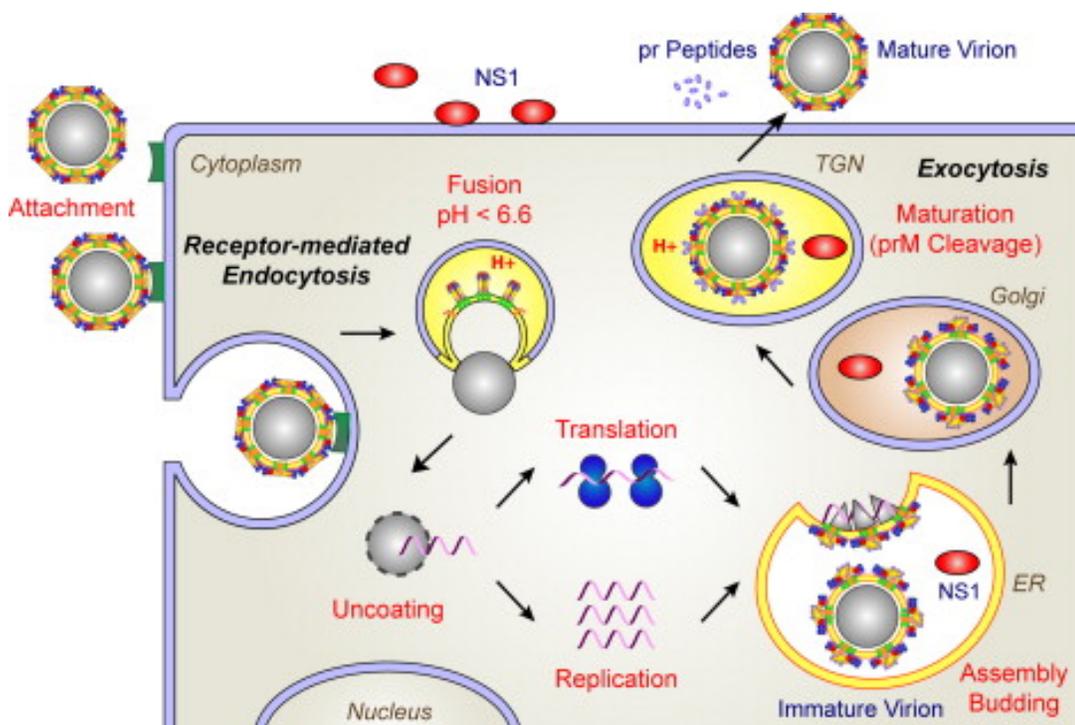
17, 20, 21



**Figura 7.** Genoma de virus del dengue.<sup>21</sup>

### 1.3.2 Ciclo viral del virus del dengue

El mecanismo de replicación del virus del dengue no se ha esclarecido totalmente, sin embargo las evidencias experimentales indican un proceso similar al de la mayoría de los miembros de la familia Flaviviridae.<sup>22</sup> La adhesión de la partícula viral a la célula inicia con la unión de la proteína de envoltura viral con un receptor de la membrana plasmática celular, seguida de la entrada de la partícula viral que conduce al desnudamiento y liberación del genoma viral de RNA en el citoplasma.<sup>23, 24</sup>



**Figura 8.** Ciclo viral esquemático de los flavivirus.<sup>22</sup>

El genoma es traducido a una única poliproteína, que es procesada por proteasas virales y celulares para sintetizar simultáneamente todas las proteínas virales intracelulares: que corresponden a tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete no estructurales (NS), que cumplen diversas funciones en el ciclo de replicación.<sup>16</sup>

La ARN polimerasa viral ARN-dependiente (NS5), asociada a otras proteínas NS, replica el ARN genómico produciendo una molécula complementaria de ARN de polaridad negativa, que a su vez actúa como molde para la síntesis de nuevas cadenas de ARN de polaridad positiva.<sup>25</sup> El genoma viral es encapsidado por la proteína C y luego, las nucleocápsides adquieren su envoltura a partir de la membrana del retículo endoplásmico hacia el espacio luminal.<sup>26</sup> A partir de ahí, las partículas virales son transportadas por el sistema exocítico secretorio hacia la superficie, en tanto que las proteínas virales adquieren su forma madura en el sistema de Golgi y, finalmente, los viriones son liberados al medio extracelular por fusión de la vesícula de transporte con la membrana plasmática.<sup>16</sup>

### **1.3.3 Serotipos y genotipos del virus del dengue**

Se han descrito cuatro tipos de virus capaces de causar fiebre de dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. A estos cuatro virus se les ha denominado serotipos, debido a que tienen epítomos comunes en la proteína de la envoltura, lo que ocasiona una elevada reactividad cruzada en pruebas serológicas.<sup>27, 28</sup> A nivel genómico, estos serotipos virales difieren aproximadamente un 30% en su secuencia nucleotídica.<sup>29</sup>

El análisis del genoma de los virus del dengue ha sido la base para estudios de evolución y epidemiología. Cada uno de los 4 serotipos en particular presenta diversidad genética en forma de clúster filogenéticamente distintos llamados genotipos.<sup>30, 31</sup> Sin embargo no hay un consenso en cuanto al nombre que llevan los genotipos.

**1.3.3.1 DENV-1.** Se reconocen cinco diferentes genotipos de DENV-1 con divergencia del 6% de nucleótidos entre ellos.<sup>32</sup> La filogenia actual basada en secuencia completa del gen E confirman los linajes: genotipo I, representando cepas del sureste de Asia, China y el este de África; genotipo II, representado por cepa de Tailandia de 1950 y 1960; genotipo III, cepas selváticas de Malasia; genotipo IV, cepas de las islas del Pacífico y Australia; y genotipo V cepas provenientes de América, oeste de África y limitado número de Asia.<sup>33</sup> El árbol filogenético de DENV-1 se observa en la Figura 9 de la página 14.

**1.3.3.2 DENV-2.** En lo que respecta a DENV-2, a filogenia basada en el genoma completo de la proteína E confirma 5 grandes genotipos: genotipo Asia I con cepas de Malasia y Tailandia y genotipo Asia II representado por cepas de Vietnam, China, Taiwán, Sri Lanka y Filipinas; genotipo Cosmopolita representado por cepas de Australia, África del este y oeste, islas del océano Pacífico e Índico, India y Medio Oriente; genotipo Americano representado por cepas de Latinoamérica, secuencias del Caribe, India e Islas del Pacífico de 1950 y 1960; genotipo Asiático Americano representado por cepas de Tailandia, Vietnam y cepas de América de los últimos 20 años; y genotipo selvático representado por cepas aisladas de humanos, mosquitos de bosque o monos centinela en el Oeste de África y Sureste de Asia.<sup>33, 34, 35, 36</sup> En la Figura 10, de la página 15, se observa el árbol filogenético de DENV-2.

**1.3.3.3 DENV-3.** La filogenia del DENV-3 confirma 4 genotipos más el genotipo selvático como se muestra en la Figura 11 de la página 16. Los genotipos son los siguientes: genotipo I con cepas de Indonesia, Malasia, Filipinas y aislados recientes de las islas del Pacífico sur; genotipo II, con cepas de Tailandia, Vietnam y Bangladesh; genotipo III, cepas de Sri Lanka, India, África y Samoa; y genotipo IV representado por cepas de Puerto Rico, América latina y central.<sup>33</sup>

**1.3.3.4 DENV-4.** En lo que respecta a la filogenia del DENV-4 (Figura 12, pág. 17), se delimitan 4 grandes genotipos: genotipo I, representado por cepas de Tailandia, Filipinas, Sri Lanka y Japón; genotipo II, representado por Indonesia, Malasia, Tahití, el Caribe y América; genotipo III representa cepas recientes de Tailandia<sup>37</sup> y genotipo IV, cepas selváticas de Malasia.<sup>33</sup>

Como está reportado, el rasgo biológico más obvio de los genotipos del dengue es su distribución geográfica.<sup>29</sup> Unos genotipos han probado ser más cosmopolitas que otros al infectar humanos en varios continentes, mientras que otros genotipos están más restringidos geográficamente.<sup>38</sup> Por ejemplo el genotipo III del DENV-1 se ha distribuido en África, América, India y el sureste de Asia, mientras que el genotipo I solo está en el sureste de Asia. No está claro si esta variación geográfica es resultado de la exportación de linajes específicos o refleja las diferencias intrínsecas en la adaptabilidad.<sup>38, 39, 40</sup>

Hay evidencia de que los genotipos del DENV difieren en adaptabilidad y virulencia y que esto puede tener un mayor impacto en la estructura de las poblaciones virales. Esto se hace más evidente en los casos del reemplazo de linaje o clado, en donde hay un cambio abrupto en la composición genética de los virus infectantes en una población específica. Hay un número de eventos de reemplazo documentados y en algunos de estos casos, la evidencia de que los virus también difieren en la adaptabilidad es apremiante. El caso mejor documentado es el del reemplazo del genotipo Americano de baja virulencia de DENV-2 por el genotipo de alta virulencia del Sureste Asiático de DENV-2 en Latinoamérica.<sup>36, 41, 42</sup>





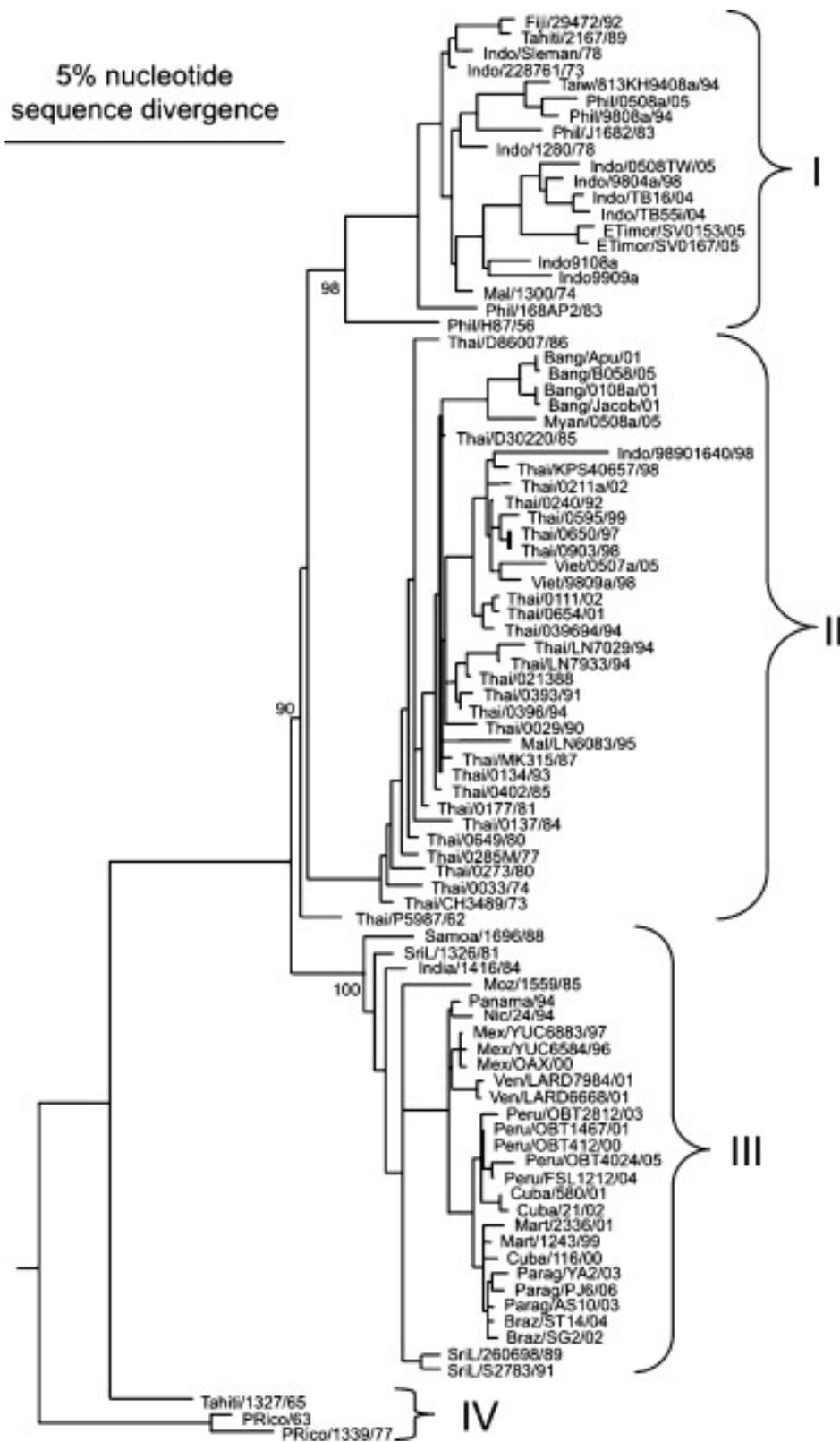


Figura 11. Relación filogenética de cepas de DENV-3 de GenBank.<sup>33</sup>

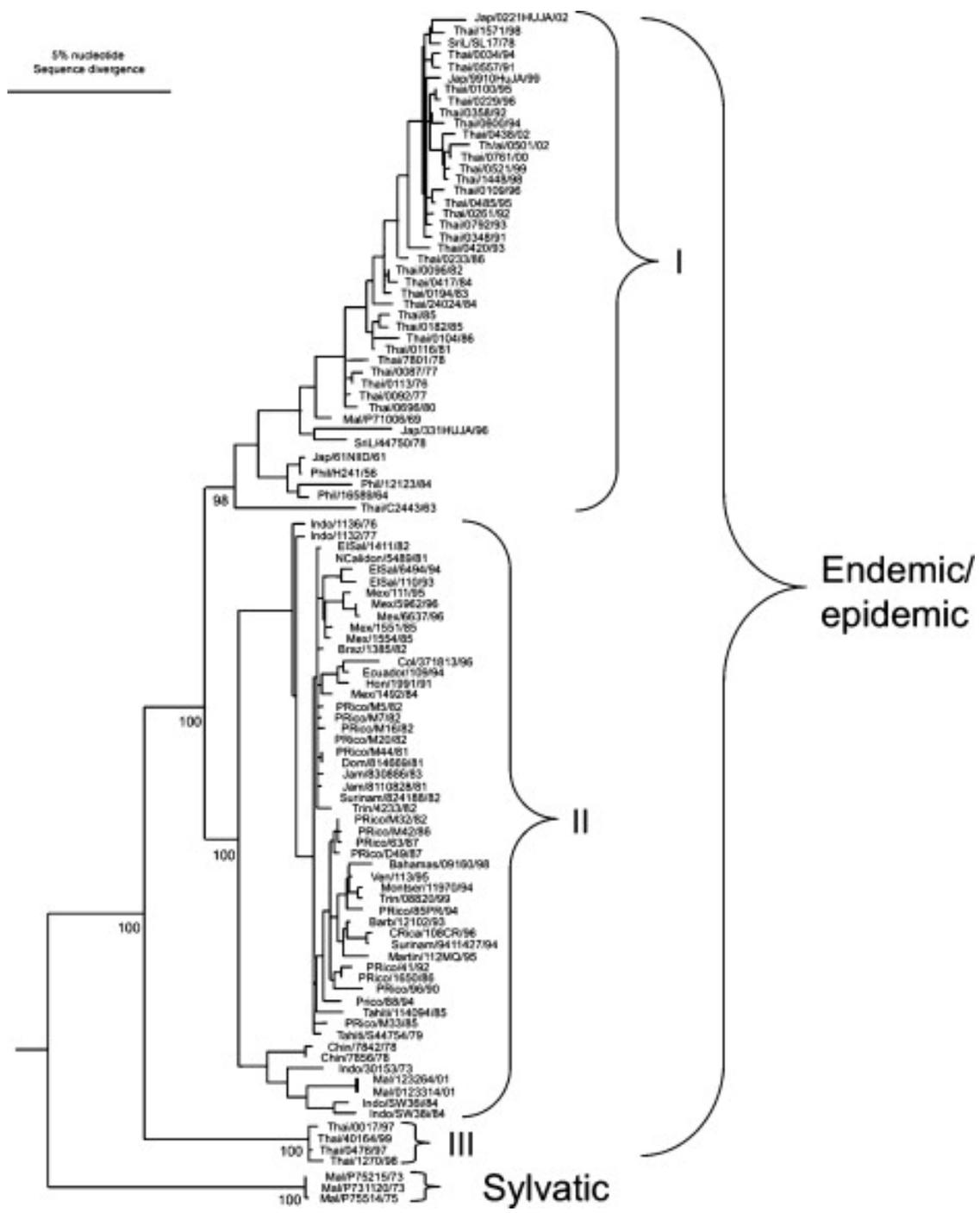


Figura 12. Relación filogenética de cepas de DENV-3 de GenBank.<sup>33</sup>

## 1.4 Factores ambientales involucrados

Una compleja interacción de factores tiene influencia en la eficacia del vector en la transmisión viral con factores ambientales como precipitación, humedad y temperatura siendo incorporados en los modelos anteriores de transmisión del dengue.<sup>43, 44</sup> Sin embargo múltiples estudios han enfatizado la importancia de los factores socioeconómicos en la dinámica de transmisión del dengue<sup>45, 46, 47, 48</sup>, como el movimiento de los mosquitos vectores y personas virémicas<sup>49</sup>, pobreza urbana, hacinamiento, y pobre infraestructura de salud.

### 1.4.1 Precipitación

La presencia de superficie de agua estancada o contenedores hechos por el hombre es un pre requisito para la oviposición y el desarrollo larvario y pupal.

Aunque los principales hábitats larvarios son los contenedores de agua hechos por el hombre, en varios lugares se han establecidos relaciones temporales a fina escala entre precipitación, abundancia del vector e incidencia del dengue.<sup>50, 51, 52</sup> Estas relaciones no son universales, ya que ocurren en periodos secos en algunos lugares<sup>53</sup> y presentan patrones variantes cuando hay dos estaciones de lluvia.<sup>54</sup> En general hay evidencia de que áreas con mayores cantidades de precipitación está asociadas con un mayor riesgo de infección por dengue.<sup>55</sup>

### 1.4.2 Temperatura

Por ser ectotermos pequeños, la distribución de los mosquitos *Aedes*, duración de ciclo vital, supervivencia y comportamiento son dependientes de temperatura.<sup>56</sup> Similarmente, el periodo de incubación extrínseco del virus del dengue en el mosquito disminuye a temperaturas entre 30 y 35°C.<sup>57</sup> Se encontró una asociación directa entre altas temperaturas y la incidencia de dengue en humanos.<sup>58</sup>

### 1.4.3 Índice de vegetación

Hay una asociación estrecha relación entre la humedad local, el desarrollo de vegetación y la abundancia de cría de mosquitos.<sup>59</sup> Aunque los huevos de *Aedes* son resistentes a la desecación, también los mosquitos adultos necesitan humedad para sobrevivir.<sup>60, 61</sup>

La protección por el dosel arbóreo se había asociado previamente con mayores densidades larvarias debido a que reducía la evaporación de los contenedores, disminuía la velocidad del viento debajo de ella y protegía los hábitats exteriores de rayos directos del sol.<sup>62, 63</sup>

## 1.5 Mecanismo de transmisión de DENV

Ocurren dos distintos ciclos de transmisión de DENV: endémico y selvático. En el ciclo endémico, DENV circula entre humanos, quienes sirven como reservorio y hospederos de amplificación y los vectores peridomésticos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. La eficiencia del ciclo endémico, que es completamente independiente evolucionaria y ecológicamente independiente de los ciclos selváticos ancestrales, es potenciado mayormente por la ecología y comportamiento de *A. aegypti*.

Estas especies se han adaptado a la convivencia con humanos, proliferando en acumulaciones de agua en basureros, patios y jardines o en contenedores desechados por humanos. Los mosquitos *Aedes* se alimentan durante el día.<sup>64</sup> Si se les perturba durante su alimentación suelen buscar gente cercana para continuar con su alimentación, teniendo el potencial de infectar con el virus a todos los miembros de una familia o de un grupo, quienes desarrollarán la infección entre 24 y 36 horas post-inoculación inicial.<sup>64, 65</sup>

Existen reportes de un ciclo de transmisión selvático del virus del dengue en bosques y selvas de Asia y África que involucra a primates inferiores como hospederos.<sup>33, 65</sup> Sin embargo, el ciclo de transmisión más importante es el urbano o epidémico. El humano es el hospedero de excelencia debido a la alta viremia sistémica que se produce, eliminando la necesidad de un hospedero enzoótico para amplificar al virus.<sup>65, 66</sup>

Los mosquitos adquieren el virus cuando se alimentan de un humano virémico, y pueden transmitir el virus si se alimentan de otro humano de 8 a 12 días después de la ingesta inicial.<sup>64</sup> Este periodo se denomina incubación extrínseca y representa el tiempo en el cual el virus se replica en las glándulas salivales del vector, el cual permanece infectado durante el resto de su periodo de vida (15 a 65 días).<sup>67</sup> Se ha documentado la transmisión transovárica del virus en mosquitos, lo cual significa que los mosquitos infectados pueden pasar el virus a su progenie.<sup>68</sup>

El riesgo de ser mordido por un mosquito es más alto durante el inicio de la mañana y en las últimas horas de la tarde antes de la puesta del sol, ya que son los periodos en los cuales las hembras se alimentan con mayor frecuencia.<sup>69</sup> Sin embargo esto no representa una limitante, puesto que pueden alimentarse a cualquier hora del día.<sup>64</sup> Una vez que el virus se ha inoculado en el humano, el virus se replica entre 3 y 14 días en un periodo denominado incubación intrínseca, que antecede a la aparición de la sintomatología de la fiebre de dengue.<sup>66, 67</sup>

Aunque no se ha documentado la transmisión directa del virus de persona a persona, existen reportes de casos originados por donación y trasplante de órganos y médula ósea, lesiones ocasionadas por punzocortantes y contacto con membrana mucosa contaminada.<sup>70, 71, 72</sup>

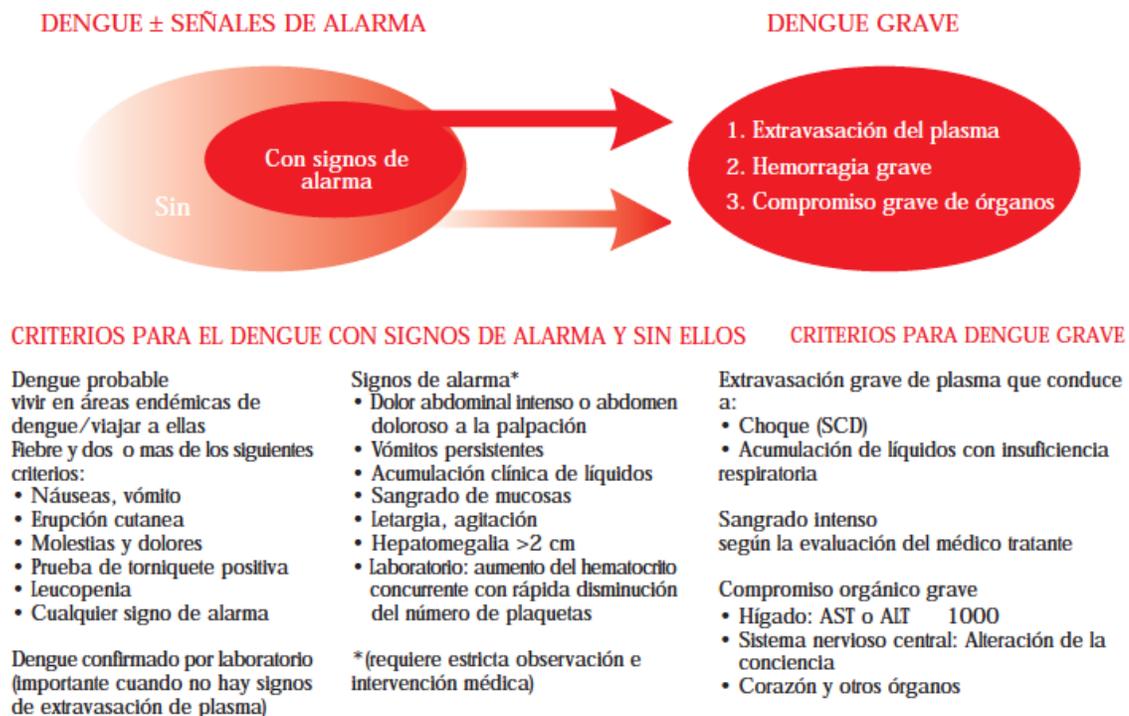
También se considera actualmente a la enfermedad como un riesgo ocupacional para el especialista en el campo de la salud, puesto que se han reportado casos de transmisión del virus de paciente a médico, ocasionados por lesiones con agujas contaminadas con sangre virémica.<sup>73, 74</sup>

### **1.6 Nueva clasificación clínica propuesta por la OMS 2009**

El dengue tiene un amplio espectro de presentaciones clínicas, a menudo con evolución clínica y resultados impredecibles. El triage, el tratamiento apropiado y el lugar donde se debe administrar (en un centro de atención médica o en casa), se determina según la clasificación de los casos de dengue.

Debido a dificultades en el uso de la clasificación anterior y en la aplicación de los criterios clínicos para la fiebre hemorrágica por dengue, junto con el aumento en los casos de dengue clínicamente graves que no cumplían con los estrictos criterios para ese diagnóstico, se reconsideró la clasificación.<sup>5,</sup>  
75

Utilizando una serie de parámetros clínicos, de laboratorio o ambos, se puede observar una diferencia bien definida entre el dengue grave y el no grave. Sin embargo, por razones prácticas fue conveniente dividir el gran grupo de pacientes con dengue no grave en dos subgrupos: dengue con signos de alarma y dengue sin signos de alarma.<sup>5</sup> Los criterios para el diagnóstico de dengue (con signos de alarma y sin ellos) y dengue grave, se presentan en la Figura 13.



**Figura 13.** Clasificación de casos de dengue sugerida y niveles de gravedad.

La clasificación según la gravedad tiene gran potencial para su uso práctico por los médicos tratantes, para decidir dónde y cuán intensivamente se debe observar y tratar al paciente.<sup>5</sup>

### 1.7 Manifestaciones clínicas

Después de un periodo de incubación de 3 a 7 días, la sintomatología inicia súbitamente y sigue tres fases: una fase febril inicial, una fase crítica y una fase de recuperación espontánea.<sup>76</sup>

La fase inicial es típicamente caracterizada por hipertermia ( $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ ) acompañado de cefalea, vómito, mialgias, artralgias y algunas veces con exantema macular. En los niños la fiebre está presente pero presentan menores manifestaciones clínicas que los adultos. Manifestaciones hemorrágicas leves como petequias y equimosis, particularmente en sitios de venopunción, pueden

estar presentes. Se puede encontrar una leve o moderada trombocitopenia y leucopenia, con una elevación moderada de aminotransferasas. Esta fase dura de 3 a 7 días, después de la cual la mayoría de los pacientes se recupera sin complicaciones.<sup>76</sup>

En una pequeña proporción de pacientes, típicamente niños y adultos jóvenes, un síndrome de fuga vascular sistémica se hace aparente al tiempo de defervescencia, evidenciado como hemoconcentración, hipoproteinemia, efusiones pleurales y ascitis. Inicialmente los mecanismos compensatorios fisiológicos son regulados a la alza para mantener una adecuada circulación a los órganos críticos, resultado en una disminución en la presión de pulso cuando la pérdida de plasma se vuelve crítica. Si la presión de pulso baja a 20 mmHg o menos, acompañado de signos de colapso vascular periférico se diagnostica síndrome de shock por dengue. Durante la transición de la fase febril a la crítica, entre los días 4 a 7 de la enfermedad, es crucial para el clínico que esté atento a los signos de alarma. Estos signos de deterioro inminente son vómito persistente, dolor abdominal severo, hepatomegalia, un nivel de hematocrito alto o en incremento junto con una rápida disminución en la cuenta plaquetaria, efusiones serosas, hemorragia en mucosas y letargia o inquietud. Las manifestaciones hemorrágicas son más comunes en esta fase crítica. En niños, el sangrado clínicamente significativo ocurre solo raramente y en asociación con shock profundo y prolongado. Sin embargo en adultos con pequeñas fugas de plasmáticas pueden ocurrir hemorragias cutáneas, hemorragia gastrointestinal o vaginal, o ambas.<sup>77</sup> Es común ver trombocitopenia moderada a severa, con cuentas de plaquetas menores de  $20 \times 10^9$  por litro durante la fase crítica, seguido de una mejoría rápida durante la fase de recuperación.<sup>76</sup>

La permeabilidad vascular alterada es corta y se revierte espontáneamente aproximadamente en 48 a 72 horas. Un segundo exantema se puede presentar en la fase de recuperación, pudieron ser maculopapular

moderado a uno severo con lesiones pruriginosas, lo que sugiere una vasculitis leucocitoclástica. Los adultos pueden tener fatiga profunda después de varias semanas de la recuperación.<sup>76</sup>

## **1.8 Pruebas diagnósticas**

El diagnóstico por laboratorio de fiebre por dengue es establecido directamente por la detección de componentes virales en suero o indirectamente por serología. La sensibilidad de cada prueba es influenciada el tiempo en el que se toma la muestra.<sup>78</sup> Dentro de los métodos disponibles para el diagnóstico de fiebre por dengue, el aislamiento viral provee el resultado más específico.<sup>21</sup> Sin embargo, no siempre hay instalaciones disponibles que cuenten con las facilidades de cultivo viral. La detección del genoma viral o antígenos virales provee evidencia de infección. La seroconversión de anticuerpos IgM o IgG es lo estándar para confirmar el diagnóstico de infección. La presencia de IgM o altos niveles de IgG en una muestra de suero de un caso sospechoso de dengue, sugiere la probable infección.

### **1.8.1 Aislamiento viral**

La línea celular C6/36 de mosquito *A. albopictus* es el método de elección para el aislamiento de DENV, aunque otras líneas celulares de mosquito o mamíferos pueden ser utilizadas.<sup>79</sup> Sueros que hayan sido extraídos de casos sospechosos de dengue en los primeros 5 días pueden ser utilizados para aislamiento viral. Después de un periodo de incubación que permita la replicación viral, se realiza identificación viral con anticuerpos monoclonales específicos para dengue en inmunofluorescencia o ensayos de PCR.<sup>80, 81, 82</sup> El suero es generalmente utilizado para el aislamiento viral, pero también puede utilizarse plasma, leucocitos, sangre completa y tejidos obtenidos de autopsia.<sup>83</sup>

## 1.8.2 Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas son comúnmente usadas para el diagnóstico de infección por dengue debido a que son relativamente baratas y fáciles de realizar, comparadas con cultivo viral y métodos moleculares.

**1.8.2.1 ELISA MAC.** El ensayo inmunoenzimático de captura de anticuerpo IgM se utiliza debido a que altos niveles de IgG en suero compiten con el IgM para la unión de antígenos. Los anticuerpos IgM específicos para dengue son detectados primero capturando todos los IgM utilizando anticuerpos específicos contra IgM humano unidos a una fase sólida. El ensayo utiliza una mezcla de antígenos de los cuatro serotipos de dengue. Comparado con el ensayo de inhibición de hemaglutinación, estándar de oro, el ELISA MAC tiene una sensibilidad del 90% y una especificidad del 98% en muestras recolectadas después de 5 días de fiebre. Resultados falso positivos debido a anticuerpos IgG específicos de dengue o reactividad cruzada con otros flavivirus es una limitación del ELISA MAC, sobre todo en regiones donde co circulan múltiples flavivirus.

**1.8.2.2 ELISA IgG.** El ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgG específicos para dengue puede ser utilizado para confirmar una infección de dengue en muestras de suero pareadas. Es usado también ampliamente para clasificar infecciones primarias o secundarias.<sup>5, 80</sup> El ensayo utiliza los mismos antígenos de dengue que el ELISA MAC y sus resultados correlacionan con los ensayos de inhibición de hemaglutinación. En general, el ELISA carece de especificidad en los grupos de flavivirus, sin embargo se ha demostrado que la respuesta de IgG a la proteína prM es específica para cada uno de los flavivirus.<sup>85</sup> De manera similar, se ha demostrado que IgG específica para la proteína NS5 puede potencialmente discriminar entre infecciones causadas por Virus del Oeste del Nilo, DENV y virus de encefalitis de St. Louis.<sup>86</sup> Los ensayos de IgG también son útiles para estudios seroepidemiológicos para identificar infecciones de dengue pasadas.

### **1.8.3 Pruebas moleculares**

Se han desarrollado muchas pruebas moleculares para el diagnóstico de infección por DENV. Unas técnicas son cuantitativas y otras pueden utilizarse para serotipificar.

**1.8.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa (RT-PCR).** Se han descrito muchos ensayos de RT-PCR para dengue en los últimos 10 años. Estos ensayos tienen como blanco diferentes genes y utilizan diferentes procedimientos de amplificación. Los ensayos más usados son RT-PCR simples,<sup>87, 88</sup> ensayos de RT-PCR anidadas,<sup>89</sup> o ensayos de RT-PCR multiplex de un solo paso.<sup>90</sup> La sensibilidad de los ensayos de RT-PCR en comparación al aislamiento viral en cultivo celular de mosquito varía entre 25% y 79%.<sup>91</sup>

**1.8.3.2 Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (RT-qPCR).** El ensayo de RT-qPCR es una prueba de un solo paso que permite cuantificar el título viral en poco tiempo. La detección por sondas fluorescentes del blanco amplificado reemplaza la necesidad de realizar una electroforesis. Se han realizado ensayos “singleplex”, donde se detecta un solo serotipo por reacción, o “multiplex” identificando los 4 serotipos de una sola reacción.<sup>92, 93, 94, 95</sup>

Una ventaja de este tipo de ensayos es que permite determinar el título viral en etapas tempranas de la enfermedad, que se piensa es un importante predictor de severidad.<sup>96</sup>

### **1.8.4 Detección de antígeno viral NS1**

NS1 es una proteína producida por todos los flavivirus y es esencial para la replicación viral y viabilidad. Debido a que esta proteína es secretada al torrente sanguíneo, muchas pruebas se han desarrollado para diagnosticar infecciones por DENV utilizando NS1. Estas pruebas no hacen diferente de serotipo.<sup>97</sup> En infecciones primarias, la sensibilidad diagnóstica de la detección

de NS1 en la fase febril puede alcanzar el 90% y la antigenemia puede durar por varios días después de la fiebre.<sup>98, 99</sup> La sensibilidad en la fase febril en infecciones secundarias es del 60 al 80%.<sup>100</sup>

## **1.9 Tratamiento**

### **1.9.1 Tratamiento convencional**

No hay agentes antivirales efectivos para tratar las infecciones por DENV y el tratamiento sigue siendo de sostén, con particular énfasis en el manejo de líquidos.<sup>5</sup> Pacientes sin complicaciones y que toleren la ingesta de líquidos pueden permanecer en casa con instrucciones de acudir al hospital inmediatamente si ocurre sangrado o signos de alarma sugestivos de pérdida vascular. El desarrollo de cualquier signo de alarma indica la necesidad de hospitalización y observación. Así como el uso de líquidos parenterales cuando los pacientes no toleren vía oral o un rápido incremento del hematocrito. Soluciones cristaloides isotónicas deben ser utilizadas, dejando a las soluciones isotónicas coloidales para pacientes con shock profundo o lo que no hayan respondido a la terapia inicial con cristaloides.<sup>101</sup> Para limitar el riesgo de sobrecarga de líquidos, la terapia parenteral debe ser utilizada lo mínimo posible, permitiendo la estabilidad cardiovascular hasta que la permeabilidad vascular regrese a la normalidad.<sup>76</sup>

### **1.9.2 Tratamientos en estudio**

Existen diversos medicamentos en estudio, enfocándose en inhibidores del virus e inhibidores en el hospedero.

**1.9.2.1 Inhibidores virales.** Están en desarrollo diversos medicamentos diseñados para inhibir: la entrada a la célula, cápside, NS4B, proteasas virales, helicasa, metiltransferasa, análogos de nucleósido y no análogos de nucleósido.<sup>102</sup> Los inhibidores de entrada celular solamente han demostrado ser eficaces en modelos *in vitro* y/o no han sido probados en el modelo de

dengue en ratón AG129.<sup>102, 103, 104, 105, 106</sup> El inhibidor de cápside, ST-148 previene la interacción de C con la membrana celular. Fue eficaz en el modelo de ratón AG129 reduciendo la viremia en plasma 52 veces cuando fue administrado dos veces al día. Este compuesto tiene buena biodisponibilidad sistémica cuando es administrado intraperitonealmente y es posible que se desarrollen pruebas preclínicas.<sup>107</sup>

Los compuestos inhibidores de NS4B, proteasa, helicasa, metiltransferasa solo fueron eficaces *in vitro*.<sup>102</sup> El análogo de adenosina NTD-008 fue eficaz en el modelo de ratón pero hubo efectos secundarios severos en ratas y perros, por lo que se discontinuó su estudio.<sup>108</sup>

**1.9.2.2 Inhibidores del hospedero.** En cuanto a los inhibidores del hospedero, el inhibidor de traducción viral NITD-451 fue eficaz en el modelo de ratón, pero desarrollaron efectos adversos. El inhibidor de biosíntesis de pirimidinas fue efectivo *in vitro*, pero no fue eficaz en ratones debido a la ingesta de pirimidinas en la dieta. El único medicamento que está actualmente en fase clínica Ib es el celgosivir, inhibidor de alfa glucosidasa. Se está evaluando la farmacocinética, seguridad y tolerancia en adultos con diagnóstico de fiebre por dengue.<sup>109, 110, 111</sup>

## 1.10 Prevención

La prevención de la enfermedad puede darse controlando los vectores y por otra parte vacunando a la población expuesta.

### 1.10.1 Control de vectores

Para reducir o prevenir la transmisión de DENV no hay otra alternativa más que el control del vector. La mayoría de los países endémicos tienen un componente de control de vector en sus programas de control y prevención del dengue, pero la práctica de los profesionales de salud es insuficiente, y/o

inefectiva. Debido a su comportamiento y su estrecha asociación con los humanos, la eliminación del principal vector *A. aegypti*, requiere del uso de métodos de control de vector, manejo ambiental y manejo químico basado en la aplicación de larvicidas y adulticidas en espray.<sup>5</sup> El control químico se debe de añadir al agua almacenada para uso doméstico, incluyendo el agua para beber. Desde 1970, el organofosforado temefos ha sido usado ampliamente, pero los niveles de resistencia han aumentado así como el rechazo de la ciudadanía de tratar su agua para beber.<sup>112</sup> Los agentes de control biológico, incluyendo peces larvívoros y copépodos, han demostrado un rol en el control de *A. aegypti* pero dificultades operacionales han prevenido su amplio uso.<sup>113, 114</sup> El manejo ambiental es considerado un componente esencial para la prevención y el control del dengue, particularmente cuando se enfoca en los contenedores hábitat del vector. La reducción de los contenedores, campañas de descacharrización, limpieza y vaciamiento de contenedores entra en manejo ambiental.

### **1.10.2 Vacunas en desarrollo**

Múltiples dificultades han impedido el desarrollo de una vacuna eficaz. Esto incluye la epidemiología de los cuatro serotipos de DENV, la compleja respuesta inmunológica después de infección natural y la falta de un modelo animal validado. Las vacunas que están en desarrollo son de: virus vivos atenuados, virus inactivados, subunidades recombinantes, vectores virales y vacunas de ADN.<sup>115</sup>

**1.10.2.1 Virus vivos atenuados.** Las vacunas de virus vivos atenuados son: Sanofi Pasteur CYD TDV, GlaxoSmithKline TDV, DENVax y Tetra-Vax-DV. La vacuna CYD TDV de Sanofi Pasteur es la más avanzada en ensayos clínicos. Se encuentra en fase clínica III en 10 países y se pretende terminar en 2016.<sup>116</sup> Esta vacuna está hecha de virus quimérico donde se insertó prM y E de DENV1-4 en el esqueleto de la vacuna de fiebre amarilla cepa 17D.<sup>117, 118</sup> La vacuna es segura e inmunogénica.<sup>119</sup> Solo que la eficacia después de la tercera

inmunización fue de 55.6, 9.2, 75.3 y 100% para DENV-1, 2, 3 y 4 respectivamente.<sup>116</sup> La vacuna TDV de GlaxoSmithKline está formada por cuatro vacunas monovalentes atenuadas por pasajes seriados en células PDK.<sup>120, 121, 122</sup> La vacuna es segura e inmunogénica. En adultos la respuesta de anticuerpos neutralizantes tetravalentes fue de 36 a 63%.<sup>123</sup> En niños sin exposición previa la seroconversión estuvo presente en el 100% después de dos dosis.<sup>121</sup> El signo primario que solo se encontró en el grupo de pacientes vacunados fue un exantema autolimitado.<sup>124</sup> La vacuna DENVax está siendo desarrollada por el Center for Disease Control e Inviragen basada en la vacuna DENV-2 atenuada por pasajes seriados en PDK (DENV-2 PDK53).<sup>125</sup> Una vacuna quimérica se desarrolló sustituyendo prM y E de DENV-2 por DENV-1, 3 y 4.<sup>126</sup> Las formulaciones son inmunogénicas contra 4 serotipos. Sin embargo los títulos de anticuerpos neutralizantes no son iguales.<sup>127</sup> Actualmente se está llevando a cabo un ensayo fase II en niños y adultos. La vacuna Tetra-Vax-DV está siendo desarrollada por el National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Se realizó a utilizando muta génesis dirigida. Específicamente la delección de 30 nucleótidos de la región 3' UTR de DENV-1 y 4, resultado en atenuación satisfactoria.<sup>128, 129, 130</sup> La respuesta de anticuerpos neutralizantes después de una dosis fue de 75 – 90%.<sup>131</sup> Esta vacuna ha sido propuesta para su posterior evaluación en ensayos fase II.

**1.10.2.2 Virus inactivados.** Este tipo de vacuna está siendo desarrollado por GlaxoSmithKline. Estudios preclínicos con DENV-2 inactivado con formalina mostró protección en modelo de ratón y primates no humanos.<sup>132</sup> Actualmente se encuentran dos ensayos fase I: vacuna DENV-1 inactivada y vacuna tetravalente inactivada.

**1.10.2.3 Subunidades recombinantes.** La vacuna se subunidades recombinantes está siendo desarrollada por Merck. Se utilizaron células S2 de *Drosophila* que expresaron proteína E truncada (80E) en su conformación nativa.<sup>133, 134</sup> Formulaciones tetravalentes de subunidades 80E se evaluaron

como potenciales candidatos en ratones y primates no humanos. Actualmente ensayo fase I de subunidades tetravalentes con adyuvantes alhydrogel e ISOCOMATRIX.<sup>133</sup>

**1.10.2.4 Vectores adenovirales.** Existe un candidato de vacunas tetravalentes utilizando adenovirus tipo 5 (AdV5). El adenovirus codifica el dominio III de proteína de envoltura. Induce respuesta inmune humoral y celular contra los cuatro serotipos en ratones.<sup>135</sup> Monos rhesus inmunizados fueron protegidos al ser expuestos a DENV-1 y 3. Además hubo una reducción significativa en el número de días virémicos al ser expuestos a DENV-2 y 4.<sup>136</sup>

**1.10.2.5 ADN.** Las vacunas de ADN constan de una secuencia clonada en un plásmido esqueleto. El plásmido es inyectado permitiendo que el ADN sea tomado por células presentadoras de antígeno, que expresarán los genes codificados en el plásmido para generar los antígenos.<sup>137</sup> La codificación de DENV-2 prM/E NS1 demostró protección en ratones.<sup>138</sup> En fase I la vacuna monovalente DENV-1 fue segura a bajas y altas dosis y obtuvo una respuesta inmunogénica moderada.<sup>139</sup>

## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES

Aunque el rol de las variantes genéticas virales había sido implicada en la severidad del dengue por hace muchos años,<sup>140, 141</sup> no fue hasta que se desarrollaron los árboles filogenéticos que se confirmó la asociación entre genotipos específicos con enfermedad de mayor o menor severidad.<sup>36, 142, 143</sup>

De ese modo, los serotipos 2 y 3 del sureste de Asia e India, respectivamente, han sido identificados como los causantes de fiebre hemorrágica por dengue y más infecciones primarias con enfermedad severa. Los genotipos más virulentos han desplazado a los genotipos autóctonos o nativos de América, conllevando a epidemias más severas con la primera aparición en el continente.<sup>30</sup>

#### **2.1 Alteraciones estructurales relacionadas con patogénesis.**

Se secuenció el genoma completo de 11 virus DENV-2 del Sureste de Asia y de América para evaluar si la diversidad genética estaba asociada con distintas presentaciones clínicas.<sup>42</sup> El genotipo del sureste asiático está relacionado con fiebre por dengue y fiebre hemorrágica, en cambio el genotipo americano solo con fiebre por dengue.

Aunque se encontraron diferencias en nucleótidos y aminoácidos, no hubo sitios específicos que se pudieran correlacionar con la atenuación o enfermedad severa en humanos.<sup>42</sup>

La mayoría de las sustituciones de nucleótido ocurrió en la posición del tercer codón y solamente del 6.9 al 16.3% de los cambios resultó en cambios de aminoácido. La mayoría de los cambios ocurrieron en las proteínas no estructurales.

Ninguno de estos cambios fue consistente entre muestras de fiebre por dengue o dengue hemorrágico y no pudieron relacionarse con el resultado de la enfermedad.<sup>42</sup>

Un total de 55 cambios de aminoácidos fueron detectados entre los dos genotipos, mientras que solo 6 resultaron en cambio de carga del aminoácido y 5 resultaron en cambio de cadena lateral (polar contra no polar). Los cambios de aminoácido presentados en prM-28 (Glu → Lys) y prM-31 (Val → Thr) revelaron un cambio en hidrofobicidad y predicción antigénica para las muestras del genotipo americano. La diferencia de carga en E-390 (Asp → Asn) no cambió los perfiles de hidrofobicidad y antigénicos. En los genes no estructurales, las sustituciones de aminoácido en la posición NS1-128 (Ser → Leu) y NS3-567 (Ile → Thr) resultaron en un cambio en hidrofobicidad y predicción antigénica. Mientras que un cambio de cargas en NS4b-17 de neutral a positivo (Ser → His) no cambió la estructura secundaria. Cinco de 8 cambios detectados en NS5. Tres sustituciones NS5-645 (Asn → Asp), NS5-676 (Ser → Arg/Lys) y NS5-800 (Lys → Ser) con cambio de carga no alteró la estructura. Sin embargo cambios en NS5-271 (Ile → Thr) y NS5819 (Gln → Leu) resultaron en cambios significativos en los perfiles de hidrofobicidad y predicción antigénica.<sup>42</sup>

En el árbol filogenético, las muestras de Tailandia, no hubo segregación obvia de acuerdo a la región geográfica ni de acuerdo al diagnóstico de la enfermedad, fiebre por dengue o dengue hemorrágico. Sin embargo, las muestras de América asociadas solo con fiebre por dengue solo segregaron en un grupo monofilético distinto al del genotipo del sureste de Asia.<sup>42</sup>

La diferencia de aminoácido observada entre los genotipos del sureste de Asia y América en la posición 390 del gen de la proteína E es de gran importancia. La proteína E al ser expuesta en la superficie del virión, representa un antígeno viral dominante, es responsable de la adhesión viral.<sup>144, 145</sup>

Existen reportes donde clonas de DENV-2 con un solo cambio de aminoácido en la posición E-390 de aspartato (Asp) a histidina (His) se tornó virulenta cuando se inoculó de manera intracerebral a ratones lactantes.<sup>146</sup> Mutaciones de Asp a asparagina (Asn) confirieron atenuación, sin embargo esto no se observó en los virus del genotipo del sureste de Asia analizados (Asn) comparados con los de América (Asp).<sup>42</sup>

El análisis de la proteína de envoltura muestra que el residuo E-390 está localizado en una región altamente hidrofílica. Aunque Asn y Asp son hidrofílicas, Asn tiene carga neutral y Asp carga negativa.<sup>42</sup>

En un estudio más reciente realizado en Brasil donde compararon 34 cepas de virus obtenidos de diferentes estados de Brasil. Las cepas comparadas mostraron una identidad nucleotídica del 96 a 100% con divergencia de hasta 4.3%. La identidad a nivel de aminoácidos fue de 98 a 100% y la divergencia no sobrepasó el 1.7%. se observó un número grande de sustituciones sinónimas, localizadas en la tercera posición del codón. Todas la sustituciones que ocurrieron en la segunda posición del codón resultaron en cambios de aminoácido.<sup>147</sup>

Analizando solo las secuencias de Brasil, se observó que varios aminoácidos fueron conservados en todas cepas. Las sustituciones no sinónimas resultaron mutaciones puntuales. Se encontraron dos sustituciones no sinónimas en la proteína E en varias cepas: E297 Met → Thr y E338 Ser → Leu.<sup>147</sup>

Se compararon las cepas secuenciadas con una cepa de referencia de Guyana Francesa de 1989. Dentro de las 3 proteínas analizadas, se encontraron 37 sustituciones no sinónimas. De las cuales 18 resultaron en aminoácidos bioquímicamente diferentes.

Se encontraron dos en la proteína C: C10 (Arg → Gln) y C75 (Asn → Glu); dos en prM/M: prM133 (Phe → Ser) y M14 (Ala → Thr); 13 en la proteína E: E51 (Thr → Ala), E96 (Val → Tyr), E156 (Thr → Ala), E180 (Thr → Ala), E227 (Ser → Pro), E228 (Gln → His), E329 (Thr → Pro), E297 (Met → Thr), E338 (Ser → Leu), E346 (Thr → Ile) y (Thr → Ala), E362 (Glu → Gly), E473 (Ala → Thr) y E478 (Thr → Ala).<sup>147</sup>

El cambio en el residuo E180 y E297 se encuentran localizados en el dominio I de la proteína, el residuo E338 se encuentra en el dominio III, mientras que el residuo E473 en la región transmembranal. Cuando se comparó con la presentación clínica de los pacientes, los cambios de aminoácidos identificados no se relacionaron con la severidad de la enfermedad. Se identificaron sustituciones no sinónimas en virus aislados de pacientes con fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue. Sin embargo, casi todas las cepas aisladas de pacientes con fiebre hemorrágica presentaron un número elevado de sustituciones en la proteína E, y cuatro de seis cepas mostraron cambio en el residuo E338.<sup>147</sup>

## **2.2 Epidemiología molecular**

Se realizó un análisis de evolución molecular con el mayor número de muestras de cepas mexicanas de DENV a la fecha.

En el caso de DENV-1, las muestras obtenidas de Sonora, Sinaloa, Tamaulipas, Jalisco, Querétaro, Michoacán, Morelos, Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas y Quintana Roo se agruparon en el genotipo V América/África.

Aunque solo se observa un genotipo de DENV-1, el estudio revela que hubieron al menos tres introducciones debido a la presencia de 3 linajes filogenéticamente distintos.<sup>148</sup> La introducción número 1 se estima que fue de 1973 a 1978, compatible con la aparición en México después de la gran

epidémica de 1979-1981 y circuló al menos hasta 1986. La introducción número 2 fue entre 1985 y 1992 y circuló hasta 1995. La tercera introducción fue en el periodo de 1997 a 2001 y circuló hasta 2007. Se reportó que circuló hasta el 2007 dado que ese fue el año de la muestra más reciente. El virus de la tercera introducción circuló por casi todos los estados y se dispersó ampliamente por América Central.<sup>148</sup>

En relación al DENV-2, hubo también tres introducciones separadas, pero cada una fue de diferente genotipo. La primera introducción involucró virus del genotipo Americano con fecha de introducción estimada de 1974 a 1980. Debido a que no se han aislado virus de este genotipo desde 1995 es probable que esté extinto en México. La segunda introducción pertenece al genotipo Cosmopolita en el 1996; en el 2002 fue reportado por última vez por lo que se considera extinto. La tercera introducción involucra a virus del genotipo América/Asia, que fue descrito en Yucatán en la epidemia del 2002. Análisis subsecuentes mostraron que este genotipo pasó al estado de Oaxaca,<sup>149</sup> Sonora, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Baja California Sur, Sinaloa, Durango, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Veracruz, y Chiapas.<sup>148</sup>

A pesar los virus de la tercera introducción están relacionados estrechamente con los obtenidos en Costa Rica y Nicaragua, lo que indica que este genotipo se ha distribuido por Centroamérica. Los años de introducción se estimaron entre 1993 y 1997.<sup>148</sup>

En caso similar a DENV-1, las introducciones de DENV-3 involucraron virus de un mismo genotipo, en este caso el III. Hubo tres introducciones independientes, donde la primera fue en 1995. Aunque la estimación del ancestro en común más reciente fue de 1991, la primera vez que se detectó DENV-3 en México fue en 1995.

Se estimó que los virus del segundo linaje compartieron ancestro durante el periodo de 1991 a 1995, que es compatible con la primera aparición de DENV-3. Este linaje circuló hasta el 2000. Se estimó que la tercera introducción fue de 2002 a 2003 y sigue en circulación, de perdido hasta el 2006.

La pequeña cantidad de muestras de DENV-4 muestra dos introducciones del genotipo II en México. La primera es probable que ocurrió en el momento del brote de DENV-4 en 1981, aunque la estimación indica que fue de 1975 a 1979. Éste fue el linaje más común de DENV-4 en la población mexicana, sin embargo no se ha detectado desde 1997. La segunda introducción se detectó en una muestra de 2006, pero el análisis de ancestría estima 1989. A pesar de eso, es probable que haya entrado a México en un tiempo más cercano a 2006.<sup>148</sup>

En años recientes, se analizaron 36 cepas de DENV-1 aisladas en el estado de Nuevo León durante 2010. Se observó que las cepas pertenecían al genotipo V América/África y se distribuyeron en 3 grupos monofiléticos distintos. No se encontró relación entre grupo monofilético y presentación clínica, ya que se presentaron casos de fiebre por dengue y fiebre hemorrágica en los tres grupos. Es importante señalar que los tres grupos monofiléticos estuvieron cocirculando por el área metropolitana de Monterrey.<sup>150</sup>

## **CAPÍTULO 3**

### **JUSTIFICACIÓN**

A nivel mundial, incluyendo México, el incremento en el número de casos de dengue hemorrágico ha generado preocupación en los sectores de la salud. Aunado a esto, la incidencia de la enfermedad no es homogénea en nuestro país.

El estudio de las variaciones genéticas del virus del DENV podría ayudar a entender los cuadros clínicos presentados y establecer las relaciones y factores asociados en áreas con mayor y menor endemidad. El análisis filogenético de las variantes genéticas del DENV ofrecería una visión más clara sobre la relación entre las variantes existentes en diferentes regiones del país y su dinámica de la transmisión.

## **CAPÍTULO 4**

### **OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Identificar y analizar si existen variantes genómicas del virus del dengue que puedan estar relacionadas con una presentación clínica en particular, en una zona de baja y alta endemicidad en México.

#### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar, clínica y molecularmente, casos positivos de dengue en las zonas metropolitanas de Mérida, Yucatán y Monterrey, Nuevo León.
2. Amplificar y aislar el genoma de los virus del dengue a partir de sujetos infectados para posteriormente secuenciar el gen de envoltura (E).
3. Determinar si existen variaciones en la secuencia del gen E y se relacionan con las manifestaciones clínicas presentadas en los pacientes infectados con el DENV.
4. Realizar estudio filogenético para determinar si existe una relación entre los virus aislados de una zona con baja y alta endemicidad.

## CAPÍTULO 5

### METODOLOGÍA

#### 5.1 Estrategia General

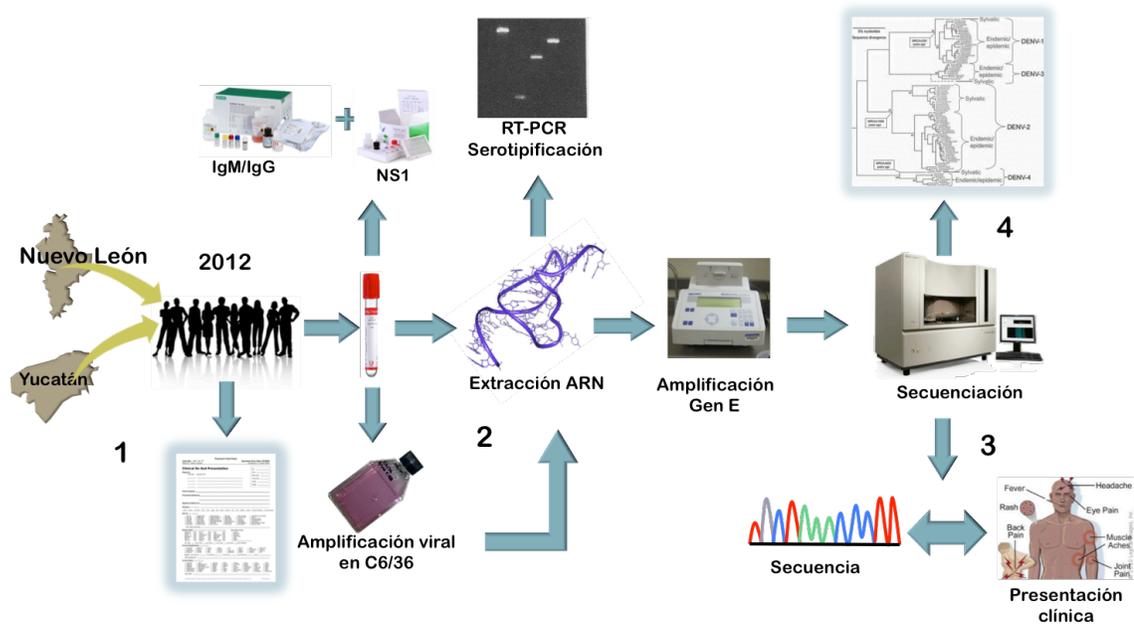


Figura 14. Estrategia general utilizada en este proyecto.

#### 5.2 Identificación de casos

Un caso probable de fiebre por dengue es todo caso sospechoso que presente fiebre y dos o más de las siguientes características: cefalea, mialgias, artralgias, exantema o dolor retroocular.

Un caso confirmado de fiebre por dengue es todo caso probable en el que se confirme infección reciente por DENV mediante técnicas de laboratorio.

### 5.2.1 Identificación de casos Yucatán

La identificación de casos de fiebre por dengue se realizó en la Unidad Universitaria de Inserción Social “San José Tecoh” (UUIS) de la Universidad Autónoma de Yucatán y en el Centro de Salud “Santa Rosa” de la Secretaría de Salud de Yucatán. El periodo en el cual se hizo la identificación en la UUIS fue del 16 de octubre al 14 de noviembre de 2012 y en el Centro de Salud Santa Rosa fue del 29 de octubre al 13 de noviembre de 2012.

Todo paciente que acudió a consulta médica de la UUIS fue evaluado primeramente por los pasantes de servicio social en medicina. Posteriormente los pacientes que tuvieran caso sospechoso de fiebre por dengue, fueron evaluados clínicamente siguiendo los criterios clínicos establecidos por la OMS y el Laboratorio de Arbovirología. Se recabó la historia clínica y se hizo exploración física intencionada.

Los pacientes que acudieron a consulta médica del Centro de Salud Santa Rosa fueron evaluados por los médicos en turno. Los pacientes con caso sospechoso de fiebre por dengue fueron evaluados posteriormente bajo los mismos criterios que en la UUIS.

Los datos clínicos fueron divididos de acuerdo a las manifestaciones de dengue no grave y grave, como se muestra en la Tabla 2. El formato de evaluación clínica se puede revisar en los anexos.

**Tabla 2.** Datos clínicos evaluados en los casos de Yucatán.

<b>Dengue no grave</b>	<b>Dengue grave</b>
Fiebre mayor a 38°C	Prurito
Rubefacción facial	Ictericia
Mialgia	Hepatomegalia
Artralgia	Esplenomegalia
Cefalea	Edema

Dolor retroocular	Derrame pleural
Conjuntivitis	Ascitis
Fotofobia	Hematemesis
Exantema	Melena
Escalofríos	Hematuria
Tos	Petequias
Congestión nasal	Equimosis
Congestión faríngea	Epistaxis
Linfadenopatía	Gingivorragia
Alteración del gusto	Hemorragias espontáneas
Dolor de garganta	Somnolencia
Anorexia	Alteración de consciencia
Náusea	Confusión mental
Vómito	Choque
Dolor abdominal	
Diarrea	

**5.2.1.1 Toma de muestra.** Para confirmar el diagnóstico de fiebre por dengue se le tomó una muestra de sangre venosa periférica de aproximadamente 5 mL a los pacientes. La muestra fue obtenida en tubos de sangre sin anticoagulante. Posterior a la toma, las muestras fueron refrigeradas a 4°C hasta su transporte al laboratorio de Arbovirología.

**5.2.1.2 Separación de muestra.** Después de recibir la muestra en el laboratorio, los tubos fueron centrifugados a 3,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente el suero fue separado del paquete globular y se hicieron alícuotas.

### **5.2.2 Identificación de casos Nuevo León**

Los casos que se analizaron en este trabajo fueron obtenidos gracias a la colaboración que se tiene con el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León. Los pacientes acudieron a consulta a cualquier Centro de Salud del estado donde fueron evaluados por los médicos en turno.

La sintomatología clínica presentada por los pacientes se ingresó a la base de datos del SINAVE. Las manifestaciones reportadas fueron las siguientes: fiebre, cefalea, mialgias, artralgias, dolor retroocular, exantema, escape de líquidos, hemorragias, vómito, y dolor abdominal.

A los pacientes que tuvieron caso sospechoso de fiebre por dengue, se les tomó una muestra de sangre venosa periférica sin usar anticoagulante para procesarla y obtener el suero que fue enviado al LESP. La muestra debió mantenerse en refrigeración desde la toma hasta la llegada al LESP. Si la muestra se tomó del día 0 al 5 de iniciada la fiebre se realizó determinación del antígeno NS1 por ELISA. Si se obtuvo un resultado positivo se confirmó el caso, si fue negativo se procedió a realizar ELISA para IgG (cuando la muestra fue de paciente con 0 a 3 días de iniciada la fiebre) o ELISA para IgM (cuando la muestra fue tomada 4 a 5 días de iniciada la fiebre). Si la determinación de IgM por ELISA resultó positiva, se confirmó el caso. Si se obtuvo un resultado negativo, se realizó la determinación de IgG. Un resultado positivo de la determinación de IgG por ELISA confirmó el caso. Un resultado negativo requiere diagnóstico diferencial.<sup>10</sup> En la Figura 15 se observa el algoritmo diagnóstico utilizado por el LESP para los casos probables de fiebre por dengue.

Los muestras que fueron positivas a la ELISA de NS1 y que fueron tomadas en dentro de los primeros 5 días de la fiebre, se les extrajo ARN y se realizó RT-qPCR para DENV<sup>92</sup>.

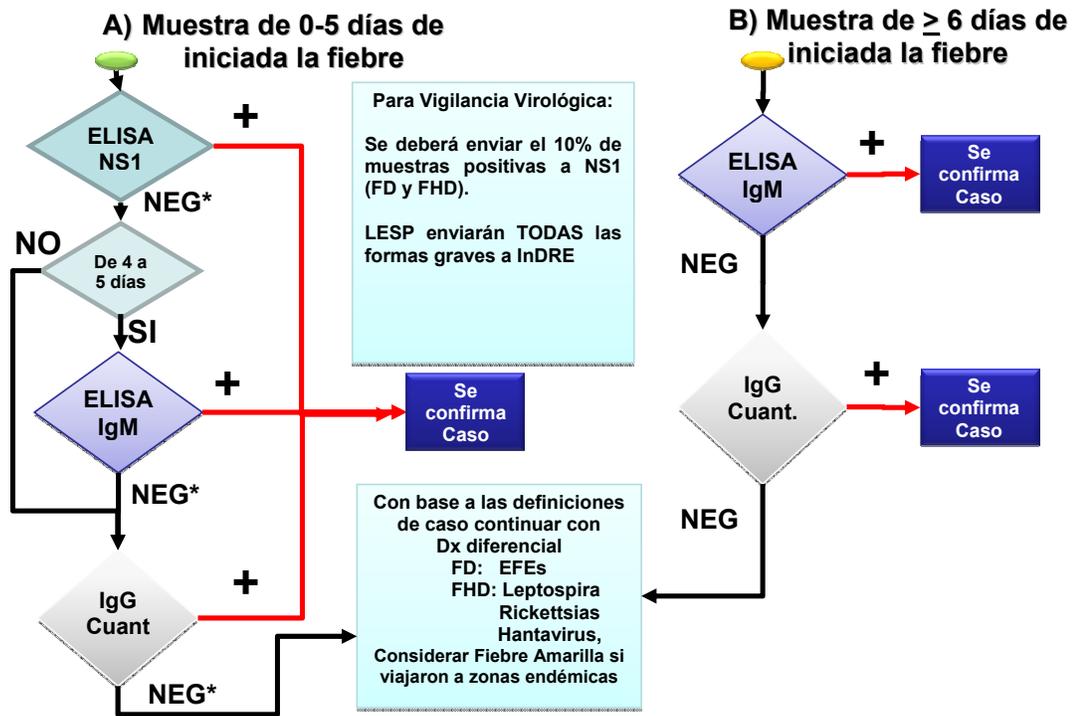


Figura 15. Algoritmo diagnóstico para casos probables de fiebre por dengue.

### 5.3 Detección del antígeno NS1 mediante método inmunoenzimático.

Se realizó la detección del antígeno NS1 a partir de 50  $\mu\text{L}$  de suero utilizando el Platelia™ Dengue NS1 Ag de BIORAD (# cat. 72830) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente se añadieron 50 $\mu\text{L}$  del diluyente en los pozos. Posteriormente se añadieron 50  $\mu\text{L}$  del calibrador, controles y suero, en diferentes pozos. A continuación se añadieron 100  $\mu\text{L}$  del conjugado para después incubar durante 90 minutos a 37°C. Al finalizar la incubación se desechó el contenido y se realizaron 6 lavados.

Se agregaron 160 $\mu\text{L}$  de cromógeno (TMB) en cada pozo y se incubó en obscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida al añadirse 100  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 1 N y la placa fue leída en un lector de placa a 450/620nm.

Para la interpretación de los resultados se necesita obtener el valor umbral del calibrador. El valor umbral del calibrador (CO) corresponde al valor medio de las densidades ópticas de los duplicados del calibrador. Los resultados se expresan en forma de relación, que se obtiene al dividir la densidad óptica de la muestra entre el valor umbral del calibrador. Obteniendo los cocientes se puede interpretar los resultados. Si la relación fue menor de 0.5 el resultado fue negativo. Si se obtuvo una relación de 0.5 a 1, el resultado fue indeterminado. En cambio, una relación mayor a 1 fue considerada como positiva.

#### **5.4 Detección de anticuerpos IgM contra el virus del dengue mediante ensayo inmunoenzimático**

Se realizó la detección de anticuerpos IgM contra el virus del dengue a partir de 10µL de suero utilizando el ensayo Dengue IgM Capture ELISA de Panbio (# cat. E-DEN01M) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se diluyó el antígeno 1/250 con el diluyente. Se mezcló el antígeno diluido con el anticuerpo monoclonal trazador en partes iguales. Se añadieron 100µL de suero diluido 1:1000 en diluyente en los pozos, al igual que los controles negativo, positivo y calibradores. Se incubó la placa durante una hora a 37°C para posteriormente realizar 6 lavados con el amortiguador correspondiente. Se agregó 100 µL de la mezcla de antígeno y trazador en cada uno de los pozos. Posteriormente se incubó por segunda ocasión por una hora a 37°C y se realizaron 6 lavados más. Se agregaron 100 µL de cromógeno (TMB) por pozo y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.

Al término de la incubación, se agregaron 100 µL de ácido fosfórico 1 M en cada pozo para parar la reacción y la placa se leyó a una longitud de onda de 450 nm con filtro de referencia de 600-650 nm.

Para la interpretación de los resultados se necesita primero calcular la media de la absorbancia de los calibradores y multiplicar por el factor de calibración (específico de cada lote) para obtener el valor del punto de corte. Se obtuvo el valor índice dividiendo la absorbancia de la muestra entre el punto de corte. Valores índice menores a 0.9 indicaron un resultado negativo. De 0.9 a 1.1 el resultado de la prueba fue dudosa. Solamente valores índice mayores a 1.1 fueron considerados positivos.

### **5.5 Detección de anticuerpos IgG contra el virus del dengue mediante ensayo inmunoenzimático**

Se realizó la detección de anticuerpos IgG contra el virus del dengue a partir de 10  $\mu$ L de suero utilizando el ensayo Dengue IgG Indirect ELISA de Panbio (# cat. E-DEN01G) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 100  $\mu$ L de suero diluido 1:1000 en diluyente en los pozos, al igual que los controles negativo, positivo y calibradores. Se incubó por 30 minutos a 37°C y posteriormente se hicieron 6 lavados con el amortiguador correspondiente. Se añadieron 100  $\mu$ L del anticuerpo anti IgG humano conjugado con peroxidasa en cada pozo y se incubó nuevamente por 30 minutos a 37°C. Se hicieron 6 lavados y se añadieron 100  $\mu$ L de cromógeno (TMB) en cada pozo. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron 100  $\mu$ L de ácido fosfórico 1 M para detener la reacción. La placa se leyó a una longitud de onda de 450 nm con filtro de referencia de 600-650 nm.

Para la interpretación de los resultados se necesita primero calcular la media de la absorbancia de los calibradores y multiplicar por el factor de calibración (específico de cada lote) para obtener el valor del punto de corte. Se obtuvo el valor índice dividiendo la absorbancia de la muestra entre el punto de corte. Valores índice menores a 0.9 indicaron un resultado negativo. De 0.9 a

1.1 el resultado de la prueba fue dudosa. Solamente valores índice mayores a 1.1 fueron considerados positivos.

## **5.6 Extracción de ARN**

Se utilizaron diferentes técnicas de extracción de ARN dependiendo del lugar en donde se realizaron. En el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León se utilizó el MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit de Roche. En el Laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales se utilizó TRIzol LS de Ambion. En el CDC Dengue Branch se utilizó el QIAamp Viral RNA Mini kit de QIAGEN.

### **5.6.1 Extracción de ARN con MagNA Pure de Roche**

Se extrajo ARN a partir de 100 µL de suero con el MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit de Roche (# cat. 03 038 505 001) utilizando el MagNA Pure LC 1.0 Instrument. Se procedió conforme lo especificado por el fabricante. Se añadieron 300 µL del amortiguador de lisis/unión a 100 µL de suero. Se mezcló y se transfirió al cartucho de muestra, el cual fue colocado en el equipo. Se utilizó el protocolo “Total NA External\_ lysis” y el volumen de elución final fue de 100 µL. Los ARN fueron almacenados a -80°C.

### **5.6.2 Extracción de ARN con TRIzol LS**

Se extrajo ARN a partir de 100 µL de suero, o cosecha viral, con el reactivo TRIzol<sup>®</sup> LS de Ambion (# cat. 10296-010). Se procedió conforme lo especificado por el fabricante. De manera breve, se agregaron 500 µL de TRIzol LS al suero o cosecha viral. Se mezcló vigorosamente y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µL de cloroformo por cada 500 µL de TRIzol empleado. Se agitó manualmente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C. Se transfirieron 150 µL de la fase acuosa a otro vial y se añadieron 250 µL de isopropanol. Se mezcló en vortex y se incubó

durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el pellet de ARN fue lavado con 500µL de etanol al 75% se centrifugó a 7,500 x g durante 5 minutos a 4°C. El pellet se dejó secar por 15 minutos y posteriormente se agregaron 45 µL de agua tratada con DEPC para resuspender el ARN. El ARN fue almacenado a -80°C.

### **5.6.3 Extracción de ARN con columna QIAGEN**

Se extrajo ARN a partir de 140 µL de suero con el kit QIAamp Viral RNA Mini de QIAGEN (# cat. 52906). La extracción fue realizada de acuerdo a las indicaciones del fabricante. A continuación se mencionará el procedimiento realizado. Se partió de un tubo de 1.5 mL con 560 µL de amortiguador AVL con acarreador de ARN. Se agregaron 140 µL de suero, se mezcló por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Terminada la incubación, se agregaron 560 µL de etanol 100% y se mezcló por 15 segundos. Se vertieron 630 µL de la mezcla a la columna QIAamp Mini y se centrifugó a 6000 x g por 1 minuto. Al terminar la centrifugación, se desecha el tubo colector y se coloca uno nuevo. Se vertió el volumen de mezcla restante en la columna y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Posteriormente se agregaron 500µL de amortiguador de lavado AW1 y se centrifugaron las columnas a 6,000 x g por 1 minuto. Se descartó el tubo colector y se utilizó uno nuevo para después añadir 500 µL de amortiguador AW2. Esta vez la centrifugación fue a 20,000 x g por 3 minutos. Se descartó el tubo colector y la columna se colocó en un tubo de 1.5 mL donde el ARN se eluyó con 60 µL de amortiguador AVE posterior a una centrifugación a 6,000 x g por 1 minuto. El ARN extraído se almacenó a -80°C.

## **5.7 Detección de ARN viral**

Se detectó ARN viral por medio de diferentes técnicas moleculares. Se utilizaron dos técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final y dos técnicas de PCR tiempo real (RT-qPCR).

### 5.7.1 Detección de ARN viral por reacción en cadena de la polimerasa I

Se detectó ARN viral por medio de la técnica de PCR anidada reportada por Catherine Seah<sup>88</sup> que fue utilizada en el Laboratorio de Arbovirología y en el Laboratorio de Infectología Molecular. El protocolo consiste en amplificar un fragmento del gen NS3 del virus del dengue con un par de iniciadores en común para los cuatro serotipos. Posteriormente se amplifica una región específica utilizando el iniciador delantero común y un iniciador reverso específico para cada serotipo, empleando el producto de la PCR anterior. Para esta PCR se utilizó la ImProm-II™ de Promega (# cat. A3800) y la GoTaq® Flexi DNA Polymerase de Promega (# cat. M8291). Los iniciadores utilizados se presentan en la Tabla 3. La mezcla de las dos reacciones se muestran en la Tabla 4. El programa de temperaturas se expone en la Tabla 5.

**Tabla 3.** Secuencia de iniciadores utilizados en la PCR I.

Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Tamaño amplificado (pb)
DV1	GGRACKTCAGGWTCTCC	-
DV3	AARTGIGCYTCRTCCAT	470
DSP1	AGTTTCTTTTCCTAAACACCTCG	169
DSP2	CCGGTGTGCTCRGCYCTGAT	362
DSP3	TTAGAGTYCTTAAGCGTCTCTTG	265
DSP4	CCTGGTTGATGACAAAAGTCTTG	420

I= inosina; K= G/T; R= A/G; W= A/T; Y=C/T

**Tabla 4.** Condiciones de reacción de PCR I

PCR 1		PCR 2	
Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer PCR 5X	2.3	Buffer PCR 5X	2.3
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2	MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2
dNTP 10 mM	0.2	dNTP 10 mM	0.2
DTT 0.1 M	1.2	Iniciador DV1 10 $\mu\text{M}$	0.5
Iniciador DV1 10 $\mu\text{M}$	0.5	Iniciador DSP1 10 $\mu\text{M}$	0.5
Iniciador DV3 10 $\mu\text{M}$	0.5	Iniciador DSP2 10 $\mu\text{M}$	0.5
RT-Improm II	0.1	Iniciador DSP3 10 $\mu\text{M}$	0.5
GoTaq Flexi	0.15	Iniciador DSP4 10 $\mu\text{M}$	0.5
Agua MiliQ	15.55	GoTaq Flexi	0.15
ARN	2.5	Agua MiliQ	15.35
Volumen total	25	ADN 1:25	2.5
		Volumen total	25

**Tabla 5.** Programas de temperatura PCR I

PCR 1			PCR 2		
Paso	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo	Paso	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo
1	42	1 h	1	94	30 s
2	94	30 s	2	55	1 min
3	55	1 min	3	72	2 min
4	72	2 min	4	25 ciclos desde 1	
5	25 ciclos desde 2		5	72	10 min
6	72	10 min	6	4	-
7	4	-			

Los productos amplificados fueron verificados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X teñido con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador EZ Load 100 bp Molecular Ruler de Biorad (# cat. 170-8352) y los geles fueron corridos a 100 V en buffer TBE 1X hasta que el colorante de carga llegó al final del gel. El gel fue examinado bajo luz UV.

### 5.7.2 Detección de ARN viral por reacción en cadena de la polimerasa II

Se detectó ARN viral por medio de la técnica de PCR anidada reportada por Robert Lanciotti<sup>89</sup> que fue utilizada en el Laboratorio de Infectología Molecular. El protocolo consiste en amplificar un fragmento del gen C y prM del virus del dengue con un par de iniciadores en común para los cuatro serotipos. Posteriormente se amplifica una región específica utilizando el iniciador delantero común y un iniciador reverso específico para cada serotipo, empleando el producto de la PCR anterior. Primero se sintetiza ADN complementario (ADNc) y posteriormente se realizan la dos reacciones de PCR. Para la síntesis de ADNc se utilizó la M-MLV Reverse Transcriptase de Invitrogen (# cat. 28025-013). Para la reacción de PCR se utilizó la Taq DNA Polymerase de Invitrogen (# cat. 10342-020).

Los iniciadores utilizados se presentan en la Tabla 6. La mezcla de reactivos de la síntesis de ADNc se muestra en la Tabla 7 y 8, así como el programa de temperaturas en la Tabla 9.

**Tabla 6.** Secuencia de iniciadores utilizados en la PCR II.

Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Tamaño amplificado (pb)
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	-
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	511
TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	482
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	119
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	290
TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	392

**Tabla 7.** Condiciones de reacción para síntesis de ADNc I.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µL)</b>
dNTP 10mM	1
Hexámeros	1
Agua libre de nucleasas	3
ARN	5
<b>Total</b>	<b>10</b>

Las reacciones fueron incubadas a 65°C por 5 minutos y se enfriaron en hielo por 3 minutos. Posteriormente se agregaron los siguientes componentes a la reacción previa.

**Tabla 8.** Condiciones de reacción para síntesis de ADNc II.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µL)</b>
Reacción anterior	10
Amortiguador RT 5X	4
Inhibidor de RNasas	0.5
Agua libre de nucleasas	5
Enzima M-MLV	0.5
<b>Total</b>	<b>20</b>

Después de tener completos los componentes de la reacción se procedió a seguir el siguiente programa de temperatura.

**Tabla 9.** Programa de temperatura síntesis de ADNc.

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
1	30	10
2	42	30
3	95	5
4	4	-

Después de haber sintetizado ADNc, se procedió a realizar las reacciones de PCR. Los componentes de las reacciones se muestran en las Tabla 10 y los programas de temperatura en la Tabla 11.

**Tabla 10** Condiciones de reacción de PCR II.

<b>PCR 1</b>		<b>PCR 2</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µL)</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µL)</b>
Buffer PCR 10X	2	Buffer PCR 10X	2.3
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2	MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2
dNTP 10 mM	0.2	dNTP 10 mM	0.2
Iniciador D1 10 µM	0.5	Iniciador D1 10 µM	0.5
Iniciador D2 10 µM	0.5	Iniciador TS1 10 µM	0.5
Taq DNA Polimerasa	0.15	Iniciador TS2 10 µM	0.5
Agua MiliQ	15.55	Iniciador TS3 10 µM	0.5
ADNc	2.5	Iniciador TS4 10 µM	0.5
Volumen total	25	Taq DNA Polimerasa	0.15
		Agua MiliQ	15.35
		ADN 1:25	2.5
		Volumen total	25

**Tabla 11.** Programas de temperatura PCR II.

<b>PCR 1</b>			<b>PCR 2</b>		
<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>
1	94	5 min	1	94	30 s
2	94	30 s	2	55	1 min
3	55	30 s	3	72	2 min
4	72	30 s	4	40 ciclos desde 1	
5	40 ciclos desde 2		5	72	10 min
6	72	5 min	6	4	-
7	4	-			

Los productos amplificados fueron verificados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X teñido con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador EZ Load 100 bp Molecular Ruler de Biorad (# cat. 170-8352). Los geles fueron corridos a 100 V en buffer TBE 1X hasta que el colorante de carga llegó al final del gel. El gel fue examinado bajo luz UV.

### 5.7.3 Detección de ARN viral por PCR tiempo real I

El método utilizado para detectar ARN viral de DENV en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León es el publicado por Bárbara Johnson<sup>92</sup>. Se utilizó la modalidad multiplex del protocolo establecido. En la Tabla 12 se enlistan las secuencias de los iniciadores y sondas utilizadas.

**Tabla 12.** Secuencias de iniciadores y sondas utilizadas.

Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Posición	Fluoróforo
DEN-1 F	CAAAGGAAGTCGTGCAATA	8973	
DEN-1 C	CTGAGTGAATTCTCTCTACTGAACC	9084	
Sonda DEN-1	CATGTGGTTGGGAGCACGC	8998	FAM/BHQ1
DEN-2 F	CAGGTTATGGCACTGTCACGAT	1605	
DEN-2 C	CCATCTGCAGCAACACCATCTC	1583	
Sonda DEN-2	CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA	1008	HEX/BHQ1
DEN-3 F	GGACTGGACACACGCACTCA	740	
DEN-3 C	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT	813	
Sonda DEN-3	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG	762	TR/BHQ2
DEN-4 F	TTGTCCTAATGATGCTGGTCG	904	
DEN-4 C	TCCACCTGAGACTCCTTCCA	992	
Sonda DEN-4	TTCCTACTCCTACGCATCGCATTCCG	960	Cy5/BHQ3

Las reacciones fueron realizadas de la siguiente manera: Se utilizaron los iniciadores específicos de serotipo en cada reacción. Se utilizó el kit SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System de Invitrogen (# cat. 11732-020). Las condiciones de la reacción se enlistan en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Condiciones de reacción de RT-qPCR I.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µL)</b>
Agua	5.32
PCR Master mix 2X	12.5
Iniciador DEN-1 F 100 µM	0.25
Iniciador DEN-1 C 100 µM	0.25
Iniciador DEN-2 F 100 µM	0.125
Iniciador DEN-2 C 100 µM	0.125
Iniciador DEN-3 F 100 µM	0.25
Iniciador DEN-3 C 100 µM	0.25
Iniciador DEN-4 F 100 µM	0.125
Iniciador DEN-4 C 100 µM	0.125
Sonda DEN-1 100 µM	0.45
Sonda DEN-2 100 µM	0.45
Sonda DEN-3 100 µM	0.45
Sonda DEN-4 100 µM	0.45
Mezcla SuperScript III RT/Platinum Taq	0.5
ARN	5
<b>Total</b>	<b>25</b>

Las reacciones fueron llevadas a cabo en placas de 96 pozos y puestas en un termociclador ABI 7500 FAST de Applied Biosystems. Los parámetros de termociclado se presentan en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Programa de temperaturas RT-qPCR I.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	50	30 min
2	95	2 min
3	95	15 s
4	60	1 min
5	45 ciclos desde 3	

Las curvas de amplificación fueron evaluadas por serotipo y la línea de umbral fue establecida sobre la señal de fondo. Curvas de amplificación con valores de CT mayores a 37 se consideraron negativas.

#### **5.7.4 Detección de ARN viral por PCR tiempo real II**

Para la detección de ARN viral se utilizó el ensayo de RT-PCR tiempo real para DENV 1 – 4 establecida en el CDC.<sup>95</sup> Se utilizó la modalidad singleplex del protocolo establecido.

En la Tabla 15 se enlistan las secuencias de los iniciadores y sondas utilizadas. Cada sonda Taqman va dirigida hacia un solo serotipo y está conjugada a un fluoróforo que emite fluorescencia a diferentes ondas de excitación.

Para esta reacción se utilizó el kit SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System de Invitrogen (# cat. 11732-020). Se utilizaron los iniciadores y sonda específicos para el serotipo buscado. En la Tabla 16 se muestran las condiciones de reacción utilizadas en este protocolo.

**Tabla 15** Secuencias de iniciadores y sondas utilizadas

Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Posición	Fluoróforo
D1-F	CAAAAGGAAGTCGYGCAATA	8936	
D1-R	CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC	9023	
D1-Sonda	CATGTGGYTGGGAGCRCGC	8961	FAM/BHQ1
D2-F	CAGGCTATGGCACYGTCACGAT	1426	
D2-R	CCATYTG CAGCARCACCATCTC	1482	
D2-Sonda	CTCYCCRAGAACGGGCCTCGACTTCAA	1454	HEX/BHQ1
D3-F	GGACTRGACACACGCACCCA	701	
D3-R	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGYCT	749	
D3-Sonda	ACCTGGATGTCCGGCTGAAGGAGCTTG	722	TR/BHQ2
D4-F	TTGTCCTAATGATGCTRGTCG	884	
D4-R	TCCACCYGAGACTCCTTCCA	953	
D4-Sonda	TYCCTACYCCTACGCATCGCATTCCG	939	Cy5/BHQ3

**Tabla 16.** Condiciones de reacción de RT-qPCR II

Reactivo	Volumen (µL)
PCR Master mix 2X	12.5
Iniciador D-F 1 µM	0.5
Iniciador D-R 1 µM	0.5
Sonda D 180 nM	0.45
Mezcla SuperScript III RT/Platinum Taq	0.5
Agua libre de nucleasas	5.55
ARN	5
Volumen total	25

Las reacciones fueron llevadas a cabo en placas de 96 pozos y puestas en un termociclador ABI 7500 FAST Dx de Applied Biosystems. Los parámetros de termociclado utilizados se presentan en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Programa de temperaturas RT-qPCR II.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	50	30 min
2	95	2 min
3	95	15 s
4	60	1 min
5	45 ciclos desde 3	

Las curvas de amplificación fueron evaluadas por serotipo y la línea de umbral fue establecida sobre la señal de fondo. Curvas de amplificación con valores de CT mayores a 37 se consideraron negativas.

### **5.8 Cultivo de células C6/36**

La línea celular C6/36 es una clona obtenida de la línea original de *Aedes albopictus* que presenta una alta sensibilidad a los virus del dengue. Las células C6/36 se mantuvieron en botellas de 25 cm<sup>2</sup> con 5 mL de medio Leibovitz L-15 suplementado con suero bovino fetal al 5%, aminoácidos no esenciales y anfotericina, a 28°C sin atmósfera de CO<sub>2</sub>. Se hizo pasaje de células cada semana. Las células se desprendieron de la botella por agitación.

#### **5.8.1 Infección células C6/36**

Se golpeó ligeramente la botella de cultivo para eliminar las células no adheridas. Posteriormente se decantó el medio de cultivo y se agregaron 5mL de medio L-15 + SBF 5% fresco. Se golpeó nuevamente la botella para desprender las células adheridas. Se realizó dilución 1:10 de las células para sembrar en tubos de cultivo celular Nunc de 3 mL (Thermo Scientific, # cat. 156758). Se incubaron los tubos a 28°C por 2 días y se descartó el medio. Se agregó 1 mL de medio L-15 + SBF 2% a cada uno de los tubos para posteriormente colocar 20 µL de suero de paciente en el borde del tubo. Se mezcló por inversión y se incubó a 37°C por una hora. Al terminar la incubación

se agregaron 2 mL de medio L-15 + SBF 2% y se incubaron a 28°C por 15 días. Las células fueron evaluadas constantemente bajo un invertoscopio. Se buscó intencionadamente: cambios en la morfología celular, formación de sincitios, vacuolización y lisis celular.

### **5.8.2 Cosecha viral**

Al día 15 de incubación, las células fueron desprendidas mecánicamente con una pipeta serológica y se hicieron alícuotas de la cosecha. Éstas fueron almacenadas a -80°C.

## **5.9 Inmunohistoquímica**

Para esta técnica se utilizó el R.T.U. VectaStain Universal Elite ABC kit y el DAB Peroxidase Substrate kit, ambos de Vector Laboratories (# cat. PK-7200 y SK-4100, respectivamente). El PBS utilizado fue PBS 0.01M pH 7.2. Las incubaciones fueron realizadas en cámara húmeda a 37°C.

Se tomaron 700µL de cosecha viral y colocaron en un tubo de 2mL. Donde se agregaron 800µL de PBS. Se centrifugó 5,000 rpm a 4°C por 5 minutos. Se decantó sobrenadante y se agregaron 250µL de PBS. Se colocaron 15 µL de solución en portaobjetos. Se secó a temperatura ambiente dentro de campana y se fijaron los portaobjetos en acetona a -20°C por toda la noche.

Se retiraron los portaobjetos de la acetona y dejaron secar dentro de la campana. Se colocaron 15 µL de “Anti-Flavivirus Group Antigen Antibody, clone D1-4G2-4-15 | MAB10216” a dilución 1:3000 en PBS, sobre las células fijadas. Se incubó por 35 minutos. Las células se lavaron 5 veces con PBS. Se colocaron 15 µL de anticuerpo biotinilado anti IgG de ratón 1:100 y se incubó por una hora. Nuevamente se lavó 5 veces con PBS, se colocaron 15 µL del reactivo R.T.U. Elite ABC y se incubó en cámara húmeda por una hora. Se hicieron 5 lavados y se colocaron 15 µL de substrato diaminobenzidina + Ni<sup>2+</sup>.

Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, se lavó una vez con agua desionizada. Se colocó una gota de PBS y se cubrió con un cubreobjetos. Se buscaron señales de color gris/negro bajo el microscopio.

### 5.10 Amplificación del gen de proteína de envoltura

La región del gen de la proteína E es la mejor para realizar el análisis filogenético para determinar las diferencias geográficas y relación genética entre los DENV.<sup>151</sup>

Se procedió a amplificar el gen de la proteína de envoltura del virus del dengue. Para ello fueron utilizados dos métodos: RT-PCR en uno y en dos pasos. El tamaño de los fragmentos a amplificar fue de: 1743pb para DENV-1 y 1741pb para DENV-2.

#### 5.10.1 RT-PCR Un Paso

La amplificación en un paso del gen de la proteína de envoltura se realizó utilizando el kit BluePrint One Step RT-PCR de TaKaRa (# cat. RR755A). La secuencia de los iniciadores y la mezcla de reactivos se muestran en las Tablas 18 y 19. El programa de temperaturas utilizado se muestra en la Tabla 20.

**Tabla 18.** Secuencia de iniciadores utilizados para la amplificación del gen E.

Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Tamaño amplificado (pb)
D1-F1	AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGAC	-
D1-R1	CAGCATGGAAGTCTGTTCTGGTGCAG	1743
D2-F1	ATGATGGCAGCAATCCTGGCATAAC	-
D2-R1	CTCCTGTCATAATAGTTAACTTCACC	1741

**Tabla 19.** Condiciones de reacción de amplificación gen E Un paso

Reactivo	Volumen (µL)
Amortiguador One Step 2X	25
Iniciador D-F1 400 nM	1
Iniciador D-R1 400 nM	1
Mezcla de Enzimas One Step RT	2
Agua libre de nucleasas	16
ARN	5
Volumen total	50

**Tabla 20.** Programa de temperatura de amplificación gen E Un paso

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	50	30 min
2	94	2 min
3	98	10 s
4	60	30 s
5	72	3 min
6	35 ciclos desde 3	
7	68	7 min
8	4	-

### 5.10.2 RT-PCR Dos pasos

En este método de amplificación del gen E se necesita primero sintetizar ADNc para después amplificar el fragmento deseado.

**5.10.2.1 Síntesis de ADNc.** La síntesis de ADNc se realizó con el kit BluePrint RT-PCR de Takara (# cat. RR714A) mezclando los reactivos en un bloque frío. Los componentes de la primera reacción se enlistan en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Condiciones de reacción para síntesis de ADNc I.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
dNTP 10mM	1
Hexámeros	1
Agua libre de nucleasas	3
ARN	5
Total	10

Las reacciones fueron incubadas a 65°C por 5 minutos y se enfriaron en hielo por 3 minutos. Posteriormente se agregaron los siguientes componentes de la Tabla 22 a la reacción previa.

**Tabla 22.** Condiciones de reacción para síntesis de ADNc II.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Reacción anterior	10
Amortiguador RT 5X	4
Inhibidor de RNasas	0.5
Agua libre de nucleasas	5
Enzima RTase	0.5
Total	20

Después de tener completos los componentes de la reacción se procedió a seguir el siguiente programa de temperatura que se muestra en la Tabla 23.

**Tabla 23.** Programa de temperatura síntesis de ADNc.

Paso	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (min)
1	30	10
2	42	30
3	95	5
4	4	-

**5.10.2.2 Protocolo PCR.** Una vez sintetizado el ADNc se procedió a realizar la PCR de amplificación del gen E. Los componentes de la reacción de PCR se enlistan a continuación (Tabla 24), así como el programa de temperaturas (Tabla 25).

**Tabla 24.** Condiciones de reacción amplificación gen E Dos pasos

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Amortiguador PCR 10X	5
dNTP 10nM	2
Iniciador D-F1 20 $\mu\text{M}$	1
Iniciador D-R1 20 $\mu\text{M}$	1
Agua libre de nucleasas	35.5
Enzima EX Taq HS	0.5
ADNc	5
Total	50

**Tabla 25.** Programa de temperatura amplificación gen E Dos pasos

Paso	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo
1	98	10 s
2	60	30 s
3	72	3 min
4	35 ciclos desde 1	
5	4	-

### 5.10.3 Electroforesis Amplificación de gen E

Para la visualización del producto amplificado de E se realizó electroforesis en un gel de agarosa al 1% en amortiguador Bionic 1X de Sigma-Aldrich (# cat. B6185). El gel fue teñido con SYBR Safe gel DNA Stain de Invitrogen (# cat. S33102). Se utilizó el marcador QuickLoad 1kb ladder de New England Biolabs (# cat. N0468L) y se colocaron los 50  $\mu\text{L}$  de reacción de PCR.

El gel se corrió en amortiguador Bionic 1X a 200 V hasta que el colorante de carga llegue al final del gel. El gel fue examinado bajo luz UV. Una banda grande y brillante fue la requerida para la extracción del gel y secuenciación.

## **5.11 Purificación de Amplificado**

### **5.11.1 Extracción de ADN a partir del Gel**

Para poder extraer el producto amplificado de PCR del gel se utilizó el QIAquick Gel Extraction kit de QIAGEN (# cat. 28706). Primero se cortó el fragmento de ADN del gel de agarosa con un bisturí limpio y afilado, removiendo la mayor cantidad de agarosa posible. El fragmento de gel se colocó en un tubo de 1.7 mL y se llenó el tubo con el amortiguador QC. El tubo fue calentado a 50°C por 10 minutos. Posteriormente se agregaron 800 µL de la mezcla en la columna QIAquick y se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto. Se descartó el filtrado y se colocó la mezcla restante en la columna para después centrifugar. Se descartó el filtrado y se añadieron 500 µL de amortiguador QG para después centrifugar por 1 minuto y descartar el filtrado. La columna fue lavada por 750 µL de amortiguador PE y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posterior a la incubación se centrifugó por 1 minuto. Se descartó el filtrado y se volvió a centrifugar por 1 minuto. La columna fue colocada en un tubo nuevo y para la elución del ADN, se añadieron 40 µL de amortiguador de elución en el centro de la membrana de la columna. La columna fue incubada por 2 minutos y se centrifugó por 2 minutos.

### **5.11.2 Cuantificación de ADN Extraído**

Posterior a la elución los ácidos nucleicos fueron cuantificados en Nanodrop utilizando la solución de elución como blanco.

## 5.12 Secuenciación

La reacción de secuenciación se realizó utilizando el BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de Life Technologies (# cat. 4337455). Se utilizaron iniciadores diferentes para cada serotipo, 7 iniciadores para las muestras de DENV-1 y 5 iniciadores para DENV-2. Se utilizó un iniciador diferente por cada reacción. Es decir, por cada muestra a secuenciar de DENV-1 se hicieron 7 reacciones y por cada muestra de DENV-2 se hicieron 5. Los iniciadores utilizados y los componentes de la reacción se muestran en las Tablas 26 y 27. Los tubos donde se realizó la mezcla se mantuvieron en un bloque frío

**Tabla 26.** Iniciadores secuenciación gen E de DENV

Serotipo	Iniciador	Secuencia 5' – 3'
1	cD1-973	CCACGAAGTCTCTGTTGCCTATT
1	D1-890	AAGGGATCATTTTCATTTTG
1	D1-1003	GTGGTACTGGAGCATGGAAGTTGC
1	cD1-1446	CGTAGGAGCTTGAGGTGTTATGGT
1	D1-1395	TGAGACTACAGAACATGGAACAAC
1	cD1-1923	TTCATATTTAACCTGCACCAGAAC
1	D1-2141	GAAGCAACTGCCCGAGGAGCACGA
2	cD2-771	ATGTTTCCAGGCCCTTCTGATGAC
2	cD2-1387	CATGTTTTCTGTGTCATTTCCGAC
2	D2-1416	GGAAATCAAATAACACCACAGAGTTCC
2	cD2-2074	TGATGATGTAGCTGTCTCCGAATG
2	D2-2207	TCCTTGGGAGGAGTGTTTACATCT

**Tabla 27.** Componentes de la reacción de secuenciación

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Amortiguador BigDye	8
Iniciador 3.3 $\mu\text{M}$	1
Agua libre de nucleasas	variable
Amplificado	60 – 80 ng
<b>Total</b>	<b>20</b>

Posteriormente se utilizó el siguiente protocolo de temperaturas (Tabla 28) ajustando la velocidad de rampa a  $1^{\circ}\text{C}$  por segundo.

**Tabla 28.** Programa de temperaturas utilizado en secuenciación

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	<b>Tiempo</b>
1	96	1 min
2	96	10 s
3	50	5 s
4	60	4 min
5	25 ciclos desde 2	
6	4	-

Posteriormente se realizó la secuenciación bidireccional con el método de Sanger en un 3730 DNA Analyzer de Life Technologies (# cat. 3730S) siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **5.13 Ensamble de secuencias**

Se obtuvo la información en crudo de las secuencias en archivos individuales con extensión \*.ab1. Estos archivos contenían el electroferograma de la muestra secuenciada. Se obtuvieron 7 archivos para cada una de las muestras de DENV-1 y 5 para las de DENV-2.

Las secuencias codificantes fueron ensambladas utilizando la aplicación SeqMan Pro del programa DNASTAR Lasergene 11. Las secuencias fueron ensambladas *de novo* y fueron curadas manualmente verificando los electroferogramas.

## **5.14 Análisis de secuencias**

### **5.14.1 Alineamiento de secuencias**

Una vez obtenidas las secuencias se realizó alineamiento múltiple de las secuencias con el programa MEGA 5.2.2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)<sup>152</sup> utilizando el módulo de ClustalW en el Explorador de Alineamiento. Se buscó intencionadamente cambios de nucleótidos y posteriormente se realizó la traducción de las secuencias en el Explorador de Alineamiento. Se verificó si los cambios en los nucleótidos alteraban la secuencia aminoacídica. Se utilizó aparte la aplicación web WebLogo,<sup>153</sup> diseñada para representar gráficamente alineamientos múltiples de aminoácidos, para la mejor representación de los cambios de aminoácidos.

### **5.14.2 Modelaje de Estructura Terciaria**

Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de las muestras secuenciadas. Se modelaron las secuencias que presentaran cambios en aminoácidos y secuencias de proteínas “normales” como control. Se ingresaron las secuencias de aminoácidos en el servidor de modelaje de homología proteica CPHmodels 3.2 del Centro para el Análisis de Secuencias Biológicas (CBS por sus siglas en inglés).<sup>154</sup> Se ingresó una secuencia a la vez y se obtuvo un archivo con extensión \*.pdb el cual contenía las coordenadas para el modelo. Posteriormente el archivo se abrió en el programa Swis-Pdb Viewer<sup>155</sup> y se inspeccionó la predicción. Después se compararon las predicciones de la proteína normal con la proteína de la muestra.

### **5.14.3 Comparación de manifestaciones clínicas con cambios en secuencia**

Se compararon las manifestaciones clínicas de los pacientes con las variaciones en la secuencia de la proteína E. Se construyó una tabla donde se ordenó el número de muestras en filas y las manifestaciones clínicas en columnas. Realizada la tabla, se marcaron las manifestaciones presentadas por los pacientes en cada una de las muestras. Asimismo se enlistaron las variantes en el gen de cada una de las muestras y se buscó relación entre la variante y las manifestaciones clínicas. Se realizó lo mismo con las secuencias de proteínas.

### **5.14.4 Análisis filogenético**

Se realizó una búsqueda intencionada de secuencias similares a las obtenidas en la Base de Datos Nucleotídica (GenBank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) utilizando la herramienta BLAST. Se reunieron las secuencias que tuvieran el 99% de identidad con la secuencia en cuestión.

Las secuencias obtenidas del GenBank que correspondieron a genoma completo del virus fueron cortadas para que el análisis se hiciera exclusivamente del gen de la proteína E.

Asimismo se obtuvieron secuencias de virus de los diferentes genotipos para poder situar las secuencias obtenidas en su respectivo genotipo. Las secuencias que se incluyeron en el análisis se muestran en las Tablas 29 y 30.

**Tabla 29.** Secuencias DENV-1 de GenBank utilizadas en el análisis filogenético

<b>Nombre</b>	<b># Acceso</b>	<b>Cepa</b>	<b>Año</b>	<b>Localización</b>
NL A3 2010	JQ065900	A3/2010	2010	Nuevo León
NL A6 2011	JQ065903	A6/201	2010	Nuevo León
Argentina 2006	AY277666	ARG0048	2006	Argentina
NL B11 2011	JQ065918	B11/2010	2010	Nuevo León
NL B14 2012	JQ065920	B14/2010	2010	Nuevo León
NL B17 2013	JQ065922	B17/2010	2010	Nuevo León
NL B5 2014	JQ065915	B5/2010	2010	Nuevo León
Brasil 2008	GU131863	BR/BID-V3490/2008	2008	Brasil
NL C16 2011	JQ065934	C16/2010	2010	Nuevo León
NL C8 2012	JQ065929	C8/2010	2010	Nuevo León
Colombia 1985	AF425616	INS 347869	1985	Colombia
Colombia 2007	GQ868566	CO/BID-V3386/2007	2007	Colombia
Colombia 2008	GQ868570	CO/BID-V3391/2008	2008	Colombia
El Salvador A1 2012	JX891660	SV/DB109/2012	2012	El Salvador
El Salvador A2 2012	JX891659	SV/DB108/2012	2012	El Salvador
NL G7 2010	JQ065945	G7/2010	2010	Nuevo León
Haití 2010	JF969282	HA/DB067/2010	2010	Haití
Martinica 1989	JF804018	MQ/DB005/1989	1989	Martinica
Myanmar 1976	AF425615	PRS 228686	1976	Myanmar
Nicaragua 2005	EU482617	NI/BID-V1071/2005	2005	Nicaragua
Nicaragua 2008	GQ199859	NI/BID-V2652/2008	2008	Nicaragua
Nicaragua 2009	JF937635	NI/BID-V5504/2009	2009	Nicaragua
Nigeria 1968	AF425625	IBH 28328	1968	Nigeria
NL 084 2010	JQ920428	MX/DB084/2010	2010	Nuevo León
NL 087 2010	JQ920431	MX/DB087/2010	2010	Nuevo León
NL 088 2010	JQ920432	MX/DB088/2010	2010	Nuevo León
Polinesia Francesa 2001	FJ898448	PF/BID-V2939/2001	2001	Polinesia Francesa
Puerto Rico A1 1998	FJ205873	US/BID-V1740/1998	1998	Puerto Rico
Puerto Rico A2 1998	JF804021	PR/DB008/1998	1998	Puerto Rico

Tailandia 1964	AF180817	16007	1964	Tailandia
Trinidad y Tobago 1986	AF425639	CAREC 86471	1986	Trinidad y Tobago
Venezuela 1997	AF425634	28164	1997	Venezuela
Venezuela 2006	HQ332182	VE_61006_2006	2006	Venezuela
Venezuela A1 2007	GU131842	VE/BID-V3578/2007	2007	Venezuela
Venezuela A2 2007	GU131840	VE/BID-V3573/2007	2007	Venezuela
Venezuela A3 2007	HQ332183	VE_61081_2007	2007	Venezuela
Venezuela 2008	HM488256	VN/BID-V4035/2008	2008	Venezuela
YUC 2007	HQ166036	MX/BID-V3733/2007	2007	Yucatán
YUC 2008	GQ868530	MX/BID-V3746/2008	2008	Yucatán
Malasia 1972	AF425622	P72-1244	1972	Malasia
China 1980	AF350498	GZ/80	1980	China
Singapur 2008	GQ357666	SG(EHI)DED12008	2008	Singapur
Indonesia 1988	AB074761	A88	1988	Indonesia
Filipinas 2004	GQ868602	PH/BID-V2940/2004	2004	Filipinas
Indonesia 1998	AB189121	98901530 DF DV-1	1998	Indonesia
Japón 2004	AB204803	D1/hu/Yap/NIID27	2004	Japón
Camboya 2001	AF309641	Cambodia	2001	Camboya
China 2004	DQ193572	Fj231/04	2004	China
Hawaii 2001	DQ091261	Hawaii-01D	2001	Hawaii
Tailandia 2001	FJ687433	TH/BID-V2277/2001	2001	Tailandia
Sri Lanka 2009	HQ891316	SL_2009d	2009	Sri Lanka

**Tabla 30.** Secuencias DENV-2 de GenBank utilizadas en el análisis filogenético

<b>Nombre</b>	<b># Acceso</b>	<b>Cepa</b>	<b>Año</b>	<b>Localización</b>
Australia 1992	AF410370	CAMR5	1992	Australia
Australia 1993	AY037116	TSV01	1993	Australia
China 1999	AF359579	FJ11/99	1999	China
Colombia 1996	AF163096	PTCOL96	1996	Colombia
Costa de Marfil 1980	AF231718	DAKAr578	1980	Costa de Marfil
El Salvador 1999	DQ364515	ES_18_99	1999	El Salvador
Guatemala 2009	HQ999999	GU/FDA-GUA09/2009	2009	Guatemala
Honduras 2007	GU586123	F07-075	2007	Honduras
Martinica 1998	AF208496	H/IMTSSA-MART/98- 703	1998	Martinica
Nicaragua 1999	DQ341201	541/NICARAGUA/99	1999	Nicaragua
Nicaragua 2000	FJ898478	NI/BID-V2924/2000	2000	Nicaragua
Jamaica 1983	M20558	Jamaica/N.1409	1983	Jamaica
Venezuela 1998	AF398106	lard3146	1998	Venezuela
Yucatán 2001	AY449682	12021/Oxkutzcab 01	2001	Yucatán
India 1957	L10043	India	1957	India
Indonesia 1976	L10044	Indon	1976	Indonesia
Indonesia 2004	AY858035	BA05i	2004	Indonesia
Malasia 1970	AF231717	P8-1407	1970	Malasia
México 1992	AF100469	131	1992	México
Nicaragua 2005	EU482748	NI/BID-V513/2005	2005	Nicaragua
Perú 1996	AF100468	IQT2913	1996	Perú
Tailandia 1958	D10514	TH-36	1958	Tailandia
Tailandia 1979	DQ181805	ThD2 0168	1979	Tailandia
Filipinas 1983	L10045	PHILIP	1983	Filipinas
Taiwán 1987	L10052	Taiwán	1987	Taiwán

Se realizó un alineamiento múltiple con el programa MEGA 5.2.2 y posteriormente se hizo la reconstrucción de la filogenia con el método estadístico de máxima similitud utilizando el modelo de Tamura-Nei 93 con distribución Gamma 4 y un soporte de 1000 replicaciones. Se obtuvo el árbol filogenético y se guardó como archivo \*.nwk para poderlo optimizar en el programa FigTree v1.4.

#### **5.14.5 Inferencia rutas de desplazamiento**

Una vez obtenido el árbol filogenético se pudo inferir la procedencia de los virus secuenciados en este proyecto. Para representar de mejor manera las rutas de desplazamiento de los virus en un mapa, se utilizó el programa ArcMap del conjunto de programas de procesamiento geoespacial ArcGis desarrollado por Esri. Se obtuvo la información geográfica de México, Guatemala, Belice, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia y Venezuela de la página [www.diva-gis.org/gdata](http://www.diva-gis.org/gdata). Se marcaron las ciudades donde se aislaron los virus en los diferentes años y se representó la posible trayectoria del virus hasta llegar a Nuevo León.

#### **5.15 Pruebas estadísticas**

El análisis estadístico se realizó en el programa IBM SPSS Statistics versión 20. Se practicó análisis de medias y mediana de la edad de los pacientes. Se realizaron tablas de contingencia y pruebas de chi-cuadrado de género, anticuerpos IgM, manifestaciones clínicas y diagnóstico.

## **CAPÍTULO 6**

### **RESULTADOS**

#### **6.1 Geomorfología**

##### **6.1.1 Geomorfología de Yucatán**

El estado de Yucatán presenta la forma de un triángulo algo irregular, cuyos vértices corresponden, uno, a la boca del estero de Celestún (90°25' longitud oeste) y otro a las Bocas de Conil (87°32' longitud oeste) y el tercero al discutido punto Put (89° 14' longitud oeste y 18°44'06" latitud norte), que se encuentra en la intersección de los límites con Campeche y Quintana Roo.

La distribución de los climas que prevalecen en Yucatán está regida principalmente por las interacciones de los factores climáticos que inciden sobre la región: corrientes marinas, circulación del este o vientos alisios, ondas tropicales, depresiones o tormentas tropicales y frentes fríos, nortes o masas de aire polar modificados.

Las temperaturas medias anuales en el estado se distribuyen desde los 24 a los 28 °C. Las más altas se presentan hacia el suroeste del estado limítrofe con Campeche, y las más bajas en el norte entre Telchac y Dzilam. A partir de la distribución de la temperatura se forman dos zonas térmicas: la cálida entre 24 y 26 °C y la muy cálida mayor de 26 °C. Teniendo dos tipos de climas, el seco estepario en el noreste y el cálido con lluvias en verano (tropical con invierno seco), en el resto del estado.

El estado presenta un importante gradiente de lluvia. Los valores más bajos de precipitación se localizan en una franja entre Chuburná y Progreso con poco menos de 500 mm anuales; valores aún más bajos se encuentran en el

Golfo de México. Los valores más altos de precipitación, entre 1200 y 1500 mm, se localizan al sureste, limitando con el centro de Quintana Roo.

La vegetación confirma lo anterior. Arbustos en la costa norte; el típico monte bajo en el centro, compuesto de árboles de poca altura, de hojas menudas y espinosas; monte alto en las regiones del oriente y del sur, formado por árboles de mayor elevación, de hojas anchas.

La orografía del Estado se reduce a dos pequeñas cadenas de colinas que corren paralelas a los límites con el estado de Campeche. La de menor significancia, denominada Puuc, está representada por una serie de oteros que partiendo de las cercanías de Bolonchenticul, en los límites con el estado de Campeche, siguen hasta 60 km hacia el sureste para luego internarse por el sur del pueblo de Becanchén al Territorio de Quintana Roo. Paralela y a 20 km al norte, se levanta la Sierrita, Sierra Baja o de Maxcanú, una serie de pequeñas colinas que corren entre Halachó y Peto. Se desarrollan en 125 km de noroeste a sureste y tienen una elevación que varía de 100 a 125 m.

El suelo del estado de Yucatán presenta una permeabilidad tal, que el escurrimiento es casi nulo. La erosión obra ahuecando y agujerando el suelo para llevar los residuos a los bajos fondos. Provoca derrumbes en los trechos de menor resistencia y presenta depresiones cerradas a las que sirven de vertedor cavernas más o menos aparentes. Estos hundimientos son conocidos con el nombre de cenotes, que son verdaderas grutas, algunas de grandes dimensiones, con sus techos y paramentos laterales revestidos a veces por estalactitas y estalagmitas.

No existen ríos superficiales. Las aguas que penetran al sistema adquieren un movimiento de descenso obedeciendo a las leyes de la gravedad y siguen la dirección en que encuentran menor resistencia, hasta llegar a la capa impermeable que detiene o modifica su curso. El agua continuará su

movimiento en relación con la forma y pendiente del medio sobre el que circula y con el poder absorbente de dicha capa impermeable. Estas aguas forman grandes mantos de espesor uniforme llamados mantos acuíferos. Esta estructura de "ríos subterráneos" y grandes depósitos lacustres forman un sistema hidrográfico completo en comunicación con el fondo del mar, a donde desaguan directamente o indirectamente por las albuferas o esteros.

### **6.1.2 Geomorfología de Nuevo León**

El estado de Nuevo León está limitado al norte y al este por Tamaulipas; al sur y al oeste por San Luis Potosí y Zacatecas; y al norte por Coahuila, Tamaulipas y el estado norteamericano de Texas. Las coordenadas geográficas de sus extremos son: al norte 27° 49' y al sur 23° 11' de latitud norte. Al este 98° 26' y al oeste 101° 14' de longitud oeste.

El clima en Nuevo León es extremoso. Es principalmente caluroso y seco, pero tiene temperaturas templadas en las áreas más altas, heladas en invierno y una fuerte temporada de lluvias a veces acompañada de huracanes. Monterrey tiene una temperatura promedio de 23°C, aunque suele llegar a los 40°C en verano y a menos de 0°C en invierno. Hay una pequeña región desértica al noroeste y una franja de clima templado en las partes altas de la Sierra, al centro y sur (temperatura promedio de 14°C).

En el estado hay cuatro tipos de clima: semiárido, tropical, árido y templado. De los cuales el semiárido está presente en el 69% de la superficie. A comparación del estado de Yucatán, donde predomina el tropical con invierno seco.

En el estado dominan las lluvias de origen ciclónico (provenientes del Golfo de México) y convectivas (que tienen lugar cuando el aire llega de varios sitios a una zona de baja presión y asciende en verano), aunque también hay

lluvias asociadas a frentes fríos (que tienen origen en dos masas de aire de diferente temperatura; la masa de aire caliente, al tener menor densidad, asciende sobre la masa fría y, al subir, se enfría y se condensa provocando lluvias abundantes).

En Nuevo León la vegetación dominante sean los matorrales en sus diversos tipos. El matorral tiene una cobertura de 67.25 % del territorio estatal, le sigue el mezquital con 9.46 %, el bosque con 9 %, la agricultura con 6.72 %, el chaparral con 2.75 %, y al final queda el pastizal con 1.89 %.

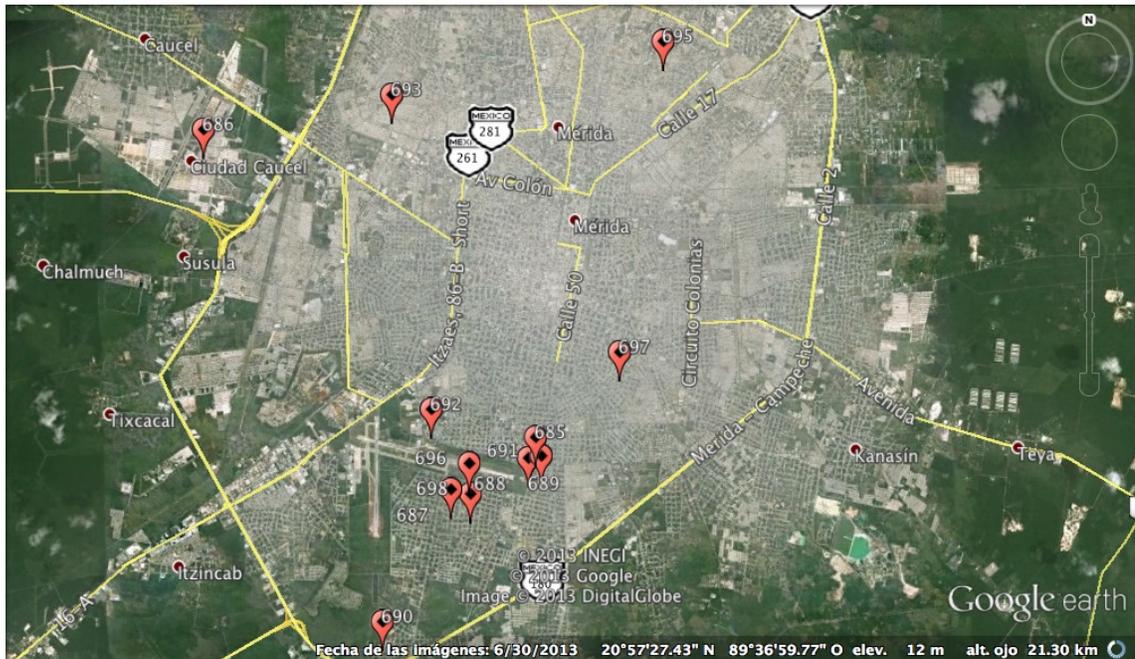
En Nuevo León existen tres provincias fisiográficas: Llanura Costera del Golfo Norte, Sierra Madre Oriental y Gran Llanura Norteamericana. La provincia fisiográfica Sierra Madre Oriental domina por su amplitud el territorio estatal, al ocupar más de 49 % del total del territorio. Recorre el estado del noroeste al sureste y crea una zona templada y boscosa.

En lo que se refiere a la hidrología, la región hidrológica Bravo – Conchos es la que ocupa la mayor proporción del estado (64 %). La región de San Fernando – Soto La Marina ocupa el resto. Casi todos nacen en la Sierra Madre Oriental y desembocan en el río Bravo o en los ríos San Fernando y Soto la Marina en Tamaulipas. La mayoría de los ríos que atraviesan Nuevo León no tiene corriente permanente, excepto en las partes medias y bajas, y ninguno es navegable.

## **6.2 Identificación de casos**

### **6.2.1 Yucatán**

Durante el periodo de recaudación se identificaron 12 pacientes con caso probable de infección por el virus del dengue. La ubicación geográfica de los casos se presenta en la imagen Figura 16.

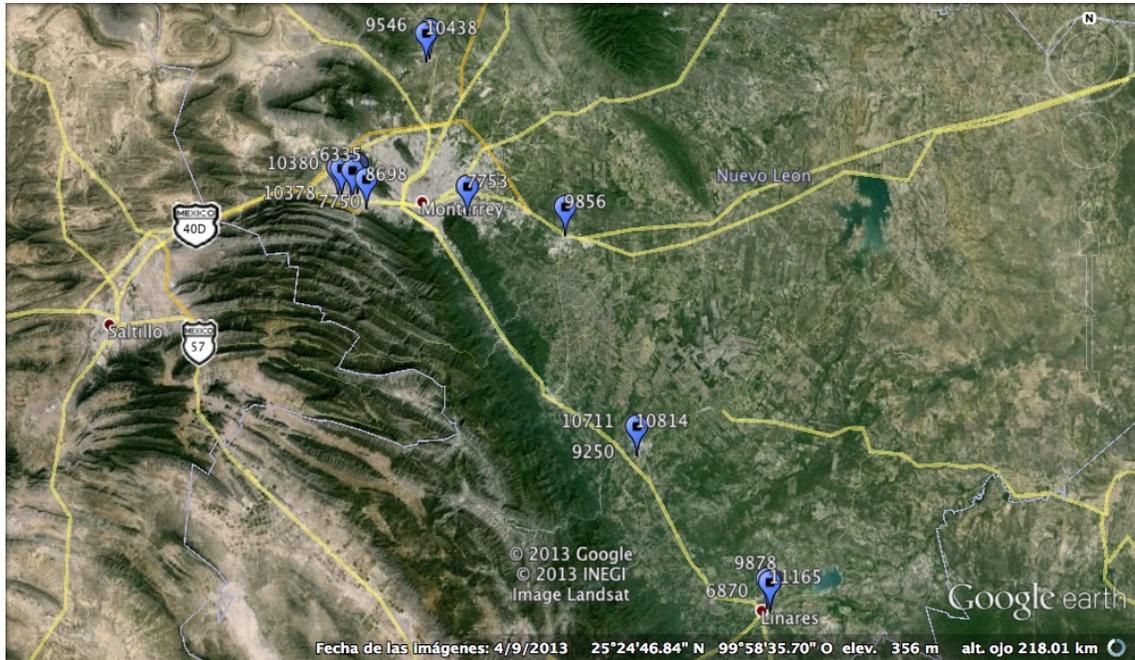


**Figura 16.** Distribución geográfica de casos identificados en Yucatán.

La edad media de presentación fue de 26.32 años, la mediana de 28 años y el rango de edad fue de 3 a 56 años. El 58% (7) de los pacientes fue de género masculino, mientras que el 43% (5) fue femenino.

### 6.2.2 Nuevo León

Se nos proporcionó ARN viral de 16 pacientes con diagnóstico de fiebre por dengue de todo el estado de Nuevo León del año 2012. La ubicación geográfica de los casos se presenta en la Figura 17.



**Figura 17.** Distribución geográfica de casos identificados en Nuevo León.

La edad media de presentación fue de 28.88 años, la mediana de 20 años y el rango de edad fue de 7 a 66 años. El 69% (11) de los pacientes fue de género femenino, mientras que el 31% (5) fue masculino.

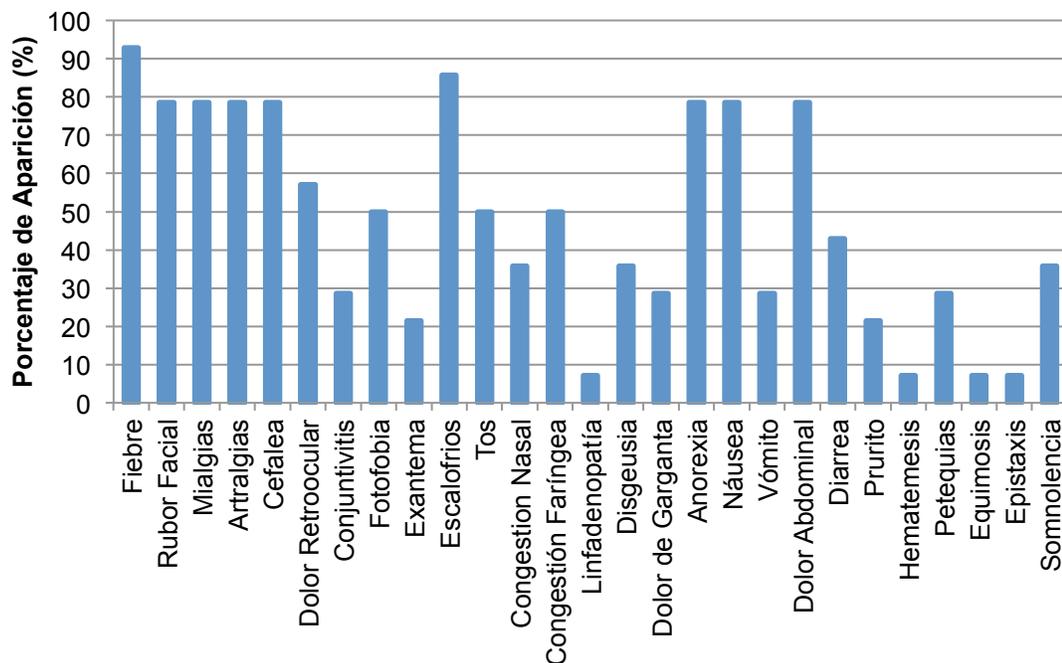
### **6.3 Manifestaciones clínicas evaluadas**

Las manifestaciones clínicas presentadas fueron diversas en los dos estados. A continuación se describen las manifestaciones presentadas en los pacientes de los dos estados evaluados.

#### **6.3.1 Yucatán**

La manifestación clínica más presentada en los pacientes fue fiebre mayor de 38°C presentada en el 93% de los pacientes, seguido de escalofríos en el 87%. El rubor facial, mialgias, artralgias, cefalea, anorexia, náusea y dolor abdominal se presentó en el 79% de los pacientes. Es importante mencionar que el dolor abdominal es un signo de alarma en la nueva clasificación de la

enfermedad de la OMS. El dolor retroocular característico de fiebre por dengue solo se presentó en el 57% de los pacientes. Síntomas respiratorios como tos, congestión nasal, congestión faríngea y dolor de garganta estuvieron presentes también, dando apariencia de cuadro catarral. Síntomas gastrointestinales como diarrea, estuvo presente en 43% de los casos. Hemorragias como hematemesis, epistaxis y equimosis estuvieron presentes en 7% de los casos, sin embargo 29% de pacientes presentó petequias. En la Figura 18 se muestran las manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes.

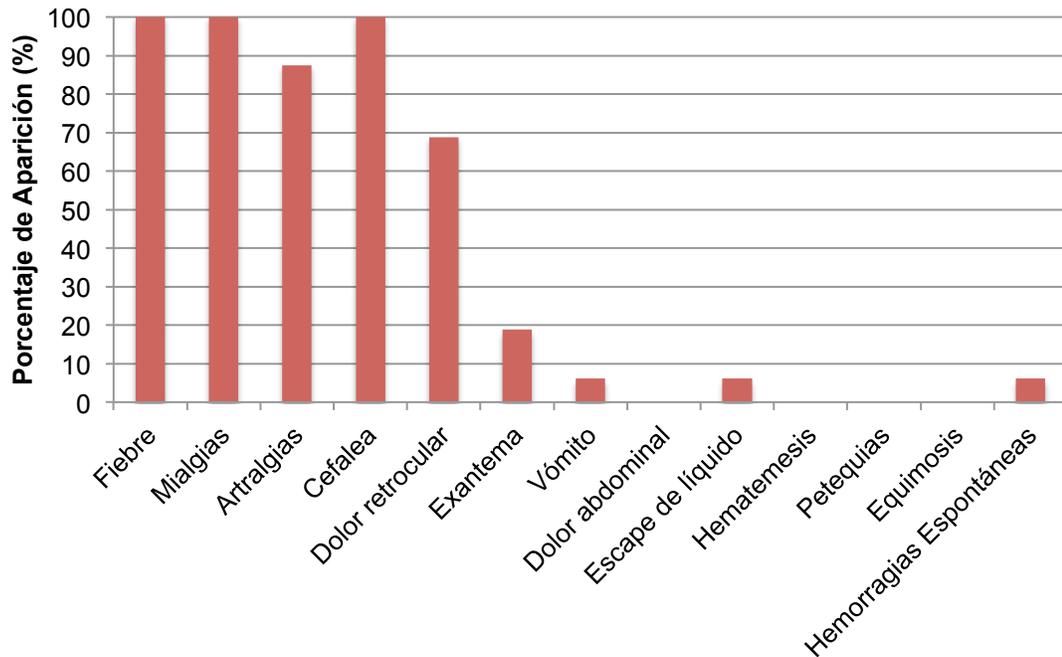


**Figura 18.** Manifestaciones clínicas presentadas en Yucatán.

### 6.3.2 Nuevo León

Las manifestaciones clínicas más presentadas fueron fiebre, mialgias y cefalea, reportadas en el 100% de los pacientes. Le siguió artralgias con el 88% y luego dolor retroocular en el 69%. Se presentó escape de líquido y hemorragias espontáneas en el 6% de los pacientes. Estos dos últimos son signos de alarma de acuerdo a la nueva clasificación de la OMS. A

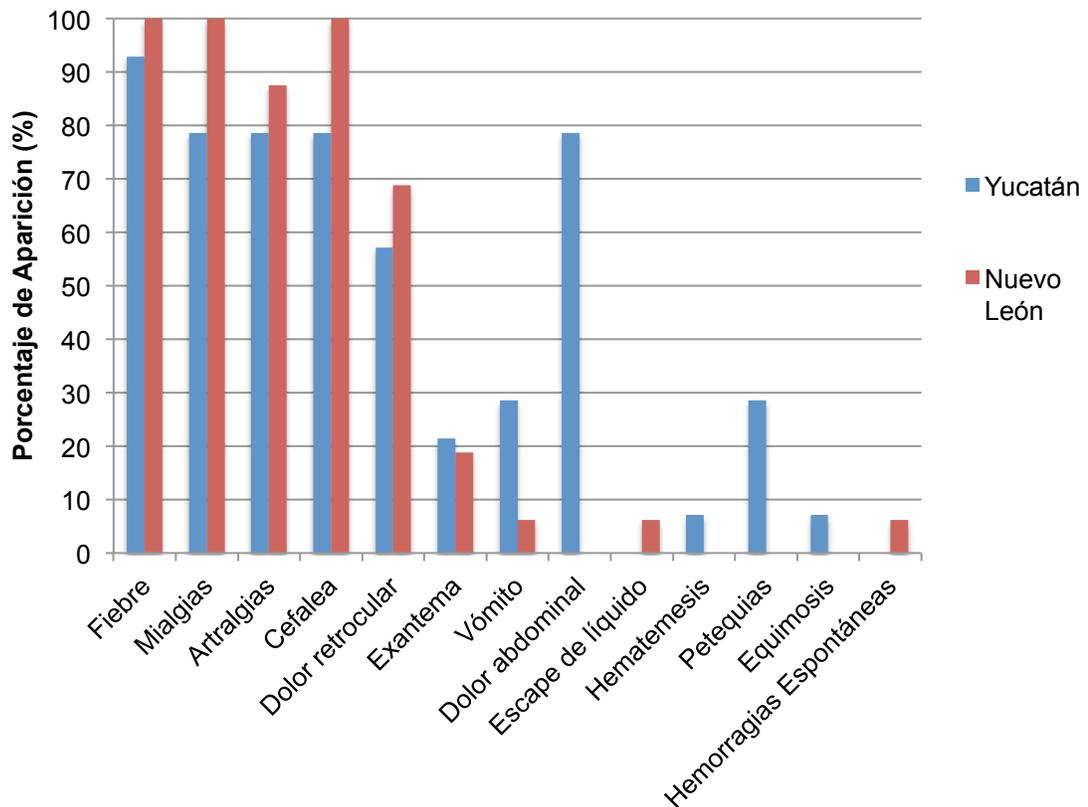
comparación de las manifestaciones de Yucatán, no se presentó dolor abdominal, petequias no equimosis. En la Figura 19 se muestran las manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes.



**Figura 19.** Manifestaciones clínicas presentadas en Nuevo León.

#### 6.4 Comparación de manifestaciones en ambos estados

Para poder hacer una correcta comparación de las manifestaciones clínicas se tomaron en cuenta solo las manifestaciones clínicas que fueron evaluadas por los dos estados. Dando como resultado el siguiente gráfico que se muestra en la Figura 20.



**Figura 20.** Manifestaciones clínicas presentadas en los dos estados.

Puede observarse que los síntomas constitucionales de la enfermedad (fiebre mialgias, cefalea, artralgias y dolor retroocular) se presentaron de igual forma en los dos estados. Sin embargo el dolor abdominal estuvo presente en la mayoría de los pacientes de Yucatán a comparación de los de Nuevo León. Este hallazgo es importante dado que el dolor abdominal es un signo de alarma. Otra manifestación clínica donde se observó diferencia son las petequias.

Debido a la diferencia observada en la presencia del dolor abdominal en los dos estados, se realizó una tabla de contingencia de la localidad y el dolor abdominal. En la prueba de Chi-cuadrado de Pearson el valor de p fue menor a 0.001 y en el estadístico exacto de Fisher, el valor de p fue menor a 0.001. Como se observó una situación similar en la presencia de petequias, se hizo también una tabla de contingencia de la localidad y petequias. El valor de p de

la prueba de chi-cuadrado de Pearson fue de 0.022 y el valor de p en el estadístico exacto de Fisher fue de 0.037. Por lo tanto podemos concluir que hay diferencia significativa en la presentación clínica de los pacientes de ambos estados.

### **6.5 Anticuerpos anti-DENV**

Se buscaron anticuerpos IgM e IgG contra DENV en suero mediante ELISA. Solamente se encontraron anticuerpos IgM contra DENV en los pacientes evaluados. Hubo una respuesta similar de anticuerpos IgM circulantes específicos para DENV en los dos estados. Se detectaron anticuerpos IgM específicos para DENV en el 14% de los pacientes de Yucatán. A comparación de los pacientes de Nuevo León, donde solamente en el 6% se detectaron. No se detectaron anticuerpos IgG contra DENV en los pacientes estudiados.

### **6.6 Antígeno NS1**

A pesar de que esta prueba tiene una sensibilidad del 80 al 100% solamente en 4 pacientes (29%) de Yucatán se detectó antígeno NS1 en sangre. Las 16 muestras de ARN proporcionadas pertenecieron a pacientes a quienes se les detectó NS1 en suero, requisito para que se realizara RT-qPCR. Aunque se realizó el mismo ensayo en los dos estados no pueden compararse los resultados.

### **6.7 Diagnóstico**

De acuerdo a la nueva clasificación de la OMS se hizo el diagnóstico de los pacientes. En Yucatán se diagnosticó fiebre por dengue con signos de alarma en el 91% de los pacientes y fiebre por dengue sin signos de alarma en 9%. En Nuevo León ocurrió lo contrario, el 87% de los pacientes tuvieron

diagnóstico de fiebre por dengue sin signos de alarma. Se realizó una tabla de contingencia de localidad y diagnóstico con la prueba de chi-cuadrado de Pearson y se obtuvo una significancia estadística de 0.001. El estadístico exacto de Fisher fue de 0.01. Lo cual nos demuestra que hay diferencia significativa entre los diagnósticos que se hacen en los dos estados.

## 6.8 Detección ARN viral

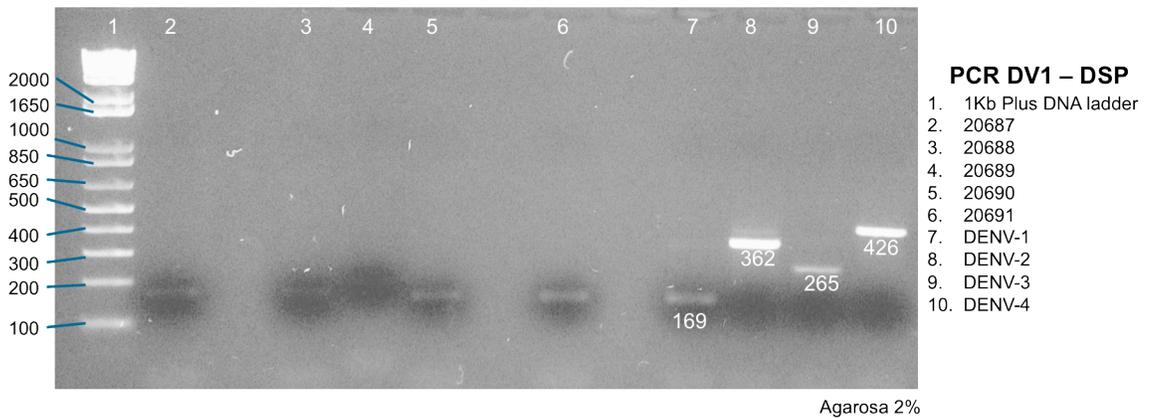
### 6.8.1 Detección de ARN viral por PCR I

En Yucatán, de las 12 muestras recolectadas, se lograron obtener 9 positivas para ARN viral por medio de la RT-PCR de Seah. De esas 9 muestras, 7 fueron positivas para DENV-1 y 2 para DENV-2. La lista de muestras se puede observar en la Tabla 31.

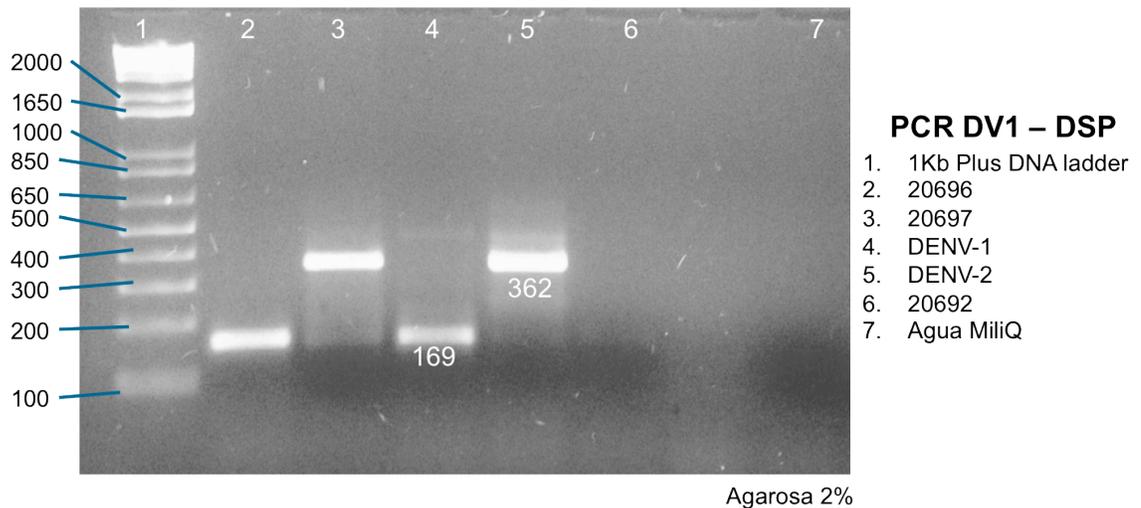
**Tabla 31.** Relación de muestras obtenidas de Yucatán

ID	PCR
687	DENV-1
688	DENV-1
689	DENV-1
690	DENV-1
691	DENV-1
692	DENV-1
693	NEG
694	NEG
695	NEG
696	DENV-1
697	DENV-2
698	DENV-2

En las Figuras 21 y 22 se observan los geles de las muestras positivas para DENV del estado de Yucatán.



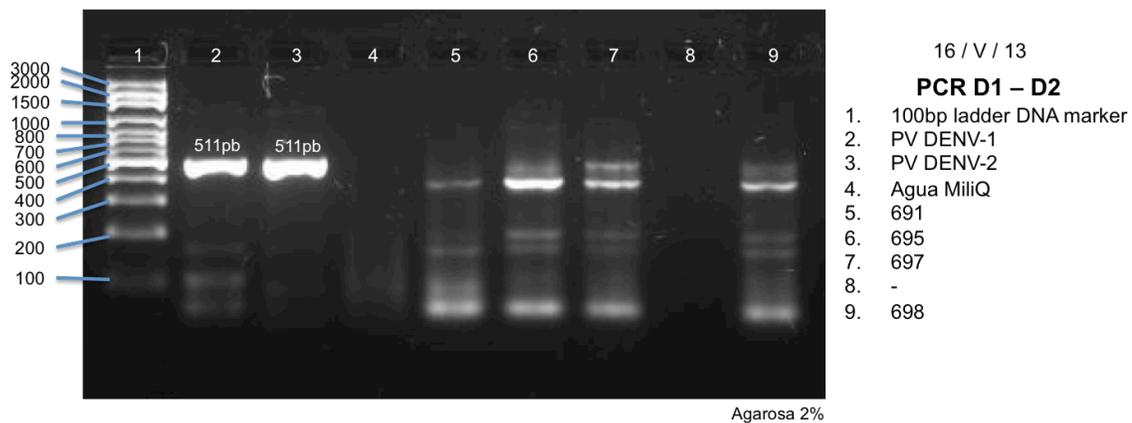
**Figura 21.** Gel de agarosa donde se observan las muestras positivas para PCR con el protocolo de C. Seah utilizando primers específicos para serotipo (DSP).



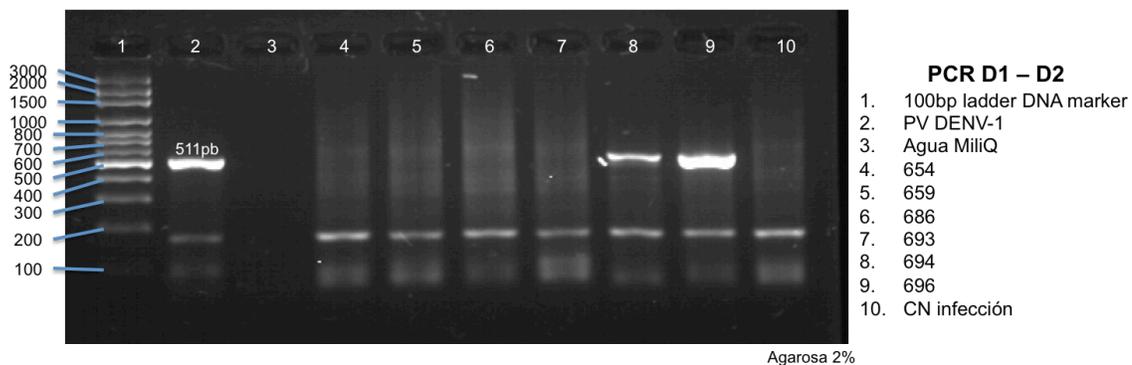
**Figura 22.** Gel de agarosa donde se observan las muestras positivas para PCR con el protocolo de C. Seah utilizando primers específicos para serotipo (DSP).

## 6.8.2 Detección ARN viral por PCR II

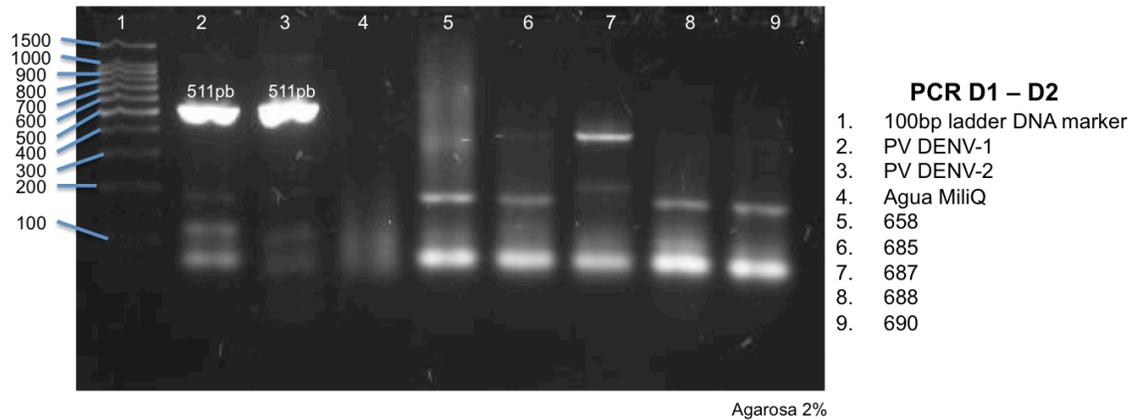
La confirmación de infección por DENV en las células C6/36 infectadas con sueros se realizó por medio de la técnica reportada por Lanciotti. A continuación (Figuras 23 – 26) se muestran los gels donde se evidencia la positividad de las muestras para infección por DENV.



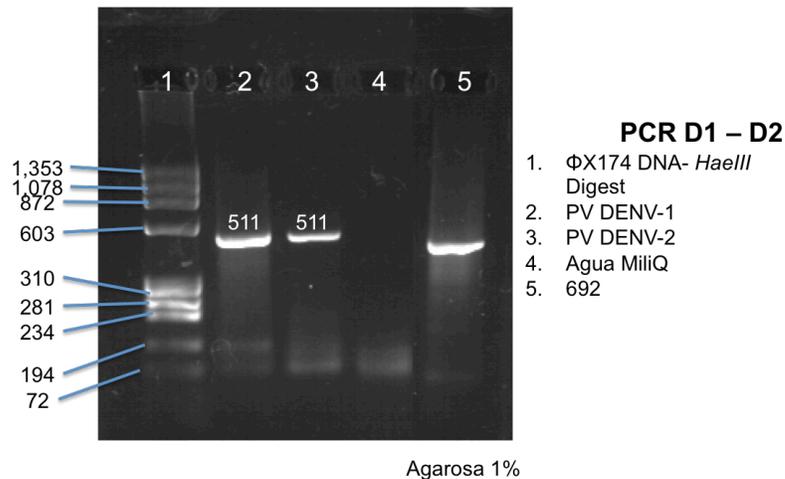
**Figura 23.** Gel de agarosa donde se muestra la positividad de las muestras 691, 695, 697 y 698 con el protocolo de R. Lanciotti.



**Figura 24.** Gel de agarosa donde se muestra la positividad de las muestras 694 y 696 con el protocolo de R. Lanciotti.



**Figura 25.** Gel de agarosa donde se muestra la positividad de la muestra 687 con el protocolo de R. Lanciotti.



**Figura 26.** Gel de agarosa donde se muestra la positividad de la muestra 692 con el protocolo de R. Lanciotti.

Las muestras que pudieron amplificarse en las células C6/36 y que procedieron a secuenciar fueron: 691, 695, 697, 698, 694, 696, 687 y 692.

### 6.8.3 Detección ARN viral por PCR tiempo real I

La RT-qPCR realizada en el Laboratorio Estatal de Salud Pública es la reportada por Johnson. Nos proporcionaron ARN de las siguientes muestras positivas para DENV-1 y DENV-2. Estas muestras son de diferentes partes del

estado y recolectadas en diferentes fechas del año 2012. El listado de las muestras se encuentra en la Tabla 32.

**Tabla 32.** Muestras obtenidas de Nuevo León

ID	PCR
6335	DENV-1
6870	DENV-2
7750	DENV-1
7753	DENV-1
8698	DENV-2
9250	DENV-1
9546	DENV-2
9856	DENV-2
9878	DENV-2
10378	DENV-2
10380	DENV-1
10438	DENV-2
10711	DENV-1
10814	DENV-1
10983	DENV-1
11165	DENV-2

#### 6.8.4 Detección de ARN viral por PCR tiempo real II

La segunda detección de ARN viral se realizó en el CDC Dengue Branch para verificar la integridad de las muestras y su posibilidad de secuenciar. Se utilizó el protocolo reportado por Santiago en modalidad singleplex para DENV-1 y DENV-2. Se analizaron muestras de ARN, ADNc y ARN recién extraído de suero. El valor de umbral de la reacción de DENV-1 fue de:  $8.60577 \times 10^4$ ; el valor de DENV-2 fue de:  $2.7250 \times 10^4$ . En la Tabla 33 se resume la información analizada.

**Tabla 33.** Resultado RT-qPCR para DENV-1 y DENV-2

<b>DENV-1</b>			<b>DENV-2</b>		
<b>ID</b>	<b>Especimen</b>	<b>CT</b>	<b>ID</b>	<b>Especimen</b>	<b>CT</b>
10380	ARN	19.49	9546	ARN	23.50
7753	ARN	28.23	8698	ARN	28.80
10983	ARN	16.98	11165	ARN	24.16
6335	ARN	34.83	10378	ARN	22.47
10814	ARN	22.08	10438	ARN	34.18
10711	ARN	31.38	9878	ARN	19.26
9250	ARN	30.89	9856	ARN	29.00
7750	ARN	19.19	6870	ARN	17.79
687	ARN	37.07	694	ARN	31.50
691	ARN	35.33	697	ARN	29.93
692	ARN	17.00	694	ADNc	30.25
695	ARN	32.39	697	ADNc	30.84
696	ARN	14.21	698	ADNc	41.65
687	ADNc	37.121	6870	ADNc	17.83
691	ADNc	34.25	694	ARN suero	23.06
692	ADNc	16.18	697	ARN suero	IND
695	ADNc	32.26	698	ARN suero	IND
696	ADNc	14.80			
687	ARN suero	IND			
691	ARN suero	IND			
692	ARN suero	18.84			
695	ARN suero	19.92			
696	ARN suero	IND			

Las muestras que fueron aptas para secuenciar fueron las que tuvieron CT menor o igual a 24. Dichas muestras se en listan en la Tabla 34 junto con el lugar de origen y el serotipo.

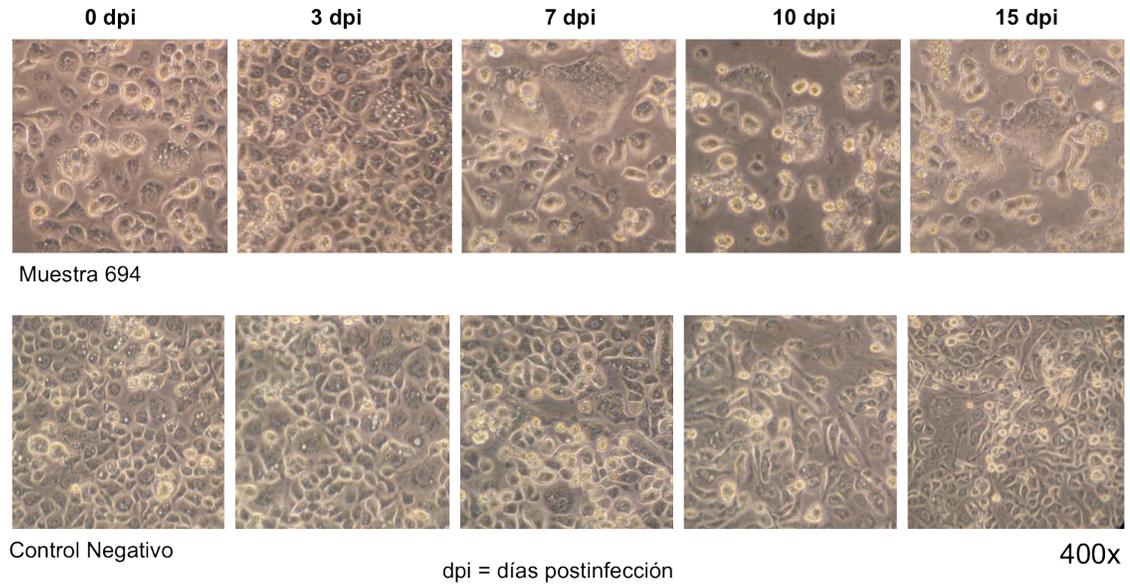
**Tabla 34.** Muestras que tuvieron CT  $\leq$ 24

<b>ID</b>	<b>Lugar</b>	<b>Muestra</b>	<b>Serotipo</b>
10380	NL	ARN	1
10983	NL	ARN	1
10814	NL	ARN	1
7750	NL	ARN	1
692	YUC	ARN	1
696	YUC	ARN	1
692	YUC	ADNc	1
696	YUC	ADNc	1
692	YUC	ARN Suero	1
695	YUC	ARN Suero	1
9546	NL	ARN	2
11165	NL	ARN	2
10378	NL	ARN	2
9878	NL	ARN	2
6870	NL	ARN	2
6870	NL	ADNc	2
694	YUC	ARN Suero	2

### 6.9 Infección de células C6/36

Se infectaron células C6/36 con los sueros obtenidos en Yucatán. Las células fueron observadas diariamente bajo microscopio de luz y se describieron los cambios morfológicos que se presentaron.

Se presentaron cambios en la morfología en todas las células infectadas en diferente grado. En la Figura 27 se muestra una serie de fotografías de las células infectadas con la muestra 694, donde se observan las células a diferentes días postinfección y los cambios presentados.

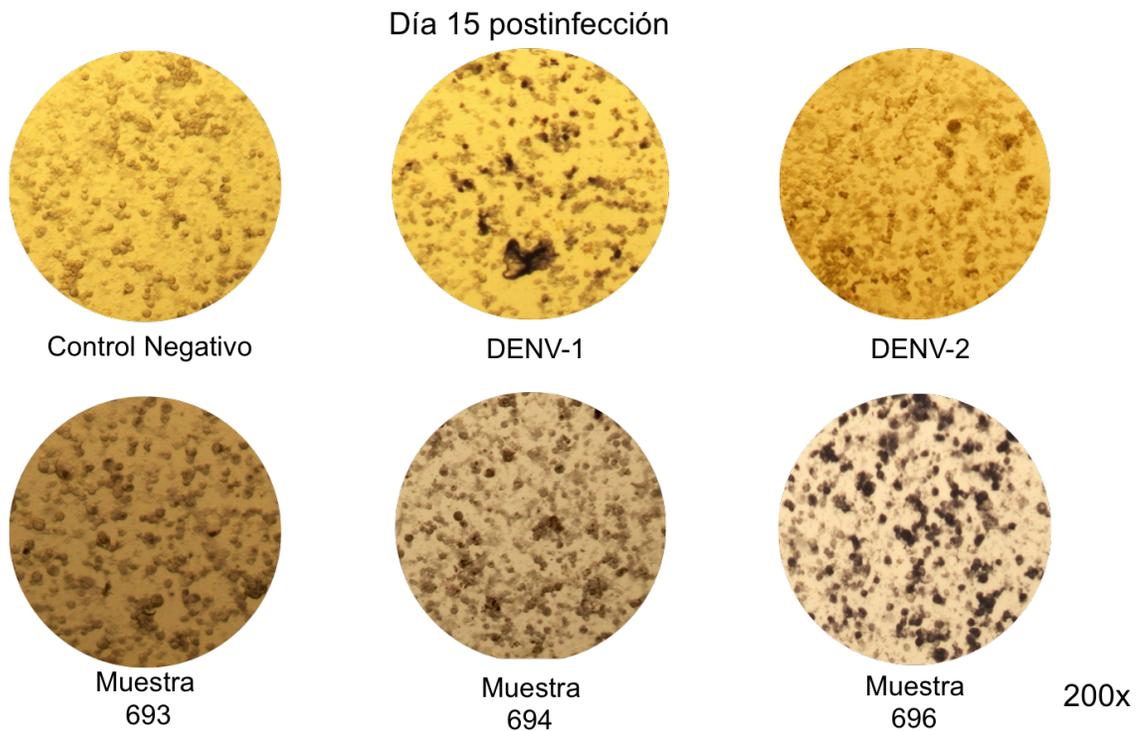


**Figura 27.** Células C6/36 infectadas con la muestra 694 a diferentes días postinfección.

En la serie de fotografías podemos observar que al día 0 postinfección las células son similares al control negativo sin infección. Al día 3, algunas células infectadas presentan vacuolización, contrario a las células sin infectar. En el día 7 se observa un célula gigante, producto de fusión celular. A su vez se observan espacios en blanco entre las células, que no se observa en la monocapa de células sin infectar. Al día 10 postinfección podemos observar mayor cantidad de células gigantes y mayor escases de células, lo que indica lisis celular. Para el día 15 postinfección, la monocapa celular se ve afectada, debido a la lisis celular. Se observan células gigantes y detrito celular. Estos cambios son característicos de infección. La confirmación de infección por DENV se realizó por RT-PCR e inmunohistoquímica.

### 6.10 Inmunohistoquímica

La confirmación de infección por inmunohistoquímica se realizó en en las células infectadas con las muestras 693, 694 y 696. En la Figura 28 se pueden observar la positividad de las muestras.

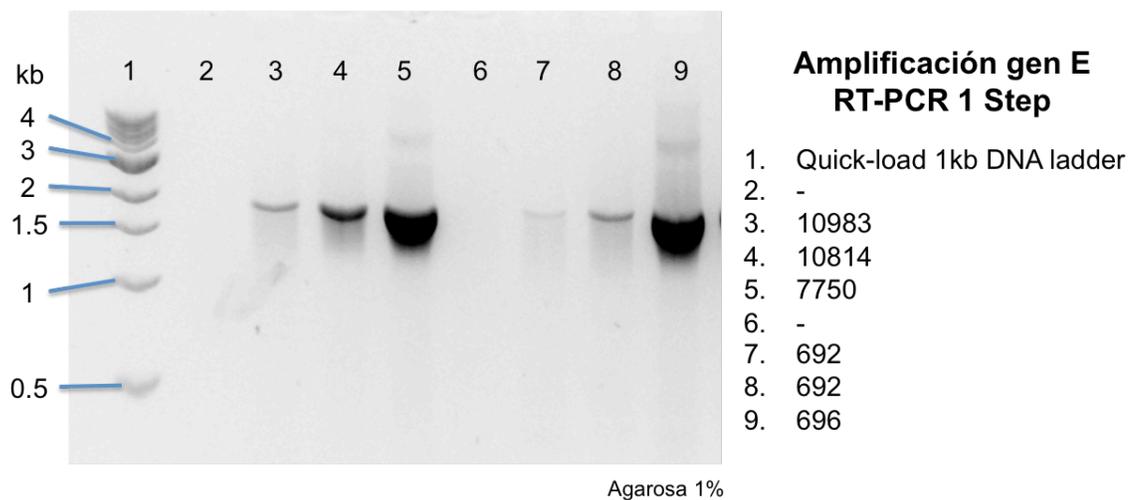


**Figura 28.** Inmunohistoquímica contra Flavivirus realizada en células C6/36 infectadas con DENV.

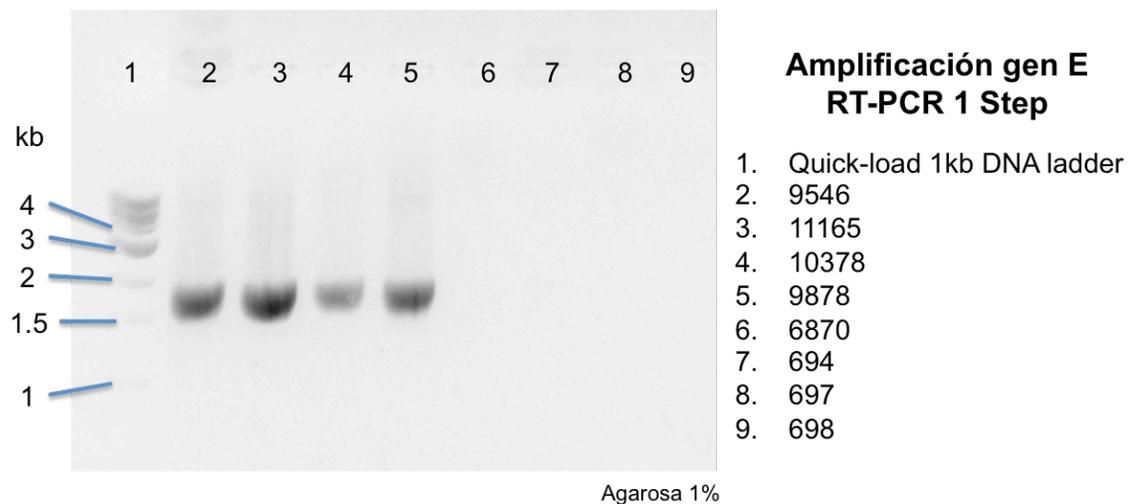
Podemos observar que la técnica es válida debido a que los controles positivos y negativos resultaron positivos y negativos, respectivamente. Las muestras fueron positivas a infección por flavivirus dado que se muestran señales negras en las células. Observamos que las células infectadas con las muestras dieron mayor señal que los controles positivos. Esto puede deberse a que las células controles estaban congeladas y las células infectadas con las muestras se fijaron inmediatamente después de su cosecha.

## 6.11 Amplificación gen de proteína de envoltura

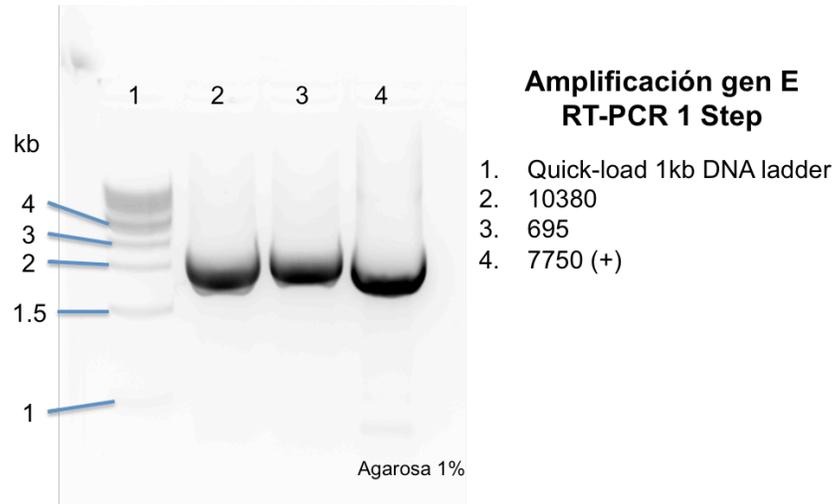
Las muestras que tuvieron  $CT \leq 24$  se procedieron a amplificar el gen de la proteína de envoltura por en un solo paso. A continuación se muestran los geles (Figuras 29 – 33) donde se evidencia la amplificación de las muestras.



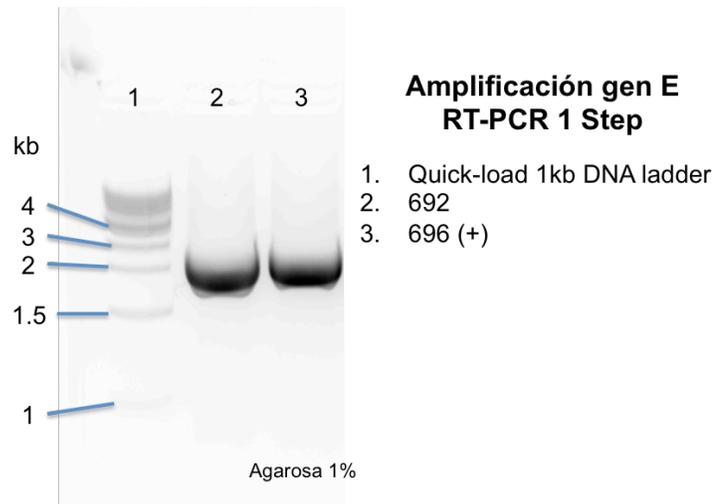
**Figura 29.** Gel de agarosa donde se muestran bandas definidas de las muestras 10814, 7750, y 696.



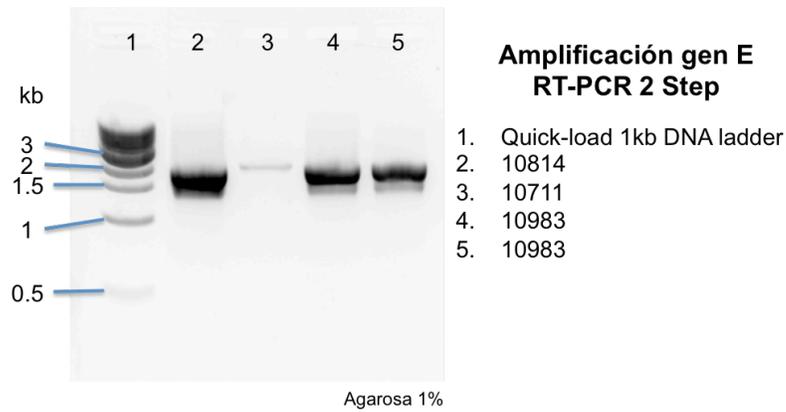
**Figura 30.** Gel de agarosa donde se muestran bandas definidas de las muestras 9546, 11165, 10378 y 9878.



**Figura 31.** Gel de agarosa donde se muestran bandas definidas para las muestras 10380 y 695.



**Figura 32.** Gel de agarosa donde se muestra banda definida de la muestra 692.



**Figura 33.** Gel de agarosa donde se muestran bandas definidas para las muestras 10814 y 10983.

Solamente amplificaron 11 muestras de manera adecuada y se enlistan en la Tabla 35 junto con el serotipo y la localidad de las muestras.

**Tabla 35.** Muestras amplificadas para E

ID	Serotipo	Localidad
7750	1	NL
9546	2	NL
11165	2	NL
10378	2	NL
9878	2	NL
10380	1	NL
10814	1	NL
10983	1	NL
696	1	YUC
695	1	YUC
692	1	YUC

## 6.12 Secuenciación

Después de haber sido secuenciadas las muestras, se ensamblaron las secuencias. De las 11 muestras secuenciadas, la muestra 10378 obtuvo electroferogramas de mala calidad, por lo cual no se pudo obtener secuencia. Las secuencias de las muestras restantes que pudieron ser secuenciadas se enlistan en la Tabla 36.

**Tabla 36.** Lista de muestras de las que se obtuvieron secuencia nucleotídica.

ID	Nombre	Serotipo	Localidad
7750	NL 7750 2012	1	Nuevo León
10380	NL 10380 2012	1	Nuevo León
10814	NL 10814 2012	1	Nuevo León
10983	NL 10983 2012	1	Nuevo León
9546	NL 9546 2012	2	Nuevo León
9878	NL 9878 2012	2	Nuevo León
11165	NL 11165 2012	2	Nuevo León
692	YUC 692 2012	1	Yucatán
695	YUC 695 2012	1	Yucatán
696	YUC 696 2012	1	Yucatán

## 6.13 Comparación de secuencias

Las secuencias obtenidas se separaron por serotipo y fueron analizadas en el programa MEGA. En este programa se realizó el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas. Una vez alineadas las muestras, se buscó manualmente los cambios presentados en las secuencias.

### 6.13.1 DENV-1

Se detectaron 20 mutaciones en las secuencias del gen de la proteína E de DENV-1. Catorce de las 20 mutaciones se encontraron en las secuencias de Yucatán. De esas 14, 11 mutaciones estuvieron presentes solo en la muestra 696. Dos mutaciones (244 y 1296) fueron compartidas por las tres muestras de Yucatán y una mutación (885) por las muestras 692 y 695. Cinco de las 6 mutaciones detectadas en las secuencias de Nuevo León fueron compartidas por las 4 muestras. Solamente la mutación en el sitio 999 estuvo presente en la muestra 10814. Las mutaciones y la muestra correspondiente se enlistan en la Tabla 37.

**Tabla 37.** Cambios presentados en las secuencias de DENV-1

Posición nucleótido	Δ	ID Muestra
30	C-T	696
69	G-A	696
135	C-T	7750 10814 10380 10983
207	C-T	696
244	C-T	692 695 696
312	C-T	696
357	C-T	7750 10814 10380 10983
447	C-T	696
507	T-C	7750 10814 10380 10983
681	C-T	696
885	A-G	692 695
922	C-T	696
999	C-T	10814
1197	G-A	696
1243	C-T	7750 10814 10380 10983
1296	G-A	692 695 696
1383	T-C	7750 10814 10380 10983
1389	G-A	696
1423	C-T	696
1455	T-A	696

Diecinueve de las 20 mutaciones fueron transiciones, solamente la mutación en la posición 1455 fue una transversión. Todos los cambios fueron mutaciones sinónimas con excepción del cambio en la posición 1423, que resultó ser cambio en la primera posición del codón.

La transición de C – T en la posición 1423 de la muestra 696 da como resultado un cambio de leucina por fenilalanina en la posición 475. Ambos aminoácidos son hidrofóbicos por lo que no se espera un cambio en la estructura secundaria. El alineamiento de aminoácidos de las muestras se representa gráficamente en la Figura 34.



**Figura 34.** Representación gráfica de alineamiento de proteína E de DENV-1.<sup>153</sup>

### 6.13.2 DENV-2

En el gen de la proteína E del DENV-2 se observaron 11 mutaciones en las muestras secuenciadas. De las 11 mutaciones, 5 estuvieron presentes en la muestra 9546, 4 en la muestra 9878 y 2 en la muestra 11165. Ninguna de las muestras compartió mutaciones. Las mutaciones y la muestra correspondiente se enlistan en la Tabla 38.

**Tabla 38.** Cambios presentados en las secuencias de DENV-2

Posición Nucleótido	$\Delta$	ID Muestra
36	A-G	9546
121	T-C	11165
240	T-C	9878
249	C-T	9878
447	C-T	9546
453	A-G	9546
723	G-A	9546
1062	T-A	9878
1063	A-T	9878
1194	C-T	9546
1452	T-C	11165

De las 11 mutaciones presentadas, 9 fueron transiciones y dos transversiones. La transversiones se presentaron en la muestra 9878. Diez de los 11 mutaciones fueron sinónimas con excepción de la transversión en la posición 1063. La mutación fue en la primera posición del codón, dando por resultado una mutación no sinónima.

La transversión de A – T en la posición 1063 de la muestra 9878 da como resultado un cambio de asparagina por tirosina en la posición 355. Ambos aminoácidos son hidrofílicos pero la capacidad de la tirosina de fosforilarse puede alterar la estructura terciaria de la proteína. La representación gráfica del alineamiento de aminoácidos se observa en la Figura 35.



**Figura 35.** Representación gráfica de alineamiento de proteína E de DENV-2.<sup>153</sup>

### 6.14 Modelaje estructura terciaria

Se realizó el modelaje de las proteína E nativas para los dos serotipos, DENV-1 y DENV-2 y para las proteínas con mutación de las muestras 696 y 9878.

#### 6.14.1 DENV-1

La predicción de la estructura terciaria de la proteína E de la muestra 696 no presentó cambios comparada con la estructura de la proteína nativa de DENV-1. Puede observarse la similitud de las estructuras proteicas en las Figuras 36 y 37.



**Figura 36.** Modelo de proteína E nativa de DENV-1 realizado en el servidor CPHmodel y optimizado en PDB viewer.<sup>154</sup>



**Figura 37.** Modelo de proteína E de muestra 696 realizado en el servidor CPHmodel y optimizado en PDB viewer.<sup>154</sup>

### 6.14.2 DENV-2

La sustitución no sinónima en la posición 355 de la proteína de la muestra 9878 ocasionó un cambio en la estructura terciaria de la proteína. Esto de acuerdo al modelaje realizado. Puede observarse el cambio en las Figuras 38 y 39.



**Figura 38.** Modelo de proteína E nativa de DENV-2 realizado en el servidor CPHmodel y optimizado en PDB viewer.



**Figura 39.** Modelo de proteína E de muestra 9878 realizado en el servidor CPHmodel y optimizado en PDB viewer.

El modelaje de la estructura proteíca es hipotético, se necesitan estudios a profundidad para establecer si este cambio es verdadero.

### 6.15 Compración de manifestaciones clínicas con cambios en secuencia

Las manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes infectados con DENV-1 se presentan en la Tabla 39. Las primeras tres filas corresponden a pacientes de Yucatán y las cuatro últimas a pacientes de Nuevo León.

**Tabla 39.** Manifestaciones clínicas presentadas por pacientes infectados con DENV-1

	Fiebre	Mialgias	Artralgias	Cefalea	Dolor retroocular	Exantema	Vómito	Dolor abdominal	Petequias	Equimosis
692	X	X	X	X	X	X		X	X	X
695	X	X	X	X						
696	X			X			X		X	
7750	X	X	X	X	X					
10814	X	X	X	X			X			
10380	X	X	X	X	X					
10983	X	X	X	X	X					

El paciente infectado con el virus que presentó mayores manifestaciones clínicas (692) solo presentó tres mutaciones, y esas mutaciones estuvieron presentes en los tres virus pertenecientes a Yucatán. El paciente 696, quien su muestra presentó el mayor número de mutaciones (13), fue el que tuvo menos manifestaciones clínicas (fiebre, cefalea, vómito y petequias). Solo fue posible secuenciar un virus que haya dado dolor abdominal como manifestación clínica (692). Sin embargo no hubo mutación específica para ese virus.

Los virus pertenecientes a Nuevo León causaron solo síntomas constitucionales y los cuatro compartieron 4 mutaciones a lo largo del gen de la proteína E. Solamente la mutación en la posición 999 fue específica para el virus 10814, pero la única manifestación clínica diferente a las demás fue el vómito.

En relación a las manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes infectados con DENV-2, en la Tabla 40 se enlistan las manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes infectados por DENV-2.

**Tabla 40.** Manifestaciones clínicas presentadas por pacientes infectados por DENV-2.

	Fiebre	Mialgias	Artralgias	Cefalea	Dolor retroocular	Exantema	Vómito	Dolor abdominal	Petequias	Equimosis
9546	X	X	X	X						
9878	X	X		X	X					
11165	X	X	X	X	X	X				

Los pacientes de Nuevo León presentaron los síntomas constitucionales de la enfermedad. Solamente el paciente infectado con el virus 11165 presentó exantema. El virus 11165 presentó dos mutaciones (121 y 1452). Sin embargo la ausencia de otro virus con la misma mutación que cause exantema hace que no se pueda establecer relación. El virus 9546 presentó 5 mutaciones pero los síntomas presentados por el paciente fueron leves. El virus 9878 presentó 4 mutaciones pero al igual que el 9546, la sintomatología fue leve. No hubo sintomatología de alarma en los pacientes de Nuevo León.

## **6.16 Análisis filogenético**

Se realizó el análisis filogenético de los dos serotipos de DENV utilizados en este trabajo mediante el programa MEGA.

### **6.16.1 DENV-1**

Podemos observar que están presentes los 5 genotipos del DENV-1 en el árbol. Los virus de Nuevo León de 2012, secuenciados en este trabajo, se encuentran señalados con un cuadro azul. En cuanto los triángulos rojos corresponden a los virus de Yucatán secuenciados en este trabajo.

Se observan 6 clusters en el genotipo Americano Africano. En dos de ellos se encuentran virus de Nuevo León y Yucatán. Los virus de Nuevo León del 2012 se agrupan con los de Yucatán del mismo año. Quienes a su vez se agrupan con virus de El Salvador de 2012, Nicaragua de 2008 y Venezuela 2006. En otro cluster se encuentran los virus de Nuevo León de 2010 a 2011 y Yucatán 2007 a 2008. Estos virus se agrupan con el de Nicaragua de 2005. Se puede inferir que hubo una introducción nueva de DENV-1 en Nuevo León y Yucatán, desplazando a los virus del 2010 y 2011. El árbol filogenético de DENV-1 se puede observar en la Figura 40 en la página 102.

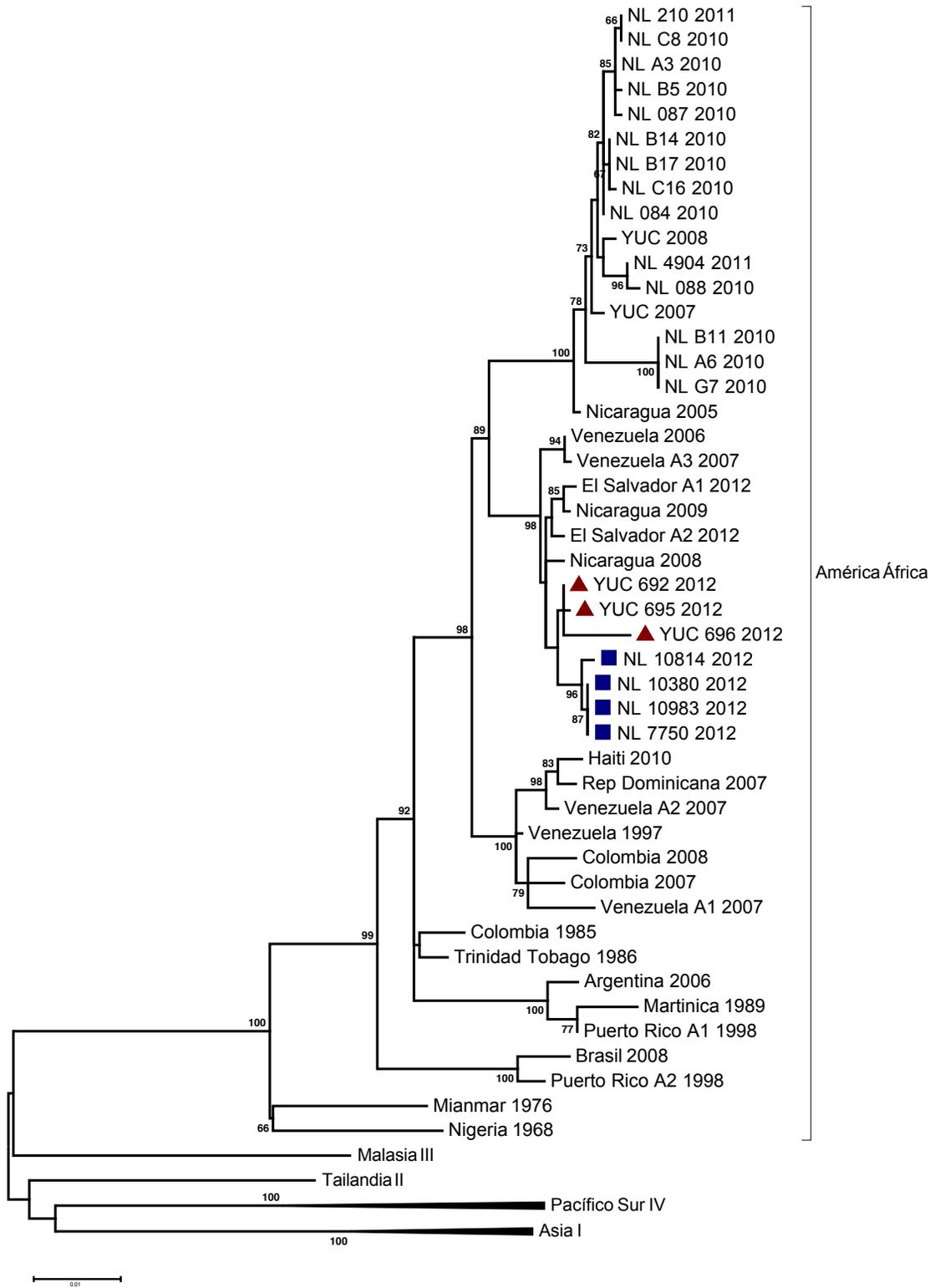


Figura 40. Árbol filogenético DENV-1.

## **6.16. 2 DENV-2**

Podemos observar como se divide el árbol en los 5 genotipos anteriormente reportados y un grupo selvático. Los virus de Nuevo León de 2012, secuenciados en este trabajo, se encuentran marcados con un cuadro azul.

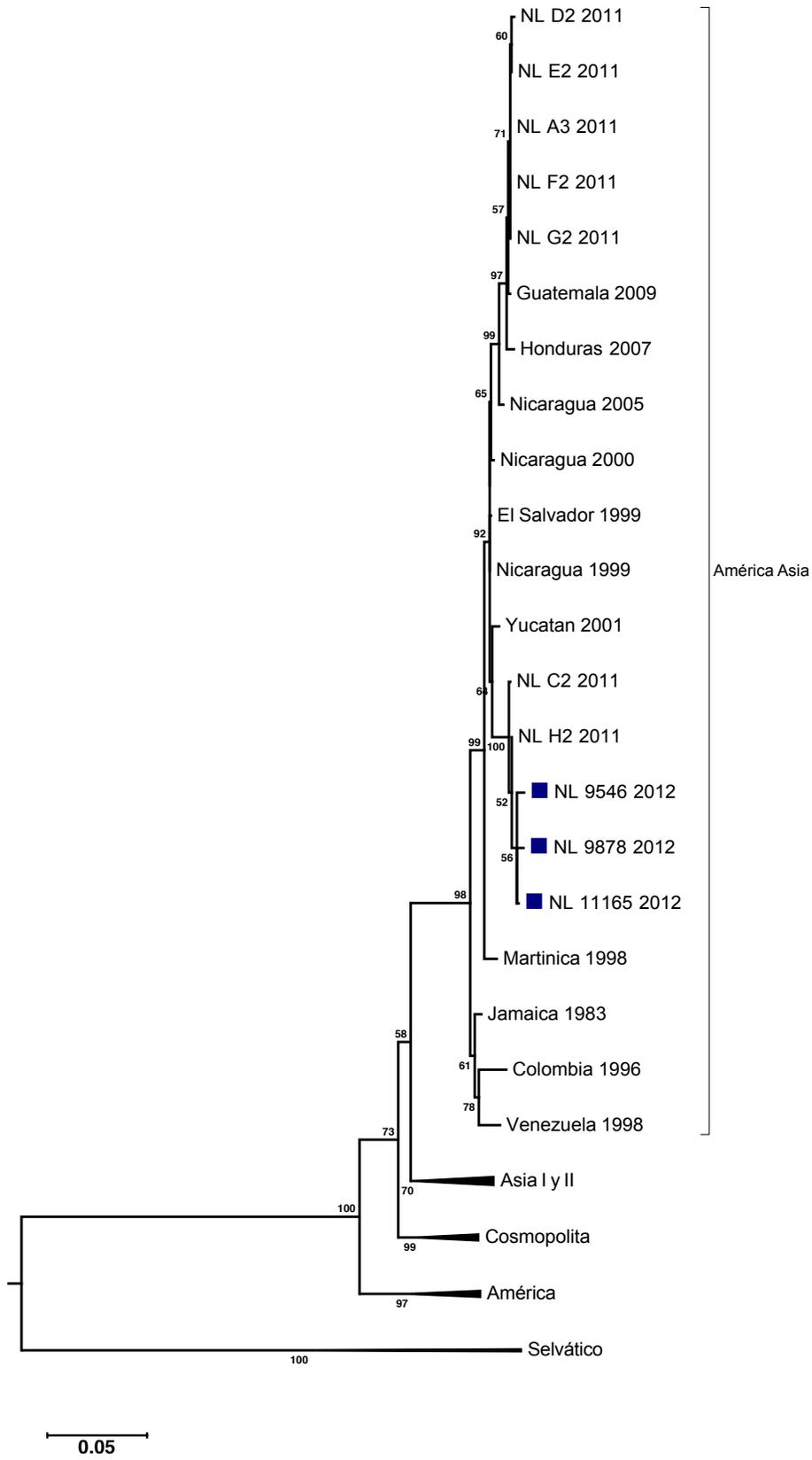
Los virus secuenciados se encuentran en uno de los clusters del genotipo Americano Asiático. Observamos como los virus de 2012 se agrupan con virus de Nuevo León de 2011. Éstos a su vez se agrupan con un virus de Yucatán de 2001 y después con Nicaragua en 1999. En otro cluster se observan otros virus de Nuevo León de 2011. Estos virus se agrupan con los virus de Guatemala 2009, Honduras 2007 y Nicaragua 2000. Con esto se puede inferir que hubo dos virus de diferente cluster circulando al mismo tiempo en el 2011. Sin embargo solo uno permaneció en circulación. El árbol filogenético de DENV-2 se puede observar en la Figura 41 en la página 104.

## **6.17 Inferencia rutas de desplazamiento**

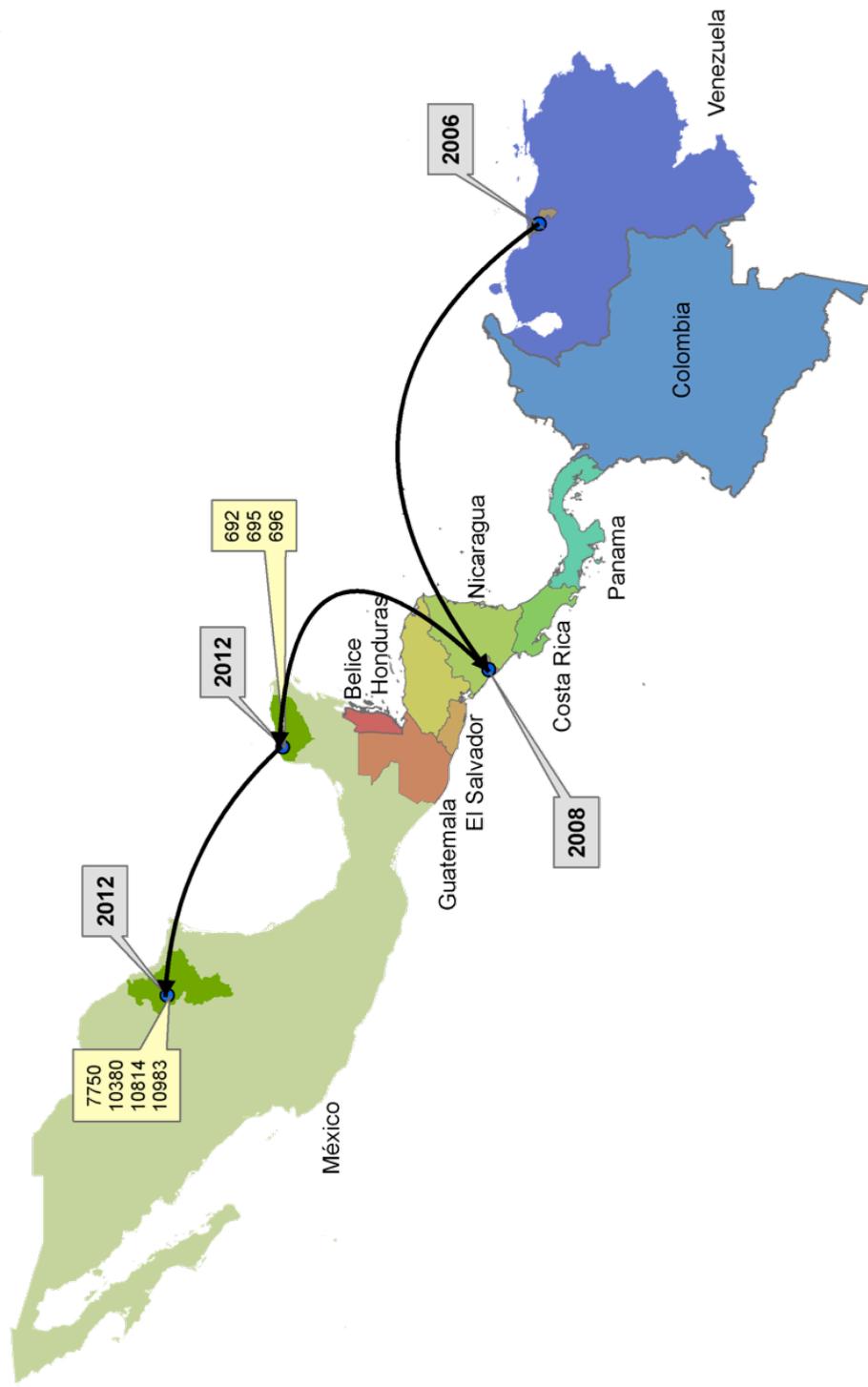
Gracias al estudio filogenético, podemos inferir las rutas de desplazamiento del virus.

### **6.17.1 DENV-1**

Podemos inferir que el virus proviene de Venezuela en el 2006, dado que es el aislado detectado más antiguo. Siguiendo la cronologicamente el aislamiento de los virus, se desplazó hacia Nicaragua donde fue detectado en el 2008. Posteriormente el virus fue detectado en el 2012 en Yucatán y después se estableció en Nuevo León en el 2012 desplazando a las cepas del 2010 - 2011. La posible trayectoria se muestra en la Figura 42 en la página 105. Ésta puede cambiar a medida que se tengan disponibles más secuencias.



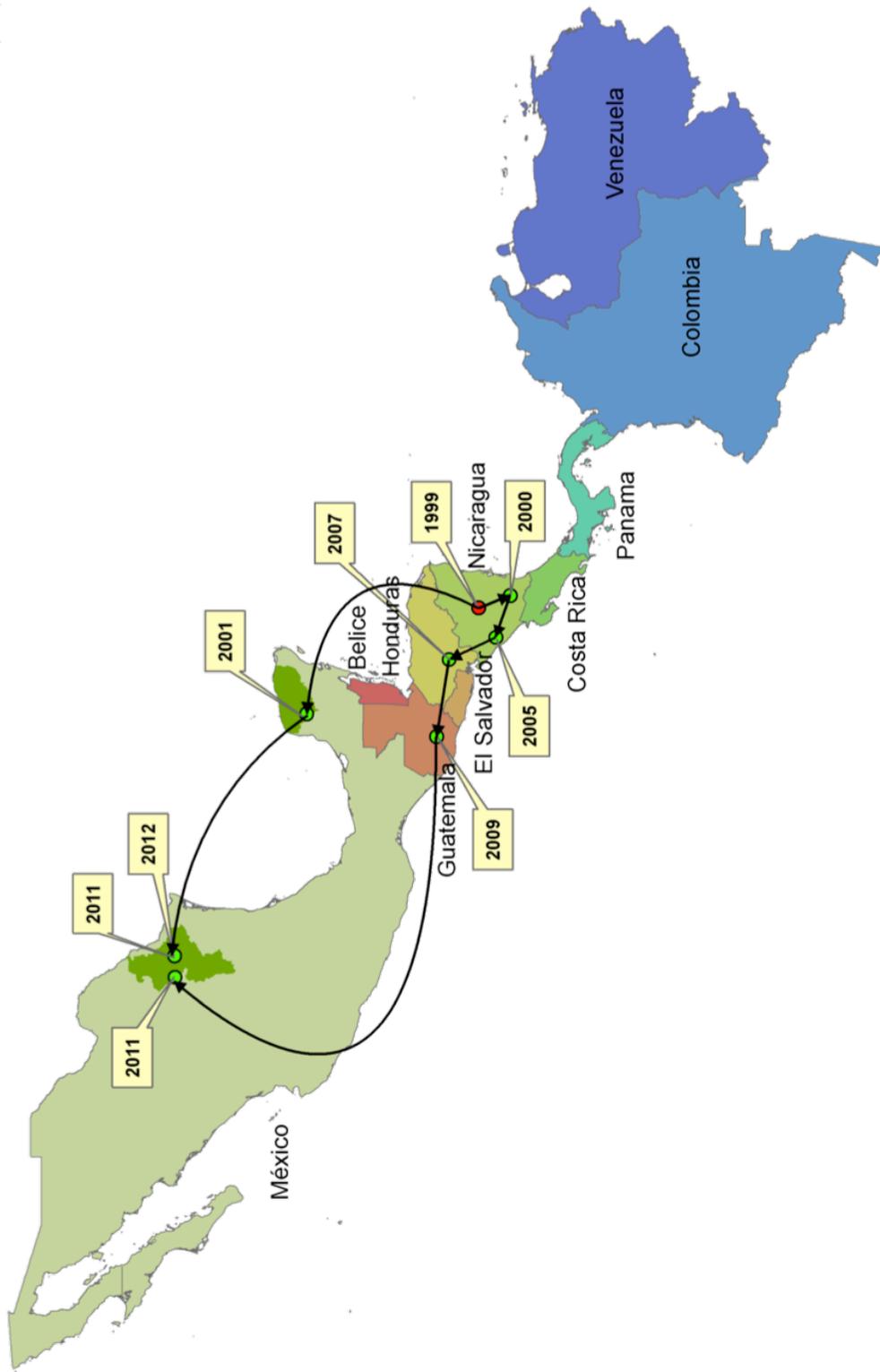
**Figura 41.** Árbol filogenético DENV-2.



**Figura 42.** Posible trayectoria del DENV-1 por America Latina.

### **6.17.2 DENV-2**

A partir de las secuencias que se tienen hasta el momento se puede inferir que el origen del virus fue en Nicaragua en 1999, debido a que es la secuencia cronológicamente más antigua agrupada con las secuencias obtenidas en este proyecto. El virus estuvo circulando en Nicaragua, donde fue detectado en diversas ocasiones. El virus evolucionó y se propagó por dos formas diferentes. Uno de ellos siguió circulando por Nicaragua y se extendió a Honduras, donde fue detectado en el 2007. Posteriormente fue detectado en Guatemala en el 2009, para después desplazarse a Nuevo León en el 2011. El otro virus pasó de Nicaragua a Yucatán, donde fue detectado en el 2001. Después se desplazó a Nuevo León, donde fue detectado en el 2011 y siguió circulando durante el 2012. La posible trayectoria se muestra en la Figura 43 en la página 107.



**Figura 43.** Posible trayectoria del DENV-2 por Latino América.

## **CAPÍTULO 7**

### **DISCUSIÓN**

Las manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes de ambos estados fue heterogénea. En Yucatán, los pacientes fueron evaluados directamente, a comparación de los pacientes de Nuevo León donde las manifestaciones clínicas fueron obtenidas de la plataforma única del SINAVE, por lo que para establecer una asociación será necesario utilizar el mismo sistema de evaluación de síntomas en Nuevo León.

Las secuencias de nucleótidos del dengue analizadas en ambas regiones endémicas y su comparación con otras secuencias de años anteriores inmediatos y otras diferentes regiones, nos permiten visualizar un panorama epidemiológico de esta enfermedad y permiten estudiar la dinámica de la transmisión en nuestro país.

No se observó relación entre las manifestaciones clínicas y la diversidad del gen de la proteína E del virus del dengue en los pacientes infectados analizados, lo cual coincide con lo reportado.<sup>156</sup>

El análisis filogenético de secuencias del gen de la proteína E de los aislados en este trabajo y su comparación con los reportados en GenBank en los últimos años permitieron inferir las rutas de desplazamiento del virus a través del continente.

La identificación y filogenia de secuencias circulantes de DENV en América conlleva un impacto significativo en el sector salud, económico y social principalmente en las áreas endémicas. El costo promedio anual de casos de dengue reportados es de 440 millones USD. Debido a esto, es importante identificar los virus circulantes y su dinámica de transmisión para definir medidas preventivas de la enfermedad.

## **CAPÍTULO 8**

### **CONCLUSIONES**

A partir de los virus aislados circulantes en los estados de Nuevo León y Yucatán, no se encontró relación entre las manifestaciones clínicas y las variantes genéticas del gen de la proteína E.

Los virus que circularon durante el 2012 en Nuevo León y Yucatán tienen una gran homología, por lo tanto se puede inferir que tienen el mismo origen.

Se confirmaron dos introducciones del DENV-1 en el estado de NL y Yucatán, sin embargo solo un clado sigue en circulación. Asimismo, se confirmaron dos introducciones de DENV-2 en NL donde se identificó la cocirculación de los virus.

No se observó relación entre las manifestaciones clínicas y la diversidad del gen de la proteína E-DENV en los pacientes infectados analizados.

Se establecieron las posibles rutas de desplazamiento de los virus en los dos estados, teniendo su origen en Venezuela y Centroamérica.

## CAPÍTULO 9

### BIBLIOGRAFÍA

1. Secretaría-de-Salud. Manejo del dengue no grave y el dengue grave. Mexico: CENETEC; 2008.
2. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988, **239**(4839): 476-481.
3. Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1998, **352**(9132): 971-977.
4. Rodhain F. La situation de la dengue dans le monde. *Bull Soc Pathol Exot* 1996, **89**(2): 87-90.
5. World-Health-Organization. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. World Health Organization: Geneva, 2009.
6. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, *et al.* Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis* 2012, **6**(8): e1760.
7. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013, **496**(7446): 504-507.
8. Chakravarti A, Arora R, Luxemburger C. Fifty years of dengue in India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012, **106**(5): 273-282.
9. Tapia-Conyer R, Mendez-Galvan JF, Gallardo-Rincon H. The growing burden of dengue in Latin America. *J Clin Virol* 2009, **46 Suppl 2**: S3-6.
10. SINAVE. Perfil Epidemiológico del Dengue en México. In: Epidemiología DGd, editor. México: Secretaría de Salud; 2012.

11. Lorono-Pino MA, Cropp CB, Farfan JA, Vorndam AV, Rodriguez-Angulo EM, Rosado-Paredes EP, *et al.* Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. *Am J Trop Med Hyg* 1999, **61**(5): 725-730.
12. Diaz FJ, Black WCt, Farfan-Ale JA, Lorono-Pino MA, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus circulation and evolution in Mexico: a phylogenetic perspective. *Arch Med Res* 2006, **37**(6): 760-773.
13. SINAVE. Panorama Epidemiológico de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue. In: Epidemiología DGd, editor. México Secretaría de Salud; 2013.
14. Buhl MR. [Flavivirus infections: yellow fever, dengue fever and Japanese encephalitis]. *Ugeskr Laeger* 2005, **167**(43): 4076-4080.
15. Holmes EC. The evolutionary biology of dengue virus. *Novartis Found Symp* 2006, **277**: 177-187; discussion 187-192, 251-173.
16. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 2006, **80**(23): 11418-11431.
17. Tomlinson SM, Malmstrom RD, Watowich SJ. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. *Infect Disord Drug Targets* 2009, **9**(3): 327-343.
18. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J Clin Virol* 2012, **55**(4): 289-295.
19. Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, *et al.* Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* 2008, **319**(5871): 1834-1837.
20. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003, **59**: 23-61.

21. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, *et al.* Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 2010, **8**(12 Suppl): S7-16.
22. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* 2012, **30**(29): 4301-4306.
23. van der Schaar HM, Wilschut JC, Smit JM. Role of antibodies in controlling dengue virus infection. *Immunobiology* 2009, **214**(7): 613-629.
24. Halstead SB, Heinz FX, Barrett AD, Roehrig JT. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. *Vaccine*, vol. 23: Netherlands, 2005, pp 849-856.
25. Garcia-Montalvo BM, Medina F, del Angel RM. La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA. *Virus Res* 2004, **102**(2): 141-150.
26. Qin CF, Jiang T, Chen SP, Yu M, Qin ED. [Capsid-targeted viral inactivation for dengue virus infection]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2005, **45**(1): 111-115.
27. Seema, Jain SK. Molecular mechanism of pathogenesis of dengue virus: Entry and fusion with target cell. *Indian J Clin Biochem* 2005, **20**(2): 92-103.
28. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, *et al.* Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 1989, **70** ( Pt 1): 37-43.
29. Holmes EC. RNA virus genomics: a world of possibilities. *J Clin Invest* 2009, **119**(9): 2488-2495.
30. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 2003, **59**: 315-341.

31. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* 2003, **3**(1): 19-28.
32. Goncalvez AP, Escalante AA, Pujol FH, Ludert JE, Tovar D, Salas RA, *et al.* Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology* 2002, **303**(1): 110-119.
33. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol* 2009, **9**(4): 523-540.
34. Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res* 2008, **72**: 1-76.
35. Lewis JA, Chang GJ, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW, Trent DW. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology* 1993, **197**(1): 216-224.
36. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, *et al.* Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 1997, **230**(2): 244-251.
37. Klungthong C, Zhang C, Mammen MP, Jr., Ubol S, Holmes EC. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology* 2004, **329**(1): 168-179.
38. Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, *et al.* Selection-driven evolution of emergent dengue virus. *Mol Biol Evol* 2003, **20**(10): 1650-1658.
39. Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanrooj S, *et al.* Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology* 2002, **301**(1): 148-156.
40. Thu HM, Lowry K, Myint TT, Shwe TN, Han AM, Khin KK, *et al.* Myanmar dengue outbreak associated with displacement of serotypes 2, 3, and 4 by dengue 1. *Emerg Infect Dis* 2004, **10**(4): 593-597.

41. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol* 2005, **79**(2): 853-859.
42. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, *et al.* Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 1999, **73**(6): 4738-4747.
43. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998, **11**(3): 480-496.
44. Hales S, de Wet N, Maindonald J, Woodward A. Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: an empirical model. *Lancet* 2002, **360**(9336): 830-834.
45. Degallier N, (IRD) IdRpID, nicolas.degallier@locean-ipsl.upmc.fr, Favier C, Bataillon UMI-pE, Menkes C, *et al.* Toward an early warning system for dengue prevention: modeling climate impact on dengue transmission. *Climatic Change* 2013, **98**(3-4): 581-592.
46. Ooi E-E, Gubler DJ. Global spread of epidemic dengue: the influence of environmental change. <http://dxdoiorg/102217/fvl0955> 2009.
47. Halstead SB. Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol* 2008, **53**: 273-291.
48. Banu S, Hu W, Hurst C, Tong S. Dengue transmission in the Asia-Pacific region: impact of climate change and socio-environmental factors. *Trop Med Int Health* 2011, **16**(5): 598-607.
49. Wilder-Smith A, Gubler DJ. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *Med Clin North Am* 2008, **92**(6): 1377-1390, x.
50. Johansson MA, Dominici F, Glass GE. Local and global effects of climate on dengue transmission in Puerto Rico. *PLoS Negl Trop Dis* 2009, **3**(2): e382.

51. Li CF, Lim TW, Han LL, Fang R. Rainfall, abundance of *Aedes aegypti* and dengue infection in Selangor, Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1985, **16**(4): 560-568.
52. Hurtado-Diaz M, Riojas-Rodriguez H, Rothenberg SJ, Gomez-Dantes H, Cifuentes E. Short communication: impact of climate variability on the incidence of dengue in Mexico. *Trop Med Int Health* 2007, **12**(11): 1327-1337.
53. Eamchan P, Nisalak A, Foy HM, Chareonsook OA. Epidemiology and control of dengue virus infections in Thai villages in 1987. *Am J Trop Med Hyg* 1989, **41**(1): 95-101.
54. Aiken SR, Frost DB, Leigh CH. Dengue hemorrhagic fever rainfall in Penninsular Malaysia: some suggested relationships. *Soc Sci Med Med Geogr* 1980, **14d**(3): 307-316.
55. Wiwanitkit V. An observation on correlation between rainfall and the prevalence of clinical cases of dengue in Thailand. *J Vector Borne Dis* 2006, **43**(2): 73-76.
56. Delatte H, Gimonneau G, Triboire A, Fontenille D. Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. *J Med Entomol* 2009, **46**(1): 33-41.
57. Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitmire RE, Nisalak A. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *Am J Trop Med Hyg* 1987, **36**(1): 143-152.
58. Chowell G, Cazelles B, Broutin H, Munayco CV. The influence of geographic and climate factors on the timing of dengue epidemics in Peru, 1994-2008. *BMC Infect Dis* 2011, **11**: 164.
59. Linthicum KJ, Anyamba A, Tucker CJ, Kelley PW, Myers MF, Peters CJ. Climate and satellite indicators to forecast Rift Valley fever epidemics in Kenya. *Science* 1999, **285**(5426): 397-400.

60. Cox J, Grillet ME, Ramos OM, Amador M, Barrera R. Habitat segregation of dengue vectors along an urban environmental gradient. *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76**(5): 820-826.
61. Reiskind MH, Lounibos LP. Effects of intraspecific larval competition on adult longevity in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol* 2009, **23**(1): 62-68.
62. Fuller DO, Troyo A, Beier JC. El Nino Southern Oscillation and vegetation dynamics as predictors of dengue fever cases in Costa Rica. *Environ Res Lett* 2009, **4**: 140111-140118.
63. Bisset Lazcano JA, Marquetti Mdel C, Portillo R, Rodriguez MM, Suarez S, Leyva M. [Ecological factors linked to the presence of *Aedes aegypti* larvae in highly infested areas of Playa, a municipality belonging to Ciudad de La Habana, Cuba]. *Rev Panam Salud Publica* 2006, **19**(6): 379-384.
64. Lifson AR. Mosquitoes, models, and dengue. *Lancet* 1996, **347**(9010): 1201-1202.
65. Esler D. Dengue - Clinical and public health ramifications. *Aust Fam Physician* 2009, **38**(11): 876-879.
66. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* 2007, **5**(7): 518-528.
67. Chan M, Johansson MA. The incubation periods of Dengue viruses. *PLoS One* 2012, **7**(11): e50972.
68. Thongrunkiat S, Maneekan P, Wasinpiyamongkol L, Prummongkol S. Prospective field study of transovarial dengue-virus transmission by two different forms of *Aedes aegypti* in an urban area of Bangkok, Thailand. *J Vector Ecol* 2011, **36**(1): 147-152.
69. Thavara U, Tawatsin A, Chansang C, Kong-ngamsuk W, Paosriwong S, Boon-Long J, *et al.* Larval occurrence, oviposition behavior and biting activity of potential mosquito vectors of dengue on Samui Island, Thailand. *J Vector Ecol* 2001, **26**(2): 172-180.

70. Azevedo LS, Carvalho DB, Matuck T, Alvarenga MF, Morgado L, Magalhaes I, *et al.* Dengue in renal transplant patients: a retrospective analysis. *Transplantation* 2007, **84**(6): 792-794.
71. Chen LH, Wilson ME. Transmission of dengue virus without a mosquito vector: nosocomial mucocutaneous transmission and other routes of transmission. *Clin Infect Dis* 2004, **39**(6): e56-60.
72. Teo D, Ng LC, Lam S. Is dengue a threat to the blood supply? *Transfus Med* 2009, **19**(2): 66-77.
73. de Wazieres B, Gil H, Vuitton DA, Dupond JL. Nosocomial transmission of dengue from a needlestick injury. *Lancet*, vol. 351: England, 1998, p 498.
74. Apisarnthanarak A, Mundy LM. Is dengue virus infection an occupational health problem? *Clin Infect Dis* 2009, **48**(1): 135-137.
75. Bandyopadhyay S, Lum LC, Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Trop Med Int Health* 2006, **11**(8): 1238-1255.
76. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v, Wills B. Dengue. *N Engl J Med* 2012, **366**(15): 1423-1432.
77. Wichmann O, Hongsiriwon S, Bowonwatanuwong C, Chotivanich K, Sukthana Y, Pukrittayakamee S. Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand. *Trop Med Int Health* 2004, **9**(9): 1022-1029.
78. Peeling RW, Artsob H, Pelegriano JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, *et al.* Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol* 2010, **8**(12 Suppl): S30-38.
79. Singh KRP. Multiplication of arboviruses in cell lines from *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Curr Sci* 1968, **37**: 65-67.

80. Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis* 2004, **8**(2): 69-80.
81. Kao CL, Wu MC, Chiu YH, Lin JL, Wu YC, Yueh YY, *et al.* Flow cytometry compared with indirect immunofluorescence for rapid detection of dengue virus type 1 after amplification in tissue culture. *J Clin Microbiol* 2001, **39**(10): 3672-3677.
82. Henchal EA, McCown JM, Seguin MC, Gentry MK, Brandt WE. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am J Trop Med Hyg* 1983, **32**(1): 164-169.
83. Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez R, Rosario D, Vazquez S, Vald s L, *et al.* Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis* 1999, **3**(3): 130-135.
84. Rosen L, Drouet MT, Deubel V. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am J Trop Med Hyg* 1999, **61**(5): 720-724.
85. Cardoso MJ, Wang SM, Sum MS, Tio PH. Antibodies against prM protein distinguish between previous infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. *BMC Microbiol* 2002, **2**: 9.
86. Wong SJ, Boyle RH, Demarest VL, Woodmansee AN, Kramer LD, Li H, *et al.* Immunoassay targeting nonstructural protein 5 to differentiate West Nile virus infection from dengue and St. Louis encephalitis virus infections and from flavivirus vaccination. *J Clin Microbiol* 2003, **41**(9): 4217-4223.
87. Morita K, Tanaka M, Igarashi A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991, **29**(10): 2107-2110.
88. Seah CL, Chow VT, Chan YC. Semi-nested PCR using NS3 primers for the detection and typing of dengue viruses in clinical serum specimens. *Clin Diagn Virol* 1995, **4**(2): 113-120.

89. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992, **30**(3): 545-551.
90. Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, *et al.* Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1998, **36**(9): 2634-2639.
91. Raengsakulrach B, Nisalak A, Maneekarn N, Yenchitsomanus PT, Limsomwong C, Jairungsri A, *et al.* Comparison of four reverse transcription-polymerase chain reaction procedures for the detection of dengue virus in clinical specimens. *J Virol Methods* 2002, **105**(2): 219-232.
92. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol* 2005, **43**(10): 4977-4983.
93. Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol* 2006, **44**(4): 1295-1304.
94. Kong YY, Thay CH, Tin TC, Devi S. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *J Virol Methods* 2006, **138**(1-2): 123-130.
95. Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, Medina JF, *et al.* Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis* 2013, **7**(7): e2311.
96. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, *et al.* Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000, **181**(1): 2-9.

97. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol* 2000, **38**(3): 1053-1057.
98. Tricou V, Minh NN, Farrar J, Tran HT, Simmons CP. Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS Negl Trop Dis* 2011, **5**(9): e1309.
99. Chaterji S, Allen JC, Jr., Chow A, Leo YS, Ooi EE. Evaluation of the NS1 rapid test and the WHO dengue classification schemes for use as bedside diagnosis of acute dengue fever in adults. *Am J Trop Med Hyg* 2011, **84**(2): 224-228.
100. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Ty Hang VT, Sekaran SD, Kroeger A, *et al.* Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2010, **4**(8).
101. Wills BA, Nguyen MD, Ha TL, Dong TH, Tran TN, Le TT, *et al.* Comparison of three fluid solutions for resuscitation in dengue shock syndrome. *N Engl J Med* 2005, **353**(9): 877-889.
102. Lim SP, Wang QY, Noble CG, Chen YL, Dong H, Zou B, *et al.* Ten years of dengue drug discovery: Progress and prospects. *Antiviral Res* 2013.
103. Poh MK, Yip A, Zhang S, Priestle JP, Ma NL, Smit JM, *et al.* A small molecule fusion inhibitor of dengue virus. *Antiviral Res* 2009, **84**(3): 260-266.
104. Wang QY, Patel SJ, Vangrevelinghe E, Xu HY, Rao R, Jaber D, *et al.* A small-molecule dengue virus entry inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**(5): 1823-1831.
105. Schmidt AG, Lee K, Yang PL, Harrison SC. Small-molecule inhibitors of dengue-virus entry. *PLoS Pathog* 2012, **8**(4): e1002627.
106. Kaptein SJ, De Burghgraeve T, Froeyen M, Pastorino B, Alen MM, Mondotte JA, *et al.* A derivate of the antibiotic doxorubicin is a selective

inhibitor of dengue and yellow fever virus replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**(12): 5269-5280.

107. Byrd CM, Dai D, Grosenbach DW, Berhanu A, Jones KF, Cardwell KB, *et al.* A novel inhibitor of dengue virus replication that targets the capsid protein. *Antimicrob Agents Chemother* 2013, **57**(1): 15-25.
108. Yin Z, Chen YL, Schul W, Wang QY, Gu F, Duraiswamy J, *et al.* An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(48): 20435-20439.
109. Rathore AP, Paradkar PN, Watanabe S, Tan KH, Sung C, Connolly JE, *et al.* Celgosivir treatment misfolds dengue virus NS1 protein, induces cellular pro-survival genes and protects against lethal challenge mouse model. *Antiviral Res* 2011, **92**(3): 453-460.
110. Schul W, Liu W, Xu HY, Flamand M, Vasudevan SG. A dengue fever viremia model in mice shows reduction in viral replication and suppression of the inflammatory response after treatment with antiviral drugs. *J Infect Dis* 2007, **195**(5): 665-674.
111. Whitby K, Pierson TC, Geiss B, Lane K, Engle M, Zhou Y, *et al.* Castanospermine, a potent inhibitor of dengue virus infection in vitro and in vivo. *J Virol* 2005, **79**(14): 8698-8706.
112. Rodriguez MM, Bisset JA, Fernandez D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. *J Am Mosq Control Assoc* 2007, **23**(4): 420-429.
113. Nam VS, Yen NT, Holynska M, Reid JW, Kay BH. National progress in dengue vector control in Vietnam: survey for *Mesocyclops* (Copepoda), *Micronecta* (Corixidae), and fish as biological control agents. *Am J Trop Med Hyg* 2000, **62**(1): 5-10.
114. Kay BH, Nam VS, Tien TV, Yen NT, Phong TV, Diep VT, *et al.* Control of aedes vectors of dengue in three provinces of Vietnam by use of *Mesocyclops* (Copepoda) and community-based methods validated by entomologic, clinical, and serological surveillance. *Am J Trop Med Hyg* 2002, **66**(1): 40-48.

115. McArthur MA, Sztein MB, Edelman R. Dengue vaccines: recent developments, ongoing challenges and current candidates. *Expert Rev Vaccines* 2013, **12**(8): 933-953.
116. Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, *et al.* Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet* 2012, **380**(9853): 1559-1567.
117. Guirakhoo F, Weltzin R, Chambers TJ, Zhang ZX, Soike K, Ratterree M, *et al.* Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. *J Virol* 2000, **74**(12): 5477-5485.
118. Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, *et al.* Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol* 2001, **75**(16): 7290-7304.
119. Leo YS, Wilder-Smith A, Archuleta S, Shek LP, Chong CY, Leong HN, *et al.* Immunogenicity and safety of recombinant tetravalent dengue vaccine (CYD-TDV) in individuals aged 2-45 y: Phase II randomized controlled trial in Singapore. *Hum Vaccin Immunother* 2012, **8**(9): 1259-1271.
120. Watanaveeradej V, Simasathien S, Nisalak A, Endy TP, Jarman RG, Innis BL, *et al.* Safety and immunogenicity of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus-naive infants. *Am J Trop Med Hyg* 2011, **85**(2): 341-351.
121. Simasathien S, Thomas SJ, Watanaveeradej V, Nisalak A, Barberousse C, Innis BL, *et al.* Safety and immunogenicity of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus naive children. *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78**(3): 426-433.
122. Edelman R, Wasserman SS, Bodison SA, Putnak RJ, Eckels KH, Tang D, *et al.* Phase I trial of 16 formulations of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 2003, **69**(6 Suppl): 48-60.

123. Sun W, Cunningham D, Wasserman SS, Perry J, Putnak JR, Eckels KH, *et al.* Phase 2 clinical trial of three formulations of tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus-naïve adults. *Hum Vaccin* 2009, **5**(1): 33-40.
124. Thomas SJ, Eckels KH, Carletti I, De La Barrera R, Dessy F, Fernandez S, *et al.* A phase II, randomized, safety and immunogenicity study of a re-derived, live-attenuated dengue virus vaccine in healthy adults. *Am J Trop Med Hyg* 2013, **88**(1): 73-88.
125. Osorio JE, Huang CY, Kinney RM, Stinchcomb DT. Development of DENVax: a chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. *Vaccine* 2011, **29**(42): 7251-7260.
126. Huang CY, Butrapet S, Tsuchiya KR, Bhamarapavati N, Gubler DJ, Kinney RM. Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. *J Virol* 2003, **77**(21): 11436-11447.
127. Brewoo JN, Kinney RM, Powell TD, Arguello JJ, Silengo SJ, Partidos CD, *et al.* Immunogenicity and efficacy of chimeric dengue vaccine (DENVax) formulations in interferon-deficient AG129 mice. *Vaccine* 2012, **30**(8): 1513-1520.
128. Murphy BR, Whitehead SS. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol* 2011, **29**: 587-619.
129. Blaney JE, Hanson CT, Firestone CY, Hanley KA, Murphy BR, Whitehead SS. Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. *Am J Trop Med Hyg* 2004, **71**(6): 811-821.
130. Blaney JE, Hanson CT, Hanley KA, Murphy BR, Whitehead SS. Vaccine candidates derived from a novel infectious cDNA clone of an American genotype dengue virus type 2. *BMC Infect Dis* 2004, **4**: 39.
131. Durbin AP, Kirkpatrick BD, Pierce KK, Elwood D, Larsson CJ, Lindow JC, *et al.* A single dose of any of four different live attenuated tetravalent dengue vaccines is safe and immunogenic in flavivirus-naïve adults: a randomized, double-blind clinical trial. *J Infect Dis* 2013, **207**(6): 957-965.

132. Putnak R, Barvir DA, Burrous JM, Dubois DR, D'Andrea VM, Hoke CH, *et al.* Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J Infect Dis* 1996, **174**(6): 1176-1184.
133. Clements DE, Collier BA, Lieberman MM, Ogata S, Wang G, Harada KE, *et al.* Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine* 2010, **28**(15): 2705-2715.
134. Robert Putnak J, Collier BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I, *et al.* An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine* 2005, **23**(35): 4442-4452.
135. Khanam S, Pilankatta R, Khanna N, Swaminathan S. An adenovirus type 5 (AdV5) vector encoding an envelope domain III-based tetravalent antigen elicits immune responses against all four dengue viruses in the presence of prior AdV5 immunity. *Vaccine* 2009, **27**(43): 6011-6021.
136. Raviprakash K, Wang D, Ewing D, Holman DH, Block K, Woraratanadharm J, *et al.* A tetravalent dengue vaccine based on a complex adenovirus vector provides significant protection in rhesus monkeys against all four serotypes of dengue virus. *J Virol* 2008, **82**(14): 6927-6934.
137. Danko JR, Beckett CG, Porter KR. Development of dengue DNA vaccines. *Vaccine* 2011, **29**(42): 7261-7266.
138. Lu H, Xu XF, Gao N, Fan DY, Wang J, An J. Preliminary evaluation of DNA vaccine candidates encoding dengue-2 prM/E and NS1: their immunity and protective efficacy in mice. *Mol Immunol* 2013, **54**(2): 109-114.
139. Beckett CG, Tjaden J, Burgess T, Danko JR, Tamminga C, Simmons M, *et al.* Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. *Vaccine* 2011, **29**(5): 960-968.

140. Rosen L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1977, **26**(3): 337-343.
141. Gubler DJ, Reed D, Rosen L, Hitchcock JR, Jr. Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. *Am J Trop Med Hyg* 1978, **27**(3): 581-589.
142. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990, **174**(2): 479-493.
143. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* 2003, **9**(7): 800-809.
144. Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology* 1998, **246**(2): 317-328.
145. Chen Y, Maguire T, Marks RM. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol* 1996, **70**(12): 8765-8772.
146. Sanchez IJ, Ruiz BH. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol* 1996, **77** ( Pt 10): 2541-2545.
147. Carneiro AR, Cruz AC, Vallinoto M, Melo Dde V, Ramos RT, Medeiros DB, *et al.* Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012, **107**(6): 805-812.
148. Carrillo-Valenzo E, Danis-Lozano R, Velasco-Hernandez JX, Sanchez-Burgos G, Alpuche C, Lopez I, *et al.* Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement. *Arch Virol* 2010, **155**(9): 1401-1412.
149. Perez-Ramirez G, Diaz-Badillo A, Camacho-Nuez M, Cisneros A, Munoz Mde L. Multiple recombinants in two dengue virus, serotype-2 isolates from patients from Oaxaca, Mexico. *BMC Microbiol* 2009, **9**: 260.

150. M. G-LS. Identificación y Análisis de las Variantes Genéticas del Virus del Dengue y su Asociación en la Dinámica de Transmisión. Mastro en Ciencias thesis, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, 2011.
151. Pandey BD, Morita K, Hasebe F, Parquet MC, Igarashi A. Molecular evolution, distribution and genetic relationship among the dengue 2 viruses isolated from different clinical severity. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000, **31**(2): 266-272.
152. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011, **28**(10): 2731-2739.
153. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 2004, **14**(6): 1188-1190.
154. Nielsen M, Lundegaard C, Lund O, Petersen TN. CPHmodels-3.0--remote homology modeling using structure-guided sequence profiles. *Nucleic Acids Res* 2010, **38**(Web Server issue): W576-581.
155. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997, **18**(15): 2714-2723.
156. Parameswaran P, Charlebois P, Tellez Y, Nunez A, Ryan EM, Malboeuf CM, *et al.* Genome-wide patterns of intrahuman dengue virus diversity reveal associations with viral phylogenetic clade and interhost diversity. *J Virol* 2012, **86**(16): 8546-8558.