

C.O. 562

10  
2e).



**Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Biotecnología**

**Análisis de la Variabilidad Genética del  
dominio III de la Proteína de Envoltura del  
Virus Dengue-4.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
P R E S E N T A

**Javier Mota Sánchez**

Director de Tesis : Dr. Celso Ramos García

Cuernavaca, Morelos

1998

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

2641713



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

SIN

PAGINACION.

# **Análisis de la Variabilidad Genética del dominio III de la Proteína de Envoltura del Virus Dengue-4.**

## **RESUMEN**

El dengue es una enfermedad febril causada por alguno de los cuatro serotipos del virus dengue. La infección por este virus causa un amplio espectro de trastornos clínicos desde la fiebre por dengue, que se caracteriza por fiebre bifásica intermitente, escalofríos, cefalea, mialgias y artralgias, hasta las formas severas que se caracterizan por Fiebre Hemorrágica (FHD) y/o Síndrome de Choque por Dengue (SCD). El dengue es un importante problema de salud pública mundial. Anualmente se reportan más de 100 millones de casos de fiebre por dengue y aproximadamente 250 mil casos son de FHD. El dengue en México es un problema emergente debido al incremento en el número de casos de FHD/SCD, actualmente los cuatro serotipos del virus circulan en el país y los casos de FHD han sido asociados a los dengues 2 y 4 (Den-2 y Den-4). El análisis de la variabilidad genética del virus dengue y que permite su clasificación genotípica, ha sido de gran utilidad para determinar el origen y la dispersión de las epidemias. La variabilidad genética del virus dengue se ha estudiado principalmente mediante la secuenciación de nucleótidos de su genoma, así como, con el uso de sondas de RNA, de cDNA o anticuerpos monoclonales; sin embargo, estas técnicas tienen algunas desventajas como el uso de radioisótopos, su alto costo, tiempos prolongados de realización y el requerimiento de grandes cantidades de virus, que las hacen imprácticas en estudios de epidemiología molecular. Por otro lado la mayoría de estos estudios se han realizado con los virus Den-1, Den-2 y Den-3. La proteína de envoltura (E) del virus dengue contiene importantes funciones biológicas como la unión al receptor celular y la estimulación de la respuesta inmune, ya que en ella se localizan diversos determinantes antigénicos. En el presente trabajo se analizó de la región del dominio III de la proteína E del virus dengue-4, mediante la digestión con enzimas de restricción y la secuenciación de nucleótidos. El RNA viral se obtuvo de células infectadas con Den-4 y amplificado por RT-PCR usando oligonucleótidos específicos. El producto de amplificación (404 pb) se digirió con las enzimas Dde I, Mae III, Sac I, Nla III, Dde I y Cfo I. Posteriormente, se obtuvo la secuencia de nucleótidos de la región del dominio III de 9 virus Den-4 (de México y de otras partes del mundo) y se determinó la relación filogenética de estos virus y de los disponibles en las bases de datos. Los resultados muestran que la digestión con las enzimas de restricción Nla III, Dde I y Cfo I, puede diferenciar a los virus que pertenecen a los genotipos 1 y 2 de Den-4 reportados previamente por Lanciotti y cols. Esta técnica es lo suficientemente sensible para ser utilizada en forma alternativa a la secuenciación de nucleótidos. Por otro lado el análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos de la región del dominio III del gene E generó un árbol filogenético que muestra dos genotipos, que son congruentes con los resultados observados con los patrones de restricción. El análisis del dominio III mediante la digestión con enzimas de restricción y por secuencia de nucleótidos permito distinguir un grado mayor de variabilidad cuando se comparó con el gene E completo. Los resultados de este trabajo, indican que la región del dominio III de la proteína E de los virus dengue puede ser considerado un marcador de variabilidad genética.

## **INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES**

### **GENERALIDADES**

El dengue es una enfermedad febril causada por el virus del mismo nombre ; existen cuatro serotipos del virus dengue que afectan al humano (Den-1, Den-2, Den-3 y Den-4) que comparten entre otras cosas, especificidad del vector (*Aedes aegypti*), manifestaciones clínicas y diversos determinantes antigénicos (Karabatsos N, 1985; Francki RI, 1991). Estos virus pueden ser distinguidos por pruebas serológicas (fijación del complemento, inhibición de la hemaglutinación y neutralización), lo cual hace posible clasificarlos como serotipos (Lewis JA, 1993). Los virus dengue se clasifican dentro del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* (Francki RI, 1991) y forman parte de los más de 500 miembros del grupo de los arbovirus (virus transmitidos por artrópodos). Dentro de los arbovirus, los patógenos más importantes para el hombre se incluyen las familias de virus de RNA : *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Flaviviridae*. Estos virus de RNA, tienen mayor plasticidad, son más adaptables y pudieron haber sido favorecidos hacia una transmisión mediada por artrópodos ya que requieren periodos alternados de replicación entre hospederos vertebrados e invertebrados (Beaty BJ, 1988 ; Houk EJ, 1981). Las epidemias más severas por arbovirus han sido causadas por togavirus, alfavirus, flavivirus y bunyavirus. El virus de la Fiebre Amarilla, (*Flavivirus*), fue el primer virus que se asoció su transmisión con artrópodos en 1900 (Monath TP, 1994<sup>A</sup>) y fue hasta 1907 que el dengue se reconoció como una enfermedad viral y desde entonces continúa siendo la causa principal de epidemias en la mayoría de las regiones tropicales y sub-tropicales del

mundo donde se encuentra el vector ( mosquito del género *Aedes*). La distribución del dengue incluye las Américas, África, Asia y el Sureste del Pacífico, donde millones de personas son infectadas anualmente (Monath TP, 1994<sup>B</sup>).

La infección por el virus dengue causa un amplio espectro de trastornos clínicos que van desde el cuadro clásico de fiebre por dengue, que se caracteriza por fiebre bifásica intermitente, escalofríos, cefalea, mialgias y artralgias, hasta las formas severas de la enfermedad que se caracterizan por Fiebre Hemorrágica (FHD) y/o Síndrome de Choque por Dengue (SCD)(Halstead SB, 1970 ; Halstead SB, 1988). La fiebre por dengue esta asociada con trombocitopenia y los pacientes frecuentemente experimentan hemorragias, como epistaxis y hemorragia gastrointestinal (Tsai CJ, 1991). La aparición de las formas severas de la enfermedad FHD y SCD, parece estar asociada a factores que involucran al virus y al hospedero (Rosen L, 1989). Actualmente poco es lo que se conoce acerca de la patogénesis de la enfermedad.

Los primeros casos de FHD se describieron durante las epidemias de dengue clásico en Australia en 1897, en Grecia en 1928 y en Formosa en 1931 (Johnson KM, 1967). En 1954 en Manila ocurrió una epidemia de fiebre hemorrágica conocida como Fiebre Hemorrágica Filipina donde posteriormente se demostró que había sido causada por los serotipos 3 y 4 del virus dengue. Posteriormente la FHD se describió en diversos países del Sureste Asiático ; en China la enfermedad se reportó por primera vez en 1985 y en el caso de las Américas, casos esporádicos de FHD ocurrieron durante los años 1970's y la primera epidemia se reportó al inicio de los 1980's (Burke DS, 1988). Los cuatro serotipos pueden causar FHD y SCD ; así, en Tailandia el serotipo 2 se asoció predominantemente a estos síndromes hasta los años 1980's cuando aparecieron los serotipos 3 y 4. En América (Cuba, Venezuela y

Brasil) las epidemias de FHD ocurrieron cuando el serotipo 2 fue introducida 3 o 4 años después de una epidemia por Den-1 (Goubler DJ, 1988). La secuencia de los serotipos infectantes, el intervalo entre las infecciones y las diferencias en la virulencia de las cepas pueden ser determinantes importantes de los patrones clínicos y epidemiológicos de la fiebre hemorrágica por dengue (Halstead SB, 1988, Halstead SB 1970 ; Sangkawhibha N, 1984 ), sin embargo, la falta de un modelo animal ha impedido aseverar o refutar estas preguntas. No obstante existen evidencias experimentales con respecto a la capacidad replicativa del virus y a diferencias en su genoma, que sugieren que factores asociados al propio virus pueden contribuir a la patogénesis de la FHD (Monath TP, 1994<sup>B</sup>).

## EL DENGUE COMO PROBLEMA DE SALUD PUBLICA

La fiebre por dengue constituye un importante problema de salud pública mundial. Más de 2,000 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad. Anualmente se reportan más de 100 millones de casos de fiebre por dengue y 250 mil casos corresponden a FHD. El incremento en la incidencia y prevalencia de esta enfermedad se deben principalmente a ) El rápido crecimiento de la población mundial y del número de nuevos criaderos del vector, b) el crecimiento de las poblaciones del mosquito vector *Aedes aegypti*, y c) al incremento de los movimientos poblaciones debidos principalmente al mejoramiento de los medios de transporte, lo cual facilita el contacto de hospederos virémicos con el vector (Monath TP, 1994<sup>B</sup>).

El dengue en México es un problema de salud pública principalmente por el reciente incremento en el número de casos de FHD y SCD. En el periodo de 1984 a 1993 se reportaron 26 casos de FHD en nueve entidades federativas. En 1994 y

1995 se notificaron 569 casos. La aparición de casos severos de dengue se presentan en todo el país y para 1995, 20 estados del país reportaron al menos 1 caso de FHD. Todos los casos se confirmaron mediante los criterios clínicos establecidos por la OMS, aunque solo el 20 % fueron confirmados por diagnóstico serológico. El grupo de edad más afectado comprende individuos entre 5 y 24 años. De los 539 casos reportados en 1995, ocurrieron 29 defunciones (una letalidad del 5.4%). En 1995 los serotipos predominantes fueron Den-2 y Den-4. El serotipo 2 se reportó principalmente en los estados de Tamaulipas y Veracruz, mientras que el serotipo 4 tuvo una mayor distribución en todo el país. El Den-3, se introdujo al territorio mexicano en 1995 después de un periodo de 16 años de ausencia (Gómez-Dantés H, 1997).

En las áreas donde se transmiten diversos serotipos del virus dengue existe una mayor probabilidad de que se presenten los cuadros severos de la enfermedad, ya que se ha observado que las segundas infecciones con un virus heterólogo es un factor de riesgo para FHD/SCD. Esta observación esta basada en la teoría de la "facilitación inmunológica" (Gollins SW, 1984 ; Halstead SB, 1977), la cual sostiene que anticuerpos previos anti-dengue facilitan la entrada del virus a las células huésped.

## RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCION POR DENGUE

El virus dengue se replica principalmente en macrófagos y monocitos, la presencia de bajas concentraciones de anticuerpos contra el virus facilita e incrementa la infección, posiblemente porque los complejos virus-anticuerpo se unen a los receptores para el Fc de los monocitos iniciándose la replicación del virus dentro de la célula, más que su degradación. Aunado al fenómeno de "facilitación

inmunológica” , la activación de los linfocitos T pueden también participar en la inmunopatología de la enfermedad. Se ha demostrado (Kurane I, 1991) que después de una infección primaria, que las clonas de reacción cruzada de células T CD4<sup>+</sup> secretan interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) cuando se estimulan in vivo, promoviendo un incremento en la expresión de receptores para Fc en los macrófagos, con lo cual se incrementa la infección mediada por “anticuerpos facilitadores”. Estos datos se relacionan con la presencia de niveles altos de IFN- $\gamma$  en el suero de pacientes con dengue (Kurane I, 1994). Además pacientes con FHD/SCD tienen niveles elevados de moléculas CD4 solubles, IL-2, receptor para IL-2 soluble, e IFN- $\gamma$  así como células CD8 (Kurane I, 1981 ; Kurane I, 1991). Se ha demostrado también (Bukowski JF, 1989 ) que las clonas de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que se generaron en una infección primaria por dengue pueden ser estimuladas y secretar citocinas y otros factores solubles para destruir extensivamente los macrófagos infectados ; esta actividad lítica se incrementa por la regulación positiva mediada por elementos del complejo mayor de histocompatibilidad que son inducidos por los niveles altos de IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  presentes en pacientes con dengue clásico o con FHD/SCD. Los macrófagos infectados al ser lisados por las células T, liberan grandes cantidades de mediadores solubles por lo que la respuesta inmune que elimina al virus, también puede estar asociada a la patología de la enfermedad (Bukowski JF, 1989 ; Kurane I, 1991). Se ha observado en pacientes con SCD que existen bajas cantidades de virus, pero grandes niveles de anticuerpos neutralizantes, así que, además al fenómeno de facilitación inmunológica la participación de la respuesta inmune celular es importante en el desarrollo de las fases severas de la enfermedad (**Figura 1**).

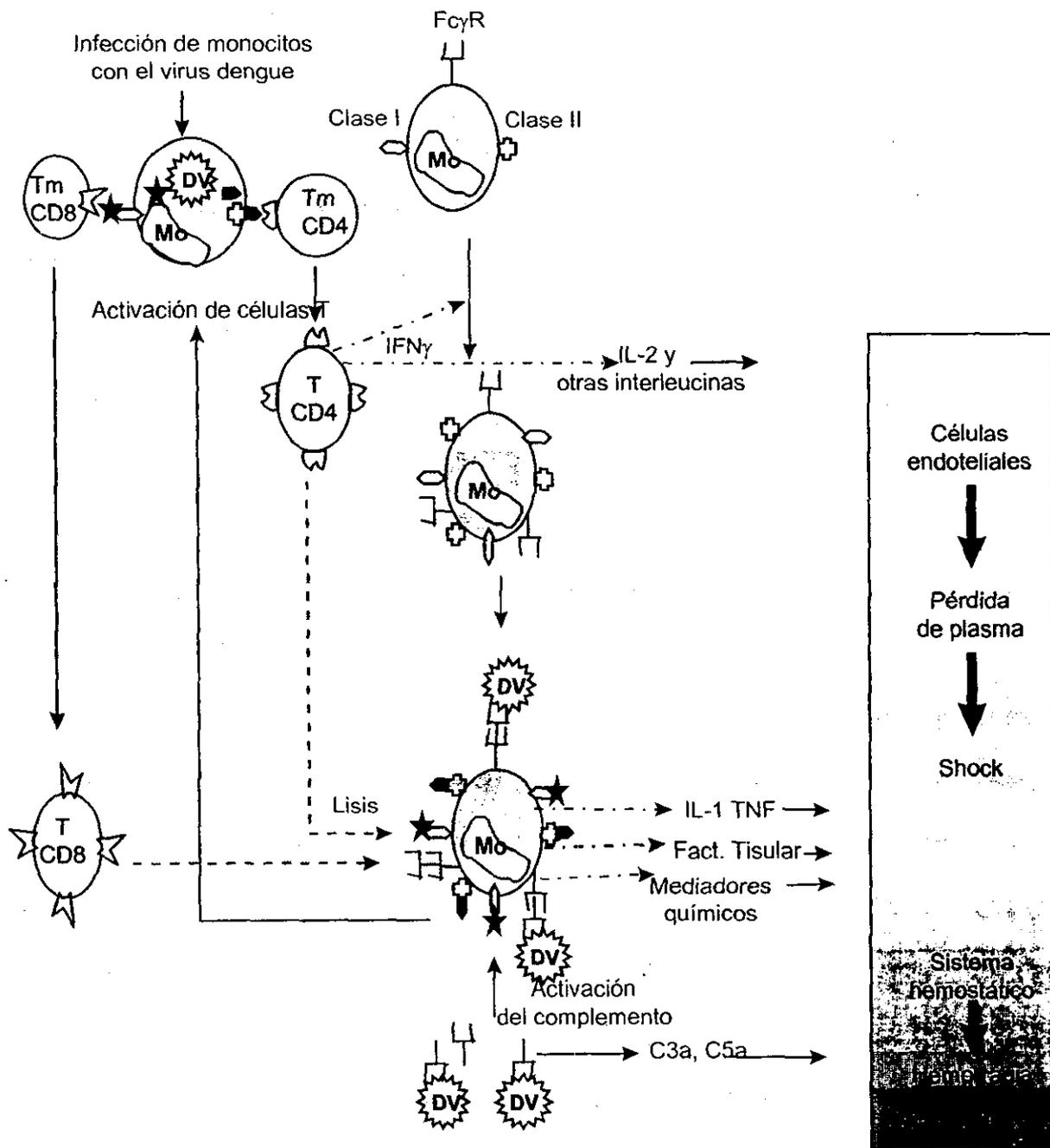


Figura 1. Mecanismos inmunopatológicos involucrados en la fiebre hemorrágica por dengue. DV=virus dengue, Tm=linfocito T maduro, Mo=monocito. (Monath TP, 1996).

## FACTORES AMBIENTALES

Los factores ambientales desempeñan un papel importante en la evolución de las enfermedades virales, principalmente en aquellas enfermedades zoonóticas donde el virus es transmitido por vectores. Así el dengue es una de las enfermedades emergentes más importantes en las regiones tropicales del mundo con millones de casos ocurriendo cada año. En Puerto Rico, en los primeros 75 años de este siglo se presentaron cinco epidemias por dengue, sin embargo en los últimos 12 años ocurrieron seis epidemias. De la misma forma países como Cuba, Brasil, Bolivia, Paraguay, Ecuador y Nicaragua han reportado grandes epidemias de fiebre por dengue (Pan. Am. Health Org. 1994 ; MMWR, 1995). Diversos serotipos han estado involucrados en estas epidemias y actualmente los cuatro serotipos circulan en las Américas, lo cual representa un mayor riesgo para la aparición de casos hemorrágicos. Actualmente se reportan más de 3000 casos de FDH anualmente. Una de las razones para que el dengue sea considerado como una de las principales enfermedades emergentes o reemergentes, es la dificultad para el control del vector, ya que en los países en vías de desarrollo, las densidades de mosquito se incrementan debido a que los programas de control han sido insuficientes, y a la falta de recursos económicos. Adicionalmente, *A. albopictus* se ha establecido en algunas regiones de América. Los hábitos de ambas especies son complementarias, mientras que *A. aegypti* es intradomiciliario, *A. albopictus* se localiza cerca de las zonas con vegetación. Además de la emergencia de casos de dengue por las condiciones antes expuestas, existe también el riesgo de la reemergencia de la fiebre amarilla, ya que *A. aegypti* es el mismo vector que para el virus dengue (Morse SS, 1993 ; Murphy FA, 1993).

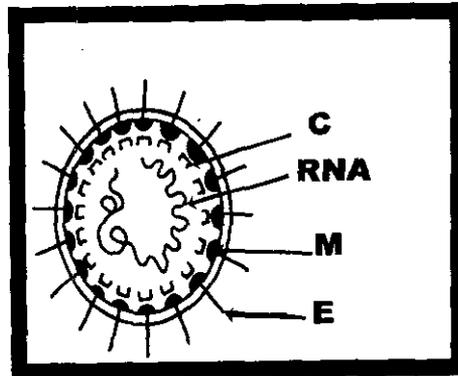
## ORGANIZACION DEL GENOMA DEL VIRUS DENGUE

El genoma del virus dengue consiste de una sola cadena positiva de RNA de aproximadamente 11 kb (Heinz FX, 1981 ; Monath TP, 1996) que contiene un cap en el extremo 5' pero carece de una secuencia poli-A en su extremo 3' (**Figura 2**). El RNA viral contiene un solo marco abierto de lectura (más de 10,000 bases) que está flanqueado por dos regiones no traducidas en los extremos 5' y 3' y que codifica para una poliproteína que es procesada co-traduccionalmente y post-traduccionalmente por proteasas tanto virales como del hospedero para obtener tres proteínas estructurales y al menos siete proteínas no estructurales (Stollar V, 1969). Las proteínas estructurales ocupan un cuarto del genoma viral en el extremo 5' y son: la proteína de la cápside (proteína C, 13-15 Kd), la proteína de membrana (proteína M, 8 Kd) y la proteína de envoltura (proteína E, 51-59 Kd) (Chamber TJ 1990). Las proteínas no estructurales (NS) ocupan el resto del genoma, se numeran del 1 al 5 en base al orden de su síntesis. Las proteínas no estructurales NS1, NS3 y NS5 (38-41 Kd, 68-70 Kd y 100-103 Kd, respectivamente) están altamente conservadas entre los flavivirus, a diferencia de las NS2A, NS2B, NS4A y NS4B. Estas proteínas desempeñan un papel importante en el procesamiento proteolítico de la poliproteína viral y en la síntesis del RNA del virus (Chambers TJ, 1989 ; Pethel M, 1992).

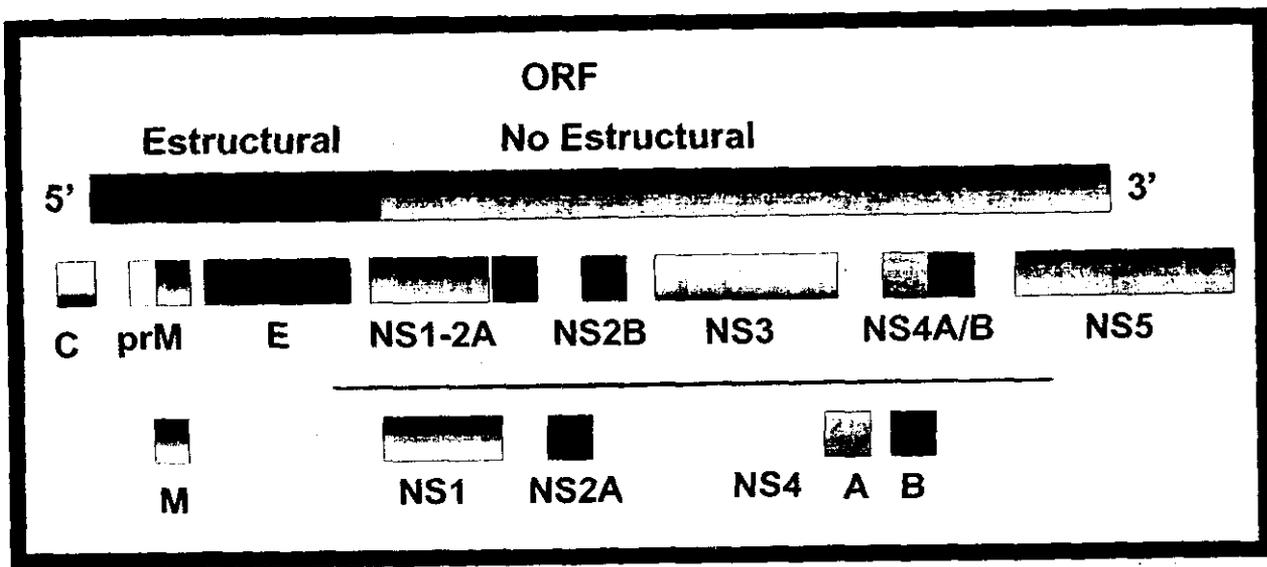
La glicoproteína E está presente en la superficie del virus y en ella se concentran diversas actividades biológicas. Participa en el ensamblaje del virión, induce la síntesis de anticuerpos neutralizantes, permite la unión a las células (fusión membranal) y la hemaglutinación (Monath TP, 1996 ; Chambers TJ, 1991). No es de extrañar que mutaciones en esta proteína tengan efectos dramáticos en la



A



B

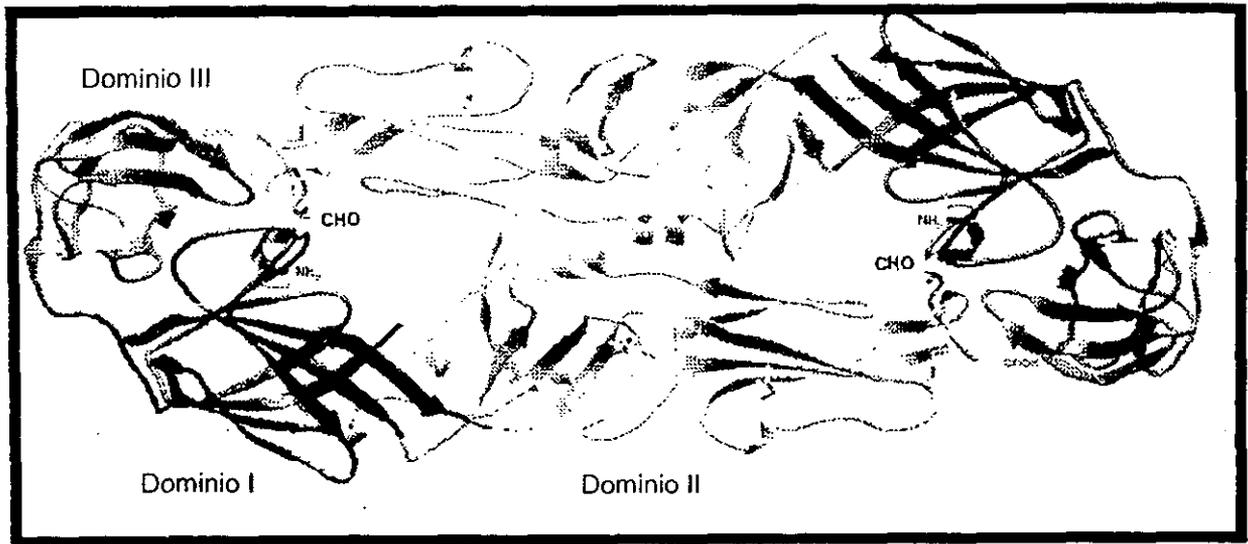


C

**Figura 2.** Estructura del virus dengue y organización del genoma. A).-Micrografía electrónica del virus dengue, B).-Representación esquemática de la estructura del virion y C).- Diagrama del genoma del virus. (Monath TP, 1996).

patogénesis viral. La proteína E de los flavivirus es variable en ciertos dominios y muy conservados en otros, los doce residuos de cisteínas en la proteína que forman enlaces disulfuro están altamente conservados. La proteína E de dengue está glicosilada, sin embargo, el papel que juegan los residuos N-glicosilados permanece sin esclarecerse completamente. Una de las regiones variables contiene los epítopes tipo-específico que son la base para la clasificación serológica del dengue. La identificación de los epítopes neutralizantes de la proteína E del virus dengue es importante desde el punto de vista del diseño y desarrollo de una vacuna contra la enfermedad (Rey FA, 1995). Epítopes lineales de la proteína E han sido utilizados en experimentos de inmunización, sin embargo, la inducción de anticuerpos neutralizantes parece depender mucho de la conformación nativa de la proteína. En base a la proteína E del virus transmitido por garrapatas (TBE), se identificaron 3 dominios antigénicos, mediante el uso de anticuerpos monoclonales, estos son los dominios A, B y C (Heinz FX, 1981). Recientemente se determinó la estructura tridimensional de la proteína E (la fracción soluble) y se determinó que el monómero está compuesto por tres dominios, I, II y III que corresponden a los dominios C, A y B descritos anteriormente (Rey FA, 1995) (**Figura 3**).

En el caso del VD (Den-2) se ha demostrado que los determinantes antigénicos de neutralización se encuentran en el dominio III (Monath TP, 1996). Este dominio está compuesto por poco menos de 100 aminoácidos de la región carboxilo terminal de la proteína E y su estructura terciaria en forma de barril formado por 7 láminas  $\beta$  anti-paralelas le confieren una estructura similar a una inmunoglobulina. Esta forma globular en el virión hace que este dominio sobresalga más que cualquier parte de la proteína. Por otro lado se ha observado que la



**A**



**B**

Figura 3. Estructura del virus transmitido por garrapatas (TBE). A) Determinación cristalográfica del dímero de la proteína de envoltura (E) de TBE a 2 Å de resolución, B) Vista aislada del dominio III de la proteína E de TBE (Rey, F, 1995).

reactividad de anticuerpos neutralizantes contra esta región dependen de su conformación estructural, dada por el único enlace disulfuro del dominio.

Aun cuando se conoce poco acerca del receptor celular para el virus dengue, se ha sugerido que el dominio III participa en la unión a tal receptor (Rey FA, 1995 ; Monath TP, 1996), y se ha reportado que los anticuerpos neutralizantes anti-proteína E en sueros de pacientes infectados con VD bloquean la unión del virus a su receptor en células Vero (He RT, 1995). Por otro lado los epítopes tipo o subtipo-específicos se encuentran en los dominios III y I, respectivamente, mientras que los epítopes de reacción cruzada con flavivirus se localizan en el dominio II (que es el que se encuentra mas expuesto en el monómero).

## LA LUCHA CONTRA EL DENGUE :

### A) VACUNAS

La prevención y control de la FD/FHD se ha basado casi exclusivamente en el control del vector, sin embargo, la eficacia de estos métodos está sujeta a situaciones de índole económico-político, además del costo económico hay que considerar también el ecológico. Por estas razones es que actualmente una de las prioridades para el control del dengue, es el desarrollo de vacunas seguras y eficientes. Las vacunas vivas atenuadas han sido probadas desde hace más de 50 años, sin embargo, no han tenido mucho éxito debido principalmente al incremento de la neurovirulencia durante los pases en cerebro de ratón. Por otro lado experimentos realizados en primates y en humanos mostraron que este tipo de vacunas son poco inmunogénicas e inseguras (Monath TP, 1996). Actualmente se están llevando a cabo diversas estrategias para generar vacunas genéticamente diseñadas, como son el uso de proteínas recombinantes. Se ha utilizado baculovirus

recombinantes para expresar la proteína E de Den-2 y Den-3 como proteína de fusión en células de *Spodoptera frugiperda*; la proteína recombinante ( que carece de la región transmembranal) induce la producción de anticuerpos neutralizantes y protección en ratones (Delenda C, 1995). También se ha hecho estudios con proteínas recombinantes de Den-1(Putnak R, 1991). Sin embargo, la producción de anticuerpos neutralizantes en monos es pobre debido, en parte, a que las proteínas recombinantes no siempre conservan los epítopes conformacionales para el reconocimiento de los anticuerpos neutralizantes (Eckels KH, 1994, Feighny R, 1994).

Otra estrategia es la elaboración de vacunas de virus vivos atenuados mediante ingeniería genética. Se han generado partículas infecciosas a partir de RNA viral transcrito *in vitro* a partir de una clona de cDNA de Den-4 (Lai C-J, 1991); el cDNA se puede manipular genéticamente y se pueden introducir deleciones o sustituciones que resultan en la atenuación del virus, por ejemplo, se ha demostrado que introducir mutaciones en la región 3' no traducida resultan en la disminución de la capacidad replicativa del virus. También se han construido quimeras, mediante la inserción de proteínas de serotipos diferentes (Den-1 y Den-2) en el marco genómico de Den-4 (Quimeras intertípicas), (Bray M, 1991<sup>A</sup>).

Así, cuando estas quimeras intertípicas se utilizan para inmunizar ratones, se obtiene una respuesta inmune en contra del serotipo que corresponde a los genes insertados. Adicionalmente, diferentes arbovirus se han utilizado para construir estas quimeras como el virus TBE dentro del genoma de Den-4 (Pletnev AG, 1993).

En otros flavivirus como el de la Encefalitis Japonesa (EJ), se han producido vacunas mediante la generación de partículas similares a los virus, para lo cual las proteínas estructurales se expresan en el virus vaccinia recombinante; estas

proteínas se ensamblan en “partículas virales” no infecciosas, y son altamente inmunogénicas y protectoras (Mason PW, 1991 ; Konishi E, 1992<sup>A</sup>), sin embargo, el éxito en la expresión de las partículas subvirales durante la replicación *in vivo* del virus Vaccinia recombinante, es un factor limitante en la eficacia de este tipo de vacunas (Konishi E, 1992<sup>B</sup>; Bray M, 1991<sup>A</sup>; Fonseca BAL,1994). Actualmente se están investigando nuevos vectores como *Salmonella*, el virus de la rubéola y adenovirus como sistemas de expresión de proteínas para la generación de vacunas contra el dengue.

Reciente se inicio el uso de vacunas de DNA ; en el caso del virus dengue los genes preM/E de Den-2 se ha insertado en plásmidos eucariotes para inmunizar ratones, vía intramuscular, e inducen formación de anticuerpos que neutralizan al virus dengue *in vitro* (Kochel T, 1997).

## B) VARIABILIDAD GENETICA Y EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

La variabilidad genética del virus dengue ha sido estudiada de diversas formas, sin embargo, la secuenciación de nucleótidos de regiones parciales o del gen entero de la proteína E ha sustituido a las técnicas tradicionales de “fingerprint de RNA”, hibridación RNA-DNA, el análisis unidimensional con RNasa T1 (Kerschner JH, 1986), la hibridación con sondas de cDNA (Block J, 1989) y el uso de anticuerpos monoclonales (antigenic signature). Estas técnicas tienen algunas desventajas como el uso de radioisótopos, su alto costo, tiempos prolongados de realización y el requerimiento de grandes cantidades de virus, que las hacen imprácticas en estudios de epidemiología molecular. (Kerschner JH, 1986). Los patrones filogenéticos derivados de la secuencia de nucleótidos han permitido la clasificación de los virus dengue en diversos “genotipos”, los cuales generalmente

correlacionan con el origen geográfico del virus. Esta clasificación genotípica ha sido de gran utilidad para determinar el origen y la dispersión de las epidemias, ya que el análisis de los genotipos en una región geográfica permite saber si un genotipo es autóctono o fue introducido de otra región. Este fenómeno puede ocurrir a través de hospederos virémicos o por mosquitos infectados, debido a los movimientos poblacionales que actualmente se realizan, producto de la modernización de los medios de transporte (Rico-Hesse R, 1997).

La clasificación genotípica de los virus dengue permite distinguir diversos genotipos, por ejemplo; para el Den-1 se conocen dos genotipos, para Den-2 5 genotipos, para Den-3, 4 genotipos y recientemente el virus Den-4 se ha agrupado en dos grupos genéticos (Monath TP, 1996). Todavía existe discrepancia respecto al número de genotipos existentes, como por ejemplo, en caso de Den-3 se pueden reconocer tres o cuatro genotipos dependiendo el autor que se cite. Para Den-4 se reportó que no existía mayor divergencia cuando se analizó la región amino terminal del gene de la proteína E (Chungue E, 1991), sin embargo, el análisis del gene completo permitió agrupar a los virus Den-4 en dos genotipos que comprenden virus de Indonesia, del Sureste del Pacífico y de las Américas en un grupo y de Tailandia y Filipinas en otro (Lanciotti RS, 1997).

El estudio de la variabilidad genética de los virus dengue es crucial para entender los patrones epidemiológicos que intervienen en la emergencia de epidemias (Henchal EA, 1986), y para determinar si estos cambios participan en el desarrollo de las formas severas de la enfermedad. Aun cuando se ha sugerido la participación de la respuesta inmunológica del huésped para explicar las manifestaciones severas de la enfermedad, se ha sugerido que pueden existir otros factores asociados al virus que participan en la generación de las formas severas de

la enfermedad (Halstead SB, 1988). Por ejemplo, el análisis filogenético de virus Den-2 de diversas partes del mundo ha sugerido que existe una posible asociación entre la presencia de un genotipo específico y la aparición de casos de FHD y se postula que puede existir un desplazamiento del genotipo autóctono americano por un genotipo de origen asiático (Rico-Hesse R, 1997) Sin embargo, en otros estudios donde se compara la secuencia de nucleótidos de la proteína E de virus Den-2 aislados de casos de dengue clásico y de FHD y SCD, que no muestran alguna asociación entre alguna secuencia particular y el cuadro clínico.

## **JUSTIFICACION**

Una de las preguntas importantes en el estudio del dengue es la identificación y caracterización de genotipos virales que se encuentran asociados con brotes epidémicos y con la aparición de casos severos de la enfermedad. Debido a la falta de modelos *in vivo* de FHD/SCD, no se ha demostrado que algún genotipo sea la causa de FHD. Sin embargo, el análisis filogenético de los virus aislados en diferentes regiones ha sido una herramienta útil para determinar el origen y la dispersión de los virus. En el caso de Den-2; el análisis filogenético basado en la secuencia de nucleótidos de la región de unión entre la proteína E y NS1, ha demostrado que existe una correlación importante entre la introducción de cepas del sureste asiático en el continente americano y el incremento en el número de casos de FHD; incluso se ha postulado que las cepas asiáticas están desplazando al genotipo americano autóctono, presumiblemente menos virulento.

La información obtenida de la secuencia de nucleótidos, además de permitir hacer el análisis filogenético, también es de gran utilidad para diseñar herramientas moleculares para diagnóstico y para la construcción de vacunas. Por lo anterior, la secuenciación nucleotídica empleando regiones distintas del genoma de dengue, ha substituido a técnicas como la de huella genética y el uso de sondas radioactivas, sin embargo, junto con estas, la secuencia de nucleótidos tiene importantes desventajas como son: el número limitado de muestras que se pueden analizar en

un periodo de tiempo dado, el uso de radioactividad y el tiempo invertido, sin mencionar el costo de los reactivos y la necesidad de entrenamiento del personal involucrado.

Tomando en consideración lo anterior, en el presente trabajo se propone llevar a cabo el análisis genético del dominio III de la proteína de envoltura de Den-4, mediante el uso de enzimas de restricción, para determinar la variabilidad genética de la región e identificar los distintos genotipos de Den-4 sin necesidad de llevar a cabo reacciones de secuenciación. Anteriormente se ha intentado una aproximación metodológica similar (Vordam V, 1994), sin embargo, al analizar el gen completo de la proteína E con solo dos enzimas, se generaban patrones de restricción con muchos fragmentos que hacían difícil el análisis de los resultados. En el presente trabajo se propone el análisis de una región de 400 nucleótidos que contiene la región del dominio III de la proteína E.

En México la circulación del serotipo 4 de dengue se ha incrementado de forma importante, y como se mencionó anteriormente, su distribución se extiende a todo el territorio nacional. Adicionalmente el Den-4 se ha asociado con casos de FHD y prácticamente no existe información de epidemiología molecular con respecto a este serotipo, no solo en México, sino a nivel mundial, ya que la mayoría de los estudios de este tipo se han realizado con alguno de los otros serotipos, principalmente con el serotipo 2.

## **HIPOTESIS**

Debido a que la proteína de envoltura (proteína E) del virus dengue tipo 4, está involucrada en el proceso de infección de las células blanco, se encuentra sometida a una presión de selección, que le induce cierto grado de variabilidad por lo cual ha sido utilizada en estudios de epidemiología molecular, para caracterizar subtipos genéticos y saber cual es su dispersión en zonas endémicas en el mundo. Dentro de la proteína E, existen distintos dominios susceptibles de ser analizados, sin embargo, se sabe que la región del dominio III es la que contiene el mayor porcentaje de variabilidad, por lo que es probable que el análisis de solo esta región pueda proporcionar información suficiente para identificar subtipos genéticos o genotipos. Por otro lado, es factible que esta región contenga la diversidad genética suficiente para ser detectada mediante el análisis de patrones de restricción con enzimas de restricción, que permitiría disponer de una metodología más fácil y práctica, además de menos costosa en comparación con la secuenciación de nucleótidos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la variabilidad genética de la proteína de envoltura (proteína E) de virus dengue-4 aislados en México y en otras regiones del mundo.

## **HIPOTESIS**

Debido a que la proteína de envoltura (proteína E) del virus dengue tipo 4, está involucrada en el proceso de infección de las células blanco, se encuentra sometida a una presión de selección, que le induce cierto grado de variabilidad por lo cual ha sido utilizada en estudios de epidemiología molecular, para caracterizar subtipos genéticos y saber cual es su dispersión en zonas endémicas en el mundo. Dentro de la proteína E, existen distintos dominios susceptibles de ser analizados, sin embargo, se sabe que la región del dominio III es la que contiene el mayor porcentaje de variabilidad, por lo que es probable que el análisis de solo esta región pueda proporcionar información suficiente para identificar subtipos genéticos o genotipos. Por otro lado, es factible que esta región contenga la diversidad genética suficiente para ser detectada mediante el análisis de patrones de restricción con enzimas de restricción, que permitiría disponer de una metodología más fácil y práctica, además de menos costosa en comparación con la secuenciación de nucleótidos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la variabilidad genética de la proteína de envoltura (proteína E) de virus dengue-4 aislados en México y en otras regiones del mundo.

## **OBJETIVO ESPECÍFICO**

Determinar la variación genética de la región del dominio III de la proteína E de virus dengue-4, mediante la digestión con enzimas de restricción y la secuencia de nucleótidos.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **VIRUS**

Se analizaron un total de 38 cepas de virus Den-4 aislados en distintas regiones geográficas y en distintos años ( **Tabla 1**). Se analizaron virus aislados en México de los Estados de Yucatán, Guerrero, Puebla y San Luis Potosí. Se incluyó una cepa (0028) aislada en 1984 en Yucatán. También, se analizaron 21 virus de un brote epidémico en la localidad de Mochitlán Gro. en 1987 ; del Estado de Puebla, se analizaron 8 cepas aisladas en 1991 y del Estado de San Luis Potosí, se analizó una cepa aislada en 1995. Estos virus forman parte del banco de virus dengue del Depto. de Arbovirus del Instituto Nacional de Salud Pública. Los virus se aislaron de pacientes con dengue clásico, a excepción del virus de Yucatán, que se aisló de un caso fatal de FHD. Los virus de otras regiones del mundo: Dakar 1988, República Dominicana 1989, India 1990, China 1990, Malasia 1990 y Venezuela 1990, además de la cepa prototipo H241 (Filipinas, 1954), fueron donadas por la Dra. Rebeca Rico-Hesse de la Unidad de Investigación en Arbovirus (YARU) en la Universidad de Yale, EE.UU.

## **OBJETIVO ESPECÍFICO**

Determinar la variación genética de la región del dominio III de la proteína E de virus dengue-4, mediante la digestión con enzimas de restricción y la secuencia de nucleótidos.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **VIRUS**

Se analizaron un total de 38 cepas de virus Den-4 aislados en distintas regiones geográficas y en distintos años ( **Tabla 1**). Se analizaron virus aislados en México de los Estados de Yucatán, Guerrero, Puebla y San Luis Potosí. Se incluyó una cepa (0028) aislada en 1984 en Yucatán. También, se analizaron 21 virus de un brote epidémico en la localidad de Mochitlán Gro. en 1987 ; del Estado de Puebla, se analizaron 8 cepas aisladas en 1991 y del Estado de San Luis Potosí, se analizó una cepa aislada en 1995. Estos virus forman parte del banco de virus dengue del Depto. de Arbovirus del Instituto Nacional de Salud Pública. Los virus se aislaron de pacientes con dengue clásico, a excepción del virus de Yucatán, que se aisló de un caso fatal de FHD. Los virus de otras regiones del mundo: Dakar 1988, República Dominicana 1989, India 1990, China 1990, Malasia 1990 y Venezuela 1990, además de la cepa prototipo H241 (Filipinas, 1954), fueron donadas por la Dra. Rebeca Rico-Hesse de la Unidad de Investigación en Arbovirus (YARU) en la Universidad de Yale, EE.UU.

**Tabla 1**

Relación de cepas de virus dengue tipo 4 analizadas por RT-PCR y con enzimas de restricción.

CEPA	HISTORIA*	LOCALIDAD	AÑO
0028	Desconocida	Yucatán, México	1984
0148	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0149	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0150	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0151	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0152	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0153	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0154	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0155	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0156	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0157	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0158	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0159	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0160	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0161	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0162	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0163	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0164	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0165	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0166	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0167	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0168	C6/36 1	Guerrero, México	1987
0044	C6/36 1	Puebla, México	1991
0045	C6/36 1	Puebla, México	1991
0046	C6/36 1	Puebla, México	1991
0047	C6/36 1	Puebla, México	1991
0048	C6/36 1	Puebla, México	1991
0051	C6/36 1	Puebla, México	1991
0067	C6/36 1	Puebla, México	1991
0098	C6/36 1	Puebla, México	1991
SLP-01	C6/36 1	San Luis Potosi, México	1995
H241	Desconocida	Filipinas	1956
DAKHD34460	C6/36 1 SM 3	Dakar	1988
TVP2177	C6/36 1	Rep. Dominicana	1989
611319 TVP2395	SM=14, C6/36 1	India	1990
BN-L8 TVO259	C6/36 1	China	1990
LN-72992	AP-61=1	Malasia	1990
88609	C6/36 3	Venezuela	1990

\*)Pases en líneas celulares (C6/36, AP-61) o SM= cerebro de ratón lactante.

## CULTIVOS DE CELULAS

Los virus se mantuvieron y amplificaron en cultivos de células C6/36 de *Aedes albopictus* que se crecieron en botellas de 25 y 75 cc<sup>2</sup> en Medio Mínimo Esencial (MEM) complementado con 10 % de suero fetal bovino y antibiótico-antimicótico (10 U/ml) a 28<sup>0</sup>C. Los cultivos en monocapa se infectaron con 150- 300 µl de suero o de lisado celular y se incubaron durante 10-12 días. Las células infectadas se cosecharon mediante desprendimiento mecánico de la monocapa ; las alícuotas de los lisados se congelaron a -70<sup>0</sup>C hasta su uso.

## INMUNOFLUORESCENCIA

Las células se fijaron en acetona durante 10 min a -20<sup>0</sup>C y posteriormente se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-dengue (1:150 en solución amortiguadora de fosfatos, PBS) durante 30 min a 37<sup>0</sup>C en una cámara húmeda. Las muestras se lavaron 4 veces (cada lavado de 15 min.) y para la inmunofluorescencia indirecta se agregó un anticuerpo monoclonal específico de serotipo (3H5, Den-2 ; 15-F3, Den-1 ; 5D4, Den-3 y 1A10, Den-4) diluido 1:75 y se incubaron a 37<sup>0</sup>C durante 30 min. Las preparaciones se montaron en Elvanol (Elvanol 51-05 13% p/v, glicerol al 33% p/v y Tris-HCl 24 mM pH 8.5). Como controles negativos se usaron células sin infectar y como controles positivos se incluyeron células infectadas con los virus prototipo (Den-1, Hawai ; Den-2, Nueva Guinea C ; Den-3, H87 y Den-4, H241).

## EXTRACCION DE RNA

El RNA total de las células infectadas se extrajo a partir de 200  $\mu$ l de lisado celular más 200  $\mu$ l de solución amortiguadora de lisis, posteriormente se agregaron 80  $\mu$ l de acetato de sodio 2M, pH 5.5 y se agitó. Se agregaron 400  $\mu$ l de fenol pH 4.3, se agitó y agregaron 80  $\mu$ l de cloroformo; las muestras se agitaron y se incubaron en hielo durante 20 min. Posteriormente se centrifugaron durante 15 min a 14, 000 r.p.m. y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. El RNA se precipitó agregando 400  $\mu$ l de isopropanol, los tubos se incubaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  o en hielo seco durante 20 min. Las muestras se centrifugaron por 20 min a 14, 000 r.p.m., el isopropanol se desechó y la pastilla se lavó dos veces con 500  $\mu$ l de etanol al 75 %, finalmente las muestras se secaron a temperatura ambiente y la pastilla se resuspendió en 3  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}$  5 veces destilada estéril.

## RT-PCR

El RNA viral se utilizó como templado en la reacción de transcriptasa reversa (RT); el cDNA se sintetizó utilizando el oligonucleótido antisentido DENE-B-1 específico para dengue 4. Los 3  $\mu$ l de RNA total se agregaron a la mezcla de la reacción de RT ( $\text{MgCl}_2$  5 mM, KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8.3, 1 U/ $\mu$ l de inhibidor de RNAsas, 2.5 U/ $\mu$ l de transcriptasa reversa, mezcla de deoxinucleótidos (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 400  $\mu$ M y 1.2  $\mu$ M del oligo DENE-B-1 (5'-GTTTCACCTAGAATGGCCATT-3') para obtener un volumen final de 10  $\mu$ l. La reacción enzimática se llevó a cabo durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ .

La región que comprende el dominio III de la proteína E del virus Den-4 se amplificó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando los

oligonucleotidos que flanquean esta región; DENE-B-I y DENE-B-II (5'-AAGTGCAAAGTCCGTATGGAG-3'). Estos oligonucleótidos se diseñaron con el programa de cómputo Oligo 4.0 y en base a la secuencia publicada de Den-4 (cepa 814669, Dominica; GeneBank: M14931); el tamaño del producto de PCR es de 404 pb.

Un  $\mu\text{l}$  del producto de la reacción de RT se utilizó en la mezcla de reacción de PCR que contiene: KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, 200  $\mu\text{M}$  de la mezcla de dNTPs,  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM, 2.5 U de Amplitaq DNA polimerasa y 1.2  $\mu\text{M}$  de los oligonucleótidos DENE-B-I y DENE-B-II, en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ . La reacción de PCR se llevó a cabo mediante un paso de desnaturalización inicial del DNA durante 5 min a  $94^\circ\text{C}$ , seguido de 35 ciclos de amplificación (desnaturalización:  $94^\circ\text{C}/30$  seg.; alineamiento:  $56^\circ\text{C}/30$  seg. y extensión:  $72^\circ\text{C}/30$  seg.) y un paso final de extensión a  $72^\circ\text{C}$  durante 5 min. Se incluyeron controles positivos y negativos. Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se teñió con bromuro de etidio (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se visualizó con un transiluminador de luz ultravioleta. Los productos de amplificación se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  o se utilizaron para los ensayos de digestión con enzimas de restricción y/o para secuenciación.

## **DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTICCION**

Los productos amplificados se analizaron mediante la digestión con enzimas de restricción. En base a la secuencia de nt de Den-4 de (Dominica, 1987) se analizaron todos los sitios posibles de restricción con el programa DNA Strider 1.0 y se escogieron seis enzimas que reconocieran sitios tanto en las regiones amino y carboxilo terminal y en la región central y además que los productos digeridos fueran

fácilmente distinguibles en geles de agarosa. Las enzimas seleccionadas fueron : Mae III, Nla III, Sac I, Cfo I, Dde I y Alu I. La posición de corte de estas enzimas y el tamaño de los productos generados se muestran en la **Tabla 2** . La reacción de digestión se llevó a cabo usando de 5 a 10  $\mu$ l de los productos de PCR más 2.5 de la solución amortiguadora apropiada para cada caso y 3 U de la enzima correspondiente, en un volúmen final de 25  $\mu$ l. Las reacciones se realizaron durante 1 hr a 37<sup>0</sup>C para todas las enzimas, excepto para Mae III, que se incubó a 55<sup>0</sup>C. Los productos digeridos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 3% y visualizados como se describió anteriormente.

## SECUENCIACION

El volúmen total de los productos de PCR, se separaron por electroforesis, como se describió anteriormente, y la banda amplificada se cortó y purificó con el kit comercial GeneClean II, siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA purificado se utilizó para secuenciar el dominio III de la proteína E de Den-4 que es sobrelapada por los oligos DENEb-I y DENEb-II. Las reacciones de secuencia se llevaron a cabo utilizando el sistema de secuenciación fmol DNA de Promega Co empleando el protocolo de incorporación directa de la marca radioactiva. Aproximadamente de 50 a 100 ng de DNA se mezcló con 5 picomoles del oligonucleótido correspondiente (para cada muestra se hicieron dos reacciones de secuencia, una con el oligonucleótido de la región 5' y otra con el oligonucleótido 3', para obtener la región del dominio III que consta de 282 nt), 0.5  $\mu$ l de [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dATP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l), 5  $\mu$ l del amortiguador 5X y 1  $\mu$ l (5U) de Taq DNA polimerasa (grado de secuencia) en un volúmen final de 16  $\mu$ l. De esta mezcla se agregaron 4  $\mu$ l a cada

## Tabla 2

Relación de enzimas de restricción empleadas para analizar la región del dominio III de la proteína E del virus dengue 4.

ENZIMA	POSICION (nt)	TAMAÑO DEL FRAGMENTO (nt)
Dde I	223	223, 181
Hha I	302	304, 100
Mae III	241	240, 164
Nla III	100	305, 99
Sac I	140	265, 139
Alu I	141, 274	140, 136, 128

tubo (A, C, G, T) con 2  $\mu$ l de su respectiva mezcla de ddNTPs; la mezcla final se cubrió con 20  $\mu$ l de aceite mineral. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador durante 25 ciclos (desnaturalización :95<sup>0</sup>C/1 min. ; alineamiento : 42<sup>0</sup>C/1 min. y extensión : 70<sup>0</sup>C/1 min.) posterior a un primer paso de desnaturalización a 95<sup>0</sup>C por 2 min. Finalmente se agregaron 3  $\mu$ l de solución de paro por cada tubo y las muestras se congelaron hasta su uso.

El DNA se separó por electroforésis en un gel de alta resolución (acrilamida/bis-acrilamida al 40 % p/v, 8M de urea) durante aproximadamente 4 hrs a 1500 volts. El gel se secó mediante vacío a 80<sup>0</sup>C durante 30 min y se expuso durante 48 hrs ante una película de autoradigrafía. La secuencia de nucleótidos se leyó manualmente con la ayuda de un transiluminador de luz blanca.

## RESULTADOS

### RT-PCR

La especificidad de los oligonucleótidos iniciadores que flanquean el dominio III del gene de la proteína de envoltura del virus dengue tipo 4, se probó con los cuatro prototipos del virus dengue. Las células C6/36 se infectaron con los virus : Den-1, Hawai, Den-2, Nueva Guinea, Den-3, H87 y Den-4,H241. Se extrajo el RNA de las células infectadas y se amplificó por RT-PCR. Se observó una banda del tamaño esperado (404 pb) únicamente con el templado correspondiente a Den-4 (**Figura 4**).

De la misma forma, se amplificó el RNA de virus aislados de pacientes provenientes de los Estados de Guerrero, Yucatán, Puebla y San Luis Potosí y de

tubo (A, C, G, T) con 2  $\mu$ l de su respectiva mezcla de ddNTPs; la mezcla final se cubrió con 20  $\mu$ l de aceite mineral. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador durante 25 ciclos (desnaturalización :95<sup>0</sup>C/1 min. ; alineamiento : 42<sup>0</sup>C/1 min. y extensión : 70<sup>0</sup>C/1 min.) posterior a un primer paso de desnaturalización a 95<sup>0</sup>C por 2 min. Finalmente se agregaron 3  $\mu$ l de solución de paro por cada tubo y las muestras se congelaron hasta su uso.

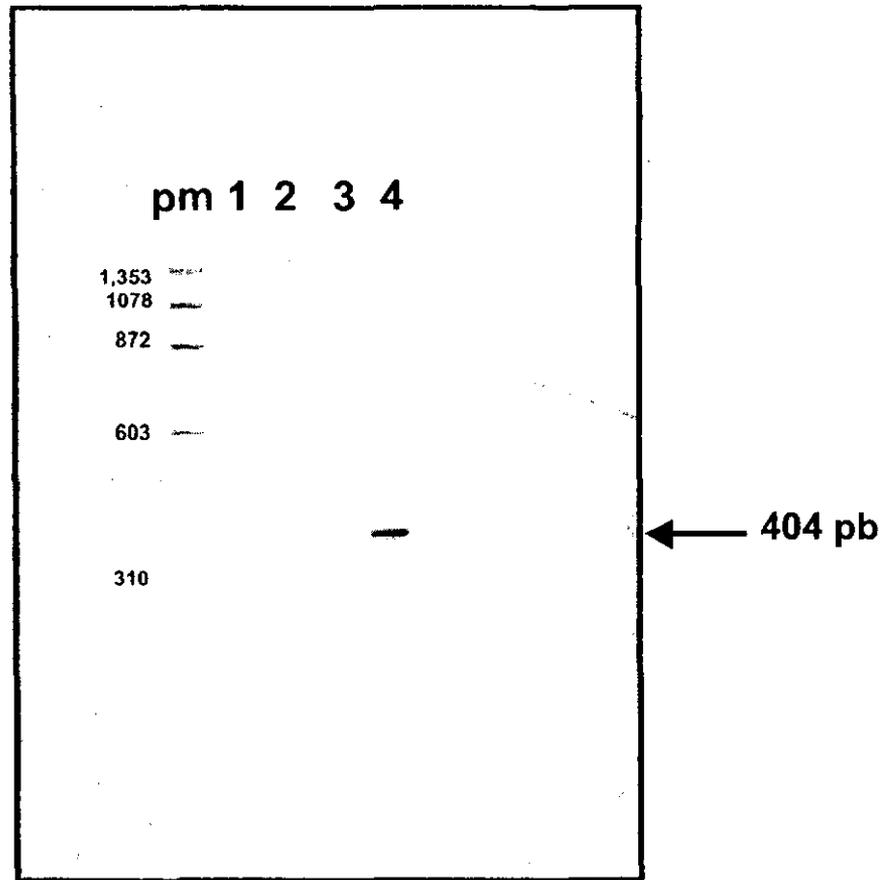
El DNA se separó por electroforesis en un gel de alta resolución (acrilamida/bis-acrilamida al 40 % p/v, 8M de urea) durante aproximadamente 4 hrs a 1500 volts. El gel se secó mediante vacío a 80<sup>0</sup>C durante 30 min y se expuso durante 48 hrs ante una película de autoradigrafía. La secuencia de nucleótidos se leyó manualmente con la ayuda de un transiluminador de luz blanca.

## RESULTADOS

### RT-PCR

La especificidad de los oligonucleótidos iniciadores que flanquean el dominio III del gene de la proteína de envoltura del virus dengue tipo 4, se probó con los cuatro prototipos del virus dengue. Las células C6/36 se infectaron con los virus : Den-1, Hawai, Den-2, Nueva Guinea, Den-3, H87 y Den-4,H241. Se extrajo el RNA de las células infectadas y se amplificó por RT-PCR. Se observó una banda del tamaño esperado (404 pb) únicamente con el templado correspondiente a Den-4 (Figura 4).

De la misma forma, se amplificó el RNA de virus aislados de pacientes provenientes de los Estados de Guerrero, Yucatán, Puebla y San Luis Potosí y de

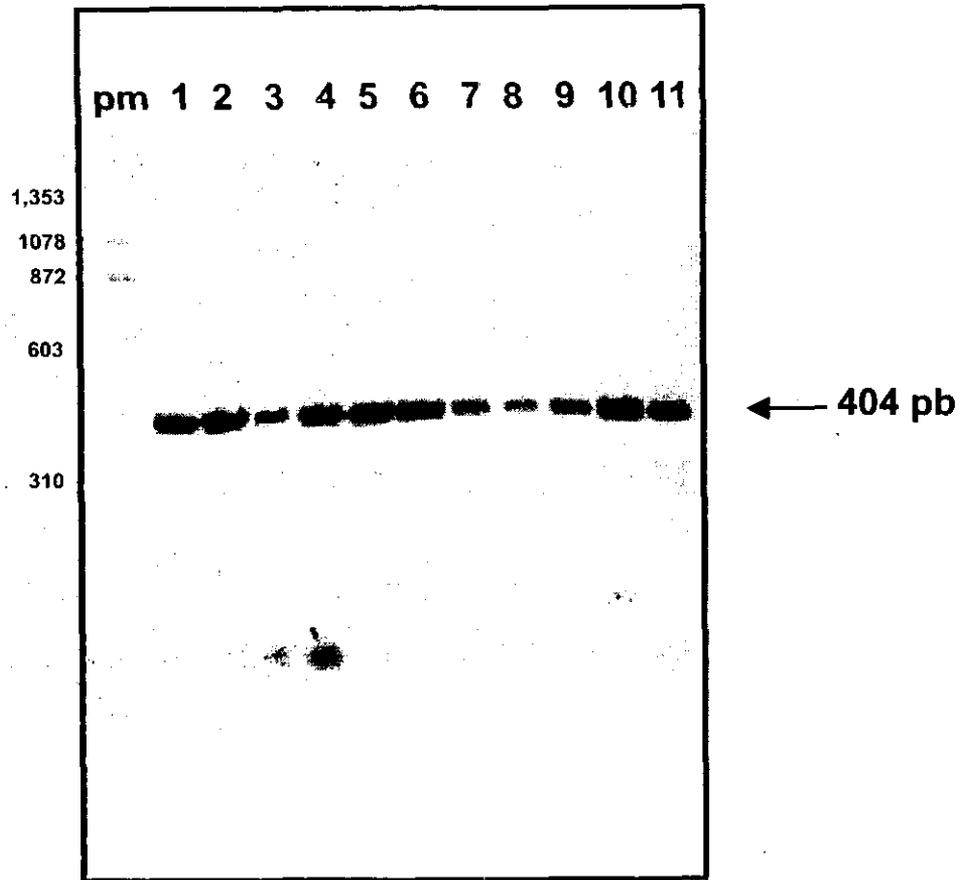


**Figura 4.** Producto de amplificación por RT-PCR de la región del dominio III de la proteína E de dengue tipo 4, usando los oligonucleótidos específicos DENE-B-I y DENE-B-II. El RNA utilizado como templado proviene de los virus prototipo Hawaii (Den-1), Nueva Guinea C (Den-2), H87 (Den-3) y H241 (Den-4), el primer carril muestra el marcador de peso molecular  $\phi$ X174 digerido con Hae III y los carriles siguientes corresponden a Den-1, Den-2, Den-3 y Den-4, respectivamente.

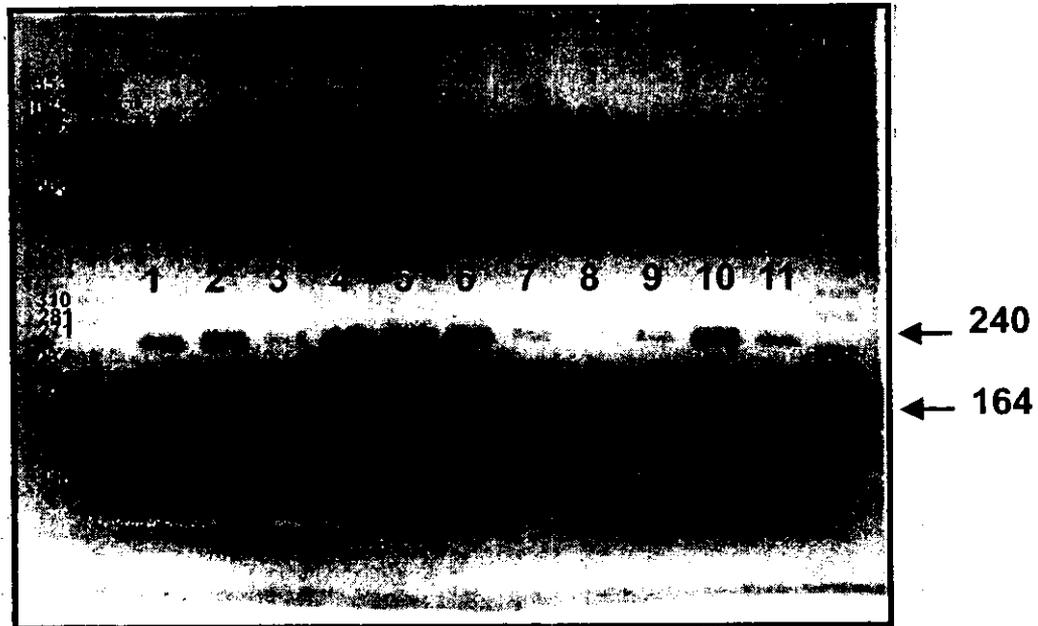
otras regiones del mundo, incluyendo la cepa prototipo H241(38 virus en total). Los resultados mostraron un producto de 404 pb en todas las muestras (**Figura 5**).

### **DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN**

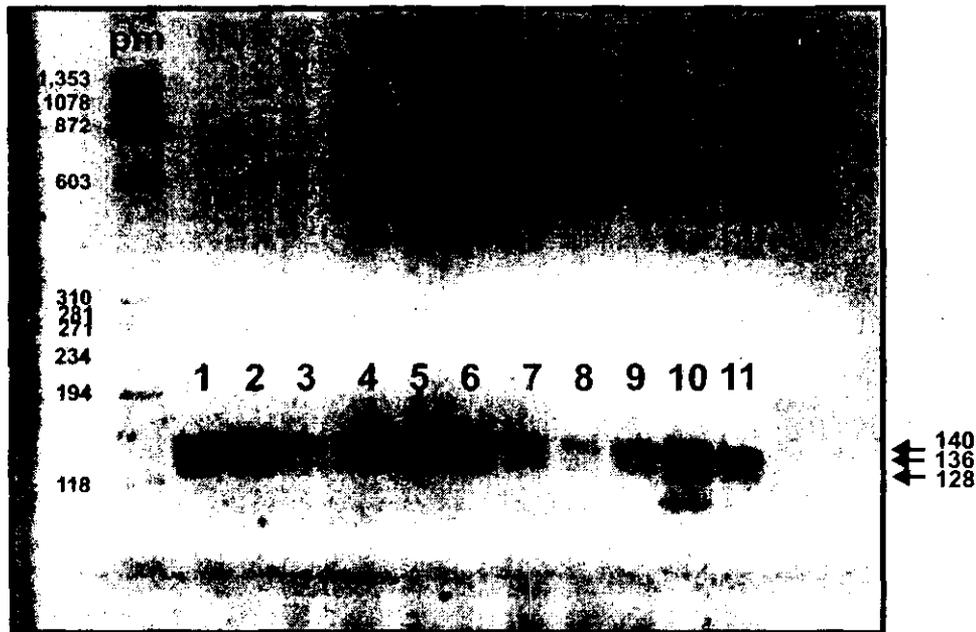
Una alícuota (5-10  $\mu$ l) de cada producto de amplificación se utilizó y se digirió con cada una de las enzimas por separado. Los virus de México y los de otros países digeridos con las seis enzimas (Mae III, Alu I, Sac I, Nla III, Dde I y CfoI) mostraron patrones similares de digestión (**Figuras 6, 7 y 8**). El tamaño de las bandas obtenidas corresponde al tamaño esperado. El sitio de restricción para la enzima Mae III se encuentra en el nucleótido 241 de la región amplificada, por lo que se generan dos productos : 240 nt y 164 nt (**Figura 6**). Para Alu I, existen 2 sitios : uno en el nucleótido 141 y otro en el 277, lo que genera tres fragmentos de 140, 136 y 128 nucleótidos (**Figura 7**). La enzima Sac I, reconoce un sitio en el nucleótido 140 por lo que se generan dos fragmentos de 139 y 265 nt (**Figura 8**). Por otro lado, la digestión con las enzimas Nla III, Dde I y Cfo I, generaron patrones distintos por lo menos en un virus analizado. La digestión con Nla III reconoce un sitio en el nucleótido 100, por lo que se generan 2 fragmentos, uno de 99 y otro de 305 nt, este patrón se obtuvo con todas las muestras excepto con la cepa prototipo H241 (**Figura 9**). El análisis por computadora de la secuencia de la cepa H241(número de acceso de GeneBank U18433) mostró que esta enzima reconoce 3 sitios en la región amplificada en los nucleótidos 15, 100 y 146, lo que generaría 4 fragmentos de 14, 46, 85 y 259 nt. Los 2 últimos fragmentos, que son los más grandes se observaron en nuestros experimentos y debido a las condiciones del gel, no se observaron los fragmentos pequeños. El mismo caso se presentó para la enzima Dde I, donde todos



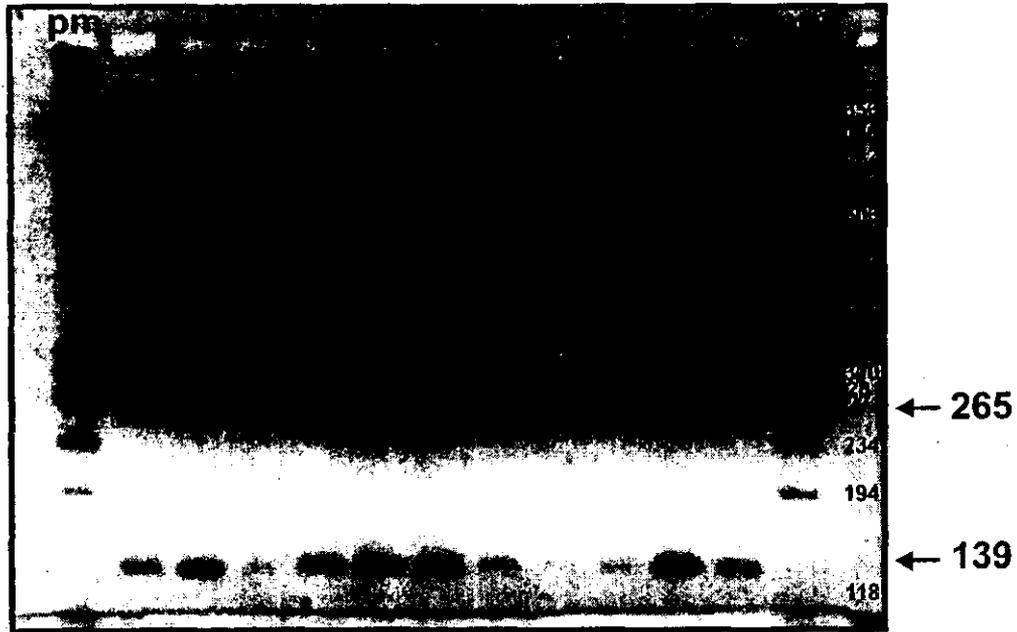
**Figura 5.** Productos de amplificación de la región del dominio III de la proteína E de dengue 4, usando como templado RNA de virus aislados en distintas regiones de México y del mundo. El marcador de peso molecular corresponde a  $\phi$ X174 digerido con Hae III y los carriles son los siguientes : 1) virus prototipo H241, 2) virus 0028, Yucatán/1984, 3) virus 0153, Guerrero/1987, 4) virus SLP-01, San Luis Potosí/1995, 5) virus 0047, Puebla/1991, 6) virus DAKHD34460, Dakar/1988, 7) virus 88609, Venezuela/1990, 8) virus BN-L8 TVO259, China/1990, 9) virus LN-72992, Malasia/1990, 10) virus TVP2177, República Dominicana/1989 y 11) virus 611319, India1990.



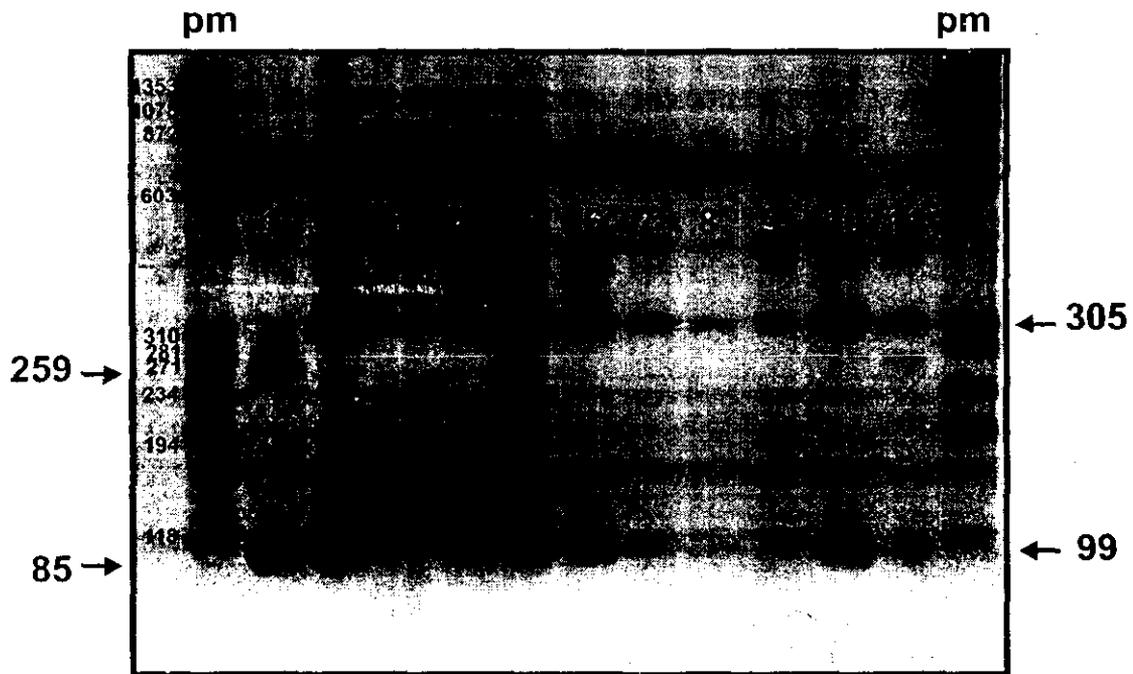
**Figura 6.** Productos de amplificación de la región del dominio III de la proteína E de dengue 4, usando como templado RNA de virus aislados en distintas regiones de México y del mundo, digeridos con la enzima de restricción Mae III. El marcador de peso molecular corresponde a  $\phi$ X174 digerido con Hae III y los carriles son los siguientes : 1) virus prototipo H241, 2) virus 0028, Yucatán/1984, 3) virus 0153, Guerrero/1987, 4) virus SLP-01, San Luis Potosí/1995, 5) virus 0047, Puebla/1991, 6) virus DAKHD34460, Dakar/1988, 7) virus 88609, Venezuela/1990, 8) virus BN-L8 TVO259, China/1990, 9) virus LN-72992, Malasia/1990, 10) virus TVP2177, República Dominicana/1989 y 11) virus 611319, India 1990.



**Figura 7.** Productos de amplificación de la región del dominio III de la proteína E de dengue 4, usando como templado RNA de virus aislados en distintas regiones de México y del mundo, digeridos con la enzima de restricción Alu I. El marcador de peso molecular corresponde a  $\phi$ X174 digerido con Hae III y los carriles son los siguientes : 1) virus prototipo H241, 2) virus 0028, Yucatán/1984, 3) virus 0153, Guerrero/1987, 4) virus SLP-01, San Luis Potosí/1995, 5) virus 0047, Puebla/1991, 6) virus DAKHD34460, Dakar/1988, 7) virus 88609, Venezuela/1990, 8) virus BN-L8 TVO259, China/1990, 9) virus LN-72992, Malasia/1990, 10) virus TVP2177, República Dominicana/1989 y 11) virus 611319, India 1990.

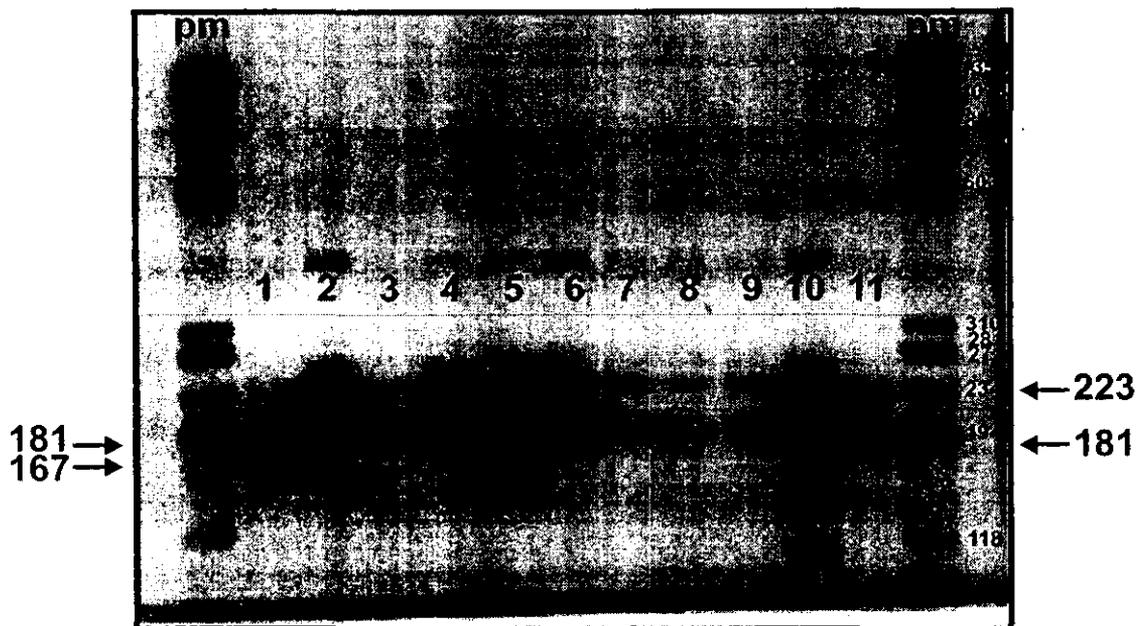


**Figura 8.** Productos de amplificación de la región del dominio III de la proteína E de dengue 4, usando como templado RNA de virus aislados en distintas regiones de México y del mundo, digeridos con la enzima de restricción *Sac* I. El marcador de peso molecular corresponde a  $\phi$ X174 digerido con *Hae* III y los carriles son los siguientes : 1) virus prototipo H241, 2) virus 0028, Yucatán/1984, 3) virus 0153, Guerrero/1987, 4) virus SLP-01, San Luis Potosí/1995, 5) virus 0047, Puebla/1991, 6) virus DAKHD34460, Dakar/1988, 7) virus 88609, Venezuela/1990, 8) virus BN-L8 TVO259, China/1990, 9) virus LN-72992, Malasia/1990, 10) virus TVP2177, República Dominicana/1989 y 11) virus 611319, India1990.

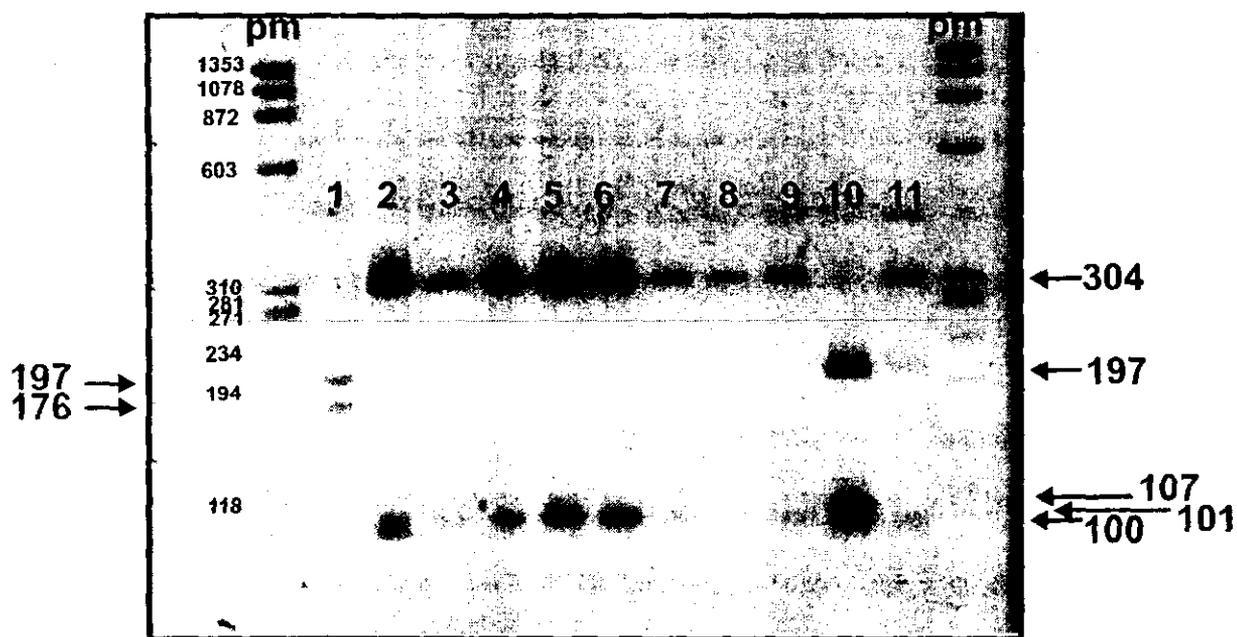


**Figura 9.** Productos de amplificación de la región del dominio III de la proteína E de dengue 4, usando como templado RNA de virus aislados en distintas regiones de México y del mundo, digeridos con la enzima de restricción Nla III. El marcador de peso molecular corresponde a  $\phi$ X174 digerido con Hae III y los carriles son los siguientes : 1) virus prototipo H241, 2) virus 0028, Yucatán/1984, 3) virus 0153, Guerrero/1987, 4) virus SLP-01, San Luis Potosí/1995, 5) virus 0047, Puebla/1991, 6) virus DAKHD34460, Dakar/1988, 7) virus 88609, Venezuela/1990, 8) virus BN-L8 TVO259, China/1990, 9) virus LN-72992, Malasia/1990, 10) virus TVP2177, República Dominicana/1989 y 11) virus 611319, India1990.

los virus, excepto el virus prototipo H241, mostraron un patrón similar (**Figura 10**), el sitio de reconocimiento de esta enzima está en el nucleótido 224, por lo que se generan dos fragmentos, uno de 223 y otro de 181 nt. En el caso del virus prototipo H241 se observaron 2 bandas de aproximadamente 167 y 181 nt y el análisis de la secuencia por computadora confirmó el tamaño de estos fragmentos generados por un corte en el sitio 224 (igual que el resto de los virus analizados) y mostró otro sitio de corte en el nucleótido 57 por lo que se genera otro fragmento de 56 nt, que no es visible en nuestras condiciones de trabajo. Finalmente, cuando los virus se digirieron con la enzima Cfo I, los virus prototipo H241 y el de República Dominicana, mostraron un patrón de restricción distinto al resto y distinto entre ellos (**Figura 11**). Los fragmentos esperados ( sitio de corte en el nucleótido 305) de 304 y 100 nt, se observaron en la mayoría de las muestras. El virus de República Dominicana, conserva el sitio 305 pero además existe otro en el nucleótido 198, lo que genera 3 fragmentos : 107, 197 y 101 nt. El análisis de la secuencia de nt de un virus aislado en Puerto Rico (GeneBank U18436), mostró un patrón similar al que observamos con el virus de República Dominicana. El análisis de la secuencia de nt de ambos virus mostró que comparten los mismos sitios de restricción. En el virus prototipo, también existen dos sitios de corte de la enzima Cfo I, uno en el nucleótido 374, que difiere de todas las demás, y otro en el nucleótido 198, lo que genera tres fragmentos : 176, 197 y 31 nt; el análisis computacional de la secuencia de nucleótidos, confirmó el tamaño de las bandas observadas.



**Figura 10.** Productos de amplificación de la región del dominio III de la proteína E de dengue 4, usando como templado RNA de virus aislados en distintas regiones de México y del mundo, digeridos con la enzima de restricción Dde I. El marcador de peso molecular corresponde a  $\phi$ X174 digerido con Hae III y los carriles son los siguientes : 1) virus prototipo H241, 2) virus 0028, Yucatán/1984, 3) virus 0153, Guerrero/1987, 4) virus SLP-01, San Luis Potosí/1995, 5) virus 0047, Puebla/1991, 6) virus DAKHD34460, Dakar/1988, 7) virus 88609, Venezuela/1990, 8) virus BN-L8 TVO259, China/1990, 9) virus LN-72992, Malasia/1990, 10) virus TVP2177, República Dominicana/1989 y 11) virus 611319, India1990.



**Figura 11.** Productos de amplificación de la región del dominio III de la proteína E de dengue 4, usando como templado RNA de virus aislados en distintas regiones de México y del mundo, digeridos con la enzima de restricción Cfo I. El marcador de peso molecular corresponde a  $\phi$ X174 digerido con Hae III y los carriles son los siguientes : 1) virus prototipo H241, 2) virus 0028, Yucatán/1984, 3) virus 0153, Guerrero/1987, 4) virus SLP-01, San Luis Potosí/1995, 5) virus 0047, Puebla/1991, 6) virus DAKHD34460, Dakar/1988, 7) virus 88609, Venezuela/1990, 8) virus BN-L8 TVO259, China/1990, 9) virus LN-72992, Malasia/1990, 10) virus TVP2177, República Dominicana/1989 y 11) virus 611319, India1990.

## SECUENCIACIÓN

Se analizó la secuencia de nucleótidos del dominio III de la proteína E (282 nucleótidos, 901-1182 que corresponden a 94 residuos de aminoácidos, 301-394) de 24 virus dengue tipo 4. De México se secuenciaron 3 virus (Guerrero, Puebla y San Luis Potosí) y 6 de otras regiones del mundo (**Tabla 1**). Las secuencias de nt se enviaron a la base de datos del GeneBank y los números de acceso otorgados son : AF051104, AF051105 AF051106 AF051107 AF051108 AF051109 AF051110 AF051111 AF051112. Las secuencias de nt de los otros virus incluidos, se obtuvieron de la base de datos del GeneBank (números de acceso : U18425, U18426, U18427, U18428, U18430, U18431, U18432, U18433, U18434, U18435, U18436, U18438, U18439, U18440, U18442). Además, se incluyó en el análisis, las secuencias de nt de los serotipos Den-1, Hawaii ; Den-2, Malasia y Den-3 ,M3 y Fiji (GeneBank :X76219, X15214 y L11422, respectivamente). El análisis de la secuencia de nucleótidos y de la secuencia deducida de aminoácidos, se realizó con el programa de cómputo Wisconsin (Genetics Computer Group). La comparación de las secuencias de nt de todos los virus de Den-4 mostró una divergencia máxima de 9.3 % (**Tabla 3**). Los cambios de nucleótidos ocurrieron en 52 posiciones, lo que representa el 18.4 % del dominio III ; la mayoría de estos cambios fueron transiciones silenciosas. La región de mayor variabilidad se encontró entre los nucleótidos 961-1080, que corresponde a los aa 321-360, con 29 mutaciones (55.8 %)(**Figura 12**). El análisis de la secuencia deducida de aminoácidos mostró 8 cambios (8.6 %) : Cys-Tyr<sup>326</sup>, Thr-Ala<sup>329</sup>, Glu-Gln<sup>330</sup>, Ile-Val<sup>335</sup>, Arg-Lys<sup>344</sup>, Val-Ile<sup>351</sup>, Tyr-Asn<sup>360</sup> y Asp-Asn<sup>384</sup> (**Figura 13**). Siete de estos cambios ocurrieron en la región de máxima variabilidad, antes mencionada.

LIBRERIA DE LA ESCUELA DE QUÍMICA  
NO DEBE SER PRESTADA

**Tabla 3**

Porcentaje de homología en la secuencia nucleótidos del Dominio III o del gene completo de la Proteína E de diferentes virus Den-4.

	<i>Tailandia 63</i>		<i>Filipinas 54</i>		<i>México 84</i>	
	Dom III	Gen E	Dom III	Gen E	Dom III	Gen E
Tailandia 63	100	100	92.5	95.2	93.2	92.6
Indonesia 73	94.0	93.8	95.4	95.1	95.7	95.8
Filipinas 54	93.2	95.2	100	100	94.3	94.1
Indonesia 77	92.9	93.3	97.9	95.1	95.4	98.7
JSan L Potosi 95	92.9		97.9		94.7	
Filipinas 64	92.9	94.9	94.0	99.1	98.2	94.3
Jpuebla 91	92.6		98.2		95.0	
Brasil 82	92.5	92.8	98.9	94.5	95.0	99.5
N.Caledonia 84	92.5	92.8	98.9	94.5	95.0	99.6
JDakar 88	92.5		98.9		95.0	
JIndia 90	92.5		98.9		95.0	
México 84	92.5	92.6	94.3	94.1	100	100
Salvador 83	92.5	92.7	98.9	94.4	95.0	99.5
Tailandia 84	92.5	93.5	92.9	95.2	93.6	93.7
Taiti 79	92.5	93.0	98.9	94.4	95.0	99.3
JChina 90	92.2		98.6		94.7	
JGuerrero 87	92.2		98.6		94.7	
Jmalasia 90	92.2		98.6		94.7	
JVenezuela 90	92.2		98.6		94.7	
P. Rico 86	92.2	92.3	97.9	94.0	94.7	98.6
Taiti 85	92.2	92.3	98.0	94.0	94.7	98.6
Salvador 94	91.8	92.6	98.2	94.1	94.3	98.6
JR.Dominicana 89	91.1		97.3		93.8	
Filipinas 84	90.7	93.9	92.9	97.6	95.7	93.9
Den2	63.8		64.0		65.1	
Den1	63.2		59.3		58.2	
Den3	61.7		59.4		60.6	

	1001				1050
jgro87	AAGTCCCCAT	AGAGATAAGA	GATGTAAACA	AGGAAAAAGT	GGTTGGGCGT
jdakar88	.....	.....	.....	.....	.....
jindia90	.....	.....	.....	.....	.....
jreptomi89	.....	.....	.....	.....	.....C
jchina90	.....	.....	.....	.....	.....
jmalasia90	.....	.....	.....	.....	.....
jvenezue90	.....	.....	.....	.....	.....
jpueb90	.....	.....	.....	.....	.....
jslp95	.....	.....	.....	.....	.....
*phi54	....T.....	.....	....G....	.....	...A....C
phi64	....T.....	.....	....G....	.....	...A.....
phi84	....T.....	.....	....G....	G.....	...A.....
pric86	.....	.....	.....	.....	.....C
indon77	.....	.....	.....	.....	.....
braz87	.....	.....	.....	.....	.....
caledo84	.....	.....	.....	.....	.....
salv83	.....	.....	.....	.....	.....
tait79	.....	.....	.....	.....	.....
tait85	.....	.....	.....	.....	.....
salv94	.....	.....	.....	.....	.....
mex84	.....	.....	.....	.....	.....
indon73	.....	.....	....G....	.....	.....C
tailan84	.....	.....	....G....	.....	.....
tailan63	..A.....	.....	....G....	.....	T.....C
DEN1	AGATCCCCTT	TTCGACCCAA	GATGAGAAAG	GAGTAACCCA	GAATGGGAGA
DEN2	AGATCCCCTT	TGAAATCATC	GATTTGGAAA	AAAGACATGT	CTTAGGTTGC
DEN3	AGATTCCTTT	CTCCACGGAG	GATGGACAAG	GGAAAGCCCA	CAATGGCAGA
	1051				1100
jgro87	ATCATCTCAT	CCACCCCTTT	GGCTGAGAAT	ACCAACAGTG	TAACCAACAT
jdakar88	.....	.....	.....	.....	.....
jindia90	.....	.....	.....	.....	.....
jreptomi89	G.T.....	.....	.....	.....	.....
jchina90	.....	.....	.....	.....	.....
jmalasia90	.....	.....	.....	.....	.....
jvenezue90	.....	.....	.....	.....	.....
jpueb90	.....	.....	.....	.....	.....
jslp95	G.....	.....	.....	..T.....	.....
*phi54	.....	..T.....	.....T..	.....	.....
phi64	.....	..T.....	.....C	.....	.....
phi84	G.....	..T.....	...C....	.....	.....
pric86	G.....	.....	.....	.....	.....
indon77	.....	.....	.....	.....	.....
braz87	.....	.....	.....	.....	.....
caledo84	.....	.....	.....	.....	.....
salv83	.....	.....	.....	.....	.....
tait79	.....	.....	.....	.....	.....
tait85	G.....	.....	.....	.....	.....
salv94	.....	.....	.....	.....	.....
mex84	.....	.....	.....	.....	.....
indon73	.....	..T.....	.....	.....	..C.....
tailan84	.....	..T.....	.....	.....	..G.....T..
tailan63	.....	....T....	.....A..C	.....C..	..G.....T..
DEN1	TTGATAACAG	CCAACCCCAT	AGTCACTGAC	AAAGAAAAC	CAGTCAACAT
DEN2	CTTATTACAG	TTTACCCGAT	CGTAACAGAA	AAAGATAGCC	CAGTCAACAT
DEN3	CTGATCACAG	CTAACCCAAT	AGTGACCAAG	AAGGAGGAGC	CTGTCAACAT

Figura 12. Continuación.

	901				950
jgro87	<b>ATGTGTTTCAG</b>	<b>GAAAGTTTTTC</b>	<b>AATTGACAAA</b>	<b>GAGATGGCAG</b>	<b>AAACACAGCA</b>
jdakar88	.....	.....	.....	.....	.....
jindia90	.....	.....	.....	.....	.....
jreptomi89	.....	.....	.....	A.....	.....
jchina90	.....	.....	.....	.....	.....
jmalasia90	.....	.....	.....	.....	.....
jvenezue90	.....	.....	.....	.....	.....
jpueb90	.....	C.....	.....	.....	.....
jslp95	.....	.....	C.....	.....	.....
*phi54	.....	C.....	.....	.....	.....
phi64	.....	C.....	.....	.....	.....
phi84	.....	C.....	G.....	C.....	.....
pric86	.....	.....	.....	C.....	.....
indon77	.....	.....	C.....	.....	.....
braz87	.....	.....	.....	.....	.....
caledo84	.....	.....	.....	.....	.....
salv83	.....	.....	.....	.....	.....
tait79	.....	.....	.....	.....	.....
tait85	.....	.....	.....	.....	.....
salv94	.....	.....	.....	T.....	.....
mex84	.....	.....	.....	.....	.....
indon73	.....	.....	C.....	.....	.....
tailan84	.....	C.....	.....	C.....	T.....
tailan63	.....	C.....	.....	C.....	.....
DEN1	<b>ATGTGCACAG</b>	<b>GCTCATTCAA</b>	<b>GTTAGAGAAA</b>	<b>GAAGTGGCTG</b>	<b>AGACCCAGCA</b>
DEN2	<b>ATGTGTACAG</b>	<b>GAAAGTTTAA</b>	<b>AATTGTGAAG</b>	<b>GAATTCGCTG</b>	<b>AAACACAACA</b>
DEN3	<b>ATGTGCTTGA</b>	<b>ATGCCTTCGT</b>	<b>GTTGAAGAAA</b>	<b>GAAGTCTCTG</b>	<b>AAACGCAACA</b>
	951				1000
jgro87	<b>TGGGACAACA</b>	<b>GTGGTGAAAG</b>	<b>TCAAGTATGA</b>	<b>AGGTGCTGGA</b>	<b>GCTCCGTGCA</b>
jdakar88	.....	.....	.....	.....	T.....
jindia90	.....	.....	.....	.....	T.....
jreptomi89	.....	.....	.....	.....	T.....
jchina90	.....	C.....	.....	.....	T.....
jmalasia90	.....	C.....	.....	.....	T.....
jvenezue90	.....	C.....	.....	.....	T.....
jpueb90	.....	.....	.....	.....	.....
jslp95	.....	.....	.....	.....	T.....
*phi54	.....	.....	A.....	.....	G.....
phi64	.....	.....	A.....	.....	A.....
phi84	.....	.....	T.....	.....	A.....
pric86	.....	.....	.....	.....	T.....
indon77	.....	.....	.....	.....	.....
braz87	.....	.....	.....	.....	T.....
caledo84	.....	.....	.....	.....	T.....
salv83	.....	.....	.....	.....	T.....
tait79	.....	.....	.....	.....	T.....
tait85	.....	.....	.....	.....	T.....
salv94	.....	.....	.....	.....	T.....
mex84	.....	.....	.....	G.....	C.....
indon73	.....	.....	.....	.....	C.....
tailan84	.....	A.....	A.....	G.....	CA.....
tailan63	.....	A.....	A.....	G.....	T.....
DEN1	<b>TGGA</b> ACTGTT	<b>CTAGTGCAGG</b>	<b>TTAAATACGA</b>	<b>AGGAACAGAT</b>	<b>GCACCATGCA</b>
DEN2	<b>TGGA</b> ACCATC	<b>GTTATCAGAG</b>	<b>TGCAATATGA</b>	<b>AGGGGACGGC</b>	<b>TCTCCATGTA</b>
DEN3	<b>TGGG</b> ACGATA	<b>CTCATTAAGG</b>	<b>TTGAGTACAA</b>	<b>AGGGGAAGAT</b>	<b>GCACCTTGCA</b>

**Figura 12.** Comparación de la secuencia de nucleótidos (nt) del fragmento de 282 nt que comprende la región del dominio III de diferentes virus dengue tipo 4 incluyendo la cepa prototipo H241(\*) y la secuencia consenso de los virus Den-1, 2 y 3. Las secuencias que se obtuvieron en este estudio (negritas) se comparan con las reportadas en la base de datos GeneBank. Los puntos indican igualdad y los cambios de nt se indican con la letra correspondiente.

	1101				1150
jgro87	AGAATTAGAA	CCCCCCTTTG	GGGACAGCTA	CATAGTGATA	GGTGTTGGAA
jdakar88	.....	.....	.....	.....	.....
jindia90	.....	.....	.....	.....	.....
jreptomi89	.....	.....	.....	.....	.....
jchina90	.....	.....	.....	.....	.....
jmalasia90	.....	.....	.....	.....	.....
jvenezue90	.....	.....	.....	.....	.....
jpueb90	.....	.....	.....	.....	.....
jslp95	.....	.....	.....	.....	.....
*phi54	.....	.....	.....	.....A.....	.....G
phi64	.....	.....T.....	.....	.....A.....	.....G
phi84	.....	.....T.....	.....	.....A.....	.....G
pric86	.....	.....	.....	.....	.....
indon77	.....	.....	.....	.....	.....
braz87	.....	.....	.....	.....	.....
caledo84	.....	.....	.....	.....	.....
salv83	.....	.....	.....	.....	.....
tait79	.....	.....	.....	.....	.....
tait85	.....	.....	.....	.....	.....
salv94	.....	.....	.....	.....	.....C.....
mex84	.....	.....T.....	.....	.....	.....
indon73	.....	.....T.....	.....	.....	.....G
tailan84	.....G.....	.....T..T.....	.....T.....	.....	.....G...G
tailan63	.....	.....T.....	.....	.....A.....	.....G
DEN1	TGAGGCAGAA	CCACCTTTTG	GTGAGAATTA	CATCGTGGTA	GGAGCAGGTG
DEN2	AGAAGCAGAC	CCTCCATTTCG	GAGACAGCTA	CATAATCATA	GGAAATAGAGC
DEN3	TGAGGCAGAA	CCTCCTTTTG	GGGAAAGTAA	TATAGTAATT	GGAAATGGAG
	1151			1182	
jgro87	ACAGCGCATT	AACACTCCAT	TGGTTCAGGA	AA	
jdakar88	.....	.....	.....	..	
jindia90	.....	.....	.....	..	
jreptomi89	.....	.....	.....	..	
jchina90	.....	.....	.....	..	
jmalasia90	.....	.....	.....	..	
jvenezue90	.....	.....	.....	..	
jpueb90	.....	.....	.....	..G	
jslp95	.....	.....	.....	..	
*phi54	.....T.....	.....	.....	..	
phi64	.....T.....	.....	.....	..	
phi84	.....T.....	.....	.....	..	
pric86	.....	.....	.....	..	
indon77	.....T.....	.....	.....	..	
braz87	.....	.....	.....	..	
caledo84	.....	.....	.....	..	
salv83	.....	.....	.....	..	
tait79	.....	.....	.....	..	
tait85	.....	.....	.....	..	
salv94	.....	.....	.....	..	
mex84	.....	.....	.....	..	
indon73	.....T..T.....	.....	.....	..	
tailan84	.....T.....	.....	.....	..	
tailan63	.....T.....	.....	.....	..G	
DEN1	AAAAAGCTTT	GAAACTAAGC	TGGTTC AAGA	AA	
DEN2	CGGGACAATT	GAAACTCCAC	TGGTTGAAGA	AA	
DEN3	ACAAAGCCTT	GAAAATCAAC	TGGTACAAGA	AA	

Figura 12. Continuación.

	301				350
<b>jchina90</b>	<b>MCSGKFSIDK</b>	<b>EMAETQHGT</b>	<b>VVKVYEGAG</b>	<b>APCKVPIEIR</b>	<b>DVNKEKVVGR</b>
jslp95	.....	.....	.....	.....	.....
jdakar88	.....	.....	.....	.....	.....
jpgro87	.....	.....	.....	.....	.....
jindia90	.....	.....	.....	.....	.....
jmala90	.....	.....	.....	.....	.....
jpueb91	.....	.....	.....	.....	.....
jvenezue90	.....	.....	.....	.....	.....
jreptomi89	.....	.....	.....	.....	.....
pric86	.....	.....	.....	.....	.....
tait85	.....	.....	.....	.....	.....
braz87	.....	.....	.....	.....	.....
caledo84	.....	.....	.....	.....	.....
indon77	.....	.....	.....	.....	.....
salv83	.....	.....	.....	.....	.....
salv94	.....	.....	.....	.....	.....
tait79	.....	.....	.....	.....	.....
indon73	.....	.....	.....	.....	.....
phi64	.....	.....	.....	.....	.....
phi84	.....	.....	.....	.....	...R.....
tailan84	.....	.....	.....T.....	.....	.....
mex84	.....	.....	.....C.....	.....	.....
phi54	.....	.....	.....	.....	.....
tailan63	.....	.....	.....E.....	.....I.....	.....

**Figura 13.** Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la región del dominio III de la proteína E de diferentes virus Dengue tipo 4. Las secuencias que se obtuvieron en este estudio (negritas), se comparan con las reportadas en la base de datos GeneBank. Los puntos indican igualdad y los cambios de aminoácidos se indican con la letra correspondiente.

	351				394
jchina90	IISSTPLAEN	TNSVTNIELE	PPFGDSYIVI	GVGNSALTLH	WFRK
jslp95	V.....	.....	.....	.....	.....
jdakar88	.....	.....	.....	.....	.....
jpgro87	.....	.....	.....	.....	.....
jindia90	.....	.....	.....	.....	.....
jmala90	.....	.....	.....	.....	.....
jpueb91	.....	.....	.....	.....	.....
jvenezue90	.....	.....	.....	.....	.....
jrepdomi89	V.....	.....	.....	.....	.....
pric86	V.....	.....	.....	.....	.....
tait85	V.....	.....	.....	.....	.....
braz87	.....	.....	.....	.....	.....
caledo84	.....	.....	.....	.....	.....
indon77	.....	.....	.....	.....	.....
salv83	.....	.....	.....	.....	.....
salv94	.....	.....	.....	.....	.....
tait79	.....	.....	.....	.....	.....
indon73	.....	.....	.....	D.....	.....
phi64	.....	.....	.....	D.....	.....
phi84	V.....	.....	.....	D.....	.....
tailan84	.....	.....	.....	D.....	.....
mex84	.....	.....	.....	.....	.....
phi56	.....Y	.....	.....	D.....	.....
tailan63	.....	.....	.....	D.....	.....

Figura 13. Continuacion..

El total de cambios de nucleótidos y de aminoácidos del dominio III, se resumen en la **Figura 14**.

### **Análisis Filogenético**

La variabilidad genética y la relación filogenética de los virus Den-4 se determinaron en base a la secuencia de 282 nucleótidos del dominio III de la proteína E. El análisis filogenético se hizo con los programas de cómputo, Wisconsin (Genetics Computer Group) y PAUP. El programa PAUP, se ha utilizado para estudios de variabilidad genética y filogenia en diversos virus (Rico-Hesse, R, 1997). Estos programas determinan el grado máximo de homología de un grupo de secuencias de nt, codón por codón y que determina el porcentaje de cambios sinónimos y no sinónimos tomando en cuenta la posición en la secuencia y el tipo de cambio de un nucleótido, es decir, proporciona información sobre transiciones o transversiones. Con ambos programas se generaron dendogramas similares. En la **Figura 15** se muestra el árbol filogenético generado con el programa PAUP. El análisis mostró que se pueden diferenciar dos grupos filogenéticos de Den-4; en un grupo se ubican los virus del Sureste Asiático (Filipinas 1956, 1964 y 1984; Tailandia 1963 y 1984 e Indonesia 1973) y el otro grupo lo componen el resto de los virus analizados y agrupa virus de Asia, Africa, Centroamerica y Sudamérica.

### **DISCUSION**

La clasificación genotípica de los virus dengue ha sido una herramienta valiosa para determinar su origen y dispersión, así por ejemplo se ha propuesto que

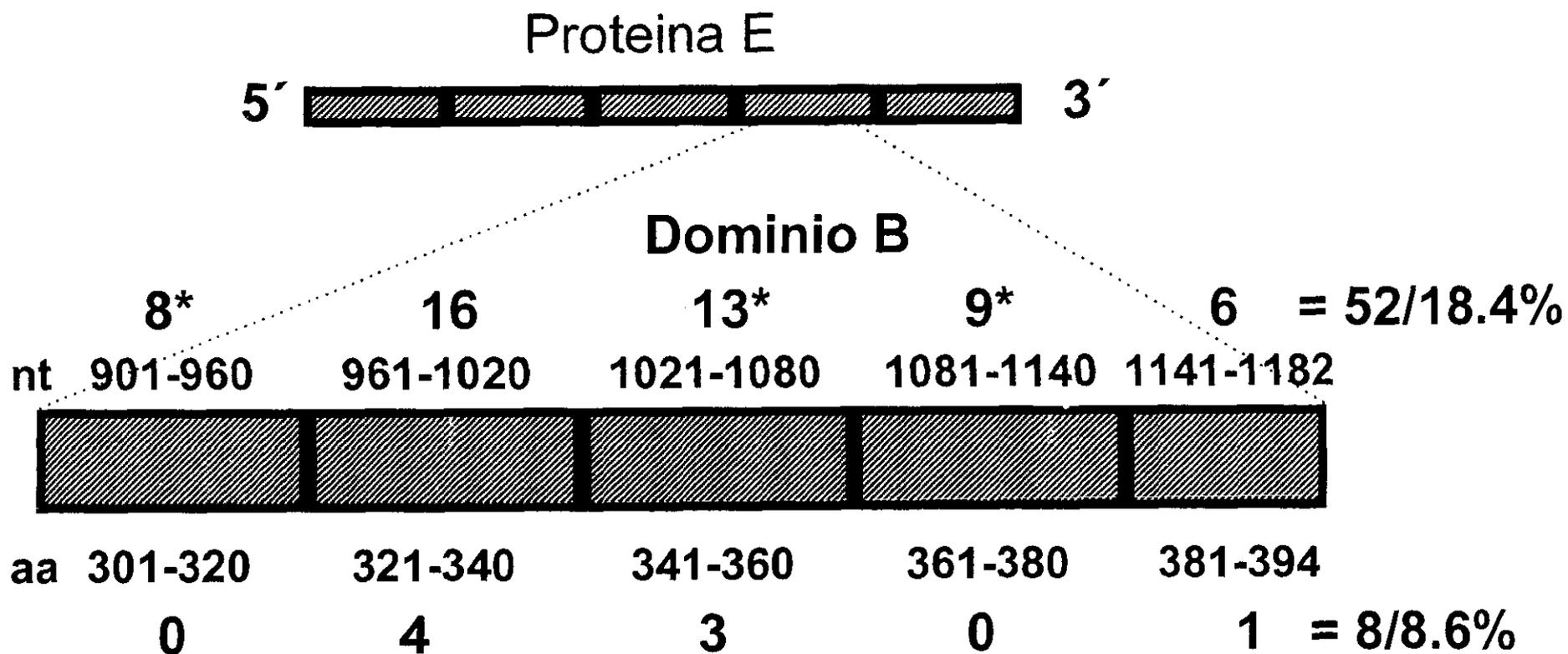
El total de cambios de nucleótidos y de aminoácidos del dominio III, se resumen en la **Figura 14**.

### **Análisis Filogenético**

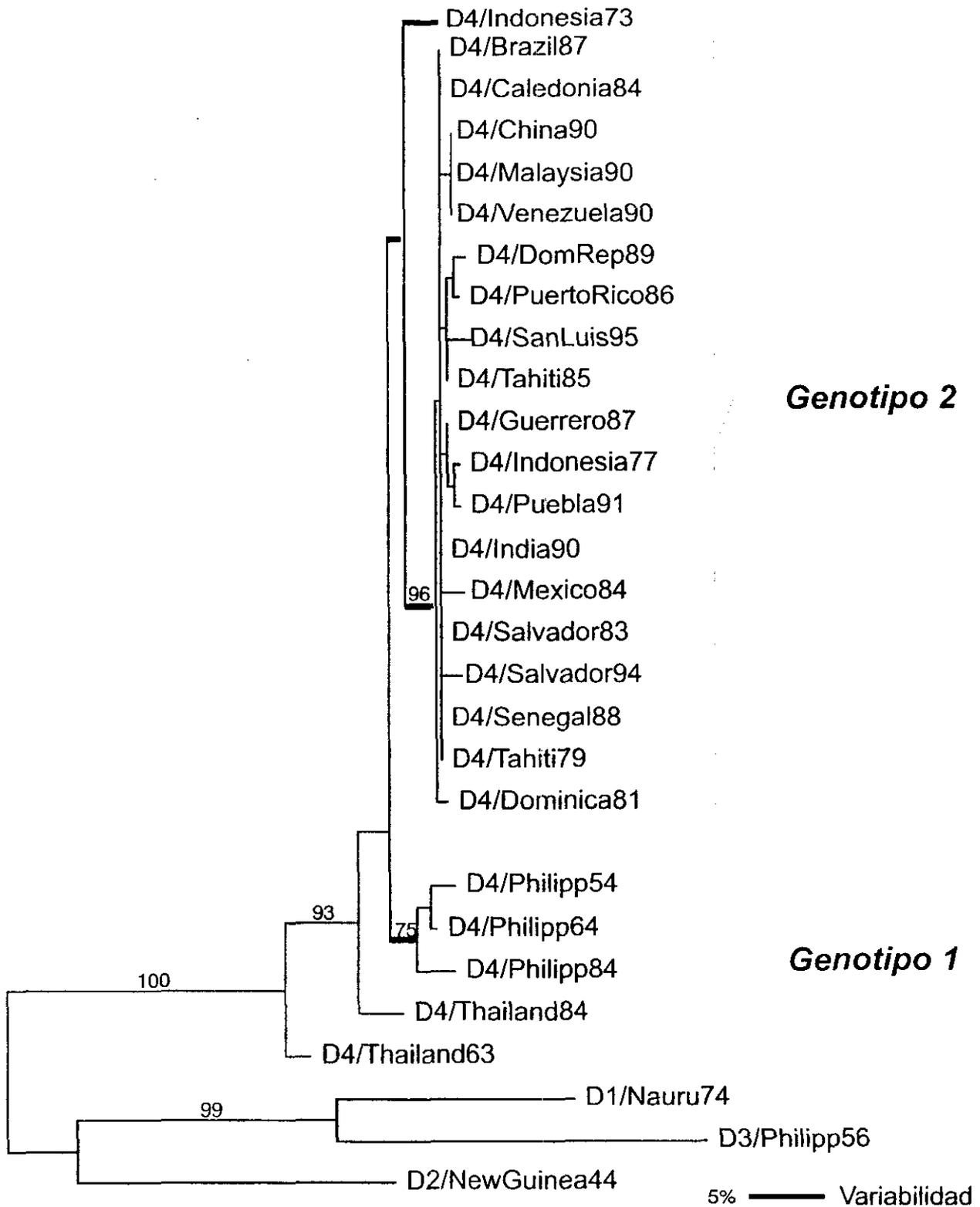
La variabilidad genética y la relación filogenética de los virus Den-4 se determinaron en base a la secuencia de 282 nucleótidos del dominio III de la proteína E. El análisis filogenético se hizo con los programas de cómputo, Wisconsin (Genetics Computer Group) y PAUP. El programa PAUP, se ha utilizado para estudios de variabilidad genética y filogenia en diversos virus (Rico-Hesse, R, 1997). Estos programas determinan el grado máximo de homología de un grupo de secuencias de nt, codón por codón y que determina el porcentaje de cambios sinónimos y no sinónimos tomando en cuenta la posición en la secuencia y el tipo de cambio de un nucleótido, es decir, proporciona información sobre transiciones o transversiones. Con ambos programas se generaron dendrogramas similares. En la **Figura 15** se muestra el árbol filogenético generado con el programa PAUP. El análisis mostró que se pueden diferenciar dos grupos filogenéticos de Den-4; en un grupo se ubican los virus del Sureste Asiático (Filipinas 1956, 1964 y 1984; Tailandia 1963 y 1984 e Indonesia 1973) y el otro grupo lo componen el resto de los virus analizados y agrupa virus de Asia, Africa, Centroamerica y Sudamérica.

### **DISCUSION**

La clasificación genotípica de los virus dengue ha sido una herramienta valiosa para determinar su origen y dispersión, así por ejemplo se ha propuesto que



**Figura 14.** Representación esquemática de la región del dominio III del gen de la proteína E del virus dengue tipo 4. El número de cambios de nucleótidos (nt) y de aminoácidos (aa) es el total de cambios observados en las distintas secuencias de cepas disponibles en la base de datos del GeneBank y las obtenidas en este trabajo. Los asteriscos indican que uno del total de cambios, se encontró en los virus secuenciados en este trabajo.



**Figura 15.** Arbol filogenético generado a partir de las secuencias de nt de diferentes virus dengue tipo 4. El árbol se enraizó incluyendo las secuencias de la misma región de virus dengue de los serotipos 1, 2 y 3. Las ramas horizontales son proporcionales a la barra inferior que representa 5 % de variabilidad.

la introducción en el continente americano de un virus Den-2 del Sudeste Asiático, puede estar asociado con la primera epidemia de FHD que ocurrió en Cuba en 1981 donde se reportaron más de 350,000 casos de fiebre por dengue, de los cuales 10,000 fueron FHD y ocurrieron 159 muertes (Monath TP, 1996, Kouri G, 1986).

El análisis filogenético del virus dengue basado en la secuencia de nucleótidos de genes o regiones del genoma del virus, ha substituido en parte el uso de técnicas como la " huella genética" (fingerprint) y la hibridación RNA-cDNA o cDNA-cDNA. Esta estrategia ha permitido demostrar la existencia de distintos genotipos, por ejemplo, el virus Den-1 ha sido clasificado en 2 genotipos, el Den-2 en 5 y el Den-3 en 4 (Monath TP, 1996). El análisis parcial de la región 5' del gene E (179 nucleótidos) de Den-4 mostró la existencia de un genotipo (Chungue E, 1995), sin embargo, recientemente se reportó la existencia de dos genotipos (Lanciotti RS, 1997). Estos resultados fueron congruentes con las primeras observaciones de variabilidad entre cepas de Den-4 determinadas por ensayos de reducción de placa y por la técnica de "huella genética" (Henchal EA, 1986).

Recientemente el análisis de la secuencia de nucleótidos de la región de unión entre las proteínas E y NS1, sugiere que puede existir una asociación entre la introducción de virus de Den-2 del Sudeste Asiático y el aumento de casos de FHD en las Américas (Rico-Hesse R, 1997). Rico-Hesse y cols. proponen que el genotipo americano de Den-2 ha sido desplazado por el Den-2 del Sudeste Asiático ya que los virus aislados de casos de FHD en distintos países de América se agrupan genéticamente con virus del Sudeste Asiático. Estos datos recientes sugieren que este fenómeno puede estar ocurriendo en México (Rico-Hesse R, 1997). Se ha observado una situación similar para Den-3 ya que la introducción de virus provenientes de Indonesia en la región del Pacífico se ha asociado con epidemias recientes de FHD

(Chungue E, 1993). Los estudios filogenéticos y las observaciones epidemiológicas, sugieren que distintos subtipos genéticos o genotipos pueden contener diferencias en su capacidad virulenta o en su potencial de dispersión (Rico-Hesse R, 1990).

Sin embargo, el análisis filogenético, basado en la secuencia de nucleótidos implica el uso de reactivos costosos, de isótopos radioactivos, tiempo prolongado para la obtención y análisis de resultados, que limita su uso en estudios de epidemiología molecular; por tal motivo se han propuesto otras estrategias que proporcionan información para determinar la variabilidad genética de los virus, en particular del virus dengue ; así, se ha utilizado el análisis de patrones de digestión con enzimas de restricción. Vordam y cols., analizaron la región del genoma que codifica para las proteínas estructurales de los virus Den-2 y Den-3, mediante la amplificación por RT-PCR y digestión con las enzimas de restricción Alu I y Dde I. Los resultados, aún cuando concuerdan con los reportes previos con respecto a la clasificación genética de estos virus (genotipificación)(Trent DW, 1983 ; Rico-Hesse R, 1990), resultan ser complicados ya que se basa en la comparación de los "patrones variables de fragmentos consenso", así por ejemplo, para Den-2 encontraron dos genotipos en las Américas (Jamaica y Puerto Rico) (Trent DW, 1983 ; Rico-Hesse R, 1990); el análisis de Den-2 (genotipo Jamaica) con la enzima Alu I, mostró nueve fragmentos consenso en la mayoría de los virus analizados, (los cuales no se observaban en el genotipo Puerto Rico), sin embargo, algunas muestras contenían bandas únicas que no eran compartidas por ninguno de los dos genotipos ; el análisis se hace más complicado debido a que un alto porcentaje de los fragmentos consenso se comparten con virus de Asia, del Pacífico Occidental y de Tailandia. Es posible que la dificultad en el análisis de los resultados de Vordam y cols., se deba a que se analizó una región grande del genoma del virus (2400 nt). No obstante en otros modelos virales, el uso de enzimas de

restricción, ha probado ser una herramienta valiosa para estudios de epidemiología molecular y de variabilidad genética, como es el caso del virus de la polio (Vonsover A, 1993)

Estudios sobre la variabilidad genética para Den-4 han sido pocos, Chungue E y cols. analizaron una región de 179 nt en la proteína E y encontraron que los virus analizados se agrupaban en un solo grupo genético; sin embargo, Lanciotti y cols., basados en el análisis del gene completo de la proteína E del virus Den-4 mostró dos genotipos: Genotipo 1 donde se agrupan los virus aislados el Sureste Asiático (Filipinas Tailandia y Sri Lanka) y el Genotipo 2 que contiene virus aislados en Indonesia, el Caribe, Centroamérica y Sudamérica (Lanciotti RS, 1997).

En el presente trabajo se analizó la región del dominio III (301-394 aa ; 901-1182 nts) de la proteína E de virus Den-4 (Tabla 1). La región del dominio III se amplificó por RT-PCR, y se digirió con seis diferentes enzimas de restricción (Mae III, Alu I, Sac I, Dde I, Nla III y Cfo I). Mediante el análisis de los fragmentos obtenidos con las enzimas Dde I, Nla III y Cfo I, se diferenciaron 2 genotipos; todos los virus incluidos en este estudio (Tabla 1) corresponden al genotipo 2, según la clasificación de Lanciotti y cols, con excepción del virus prototipo H241 (Filipinas-54) que pertenece al genotipo 1 (**Figuras 9-11**); cuando se analizaron los patrones de restricción con las tres enzimas antes mencionadas de las secuencias de nucleótidos de virus obtenidas de la base de datos del GeneBank, se diferenciaron los dos genotipos, lo cual, como se había observado antes, no sucedió con las restantes tres enzimas (Mae III, Alu I y Sac I).

La digestión del virus de República Dominicana con la enzima Cfo I del dominio III, tuvo un patrón diferente a las demás; adicionalmente la secuencia de nt de la región del dominio III (282 nt) es similar a la reportada para el virus Den-4 de Puerto Rico-86 (GeneBank U18436), la cual pertenece al genotipo 2 según la

clasificación de Lanciotti y cols ; ambas secuencias tienen un cambio en el nucleótido 150 (citocina por timina), similar a las cepas del genotipo 1 (Filipinas-54 y Tailandia-63), que les confiere un sitio Cfo I adicional, además del sitio Cfo I característico de los virus del genotipo 2. Estos datos sugieren que en la región del Caribe pueden existir ambos genotipos.

Un caso similar es el del virus de Indonesia-73 (GeneBank U18428), en el cual existen sitios para la enzima Cfo I que se comparten con virus del genotipo 1, no obstante, el resto de los patrones de digestión es característico del genotipo 2 al cual pertenece (Lanciotti RS, 1997) .

Lanciotti y cols., demostraron en base al análisis de la secuencia completa del gene E, una similitud de más de 92 % entre las cepas de Den-4, con un porcentaje máximo de divergencia de 8 %. En el presente trabajo se encontró un máximo de divergencia de 9.3% en la región del dominio III (282 nucleótidos) (Tabla 3), lo cual indica que esta región puede ser un marcador genético de la variabilidad genética del virus dengue tipo 4. Para corroborar estos datos se analizó el gene E mediante el alineamiento de nucleótidos y de aminoácidos de las secuencias disponibles en la base de datos GeneBank. Para lo cual se dividió el gene E en regiones de 100 aa/300 nt para analizar el número de cambios entre los virus Den-4 y su comparación con los otros serotipos. Los resultados mostraron que el mayor grado de divergencia en la secuencia de nucleótidos es de 15.4 % y de 6.2 % en la secuencia de aminoácidos (**Figura 16**). La región comprendida entre los nucleótidos 301-600, presentó el mayor número de cambios (55 cambios), mientras que en el dominio III (nucleótidos 901-1200) se encontraron 49 cambios, adicionalmente el análisis de los virus incluidas en este estudio mostraron tres cambios adicionales ; por otro lado, el mayor número de cambios en aminoácidos, ocurre en la región del dominio III (aa 301-400) (**Figura 12**).

	1-300	301-600	601-900	901-1200	1201-1485	
<b>nt</b>	33(2.2)	55(3.7)	47(3.2)	49(3.3)	45 (3)	
5'						3'
<b>aa</b>	1-100	101-200	201-300	301-400	401-495	
	2(0.4)	7(1.4)	7(1.4)	8(1.6)	7(1.4)	
<b>Den-2</b>						Pro E = 6.2% Dom III = 8.6 %
<b>Den-1</b>	11(2.2)	14(2.8)	10(2)	18(3.6)	14(2.8)	= 13.4 % =19.1 %
<b>Den-3</b>	5(1.0)	7(1.4)	11(2.2)	11(2.2)	8(1.6)	= 8.4 % =11.7 %
	3(0.6)	6(1.2)	5(1.0)	8(1.6)	4(0.8)	= 5.2 % = 8.6 %

**Figura 16.** Representación esquemática de la proteína E de dengue tipo 4 y de otros 3 serotipos. El número de cambios de aa y de nt es el total de cambios observados en las distintas secuencias disponibles en la base de datos del GeneBank y las obtenidas en este trabajo y que corresponden a diferentes virus. El porcentaje de divergencia del gene completo se compara con el porcentaje de divergencia del dominio III.

Cuando se determinó el grado de divergencia entre el dominio III y el gene E se observó que el dominio III tiene el mayor grado de divergencia tanto en nucleótidos como en aminoácidos (18.4/15.4 % en nt y 8.6/6.2 % en aa). Del mismo modo se obtuvieron resultados similares cuando se analizó la secuencia de aminoácidos de los serotipos 1, 2 y 3 (**Figura 16**).

Dentro de la región del dominio III, 56 % del total de cambios se encuentran entre los nucleótidos 961-1080 (29 de 52 cambios), mientras en esta misma región (aa 321 al 360) se presentan 7 de los 8 cambios de aa encontrados (86 % del total) (**Figuras 13 y 14**).

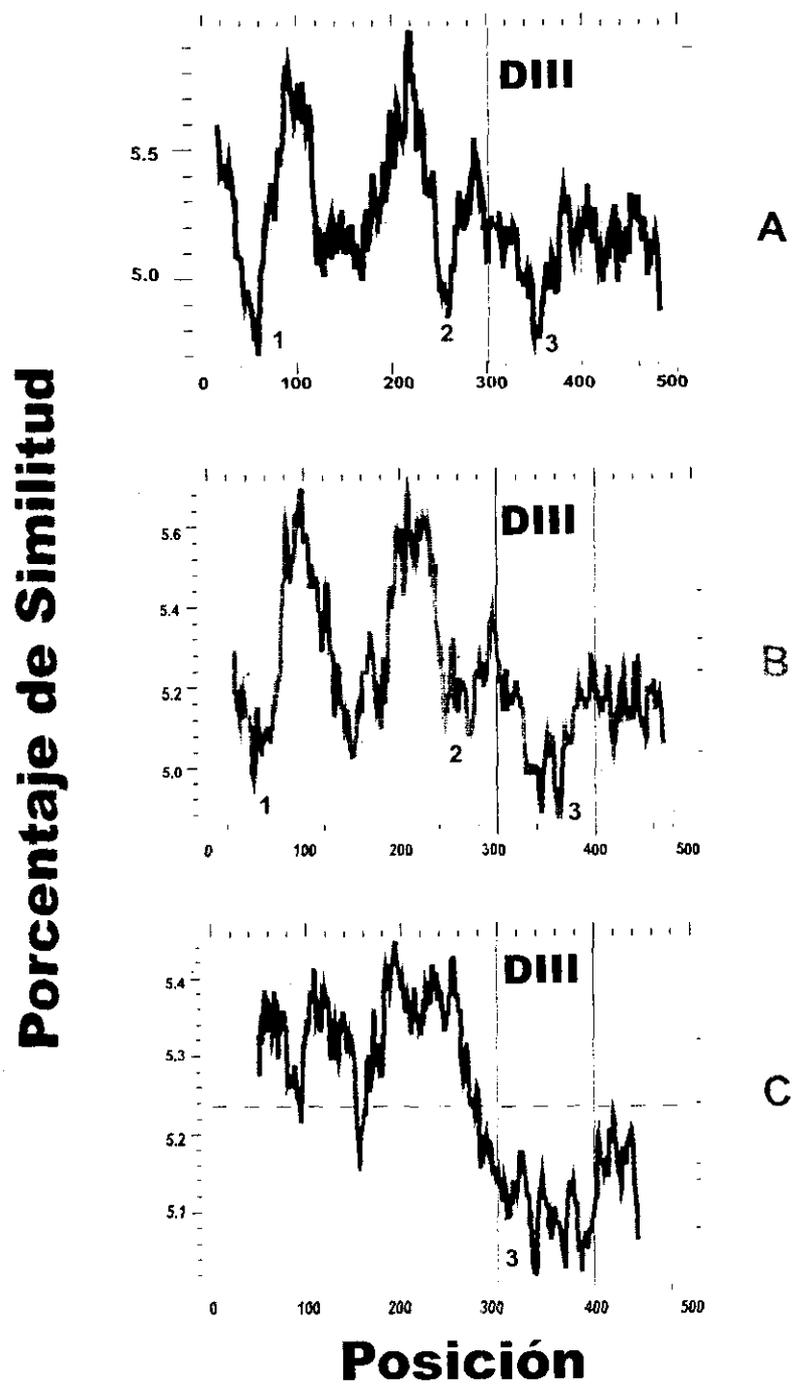
Cuando se analizó la variabilidad en la secuencia de nt entre cepas de Den-4 mediante alineamientos múltiples, usando como cepa de comparación cualquier virus (Tailandia-63, el virus prototipo H241 o la cepa México84), el menor grado de homología (mayor variabilidad) se observó en el dominio III comparado con el gene completo (**Tabla 3**).

La similitud del gene de la proteína E entre diversos virus Den-4, también se analizó entre cada aminoácido, mediante el ensayo de "ventana de comparación" (paquete Wisconsin, Genetics Computer Group). Se incluyeron las secuencias completas del gene E en la base de datos del GeneBank utilizando tres tamaños de ventana (30, 50 y 100 aa)(**Figura 17**). Cuando se utilizó la ventana de 30 aa se aprecian tres picos principales que representan las 3 regiones de menor similitud (**Figura 17 A**). Los picos 1, 2 y 3 se encuentran alrededor de los aminoácidos 60, 260 y 345, respectivamente, que este último está incluido en la región del dominio III. En el análisis con la ventana de 50 aa se observó que los picos 1 y 2 disminuyen no así el pico 3 (**Figura 17 B**). Finalmente el análisis de la ventana de 100 aa reveló que los

picos 1 y 2 disminuyen considerablemente mientras que el pico 3 se amplía, abarcando gran parte del dominio III (**Figura 17 C**). Este análisis permite ver que existen diversas regiones con distintos grados de variabilidad a lo largo de la proteína E, sin embargo, cuando el tamaño de la ventana se amplía, solo permanecen aquellas regiones relevantes en tamaño y en variabilidad, como es el caso del dominio III, lo que significa que se trata de una región que puede servir como un marcador genético en estudios de variabilidad genética y de epidemiología molecular. Finalmente, cabe mencionar que en el análisis de las secuencias de nt, sólo se incluyeron tres virus de México, ya que los patrones de restricción para todos los virus analizados de México resultaron idénticos.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de las secuencias de los virus incluidos en este estudio, más el de las secuencias de Den-4 disponibles, son congruentes con los resultados observados con los patrones de restricción. Con las enzimas de restricción : Dde I, Nla III y Cfo I, es posible distinguir entre virus de los dos genotipos reportados, de la misma forma que si se analizaran las secuencias de nt ( de la región del dominio III o del gene E completo), lo cual implica que el uso de al menos una de estas enzimas podría ser una estrategia metodológica mas accesible en estudios de epidemiología molecular del virus Den-4.

En México la transmisión del virus Den-4 se ha asociado con casos de FHD y aún cuando no se ha comprobado alguna asociación con un cierto genotipo, el monitoreo de la distribución y dispersión de los genotipos 1 y 2 permitiría mantener una estrecha vigilancia epidemiológica con el fin de identificar nuevos brotes asociados con Den-4 y determinar la influencia del genotipo viral en la aparición de brotes o epidemias de FHD. Dicho monitoreo, se puede llevar a cabo mediante el análisis con enzimas



**Figura 17.** Determinación de la variabilidad de aa en la proteína E del virus dengue 4 mediante un análisis de ventana. Se utilizaron las secuencias del gene E disponibles en la base de datos del GeneBank, los números de acceso se muestran en la sección de Materiales y Métodos. El tamaño de las ventanas fue de 30 aa (panel A), 50 aa (panel B) y 100 aa (panel C).

restricción en forma rápida y sencilla, sin embargo, es necesario analizar un mayor número de virus para confirmar el posible uso de estas enzimas.

## CONCLUSIONES

el análisis del dominio III de las enzimas de restricción Mae a los genotipos 1 y 2 de Den-4 sientemente sensible para ser ótidos. El análisis del dominio nite distinguir un mayor grado

ricción permite clasificar a los rto, sin necesidad de emplear umente en la secuenciación de la metodología puede hacerse, computacional. El uso de las virus provenientes de diversas resultados generados de este proteína E del virus dengue 4 y ar un marcador de variabilidad

## REFERENCIAS

1. Beaty BJ, et al, 1988. Virus variation and evolution mechanisms and epidemiological significance. In : Monath TP ed. The arboviruses : epidemiology and ecology. Vol 1. Boca Raton, FL : CRC Press pp 59-85.
2. Blok J; et al. 1989. Variation of the nucleotide and encoded amino acid sequences of the envelope gene from eight dengue 2 viruses. Arch Virol 105:39-53.
3. Bray M, et al. 1991<sup>A</sup>. Construction of intertypic chimeric dengue viruses by substitution of structural protein genes. Proc Natl Acad Sci USA 88 :10342-10346.
4. Bray M, et al. 1991<sup>B</sup>. Dengue virus pre-membrane and membrane proteins elicit a protective immune response. Virology 185 :505-508.
5. Bukowski JF, et al. 1989. Dengue virus-specific cross-reactive CD8+ human cytotoxic T lymphocytes. J Inf Dis 63 :5086-5091.
6. Burke DS, et al, 1988. A prospective study of dengue infection in Bangkok. Am J Trop Med Hyg 38 :172-180.
7. Chambers TJ, et al, 1991. Processing of the Yellow Fever virus nonstructural polyprotein : A catalytically active NS3 proteinase domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites. J Virol 65 :6042-6050.
8. Chambers TJ, et al. 1990. Flavivirus genome organization, expression and evolution. Ann Rev Microbiol 44:649-688.
9. Chambers TJ, et al, 1989. Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B and NS4B : identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. Virology 169 :100-109.
10. Chow YH, et al. 1997. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. J Virol 71 :169-178.
11. Chu MC; et al. 1989. Genetic relatedness among structural protein genes of dengue 1 virus strains. J Gen Virol 70:1701-1712.

12. Chungue E, et al. 1993. Molecular epidemiology of dengue 3 viruses and genetic relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue fever in French Polynesia. *J Gen Virol* 74 :2765-2770.
13. Chungue E, et al. 1995. Molecular epidemiology of dengue-1 and dengue-4 viruses *J Gen Virol* 76 :1877-1884.
14. Delenda C, et al. 1995. Analysis of C-terminally truncated dengue 2 and dengue 3 virus envelope glycoproteins in insect cells and immunologic properties in mice. *En Virology*, Bernard Fields, (Editor). 3a. Ed 1996. Lippincott-Raven, USA. pp 1003.
15. Eckels KH, et al. 1994. Immunization of monkeys with baculovirus-dengue type 4 recombinants containing envelope and nonstructural proteins : evidence of priming and partial protection. *Am J Trop Med Hyg* 50 :472-478.
16. Feighny R, et al, 1994. Dengue type 2 virus envelope protein made using recombinant baculovirus protects mice against virus challenge. *Am J Trop Med Hyg* 50 :322-328.
17. Fonseca BAL, et al. 1994. Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 12 :279-285.
18. Francki RI; et al. 1991. Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol Suppl* 2:223-233.
19. Galler R. 1993. Molecular approach to the development of flavivirus vaccines. *J of the Brazilian Assoc Adv Science* 45:263-268.
20. Gollins SW, et al. 1984. Flavivirus infection enhancement in macrophages : radioactive and biological studies on the effect of antibodies on viral fate. *J Gen Virol* 65 :1261-1272.
21. Gómez-Dantés H, et al. 1997. El panorama del dengue en México ; *En Diez Problemas Relevantes de Salud Pública*. 1a. Ed. Secretaría de Salud/Instituto Nacional de Salud Pública. pp. 7-18.
22. Gritsun TS; et al. 1995. Analysis of flavivirus envelope proteins reveals variable domains that reflect their antigenicity and may determine their pathogenesis. *Virus Research* 35:307-321.
23. Gubler DJ, et al, 1994. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infect Agents Dis* 2 :383-393.

24. Gubler DJ. 1988. Dengue. En : Monath TP(ed). The arboviruses : ecology and epidemiology. Vol II. Boca Raton, FL CRC Press ; 223-260.
25. Halstead SB, et al. 1977. Dengue virus and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. J Exp Med 146 :201-217.
26. Halstead SB. 1970. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypothesis and discussion. Yale J Biol Med 42:350-362.
27. Halstead SB. 1984. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XI. Dengue Rev Infect Dis 6:251-264.
28. Halstead SB. 1988. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 239:476-481.
29. He RT, et al. 1995. Antibodies that block virus attachment to Vero cells are major component of the human neutralizing antibody response against dengue virus type 2. J Med Virol 45 :451-461.
30. Heinz FX. 1986. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. Virus Res 31:103-186.
31. Heinz FX; et al. 1981. Antigenic and immunological properties of defined physical forms of tick-borne encephalitis virus structural proteins. Infect Immunol 33:250-257.
32. Henchal EA; et al. 1986. Identification of an antigenic and genetic variant of dengue-4 virus from the Caribbean. Am J Trop Med Hyg 35:393-400.
33. Johnson KM, et al, 1967. Hemorrhagic fever of Southeast Asia and South America : a comparative appraisal. Prog Med Virol 9 :105-158.
34. Kaplan JE; et al. 1983. Epidemiologic investigations of dengue infection in México, 1980. Am J Epidemiol 1127:335-343.
35. Karabatsos N. International catalog of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. San Antonio, Texas. Am Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1985 ;1147.
36. Kerschner JH; et al. 1986. Genetic and epidemiological studies of dengue type 2 viruses by hybridization using synthetic deoxyoligonucleotides as probes. J Gen Virol 67:2645-2661.
37. Kochel T, et al. 1997. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. Vaccine15 :547-552.

38. Konishi E, et al. 1992<sup>A</sup>. Mice immunized with a subviral particle containing the Japanese encephalitis virus prM/M and E proteins are protected from lethal JEV infection. *Virology* 188 :714-720.
39. Konishi E, et al. 1992<sup>B</sup>. A highly attenuated host range-restricted vaccinia virus strain, NYVAC, encoding the prM/M, E, and NS1 genes of Japanese encephalitis virus prevents JEV viremia in swine. *Virology* 190 :454-458.
40. Kouri G et al. 1986. Hemorrhagic dengue in Cuba : History of an epidemic. *Bull Pan Am Health Org* 20 :24-30.
41. Kurane I, et al, 1989. Human T cell responses to dengue virus antigens. *J Clin Invest* 83 : 506-513.
42. Kurane I, et al. 1991. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J Clin Invest* 88 :1473-1480.
43. Kurane I, et al. 1994. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch Virol* 9 :59-64.
44. Lai C-J, et al. 1991. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 :5139-5143.
45. Lanciotti RS, et al. 1997. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol* 78 :2279-2286.
46. Lewis JA, et al , 1993. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology* 197 :216-224.
47. Mason PW, et al. 1991. Japanese encephalitis virus-vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection. *Virology* 180 :294-305.
48. MMWR, 1995. Imported dengue : United States, 1993-1994. *Morb Mortal Wkly Report* 44 : 353-356.
49. Monath TP, et al, 1996. Flaviviruses, En : *Virology*, Bernard Fields (Ed). 3a. Ed. Lippincott-Raven, USA. pp 1002.
50. Monath TP. 1994. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci* ; 91 :2395-2400.

51. Monath TP; et al. 1983. Ontogeny of yellow fever 17D vaccine: RNA oligonucleotide fingerprint and monoclonal antibody analyses of vaccine produced world-wide. *J Gen Virol* 4:627-637.
52. Morse SS. 1993. *Emerging viruses*. New York : Oxford University Press.
53. Murphy FA. 1993. New emerging, and reemerging infectious diseases. *Adv Virus Res* 43 : 1-52.
54. Pan Am Health Org, 1994. *Dengue and dengue hemorrhagic fever : guidelines for prevention and control*. Washington DC pp 12-13.
55. Pethel M, et al, 1992. Mutational analysis of the octapeptide sequence motif at the NS1-NS2A cleavage junction of dengue type 4 virus. *J Virol* 66 :7225-7231.
56. Phillpotts RJ, et al. 1996. Immunization with DNA polynucleotides protects mice against lethal challenge with St. Louis encephalitis virus. *Arch Virol* 141 :743-749.
57. Pletnev AG, et al. 1993. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses : Effects of mutations on neurovirulence in mice. *J Virol* 67 :4956-4963.
58. Putnak R, et al, 1991. Dengue 1 envelope glycoprotein gene expressed in recombinant baculovirus elicits virus neutralization antibody in mice and protects them from virus challenge. *Am J Trop Med Hyg* 45 :159-167.
59. Rey FA, et al. 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375 :291-298.
60. Rico-Hesse R, et al. 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 174:001-0015.
61. Rico-Hesse R, et al. 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230 :244-251.
62. Rosen L. 1989. Disease exacerbation caused by sequential dengue infections : myth or reality. *Rev Infect Dis* 11 : S840-S842.
63. Sangkawhibha N, et al, 1984. Risk factors in dengue shock syndrome : A prospective study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 120 :653-669.
64. Shapiro D; et al. 1972. Change involving a viral membrane glycoprotein during morphogenesis of group B arboviruses. *Virology* 50:906-911.
65. Stollar V. 1969. *Studies on the nature of dengue viruses*. IV. The structural proteins of type 2 dengue virus. *Virology* 39:426-438.

66. Stollar V; et al. 1966. Studies on the nature of dengue viruses.II. Characterization of viral RNA and effects of inhibitors of RNA synthesis. *Virology* 30:303-312.
67. Sweet BH; et al. 1954. Properties and antigenic relationships of hemagglutinins associated with dengue virus. *J Immunol* 73:363-373.
68. Trent DW; et al. 1983. Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology* 128:271-284.
69. Triwatanapong T, et al. 1992. Mapping of a region of dengue virus type 2 glycoprotein required for binding by a neutralizing monoclonal antibody. *Gene* 116 :139-150.
70. Tsai CJ, et al, 1991. Upper gastrointestinal bleeding in dengue fever. *Am J Gastroenterol* 86 :33-35.
71. Vezza AC; et al. 1980. Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 29:643-652.
72. Vonsover A ; et al.1993. Molecular epidemiology of type 1 Polioviruses isolated in Israel and defined by restriction fragment length polymorphism assay. *J Infect Dis* 167 :199-203.
73. Vordam V; et al. 1994. A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes. *J Virol Method* 48:237-244.
74. Whalen RG. 1996. DNA vaccines for emerging infectious diseases : What if ?. *Emerg Infect Dis* 2 : 168-182.
75. Winkler G, et al. 1987. Characterization of a disulfide bridge-stabilized antigen domain of tick-borne encephalitis virus structural glycoprotein. *J Gen virol* 68 :2239-2244.
76. Zhao B; et al. 1986. Cloning full-length dengue type 4 viral DNA sequences: Analysis of genes coding for structural proteins. *Virology* 155:77-88.