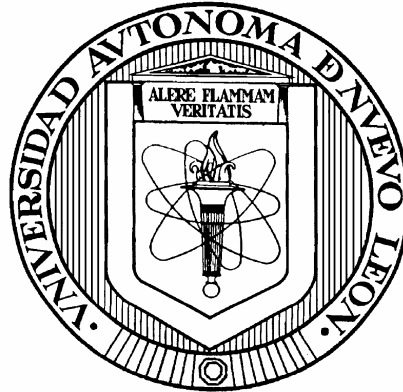


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**“EVALUACIÓN DEL IMPACTO DEL SILENCIAMIENTO DE LOS GENES APC  
Y HSP90 DE CÉLULAS HUMANAS EN LOS NIVELES DE INFECCIÓN DE  
LOS SEROTIPOS 1 Y 2 DEL DENV”**

**PRESENTA: Q.F.B. DANIEL ARELLANOS SOTO**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con especialidad en  
Biología Molecular e  
Ingeniería Genética.**

**ASESOR: DRA. ANA MARÍA RIVAS ESTILLA**

**MONTERREY, N.L.**

**ENERO DEL 2011**

**"EVALUACIÓN DEL IMPACTO DEL SILENCIAMIENTO DE LOS GENES APC Y  
HSP90 DE CÉLULAS HUMANAS EN LOS NIVELES DE INFECCIÓN  
DE LOS SEROTIPOS 1 Y 2 DEL DENV"**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DRA. ANA MARÍA GUADALUPE RIVAS ESTILLA**  
Director de Tesis



---

**DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**  
Co-Director de Tesis



---

**DR. ILDEFONSO FERNÁNDEZ SALAS**  
Co-Director de Tesis

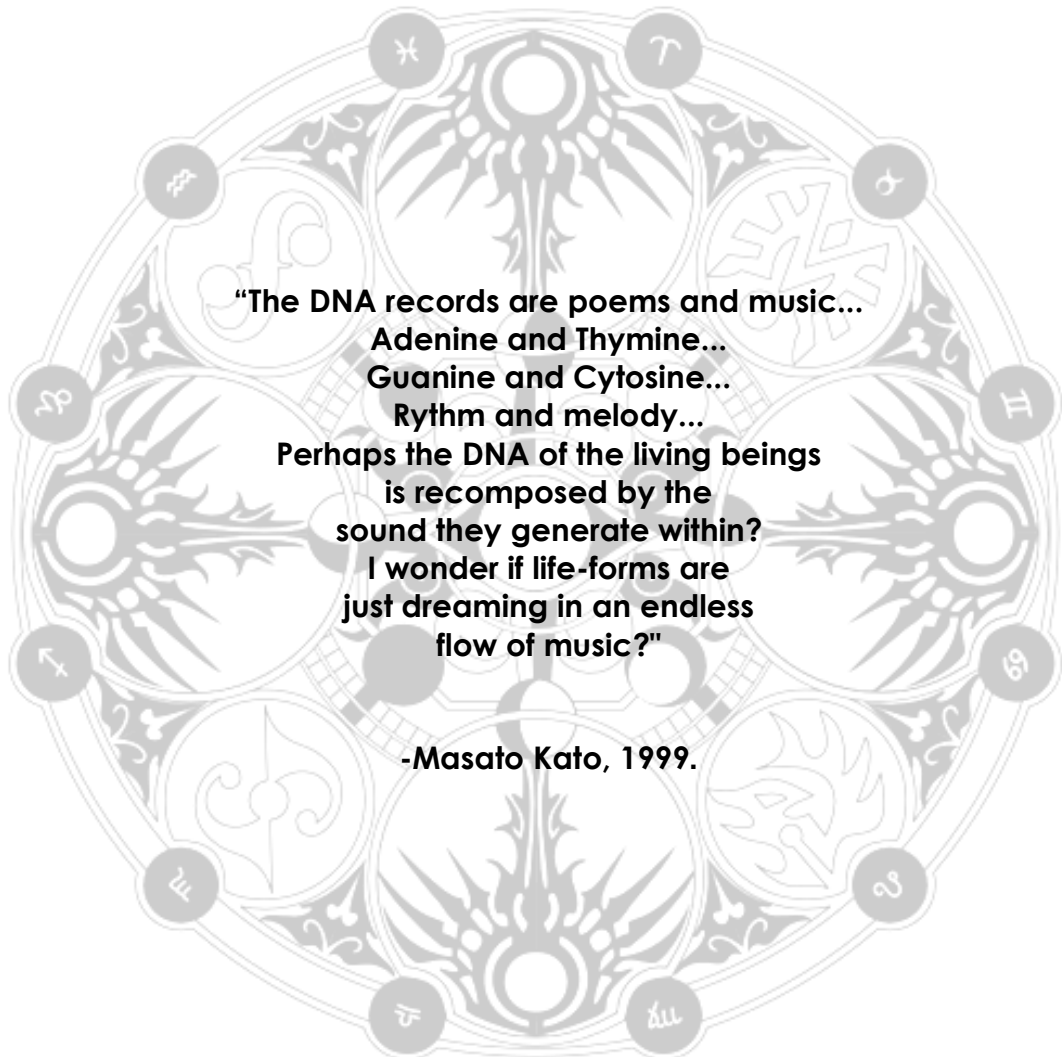


---

**DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

Este trabajo se realizó 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, bajo la asesoría de la Dra. Ana María Guadalupe Rivas Estilla; así como en el Laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales 'Dr. Hideyo Noguchi' de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.  
Monterrey, Nuevo León, 2011.



**"The DNA records are poems and music...**

**Adenine and Thymine...**

**Guanine and Cytosine...**

**Rythm and melody...**

**Perhaps the DNA of the living beings**

**is recomposed by the**

**sound they generate within?**

**I wonder if life-forms are**

**just dreaming in an endless**

**flow of music?"**

**-Masato Kato, 1999.**

## DEDICATORIAS

A mis padres, por su apoyo incondicional durante toda mi vida en todos los aspectos posibles e imposibles. Sin importar el campo en el que me desempeñe, el espacio donde me encuentre y el tiempo que me tome alcanzar la meta. Saben que lo son todo para mí.

A mi hermana Paulina y a Pix que también saben como luchar para encontrar su camino en esta vida.

A mi abuela Paula y mi tonelada de tíos y primos que aún estando lejos son parte fundamental de mi estabilidad emocional, con sus correos electrónicos, mensajes y llamadas.

A mis tíos Luis y Patty, que se han convertido en parte fundamental de este proyecto de vida, tanto académica como de desarrollo personal. Muchas gracias por absolutamente todo lo que me han apoyado a superar y entender durante esta aventura llamada maestría.

A la memoria de mis abuelos Dina y Ambrosio. Este es otro logro alcanzado bajo su vigilancia continua y sus bendiciones. Les agradezco el cuidarme y guiarme todo el tiempo.

A mis amigos Ale, Mel, Mau, Homer, Mandy, Beto, Marcel, Nalle, Yessa, Marisol, Cinthya, Lety y Ben. La distancia entre ustedes y yo ha sido el precio a pagar por poder convertir este deseo en realidad y seguir caminando hacia adelante. Les extraño mucho.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme seguir creciendo en el campo académico y personal con todas las oportunidades que ha puesto en mi camino.

A mis padres por su amor y apoyo constante. No puedo negar que me resultó muy difícil tomar la decisión de estudiar fuera, pero les agradezco mucho el haber hecho todo tan entendible y fácil, además de siempre estar acompañado por ustedes. Este viaje jamás hubiera sido posible sin su ayuda.

A mi familia regia: Luis, Patty, Luisillo y Ger, por permitirme tener un rol bajo su techo y convertirme en su hijo adoptivo. Los quiero mucho y agradezco infinitamente todo lo que han hecho por mí todo el tiempo.

A la gente especial que me ha permitido compartir sus días y hacerme sonreír y sentirme querido: Marsela Garza, Martha Cavazos, Gaby Rubio, Raúl Favela, Alan Márquez, Ángel Merino, Sonia Lozano, Mario Simental, Adriana Sánchez, Ivette Aldama, Eder Arredondo, Ulises Gloria, Laura Guerra, Tania Coral, Manuel González, Pau Delgado, Claudia Murga, Julián Zaragoza, Chuy Martínez, Cynthia Chávez, Sam Patena, Paola Rivera, Ernesto Hernández y Adriana Saucedo. Muchas gracias mis amigos por haber hecho que estos dos años y medio valieran más la pena. Se les quiere mucho y bien.

A mis queridas hermanas galletas: Ana V. Villarreal y Elda Melchor. Por todo lo que hemos pasado, incluso por el café del 7-11 con sabor a gato. ¡Muchos 'Barney si' para el futuro!

Al staff completo del laboratorio de Infectología Molecular, especialmente a la Dra. Clara Ríos, por su paciencia y consejos, así como por el adiestramiento flash y por haber aguantado mi cabeza dura durante este año de estancia.

A mis compañeras de línea de investigación: Selene García y Desiree Leduc, porque este trabajo también les pertenece a ellas por sus consejos y colaboraciones.

A mi amiga Cinthya López, por su invaluable apoyo y guía en Mérida y sus alrededores. Mi querida Cinthya, muchísimas gracias por todo.

A la familia del laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales 'Dr. Hideyo Noguchi': Dra. María Alba,

Dr. Julián, Pili, Lula y Rosy por su excelente trato y por permitirme compartir unos días con ustedes. Especialmente agradezco a usted Pili por toda su paciencia y buena disposición para enseñarme y transmitirme experiencia y buen humor. Por los ratitos divertidos en el cuarto de cultivo, por todos esos tubos de C6/36 sembrados y porque usted se convirtió en una pieza fundamental en este trabajo. Muchísimas gracias.

Juany, Normita, Lupita y Ari por toda su ayuda y colaboración así como por las sonrisas diarias, fundamentales para este trabajo. Muchas gracias, son inigualables.

A mis profesores del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular: Dr. Hugo Barrera, Dr. Jorge Ascacio, Dr. Augusto Rojas, Dra. Rocío Ortiz, Dr. Gerardo Padilla y Dr. Francisco Velázquez, por haber logrado que en la cabeza de un químico orgánico con corazón de bioquímico creciera el amor por la biología molecular.

Dr. Ildefonso Fernández, por permitirme introducir la nariz en el campo de la entomología médica y mostrarme un panorama que nunca habría pasado por mi cabeza. Gracias por las palabras de aliento y su colaboración en este trabajo.

Dra. Herminia Martínez: Por sus enseñanzas, su apoyo constante, sus consejos y su sabiduría, así como por la confianza depositada en mí. Muchas gracias, es un orgullo ser su alumno.

Dra. Ana María Rivas. Le agradezco permitirme compartir el trabajo y los triunfos del laboratorio de Infectología Molecular, así como toda la confianza depositada en un servidor para colaborar y formar parte de un grandioso equipo de trabajo. Por todas sus sabias palabras y por absolutamente todo lo que ha puesto en juego creyendo en mí para cristalizar un sueño. Esto es sólo el comienzo de un viaje fantástico largo y productivo. Mis respetos y estima totales.

## COLABORACIONES

Dr. José Arturo Farfán Ale  
Dra. María Alba Loroño Pino  
Q.F.B. Elsy del Pilar Rosado Paredes  
Laboratorio de Arbovirología  
Centro de Investigaciones Regionales  
'Dr. Hideyo Noguchi', U.A.D.Y.

Dr. Ernesto Torres López  
Unidad de Laboratorios de Virología,  
Inmunoterapia y Biotecnología.  
C.I.D.C.S. U.A.N.L.

Q.F.B. Isabel Tabithas  
Laboratorio Estatal de Salud,  
Secretaría de Salud del  
Estado de Nuevo León.

Dr. Ildelfonso Fernández Salas  
Laboratorio de Entomología Médica  
Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

# ÍNDICE

## ABREVIATURAS. FÓRMULAS Y SÍMBOLOS

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE TABLAS

## RESUMEN

<b>Capítulo I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Epidemiología.....	1
1.2. Agente etiológico.....	7
1.3. Mecanismos de transmisión.....	12
1.4. Historia clínica de la enfermedad.....	15
1.5. Diagnóstico diferencial.....	19
1.6. Tratamiento.....	23
1.7. Investigación de potenciales blancos terapéuticos.....	26
<b>Capítulo II. ANTECEDENTES</b> .....	28
2.1. Antecedentes directos.....	28
2.2. Estudio de factores celulares involucrados en la replicación del virus del dengue..	31
2.2.1. Adenomatosis Poliposis Coli (APC).....	31
2.2.2. Proteína de Choque Térmico de 90 KDa (HSP90).....	34
<b>Capítulo III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	37
<b>Capítulo IV. OBJETIVOS</b> .....	38
4.1. Objetivo general.....	38
4.2. Objetivos específicos.....	38
<b>CAPÍTULO V. MATERIALES</b> .....	39
5.1. Reactivos.....	39
5.1.1. Reactivos de uso general.....	39
5.1.2. Cultivo celular.....	39
5.1.3. Recuento celular.....	40
5.1.4. Infección viral de cultivos infectados.....	40
5.1.5. Extracción de RNA total.....	40
5.1.6. Retrotranscripción (RT).....	41
5.1.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	41
5.1.8. PCR cuantitativa.....	41
5.1.9. Interferencia con RNA.....	42
5.2. Materiales.....	42
5.2.1. Material de uso general.....	42
5.2.2. Cultivo celular.....	42
5.2.3. Congelación de células.....	43
5.2.4. Infección viral de cultivos infectados.....	43
5.2.5. Extracción de RNA total.....	43
5.2.6. Técnicas moleculares (RT, PCR, qPCR).....	44
5.2.7. Interferencia con RNA.....	44
5.3. Equipo.....	44
5.3.1. Equipo de uso general.....	44
5.3.2. Cultivo celular.....	45
5.3.3. Infección viral de cultivos infectados.....	45
5.3.4. Técnicas moleculares (RT, PCR, qPCR).....	45

5.3.5. Interferencia con RNA.....	45
5.4. Hardware y software.....	46
5.5. Material biológico.....	47
5.5.1. Líneas celulares.....	47
5.5.2. Virus.....	49
<b>Capítulo VI. MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
6.1. Cultivo de células C6/36.....	50
6.2. Cultivo de células Huh-7.....	51
6.3. Infección de cultivos celulares con virus del dengue.....	51
6.4. Generación del banco de aislados virales.....	52
6.5. Extracción de RNA total.....	52
6.6. Retrotranscripción (RT-MMLV).....	54
6.7. Serotipificación de dengue con el protocolo de Lanciotti.....	55
6.8. PCR punto final para APC y HSP90.....	57
6.9. Experimentos de silenciamiento génico.....	59
6.10. Evaluación del silenciamiento génico por PCR en tiempo real.....	60
6.11. Experimentos de infección viral en cultivos de Huh-7 silenciados.....	62
<b>Capítulo VII. RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
7.1. Cultivo de células C6/36 y amplificaciones virales iniciales.....	65
7.2. Amplificación de los virus prototipo en células C6/36.....	66
7.3. Validación de la infección viral por métodos moleculares.....	79
7.4. Infección de células Huh-7 con virus del dengue.....	70
7.5. Definición de la dosis viral infecciosa.....	72
7.6. Experimentos de silenciamiento génico.....	74
7.7. Experimentos de infección viral en cultivos silenciados.....	76
7.7.1. Silenciamiento de APC.....	76
7.7.2. Silenciamiento de HSP90.....	79
<b>Capítulo VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>80</b>
<b>Capítulo IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>85</b>
<b>Capítulo X. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>86</b>
<b>Capítulo XI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>87</b>
<b>Capítulo XII. ANEXOS.....</b>	<b>94</b>

## ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y SÍMBOLOS

aa	Aminoácidos
APC	Adenomatosis Poliposis Coli
ATP	Agua
°C	Grados centígrados
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético.
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Da	Daltones
DEPC	Dietilpirocarbonato
DENV-1	Dengue serotipo 1
DENV-2	Dengue serotipo 2
DENV-3	Dengue serotipo 3
DENV-4	Dengue serotipo 4
DENVV	Virus del dengue
DH	Dengue hemorrágico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FD	Fiebre de dengue
g	Gramos
HI	Inhibición de la hemaglutinación
HSP90	Proteína de Choque Térmico de 90 KDa
IF	Inmunofluorescencia
IgG	Inmunoglobulina de isotipo G
IgM	Inmunoglobulina de isotipo M
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
M	Molar
μM	Micromolaridad
mM	Milimolaridad
MWM	Marcador de peso molecular
ng	Nanogramos
nM	Nanomolaridad
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
qPCR	PCR cuantitativa
RNA	Acido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
s	segundos
SSA	Secretaría de Salud
SSD	Síndrome de choque por dengue
Taq	Thermophilus aquaticus
TE	Buffer Tris-EDTA
TCID	Dosis infecciosa para cultivo tisular
UV	Ultravioleta
V	Volts
SDS	Dodecil sulfato de sodio

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	Distribución mundial del dengue.	2
<b>2</b>	Estadística comparativa de los casos reportados de dengue a nivel mundial en el periodo comprendido entre los años 1955 – 2007.	3
<b>3</b>	Incidencia y serotipos de los casos confirmados por la SSA en México hasta la semana 50 del año 2010.	6
<b>4</b>	Micrografía electrónica y estructura de la partícula viral del dengue.	8
<b>5</b>	Estructura del genoma viral del dengue y sus productos proteicos.	9
<b>6</b>	Ciclo de replicación del virus del dengue.	10
<b>7</b>	Distribución geográfica de los distintos genotipos del virus del dengue.	12
<b>8</b>	Dinámica de transmisión del dengue.	13
<b>9</b>	Manifestaciones clínicas del dengue.	15
<b>10</b>	Historia clínica del dengue reportada por la OMS.	18
<b>11</b>	Esquema comparativo de los diferentes métodos de diagnóstico del dengue	19
<b>12</b>	Vía de señalización Wnt	32
<b>13</b>	Western Blot para identificación de HSP70/90 en células U937 infectadas con dengue.	35
<b>14</b>	Micrografía de una monocapa de células C6/36, 40X.	47
<b>15</b>	Micrografía de una monocapa de célula Huh-7, 40X	48
<b>16</b>	Estrategia general de trabajo.	50
<b>17</b>	Esquema de trabajo para la realización de la transfección reversa.	60
<b>18</b>	Esquema general de los experimentos de silenciamiento génico e infección viral.	63
<b>19</b>	Diseño general del experimento de silenciamiento génico e infección viral.	64
<b>20</b>	Inmunofluorescencia de cultivos de C6/36 infectados con dengue	66
<b>21</b>	Cultivos de células C6/36 infectadas con los aislados virales de la primera cosecha.	67
<b>22</b>	Cultivos virales de dengue 1 y 2 en células C6/36 incubados durante 15 días.	68
<b>23</b>	Serotipificación de los aislados virales empleando el método de Lanciotti.	70
<b>24</b>	Infección de células Huh-7 con dengue 1 (40X)	71
<b>25</b>	Infección de células Huh-7 con dengue 2 (40X)	71
<b>26</b>	Resultados del qPCR del silenciamiento de APC.	74
<b>27</b>	Resultados del qPCR del silenciamiento de HSP90.	75
<b>28</b>	Cultivos de células Huh-7 con APC silenciado e infectados con virus del dengue 1 o 2.	77
<b>29</b>	Cultivos de células Huh-7 con HSP90 silenciado e infectados con virus del dengue 1 o 2.	78

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	Casos confirmados de fiebre de dengue y fiebre hemorrágica por dengue hasta la semana 50 del año 2010. Secretaría de Salud, México.	4
<b>2</b>	Comparación de las técnicas para diagnóstico del dengue más usadas.	5
<b>3</b>	Casos confirmados de dengue por la SSA hasta la semana 50 del año 2010.	6
<b>4</b>	Comparación de las técnicas más usadas para diagnóstico diferencial del dengue.	23
<b>5</b>	Tratamiento recomendado por la SSA para el paciente con dengue.	25
<b>6</b>	Condiciones de reacción para la retrotranscripción. Primera mezcla.	54
<b>7</b>	Condiciones de reacción para la retrotranscripción. Segunda mezcla.	54
<b>8</b>	Programa de reacción de retrotranscripción.	55
<b>9</b>	Secuencias de los primers empleados para la PCR de Lanciotti.	55
<b>10</b>	Condiciones de reacción para la serotipificación de dengue 1 y 2.	56
<b>11</b>	Programa del termociclador para la serotipificación de dengue 1 y 2.	57
<b>12</b>	Secuencia de los primers diseñados para APC y HSP90.	57
<b>13</b>	Condiciones de reacción para la PCR de APC y HSP90.	58
<b>14</b>	Programa del termociclador para la amplificación de APC y HSP90.	58
<b>15</b>	Condiciones de reacción para qPCR de APC y HSP90 con SYBR Green.	61
<b>16</b>	Programa estándar para qPCR.	61
<b>17</b>	Condiciones de reacción para la qPCR de GAPDH empleando sondas TaqMan	61

## RESUMEN

### “EVALUACIÓN DEL IMPACTO DEL SILENCIAMIENTO DE LOS GENES APC Y HSP90 DE CÉLULAS HUMANAS EN LOS NIVELES DE INFECCIÓN DE LOS SEROTIPOS 1 Y 2 DEL DENV”

**Nombre:** Q.F.B. Daniel Arellanos Soto

**Institución:** Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

**Localización:** Monterrey, Nuevo León.

**Fecha de titulación:** Enero 2011

**Páginas en el Estudio:** 139

**Introducción:** La fiebre del dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos a humanos más frecuente del mundo, con cerca de la mitad de la población mundial en riesgo de la infección. El alto predominio, la carencia de una vacuna eficaz, y la ausencia de tratamiento específico sitúan a esta enfermedad como un serio problema y amenaza a nivel mundial. Hasta el momento no existen vacunas para prevenir la infección ni drogas específicas para controlar la replicación viral. En los últimos años, el conocimiento parcial del ciclo de multiplicación del virus en la célula huésped y de las características estructurales y funcionales de las proteínas virales ha impulsado el estudio de diversos blancos potenciales para la acción antiviral, ya sea a través del diseño racional de inhibidores o mediante el ensayo empírico de compuestos de síntesis y productos naturales. Es importante considerar que el DENV, al igual que otros virus tiene sólo 10 genes propios y debe dirigir y utilizar proteínas producidas por el organismo que infecta para completar su ciclo vital. Desde esta perspectiva en otro intento por generar información para controlar la enfermedad, recientemente dos grupos de investigación estadounidenses dirigidos por el Dr. Stephen Elledge y Dr. García-Blanco, realizaron un tamizaje genético masivo para identificar moléculas del huésped que son necesarias para que el DENV se replique. Los investigadores identificaron alrededor de 82 familias proteicas involucradas en la replicación del DENV. A la fecha la función específica de estas proteínas en la modulación de la replicación viral no se conoce, mucho menos los mecanismos y las vías de señalización implicados en dicha regulación. Este hallazgo abre numerosas perspectivas y oportunidades en la búsqueda de nuevos blancos antivirales.

**Objetivo:** Evaluar el impacto de los genes APC y HSP90 en la infección con DENV serotipos 1 y 2.

**Materiales y Métodos:** Se amplificaron DENV aislados a partir de sueros de pacientes virémicos, se amplificaron en células C6/36 y la infección se evaluó por registro de cambios morfológicos y por PCR. Los aislados virales obtenidos se emplearon para infectar células Huh-7 bajo diferentes dosis infecciosas (TCID). Utilizando RNAs de interferencia se silenciaron los genes APC y HSP90 para después infectar cultivos de células Huh-7 silenciadas y evaluar el impacto de la presencia de estos genes en la infección viral.

**Resultados:** APC parece estar involucrado en el proceso de infección viral, que que los cultivos infectados con DENV 1-2 mostraron un daño menor en comparación con los cultivos con la expresión normal del gen. Los cultivos infectados y con APC silenciado no presentaron tanto efecto citopático como los cultivos con los genes expresándose. El gen HSP90 previamente se había identificado como una molécula que media el proceso de entrada de la partícula viral, formando parte del receptor viral. Los cultivos donde HSP90 se silenció no presentan tanto efecto citopático como aquellos donde el gen se encuentra presente.

**Conclusiones:** APC y HSP90 parecen estar involucrados en el proceso de replicación del DENV 1-2. El silenciamiento de APC parece disminuir la lisis de las células infectadas, mientras que la reducción de la expresión de HSP90 parece ocasionar cultivos celulares con menos daño efecto citopático post-infección y sin lisis. Sin embargo se requieren mayores estudios para elucidar el papel de cada uno de estos genes en el ciclo de replicación viral.

---

Dra. Ana María Gpe. Rivas Estilla.  
Firma del Asesor



## Capítulo I

### INTRODUCCIÓN

El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos a humanos más frecuente del mundo, con cerca de la mitad de la población mundial en riesgo de infectarse en algún momento de su vida.<sup>1</sup> Sus manifestaciones clínicas varían en severidad desde un síndrome febril autolimitado conocido como **fiebre de dengue** o **dengue clásico**, hasta una fiebre hemorrágica o **dengue hemorrágico**.<sup>2</sup> La complicación más grave, el **síndrome de choque por dengue** es potencialmente fatal.<sup>2</sup> El alto predominio de la enfermedad, la carencia de una vacuna eficaz y la ausencia de un tratamiento antiviral específico sitúan a este padecimiento como un serio problema reemergente a nivel mundial.<sup>3</sup>

El agente etiológico de la enfermedad es el virus del dengue, miembro del género *Flaviviridae* y de la familia *Flavivirus*.<sup>3</sup> Se han descrito cuatro tipos de virus del dengue altamente relacionados entre sí (serotipos), con la capacidad de causar el mismo cuadro patológico al infectar al hospedero humano.<sup>2</sup>

#### 1.1. EPIDEMIOLOGÍA

Los reportes más antiguos de una enfermedad similar al dengue provienen de China (265-420 D.C.).<sup>4,5</sup> El primer brote epidémico reportado ocurrió entre 1799 y 1780 simultáneamente en Egipto, Indonesia, India y Estados Unidos.<sup>4</sup> Los orígenes del término “dengue” no son muy claros. El término parece haber surgido a partir de la frase Swahili ‘*Ki-dinga pepo*’ que define a la enfermedad como una plaga



ocasionada por un espíritu maligno.<sup>5</sup> La primera descripción del cuadro sintomático fue realizada por el Benjamín Rush en 1780 después de comparar pacientes en Filadelfia durante la epidemia en Estados Unidos.<sup>6</sup> En ese momento el término popular empleado para nombrar a la enfermedad era ‘Fiebre quebrantahuesos’ debido al cuadro sintomático que se presenta.<sup>7</sup>

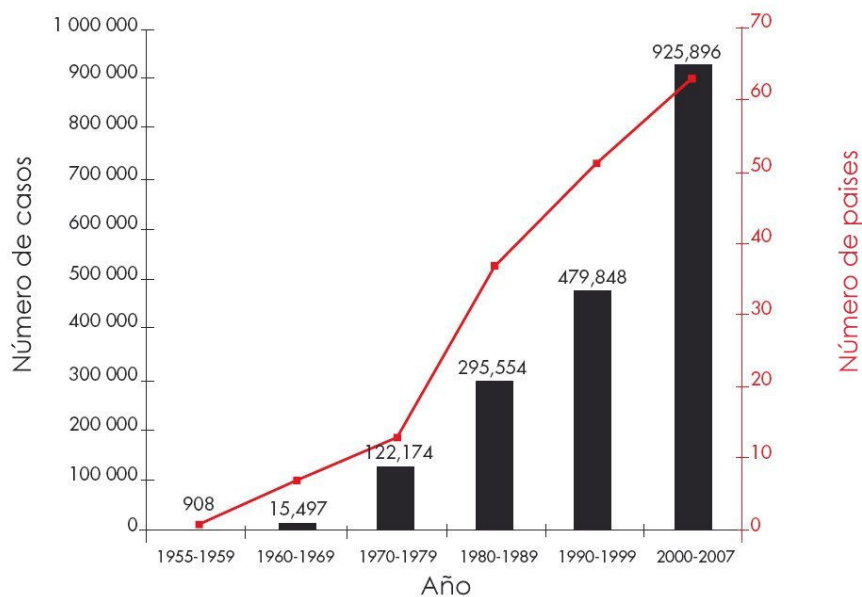
El dengue es la enfermedad transmitida por vector que se ha diseminado en mayor medida a nivel mundial durante los últimos 50 años y la causante de la fiebre hemorrágica con mayor incidencia.<sup>1</sup> Las razones para esto incluyen una elevación en la frecuencia de brotes epidémicos y la cambiante distribución del virus y el vector. La enfermedad se ha vuelto endémica en más de 100 países, aunque se le sigue considerando un padecimiento de zonas tropicales y subtropicales.<sup>8</sup> Fenómenos naturales como ‘el Niño’ y los efectos del continuo calentamiento global, con el paso del tiempo incrementarán el número de zonas en las cuales el ambiente será apto para la transmisión de la enfermedad, representando un riesgo potencial para la población mundial. (Figura 1)<sup>9, 10</sup>



Figura 1. Distribución mundial del dengue.<sup>10</sup>



En los últimos 50 años la incidencia de la enfermedad ha aumentado 30 veces, con expansión geográfica a nuevos países tanto en zonas urbanas como rurales.<sup>11</sup> Se estima que anualmente ocurren 50 millones de infecciones nuevas y aproximadamente 2.5 billones de personas habitan en países endémicos.<sup>10, 12</sup> Es importante mencionar que la resolución EHA58.3 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye al dengue como un ejemplo de enfermedad que constituye un problema emergente de salud pública a considerar como asunto de seguridad nacional.<sup>13, 14</sup> El dengue representa una carga económica y social para los sistemas de salud pública en las zonas endémicas. El número de casos anuales reportados a la OMS variaron de 0.4 a 1.3 millones en la década de 1996 a 2005.<sup>8,10</sup> Los casos no reportados y los malos diagnósticos son los mayores obstáculos a superar para conocer el panorama mundial real.<sup>10</sup>



**Figura 2.** Estadística comparativa de los casos reportados de dengue a nivel mundial en el periodo comprendido entre los años 1955 - 2007.<sup>10</sup>



El dengue es una enfermedad cada vez más frecuente en el sudeste asiático, el continente americano y otras regiones del mundo. En los últimos cinco años, América Latina ha experimentado un aumento inusitado de casos de dengue y dengue hemorrágico.<sup>8</sup> El número de casos se ha incrementado de 267 mil en 2003 a más de 550 mil en 2006. La mayor proporción correspondió a Brasil, país que ha llegado a contribuir con más de la mitad de lo notificado cada año, seguido en orden de frecuencia por Colombia, Venezuela, Honduras y México, aunque éstos últimos, con una menor magnitud.<sup>8</sup> Durante 2007, se registraron más de 800 mil casos de dengue, 46.1% más, que en el año anterior. Del total de casos notificados en este año, 25,811 corresponden a dengue hemorrágico. (Tabla 1).<sup>8</sup>

País	2003	2004	2005	2006	2007
Brasil	341,902	112,928	203,789	346,550	481,316
Colombia	52,588	27,523	30,475	36,471	41,773
Venezuela	26,996	30,693	42,198	39,860	80,646
Costa Rica	19,699	9,408	37,798	12,124	26,440
México	5,018	8,202	16,862	27,287	456
Honduras	16,559	19,971	18,843	8,436	33,508
Resto	48,004	53,645	59,373	57,419	90,695
Total	510,736	262,370	409,338	528,147	802,834

**Tabla 1.** Casos de dengue en América registrados del año 2002 al 2007.<sup>8</sup>

México es un país endémico con brotes re-emergentes, donde se ha reportado la presencia de los cuatro serotipos virales circulando simultáneamente desde el año 2004 (Tabla 2, Figura 3). El serotipo DENV-1 se detectó en Centroamérica y Yucatán en el año 2002, pero desde 1994 no se le había relacionado con brotes epidémicos.<sup>15, 16</sup> El serotipo DENV-2 se detectó en 1999 en Chiapas, extendiéndose en el 2000 hacia Veracruz y Oaxaca, en el 2001 a Guerrero y la península de Yucatán y en el 2002 hacia el Pacífico Occidental, Estado de México,



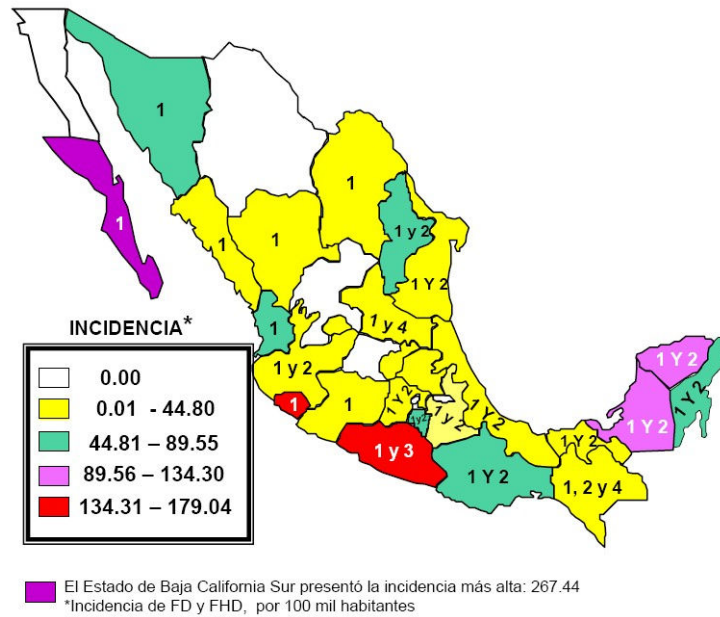
Tamaulipas, Hidalgo y Coahuila.<sup>15, 16</sup> El serotipo DENV-3 se dejó de detectar a nivel nacional en el año 1999, pero reemergió en el 2002 en brotes epidémicos en diversos estados.<sup>15, 16</sup> DENV-4 se detectaba en 1995 y 1996 en el sur del país, pero a partir de 1999 su incidencia disminuyó.<sup>15, 17</sup>

El dengue se encuentra presente en México desde la década de los años setenta con variaciones anuales en su incidencia y brotes epidémicos de diferentes magnitudes, principalmente en los estados de la región sur-sureste, Pacífico y Golfo de México.<sup>8,18</sup> En esas regiones, la transmisión es atribuible a factores tales como la circulación viral, presencia y abundancia del vector, migración, densidad poblacional, intensificación de los fenómenos hidrometeorológicos y otros factores específicos que involucran la operación del Programa de Prevención de la transmisión de la enfermedad a cargo de la Secretaría de Salud en los estados.<sup>8, 10, 11</sup>

Serotipos	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
1	16.7	27	6.5	5	3	0.7	-	0.7
2	38.6	2	1.6	2	13.4	55.2	75	65.6
3	8.8	60	88.3	93	81.7	44.1	25	33.7
4	35.9	11	3.6	-	1.9	-	-	

**Tabla 2.** Porcentaje de serotipos circulantes en México entre 1995-2002.<sup>17</sup>

El dengue reingresó a finales de los años setenta a México y se extendió por todo el país. En la actualidad presenta variaciones anuales en su incidencia y brotes epidémicos de diferentes magnitudes, en particular en los estados de la región sur-sureste y costas del Océano Pacífico y Golfo de México, con eventos epidemiológicos más esporádicos en los estados del centro y norte del país.<sup>8,18</sup>



**Figura 3.** Incidencia y serotipos de los casos confirmados por la SSA en México hasta la semana 50 del año 2010.<sup>18</sup>

Indicador	2009 cierre	2009 semana 50	2010 semana 50
Casos de fiebre por dengue	44565	44228	22035
Casos de fiebre hemorrágica por dengue	11396	11147	6242
Total de casos de dengue	55961	55375	28277
Defunciones por fiebre hemorrágica por dengue	96	94	47
Letalidad (por cada 100 casos)	0.84	0.84	0.75

**Tabla 3.** Casos confirmados de fiebre de dengue y fiebre hemorrágica por dengue hasta la semana 50 del año 2010. Secretaría de Salud, México.<sup>18</sup>

Para el periodo 2001-2007 se observó una tendencia anual ascendente, en la que estados como Veracruz, Chiapas, Quintana Roo, Tamaulipas,

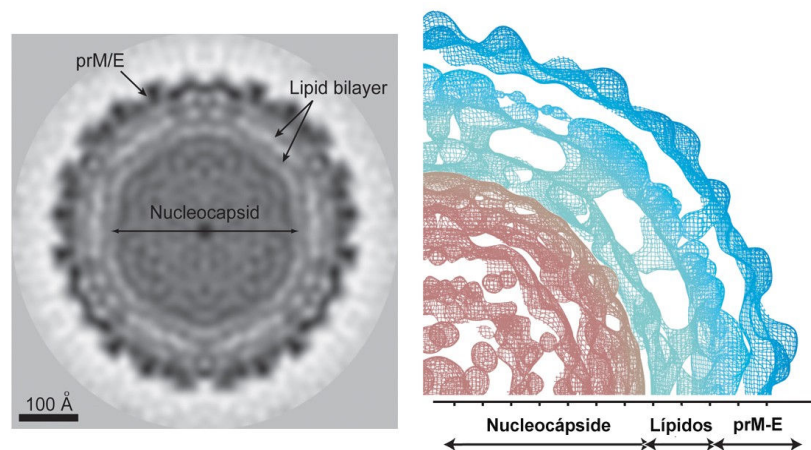


Nayarit, Jalisco y Sonora han contribuido a mantener una presencia de casos, cada vez mayor, alcanzando para 2007 las cifras más altas en lo que va de la década, tanto de dengue clásico, como hemorrágico.<sup>18</sup> El comportamiento de la transmisión denota aumentos anuales progresivos, con repuntes en el segundo semestre de cada año. No obstante, en México se observan incrementos en la transmisión al inicio de cada ciclo anual.<sup>8, 18, 19</sup>

Los datos registrados hasta la semana 50 del año 2010 por la Secretaría de Salud (Tabla 3) reportan una incidencia general aproximadamente 50% menor que el año anterior, y la letalidad de los casos se vio disminuida probablemente debido a la concientización del medio clínico a las señales de alarma de la enfermedad.<sup>18, 20</sup> Los estados con mayor incidencia hasta el 18 de diciembre del 2010 fueron Baja California Sur, Colima, Guerrero, Campeche y Yucatán.<sup>18, 20</sup> El Estado de Nuevo León presentó un aumento en los casos en comparación con el año 2009, sin embargo el repunte no es comparable con aquellos estados donde la incidencia anual permanece constante.<sup>8, 18</sup>

## 1.2. AGENTE ETIOLÓGICO

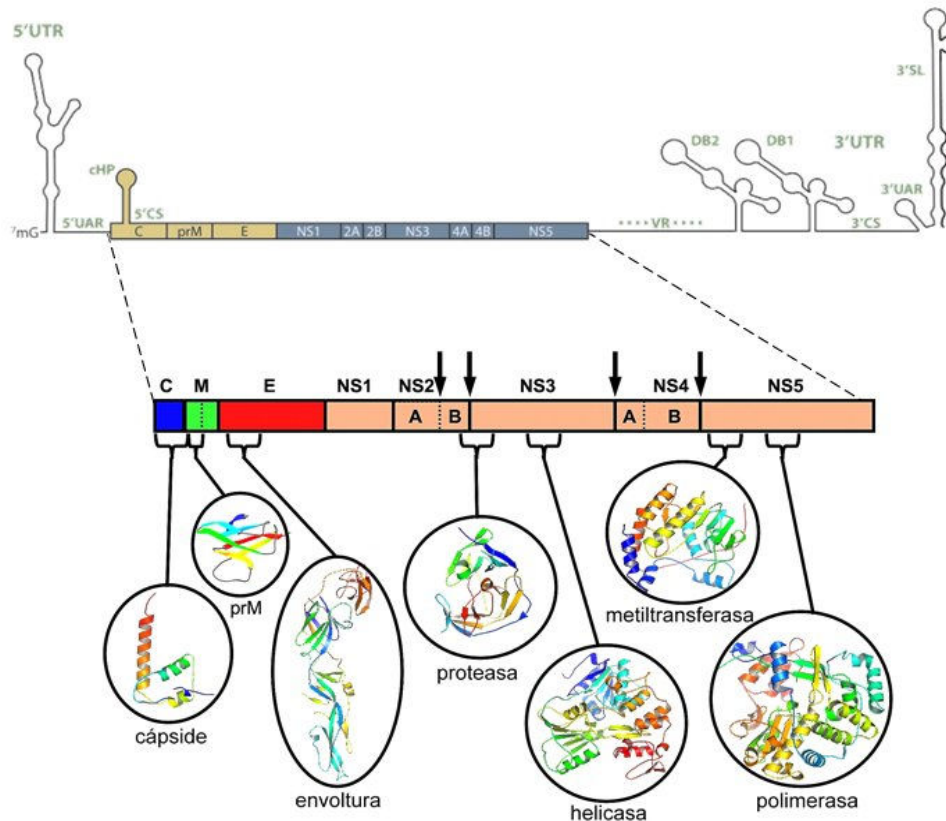
El estudio inicial del dengue implicaba a bacterias, protozoarios y espiroquetas como posibles agentes causales. Fue hasta 1907 que Asburn y Craig evidenciaron la etiología viral de la enfermedad, convirtiendo al virus del Dengue en el segundo patógeno viral identificado después del virus de la fiebre amarilla.<sup>21</sup> El virus fue aislado hasta 1943 y después la comunidad científica identificó que la enfermedad podía ser causada por cuatro serotipos diferentes.<sup>21, 22</sup>



**Figura 4.** Micrografía electrónica y estructura de la partícula viral del dengue.<sup>26</sup>

El virus del dengue (DENV) es un miembro de la familia *Flaviviridae* y del género *Flavivirus*.<sup>23</sup> La partícula viral contiene un genoma de RNA de cadena de polaridad positiva, dentro de una cápside con simetría icosaédrica, y rodeado por una envoltura externa en la cual se encuentran insertas las proteínas prM y E.<sup>24, 25</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>25, 26</sup>

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) que le proporcionan estabilidad y contienen regiones de control. El ORF codifica para una única poliproteína, la cual sufre diversos procesos de corte para generar proteínas virales individuales.<sup>24</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, NS5) están en el extremo carboxilo de la poliproteína. (Figura 5)<sup>26, 27</sup>

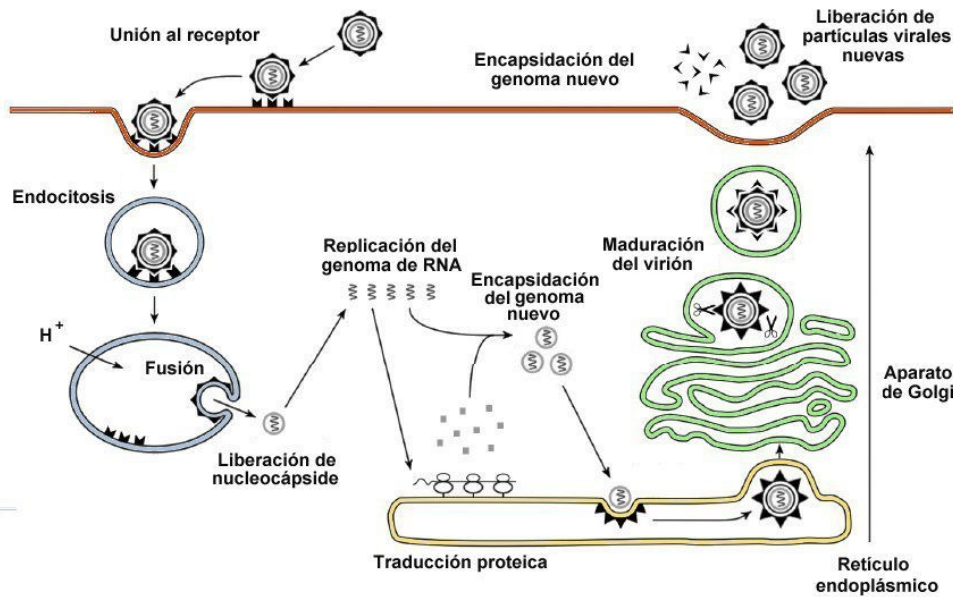


**Figura 5.** Estructura del genoma viral del dengue y sus productos proteicos.<sup>25, 26</sup>

El genoma de RNA del virus dengue y de todos los Flavivirus, tiene por característica presentar un cap (capucha) en su extremo 5' (m7GpppAmp) y carecer de un tracto poliadenilado en su extremo 3'.<sup>28</sup> Presenta además un marco de lectura abierto que varía en tamaño de acuerdo con cada serotipo del virus, incluso entre un serotipos homólogos (Figura 5).<sup>28</sup>

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*, ilustrado en la figura 6. La adhesión (adsorción) de la partícula viral a la célula inicia con la unión de la glicoproteína E (gpE) de la 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>29, 30, 31</sup>



**Figura 6.** Ciclo de replicación del virus del dengue.<sup>29</sup>

Tanto la naturaleza del receptor (residuos de heparán sulfato o proteínas) como el mecanismo de entrada (endocitosis o fusión en membrana) están en discusión.<sup>32</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>29</sup>

La RNA polimerasa RNA-dependiente viral (NS5), asociada a otras proteínas NS, replica el RNA genómico produciendo una molécula complementaria de RNA de polaridad negativa, la que a su vez actúa como templado para la síntesis de nuevas cadenas de RNA de polaridad positiva.<sup>33</sup> Las réplicas de genoma viral son encapsidadas por la proteína



C y luego, las nucleocápsides adquieren su envoltura a partir de la membrana del retículo endoplásmico hacia el espacio luminal.<sup>34</sup> A partir de allí, las partículas virales son transportadas por el sistema exocítico secretorio hacia la superficie en tanto que las glicoproteínas virales adquieren su forma madura por procesamiento de los residuos hidrocarbonados 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>35</sup>

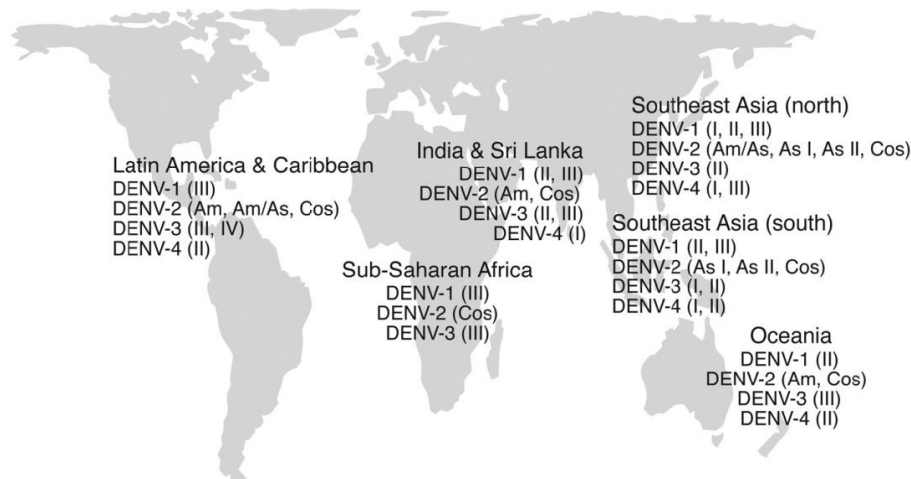
Se han descrito cuatro tipos de virus capaces de causar fiebre de dengue. A estos cuatro virus se les ha denominado **serotipos**, debido a que tienen epítopes comunes en la proteína de la envoltura, lo que ocasiona una elevada reactividad cruzada en pruebas serológicas.<sup>36</sup> A nivel genómico, estos serotipos virales difieren aproximadamente un 30% en su secuencia nucleotídica.<sup>37</sup>

En humanos, cada uno de los cuatro serotipos virales se ha asociado con dengue clásico y dengue hemorrágico. Estudios realizados en Cuba y Tailandia han mostrado una alta asociación consistente entre la infección con el serotipo DENV-2 y casos de fiebre hemorrágica/ choque de dengue, pero entre 1976-1978 en Indonesia, 1980-1982 en Malasia, 1989-1990 en Tahití y desde 1983 hasta la actualidad en Tailandia, se ha observado que el serotipo que más incidencia presenta en los casos complicados es el DENV-3.<sup>38</sup> Sin embargo no es regla, puesto que en México en 1984, Puerto Rico en 1986 y El Salvador en 1989 se diagnosticaron pacientes complicados con el serotipo DENV-4.<sup>38</sup>

En general, los casos complicados se presentan con mayor frecuencia en dos grupos de pacientes inmunológicamente definidos: niños que han sufrido una reinfección y niños que portan anticuerpos maternos contra el virus del dengue. Actualmente se desconoce el mecanismo o los



factores que influyen para que un paciente evolucione hacia una fase crítica.<sup>38</sup>



**Figura 7.** Distribución geográfica de los distintos genotipos del dengue a nivel mundial.<sup>37, 39</sup>

Actualmente el análisis del genoma de los serotipos virales ha sido la pieza central de los estudios en la evolución y epidemiología del dengue. En particular, cada uno de los serotipos presenta diversidad genética extensa en forma de clusters filogenéticamente relacionados que se han denominado **genotipos**, aunque no se ha descrito un criterio específico para definir cada uno de ellos.<sup>37,39</sup> Los genotipos se han definido dependiendo de la región geográfica que ocupan: americano, asiático/americano, asiático I, asiático II y cosmopolita. Sumado a esto se ha reportado que la posibilidad de la sustitución del genotipo viral circulante en una población por uno distinto pudiera ser la causa de los brotes epidémicos reemergentes. (Figura 7)<sup>37, 39</sup>

### 1.3. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

Los vectores más comunes para el virus del dengue son los mosquitos hematófagos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.<sup>40</sup> Estas especies se han

adaptado a la convivencia con humanos, a menudo 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>41</sup> Si se les perturba durante su alimentación suelen buscar gente cercana para morderlos, 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>9, 13, 41</sup>

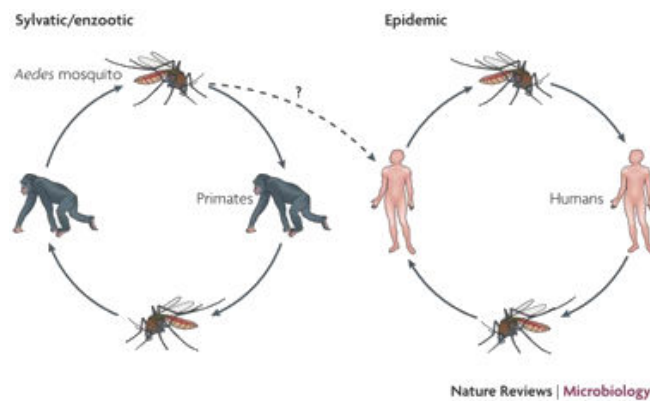


Figura 8. Dinámica de transmisión del dengue.<sup>42</sup>

Existen reportes de un ciclo de transmisión enzoótico del virus del dengue en bosques y selvas de Asia y África que involucra a primates inferiores como hospederos.<sup>9</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. (Figura 8)<sup>9, 42</sup>

Los mosquitos adquieren el virus cuando se alimentan de un humano virémico, y pueden transmitir el virus si muerden a otro humano de 8 a 12 días después de la ingesta inicial.<sup>43</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). Se ha documentado transmisión vertical del virus en mosquitos, lo cual significa que los mosquitos infectados pueden pasar el virus a los descendientes jóvenes.<sup>42</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>43</sup> Sin embargo esto no representa una limitante, puesto que pueden alimentarse a cualquier hora del día.<sup>41</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>42, 43</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<sup>44</sup> lesiones ocasionadas por punzocortantes (agujas) y contacto con membrana mucosa contaminada.<sup>45, 46, 47</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>48, 49</sup>

El dengue se está diseminando rápidamente a zonas nuevas, y la frecuencia de brotes epidémicos está aumentando. También se ha observado que la edad de los pacientes con dengue está aumentando. Esto representa un riesgo en el medio clínico debido a que potenciales donadores de sangre se han convertido en un grupo de riesgo.<sup>50</sup> El riesgo de transmisión de la enfermedad a través de transfusiones sanguíneas provenientes de donadores virémicos asintomáticos es un



riesgo latente, sumado a que incluso en zonas endémicas en los bancos de sangre no es común hacer detección de dengue en paquetes de sangre completa o de componentes.<sup>50</sup> En países endémicos, como en Singapur, el riesgo estimado de contraer la enfermedad es de 1.6 a 6 casos por cada 10000 transfusiones.<sup>48</sup>

Se ha reportado transmisión vertical del dengue durante embarazo o durante el nacimiento, con madres gestantes mientras cursan con fiebre de dengue clásico o hemorrágico.<sup>51</sup> En Malasia, país endémico para dengue, la Universidad de Malaya realizó un estudio en el cual demostró que 2.5% de las parturientas cursaban con una infección reciente por dengue, mientras que la tasa de transmisión vertical en los casos estudiados fue del 1.6%.<sup>52</sup>

#### 1.4. HISTORIA CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD

La infección por dengue es una enfermedad sistémica y dinámica. Tiene un amplio espectro clínico que incluye manifestaciones severas y no-severas (Figura 9). Después del periodo de incubación intrínseco la enfermedad comienza repentinamente y es seguida por tres fases: febril, clínica y de recuperación.<sup>10</sup>

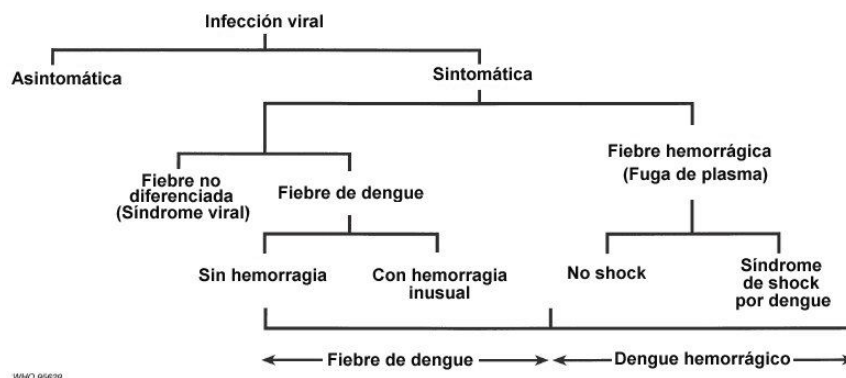


Figura 9. Manifestaciones clínicas del dengue.<sup>38</sup>



En la **fase febril** el paciente típico presenta fiebre repentinamente y coincide con el aumento en la viremia sistémica. Esta fase febril aguda generalmente dura de 2 a 7 días y se acompaña de enrojecimiento facial, eritema, dolor corporal generalizado, mialgia, artralgia y cefalea. Algunos pacientes pueden presentar irritación en garganta, faringe irritada, anorexia, náusea y vómito.<sup>10</sup> Puede resultar difícil distinguir al dengue de otros padecimientos en la fase febril temprana. Una prueba de torniquete positiva en esta fase eleva las posibilidades de un diagnóstico correcto. Es importante mencionar que la sintomatología descrita con anterioridad no permite distinguir entre casos de dengue severo y no-severo, por lo cual se requiere monitoreo continuo para distinguir señales de alarma y otros parámetros clínicos para reconocer la progresión hacia una fase crítica.<sup>10, 53</sup>

Pueden aparecer manifestaciones hemorrágicas leves como aparición de petequias y sangrado de membranas mucosas (ejemplos: membranas nasales y encías). Puede ocurrir sangrado vaginal masivo y gastrointestinal pero no son comunes.<sup>54</sup> Se puede presentar hepatomegalia después de los primeros días del cuadro febril. La anomalía más temprana en el recuento de células sanguíneas es una reducción progresiva en el número de leucocitos, lo cual eleva las probabilidades de que el paciente tenga dengue.<sup>10, 54</sup>

Durante el tiempo de defervescencia, cuando la temperatura disminuye a 37.5 - 38.0 °C o menos y permanece bajo este nivel, generalmente entre los días 3 y 7 de la enfermedad, puede ocurrir un incremento en la permeabilidad capilar en paralelo con el aumento en el hematocrito. Esto marca el inicio de la **fase crítica** y el periodo de fuga de plasma clínicamente significativo puede durar entre 24 y 48 horas.<sup>10</sup> Una leucopenia progresiva seguida de un decremento rápido en el recuento



plaquetario usualmente antecede a la fuga de plasma. En este punto los pacientes sin incremento en la permeabilidad capilar comenzarán a recuperarse, mientras aquellos con permeabilidad aumentada empeorarán, como resultado de la pérdida del volumen de plasma.<sup>10</sup> El grado de fuga plasmática varía. Puede detectarse ascitis y efusión pleural dependiendo del volumen perdido y de la terapia de restitución de líquidos empleada, por lo que el empleo de rayos X de tórax y abdomen es útil para hacer un diagnóstico. El incremento del hematocrito a menudo refleja la severidad de la fuga de plasma.<sup>10, 55</sup>

Cuando el volumen de plasma perdido es crítico puede ocurrir **choque de dengue**. A menudo se antecede por señales de alarma como temperatura corporal subnormal. La hipoperfusión orgánica resulta en daño progresivo, acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada, que se ven reflejados en un cuadro hemorrágico severo y una disminución dramática en el hematocrito.<sup>10</sup> Pueden presentarse hepatitis, encefalitis y miocarditis. Aquellos pacientes que mejoran después de la defervescencia son diagnosticados con dengue no-, severo. Algunos pacientes progresan a la fase crítica de fuga de plasma sin defervescencia, por lo que para hacer un diagnóstico adecuado deben monitorearse los posibles cambios en el recuento hemático.<sup>3, 10</sup>

Si el paciente sobrevive durante la fase crítica entre 24 y 48 horas, se puede presentar una reabsorción gradual del fluido del compartimiento extravascular en las siguientes 48 – 72 horas, comenzando la **fase de recuperación**. El estado general del paciente mejora, regresa el hambre, desaparecen los síntomas gastrointestinales, se estabiliza la hemodinamia y se retorna a una diuresis normal. Algunos pacientes pueden presentar rash y prurito. El hematocrito se estabiliza o se disminuye ligeramente por efecto del fluido reabsorbido.<sup>10</sup>



Sin embargo no todos los pacientes progresan con buen pronóstico hacia la fase de recuperación. La aparición de fuga de plasma, choque, acumulación de fluidos con o sin afección respiratoria, hemorragias severas y/o daño sistémico generalizado, son indicativos de que el paciente cursa con un cuadro de **dengue severo** y deben considerarse como señales de alarma.<sup>56</sup> Mientras progresa la permeabilidad vascular, la hipovolemia empeora. Generalmente sucede entre el día 4 y 5 de la enfermedad y durante la etapa inicial del choque, el mecanismo compensatorio que mantiene una presión sanguínea sistólica normal, ocasiona taquicardia y vasoconstricción periférica con perfusión epitelial reducida.<sup>10, 57</sup>

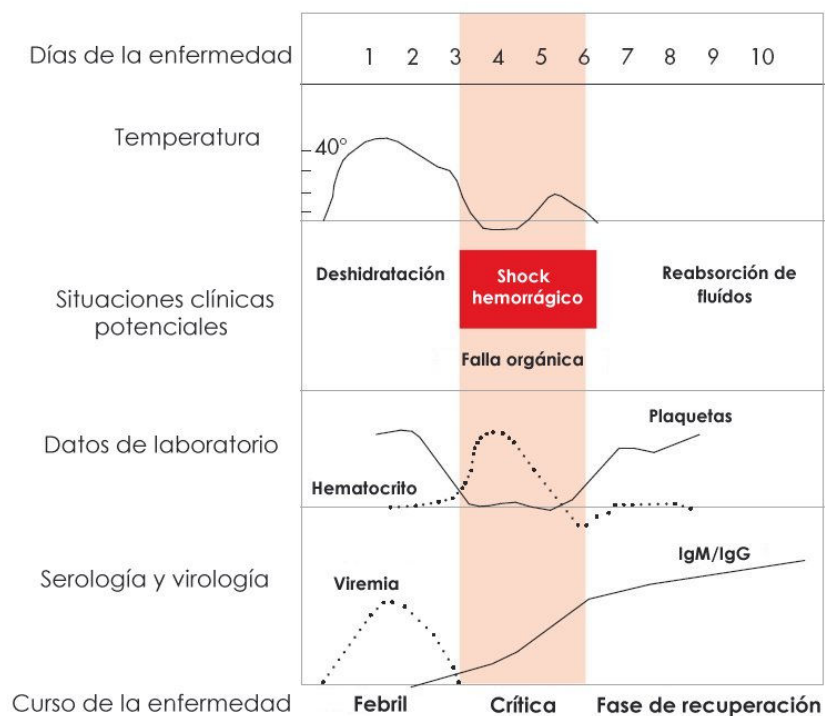


Figura 10. Historia clínica del dengue reportada por la OMS.<sup>10</sup>

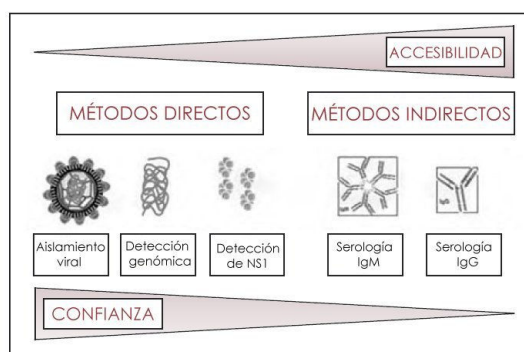
Pacientes con dengue severo pueden tener anomalías en la coagulación, pero no son suficientes por sí solas para causar hemorragias masivas.<sup>10, 54</sup> Cuando no se presenta el cuadro hemorrágico generalmente se asocia el cuadro con choque profundo, ya



que en combinación con la trombocitopenia, hipoxia y acidosis puede ocasionarse falla orgánica múltiple y coagulación intravascular diseminada avanzada. El sangrado masivo puede ocurrir en pacientes tratados con ácido acetilsalicílico, ibuprofeno o corticosteroides.<sup>10, 55</sup> Las manifestaciones inusuales, incluyendo la falla hepática aguda y encefalopatía pueden presentarse, incluso en ausencia de fuga de plasma severa o choque.<sup>58</sup> Se han reportado encefalitis y cardiomiopatía en algunos casos. Sin embargo, el mayor número de muertes de paciente con dengue ocurren en pacientes con choque profundo, particularmente si la situación se complica por el volumen de líquido acumulado.<sup>10, 57, 58</sup>

### 1.5. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

El diagnóstico eficiente y preciso del dengue es una necesidad primaria en el ámbito clínico. La detección temprana de casos, la confirmación y el diagnóstico diferencial de otras enfermedades febriles son actividades importantes para el tratamiento adecuado de los pacientes, además de que se requieren como base para el monitoreo continuo de la diseminación de la enfermedad, control de brotes epidémicos, estudios académicos, así como para el desarrollo de vacunas y diseño de protocolos clínicos.<sup>59</sup>



**Figura 11.** Esquema comparativo de los diferentes métodos de diagnóstico del dengue.<sup>10</sup>



Los métodos de laboratorio para el diagnóstico y confirmación del dengue pueden ser directos o indirectos. Los métodos directos son aquellos en donde se busca la presencia de la partícula viral ya sea detectando el genoma o antígenos de superficie del virión.<sup>10</sup> Los métodos indirectos se basan en la detección de anticuerpos y permiten identificar entre infecciones primarias y secundarias. En general, las pruebas con alta sensibilidad y especificidad (directas) requieren tecnologías más complejas y mayor experiencia en el desarrollo de la técnica, mientras que las pruebas rápidas (indirectas) pueden tener sensibilidad y especificidad comprometidas pero el resultado se obtiene de forma rápida (Figura 11).<sup>10</sup>

Los métodos directos más empleados son el aislamiento viral, detección del genoma viral y de la proteína NS1.<sup>10, 12</sup> Los métodos indirectos que se emplean normalmente son serológicos y se basan en detecciones de IgG/IgM. La técnica a utilizar es dependiente del tiempo en el cual se requiere hacer la detección de la enfermedad. Durante las etapas iniciales se recomienda emplear métodos directos, mientras que para el final de la fase aguda se recomienda el uso de métodos indirectos.<sup>10, 12</sup>

Antes del quinto día de la enfermedad, durante el periodo febril las infecciones pueden diagnosticarse por aislamiento viral en cultivo celular, estándar de oro para la confirmación de casos.<sup>10, 60</sup> Es muy importante mantener las muestras congeladas para preservar la viabilidad de las partículas virales presentes durante su almacenamiento y transporte. Este proceso generalmente toma de 7 a 14 días.<sup>10, 60</sup> La detección de ácidos nucleicos permite la identificación y tipificación del RNA viral en un rango de 24 a 48 horas, pero requiere equipo y reactivos especializados y caros.<sup>61, 62, 63</sup> En ambos casos, se requiere también de



personal con experiencia en la técnica y el establecimiento de protocolos de control de calidad para evitar contaminación y resultados falsos.<sup>64, 65</sup>

Actualmente el uso de estuches comerciales para la detección de la proteína NS1 se ha extendido a nivel mundial, puesto que permiten un análisis directo de forma rápida y pueden trabajarse en laboratorios con equipo e infraestructura limitados.<sup>66, 67</sup>

Posterior al quinto día, las partículas y antígenos virales desaparecen del torrente sanguíneo, coincidiendo con la aparición de anticuerpos específicos, permitiendo el empleo de métodos serológicos para diagnosticar la infección.<sup>68</sup> Para las técnicas serológicas el transporte y almacenamiento de muestras, así como el tiempo de colecta de la muestra son más flexibles.<sup>10</sup> Se recomienda que las muestras se mantengan a 4 °C para evitar la posible degradación de los anticuerpos, aunque estos son estables a temperatura ambiente.<sup>10</sup>

Cuando la infección por dengue ocurre en un paciente que no había sido previamente inmunizado con un Flavivirus o con una vacuna contra alguno de ellos, se desarrolla una respuesta inmune primaria caracterizada por un aumento lento en la concentración de anticuerpos específicos.<sup>10, 71</sup>

Los IgM son los primeros en aparecer y son detectables en el 50% de los pacientes de 3 a 5 días después de la aparición de la sintomatología, en el 80% al día 5 y en el 99% al día 10, alcanzando su máximo a las dos semanas después del inicio del cuadro sintomático y disminuyendo a niveles indetectables de dos a tres meses después.<sup>10, 70</sup> El igG anti-dengue en suero se detecta en bajos títulos al final de la primera semana de la enfermedad, incrementando lentamente y lográndose hallar en suero probablemente durante toda la vida del paciente.<sup>72</sup>



Durante una infección secundaria, aquella en donde el paciente ya ha cursado antes con dengue o ha sido previamente inmunizado con vacunas, el título de anticuerpos se eleva rápidamente y reacciona de forma cruzada contra múltiples Flavivirus.<sup>73</sup> El isotipo de anticuerpo dominante es IgG, detectable en altas concentraciones incluso en la fase aguda y persiste desde 10 meses hasta toda la vida del paciente. Los niveles de IgM son tan bajos en estos casos que llegan a ser indetectables, por lo que actualmente para diferenciar entre infecciones primarias y secundarias se usan cocientes IgM/IgG.<sup>73, 74</sup>

Los métodos serológicos tienen la ventaja de permitir la comparación entre muestras del mismo paciente obtenidas durante la fase aguda de la enfermedad contra muestras colectadas semanas o meses después. Un incremento de 4 veces en los niveles de IgG por ELISA o inhibición de la hemaglutinación indica una infección aguda o reciente. Sin embargo, el esperar para la obtención del suero de un paciente convaleciente no es útil para el diagnóstico y el manejo clínico y sólo es útil para la realización de análisis retrospectivos.<sup>74</sup>

El método de diagnóstico depende por lo tanto de múltiples variables. La tabla 4 muestra los métodos más empleados actualmente, sus ventajas y desventajas, mostrando que no todas son tan asequibles, precisas e infalibles como pudiéramos necesitar. Nuevas estrategias se han ido desarrollando con el paso del tiempo, como los inmunoensayos basados en microesferas, microarreglos y técnicas basadas en inmunoluminiscencia.<sup>75</sup> Sin embargo no se encuentran disponibles más que a nivel de investigación y desarrollo, no siendo aptas para su utilización en el ámbito clínico todavía.



Método	Diagnóstico de infección aguda	Tiempo para obtención del resultado	Espécimen	Tiempo para colecta de muestra *	Infraestructura y equipo	Costo
Aislamiento viral y serotipificación	Confirmado	1-2 semanas	Sangre completa, suero, tejido	1-5 días	Laboratorio BSL-2/BSL-3, cuarto de cultivo, líneas celulares permisibles, microscopio de fluorescencia, equipos para biología molecular	\$\$\$
Detección del genoma viral	Confirmado	1-2 días	Tejidos, sangre completa, suero, plasma	1-5 días	Laboratorio BSL-2 y equipo para biología molecular	\$\$\$
Detección de NS1	No determinado	1 día	Suero	1-6 días	Equipo para ELISA	\$
Detección antigénica	Confirmado	> 1 día	Tejido para inmunohistoquímica	No aplica	Equipo para histología	\$\$\$
IgM ELISA	Probable	1-2 días	Suero, plasma, sangre completa	> 5 días	Equipo para ELISA	\$
Test rápido IgM		30 minutos			No se requiere infraestructura adicional	
IgG con sueros pareados	Confirmado	7 días o más	Suero, plasma, sangre completa	Fase aguda: 1-5 días; Fase convalescente: > 15 días	Equipo para ELISA	\$
Inhibición de la hemaglutinación					Laboratorio BSL-2	

\* después de la aparición de la sintomatología en el paciente.

**Tabla 4.** Comparación de las técnicas para diagnóstico del dengue más usadas.<sup>10</sup>

## 1.6. TRATAMIENTO

Actualmente no existe un tratamiento específico para la infección por el virus del dengue. El manejo clínico del paciente requiere el control de la sintomatología presente, con estrategias que pueden ir desde el aumento en la ingesta de líquidos hasta la hospitalización. La admisión del paciente en el hospital es dependiente de la presencia de señales de alarma. No se deben administrar antiinflamatorios no esteroideos (AINES)



para no elevar las probabilidades de evolución hacia cuadros hemorrágicos. Durante la fase de recuperación la restitución de líquidos debe detenerse para prevenir la sobrecarga de fluidos.<sup>76, 77, 78</sup> El tratamiento a seguir definido por la SSA dependiendo del caso de dengue que presente el paciente se muestra en la tabla 5.<sup>11</sup>

Para una enfermedad que es compleja en sus manifestaciones, el manejo del paciente es considerablemente sencillo, barato y efectivo siempre y cuando el médico logre dar un diagnóstico temprano y se realicen las acciones adecuadas en el tiempo correcto.<sup>10</sup> La clave es el reconocimiento temprano y el entendimiento del cuadro clínico durante las diferentes fases de la enfermedad, para lograr una aproximación racional del caso y obtener un buen pronóstico clínico. El control de la transmisión de la enfermedad se realiza tratando de limitar la presencia del vector en comunidades urbanas empleando insecticidas y concientizando a la población en general para la eliminación adecuada de basura y erradicación de reservorios de agua.<sup>79</sup>

El dengue es una prioridad de salud pública nacional, debido a los efectos sociales y económicos inmediatos que puede ocasionar, por los daños a la salud en grandes grupos de población expuesta y, entre otras razones, por el exceso en la demanda de consulta y los costos de atención que conlleva la prestación de los servicios para las instituciones, las familias y la comunidad. La protección ante los riesgos de transmisión en la población es un factor importante para evitar su diseminación; sin embargo, es indispensable contar con la participación total y decidida de la sociedad, municipios y los propios servicios de salud de todas las instituciones del Sector Salud, para operar los programas con mayor eficiencia y contener así la tendencia ascendente del dengue en México.<sup>8, 79</sup>



Forma clínica de la infección por DENV	Tratamiento
Fiebre de dengue	Hidratación oral; Acetaminofen 10-15 mg/ 6 horas. Evitar AINES. Informar al paciente y a la familia sobre los signos clínicos a observar. Realizar prueba de torniquete. Vigilar sangrados y signos de alarma.
Pacientes con fiebre y petequias	Tratamiento local compresivo si hay sangrado de mucosas. Hematocrito y recuento plaquetario seriado cada 12 horas y buscar hemoconcentración. Vigilar sangrados mayores: Hematemesis, hematoquesia, melena. Vigilar signos de fuga capilar, ascitis o hidrotórax por clínica, ultrasonido o rayos x. Vigilar la aparición de señales de alarma.
Pacientes con señales de alarma	Infusiones intravenosas con soluciones cristaloides. Monitoreo clínico cada hora y de laboratorio cada 8. Vigilar cianosis (oxigenoterapia). Vigilar aparición de signos preliminares de choque (estrechamiento de la presión y pulso). Consideración de peligro inminente de choque para tratamiento precoz.
Pacientes con signos de choque	Canalización de venas. Infusiones intravenosas con soluciones cristaloides. Oxigenoterapia. Vigilar hematemesis y hemorragia pulmonar. Si fuese necesario, transfundir plaquetas o sangre recién extraída. Vigilar dificultad respiratoria. Prevención del edema pulmonar. Si es necesario, dar ventilación mecánica y evitar traslado de pacientes hemodinámicamente inestables.

**Tabla 5.** Tratamiento recomendado por la SSA para el paciente con dengue. <sup>11</sup>

Las acciones de prevención y control de los programas estatales de dengue se llevan a cabo por las diversas instituciones del sector y otros organismos de salud que atienden a los distintos segmentos de la población, bajo un esquema de organización que se enmarca en el Programa de Acción. <sup>8</sup> Si bien existen ejes rectores que definen la orientación y criterios para el funcionamiento del mismo en todos sus componentes, se requiere de un mayor nivel de integración de las instituciones de salud y otras dependencias públicas y privadas afines, en las que se reconocen rezagos para su incorporación efectiva a las acciones de lucha contra el dengue. <sup>8,11</sup>



Las instituciones de Seguridad Social se encargan de atender entre cinco y seis de cada diez mexicanos, en tanto la Secretaría de Salud y otras instituciones de población abierta, brindan atención médica al resto de la población y sólo una proporción menor se atiende en instituciones privadas; a pesar de ello, los servicios de la Secretaría de Salud en los estados, son los que reciben la mayor demanda de consultas y hospitalización por dengue.<sup>8</sup>

El número de casos complicados de dengue continúa aumentando en las áreas endémicas a nivel mundial, siendo los niños los que resultan más afectados, por lo cual el desarrollo de una vacuna efectiva debe convertirse en una prioridad de salud pública global.<sup>10, 11</sup> Existen reportes experimentales en animales que analizan un modelo experimental adecuado en animales de laboratorio, sin embargo siguen en controversia, ya que para establecer los protocolos de infección e inmunización a la fecha ha sido difícil de reproducir.<sup>80</sup> Actualmente la vacuna se encuentra bajo investigación y aunque los resultados parecen ser prometedores, todavía tomará tiempo obtener una vacuna efectiva contra los cuatro serotipos virales, asequible y que provea protección a largo plazo.<sup>81, 82</sup>

### **1.7. INVESTIGACIÓN DE POTENCIALES BLANCOS TERAPÉUTICOS.**

Para poder desarrollar un tratamiento efectivo contra el virus, se requiere comprender la forma en la cual este agente con su limitado genoma y sus 10 proteínas, es capaz de secuestrar la maquinaria celular para poder utilizarla a su favor y replicarse. El entendimiento del mecanismo de entrada y de replicación viral en la célula hospedera es la clave para la identificación de potenciales blancos terapéuticos.



Como se ha hecho con otros virus como el VIH-1 o el VHC, la base para estos estudios es el análisis de los genes tanto virales como del hospedero que participan en el proceso, su sub-expresión, sobre-expresión o silenciamiento. El desarrollo de antivirales requiere del conocimiento del ciclo de replicación del virus en la célula huésped así como las características estructurales y funcionales de las proteínas virales, a fin de hallar los blancos más adecuados para bloquear la infección.<sup>83, 84, 85</sup> A nivel mundial se han realizado numerosas investigaciones destinadas a la comprensión de los procesos moleculares de replicación del RNA del virus del dengue y otros flavivirus.<sup>86</sup> Sin embargo, a la fecha no existe un modelo ilustrativo que resuma de manera general toda la información obtenida sobre los procesos de replicación del RNA del virus del dengue.<sup>87</sup>

A lo largo del ciclo de replicación descrito en el apartado 1.2 del presente capítulo, hay varios puntos que son objeto de estudio como potenciales blancos antivirales entre ellos: Inhibidores de la síntesis de RNA, de la proteasa y de la fusión de membranas; maduración: inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa, inhibición a nivel de la expresión génica.<sup>88</sup> Los estudios no se enfocan exclusivamente en genes únicos, sino en el rol que juegan en vías de señalización intra y extracelular, desde la interacción de la partícula viral con su receptor hasta la liberación de los viriones nuevos.

En este momento hay numerosas líneas de investigación sobre inhibidores de diversos blancos potenciales antivirales en el ciclo de amplificación *in vitro* del DENV. Se han obtenido resultados positivos, en algunos casos extendidos a modelos experimentales *in vivo*, por lo que cabe alentar buenas perspectivas para contar en un futuro no muy lejano con una terapia específica y efectiva para combatir las distintas formas clínicas del dengue.<sup>89, 90, 91, 92</sup>



## Capítulo II

### ANTECEDENTES

#### 2.1. ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro grupo de estudio se realizó un estudio en un grupo de donadores en un hospital de concentración de tercer nivel del Noreste del país, en donde se reportó que existe un 2% de donadores que presentan anticuerpos contra el DENV al momento de realizar la donación sanguínea, lo cual podría representar un alto riesgo de contraer la infección para los pacientes.<sup>93</sup> Por otra parte, en un estudio seroepidemiológico del Virus del oeste del Nilo y virus del Dengue a finales del 2009,<sup>4</sup> nuestro grupo de investigación demostró que el VON y el DENV conviven en el norte del país (evidencia serológica de anticuerpos). También se encontró que un alto porcentaje de la población ha estado expuesto al DENV ya que en la población estudiada del 58 al 67 % de los individuos presentaron evidencia de exposición previa al DENV. Mediante pruebas específicas (pruebas de PRNT) se evidenció que el 41% de las muestras analizadas fueron seropositivas para el DENV-1 y 15% fueron positivas para el DENV-2. Estos resultados concuerdan con estudios realizados en el 2004 en las ciudades fronterizas. Finalmente en ese estudio llegamos a la conclusión que la principal razón de la ausencia de casos anuales del VON en humanos en el Noreste de México es que una gran proporción de la población estudiada ha sido infectada con el DENV y por lo tanto son resistentes o menos susceptibles a padecer una infección severa por el VON.



Sabemos que un problema evidente con este tipo de infecciones reemergentes es que actualmente no existe una vacuna contra el DENV, ni fármacos antivirales específicos, por lo que enfocados en este raciocinio, queremos dirigirnos un paso más adelante de solo conocer la seroepidemiología del DENV en nuestro país.<sup>95, 96, 97</sup> Dentro de este nuevo enfoque nos interesa conocer cuáles son los mecanismos implicados en la replicación del DENV (serotipos1-4) que circulan en nuestro país, qué mecanismos celulares “aprovecha el virus” para realizar su ciclo de replicación, cómo podría modificarse o bloquearse este ciclo, etc., para posteriormente estudiar diversas posibilidades que impliquen “moléculas o proteínas” imprescindibles para el virus e identificar probables blancos terapéuticos contra este virus.

A partir del conocimiento de la secuencia de bases que conforman el genoma humano en el 2003, se han generado recientemente nuevas estrategias para estudiar y abordar el entendimiento de la relación huésped-parásito. Específicamente ha cobrado gran importancia el conocer el papel de las proteínas celulares en las infecciones virales. Dado sus genomas compactos, el DENV (DENV-1-4) y otros flavivirus muy probablemente requieran un número extenso de factores celulares del anfitrión; sin embargo, solamente un número limitado de proteínas humanas, y un número incluso más pequeño de proteínas celulares del insecto anfitrión, han sido identificadas.<sup>92, 98, 99</sup>

Recientemente, el grupo de investigación del Dr. Stephen Elledge y Dr M. Garcia-Blanco han identificado alrededor de 82 proteínas humanas naturales que podrían favorecer la infección por los virus del Dengue, Virus del Oeste del Nilo y virus de influenza A H1N1.<sup>100, 101, 102</sup> Estos resultados podrían abrir la vía al desarrollo de nuevos antivirales. Ellos reportan que las células humanas responden a las infecciones virales intensificando la producción de proteínas que tienen fuertes efectos



antivirales. En las células humanas en cultivo estas proteínas, cuyas funciones se desconocían, bloquean la replicación de los virus estudiados, entre ellos el DENV. El DENV tiene sólo 10 genes propios y debe dirigir proteínas producidas por el organismo que infecta para completar su ciclo vital. El estudio comenzó con la identificación de las proteínas del organismo infectado que el virus necesita para entrar en las células y replicarse en su interior. Posteriormente se utilizó un método de tamizaje molecular (Knock-Down) y mediante el uso de pequeños RNA de interferencia, bloquearon la producción de estas proteínas y observaron la reacción del virus ante su ausencia. Se identificaron más de 80 genes cuya expresión es necesaria para que el virus infecte las células. Durante este proceso también se descubrieron otros genes que tienen el efecto contrario y que si se eliminan el virus de la gripe se replica mucho mejor. Estos genes protectores y/o bloqueadores se describen genéricamente en esta publicación.<sup>100</sup>

La interferencia con RNA, o RNAi, descubierta hace apenas unos 10 años en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, está generando gran interés por su aparente capacidad de desactivar genes que causan enfermedades. Existen ya al menos seis fármacos basados en RNAi que se están probando con personas, relacionados con enfermedades que van del cáncer a un padecimiento de los ojos.<sup>103, 104</sup> Y aunque aún existen enormes obstáculos por superar, el número podría fácilmente duplicarse el próximo año. Una de las tecnologías cruciales para estudiar los genes celulares en este proyecto será el silenciamiento génico mediante RNAi y su posterior validación mediante métodos de biología molecular como se describe mas adelante.<sup>104</sup> De tal manera que consideramos que mientras el papel de las moléculas generadas por el propio virus ha sido estudiado en profundidad, "la misión de las proteínas



de la célula infectada se ignora", por lo que este proyecto se enfoca hacia este nivel del conocimiento.

## **2.2. ESTUDIO DE FACTORES CELULARES INVOLUCRADOS EN LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE.**

En el estudio realizado por Sessions y cols., se proporciona un listado de genes que pudieran estar participando como factores reguladores de la replicación viral.<sup>100</sup> Algunos de los genes mencionados no se habían relacionado con infecciones virales, mientras que de algunos otros se está comenzando a elucidar el papel que cumplen en la replicación del virus. En este trabajo elegimos evaluar el papel que juegan los genes Adenomatosis Poliposis Coli (APC) y la proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90) en la infección de células eucariontes humanas con virus del dengue.

Previo al estudio de Sessions, la proteína APC no se había relacionado con infecciones virales; mientras que HSP90 se ha reportado que se encuentra relacionada probablemente con fenómenos de internalización de partículas virales a la célula hospedera.<sup>100</sup>

### **2.2.1. Adenomatosis Poliposis Coli (APC)**

Adenomatosis Poliposis Coli (APC) está clasificado como un gen supresor de tumores. La proteína codificada por este gen juega papeles críticos en diversos procesos celulares que pueden definir si una célula puede servir como punto de nucleación tumoral. El gen APC se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 5, entre las posiciones 21 y 22, del par de bases número 112,118,468 hasta el 112,209,532 y se ha demostrado que APC contiene en su secuencia un sitio de internalización a ribosoma.<sup>105</sup> La proteína humana completa

tiene una secuencia de 2843 aminoácidos con una masa molecular predicha de aproximadamente 31 KDa. <sup>105</sup>

La proteína APC controla procesos de división celular, adhesión intercelular para formación de tejidos e incluso fenómenos de migración celular. <sup>105</sup> La mayoría de estas funciones las realiza asociándose a otras proteínas especialmente con algunas relacionadas con adhesión y señalización celular. <sup>106</sup> La actividad de una de estas proteínas en particular, la  $\beta$ -catenina, está controlada en su totalidad por APC como participantes en la vía de señalización Wnt (Figura 12). <sup>107. 108</sup>

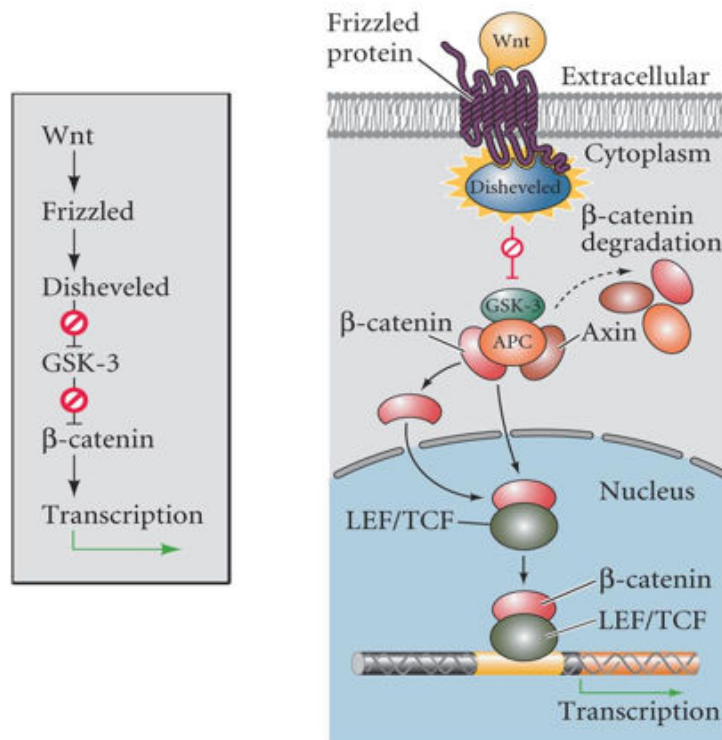


Figura 12. Vía de señalización Wnt. <sup>108</sup>

APC normalmente participa en la vía de señalización Wnt formando un complejo con las proteínas GSK 3 $\beta$  (glicógeno-sintetasa-quinasa 3 beta) y Axin; este complejo es capaz de capturar  $\beta$ -cateninas citoplásmicas que se han disociado de las uniones adherentes entre células. <sup>107</sup> Con



ayuda de la Caseína quinasa 1 (CK1) que se encarga de fosforilar a la  $\beta$ -catenina, GSK-3 $\beta$  realiza fosforilaciones subsecuentes marcando a la  $\beta$ -catenina para su ubiquitinización y degradación vía proteosomal.<sup>107</sup>

De esta forma, se evita que la  $\beta$ -catenina sea traslocada al núcleo y actúe como un factor de transcripción (interactuando con factores como TCL/LEF o Pygo) para encender genes de proliferación celular. La unión del ligando Wnt con su receptor Frizzled ocasiona la disociación del complejo de degradación de la  $\beta$ -catenina, permitiendo el aumento en su concentración citoplásmica, su traslocación al núcleo y el inicio de la expresión génica.<sup>107, 108</sup>

En personas que tienen mutaciones en la secuencia del gen APC, el riesgo de padecer cáncer colorrectal a los 40 años es casi del 100%.<sup>110</sup> La mutación que se presenta con mayor incidencia es la inactivación de APC, ya sea produciéndose una proteína trunca carente del dominio funcional o con su dominio funcional mutado.<sup>110</sup> Las mutaciones más comunes en este gen son las non-sense (sin sentido), que sustituyen una base ocasionando sitios de terminación temprana de la traducción.<sup>110</sup> La alteración en APC conlleva a la desregulación de la  $\beta$ -catenina, migración celular alterada e inestabilidad cromosómica.<sup>110</sup> Se ha reportado que APC también participa en la dirección de la sinapsis colinérgica neuronal, por lo que sus mutaciones pudieran estar originando neuropatías autonómicas, mal de Alzheimer, pérdida de la audición relacionada con la edad, así como algunas formas de epilepsia y esquizofrenia.<sup>111</sup>

Actualmente se desconoce el rol que APC juega en la replicación viral del dengue. El estudio de Sessions y cols.<sup>100</sup> indica que pudiese resultar un factor importante que media el proceso de infección en las células hospederas humanas, especialmente por su capacidad de modular



diversas etapas del ciclo celular. Existen reportes de que algunos virus como el VHB activan la señalización por Wnt interactuando con APC <sup>112</sup> y que las mutaciones en APC son frecuentes en hepatocarcinomas hepatocelulares asociados con VHC. <sup>113</sup> Sin embargo, todos son solamente estudios preliminares.

### **2.2.2. Proteína de Choque Térmico de 90 KDa (HSP90)**

Las proteínas de choque térmico son una familia encargada de proteger a las células del posible daño causado al elevar la temperatura ambiental a la que se encuentran expuestas. Conforman el 1-2% de las proteínas totales celulares en condiciones basales, pero su concentración se eleva hasta el 4-6% en condiciones de estrés térmico. <sup>114</sup>

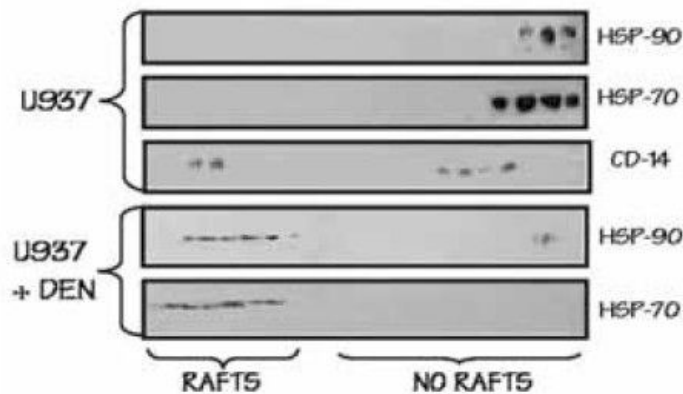
La proteína de choque térmico de 90 KDa (Heat Shock Protein, HSP) es una chaperona subcelular, además de ser una de las proteínas más abundantes en la célula. <sup>114</sup> La proteína codificada por el gen HSP90 tiene tres dominios funcionales: el dominio de unión a ATP, el dominio de plegamiento proteico y el dominio de dimerización, <sup>115</sup> cada uno jugando un rol importante en cada uno de los procesos en los que participa HSP90: como auxiliar en el plegamiento proteico <sup>116</sup>, señalización celular <sup>117</sup>, transporte intracelular <sup>118</sup>, interacción con receptores esteroideos <sup>119</sup> y represión tumoral. <sup>120</sup>

HSP90 se ha relacionado con procesos apoptóticos en células cancerosas, estabilizando las proteínas PI3K y AKT <sup>121</sup>, así como interactuando con los receptores del factor de necrosis tisular (TNFR) y el factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF-  $\kappa\beta$ ). <sup>120</sup> La inhibición de HSP90 en tejidos cancerosos parece inducir apoptosis por medio de la vía de señalización PI3K/AKT. <sup>121</sup> HSP90 se requiere para la inducción del factor de



crecimiento vascular endotelial (VEGF) y la óxido nítrico sintasa (NOS), importantes para la angiogénesis de novo en el crecimiento tumoral.<sup>122</sup>

Estudios realizados por Del Ángel y cols. en México, evidencian que HSP90 es parte del receptor en la superficie de la célula hospedera, que permite la internalización de la partícula viral. Empleando cromatografía de afinidad lograron aislar la proteína a partir de células SH-SY-5Y (neuroblastoma humano) y U937 (línea promonocítica que se diferencia de macrófagos), y caracterizarla por espectrometría de masas MALDI-TOF.<sup>123, 124, 125</sup>



**Figura 13.** Western Blot para identificar HSP70 y 90 en células U937, en presencia o ausencia del virus del dengue.<sup>35, 124</sup>

Los hallazgos muestran que HSP70 y HSP90 se asocian con microdominios de membrana (rafts) en respuesta a la infección viral. La figura 13 muestra los resultados del Western Blot para HSP70 y 90 en células U937 con y sin presencia del virus del dengue. Los anticuerpos indican que las proteínas de choque térmico se encuentran asociadas en la membrana celular únicamente cuando el virus del dengue se encuentra presente.<sup>123, 124, 125</sup>

Se ha descrito que algunas proteínas de choque térmico se incorporan en la partícula viral y que algunos virus codifican proteínas del tipo de las



Hsps, haciendo evidente que éstas son proteínas clave en la replicación viral.<sup>35</sup> Las Hsps, en su mayoría chaperonas, tienen la función de plegar correctamente a las proteínas celulares y, por tanto, su actividad resulta crucial durante ciertos pasos de la replicación de los virus, ya que pueden darle la conformación adecuada a las proteínas virales para que éstas también sean activas. Así mismo, pueden permitir que la partícula viral, durante la entrada, pierda la envoltura o cápside o bien darle la conformación correcta durante su salida de la célula.<sup>35</sup>



## Capítulo III

### JUSTIFICACIÓN

El dengue es un problema de salud mundial prioritario para todos los gobiernos de países afectados. Es importante considerar que el virus con sólo 10 genes propios, es capaz de dirigir y utilizar proteínas producidas por el organismo que infecta para completar su ciclo de replicación. Desde esta perspectiva es fundamental entender la relación existente entre el virus y el hospedero, para intentar modular a voluntad la replicación viral.

El estudio de los genes celulares involucrados en este proceso, permitiría desarrollar estrategias moleculares para detener o bloquear la proliferación del virus en el interior de las células huésped, generando posibles alternativas profilácticas y/o terapéuticas contra el dengue.

Así mismo el descubrimiento podría ser indicativo de posibles blancos terapéuticos y por lo tanto, guiar hacia el desarrollo de fármacos antivirales más eficaces, incluyendo medicamentos profilácticos que podrían utilizarse para ralentizar la transmisión del dengue.



## Capítulo IV

### OBJETIVOS

#### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto del silenciamiento de los genes APC y HSP90 de células humanas en los niveles de infección de los serotipos 1 y 2 del DENV.

#### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer y validar un sistema de infección celular empleando células C6/36 de *Aedes albopictus* para la producción y amplificación de los cuatro tipos del DENV.
2. Establecer y validar un modelo de estudio de infección celular con los serotipos 1 y 2 del DENV empleando células humanas Huh-7.
3. Silenciar mediante la tecnología de RNA de interferencia los genes APC y HSP90 en células humanas Huh-7.
4. Evaluar el impacto del silenciamiento de los genes APC y HSP90 de células humanas en los niveles de infección de los serotipos 1 y 2 del DENV



## Capítulo V

### MATERIALES

Este trabajo se realizó 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, así como en el Laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales 'Dr. Hideyo Noguchi' de la Universidad Autónoma de Yucatán, en el periodo comprendido de enero a diciembre del año 2010.

#### 5.1. REACTIVOS

##### 5.1.1. Soluciones de uso general

- La limpieza de la zona de trabajo se realizó con solución al 10% de Dodecil sulfato de sodio (SDS; Marca USB. Cat. S5010); así como con etanol al 70% (Etanol desnaturalizado; marca Jaico, México), ambas en agua ultrapura.

##### 5.1.2. Cultivo celular

- El cultivo de la línea celular C6/36 se realizó en una campana de flujo laminar BSL-2 con filtros HEPA (Marca Lumistell; Celaya, Guanajuato, México). Para dar mantenimiento a la línea celular se empleó medio de cultivo Leibovitz (L-15), solución de aminoácidos no esenciales para medio mínimo esencial de Tagle (100X), solución de antibiótico-antimicótico (100X; Penicilina-Estreptomocina-Anfotericina B) y bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, todos de la marca In vitro, S.A.



México, D.F.). Para suplementar el medio se utilizó suero bovino fetal (SBF) de la marca Hyclone.

- Los procedimientos de cultivo celular para la línea Huh-7 se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar BSL-2 con filtros HEPA (Marca NUAIRE). Para el mantenimiento de la línea celular se utilizó medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced-DMEM), L- Glutamina (200 mM; 100X), suero bovino fetal (SBF), Tripsina-EDTA (0.25%), solución de antibiótico penicilina-estreptomicina (100 UI/mL de penicilina G de sodio y 100 µg/mL de sulfato de estreptomina) y solución de aminoácidos no esenciales (10 mM; 100X), todos de la marca GIBCO-BRL (Grand Island, N.Y.).
- Para los lavados de las células se empleó una solución buffer de fosfatos (PBS) 1X.
- Para la congelación de líneas celulares se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) de la compañía Sigma.

#### **5.1.3. Recuento celular**

- Para realizar el recuento celular se empleó el colorante vital azul tripano 0.4% (marca GIBCO-BRL, Grand Island, N.Y.).

#### **5.1.4. Infección viral de cultivos celulares.**

- Para la infección de células C6/36 y Huh-7 con virus del dengue se emplearon los mismos reactivos descritos en el apartado de cultivo celular.

#### **5.1.5. Extracción de RNA**

- Para la extracción de RNA total a partir de células en monocapa o de aislados de cultivo viral, se empleó el reactivo TRIzol (marca Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), cloroformo (marca Fischer



Scientific, New Jersey, USA), Etanol (marca Merck, Darmstadt, Alemania), isopropanol (marca Fischer Scientific, New Jersey, USA) e inhibidor de RNAsas 'RNA out' de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

- Todas la soluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura tratada con el inhibidor de RNAsas Dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma Aldrich).

#### **5.1.6. Retrotranscripción (RT)**

- Para la síntesis del DNA complementario a partir de RNA total se utilizó la enzima RT-MMLV, Buffer RT 5X, Random primers, Ditiotreitól (DTT), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) e inhibidor de RNAsas 'RNA out', todos de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

#### **5.1.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

- La amplificación del cDNA se realizó utilizando la enzima Taq DNA Polymerase recombinante, buffer 10X para PCR sin  $Mg^{+2}$  y cloruro de magnesio 50 mM de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
- Los primers utilizados (D1, D2, TS1, TS2, APC-Upper, APC-Lower, HSP90-Upper y HSP90-Lower) son de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

#### **5.1.8. PCR cuantitativa**

- Para el análisis de la expresión génica de APC y HSP90 por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se utilizó el reactivo SYBR Green ER qPCR Supermix for ABI de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
- La normalización de los datos se realizó definiendo como gen endógeno la enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa



(GAPDH) y utilizando el estuche comercial Human GAPDH 20X y el TaqMan Universal PCR Master Mix, ambos de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

#### **5.1.9. Interferencia con RNA**

- Los RNA de interferencia prediseñados empleados (APC-si1433, APC-si1435, HSP90-si6993 y HSP90-si6994, 40 nmol de cada uno) son de la compañía Ambion-Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).
- Para la transfección de células Huh-7 con los RNAs de interferencia se empleó el agente lipídico siPORT NeoFX de Ambion-Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

### **5.2. MATERIALES**

#### **5.2.1. Uso general**

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat. 4488.
- Pipetas serológicas de 2 mL. Marca Fisherbrand. Cat. 13-678-11C.
- Tubos falcon de 15 mL. Marca Corning. Cat. 430053.
- Tubos falcon de 50 mL. Marca Corning. Cat. 430291.
- Toallas desechables de papel 'Sanitas'. Marca Kimberly Clark.
- Puntillas desechables blancas (10  $\mu$ L). para micropipeta Marca Axygen.
- Puntillas desechables amarillas (200  $\mu$ L) para micropipeta. Marca Axygen.
- Puntillas azules (1 mL) para micropipeta. Marca Axygen.

#### **5.2.2. Cultivo celular**

- Botellas para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>.



- a) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430639.
- b) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430168.
- Botellas para cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>.
  - a) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430641.
  - b) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430199.
- Raspadores celulares (gendarmes) de 25 cm. Marca Corning. Cat. 3010.
- Pipeta pasteur. Marca Corning. Cat. 101001440.
- Placas para cultivo celular de 6 pozos. Marca Corning. Cat. 3506.
- Placas para cultivo celular de 24 pozos. Marca Corning. Cat. 3526.

### **5.2.3. Congelación de células**

- Crioviales de 2 mL. Marca Corning. Cat. 430659.

### **5.2.4. Infección viral de cultivos celulares**

- Microtubos de 0.6 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-060-C1.
- Microtubos de 1.5 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-150-C.
- Placas para cultivo celular de 6 pozos. Marca Corning. Cat. 3506.
- Placas para cultivo celular de 24 pozos. Marca Corning. Cat. 3526.

### **5.2.5. Extracción de RNA total**

- Microtubos de 1.5 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-150-C.
- Microtubos de 2 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-200.

### **5.2.6. Técnicas moleculares (RT, PCR, qPCR)**

- Microtubos de 0.2 mL. Marca Axygen. Cat. PCR-02-C1.
- Tubos ópticos para qPCR (Tiras de 8 tubos) Applied Biosystems. Part. 4323032.
- Tapas ópticas para tubos de qPCR. Applied Biosystems. Part. 4316567.



- Puntillas desechables blancas (10  $\mu$ L) con filtro. Marca Rainin. RT-10F.
- Puntillas desechables amarillas (200  $\mu$ L) con filtro. Marca Rainin. RT-200F.
- Agarosa Ultrapure. Marca Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

#### **5.2.7. Interferencia con RNA**

- Placas para cultivo celular de 24 pozos. Marca Corning. Cat. 3526.
- Microtubos de 1.5 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-150-C.
- Microtubos de 2 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-200.
- Raspadores celulares (gendarmes) de 25 cm. Marca Corning. Cat. 3010.

### **5.3. EQUIPO**

#### **5.3.1. Uso general**

- Centrífuga clínica. Marca Thermo Scientific. Modelo IEC-CLR30R.
- Centrífuga refrigerada. Marca Heraeus. Modelo Biofuge Primo R.
- Microcentrífuga. Marca Eppendorf. Modelo 5415D.
- Microscopio invertido. Marca Olympus. Modelo CKX41
- Ultracongelador Revco. Marca NUAIRE. Modelo UN-6617A36.
- Pipetor Pipet-Aid XP. Marca Drummond. Modelo 4-000-101.
- Baño maría. Marca PRECISION 180.
- Micropipetas.
- Vórtex. Marca Scientific Industries. Modelo Vortex Genie 2 G-560.

#### **5.3.2. Cultivo celular**

- Campana de flujo laminar con filtros HEPA. Class II type A2. Marca NU AIRE. Modelo NU-425-400.
- Incubadora con fuente de CO<sub>2</sub>. Marca NUAIRE. Modelo UN-4750.



- Incubadora sin fuente de CO<sub>2</sub>. Marca Labnet Microincubator. Modelo I5110.
- Bomba de presión y vacío. Marca Daigger. Cat. EF2090G.
- Mechero de bunsen.

### **5.3.3. Infección viral de cultivos celulares**

- Campana de flujo laminar con filtros HEPA. Marca Lumistell. Modelo LV-120.

### **5.3.4. Técnicas moleculares (extracción de RNA total, RT, PCR, qPCR)**

- Campana de PCR. Marca CBS Scientific Co. Modelo P-036-02.
- Termociclador para retrotranscripción. Marca Applied Biosystems. Modelo GeneAmp PCR System 9700.
- Termociclador para PCR punto final: Marca Eppendorf. Modelo Mastercycler gradient.
- Termociclador de tiempo real: Marca Applied Biosystems. Modelo ABI PRISM 7000.
- Micropipetas automáticas de 10 y 200 µL. Marca Rainin.
- Fotodocumentador UVP Mini Darkroom. Marca UVP. (Cambridge, UK) Modelo M-26E.
- Espectrofotómetro NanoDrop. Marca Thermo Scientific. Modelo Nanodrop 2000.
- Cámara de electroforesis. Marca Owl. Modelo B1A.
- Fuente de poder. Marca Bio Rad. Modelo Power Pac 100.
- Horno de micro-ondas. Marca Panasonic.

### **5.3.5. Interferencia con RNA**

- Se empleó el mismo equipo descrito en el apartado correspondiente a cultivo celular.



#### 5.4 HARDWARE Y SOFTWARE.

- Para realizar la escritura, diseño de esquemas, manejo de imágenes, análisis de datos y gráficas, se empleó una computadora portátil Sony VAIO modelo VGN-S460F.
- La captura y análisis de datos, elaboración de gráficas y esquemas se realizaron con Microsoft Excel 2002 (2001, ver. 10.2614.2625) y Microsoft Power Point 2002 (2001, ver. 10.2623.2625). El procesador de textos empleado fue Microsoft Word 2002 (2001, ver. 10.2627.2625). Todos con el paquete de compatibilidad para Office 2007 instalado (Microsoft Corp.).
- La plataforma empleada para la cuantificación de ácidos nucleicos con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 fue el NanoDrop 2000/2000c ver. 1.4.1 de Thermo Fischer Scientific.
- El registro de datos para la PCR en tiempo real se realizó en una computadora personal DELL con la plataforma ABI 7000 Sequence Detection System ver. 1.1 de Applied Biosystems
- Los geles de agarosa fueron capturados con el equipo UVP Mini Darkroom (UVP; Cambridge, UK) acoplado a una computadora DELL con la plataforma ABI7000 Sequence Detection System ver. 1.1 instalada.
- Las fotografías fueron tomadas con una cámara PowerShot A470 (Modelo PC1267; Canon, Inc. China) de 7.1 megapíxeles, acoplada al microscopio Olympus. Modelo CKX41. Las condiciones empleadas para el ajuste de la cámara digital fueron modo de fotografía macro automático, zoom óptico de 3.4X y auto ISO alta.
- Las imágenes fueron editadas con los programas Paint Shop Pro 4.12 (1996, JASC, Inc. Minnesota, USA) y con Microsoft Photo Editor 3.0.2.3 (2000, Microsoft Corp. USA).

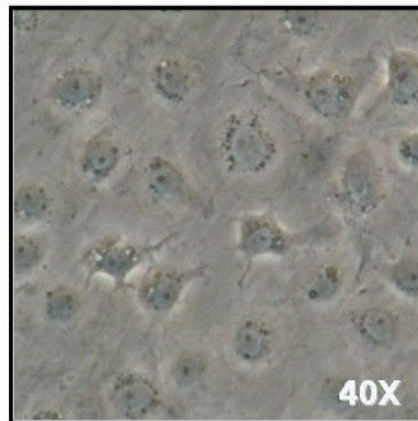
---

## 5.5. MATERIAL BIOLÓGICO

### 5.5.1. LÍNEAS CELULARES

#### A) Línea celular C6/36

La línea celular C6/36 <sup>127</sup> es una clona obtenida de la línea original de *Aedes albopictus* establecida por Singh <sup>128</sup> que presenta una alta sensibilidad a los virus del dengue <sup>129</sup>. Algunas cepas de dengue son capaces de producir efecto citopático de tipo sincicial en las C6/36. Con mucha frecuencia se observa toxicidad en las células a causa de los inóculos empleados <sup>130</sup>.



**Figura 14.** Micrografía de una monocapa de células C6/36.

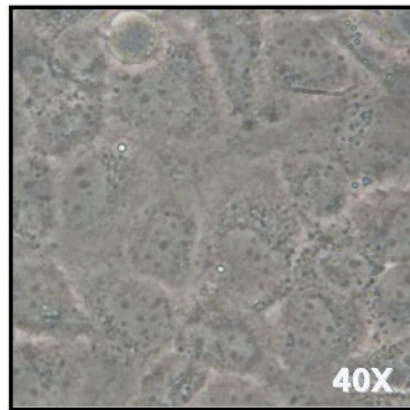
Se cultivan en medio MEM Earle o Leibovitz L-15 suplementado al 5-10% con suero bovino fetal y se incuban a temperatura ambiente (25-28 °C) sin requerimiento de atmósfera de CO<sub>2</sub> y en botellas de cultivo cerradas. Su subcultivo se realiza por 'split' proporcional (1:10 semanal generalmente), agitando la botella de cultivo y permitiendo que el medio caiga de forma perpendicular a la monocapa celular (Figura 14), aunque también se pueden raspar con ayuda de un gendarme de hule. No se deben tripsinizar ni levantar con EDTA.



La línea celular C6/36 fue amablemente donada por la Dra. María Alba Loroño Pino, del Centro de Investigaciones Regionales 'Dr. Hideyo Noguchi' de la Universidad Autónoma de Yucatán.

## B) Línea celular Huh-7

Huh-7 (JTC-39) es una línea celular adherente de hepatocitos diferenciados, derivados de un hepatocarcinoma, por ende su nombre.<sup>131</sup> Fue aislada de un paciente masculino japonés de 57 años en septiembre de 1982 y establecida por Nakabayshi, H. y Sato, J en la Universidad de Okayama, Japón<sup>132</sup>.



**Figura 15.** Micrografía de una monocapa de células Huh-7..

Las células se encuentran inmortalizadas y crecen en monocapas bidimensionales (Figura 15).<sup>133</sup> Aunque pueden ser cultivadas en ausencia de suero bovino fetal, tradicionalmente se les cultiva con medio suplementado con 2 al 10% de SBF y se incuban a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Para su subcultivo se desprenden con tripsina-EDTA 0.25%.



### 5.5.2. VIRUS

Las cepas de dengue utilizadas en esta tesis fueron la H-159911 (DENV-1), H-17247 (DENV-2), H-25924A (DENV-3), H-87 (DENV-3) y H-241 (DENV-4). Todas fueron aisladas a partir de sueros de pacientes virémicos, en cultivos de C6/36, serotipificadas por RT-PCR con el protocolo de Lanciotti y caracterizadas por inmunofluorescencia en el Laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales ‘Dr. Hideyo Noguchi’ de la Universidad Autónoma de Yucatán. Los virus usados en la presente tesis fueron amablemente donados por la Dra. María Alba Loroño Pino.

## Capítulo VI

### MÉTODOS.

Para cumplir con los objetivos planteados en la presente tesis, se planteó la siguiente estrategia general (Figura 16).

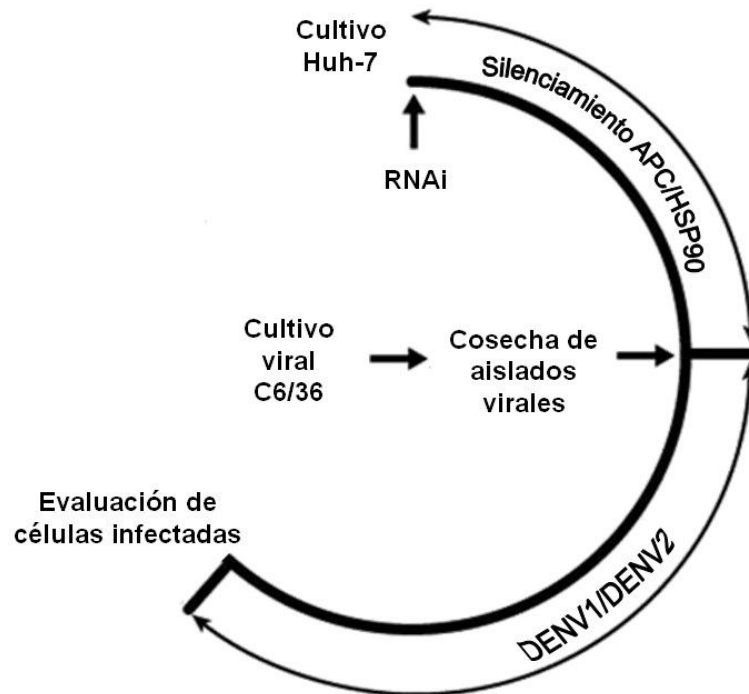


Figura 16. Estrategia general de trabajo.

#### 6.1. Cultivo de células C6/36.

Las células C6/36 se mantuvieron en medio L-15, haciendo el split cada semana en botellas de 25 cm<sup>2</sup> para la obtención de monocapas semiconfluentes. Los tubos se cultivaron en una incubadora seca sin



fuelle de CO<sub>2</sub>, a una temperatura entre 26 a 28 °C. Las células se levantaron de sus botellas de cultivo por agitación o por raspado con un gendarme de hule.

## **6.2. Cultivo de células Huh-7.**

Las células Huh-7 se mantuvieron en medio de cultivo Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal, haciendo el split cada tres o cuatro días a la semana, al alcanzar los cultivos un 90% de confluencia. Se incubaron a 37°C bajo atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se levantaron de sus botellas de cultivo empleando Tripsina-EDTA 0.25% y después neutralizando la actividad de la enzima con una proporción 1:1 con medio Advanced DMEM con 2% de suero bovino fetal.

## **6.3. Infección de cultivos celulares con virus del dengue.**

Las monocapas semiconfluentes se lavaron con PBS1X, el cual después fue removido por aspiración. El medio de cultivo (botella de 25 cm<sup>2</sup>) se sustituyó con medio para infección (L-15-2% SBF para la línea C6/36 y ADMEM-1% SBF para la línea Huh-7). El volumen de medio colocado antes de depositar la alícuota viral fue de 2 mL, de tal forma que cubriera la monocapa celular. Después de colocar suavemente la alícuota del aislado viral infeccioso, se homogenizó realizando movimientos circulares para distribuir las partículas virales en toda la superficie de cultivo.

Las células se incubaron a 37°C durante una hora para permitir la adsorción de las partículas virales. En los casos que fue necesario, después de la adsorción viral se removió el medio de infección, se realizó un segundo lavado con PBS1X para eliminar todas las partículas



virales libres y se añadieron 5 mL del medio reducido en suero dependiendo de la línea celular infectada.

Se permitió la infección viral entre 1 a 15 días dependiendo del experimento realizado, permitiendo el mantenimiento del cultivo a 25-27°C para la línea C6/36 y a 37°C con atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> en el caso de la línea Huh-7.

#### **6.4. Generación del banco de aislados virales.**

Los cultivos de C6/36 infectados con virus del dengue se rasparon con ayuda de un gendarme de hule. Una vez removido todo el material adherido a la superficie de la botella de cultivo, se añadieron 300 µL de mezcla 90:10 suero bovino fetal-bicarbonato de sodio al 7.5% por cada mililitro de medio de cultivo en la botella (para una botella de 25 cm<sup>2</sup> se añadieron 1.5 mL de mezcla de congelación).

El contenido de la botella de cultivo se dividió en 5 tubos de 2 mL rotulados con el serotipo viral, la cepa del virus y la fecha de cosecha. Los virus se mantuvieron en hielo mientras se terminó de procesar todo el volumen de la botella de cultivo. Posteriormente se almacenaron en un ultracongelador a -80 °C. En total se realizaron 5 cosechas virales en el periodo comprendido entre marzo –diciembre del año 2010.

#### **6.5. Extracción de RNA total.**

La extracción de RNA tanto de aislados virales como de células en monocapa se realizó con TRIzol, 1 mL de reactivo por cada 10 cm<sup>2</sup> de la botella de cultivo o en una proporción 1:1 con respecto al volumen de



aislado viral empleado para realizar la extracción. El protocolo empleado fue el siguiente:

1. En caso de extraer RNA de una monocapa celular, primero se removió el medio de cultivo para permitir el contacto directo del TRIzol con ellas.
2. Se adicionó el TRIzol a la botella de cultivo o al tubo conteniendo el aislado viral.
3. Se incubó durante 5 minutos para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. En caso de estar haciendo la extracción a partir de células en monocapa fue en este paso que el contenido de la botella se transfirió a un tubo eppendorf de 2 mL.
4. Posteriormente, se adicionaron 200  $\mu$ L de cloroformo frío por cada mililitro de TRIzol empleado. Se mezcló por inversión durante 15 segundos. Se incubó en hielo durante 3 minutos.
5. Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
6. Después de la centrifugación se recuperó en un tubo de 1.5 mL el sobrenadante transparente, puesto que en esta fase es donde se encuentra el RNA. Para su precipitación se añadieron 500  $\mu$ L de isopropanol por cada mililitro de TRIzol empleado.
7. Se centrifugó nuevamente a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
8. Se retiró el sobrenadante y la pastilla de RNA se lavó con 1 mL de etanol al 70% en agua DEPC por cada mililitro de TRIzol empleado.
9. Se mezcló en el vórtex el contenido del tubo.
10. Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
11. Por último se removió el etanol residual y el RNA se resuspendió en agua DEPC, empleando de 10 a 30  $\mu$ L dependiendo del tamaño de la pastilla obtenida.



## 6.6. Retrotranscripción (RT-MMLV).

Una vez realizada la extracción del RNA total, éste fue sujeto a retrotranscripción utilizando la enzima MMLV. Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

**Tabla 6.** Condiciones de reacción para la RT. Primera mezcla.

RNA total de células en monocapa		RNA total viral	
Reactivo	Volumen	Reactivo	Volumen
Random primer 10X	1 $\mu$ L	Primer D2 10 $\mu$ M	1 $\mu$ L
RNA	5 $\mu$ L	RNA	5 $\mu$ L
Agua DEPC	6.5 $\mu$ L	Agua DEPC	6.5 $\mu$ L
<b>Volumen total</b>	<b>11.5 <math>\mu</math>L</b>	<b>Volumen total</b>	<b>11.5 <math>\mu</math>L</b>

Una vez preparada esta primera mezcla, se introdujeron los tubos al termociclador para incubarlos a 72 °C durante 10 minutos. Mientras tanto, se preparó la siguiente mezcla de reacción:

**Tabla 7.** Condiciones de reacción para la RT. Segunda mezcla.

Reactivo	Volumen
Buffer RT 5X	4 $\mu$ L
DTT 0.1 M	2 $\mu$ L
RNase out	0.5 $\mu$ L
dNTPs 10 mM	1 $\mu$ L
RT-MMLV 200U/mL	1 $\mu$ L
<b>Volumen total</b>	<b>8.5 <math>\mu</math>L</b>



Transcurrido el tiempo de incubación de los tubos en el termociclador, se incubaron durante 3 minutos en hielo y se añadieron los 8.5  $\mu$ L de la segunda mezcla de reacción por cada tubo. Posteriormente se continuó con el siguiente programa en el termociclador:

**Tabla 8.** Programa de reacción de retrotranscripción.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	25 °C	10 minutos
2	37 °C	60 minutos
3	94 °C	5 minutos
4	4 °C	10 minutos

Terminado el programa, los tubos se retiraron del termociclador, se rotularon y se almacenaron a -80°C.

### 6.7. Serotipificación de dengue según el protocolo de Lanciotti.

El protocolo de Lanciotti para serotipificación del virus del dengue consiste en una retrotranscripción seguida de una amplificación del cDNA para la obtención de amplicones con tamaño distinto para realizar una serotipificación diferencial dependiendo del virus del dengue presente.

**Tabla 9.** Secuencias de los primers empleados para la PCR de Lanciotti.

Primer	Secuencia	Amplicón
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	482 pb
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	
TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	119 pb
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	



La reacción se optimizó para poder trabajar con el cDNA viral y después en un segundo paso amplificarlo. Para la reacción de PCR dependiendo si se detectó DENV-1 o DENV-2, se preparó la correspondiente mezcla de reacción indicada en la tabla 10 y se corrió la reacción con el programa de termociclador descrito en la tabla 11.

**Tabla 10.** Condiciones de reacción para la serotipificación de DENV 1 y 2.

Para Dengue 1		Para Dengue 2	
Reactivo	Volumen	Reactivo	Volumen
Buffer PCR 10X	2 $\mu$ L	Buffer PCR 10X	2 $\mu$ L
Buffer Enhancer 20X	4 $\mu$ L	Buffer Enhancer 20X	4 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.5 $\mu$ L	MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.5 $\mu$ L
dNTPs 10 mM	0.5 $\mu$ L	dNTPs 10 mM	0.5 $\mu$ L
Primer D1 10 $\mu$ M	2 $\mu$ L	Primer D1 10 $\mu$ M	2 $\mu$ L
Primer TS1 10 $\mu$ M	2 $\mu$ L	Primer TS2 10 $\mu$ M	2 $\mu$ L
Taq polimerasa	0.3 $\mu$ L	Taq polimerasa	0.3 $\mu$ L
cDNA	1 $\mu$ L	cDNA	1 $\mu$ L
Agua Mili Q	6.7 $\mu$ L	Agua Mili Q	6.7 $\mu$ L
<b>Volumen total</b>	<b>20 <math>\mu</math>L</b>	<b>Volumen total</b>	<b>20 <math>\mu</math>L</b>

Los productos amplificados se verificaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio. Los geles se corrieron a 70 V. La PCR positiva para DENV-1 debe producir un fragmento de 482 pb, mientras que para DENV-2 el fragmento debe tener un tamaño de 119 bp.



**Tabla 11.** Programa para la amplificación de DENV1 y DENV2.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	5 minutos
2	94 °C	30 segundos
3	55 °C	30 segundos
4	72 °C	30 segundos
5	Ir al paso 2, 40 veces	
6	72 °C	5 minutos
7	4°C	Esperar

### 6.8. PCR punto final para APC y HSP90.

Para la evaluación de APC y HSP 90 se diseñaron primers tomando como base las secuencias NM\_000038.4 (APC) y NM\_005348.3 (HSP90), y ubicando las regiones en las cuales se unían los RNA de interferencia a usar para el silenciamiento de la expresión de estos genes. La secuencia de los primers diseñados se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 12.** Secuencia de los primers diseñados para APC y HSP90.

Primer	Secuencia	Amplicón
APC-UPPER	AAGGATCTGTATCAAGCCGTTCT	141 bp
APC-LOWER	GCAAGAAGCAATGACCTCTCTT	
HSP90-UPPER	GGTTGCTGAGAAAGTAACTGTGA	101 bp
HSP90-LOWER	GTGTCTGTCCTCACTGTGAATG	

Las condiciones de reacción para la PCR de APC y HSP90 se muestran en la tabla 13, mientras que la tabla 14 describe el programa de PCR empleado.



**Tabla 13.** Condiciones de reacción para la PCR de APC y HSP90.

Reactivo	Volumen
Buffer PCR 10X	2 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.2 $\mu$ L
dNTPs 10 mM	0.5 $\mu$ L
Primer Upper 10 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Primer Lower 10 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Taq polimerasa	0.3 $\mu$ L
cDNA	2 $\mu$ L
Agua Mili Q	12 $\mu$ L
<b>Volumen total</b>	<b>20 <math>\mu</math>L</b>

**Tabla 14.** Programa para la amplificación de APC y HSP90

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	5 minutos
2	94 °C	30 segundos
3	55 °C	30 segundos
4	72 °C	30 segundos
5	Ir al paso 2, 40 veces	
6	72 °C	5 minutos
7	4°C	Esperar

Los productos amplificados se verificaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio. Los geles se corrieron a 70 V. La PCR positiva para APC debe producir un fragmento de 141 pb, mientras que para HSP90 el fragmento debe tener un tamaño de 101 bp.



## 6.9. Experimentos de silenciamiento génico.

Para realizar el silenciamiento de las células Huh-7 se trabajó bajo el siguiente protocolo:

1. Tripsinizar células Huh-7 bajo el protocolo de rutina.
2. Resuspender células en suficiente medio para que 450  $\mu$ L de la suspensión celular equivalgan a 400-450000 células/mL.
3. Diluir el reactivo siPORT Neo FX en medio ADMEM 2% SBF.
4. Incubar mezcla de agente transfectante con medio durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Durante el tiempo de incubación del agente transfectante, diluir el RNAi en medio ADMEM 2% SBF.
6. Transferir la mezcla del medio con RNAi al tubo con la mezcla del agente transfectante en volúmenes de 100  $\mu$ L y mezclar suavemente con la puntilla con movimientos circulares. Evitar subir y bajar el volumen de la mezcla nueva con la puntilla, para evitar la introducción de aire a los complejos de transfección.
7. Incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos.
8. Dispensar 50  $\mu$ L de la mezcla de transfectante-RNAi en cada pozo de la placa.
9. Depositar en cada pozo 450  $\mu$ L de la suspensión celular.
10. Mezclar suavemente el contenido de los pozos ladeando la placa hacia delante y hacia atrás sin generar remolinos en su interior, ya que esto puede provocar que los complejos de transfección se acumulen en el centro de la placa.

Transcurridos los tiempos de silenciamiento deseados se realizó extracción de RNA total o se procedió a realizar la infección con virus del dengue.

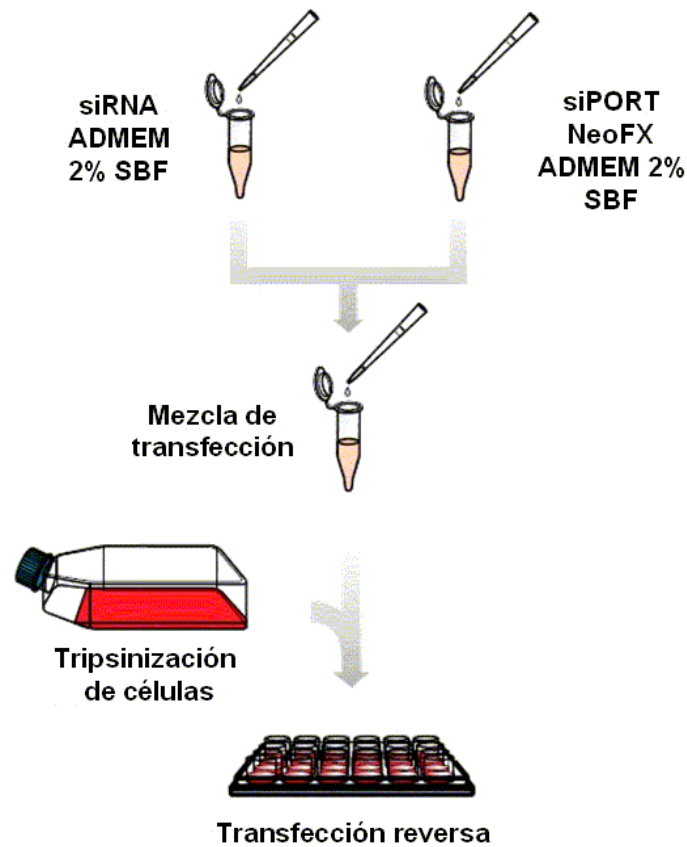


Figura 17. Esquema de trabajo para la realización de la transfección reversa.

### 6.10. Evaluación del silenciamiento génico por PCR tiempo real.

La evaluación de APC y HSP90 se llevó a cabo empleando la química de SYBR Green. Los cDNAs evaluados se cuantificaron con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Termo Fisher Scientific), para ajustar la cantidad de cDNA a 300 ng por reacción de PCR. El protocolo empleado se muestra en la tabla 15.

Las reacciones se corrieron en el termociclador ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster CA) bajo el programa estándar de PCR en tiempo real, mostrado en la tabla 16.



**Tabla 15.** Condiciones de reacción para qPCR con SYBR Green.

Reactivo	Volumen
SYBR Green ER 2X	2 $\mu$ L
Primer Upper 10 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Primer Lower 10 $\mu$ M	1 $\mu$ L
cDNA	Equiv. 300 ng
Agua Mili Q	c.b.p. 20 $\mu$ L
<b>Volumen total</b>	20 $\mu$ L

**Tabla 16.** Programa estándar de reacción para PCR en tiempo real.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	50 °C	2 minutos
2	95 °C	10 minutos
3	95 °C	15 segundos
4	60 °C	1 minuto
5	Ir al paso 3, 40 veces	

Para normalizar los datos, las muestras se corrieron en PCR tiempo real para GAPDH utilizando el Human GAPDH kit de Applied Biosystems, el cual funciona basado en la química de sondas TaqMan. Las condiciones de reacción se muestran en la tabla 17.

**Tabla 17.** Condiciones de reacción para qPCR de GAPDH.

Reactivo	Volumen
qPCR Mastermix 2X	10 $\mu$ L
Ensayo GAPDH 20X	1 $\mu$ L
cDNA	Equiv. 300 ng
Agua DEPC	c.b.p. 20 $\mu$ L
<b>Volumen total</b>	20 $\mu$ L



El programa utilizado para correr las muestras en el ABI PRISM 7000 fue el mismo que para APC y HSP90, descrito en la tabla 16: Todas las muestras se analizaron por triplicado. Se registró el Ct de las muestras procesadas tanto para el gen de estudio como para el calibrador endógeno. Los datos se analizaron empleando el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  con Microsoft Excel 2002 (XP).

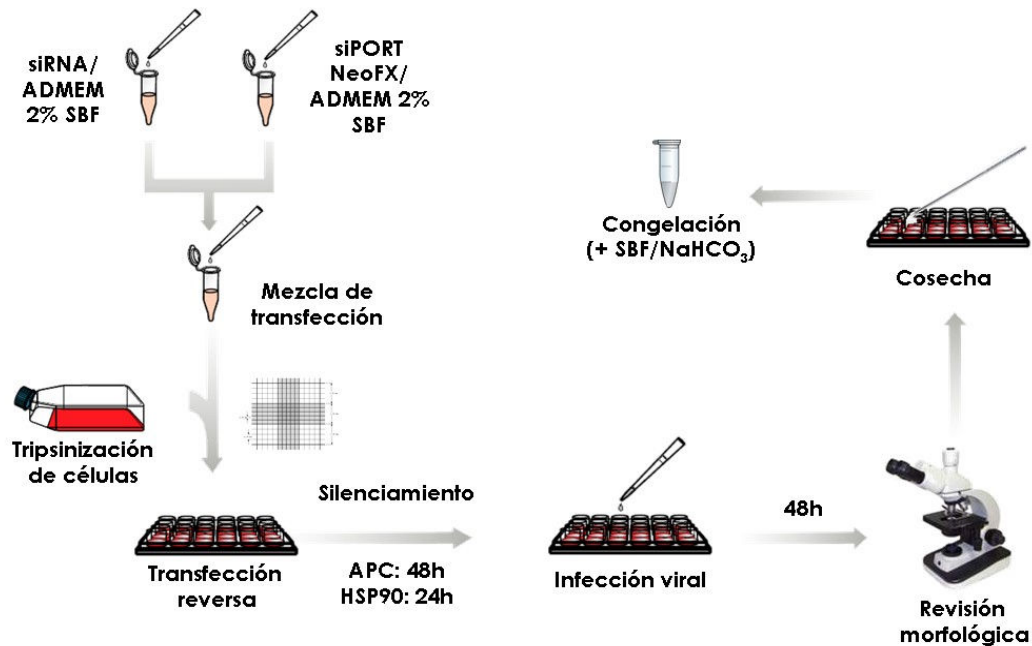
### **6.11. Experimentos de infección viral en cultivos silenciados.**

Para la infección de cultivos de Huh7 con APC y HSP90 silenciados, se trabajó en placas de 24 pozos. En cada pozo se sembraron 40000 células, las cuales se transfectaron con 2  $\mu\text{L}$  de siPORT NeoFX por pozo, en un volumen final de 500  $\mu\text{L}$  de medio ADMEM 2% SBF por pozo. (Figura 18)

Las concentraciones de RNAi para los siRNA para APC (si1433 y si1435) fue de 5 nM, mientras que para los siRNA para HSP90 (si6993 y si6994) fue de 100 nM. Se permitió el silenciamiento de APC durante 48 horas antes de realizar la infección. Para HSP90 se permitió el silenciamiento durante 24 horas pre-infección con virus del dengue. La TCID normal empleada fue de 1.5  $\mu\text{L}$  de aislado viral por pozo, mientras que la TCID letal fue de 6  $\mu\text{L}$ /pozo.

El contenido de los pozos en las placas de cultivo se raspó con ayuda de un gendarme de hule y se cosechó tanto contenido celular como medio de cultivo en tubos eppendorf de 1.5 mL.

Las muestras se congelaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , acondicionadas bajo el mismo protocolo de almacenamiento de aislados virales (adición de mezcla 90:10 suero bovino fetal- bicarbonato de sodio al 7.5%).



**Figura 18.** Esquema general de los experimentos de silenciamiento génico e infección viral.

Para APC se realizó el silenciamiento con los RNAi por separado y en conjunto, a una concentración final de 5 nM. Para HSP90 se utilizaron los RNAi por separado, a una concentración final de 100 nM. En los dos experimentos los controles utilizados fueron células sin infección (control negativo), células infectadas sin silenciar (representando el 100% de infección) y células infectadas con una TCID letal (para confirmar una infección viral exitosa). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. (Figura 19)

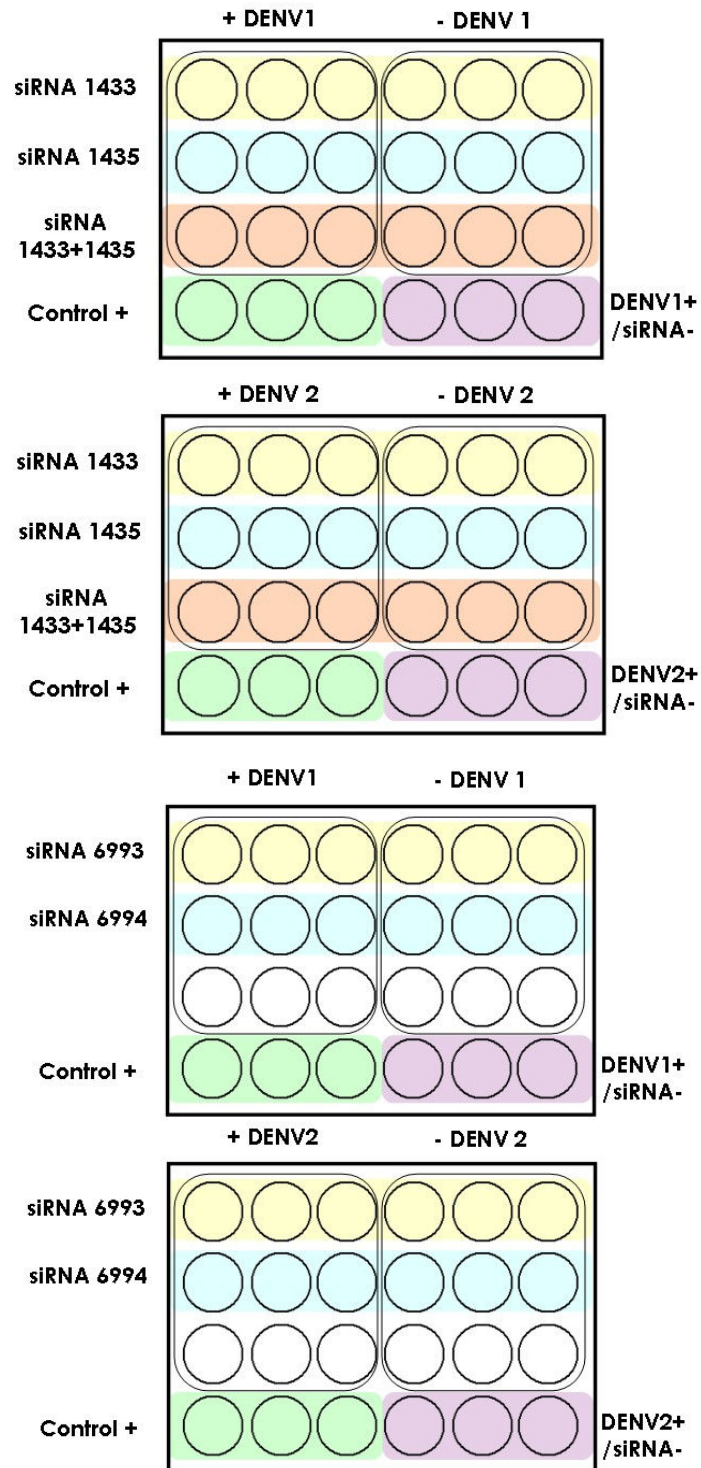


Figura 19. Diseño general del experimento de silenciamiento génico e infección viral.



## Capítulo VII

### RESULTADOS

#### 7.1. Cultivo de células C6/36 y amplificaciones virales iniciales.

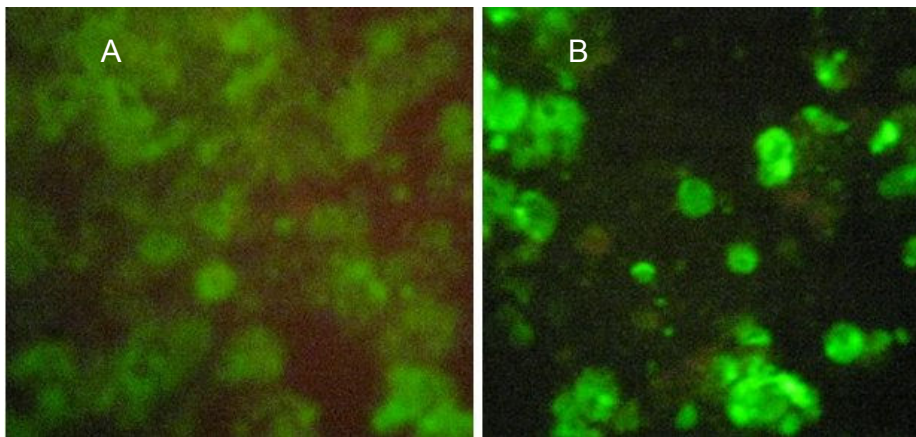
Las células C6/36 donadas por la Dra. María Alba Loroño Pino se trasladaron a temperatura ambiente y en cultivo activo; de Mérida, Yucatán a Monterrey, Nuevo León. La revisión morfológica inicial no mostró alteraciones de la monocapa semiconfluente por efecto de los cambios de presión y temperatura en el viaje. Sin embargo, a las células les tomó alrededor de dos semanas el recuperar el ritmo metabólico, para trabajar con ellas antes del viaje.

Se llevó a cabo el cultivo de la línea celular en tres botellas de 75 cm<sup>2</sup> en medio L-15 (In vitro, S.A.) al 5% SBF (Hyclone). Posteriormente se congelaron para generar un banco de células en el Laboratorio de Infectología Molecular, de las cuales se hizo control de calidad un mes después, descongelando un vial y corroborando que las células congeladas se mantenían viables, confirmando que el proceso de congelación fue exitoso. Se observó que bajo las condiciones de descongelación empleadas, a las células les tomó aproximadamente tres semanas en recuperarse y volver a establecer monocapas semiconfluentes en el periodo de una semana.

Se trató de cultivar con medio L-15 de Invitrogen suplementado con medio GIBCO, pero las células comenzaron a despegarse al tercer día después de haber sido sembradas, por lo que se decidió emplear solamente los reactivos iniciales (InVitro).

## 7.2. Amplificación de los virus prototipo en células C6/36.

La infección viral inicial se realizó en el Laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales 'Dr. Hideyo Noguchi' (bajo la dirección de la QFB Elsy del Pilar Rosado Paredes), empleando sueros de pacientes virémicos (17  $\mu$ L suero por monocapa semiconfluente de células C6/36 en tubos de cultivo de fondo plano) registrados en su banco de casos confirmados. Se realizó una infección inicial durante dos semanas en tubos de cultivo de fondo plano (Nunc). Las infecciones virales fueron evaluadas por inmunofluorescencia directa empleando el anticuerpo monoclonal 4G2 (dirigido contra la proteína E de los Flavivirus en general) en una dilución 1:3000; así como por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos IgG monoclonales específicos contra cada serotipo viral y posterior incubación con el anticuerpo secundario fluorescente. Todos los cultivos resultaron positivos para ambas pruebas de inmunofluorescencia (Figura 20).

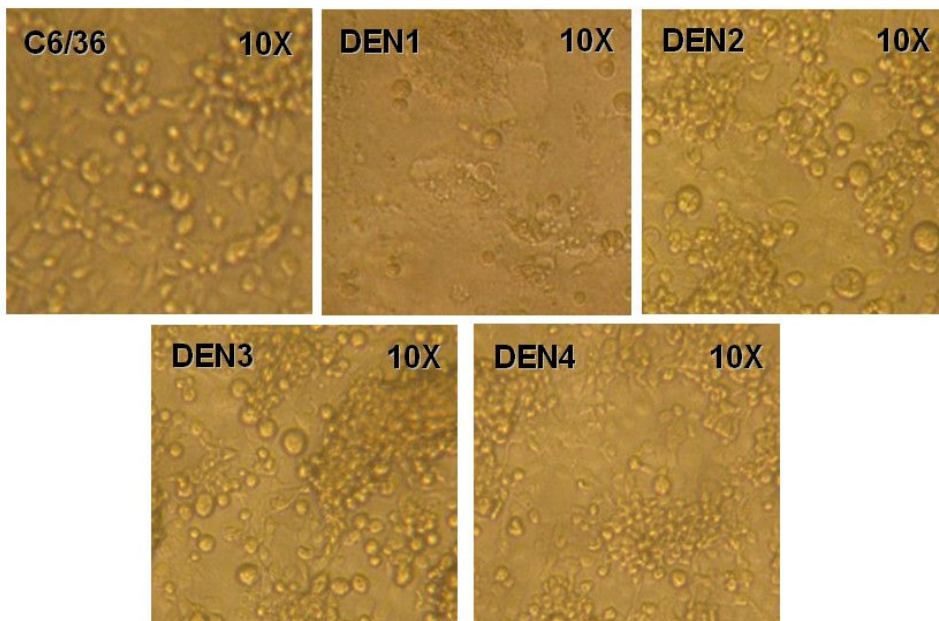


**Figura 20.** Confirmación por inmunofluorescencia (IF) de la infección de células C6/36 con dengue. Las imágenes se observan a 40 aumentos. A muestra el resultado de la infección de un cultivo con dengue 1, confirmado con IF directa (4G2), mientras que B muestra el resultado de una infección con dengue 4 por IF indirecta.



Una vez confirmado el potencial infeccioso de los sueros descongelados, se procedió a infectar cinco tubos de cultivo de fondo plano para el traslado de los virus a Monterrey. Las monocapas confluentes se infectaron con 100  $\mu$ L de suero con los virus dengue 1 (H-15991), dengue 2 (H-17247), dengue 3 (H-25924A), dengue 3 (H-87) y dengue 4 (H-241), cada uno en su propio tubo de cultivo. Para el traslado se colocó medio del cultivo L-15 al 2% SBF hasta un 90% del volumen del tubo, el cual se removió a los 3 días, colocando medio nuevo al 2% SBF. Se incubaron los cultivos virales hasta comenzar a observar cambios en la morfología de la monocapa celular (Figura 20).

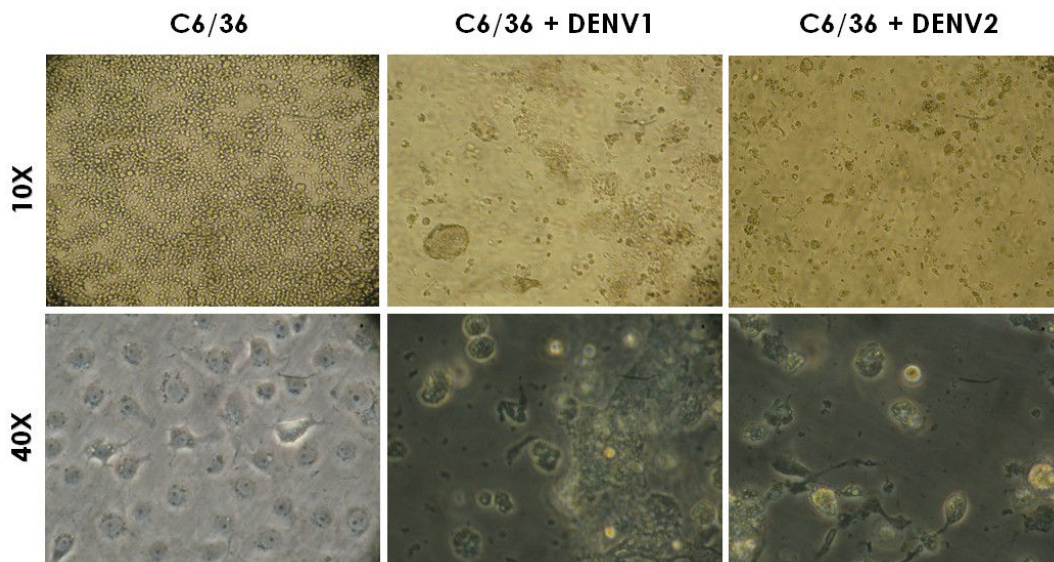
A los 10 días post-infección se cosecharon dengue 1 y dengue 4, mientras que dengue 2 y los dos cultivos de dengue 3 se cosecharon a los 14 días post-infección. Es probable que los cultivos se hayan tenido que cosechar antes de los 15 días post-infección debido a que el inóculo infeccioso inicial pudo haber resultado demasiado alto para la monocapa en el tubo de cultivo, lo que ocasionó citotoxicidad.



**Figura 21.** Cultivos de células C6/36 infectados con los aislados de la primera cosecha viral observados en microscopio invertido.



Con estos primeros aislados se realizó una segunda infección en monocapas de C6/36 sembradas en botellas de 25 cm<sup>2</sup>. Estos cultivos se infectaron con 100 µL de cada aislado viral. DENV-1 y DENV-2 se cosecharon 10 días post-infección, mientras que DENV-3 y DENV-4 se cosecharon hasta el día 15 post-infección. La figura 20 muestra el aspecto de las monocapas celulares al momento de su cosecha. Se observó que a los 10 días la monocapa celular se encontraba notablemente dañada en el cultivo infectado con DENV-1, habiendo lisis notoria y mucho detrito celular. En el caso de DENV-2 se observó fusión celular y daño de tipo sincicial, además de formación de cúmulos celulares similares a racimos de uvas. En los cultivos infectados con DENV-3 y DENV-4 como era de esperarse por lo observado en Mérida, las células no se encontraron dañadas, sólo se percibieron cúmulos celulares en algunos campos en el microscopio.



**Figura 22.** Imágenes de cultivos virales de dengue 1 y 2 en células C6/36 durante 15 días. Fotografías tomadas con un microscopio invertido.



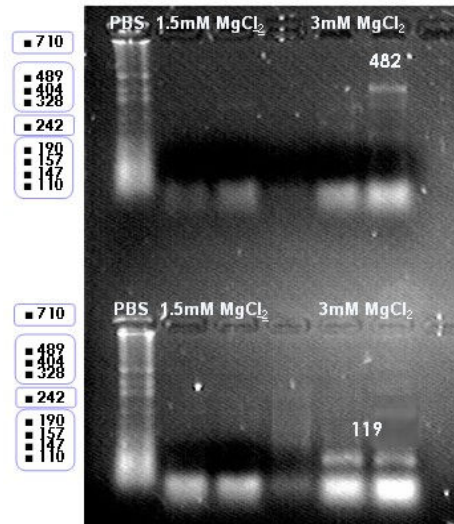
Los aislados virales se congelaron y almacenaron a  $-86^{\circ}\text{C}$  en una mezcla de suero bovino fetal/ bicarbonato de sodio al 7.5% estéril 90:10. Las proteínas del suero protegen la envoltura de los viriones, mientras que el pH básico los mantiene viables. Debido a que los objetivos de esta tesis estuvieron orientados al estudio de los serotipos 1 y 2, la importancia que tienen a nivel nacional y aprovechando su rápida velocidad de cultivo para el establecimiento del sistema de estudio se requirió de un banco más grande de aislados virales que para los serotipos 3 y 4, así que en una siguiente ronda de amplificación con los aislados virales iniciales, se permitió el cultivo durante 15 días de ambos virus en monocapas semiconfluentes y asegurar una lisis celular completa. Con este lote de aislados virales fue con el cual se realizaron todos los experimentos de la presente tesis.

### **7.3. Validación de la infección viral por métodos moleculares.**

Para confirmar la presencia de las partículas virales en los cultivos, y de forma complementaria a la evaluación de los cambios en la morfología de la monocapa celular; se realizó la extracción de RNA total con TRIzol de los aislados virales de dengue 1 y 2. La proporción volumen-volumen fue 1:1 de aislado viral-TRIzol. Los RNAs se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en agua DEPC tratada con inhibidor de RNAsas.

Los RNAs totales se retrotranscribieron utilizando el *primer* D2 de acuerdo al método publicado por Lanciotti y cols., como cebador, sólo para amplificar los genomas virales de dengue 1 y 2. Los cDNA obtenidos se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se usaron como templado para la optimización de la reacción de serotipificación. Los amplicones de 482 pb para dengue 1 y el de 119 pb para dengue 2 se obtuvieron únicamente empleando una concentración final 3 mM de  $\text{MgCl}_2$  (el doble

que en las PCR estándar), debido a que las regiones que se amplifican parecen ser ricas en guaninas y citosinas (Figura 22).



**Figura 23.** Serotipificación de los aislados virales empleando el método de Lanciotti.

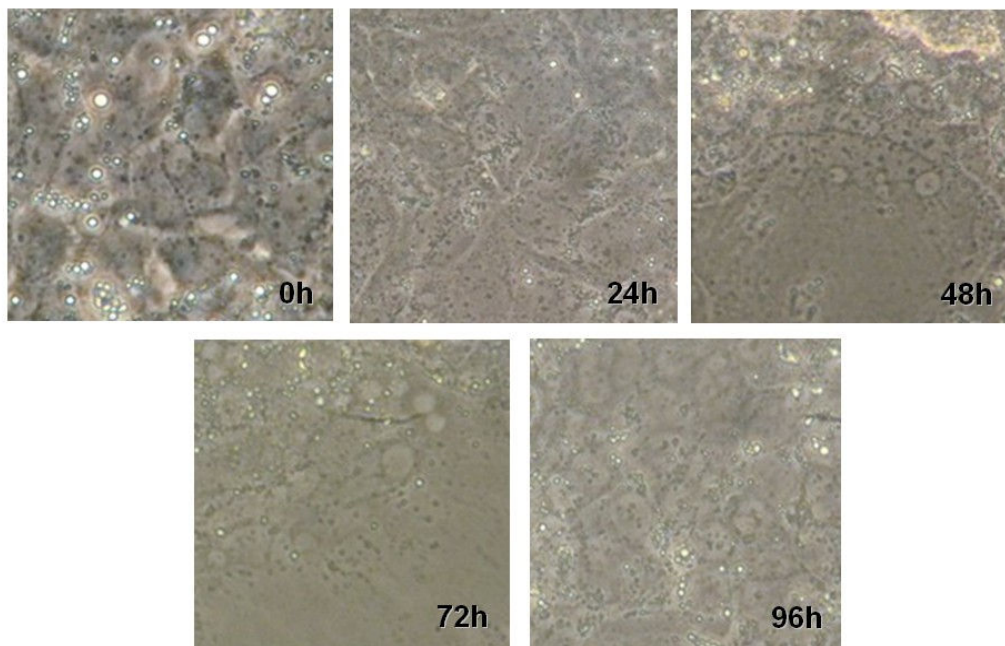
#### 7.4. Infección de células Huh-7 con virus del dengue.

Para confirmar que los virus del dengue infectaban células Huh-7, se sembraron 600-650000 células/ pozo en placas de cultivo de 6 pozos. Las monocapas se infectaron con diferentes volúmenes (25, 50, 75 y 100  $\mu$ L), así como con 50  $\mu$ L de diluciones 1:10 y 1:100 de los aislados virales de DENV-1 y DENV-2. Se monitorearon los cambios morfológicos en los cultivos durante 24, 48, 72 y 96 horas.

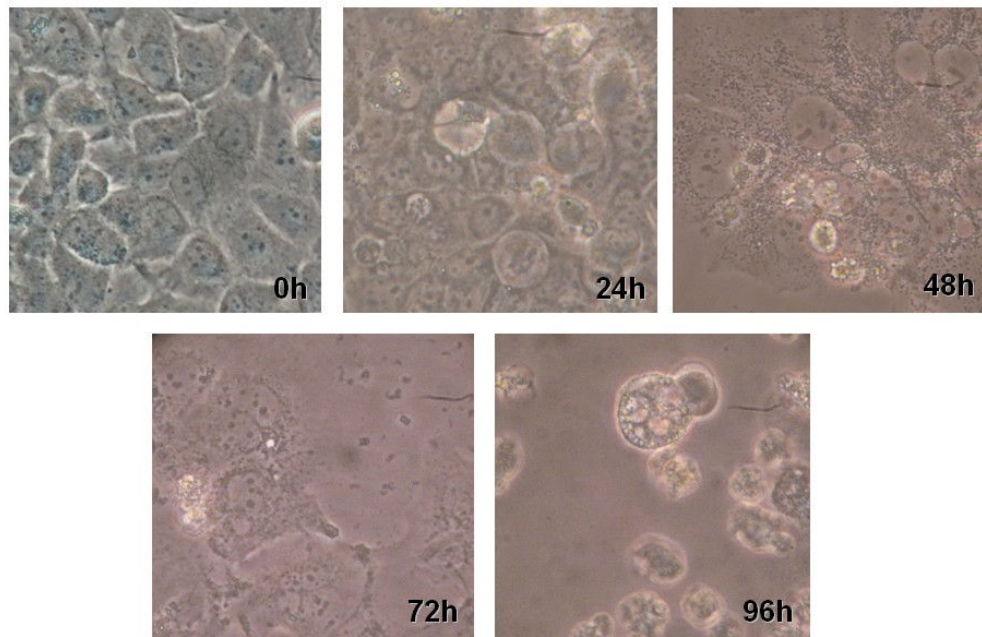
DENV-2 resulta ser más agresivo con las células Huh-7, mientras que DENV-1 es más tóxico para la línea C6/36. La dosis más alta de los aislados virales originó zonas líticas extensas en los cultivos, 24 horas post-infección. DENV-2 fue capaz de destruir la monocapa celular a las 48 horas post-infección con el inóculo de 100  $\mu$ L.



Los cambios ocasionados por ambos serotipos virales correspondieron con los observados en la línea C6/36: En este tiempo hubo una granulación intensa en las células, además de que comenzaron a formarse vacuolas. En general se observaron grandes zonas con fusión y la presencia de mucho detrito celular, siendo esto indicativo de la lisis que genera el virus. Los pozos infectados con diluciones 1:10 y 1:100 mostraron daño celular hasta las 96 horas. Las figuras 23 y 24 corresponden a diferentes tiempos empleando una alícuota de 50  $\mu$ L del aislado viral completo en una monocapa celular de Huh-7.



**Figura 24.** Infección de células Huh-7 con DENV-1 (40X)



**Figura 25.** Infección de células Huh-7 con DENV-2. (40X)

### 7.5. Definición de la dosis viral infecciosa.

Para poder realizar experimentos con reproducibilidad fue necesario realizar una estandarización del número de partículas virales a emplear por experimento. Por simplicidad se definió una dosis infecciosa para cultivo celular (TCID, *Tissue Culture Infective Dose*), basándonos en los resultados de los experimentos de infección de células Huh-7 con virus del dengue. <sup>134</sup>

TCID indica el volumen de aislado viral que se requiere para observar un cambio en el cultivo celular.[D1, D3] Como cualquier medida de cuantificación viral es dependiente de la cantidad de células sembradas para infectar y para obtener resultados reproducibles, se debe trabajar con el mismo lote de aislado viral. El parámetro característico en virología clásica es TCID<sub>50</sub>, que indica el volumen de un aislado viral que es necesario para matar u observar un efecto citopático en el 50% de una serie de cultivos celulares realizados bajo las mismas



condiciones.<sup>135</sup> La TCID<sub>50</sub>, se emplea principalmente para virus cuyo cultivo y cuantificación resultan difíciles, como los virus de la influenza.

136

Los silenciamientos con RNAi en general requieren un máximo aproximado de 36-72 horas para realizar la evaluación de la reducción génica, por lo tanto la dosis viral a emplear debe poder infectar la monocapa y mantenerla viable durante 3 días. Los volúmenes de aislado viral trabajados en las infecciones iniciales de células Huh-7 indicaron que de 50 µL de los aislados virales de DENV 1 y 2 destruyen la monocapa celular a las 96 horas, mientras que de 75 a 100 µL destruyen la monocapa entre 24 y 48 horas.

Considerando que para los experimentos de infección se sembraron un máximo de 650000 células por pozo, corresponde que a cada célula se le está tratando con  $3.84 \times 10^{-5}$  µL de aislado viral, mientras que una dosis de 100 µL involucra que a cada célula de la monocapa le corresponden  $1.53 \times 10^{-4}$  µL del aislado.

Definimos por lo tanto dos dosis infecciosas:

- **Dosis infecciosa estándar o normal:** Volumen de aislado viral que tiene la capacidad de infectar al cultivo celular sin destruir la monocapa antes de las 96 horas.
- **Dosis infecciosa letal (TCID<sub>100</sub>):** Volumen de aislado viral que tiene la capacidad para destruir la monocapa celular en un periodo de 24 horas.



Los experimentos de infección de Huh-7 con dengue se realizaron todos con el mismo vial de aislado viral, tanto para DENV-1 como para DENV-2, pertenecientes al lote cosechado el día 5 de abril del año 2010. La dosis infecciosa letal se definió para utilizarla como control positivo de infección.

### 7.6. Experimentos de silenciamiento génico.

El silenciamiento de APC y HSP90 se realizó en células Huh-7 siguiendo las recomendaciones del kit Silencer II, que se basa en transfección reversa de los siRNA. Los resultados del silenciamiento de APC se muestran en la figura 25. Para silenciar APC se trabajó con los siRNA 1433 y 1435 por separado y en combinación. Debido a que estos dos siRNA se encontraban validados, se decidió utilizar la concentración final de 5 nM recomendada por el proveedor en el inserto.

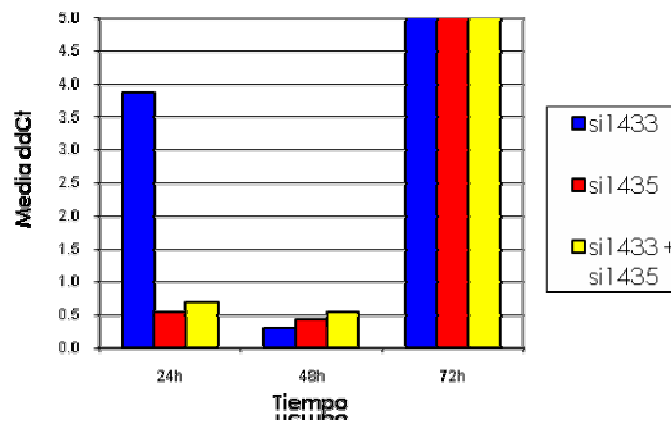
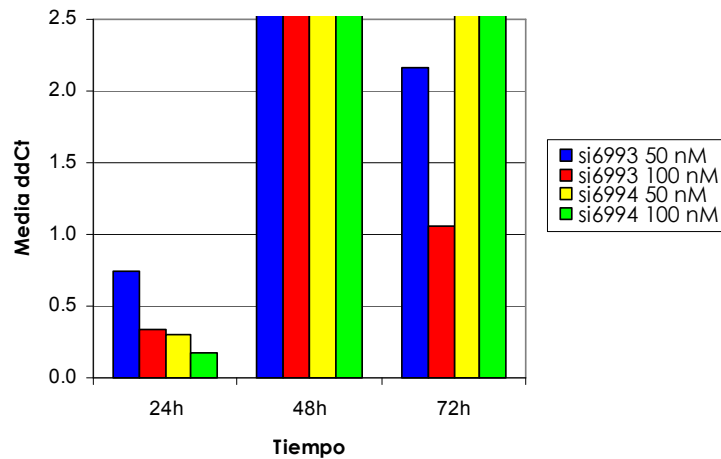


Figura 26. Resultados de la evaluación del silenciamiento de APC.

La figura 25 muestra la gráfica de los  $\Delta\Delta C_t$  obtenidos al analizar los RNA totales de cada experimento para APC por tiempo real. Se observa que a la concentración final de 5 nM, los tres tratamientos fueron capaces de disminuir la expresión del gen. Los RNAi por separado parecen ser más



eficientes que al realizar la transfección con ambos de forma simultánea. Sin embargo el silenciamiento parece no mantenerse a las 72 horas.



**Figura 27.** Resultados de la evaluación del silenciamiento de HSP90.

En el caso de HSP90, los RNAi si6993 y si6994 no se encontraban validados, por lo tanto se decidió experimentar con ellos únicamente por separado y a las concentraciones finales de 50 y 100 nM, ya que es a estos valores que en el laboratorio se han obtenido resultados exitosos en el silenciamiento génico con otros RNA de interferencia.

Para HSP90 (Figura 26) se observó que el RNAi más eficiente fue el si6994 a la concentración de 100 nM, aunque con los otros tratamientos también se logró la reducción de la expresión génica. Es interesante observar que a las 48 horas se pierde por completo el efecto del silenciamiento. Se pudiera pensar que al tratarse HSP90 de un gen que resulta imprescindible para la viabilidad celular eucarionte, el sistema de cultivo pudiera entrar en crisis y llevar a cabo algún mecanismo de rescate de forma simultánea a una posible degradación del oligo. Por lo tanto, con los experimentos de silenciamiento génico se pudo observar



que la reducción en la expresión de APC se logró a las 48 horas post-transfección y para HSP90 a las 24 horas post-transfección.

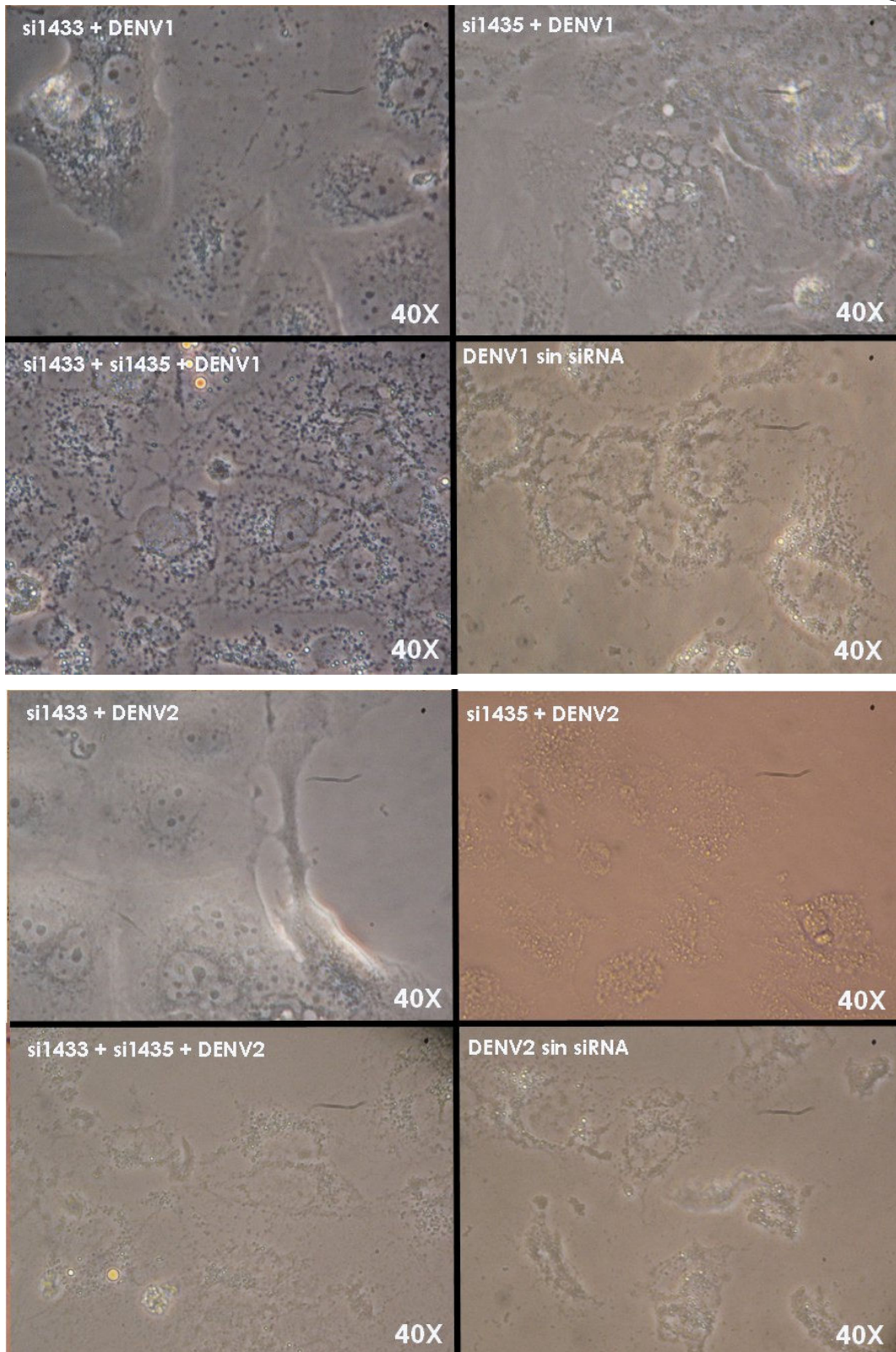
## **7.7. Experimentos de infección viral en cultivos silenciados.**

### **7.7.1. Silenciamiento de APC**

Al comparar la morfología de las células infectadas con DENV-1/DENV-2 con la expresión normal de APC, contra aquellas células que fueron infectadas en y con expresión reducida de APC, se observa que la monocapa celular presenta un mayor número de células adheridas a la botella de cultivo cuando el gen se encuentra silenciado (Figura 27).

Aunque en ambos experimentos se observa lisis celular, formación de vacuolas, granulación extensiva y fusión celular con estructuras sinciciales, los cultivos donde APC se expresa de forma normal tienen un grado de lisis mucho más significativo y notorio que los cultivos con el gen silenciado.

No se puede decir que la reducción en la expresión de APC reduzca el daño que el virus del dengue causa sobre las células Huh-7, puesto que en cultivos silenciados hay un alto efecto citopático: las células se ven fusionadas formando estructuras denominadas 'células gigantes', de forma similar a como sucede en los cultivos del virus del ojo azul.<sup>137</sup> Esto es especialmente más notorio en los cultivos infectados con DENV-2, debido a que en los cultivos sin silenciar ese gen, la monocapa tiene un alto grado de daño, presentando extensas zonas de lisis celular.



**Figura 28.** Cultivos con APC silenciado infectados con DENV1 o DENV2.

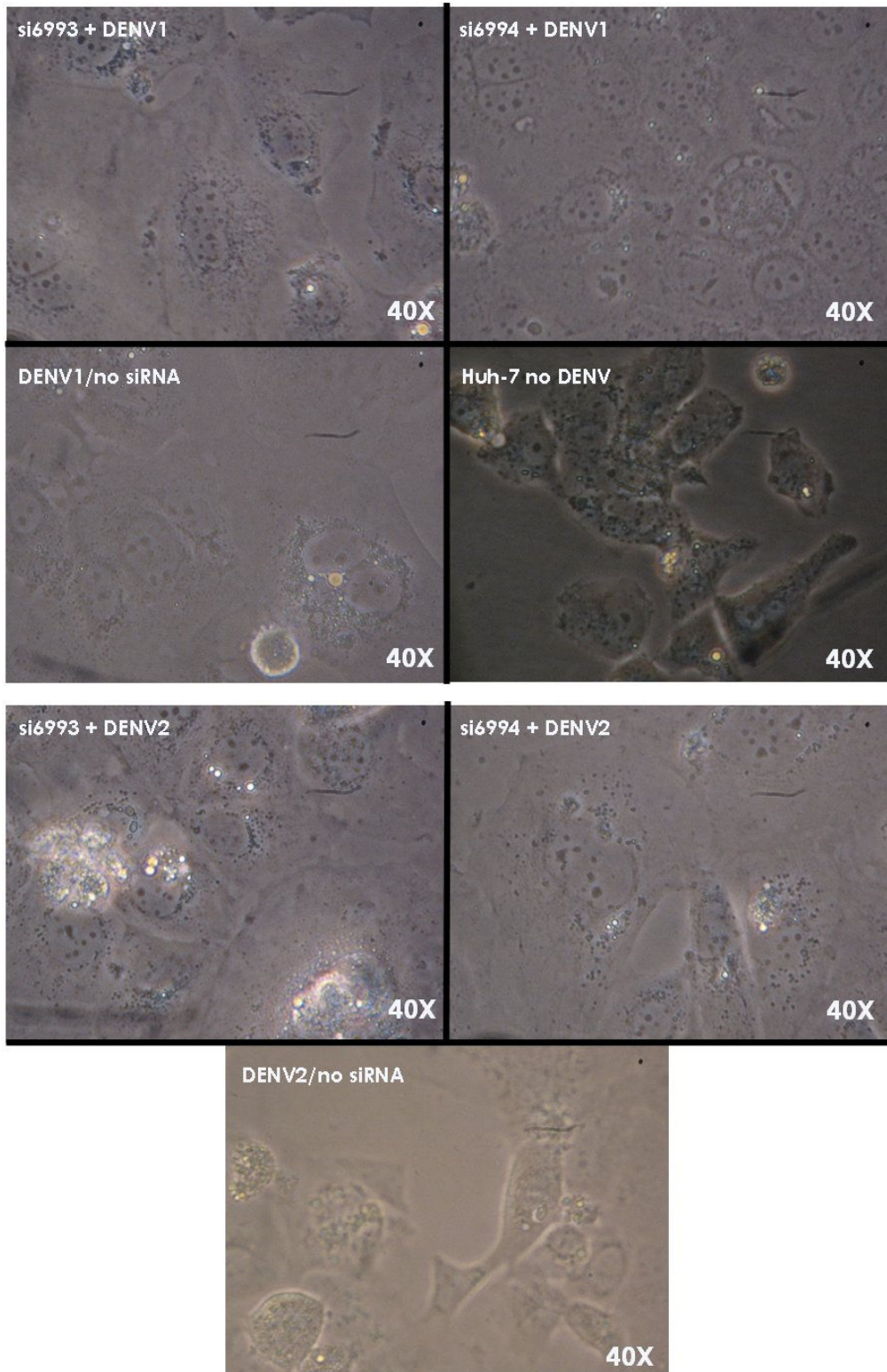


Figura 29. Cultivos con HSP90 silenciado infectados con DENV1 o DENV2.



### **7.7.2. Silenciamiento de HSP90.**

La figura 28 muestra las fotografías del experimento de reducción de la expresión de HSP90 e infección con virus del dengue. Como era de esperarse, la reducción en la expresión de HSP90 ocasionó una infección menos agresiva en comparación con los cultivos celulares en los cuales la expresión génica era basal. En los cultivos con HSP90 silenciado se observó una menor formación de vacuolas y granulación en comparación con los cultivos no silenciados.

En todos los casos con silenciamiento de HSP90 la monocapa celular se mantuvo casi íntegra, aunque se encontraron zonas en las cuales la fusión celular resultaba abundante. No se presentó el mismo grado de lisis celular en los cultivos silenciados. En el pozo de la placa de cultivo en la cual se colocó la TCID letal, la monocapa celular estaba totalmente destruida.

Los resultados coinciden con los reportes que indican que HSP90 es parte del receptor celular para el virus del dengue: Si HSP90 se encuentra ausente, las partículas virales no podrían ser endocitadas por la célula del hospedero. En nuestro experimento concluimos que la reducción en la expresión génica de HSP90, concurda con una reducción en el impacto de la infección viral sobre cultivos de células Huh-7.



## Capítulo VIII

### DISCUSIÓN

El dengue es un problema creciente de salud pública que afecta a más de 100 países en el mundo, con más de 50 millones de casos informados cada año, incluidos 500.000 hospitalizaciones y alrededor de 20.000 defunciones. Los cuatro serotipos virales, están circulando de forma simultánea en el continente Americano, con una incidencia en aumento de forma explosiva.<sup>10</sup>

Según la OPS, el incremento de los viajes aéreos, las condiciones climáticas, la urbanización no planificada, las dificultades en el abastecimiento de agua, sumados al deterioro de los programas de control del vector, la carencia de insecticidas con buena relación de costo/efectividad y la falta de educación sanitaria son algunos de los factores relacionados a la diseminación del *Aedes aegypti* y al incremento en la circulación de los cuatro serotipos del virus.<sup>138</sup>

La falta de tratamiento y profilaxis señala la necesidad primaria de la búsqueda de principios activos que tengan la capacidad de interferir con la replicación viral para poder evitar la evolución de una fiebre autolimitada a un síndrome hemorrágico. Por lo tanto es de fundamental importancia el estudio de aquellos factores que se encuentran involucrados en el proceso de replicación viral empleando sistemas de estudio *in vitro*.

Al comienzo de la realización del presente trabajo de tesis, en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, UANL, no contábamos



con el sistema de cultivo viral para dengue. Con la colaboración del equipo de trabajo de la Dra. María Alba Loroño Pino, especialmente por parte de la Q.F.B. Elsy del Pilar Rosado Paredes, logramos trasladar la técnica y adaptarla a las condiciones particulares de un nuevo laboratorio.<sup>19</sup>

Las células se trasladaron en cultivo activo junto con los virus, y estuvieron expuestas a una temperatura ambiental de 29 °C (registrados para Mérida, Yucatán, el día 6 de marzo del 2010), para llegar a Monterrey, N.L. a un medio a 10 °C (registrados el día 7 de marzo del 2010) después de un vuelo de 3 horas bajo los cambios de presión inherentes al viaje en avión.

Las células tardaron alrededor de dos semanas en recuperar la velocidad de división observada al trabajarlas en Yucatán. Estableciendo el banco de células para cultivo y el banco de prototipos virales amplificados. Así nos convertimos en el primer laboratorio en el norte del país en tener montada y funcional la técnica de cultivo del virus del dengue.

Con la primera cosecha viral, confirmamos que los serotipos del DENV amplificados en células C6/36 a partir de sueros de pacientes víremicos mantienen su potencial infeccioso. Es de suma importancia asegurar que la muestra del paciente debe tener máximo 5 días después de la aparición de la sintomatología para tener una mayor probabilidad de capturar partículas virales en el periodo de viremia activa. Observamos que aunque las cosechas virales iniciales no alcanzaron los 15 días estandarizados, pudo haberse debido a que el inóculo viral con el suero del paciente fuera muy alto para la cantidad de células en monocapa en los tubos de cultivo de fondo plano.



Sin embargo, al momento de reproducir la infección viral en cultivos realizados en botellas de 25 cm<sup>2</sup>, logramos replicar también los tiempos de cosecha viral aprendidos en Mérida, además de confirmar los serotipos estudiados (DENV-1 y DENV-2) por métodos moleculares, correspondiendo los resultados obtenidos por PCR con los tamaños de los amplicones serotipo-específicos reportados por Lanciotti y colaboradores.<sup>62</sup>

La infección en las células Huh-7 fue reproducible, usando los mismos lotes de aislados virales para realizar la infección, se observó efecto citopático dependiente del volumen de aislado viral empleado y del tiempo de incubación de los cultivos para promover la amplificación viral. Sin embargo se requiere realizar una cuantificación absoluta de la multiplicidad de infección para cada lote de virus.

El silenciamiento génico empleando RNAs de interferencia dirigidos contra los mensajeros de APC y HSP90 fue exitoso. Sin embargo en ambos casos se observó una sobre-expresión en el sistema celular a las 72 horas para APC y a las 48 horas para HSP90. Aunque no existen referencias de estos sucesos, por lo que es importante considerar que estos dos genes se encuentren involucrados en múltiples procesos celulares y resulten de gran importancia para el sistema celular, por lo que pudiera ser necesario montar una respuesta compensatoria a la disminución de la expresión génica.

Probablemente tenga lugar algún mecanismo que resulte en una sobre expresión de ambos genes. Es posible que también pudiera verse involucrada la degradación de los RNAi. Para los efectos de esta tesis, la definición de los tiempos de silenciamiento génico sostenido observados para APC y HSP90 fue suficiente para enfrentar al sistema silenciado al proceso de infección viral.<sup>100</sup>



Nuestros resultados preliminares sugieren que el gen APC y/o sus productos son importantes para inducir la infección celular por el DENV (serotipos 1 y 2) en células Huh-7. Considerando que APC es necesario para múltiples procesos celulares, es interesante observar que su ausencia ocasione una infección severa pero sin lisis exacerbada en comparación de aquellos cultivos donde el nivel de expresión de APC es basal.

No existen referencias previas fuera del estudio a gran escala del grupo de Sessions <sup>100</sup>, que indiquen que el gen APC participe en los procesos de infección por dengue, aunque se ha reportado que el VHB codifica una proteína capaz de interactuar con el gen APC, bloqueando el sitio de unión a  $\beta$ -catenina, activando la señalización mediada por Wnt.<sup>112</sup> Deberán realizarse experimentos adicionales para confirmar la participación de APC en la infección por el DENV.

En los cultivos (serotipos 1 y 2) en donde se ha disminuido la expresión del gen HSP90, el virus causa menor lisis celular en comparación con las células donde la expresión del gen es basal. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Del Ángel y cols. <sup>123, 124, 125</sup> quienes describieron a HSP90 como parte del receptor del virus del Dengue en células C6/36.

Se ha reportado que en células hepáticas HepG2 la entrada del virus es independiente de las proteínas de choque térmico HSP70 y 90 <sup>139</sup>, mientras que nosotros observamos que en la línea Huh-7, que es la misma que Sessions y col. <sup>100</sup> emplearon para hacer el monitoreo de factores humanos involucrados con la infección viral, al reducir la expresión génica de HSP90, la severidad de la infección disminuye,



llegándose a observar algunos campos en el microscopio que parecen no tener alteraciones morfológicas.

Sessions y cols. <sup>100</sup> señalaron a APC y HSP90 como posibles factores del hospedero participantes en el proceso de infección viral. Los resultados preliminares de la presente tesis son coherentes con sus hallazgos experimentales con DENV-2. Adicionalmente nuestros resultados sugieren el mismo comportamiento para el DENV-1. Sin embargo, es necesario realizar la cuantificación absoluta del número de partículas virales obtenidas y el estudio de infectividad de las partículas virales obtenidas después de silenciar los cultivos de Huh-7. Desconocemos la forma en la cual la disminución génica alteró la producción de partículas virales o si se modificó su potencial infeccioso.



## Capítulo IX

### CONCLUSIONES

1. Estandarizamos el sistema de cultivo de la línea celular C6/36 y su infección con sueros humanos o sobrenadantes de cultivo celular que contenían partículas de DENV.
2. Establecimos el sistema de infección en la línea Huh-7 como un modelo de estudio disponible para la evaluación de la patogenicidad del DENV y replicación viral.
3. Existen diferencias en los tiempos de crecimiento de los cuatro serotipos del virus del Dengue cultivados: DENV 3 y 4 tardan más tiempo para crecer que DENV 1 y 2.
4. Durante la infección de células C6/36 con los serotipos 1 y 2 del virus del Dengue, se observó que el serotipo 1 es más lítico, mientras que para las células de hepatocitos Huh-7 fué más lítico el serotipo 2.
5. Los resultados preliminares sugieren la participación de los genes APC y HSP90 en el proceso de infección viral para los serotipos 1 y 2 del DENV. También sugieren que APC pudiera estar regulado por el virus para lisar la célula hospedera.
6. Los resultados preliminares obtenidos con el silenciamiento del gen HSP90 son similares a aquellos publicados por Del Ángel y cols., donde se le identifica como parte del receptor viral.



## Capítulo X

### PERSPECTIVAS

1. Cuantificación de la carga viral por PCR tiempo real, y de NS1 del DENV usando como base las secuencias de cada serotipo.
2. Conocer la carga viral de los aislados cosechados en los experimentos de silenciamiento-infección, para poder conocer el número de partículas virales producidas y si el tratamiento con los RNAs de interferencia modificó las cantidades producidas.
3. Se requiere terminar de estandarizar la metodología de formación de placas virales para conocer si el número de partículas virales viables se modifica después de la reducción de la expresión de los genes estudiados.



## Capítulo XI

### BIBLIOGRAFÍA

- 1 San Martin, J. L., O. Brathwaite, et al. (2010). "The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality." *Am J Trop Med Hyg* 82(1): 128-135.
- 2 Teysou, R. (2009). "Dengue fever: from disease to vaccination." *Med Trop (Mars)* 69(4): 333-334.
- 3 Guzman MG and Kouri G. (2002) "Dengue: an update". *Lancet Infect Dis.* 2(1): 33-42.
- 4 Dengue fever Essential Data. CBWInfo Inc. 1999. <http://www.cbwinfo.com/Biological/Pathogens/DENV.html> (consultada en diciembre, 2010).
- 5 (2006) "Dengue Etymology" *Emerging Infectious Diseases*, 12(6): 893. <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol12no06/pdfs/etymology.pdf>.
- 6 Barrett AD, Stanberry LR (2009). Vaccines for biodefense and emerging and neglected diseases. San Diego: Academic. pp. 287-323
- 7 Halstead, Scott B. (2008). Dengue (Tropical Medicine: Science and Practice). River Edge, N.J: Imperial College Press. pp. 1-10.
- 8 Programa de Acción Específico para Dengue 2007-2010. Secretaría de Salud. CENAVECE. México.
- 9 Esler, D. (2009). "Dengue - Clinical and public health ramifications." *Aust Fam Physician* 38(11): 876-879.
- 10 Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. (2009). Organización Mundial de la salud
- 11 Secretaría de Salud. Manual para la prevención y control del dengue. México, 2002.
- 12 WHO. "Dengue fever and dengue haemorrhagic fever prevention and control. World Health Assembly Resolution WHA55.17, adopted by the 55th World Health Assembly", (2002) ([http://www.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA55/ewha5517.pdf](http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA55/ewha5517.pdf)).
- 13 WHO. "Dengue and dengue haemorrhagic fever. Factsheet No 117", revised May 2008. Geneva, (2008) World Health Organization (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>)
- 14 WHO. "Revision of the International Health Regulations. World Health Assembly Resolution WHA58.3, adopted by the 58th World Health Assembly", (2005) ([http://www.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA58/WHA58\\_3-en.pdf](http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA58/WHA58_3-en.pdf)).
- 15 Badii, M.H.J., Landeros, J., Cerna, E., Abreu, J.L. (2007) "Bionomía y epidemiología del dengue". *Daena International Journal of good conscience*, 2(2)
- 16 <http://cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue/serotiposcirculantes.html>
- 17 <http://cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue/porcentajeserotipos.html>
- 18 "Panorama epidemiológico de fiebre de dengue y fiebre hemorrágica por dengue en entidades federativas". Semana 49 del año 2010. Secretaría de Salud, México.
- 19 Lorono-Pino, M. A., Farfan-Ale, J. A. et al. (2004). "Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico." *Am J Trop Med Hyg*, 71(4): 485-492
- 20 CENAVECE Situación de Dengue en México, 2009. <http://cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue/situacionmexico.html>



- 21 Chambers, T.J.; Monath, T.P. *Advances in Virus Research*, vol, 61. The Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development. Elsevier Academic Press, 2003. pp. 235-267.
- 22 Ross, T.M. (2010) "Dengue virus". *Clin Lab Med.*, **30**(1):149-60.
- 23 Buhl, M. R. (2005). "Flavivirus infections: yellow fever, dengue fever and Japanese encephalitis." *Ugeskr Laeger* 167(43): 4076-4080.
- 24 Holmes, E. C. (2006). "The evolutionary biology of dengue virus." *Novartis Found Symp* 277: 177-187; discussion 187-192, 251-173.
- 25 Clyde, K.; Kyle, J.L.; Harris, E. (2006) "Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis" *J. Virol.*, **80** (23), 11418–11431
- 26 Tomlinson SM, Malmstrom RD, Watowich SJ. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. *Infect Disord Drug Targets*. 2009 Jun;9(3):327-43.
- 27 Lindenbach, B. D.; C. M. Rice (2003). "Molecular biology of flaviviruses." *Adv Virus Res.* **59**: 23-61.
- 28 Teoh, P. G., A. S. Ooi, et al. (2009). "Virus-specific read-through codon preference affects infectivity of chimeric cucumber green mottle mosaic viruses displaying a dengue virus epitope." *J Biomed Biotechnol* 2009: 781712.
- 29 van der Schaar, H. M. (2009). "Cell entry mechanisms of Dengue virus", *Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis*, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. Halstead SB, Heinz FX, Barrett AD, Roehrig JT. *Vaccine*. 2005 Jan 4;23(7):849-56.
- 30 Heinz, F. X. (1994). "Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM." *Virology*, **198**: 109-117.
- 31 Acosta, E. G., V. Castilla, et al. (2008). "Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis." *J Gen Virol* **89**(Pt 2): 474-484
- 32 Garcia-Montalvo, B. M., F. Medina, et al. (2004). "La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA." *Virus Res* **102**(2): 141-150.
- 33 Qin, C. F., T. Jiang, et al. (2005). "[Capsid-targeted viral inactivation for dengue virus infection]." *Wei Sheng Wu Xue Bao* 45(1): 111-115.
- 34 del Angel, R. M. (2006). "Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogenia viral." *Cinvestav revista Julio-Septiembre 2006*: 38-43.
- 35 Jain, S.K., Jain, S. (2005). Molecular mechanism of dengue virus: entry and fusion with target cell. *Indian journal of clinical biochemistry*. **20**(2), 92-103
- 36 Holmes, E.C. (2009) "RNA virus genomics: A world of possibilities". *J Clin Invest.*; **119**(9):2488–2495
- 37 Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva : World Health Organization.  
<http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/print.html>
- 38 Holmes, E.C. "The evolution and emergence of RNA viruses. Oxford Series in Ecology and Evolution".(2009) P.H. Harvey, and R.M. May, editors. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- 39 Dhananjeyan KJ, Paramasivan R, Tewari SC, Rajendran R, Thenmozhi V, Victor Jerald LS, Venkatesh A, Tyagi BK.  
"Molecular identification of mosquito vectors using genomic DNA isolated from eggshells, larval and pupal exuvium." *Trop Biomed*. 2010 Apr;27(1):47-53.
- 40 Lifson AR. "Mosquitoes, models, and dengue." *Lancet*. 1996 May 4;347(9010):1201-2.
- 41 Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, and Murphy BR. (2007) Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews Microbiology*. **5**: 518-528.



- 43 Chakraborty, T. (2008) Dengue Fever and other Hemorrhagic viruses. Chelsea House, Infobase publishing. pp.20-23.
- 44 Azevedo LS, Carvalho DB, Matuck T, et al. (2007) "Dengue in renal transplant patients: a retrospective analysis". *Transplantation*. **84**:792–794.
- 45 Chen LH, Wilson ME. (2004) "Transmission of dengue virus without a mosquito vector: nosocomial mucocutaneous transmission and other routes of transmission". *Clin Infect Dis*. **39**(6):e56-60.
- 46 Chen LH, Wilson ME. (2005) Nosocomial dengue by mucocutaneous transmission. *Emerg Infect Dis*, **11**(5):775.
- 47 de Wazières B, Gil H, Vuitton DA, Dupond JL. (1998) "Nosocomial transmission of dengue from a needlestick injury". *Lancet*. **351**(9101):498.
- 48 CDC Traveler's yellow book. Dengue fever. <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-5/dengue-fever-dengue-hemorrhagic-fever.aspx>
- 49 Apisarnthanarak A, Mundy LM. (2009) "Is dengue virus infection an occupational health problem?" *Clin Infect Dis*. **48**(1):135-7.
- 50 Teo, D. Ng, L.C. Lam, S. (2009) "Is dengue a threat to the blood supply?" *Transfus Med*, **19**(2): 66–77.
- 51 Vertical transmission of dengue: first case report from Bangladesh. Fatimil LE et al. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. (2003)
- 52 Tan PC, Rajasingam G, Devi S, Omar SZ. (2008) "Dengue infection in pregnancy: prevalence, vertical transmission, and pregnancy outcome". *Obstet Gynecol*. **111**(5):1111-7.
- 53 Kalayanarooj, S. et al. (1997) "Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness". *Journal of Infectious Diseases*, **176**:313–321.
- 54 Srikiatkachorn, A. et al. (2007) "Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonic study". *Pediatric Infectious Disease Journal*, **26**(4):283–290.
- 55 The need for more evidence in the treatment of dengue hemorrhagic fever and shock syndromes. Khilnani P. *Pediatr Crit Care Med*. 2011 Jan; **12**(1):116-7.
- 56 Nimmannitya, S. et al. (1969) "Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962–64. Observations on hospitalized patients with haemorrhagic fever". *Am. J. Trop. Hyg.*, **18**(6):954-971.
- 57 Martínez-Torres E.; Polanco-Anaya A.C.; Pleites-Sandoval E.B. (2008) "Why and how children with dengue die? ". *Revista cubana de medicina tropical*, **60**(1):40–47.
- 58 Nimmannitya S. (1987) "Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever". *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **18**(3):392–397.
- 59 Gubler DJ, Kuno G, eds. (1997) Dengue and dengue hemorrhagic fever. New York, CAB International, 313–333.
- 60 Shu PY, Huang JH. Current advances in dengue diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2004, **11**(4):642–650.
- 61 Lanciotti RS. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. *Adv Virus Res*. 2003; **61**:67-99. Review.
- 62 Lanciotti RS et al. (1992) "Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction". *Journal of Clinical Microbiology*, **30**:545–551.
- 63 Harris E et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single tube multiplex reverse transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, **36**:2634–2639.
- 64 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 Oct; **43**(10):4977-83.



- 65 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 Apr;44(4):1295-304.
- 66 Nonstructural protein NS1: giving a new structure to dengue diagnosis. Singh MP, Goyal K, Ratho RK. *J Clin Microbiol.* 2010 Dec;48(12):4688
- 67 NS1 antigen as an early diagnostic marker in dengue: report from India. Singh MP, Majumdar M, Singh G, Goyal K, Preet K, Sarwal A, Mishra B, Ratho RK. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010 Sep;68(1):50-4.
- 68 Huhtamo E, Hasu E, Uzcátegui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, Vapalahti O, Piiparinen H. Early diagnosis of dengue in travelers: comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. *BJ Clin Virol.* 2010 Jan;47(1):49-53. Epub 2009 Dec 5.
- 69 Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *Journal of Virological Methods,* 1991, 33:101–113.
- 70 Shu PY et al. Comparison of a capture immunoglobulin M (IgM) and IgG ELISA and non-structural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology,*
- 71 Vazquez S et al. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *Journal of Clinical Virology,* 2005, 33(2):132–137.
- 72 Fernandez RJ, Vazquez S. Serological diagnosis of dengue by an ELISA inhibition method (EIM). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,* 1990, 85(3):347-351.
- 73 Chanama S et al. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. *Journal of Clinical Virology,* 2004, 31:185–189.
- 74 Falconar AK, de Plata E, Romero-Vivas CM. Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM)/IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. *Clinical and Vaccine Immunology,* 2006, 13:1044–1051.
- 75 Teles FS. Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: A review. *Anal Chim Acta.* 2011 Feb 14;687(1):28-42. Epub 2010 Dec 15.
- 76 Dung NM, Day NP, Tam DT. (1999) "Fluid replacement in dengue shock syndrome: a randomized, double-blind comparison of four intravenous-fluid regimens". *Clinical Infectious Diseases,* 29:787–794.
- 77 Ngo NT, Cao XT, Kneen R. (2001) "Acute management of dengue shock syndrome: a randomized double-blind comparison of 4 intravenous fluid regimens in the first hour". *Clinical Infectious Diseases,* 32:204–213.
- 78 Wills BA et al. (2005) "Comparison of three fluid solutions for resuscitation in dengue shock syndrome". *New England Journal of Medicine,* , 353:877–889.
- 79 Dengue. Sitio web de la Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León. México. [http://www.nl.gob.mx/?P=salud\\_familia\\_enf\\_dengue](http://www.nl.gob.mx/?P=salud_familia_enf_dengue)
- 80 Blaney JE Jr, Durbin AP, Murphy BR, Whitehead SS. (2006) "Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics". *Viral Immunol. Spring;*19(1):10-32.
- 81 Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. (2007) Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* Jul;5(7):518-28.
- 82 Kinney RM, Huang CY.(2001) Development of new vaccines against dengue fever and Japanese encephalitis. *Intervirology.,* 44(2-3):176-97.
- 83 Andoh, T. (1998). "Effect of bafilomycin A1 on the growth of Japanese encephalitis virus in Vero Cells." *J. Neurovirol.* 4: 627-631.



- 84 Chapel, C. (2006). "Antiviral effect of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors on viral morphogenesis and binding properties of hepatitis C-like virus-like particles." *J. Gen. Virol.* 87: 861-871.
- 85 Yin, Z., Y. L. Chen, et al. (2009). "An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(48): 20435-20439.
- 86 Singhi, S., N. Kissoon, et al. (2007). "Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit." *J Pediatr (Rio J)* 83(2 Suppl): S22-35.
- 87 Ahluwalia, G. and S. K. Sharma (2004). "Dengue: current trends and challenges--an Indian perspective." *J Assoc Physicians India* 52: 561-563.
- 88 Bartenschlager, R. and S. Miller (2008). "Molecular aspects of Dengue virus replication." *Future Microbiol* 3: 155-165.
- 89 Placheril, J. G. (2004). "Dengue fever: diagnosis, prevention & control." *Nurs J India* 95(12): 281-284
- 90 Guzman, M. G. and G. Kouri (2009). "Dengue in Cuba: research strategy to support dengue control." *Lancet* 374(9702): 1660-1661.
- 91 Mazzon, M., M. Jones, et al. (2009). "Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation." *J Infect Dis* 200(8): 1261-1270.
- 92 Durbin, A. P. and S. S. Whitehead (2010). "Dengue vaccine candidates in development." *Curr Top Microbiol Immunol* 338: 129-143
- 93 Rodriguez Rodriguez, D., M. Garza Rodriguez, et al. (2009). "Dengue virus antibodies in blood donors from an endemic area." *Transfus Med* 19(3): 125-131.
- 94 de Lourdes Garza Rodriguez, M., D. R. Rodriguez Rodriguez, et al. (2009). "Serologic Surveillance for West Nile Virus and Other Flaviviruses in Febrile Patients, Encephalitic Patients, and Asymptomatic Blood Donors in Northern Mexico." *Vector Borne Zoonotic Dis.* doi:10.1089/vbz.2008.0203
- 95 Lorono-Pino, M. A., J. A. Farfan-Ale, et al. (2004). "Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico." *Am J Trop Med Hyg* 71(4): 485-492.
- 96 Cuddehe, M. (2009). "Mexico fights rise in dengue fever." *Lancet* 374(9690): 602
- 97 Tapia-Conyer, R., J. F. Mendez-Galvan, et al. (2009). "The growing burden of dengue in Latin America." *J Clin Virol* 46 Suppl 2: S3-6.
- 98 Balmaseda, A., S. N. Hammond, et al. (2006). "Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue." *Am J Trop Med Hyg* 74(3): 449-456.
- 99 Rico-Hesse, R. (2007). "Dengue virus evolution and virulence models." *Clin Infect Dis* 44(11): 1462-1466.
- 100 Discovery of insect and human dengue virus host factors.  
Sessions OM, Barrows NJ, Souza-Neto JA, Robinson TJ, Hershey CL, Rodgers MA, Ramirez JL, Dimopoulos G, Yang PL, Pearson JL, Garcia-Blanco MA.  
*Nature.* 2009 Apr 23;458(7241):1047-50.
- 101 RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. Krishnan MN, Ng A, Sukumaran B, Gilfoy FD, Uchil PD, Sultana H, Brass AL, Adametz R, Tsui M, Qian F, Montgomery RR, Lev S, Mason PW, Koski RA, Elledge SJ, Xavier RJ, Agaisse H, Fikrig E.  
*Nature.* 2008 Sep 11;455(7210):242-5.
- 102 Karlas A, Machuy N, Shin Y, Pleissner KP, Artarini A, Heuer D, Becker D, Khalil H, Ogilvie LA, Hess S, Mäurer AP, Müller E, Wolff T, Rudel T, Meyer TF.  
Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature.* 2010 Feb 11;463(7282):818-22. Epub 2010 Jan 17.
- 103 Travanty, E. A., Z. N. Adelman, et al. (2004). "Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*." *Insect Biochem Mol Biol* 34(7): 607-613.
- 104 Franz, A. W., I. Sanchez-Vargas, et al. (2006). "Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(11): 4198-4203.



- 105 Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P (August 1991). "Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients". *Science* 253 (5020): 665–9.
- 106 Goss KH, Groden J (2000). "Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor". *J Clin Oncol* 18 (9): 1967–79.
- 107 Nakamura, T; Hamada F, Ishidate T, Anai K, Kawahara K, Toyoshima K, Akiyama T (Jun. 1998). "Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, interacts with beta-catenin, GSK-3beta and APC and reduces the beta-catenin level". *Genes Cells* 3 (6): 395–403.
- 108 Esquema adaptado de Gilbert, S. *Developmental Biology*, 9th Edition. <http://www.zfic.org/classroom%20experiments/lithiumindex.html>
- 109 Tickenbrock, Lara; Kössmeier Katja, Rehmann Holger, Herrmann Christian, Müller Oliver (Mar. 2003). "Differences between the interaction of beta-catenin with non-phosphorylated and single-mimicked phosphorylated 20-amino acid residue repeats of the APC protein". *J. Mol. Biol.* 327 (2): 359–67
- 110 SD, Bertagnolli MM (December 2009). "Molecular basis of colorectal cancer". *N. Engl. J. Med.* 361 (25): 2449–60
- 111 Rosenberg MM, Yang F, Giovanni M, Mohn J, Temburni MK, Jacob M (2008-06). "Adenomatous polyposis coli plays a key role, in vivo, in coordinating assembly of the neuronal nicotinic postsynaptic complex.". *Molecular and Cellular Neuroscience* 38 (2): 138–152
- 112 Hsieh A, Kim HS, Lim SO, Yu DY, Jung G.(2011) "Hepatitis B viral X protein interacts with tumor suppressor adenomatous polyposis coli to activate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling". *Cancer Lett.* 300(2):162-72.
- 113 The immunosuppressive tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma. Pang YL, Zhang HG, Peng JR, Pang XW, Yu S, Xing Q, Yu X, Gong L, Yin YH, Zhang Y, Chen WF. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Jun;58(6):877-86. Epub 2008 Oct 22.
- 114 Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G (August 1998). "The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review". *Pharmacol. Ther.* 79 (2): 129–68
- 115 Wegele H, Müller L, Buchner J (2004). "Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding". *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 151: 1–44.
- 116 Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (July 1997). "Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone". *Cell* 90 (1): 65–75.
- 117 Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, Sessa WC (May 2002). "Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release". *Circ. Res.* 90 (8): 866–73
- 118 Pratt WB, Toft DO (1 February 2003). "Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery". *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 228 (2): 111–33.
- 119 Pratt WB, Morishima Y, Murphy M, Harrell M (2006). "Chaperoning of glucocorticoid receptors". *Handb Exp Pharmacol* 172 (172): 111–38.
- 120 Whitesell L, Lindquist SL (October 2005). "Hsp90 and the chaperoning of cancer". *Nat. Rev. Cancer* 5 (10): 761–72.
- 121 Lurje G, Lenz HJ (2009). "EGFR Signaling and Drug Discovery". *Oncology* 77 (6): 400–410.
- 122 Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, Sessa WC (May 2002). "Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release". *Circ. Res.* 90 (8): 866–73



- 123 Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. (2005) "Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells". *79*(8):4557-67.
- 124 Chavez-Salinas S, Ceballos-Olvera I, Reyes-Del Valle J, Medina F, Del Angel RM. (2008) "Heat shock effect upon dengue virus replication into U937 cells". *Virus Res.* **138**(1-2):111-8.
- 125 Salas-Benito J, Reyes-Del Valle J, Salas-Benito M, Ceballos-Olvera I, Mosso C, del Angel RM. (2007) "Evidence that the 45-kD glycoprotein, part of a putative dengue virus receptor complex in the mosquito cell line C6/36, is a heat-shock related protein." *Am J Trop Med Hyg.* **77**(2):283-90.
- 126 Cabrera-Hernandez A, Thepparit C, Suksanpaisan L, Smith DR. (2007) "Dengue virus entry into liver (HepG2) cells is independent of hsp90 and hsp70". *J Med Virol.* **79**(4):386-92.
- 127 Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol.* 1978 Sep;40(3):531-44.
- 128 Singh KR, Pavri KM. Experimental studies with chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Acta Virol.* 1967 Nov;11(6):517-26.
- 129 Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. Kuno G, Gubler DJ, Vélez M, Oliver A. *Bull World Health Organ.* 1985;63(2):279-86.
- 130 Técnicas de laboratorio para el diagnóstico y la caracterización del virus del dengue. Instituto de Medicina Tropical 'Dr. Pedro Kouri', La Habana, Cuba. 2003.
- 131 Huh-7 cell line general information  
<http://huh7.com>
- 132 Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium.  
Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. *Cancer Res.* 1982 Sep;42(9):3858-63.
- 133 Japan Cell Bank: Huh-7 cell line data.  
<http://cellbank.nibio.go.jp/celldata/jcra0403.htm>
- 134 Brown WF . (1964), Variance estimation in the Reed-Muench fifty per cent end-point determination. *Am J Hyg.* 1964 Jan;79:37-46.
- 135 Sampling variation of the fifty percent end-point, determined by the Reed-Muench (Behrens) method. PIZZI M. *Hum Biol.* 1950 Sep;22(3):151-90
- 136 Growth of Myxovirus parainfluenza type 3 in organ cultures of guinea pig tissue. Craighead JE. *J Bacteriol.* 1966 Sep;92(3):751-61.
- 137 Reyes-Leyva, J. et. al. (2004) "Characteristics of the immune response of pigs infected with porcine rubulavirus" *Vet. Méx.*, 35(1).
- 138 Retorno del dengue a las Américas, llamada de alerta a los sistemas de vigilancia. Washington, DC, 21 de febrero de 2002 (OPS)  
<http://www.paho.org/Spanish/DPI/100/100feature08.htm>
- 139 Dengue virus entry into liver (HepG2) cells is independent of hsp90 and hsp70. Cabrera-Hernandez A, Thepparit C, Suksanpaisan L, Smith DR. *J Med Virol.* 2007 Apr;79(4):386-92.



## Capítulo XII

### ANEXOS

#### - CULTIVO CELULAR -

#### 1. SUPLEMENTO DE MEDIOS DE CULTIVO

##### Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat. 4488.

##### Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Mechero de Bunsen.
- Pipetor.

##### I. Medio Leibovitz (L-15).

##### Reactivos

- Medio de cultivo Leibovitz (L-15) con *L*-Glutamina. 500 mL. In vitro S.A. cat. ME-040.
- Suero Bovino Fetal. 500 mL. HyClone. Cat. sh30396.03.
- Solución de antibiótico-antimicótico (100X) Penicilina-Estreptomicina-Anfotericina B, 100 mL, In vitro, S.A. Cat. A-07.
- Solución de aminoácidos no esenciales (100X), para medio mínimo esencial de Eagle, 100 mL, In vitro S.A. Cat. SR-05.
- Solución de bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, 100 mL, In vitro S.A.



## Protocolo

a) Medio al 10% SBF para mantenimiento de células C6/36.

Para suplementar 500 mL de medio L-15 al 10%, se requieren 50 mL de suero bovino fetal inactivado, 5.5 mL de solución antibiótico/antimicótico (100X) y 5.5 mL de solución de aminoácidos no esenciales (concentración final 1X). El medio al 10% es el que se debe utilizar para subcultivar.

b) Medio al 2% SBF para infección viral de células C6/36.

El medio de cultivo para infección viral debe estar al 2% con respecto al SBF. A 500 mL de medio L-15 se añaden 10 mL SBF + 5 mL de antibiótico/antimicótico + 5 mL de aminoácidos no esenciales.

## Observaciones

- Es fundamental usar un suero bovino fetal compatible con las células C6/36 (HyClone), Gibco e Invitrogen parecen no dar buenos resultados, observándose como las células comienzan a decaer después del tercer pasaje.
- El volumen de bicarbonato necesario para alcalinizar el medio es empírico dependiendo del lote adquirido: el medio debe tornarse color rojo grosella para poder ser utilizado. En general para 500 mL de medio se añaden 3 mL de solución de bicarbonato y lograr un pH de 7.2.
- El medio de cultivo puede irse alcalinizando con el abrir y cerrar continuo de los frascos que lo contienen. Para acidificar el medio se pueden emplear utilizar unas gotas de HCl 1M esterilizado por filtración con una membrana de 0.22. Mantener el ácido y el bicarbonato en refrigeración a 4°C.



---

## II. Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced-DMEM).

### Reactivos

- Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced DMEM). 500 mL. GIBCO. Cat. 12491015.
- Suero Bovino Fetal. 500 mL. GIBCO. Cat. 16000-044.
- Solución de antibiótico penicilina/estreptomicina 100X. 100 mL. GIBCO. Cat. 15070-063.
- Amino ácidos no esenciales. 10 mM (100X). 100 mL. GIBCO. Cat. 11140-050.
- L-Glutamina. 200 mM (100X). 100 mL. GIBCO. Cat. 25030081.

### Protocolo

a) Medio con 2% de SBF para mantenimiento de células Huh-7.

Para suplementar 500 mL de medio Advanced DMEM al 2% se requieren 10 mL de suero bovino fetal inactivado, 5 mL de amino ácidos no esenciales (100X), 5 mL de solución de antibiótico (100X penicilina/estreptomicina) y 5 mL de L- glutamina (100X).

b) Medio con 1% de SBF para infección viral de células Huh-7.

Para suplementar 500 mL de medio Advanced DMEM al 1% se requiere 1 mL de suero bovino fetal inactivado, 5 mL de amino ácidos no esenciales (100X), 5 mL de solución de antibiótico (100X penicilina/estreptomicina) y 5 mL de L- glutamina (100X).



---

## 2. MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES.

### Fundamento

El subcultivo provee la oportunidad para expandir la población celular total, aplicar presión selectiva empleando en el medio un agente de selección y permitir la generación de cultivos réplica para caracterización, experimentación, preservación y congelación. Cuando el cultivo se encuentra aproximadamente al 90% de confluencia, es necesario realizar su subcultivo para asegurar la formación de monocapas y evitar los cúmulos celulares. Los pasajes permiten mantener limpio el medio de cultivo y evitar la aglomeración de células, permitiendo que cada unidad de la monocapa reciba la misma concentración de nutrientes y se encuentre expuesta a las mismas condiciones que las demás células.

### Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat. 4488.
- Pipetas serológicas de 2 mL. Marca Fisherbrand. Cat. 13-678-11C.
- Botellas para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>.
  - c) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430639.
  - d) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430168.
- Botellas para cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>.
  - c) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430641.
  - d) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430199.
- Raspadores celulares (gendarmes) de 25 cm. Marca Corning. Cat. 3010.
- Pipeta pasteur. Marca Corning. Cat. 101001440.



## Reactivos

- Medio de cultivo
  - a) L-15 suplementado al 5% con suero bovino fetal.
  - b) Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- Solución buffer salino de fosfatos (PBS) 1X.
- Tripsina-EDTA 0.25% 500 mL. Marca GIBCO. Cat. 15050057.
- Solución de bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, 100 mL, In vitro S.A.

## Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Bomba de vacío.
- Centrífuga.
- Incubadora con tanque de CO<sub>2</sub>.
- Incubadora sin tanque de CO<sub>2</sub>.
- Bomba de presión y vacío.

## I. Protocolo para células C6/36

1. Golpear botella confluyente para eliminar células C6/36 que no se encuentren adheridas. Si no se va a dividir el cultivo es innecesario golpear la botella.
2. Decantar medio de cultivo.
3. Añadir medio nuevo a la botella (L-15, 10% SBF. 25 cm<sup>2</sup>: 5 mL medio, 75 cm<sup>2</sup>, 10 mL medio).
4. Golpear botella con medio nuevo. De ser necesario, realizar raspado con gendarme para desprender la mayoría de células. Hacer dilución 1:10 en botellas nuevas o dependiendo de la necesidad de botellas a sembrar.



5. Ajustar volumen final en las botellas subcultivadas (25 cm<sup>2</sup>: 5 mL medio, 75 cm<sup>2</sup>, 10 mL medio).
6. Al cultivo inicial añadir medio fresco y continuar creciendo.
7. Crecer a temperatura ambiente (23-24°C) con la tapa cerrada.
8. La botella sembrada alcanza confluencia entre 5 a 7 días, lo que permite hacer los subcultivos semanalmente.

### Observaciones

- El medio debe estar al 10% con SBF para que las células crezcan.
- El número de pases es indistinto, se puede continuar cultivando a partir de la botella inicial. No tirar botellas a menos que sea necesario.
- Si se desea que las células crezcan más rápido, golpear vigorosamente la botella de cultivo
- Si el pH del medio parece estar ácido (color amarillo) y la botella todavía no está confluyente, se puede alcalinizar a rojo de nuevo añadiendo unos cuantos microlitros de bicarbonato de sodio al 75% estéril.
- Las células C6/36 prefieren el medio ácido cuando se encuentran en división, por lo que no afecta tanto el vire de coloración del medio en comparación con otras líneas celulares.

### II. Protocolo para células Huh-7.

1. Retirar el medio de cultivo viejo por aspiración.
2. Lavar las células con una alícuota de PBS estéril 1X. por cada 25 cm<sup>2</sup> de superficie se debe emplear 1 mL de buffer de lavado. Realizar movimientos circulares para permitir que la solución entre en contacto con todas las unidades de la monocapa y pueda remover la mayor cantidad posible de detrito celular.



3. Retirar el PBS 1X por aspiración.
4. Añadir tripsina. Las células en una botella de 25 cm<sup>2</sup> se levantan con 1 mL de tripsina. Las de una botella de 75 cm<sup>2</sup> se levantan con 3 mL.
5. Incubar a 37°C durante 5 minutos. Procurar no exceder el tiempo para que la enzima no comience a degradar la membrana celular.
6. Neutralizar la actividad de la tripsina adicionando un volumen 1:1 de medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal.
7. Recolectar la suspensión celular en un tubo falcon de 15 mL.
8. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Cuidadosamente retirar el medio de cultivo utilizado para neutralizar la tripsina. Se puede dejar un poco de volumen para no romper el botón celular.
10. Añadir medio de cultivo nuevo dependiendo del tamaño del botón celular obtenido. Generalmente el botón obtenido a partir de una botella semiconfluente de 25 cm<sup>2</sup> requiere ser resuspendido en 3 mL de medio nuevo; mientras que un botón celular proveniente de una botella semiconfluente de 75 cm<sup>2</sup> se puede resuspender en 4 a 5 mL de medio.
11. Resuspender completamente con ayuda de una pipeta de 2 mL (o con una puntilla de 1000 µL) el botón celular en el medio nuevo hasta observar que no hay cúmulos flotando.
12. Preparar la botella de cultivo a sembrar con la cantidad de medio nuevo correspondiente y depositar en ella el volumen deseado de la suspensión celular.
13. Incubar a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>.



## Observaciones

- Las células no deben exponerse más de 10 minutos al PBS 1X y no más de 5 minutos a la tripsina.
- La suspensión celular obtenida al neutralizar la tripsina con medio de cultivo suplementado, se centrifuga para asegurar un nivel de compactación homogéneo. Cuando se disgrega de forma correcta se evita la formación de cúmulos celulares.
- Es recomendable flamear las bocas y las tapas de las botellas de cultivo después de abrir y antes de cerrar para evitar contaminación de su contenido.
- Si se emplean micropipetas automáticas, jamás permitir la entrada del vástago a las botellas, ya sean de cultivo celular o las correspondientes a los reactivos en uso.

### 3. RECUENTO CELULAR

#### Fundamento

La técnica de recuento celular utilizando el hemocitómetro o cámara de Neubauer fue diseñada por Louis-Charles Malasses. El dispositivo consta de una placa de vidrio con una cuadrícula grabada con láser en la cual es posible realizar el recuento de células o partículas en un volumen específico de un fluido. [Strober W (2001). ["Monitoring cell growth". In Coligan JE, Bierer BE, Margulies DH, Sherach EM, Strober W. Current Protocols in Immunology. 5. USA: John Wiley & Sons. p. A.2A.1.]

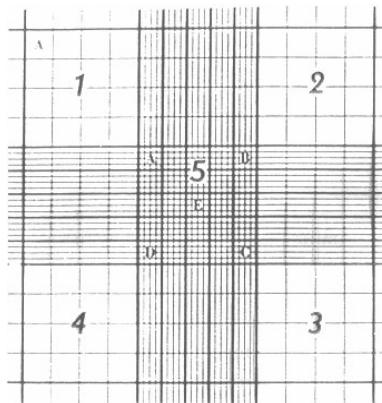


Figura X. Esquema de la cuadrícula de la cámara de Neubauer.

Para facilitar el recuento de células viables se utiliza un colorante vital, el azul tripano. Las células vivas captarán el colorante pero lo expelerán al medio, mientras que las células muertas lo mantendrán en su interior. Generalmente se preparan diluciones 1:4 o 1:8 de la suspensión celular a contabilizar. El resultado se obtiene multiplicando el número de células contadas en la cámara de



neubauer por el valor de la dilución realizada (4 u 8) por el valor del factor de la cámara ( $1 \times 10^4$ ).

### Material

- Tubos eppendorf de 0.2 mL.
- Cultivos de células Huh-7.

### Reactivos

- Medio de cultivo Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- Colorante azul tripano. 100 mL. Marca GIBCO. Cat. 15250-061.

### Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Micropipetas automáticas.
- Cámara de Neubauer.
- Microscopio.
- Incubadora con tanque de CO<sub>2</sub>.

### Protocolo

1. Procesar las botellas de cultivo hasta la resuspensión y disgregación en medio nuevo de las células. Procurar una disgregación completa, sin que el medio presente cúmulos del cultivo flotando o suspendidos.
2. Tomar una alícuota de 60  $\mu$ L de medio de cultivo nuevo y depositarla en un tubo cónico de 200  $\mu$ L.
3. Medir una alícuota de 10  $\mu$ L de la suspensión celular y depositarla en el tubo cónico del 200  $\mu$ L. Procurar homogenizar completamente antes de realizar la medición, puesto que de



forma natural las células precipitan volviendo a formar el botón al fondo del tubo donde se centrifugaron.

4. Medir 10  $\mu\text{L}$  del colorante azul tripano y colocarla en el tubo cónico de 200  $\mu\text{L}$
5. Mezclar con ayuda de una puntilla de 200  $\mu\text{L}$  el volumen del tubo, subiendo y bajando su contenido sin formar burbujas.
6. Depositar 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular con colorante en la cámara de Neubauer.
7. Utilizando el objetivo de 10X en el microscopio, contar el número de células vivas en las cuatro cuadrículas de 4 x 4 de la cámara (Figura X, números 1, 2, 3 y 4). Registrar los números.
  
8. Contar el número de células en el cuadrante central de 5 x 5 (Figura X, número 5). Registrar la cantidad.
9. Realizar el cálculo del total de células empleando la siguiente fórmula:

$$\text{No. células/mL} = (\text{Promedio } 4 \times 4) (\text{Factor de dilución}) (1 \times 10^4)$$

10. El número obtenido con el promedio de las cuadrículas de 4 x 4 debe ser similar al cálculo realizado con el total de células en la cuadrícula central de 5 x 5.
11. Multiplicar el número de células/mL por el volumen en el cual se resuspendieron y disgregaron las células del cultivo para obtener la cantidad total de células producidas.
12. Con respecto al total de células contabilizadas y el volumen total, colocar el volumen correspondiente al número de células deseado en la botella o placa de cultivo.



---

## 4. CONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

### Fundamento

Cuando una línea celular se expande en números suficientes, la congelación de células permite la generación de bancos que pueden almacenarse sin que el material envejezca. De esta forma las células también estarán protegidas de contaminación, fallas en la incubadora o agotamiento del medio de cultivo. Se recomienda congelar  $1 \times 10^6$  –  $1 \times 10^7$  células/mL en suero bovino fetal suplementado con un agente conservador (glicerol o DMSO) a una concentración del 5-10%, para proteger a las membranas del daño causado por los cristales de agua. La congelación debe ser lenta y se recomienda que el almacenamiento final se realice en un tanque de nitrógeno líquido, donde las células pueden permanecer viables durante varios años.

### Material

- Cultivos celulares semiconfluentes.
- Micropipetas.
- Crioviales de 2 mL. Marca Corning. Cat. 430659.
- Tubos falcon de 15 mL. Marca Corning. Cat. 430053.

### Reactivos

- Suero bovino fetal. 500 mL:
  - a) Para C6/36: Marca Hyclone.
  - b) Para Huh-7: Marca GIBCO.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) grado Biología molecular. 100 mL. Marca Sigma. Cat. D2650.
- Hielo.



## **Equipo**

- Campana de flujo laminar.
- Bomba de presión y vacío.
- Centrífuga.
- Hielera.
- Refrigerador de -20 – 0 °C.
- Ultracongelador Revco.

## **I. Protocolo para células C6/36.**

1. Cuando se observa un cultivo confluyente de células C6/36 en una botella de 25 cm<sup>2</sup>, permitir que crezcan un día más.
2. Raspar las células de la botella con ayuda de un gendarme (cell scraper).
3. Colectar medio en tubo falcon y centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos. Si las células no han formado un pellet, centrifugar de nuevo.
4. Decantar medio de cultivo y resuspender en 2 mL de suero bovino fetal completo.
5. Depositar en el criovial 900 µL de la suspensión celular y añadir 10 µL de DMSO.
6. Enfriar células a 4 °C durante 5 minutos.
7. Pasar células a -20 °C durante dos horas. No exceder tiempo.
8. Almacenar células a -70 °C.
9. Se recomienda hacer pases de la línea celular cada 6 meses.

## **II. Protocolo para células Huh-7.**

1. Cosechar células Huh-7 siguiendo el protocolo de subcultivo hasta la obtención del botón celular.



2. Remover completamente el medio utilizado para neutralizar la tripsina, empleando una micropipeta de 1000  $\mu$ L y procurando no romper el botón celular.
3. Resuspender células en suero bovino fetal completo. Añadir tanto suero como sea necesario para obtener una suspensión con una concentración final de 1.5 a 2 millones de células por mL.
4. Preparar crioviales a congelar. Flamear el cuello y la tapa de cada uno de ellos.
5. Depositar en cada criovial 100  $\mu$ L de DMSO. No flamear después de colocar el disolvente.
6. Depositar en cada vial 900  $\mu$ L de la suspensión de células en suero bovino fetal.
7. Almacenar células en hielo (4 °C) durante 5 minutos.
8. Transfrir crioviales a refrigerador a -20 °C durante dos horas. No almacenar a esta temperatura por más de 3 horas.
9. Transferir células a ultracongelador Revco a -80 °C. Las células congeladas y almacenadas a esta temperatura tienen caducidad de un año.



## 5. DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

### Fundamento

El proceso de congelación resulta estresante para las células. El uso de una buena técnica de descongelación asegura que una alta proporción de las células congeladas sobrevivan. Es importante evitar manipulaciones bruscas de los volúmenes de las alícuotas congeladas, ya que las membranas celulares se encuentran altamente sensibilizadas.

### Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Botellas para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>.
  - e) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430639.
  - f) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430168.

### Reactivos

- Medio de cultivo
  - a) Para C6/36: L-15 suplementado al 5% con suero bovino fetal.
  - b) Para Huh-7: Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal.

### Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Micropipetas automáticas.
- Microscopio.
- Incubadora.



## Protocolo

1. Permitir atemperar el medio de cultivo a utilizar para sembrar las células al menos 40 minutos antes de la realización de la técnica. Después de sacar el medio del baño maría se debe limpiar con etanol al 70% antes de permitir su entrada a la campana de bioseguridad.
2. Depositar 5 mL de medio de cultivo atemperado en una botella de 25 cm<sup>2</sup>.
3. Introducir criovial en baño de agua a 37°C hasta observar la descongelación de su contenido.
4. Depositar suavemente la alícuota completa del criovial y homogenizar el contenido de la botella con movimientos circulares suaves.
5. Revisar al microscopio las células recién depositadas en la botella de cultivo.
6. Incubar botella de cultivo bajo las condiciones requeridas dependiendo del tipo de línea celular que se trate.



---

- INFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES CON DENGUE -

## 6. CULTIVO VIRAL: AMPLIFICACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE EN LÍNEAS CELULARES.

### Fundamento

El cultivo viral del dengue es el estándar de oro para la confirmación y aislamiento de casos positivos. Empleando líneas celulares permisibles como C6/36, TRA-284-SF, AP-61 o Vero se pueden obtener grandes cantidades de partículas virales viables a partir de aislados de pacientes o macerados de mosquitos.

El proceso involucra la obtención del cultivo celular semiconfluyente, la adición del suero infeccioso y la adsorción de las partículas virales en la membrana celular. Se permite que el virus se replique de 7 a 14 días dependiendo del serotipo presente para su posterior cosecha o análisis por inmunofluorescencia. Los virus del dengue suelen ser citopáticos.

El protocolo descrito en este anexo se adaptó empleando la línea celular C6/36 de *Aedes albopictus* y las cepas virales H-159911 de DENV-1 y H-17247 de DENV-2.

### Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 2 mL. Marca Fisherbrand. Cat. 11-678-11C.
- Cultivos confluentes de células C6/36 en botellas sin filtro de 25 cm<sup>2</sup>.
- Virus prototipo Dengue 1 cepa H-159911 conservado a -80°C.
- Virus prototipo Dengue 2 cepa H-17247 conservado a -80°C.



### Reactivos

- Medio L-15 suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- Solución buffer salino de fosfatos (PBS) 1X.

### Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Pipetor.

### Protocolo

1. Sembrar células C6/36 hasta obtener una monocapa confluyente bajo las condiciones indicadas en el protocolo correspondiente.
2. Desechar medio de cultivo por decantación.
3. Lavar células con 3 mL de solución PBS 1X para remover el detrito celular. Realizar movimientos circulares para limpiar la monocapa completa.
4. Remover PBS 1X.
5. Recambiar medio por L-15 al 2% SBF, en un volumen adecuado para cubrir solamente las células (25 cm<sup>2</sup>: 2 mL, 75 cm<sup>2</sup>: 3.5 mL, tubo Nunc: 1 mL).
6. Adicionar al medio 100 – 150 µL del aislado viral.
7. Homogenizar botella con movimientos circulares para asegurar que el virus tenga contacto con la monocapa celular completa.
8. Incubar a 37°C durante una hora al menos.
9. Transcurrida la hora de incubación, completar volumen del medio de cultivo a los indicados en el apartado de subcultivo celular.
10. Incubar a temperatura ambiente sin fuente de CO<sub>2</sub>.



## Observaciones

- El medio de cultivo para infección viral debe estar al 2% SBF para permitir el mantenimiento celular pero evitar su división, permitiendo que el virus las infecte sin que mueran.
- Para cada serotipo viral utilizar una alícuota de medio distinta.
- Normalmente una botella de 25 cm<sup>2</sup> se infecta con 30 – 35 µL del aislado viral, pero la infección con 100 µL permite una producción mayor de partículas virales.
- Si durante el periodo de incubación el medio se torna ácido, añadir unas gotas de solución al 7.5% de bicarbonato de sodio para dejar el medio ligeramente alcalino.
- Si la infección se hace en tubos (Nunc, Nunclon surface), cultivar células a confluencia depositando 2.5 mL de la suspensión 1:10 de células proveniente de botella de 75 cm<sup>2</sup> (medio 10% SBF). Antes de realizar la infección hacer el recambio al medio correspondiente. Si las células se encuentran muy crecidas, vortexear tubo para poder eliminar las células excedentes al momento de decantar el medio y dejar una monocapa en el tubo. Primero colocar 1 mL de medio al 2% SBF, infectar con 17 µL del aislado viral e incubar 37°C. Transcurrido el tiempo, completar volumen de medio a 2.5 mL.
- DENV prefiere un pH alcalino en el medio para infectar a las células C6/36.



## 7. COSECHA Y ALMACENAMIENTO DE AISLADOS VIRALES.

### Fundamento

Los virus en cultivo se pueden cosechar para establecer bancos con prototipos virales o para confirmar casos de pacientes enfermos por inmunofluorescencia o técnicas moleculares. Dependiendo del serotipo infectante, el tiempo de cultivo varía. Generalmente dengue 1 y 2 son de crecimiento rápido y la mayoría son líticos, mientras que dengue 3 y 4 requieren más tiempo y no ocasionan cambios morfológicos tan notorios en la monocapa celular.

La suspensión células/virus se debe tratar con una mezcla de suero bovino fetal y bicarbonato de sodio para después almacenarse en un ultracongelador. Se puede realizar una purificación mayor del aislado por centrifugación diferencial.

### Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 2 mL. Marca Fisherbrand. Cat. 11-678-11C.
- Raspadores celulares (gendarmes) de 25 cm. Marca Corning. Cat. 3010.
- Tubos falcon de 15 mL. Marca Corning. Cat. 430053.
- Tubos eppendorf de 1.5 mL estériles.

### Reactivos

- Suero Bovino Fetal. 500 mL. HyClone. Cat. sh30396.03.
- Solución de bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, 100 mL, In vitro S.A.



### Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Micropipetas automáticas.
- Pipetor.
- Hielera.
- Ultracongelador Revco.

### Protocolo

1. Transcurridos de 12 a 15 días de la infección celular, se puede cosechar el virus.
2. Si el cultivo se hizo en tubo, vortexear para desprender las células. Si el cultivo se realizó en frascos, raspar con gendarme. No hacer lavados con PBS.
3. Recolectar medio de cultivo y centrifugar para empaquetar las células.
4. Del sobrenadante coleccionar alícuotas y si es necesario, reinfectar un cultivo nuevo con 100  $\mu$ L de ellos (botella de 25  $\text{cm}^2$ ).
5. Preparar la mezcla de congelación 90% suero bovino fetal: 10% bicarbonato de sodio al 7.5% en un tubo falcon de 15 mL.
6. Para congelar las alícuotas del virus, de los 6-8 mL que resultan de una botella de 25  $\text{cm}^2$ , añadir 1.5 de mezcla SBF-Bicarbonato y dividir en viales de 1 mL.
7. Almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### Observaciones

- La mezcla suero bovino fetal - bicarbonato se usa para proteger las partículas virales. El pH básico les proporciona estabilidad.



---

## - PROTOCOLOS PARA MANEJO DE RNA -

### 8. EXTRACCIÓN DE RNA.

#### Fundamento

TRIzol (Invitrogen), es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, que se emplea para la extracción de RNA basada en el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi. [*Anal. Biochem.* 162 :156-9, 1987.] Durante la homogenización de la muestra, el reactivo mantiene la integridad del RNA mientras lisa las células y disuelve componentes celulares. La adición de cloroformo y la posterior centrifugación, separa la mezcla en dos fases (acuosa y orgánica). El RNA se precipita añadiendo isopropanol a la fase acuosa y se recupera por centrifugación.

#### Material

- Microtubos de 1.5 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-150-C.
- Microtubos de 2 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-200.
- Pipetas automáticas.

#### Reactivos

- TRIzol.
- Cloroformo. 500 mL. Sigma-Aldrich. Cat. 2432-500mL.
- Isopropanol.
- Etanol al 70% en agua DEPC.
- Agua DEPC.

#### Equipo

- Centrífuga refrigerada.
- Campana de flujo laminar.



## Protocolo

1. Remover medio por aspiración de la botella o los pozos de la placa de cultivo. No hacer lavado con PBS.
2. Fase de homogenización: Adicionar 1 mL de TRIzol a una botella de 25 cm<sup>2</sup> para su lisis. En el caso de hacer la extracción de RNA a un extracto viral, usar una proporción 1:1 volumen, La adición del TRIzol debe hacerse a 4°C.
3. Fase de separación: Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas.
4. Transferir la mezcla de TRIzol a un tubo eppendorf de 2 mL.
5. Añadir 40 µL de cloroformo frío por cada 200 µL de TRIzol empleados. Mezclar por inversión 15 segundos.
6. Incubar el tubo en hielo de 2 a 3 minutos.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
8. Fase de precipitación: Recuperar la fase acuosa y adicionarle 500 µL de isopropanol frío por cada mililitro de TRIzol empleado.
9. Incubar a -80°C durante una hora o toda la noche.
10. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
11. Fase de lavado: Remover el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 mL de etanol frío por cada mililitro de TRIzol empleado. Mezclar con vórtex.
12. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
13. Fase de resuspensión: Retirar etanol sin tocar la pastilla con la puntilla.
14. Dar un pequeño spin a temperatura ambiente para poder eliminar los restos de etanol en el tubo con ayuda de una puntilla de 10 µL.
15. Resuspender la pastilla en 20-30 µL de agua DEPC con 1 µL de inhibidor de RNAasas (RNAout o RNAsin).



## 9. SÍNTESIS DE CDNA (RETROTRANSCRIPCIÓN).

### Fundamento

En la reacción de retrotranscripción, se sintetiza cDNA (DNA complementario) a partir del RNA por acción de la enzima retrotranscriptasa reversa. En este protocolo la enzima empleada es la MMLV (Molones Murine Leucemia Virus), obtenida de forma recombinante y purificada a partir de E. coli. Posee actividad 5'-3' ribonucleasa H, la cual permite alongar las cadenas de cDNA hasta una longitud mayor a 7 Kb.

### Material

- Microtubos de 0.2 mL. Marca Axygen. Cat. PCR-02-C1.

### Reactivos

- Buffer RT 5X
- Random primers 0.02 mg/mL
- DTT 0.01 M
- dNTPs 10 mM
- Inhibidor de RNAsas 40 U/mL
- Agua mili Q tratada con DEPC

### Equipo

- Pipetas automáticas.
- Termociclador. Marca Applied Biosystems. Modelo GeneAmp PCR System 9700.



## Protocolo

1. Colocar en un tubo eppendorf de 0.2 mL 1  $\mu$ L de random primers, 3  $\mu$ L de RNA y 7.5  $\mu$ L de agua DEPC.
2. Colocar los tubos en el termociclador a 72 °C durante 10 minutos.
3. Incubar la muestra en hielo durante 3 minutos.
4. Preparar la siguiente mezcla de reacción: 4  $\mu$ L de buffer RT 5X, 2  $\mu$ L de DTT 0.1 M, 0.5  $\mu$ L de inhibidor de RNAsas y 1  $\mu$ L de dNTPs 10 mM.
5. Añadir 8  $\mu$ L de la mezcla de reacción al tubo que se incubó en hielo, así como 1  $\mu$ L de la enzima MMLV.
6. Colocar el tubo en el termociclador y continuar con el siguiente programa:
  - a) 10 minutos/ 25 °C.
  - b) 60 minutos/ 37 °C.
  - c) 5 minutos/ 94 °C.
  - d) 10 minutos/ 4 °C.
7. Terminando el programa del termociclador, retirar el tubo que contiene el cDNA y almacenarlo a -20°C hasta su uso.

Condiciones de reacción		Programa del termociclador		
Reactivo	Volumen	Paso	Temperatura	Tiempo
Buffer RT 5X	4 $\mu$ L	1	72 °C	10 minutos
DTT 0.1 M	2 $\mu$ L	2	25 °C	10 minutos
RNase out	0.5 $\mu$ L	3	37 °C	60 minutos
dNTPs 10 mM	1 $\mu$ L	4	94 °C	5 minutos
RT-MMLV 200U/mL	1 $\mu$ L	5	4 °C	10 minutos
<b>Volumen total</b>	8.5 $\mu$ L			

- DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL DENGUE -

10. SEROTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE POR EL PROTOCOLO DE LANCIOTTI.

Fundamento

El diagnóstico de laboratorio de las infecciones por dengue incluye técnicas moleculares como la RT-PCR, para la cual se han reportado y publicado más de 16 protocolos diferentes. Sin embargo, el protocolo cuyo uso se encuentra más extendido a nivel mundial es el reportado por Lanciotti y colaboradores en 1992. El protocolo involucra un par de primers universales para los cuatro serotipos del dengue (primers D1 y D2), que hibridan sobre la región C y pre-M del genoma viral. Posteriormente en una segunda ronda de amplificación, utilizando primers específicos para cada serotipo ('Type Specific primers', TS: TS1, TS2, TS3 y TS4) se amplifica un fragmento con un tamaño particular para cada serotipo viral. [*J. Virol. Meth.* 72:27-41].

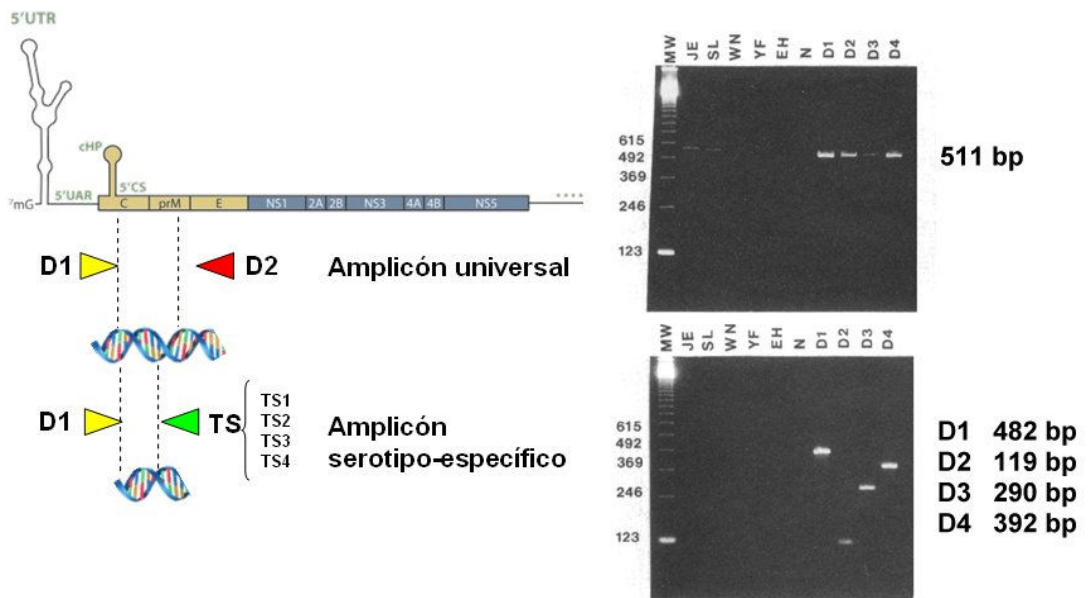


Figura X. Esquema de amplificación para la serotipificación del DENV.



Se ha reportado que este ensayo excede la sensibilidad obtenida por amplificación viral en cultivo celular cuando se usan alícuotas de la misma muestra, y se usa ampliamente para diagnóstico y monitoreo del dengue, particularmente en países del sureste de Asia. [*J. Clin. Microbiol.*, August 2003, p. 3864-3867, Vol. 41, No. 8].

### Material

- Microtubos de 0.2 mL. Marca Axygen. Cat. PCR-02-C1.

### Reactivos

- Taq DNA Polymerase recombinante.
- Buffer 10X para PCR sin Mg<sup>+2</sup>
- Cloruro de magnesio 50 mM.
- Primers D1, D2, TS1 y TS2.
- dNTPs.
- Agua miliQ
- Agarosa Ultrapure. Marca Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

### Equipo

- Termociclador. Marca Eppendorf. Modelo Mastercycler gradient.
- Cámara de electroforesis. Marca Owl. Modelo B1A.
- Fuente de poder. Marca Bio Rad. Modelo Power Pac 100.
- Horno de micro-ondas. Marca Panasonic.



**Protocolo**

Condiciones de reacción:

Para Dengue 1		Para Dengue 2	
Reactivo	Volumen	Reactivo	Volumen
Buffer PCR 10X	2 µL	Buffer PCR 10X	2 µL
Buffer Enhancer 20X	4 µL	Buffer Enhancer 20X	4 µL
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.5 µL	MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.5 µL
dNTPs 10 mM	0.5 µL	dNTPs 10 mM	0.5 µL
Primer D1 10 µM	2 µL	Primer D1 10 µM	2 µL
Primer TS1 10µM	2 µL	Primer TS2 10 µM	2 µL
Taq polimerasa	0.3 µL	Taq polimerasa	0.3 µL
cDNA	1 µL	cDNA	1 µL
Agua Mili Q	6.7 µL	Agua Mili Q	6.7 µL
<b>Volumen total</b>	<b>20 µL</b>	<b>Volumen total</b>	<b>20 µL</b>

Programa para la amplificación de DENV1 y DENV2.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	5 minutos
2	94 °C	30 segundos
3	55 °C	30 segundos
4	72 °C	30 segundos
5	Ir al paso 2, 40 veces	
6	72 °C	5 minutos
7	4°C	Esperar



Los productos amplificados se verificaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio. Los geles se corrieron a 70 V. La PCR positiva para dengue 1 debe producir un fragmento de 482 pb, mientras que para dengue 2 el fragmento debe tener un tamaño de 119 bp.



---

- ENSAYOS DE INTERFERENCIA CON RNA -

## 11. INTERFERENCIA DE RNA.

### Fundamento

La interferencia con RNA (RNAi) es una técnica para reducir o silenciar la expresión de un gen específico en células vivas en cultivo introduciendo una molécula pequeña de RNA de doble cadena (dsRNA) que es complementaria a un mRNA de interés. Se ha demostrado que moléculas de RNA de 21 pares de bases (siRNA por sus siglas en inglés 'short interferente RNA') pueden ser potentes mediadores del efecto de silenciamiento en células de mamíferos [Elbashir, 2001].

El siguiente protocolo de silenciamiento con RNAi utiliza una mezcla de lípidos (siPORT Neo FX, Ambion) como agente transfectante. Las ventajas de este reactivo son que puede utilizarse con medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal. Además, debido a que la modalidad de la técnica es la denominada 'transfección reversa', los complejos de transfección formados interactúan con las células a nivel tridimensional, incrementando la eficiencia del proceso. El siguiente protocolo se describe para el silenciamiento de células Huh-7 en placas de cultivo con 24 pozos.

### Material

- Cultivos de células Huh-7 en medio ADMEM 2% suero bovino fetal.
- Placas de cultivo de 24 pozos. Marca Corning.



### Reactivos

- siPORT NeoFX. (Ambion)
- Medio de cultivo ADMEM con 2% SBF.
- Tripsina-EDTA 0.25%.
- PBS1X.
- Azul tripano.
- RNA de interferencia suspendido en medio de cultivo ADMEM al 2% SBF.

### Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Micropipetas automáticas.
- Incubadora con tanque de CO<sub>2</sub>.

### Protocolo

1. Tripsinizar células Huh-7 bajo el protocolo de rutina.
2. Resuspender células en suficiente medio para que 450  $\mu$ L de la suspensión celular equivalgan a 400-450000 células/mL.
3. Diluir el reactivo siPORT Neo FX en medio ADMEM 2% SBF.
4. Incubar mezcla de agente transfectante con medio durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Durante el tiempo de incubación del agente transfectante, diluir el RNAi en medio ADMEM 2% SBF.
6. Transferir la mezcla del medio con RNAi al tubo con la mezcla del agente transfectante en volúmenes de 100  $\mu$ L y mezclar suavemente con la puntilla con movimientos circulares. Evitar subir y bajar el volumen de la mezcla nueva con la puntilla, para evitar la introducción de aire a los complejos de transfección.
7. Incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos.



8. Dispensar 50  $\mu$ L de la mezcla de transfectante-RNAi en cada pozo de la placa.
9. Depositar en cada pozo 450  $\mu$ L de la suspensión celular.
10. Mezclar suavemente el contenido de los pozos ladeando la placa hacia delante y hacia atrás sin generar remolinos en su interior, ya que esto puede provocar que los complejos de transfección se acumulen en el centro de la placa.
11. Incubar a 37°C hasta el momento de la evaluación del silenciamiento.