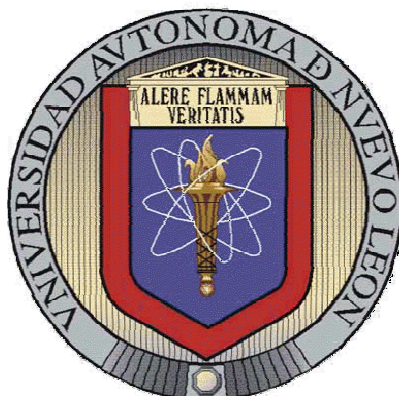


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE
DEL GEN M DEL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 2

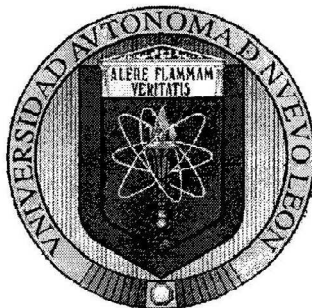
POR

JOSÉ JUAN PÉREZ TRUJILLO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

AGOSTO, 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE
DEL GEN M DEL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 2

TESIS


QUE EN OPCIÓN AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA

PRESENTA:

Q.F.B. JOSÉ JUAN PÉREZ TRUJILLO

COMISIÓN DE TESIS

PRESIDENTE:


DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA

SECRETARIO:


M.C. JOSÉ LUIS MENDEZ VÁZQUEZ

VOCAL:


DR. JUAN MANUEL ALCOCER GONZÁLEZ

SUPLENTE:


M.C. MÁXIMO EUGENIO ROMÁN CALDERÓN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

DEDICATORIA

A mis padres José Juan Pérez y Rosa Laura Trujillo

A mis hermanos Jesús Jaime y Jessica Janeth, junto a los sobrinos Aryto y _____

A mis abuelas Melva García y Paula Padilla †

...y a toda la Familia.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por brindarme fuerzas para perseverar y cumplir mis metas.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y al Dr. Reyes Tamez Guerra por permitir el desarrollo de este trabajo en las instalaciones del Laboratorio de Inmunología y Virología.

Al M.C. José Luis Méndez, por haberme apoyado con enseñanzas y conocimientos durante mi estadía en el LIV, así como el alentar a continuar el crecimiento intelectual.

Al Dr. Juan Manuel Alcocer y Dr. Pablo Zapata, por haberme apoyado con equipo y revisión del desarrollo experimental de este trabajo.

Al Dr. Alberto Valadez y M.C. Eugenio Román, por haberme apoyado con asesoramiento científico, consejos y guía durante el desarrollo experimental.

Al comité académico por la revisión y guía para el escrito de esta tesis.

Al Dr. Stephen Whitehead del NIH, por haberme apoyado con la donación de material para el desarrollo del trabajo.

Al personal del Laboratorio de Inmunología y Virología por el apoyo logístico y tenerme paciencia con mis esterilizaciones de material de último minuto.

A los compañeros y amigos del LIV por su amistad, en especial a Martha, Beto, Paola, Katty Kat, Rulo, Anie, Alee, Cindy, Víctor, Yvett, Sharon, Edgar M², Chago, Luisillo, Luigi, Cachito, Faby, Ismael, Karlita, y Magda; así como a Lulú, Mayra, Gabyta, Sara, Diana, Nairda, Mike, Checo, Jess, Janus y Luis Ángel.

ÍNDICE

| Sección | Página |
|--|--------|
| DEDICATORIA | i |
| AGRADECIMIENTOS | ii |
| LISTA DE FIGURAS | v |
| LISTA DE TABLAS | vi |
| LISTA DE ABREVIATURAS | vii |
| RESUMEN | x |
| ABSTRACT | xi |
| Capítulo 1.- INTRODUCCIÓN | 1 |
| Capítulo 2.- ANTECEDENTES | 2 |
| 2.1 Agente etiológico. | 2 |
| 2.1.1 Organización genómica. | 3 |
| 2.1.2 Ciclo viral. | 3 |
| 2.1.3 Transmisión del virus del Dengue. | 5 |
| 2.2 Epidemiología. | 6 |
| 2.2.1 Epidemiología en México. | 8 |
| 2.3 Cuadro clínico de la enfermedad. | 9 |
| 2.4 Métodos de detección de infección por virus del Dengue. | 11 |
| 2.5 Desarrollo de inmunidad contra el virus del Dengue. | 12 |
| 2.6 Aspectos generales de la tecnología recombinante. | 14 |
| 2.6.1 Expresión de proteínas heterólogas en <i>Escherichia coli</i> . | 15 |
| Capítulo 3.- HIPÓTESIS | 17 |
| Capítulo 4.- OBJETIVOS | 18 |
| Capítulo 5.- MÉTODOS | 20 |
| 5.1 Diseño de oligonucleótidos para el gen M del virus de Dengue serotipo 2. | 20 |
| 5.2 Obtención del gen M del virus de Dengue serotipo 2. | 20 |
| 5.3 Amplificación del gen M a partir del plásmido p2DEN2 por PCR. | 20 |
| 5.4 Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa. | 21 |
| 5.5 Cuantificación de ADN y proteínas por espectrofotometría UV. | 21 |
| 5.6 Clonación del gen M en pGEMT Easy Vector. | 21 |

| | |
|--|----|
| 5.7 Preparación de bacterias <i>Escherichia coli</i> calcio competentes. | 22 |
| 5.8 Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH5α con pGEMT-DEN2M. | 22 |
| 5.9 Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> por Miniprep. | 23 |
| 5.10 Análisis de los plásmidos pGEMT-DEN2M por PCR y digestión con enzimas de restricción. | 23 |
| 5.11 Amplificación del gen M en pGEMT-DEN2M por PCR con oligonucleótidos M13. | 23 |
| 5.12 Digestión de producto de PCR de DEN2M-M13 y plásmido pET22b(+). | 24 |
| 5.13 Purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa. | 24 |
| 5.14 Subclonación del gen M en el plásmido de expresión pET22b(+). | 24 |
| 5.15 Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH5α con pET22b-DEN2M. | 24 |
| 5.16 Análisis y caracterización del plásmido pET22b-DEN2M. | 25 |
| 5.17 Transformación de <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 con pET22b-DEN2M. | 25 |
| 5.18 Inducción de la expresión de la proteína M en <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3. | 26 |
| 5.19 Extracción de proteínas totales de <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3. | 26 |
| 5.20 Análisis de proteínas totales de <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 en SDS-PAGE. | 26 |
| 5.21 Detección de la proteína M recombinante por Western Blot. | 26 |
| Capítulo 6.- RESULTADOS | 28 |
| 6.1 Diseño de los oligonucleótidos. | 28 |
| 6.2 Obtención del gen M del virus de Dengue serotipo 2. | 29 |
| 6.3 Construcción del plásmido pGEMT-DEN2M. | 29 |
| 6.4 Construcción del plásmido pET22b-DEN2M. | 31 |
| 6.5 Detección de la proteína M recombinante por SDS-PAGE y Western Blot. | 34 |
| Capítulo 7.- DISCUSIÓN | 37 |
| Capítulo 8.- CONCLUSIONES | 40 |
| Capítulo 9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 41 |
| Capítulo 10.- ANEXOS | 53 |
| RESUMEN BIOGRÁFICO | 59 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|---------------|
| Figura 1.- Estructura del virus del Dengue. | 3 |
| Figura 2.- Organización del genoma del Virus del Dengue. | 3 |
| Figura 3.- Ciclo del virus del Dengue. | 4 |
| Figura 4.- Ciclo de transmisión del virus del Dengue. | 5 |
| Figura 5.- Distribución de <i>Aedes aegypti</i> en América en los años 1970 y 1995. | 7 |
| Figura 6.- Distribución de países o áreas en riesgo de transmisión del Dengue. | 8 |
| Figura 7.- Mapa de vector de clonación de productos de PCR: pGEMT Easy Vector | 22 |
| Figura 8.- Mapa de vector de expresión en procariotas pET22b(+) | 25 |
| Figura 9.- Secuencia del gen M del virus del Dengue serotipo 2 | 28 |
| Figura 10.- Electroforesis del plásmido p2DEN2 en gel de agarosa al 0.8%. | 29 |
| Figura 11.- Electroforesis del PCR del DEN2M en gel de agarosa al 1%. | 30 |
| Figura 12.- Análisis de clonas recombinantes pGEMT-DEN2M por PCR y digestión con enzimas de restricción. | 31 |
| Figura 13.- Obtención del gen DEN2M y del plásmido pET22b(+) digeridos con BamHI/XhoI. | 32 |
| Figura 14.- Electroforesis en gel de agarosa 1% de fragmentos purificados del gen DEN2M y del plásmido pET22b(+). | 32 |
| Figura 15.- Caracterización de plásmido pET22b-DEN2M con enzimas de restricción. | 33 |
| Figura 16.- Análisis del alineamiento de la secuencia del gen M recombinante. | 34 |
| Figura 17.- Electroforesis de proteínas totales de <i>Escherichia coli</i> BL21DE3 pET22b-DEN2M en gel de poliacrilamida al 15%. | 35 |
| Figura 18.- Western Blot para detección de la proteína M recombinante por reconocimiento del His-tag. | 36 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1.- Cierres anuales de casos confirmados de infección por virus del Dengue en México 2004-2009. | 9 |
| Tabla 2.- Mezcla de reacción para PCR convencional. | 20 |
| Tabla 3.- Programa de temperaturas y tiempos para PCR convencional. | 21 |
| Tabla 4.- Secuencia de oligonucleótidos específicos para DEN2M. | 29 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| Abreviatura | Significado |
|-------------------|--|
| Aa | Aminoácidos |
| ADA | Amplificación dependiente de anticuerpos |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| BamHI | Enzima de restricción obtenida de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> |
| BLAST | Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| CaCl ₂ | Cloruro de calcio |
| CD | Cluster de diferenciación |
| CDC | Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades |
| CENAVECE | Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades |
| col. | Colaboradores |
| DAB | Diaminobencidina |
| DC-SIGN | Molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas |
| DEN | Virus del Dengue |
| DEN2M | Gen M del virus del Dengue serotipo 2 |
| dNTP | Desoxirribonucleótido trifosfato |
| D.O. | Densidad óptica |
| E. coli | <i>Escherichia coli</i> |
| EcoRI | Enzima de restricción obtenida de <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| ELISA | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas |
| Et al. | Y otros |
| Fc | Fracción cristalizante |
| FD | Fiebre por dengue |
| FHD | Fiebre hemorrágica por dengue |
| Fig. | Figura |
| h/hrs | Hora/horas |

| | |
|-------------------------------|--|
| H ₂ O dd | Agua destilada desionizada |
| H ₂ O MQ | Agua milli q |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| HRP | Peroxidasa obtenida de rábano |
| IBT | Instituto de Biotecnología |
| IFN | Interferón |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IgM | Inmunoglobulina M |
| IL | Interleucina |
| IPTG | Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido |
| JE | Virus de la Encefalitis Japonesa |
| kb | Kilobases |
| kDa | Kilodaltons |
| L | Litro |
| LB | Caldo lisogénico |
| M | Molar |
| m/mts | Metro/metros |
| mA | Miliamperes |
| MgCl ₂ | Cloruro de magnesio |
| MIF | Factor de inhibición de migración de macrófagos |
| min | Minutos |
| mL | Mililitros |
| mM | Milimolar |
| NCBI | Centro Nacional para la Información Biotecnológica |
| ng | Nanogramos |
| NIH | Instituto Nacional de Salud |
| nm | Nanómetros |
| NS | No estructural |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| ORF | Marco de lectura abierto |
| PAHO | Organización Panamericana de la Salud |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Buffer fosfato salino |

| | |
|----------------|--|
| PBST | Buffer fosfato salino con tween |
| pmol | Picomoles |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PVDF | Polivinilidenofluoruro |
| qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real |
| RNS | Especies reactivas de nitrógeno |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa |
| SCH | Síndrome de choque hipovolémico |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio |
| seg | Segundos |
| TBE | Virus de la Encefalitis transmitida por garrapatas |
| TEMED | N,N,N,N-tetrametil-etilendiamina |
| T _m | Temperatura de fusión |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| U | Unidad de concentración biológica |
| UNAM | Universidad Nacional Autónoma de México |
| UTR | Región no traducible |
| UV | Luz ultravioleta |
| V | Voltios |
| VBCR | Centro de Recursos Bioinformáticos de Virus |
| x | Unidad de concentración química |
| XbaI | Enzima de restricción obtenida de <i>Xanthomonas badrii</i> |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido |
| XhoI | Enzima de restricción obtenida de <i>Xanthomonas holcicola</i> |
| YF | Virus de la Fiebre Amarilla |
| ~ | Aproximado |
| % | Porcentaje |
| ° C | Grados centígrados |
| μ L | Microlitros |
| μ g | Microgramos |

RESUMEN

En los últimos años se ha observado un incremento en el número de casos de infecciones por alguno de los 4 serotipos del virus del Dengue, provocando cuadros clínicos que van desde fiebre autolimitada hasta fiebre con hemorragias, y en los casos más graves se presentan choques hipovolémicos. Esto ocurre en distintas partes del mundo, principalmente aquellas regiones de las zonas tropicales y subtropicales donde se desarrolla el principal vector del virus: el mosquito *Aedes*. En México se presentan un gran número de infecciones, donde el serotipo 2 tiene una alta prevalencia y ha sido asociado con los cuadros clínicos más graves. Una de las estrategias para combatir este problema es el obtener péptidos virales, que tras ser evaluados en su capacidad de promover una respuesta inmune protectora, puedan ser utilizados para crear defensas en el organismo contra el virus. Por lo tanto, en este trabajo se planteó realizar la producción recombinante de la proteína estructural M del virus del Dengue. **Objetivo.** Clonar y expresar la proteína recombinante del gen M del virus del Dengue serotipo 2 en *Escherichia coli*. **Métodos.** Se utilizaron programas de bioinformática para el diseño de oligonucleótidos, así como herramientas de ingeniería genética para la clonación del gen, la expresión de la proteína recombinante en el sistema procariote, y su detección por Western Blot. **Resultados.** El producto amplificado del gen M fue clonado en pGEMT Easy Vector, subclonado en el vector de expresión pET22b(+) y posteriormente fue secuenciado. Se realizó la inducción de la expresión de la proteína recombinante en *Escherichia coli* BL21 DE3, y se detectó su presencia mediante análisis en SDS-PAGE y Western Blot. **Conclusión.** La cepa *Escherichia coli* BL21 DE3 fue capaz de expresar la proteína recombinante del gen M del virus del Dengue serotipo 2 bajo el promotor de T7lac.

ABSTRACT

In recent years it has been observed an increasing in the number of infections by some of the four serotypes of the Dengue virus, causing clinical syndromes ranging from an undifferentiated fever to a fever with hemorrhages, and in the most severe cases hypovolemic shock may appears. Millions of cases of Dengue infection occur worldwide each year, most often in urban areas of tropical and subtropical regions because they harbor the particular types of mosquitoes that transmit it (*Aedes mosquito*). In Mexico the number of infections has raised, serotype 2 has the highest prevalence and it has been associated to the most severe clinical syndromes. One of the strategies to fight this problem is to isolate viral peptides, which after being evaluated by their capacity to promote an immune response, these can be used to induce defenses in the organism against the virus. Therefore, in this study we are focus to produce the recombinant structural protein M of the Dengue virus. **Aims:** Cloning and expression of the recombinant structural protein M of the Dengue virus serotype 2 in *Escherichia coli*. **Methods:** Bioinformatics programs were used to design oligonucleotides, as well as genetic engineering tools to cloning the M gene, expression of the recombinant protein in the prokaryotic system, and its detection by Western Blot assays. **Results:** The amplified product of the M gene was cloned in the pGEMT Easy Vector, subcloned in the pET22b (+) expression vector and thereafter, it was sequenced. The induction of the expression of the recombinant protein was in *Escherichia coli* BL21 DE3, and detected by SDS-PAGE and Western Blot analysis. **Conclusions:** The *Escherichia coli* BL21 DE3 was able to express the recombinant protein of the M gene of the Dengue virus serotype 2 under the promoter of T7lac.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La fiebre por dengue es ocasionada por la infección con alguno de los cuatro serotipos del virus del Dengue, perteneciente a la familia Flaviviridae. Las partículas virales poseen una nucleocápside icosaédrica formada por la proteína C, en el interior se encuentra el genoma viral constituido por ARN monocatenario positivo. La nucleocápside se encuentra envuelta por una membrana bilipídica, y en la membrana se encuentran las proteínas E y M para su unión a receptores celulares.

El virus se transmite al ser humano a través de la picadura de los mosquitos del género *Aedes*, donde el mosquito *Aedes aegypti* ha sido detectado como el principal vector. Las manifestaciones clínicas de la infección varían desde ser asintomática y/o un cuadro febril autolimitado denominado fiebre por dengue (FD), hasta un cuadro clínico de fiebre acompañada con desórdenes coagulatorios, denominado como fiebre hemorrágica por dengue (FHD), y en los casos más severos se presenta un síndrome de choque hipovolémico (SCH). Los individuos reinfectados con un serotipo diferente presentan una mayor probabilidad de desarrollo de FHD/SCH y una de las teorías para explicar estas complicaciones es que los anticuerpos formados para el primer serotipo reaccionan de manera no neutralizante con el nuevo serotipo, provocando que favorezca la entrada al macrófago a través del receptor Fc, como consecuencia, un mayor número de células son infectadas y hay una mayor liberación de citocinas y quimiocinas que incrementan la permeabilidad vascular en células endoteliales provocando un choque hipovolémico. No obstante, se presentan incógnitas sobre el desarrollo de FHD/SCH en casos de infección primaria, por lo que se hipotetiza que factores como la virulencia del serotipo o predisposición genética a serotipos pueden influir en el desarrollo de la patogénesis. En estudios con diversos inmunizantes se demuestra que la inducción de anticuerpos neutralizantes contra un serotipo es capaz de proveer protección de por vida contra dicho serotipo, y que estos anticuerpos no predisponen a la amplificación de la enfermedad.

En este trabajo se obtuvo la proteína transmembranal M del virus del Dengue serotipo 2 por medio de técnicas de ADN recombinante, la cual podrá utilizarse en estudios posteriores para realizar una evaluación inmunológica y determinar una posible alternativa en el desarrollo de una vacuna.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Agente etiológico.

El virus del Dengue pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*, y ha sido categorizado en el grupo de los *Arbovirus* debido a su transmisión por artrópodos vectores. La familia *Flaviviridae* se conforma por virus con ARN monocatenario de polaridad positiva por genoma viral, los cuales son capaces de multiplicarse en células de vertebrados y de algunos artrópodos. Esta familia se compone de 3 géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus* (Chambers, *et al.*, 1990).

En el género *Flavivirus* se incluyen alrededor de 70 virus y la mayoría son transmitidos al humano por artrópodos hematófagos (mosquitos o garrapatas). Mas del 50 % de estos virus han sido asociados a algunos padecimientos en humanos, donde los virus más importantes son: el del Dengue (DEN), Fiebre Amarilla (YF), Encefalitis Japonesa (JE), y el de la Encefalitis transmitido por garrapatas (TBE) (Monath and Heinz, 1996).

La estructura del virus del Dengue (Fig. 1) consiste en una nucleocápside icosaédrica de 50 nm de diámetro envuelta que contiene una cadena de ARN por genoma viral. La nucleocápside, constituida por la proteína C, se encuentra envuelta por una membrana bilipídica procedente de la célula hospedera, en la cual hay alrededor de 180 copias de las proteínas E (envoltura) y M (membranal) para su unión a receptores celulares. El virus del Dengue está constituido por 4 serotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 ó DEN-4), los cuales presentan reacciones cruzadas entre ellos en las pruebas serológicas, sin embargo, se ha demostrado que los anticuerpos producidos contra un serotipo poseen una sensibilidad mayor contra ese serotipo y menor contra el resto (Shu, *et al.*, 2004). Dentro de cada serotipo se presentan variantes genéticas: los genotipos y topotipos, los cuales se utilizan como herramientas para la asociación de niveles de virulencia y la procedencia topográfica de la cepa (Rico-Hesse, 1990; Rice, 1996).

2.1.1 Organización genómica.

El genoma viral (Fig. 2) está conformado de ARN monocatenario de polaridad positiva de un tamaño aproximado de 10.6 kb. La cadena presenta un “cap” en su extremo 5’, pero carece de poliadenilación en el extremo 3’, y en ambos extremos hay regiones no traducibles (UTR) involucradas en la traducción y síntesis del ARN genómico. Tiene un solo marco de lectura abierto (ORF), el cual codifica para una poliproteína de ~3 000 aa, que al ser catalizada por proteasas virales y celulares, genera 3 proteínas estructurales (C, prM y E) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5) (Del Ángel, 2006; Whitehead, *et al.*, 2007).

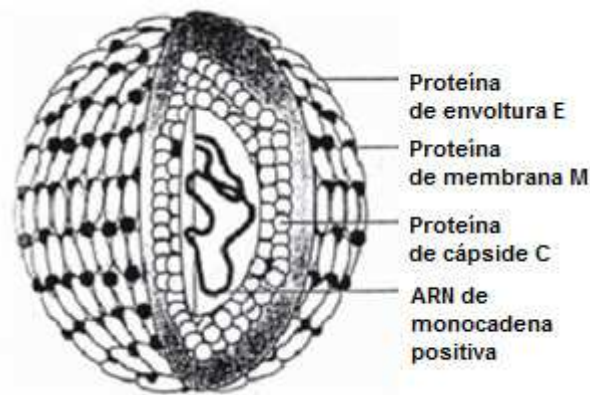


Figura 1.- Estructura del virus del Dengue. (Cabezas, et al., 2005)

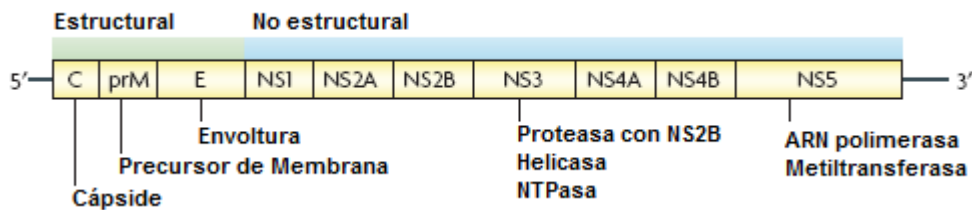


Figura 2.- Organización del genoma del Virus del Dengue. (Whitehead, et al., 2007)

2.1.2 Ciclo viral.

El ingreso del virus a la célula (Fig. 3) es por endocitosis mediada por receptores, donde la proteína E es la principal molécula de interacción con los receptores celulares DC-SIGN y CD-14 (Wu, *et al.*, 2000; Navarro, *et al.*, 2003) indicando que se presenta un mayor tropismo hacia los monocitos/macrófagos. Sin embargo, se han presentado reportes de interacción con receptores del tipo glicosaminoglicanos los cuales se encuentran presentes en una gran diversidad celular

(Hilgard, *et al.*, 2000). El endosoma formado tras la entrada viral es acidificado por acciones enzimáticas provocando la fusión de la membrana viral con la celular y la liberación del genoma viral en el citoplasma, donde la cadena de ARN es traducida en una poliproteína, la cual es transportada y procesada por proteasas virales y celulares en el retículo endoplasmático. La replicación del genoma ocurre entre las membranas intracelulares y éste es ensamblado con las proteínas estructurales en el retículo endoplasmático formando partículas virales inmaduras que después son transportadas por medio del aparato de Golgi, momento en el cual sufren un cambio en la conformación estructural de las proteínas membranales (cambio de preM a M) por la acción de la proteasa furina convirtiéndose así en partículas virales maduras. Finalmente, la partícula viral es liberada de la célula por exocitosis (Mukhopadhyay, *et al.*, 2005; Del Ángel, 2006).

Se especula que tras la inoculación del virus por la picadura del mosquito, éste se replica en las células dendríticas locales, y posteriormente en los macrófagos y linfocitos en circulación sistémica. Los niveles de viremia rondan alrededor de $10^5 - 10^6$ unidades infecciosas/mL, aunque se ha reportado que en los casos de FHD pueden aumentar de 10 hasta 100 veces, y estos altos niveles de viremia pueden promover la infección en otras áreas del organismo, lo cual podría explicar la presencia de hepatocitos infectados (Chen, *et al.*, 1997; Whitehead, *et al.*, 2007).

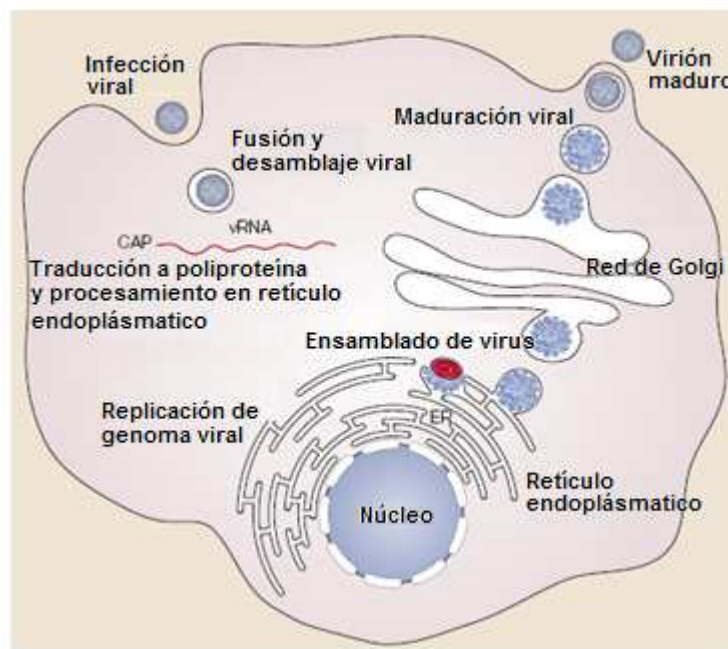


Figura 3.- Ciclo del virus del Dengue. (Mukhopadhyay, *et al.*, 2005)

2.1.3 Transmisión del virus del Dengue.

Se ha identificado al mosquito *Aedes aegypti* como el principal vector de los cuatro serotipos del virus del Dengue en América, pero también se ha detectado en otras especies del mosquito *Aedes*, por ejemplo: *A. albopictus*, *A. albifasciatus*, *A. mediovittatus*, *A. polinesiesis*, *A. scutellaris* y *A. niveus*. (Gubler, 1998). Las condiciones climáticas y geográficas para la sobrevivencia de los mosquitos son las regiones tropicales y subtropicales adyacentes a las zona Ecuatorial, lo cual engloba a mas de 100 países afectados (OMS, 2002).

El virus del Dengue se multiplica principalmente en el epitelio intestinal, esófago y glándulas salivales del mosquito, el cual permanece infectado y asintomático durante toda su vida. Después de 7 días de incubación, el mosquito es capaz de infectar al hombre por picadura, donde la hembra es el principal transmisor epidémico, ya que ésta se alimenta con mayor frecuencia debido a la necesidad calórica requerida durante la gestación (Gubler and Clark, 1994, 1995). En estudios recientes, se ha determinado que la resistencia del mosquito a la infección con el virus se debe a la presencia de la bacteria endosimbiótica *Wolbachia* que inhibe la replicación y diseminación acelerada del virus, cuyos mecanismos aún no han sido elucidados (Bian, et al., 2010). Debido a los altos niveles de viremia desarrollados en los humanos infectados, no es necesario un ciclo enzoótico para el mantenimiento de la transmisión epidémica del virus en el humano. En África se presenta un ciclo selvático de transmisión entre los primates y los mosquitos, pero se cree que la contribución de este ciclo a la transmisión epidémica urbana es mínima (Fig. 4) (Whitehead, et al., 2007).

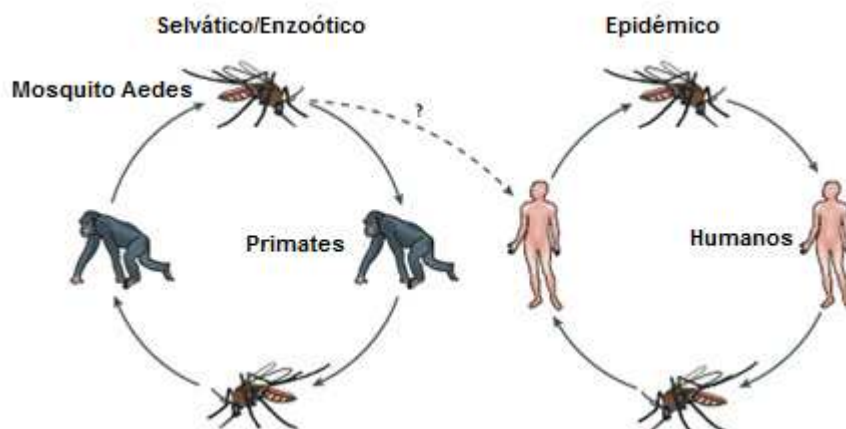


Figura 4.- Ciclo de transmisión del virus del Dengue. (Whitehead, et al., 2007)

En estudios con poblaciones sin intercambios migratorios, se observó que los genotipos del virus se mantenían en su zona; mientras que en las poblaciones con intercambios migratorios, se detectaron los distintos genotipos de las poblaciones partícipes en las migraciones; por lo tanto, la diseminación del virus del Dengue esta dada por el ser humano y no por los mosquitos *Aedes*, además se ha determinado que las distancias de vuelo de éstos son de 100 hasta 1 000 mts. (Harrington, et al. 2005).

2.2 Epidemiología.

Las primeras epidemias de fiebre por Dengue reportadas fueron en el año de 1780 en Asia, África y Norteamérica, y los periodos epidémicos se presentaban cada 3-5 años, lo cual indica que tanto la presencia del virus y del mosquito transmisor han tenido una distribución amplia en los trópicos por más de 200 años. (Gubler 1989)

En 1952, la PAHO organizó campañas para la erradicación del mosquito transmisor del virus del Dengue, y como resultado se obtuvo la disminución de las epidemias excepto por algunas islas del Mar Caribe. En 1970, se interrumpió el programa y gradualmente los países se reinfestaron con mosquitos *Aedes*, principalmente el *Aedes aegypti*, y para el año de 1995 había una distribución geográfica de los mosquitos vectores similar a la presentada antes de inicio de la campaña, así como el incremento de casos de fiebre por dengue en estas zonas (Fig. 5).

Las principales causas de esta reinfestación son: la inexistencia actual de un programa de control del mosquito vector, el desequilibrio en los sistemas de manejo de aguas residuales provocado por el crecimiento acelerado de la población, y el incremento de movimientos migratorios entre poblaciones favoreciendo el transporte de los serotipos. (Gubler y Clark, 1995)

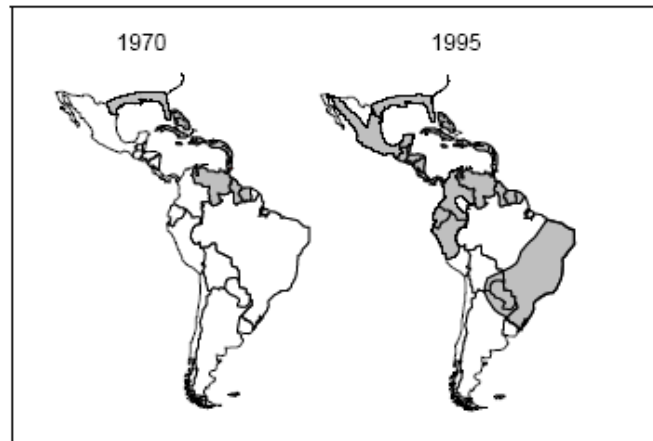


Figura 5.- Distribución de *Aedes aegypti* en América en los años 1970 y 1995.
(Gubler y Clark, 1995)

En los últimos años el número de casos de infección por el virus del Dengue ha aumentado de manera extraordinaria. Alrededor de 2.5 mil millones de personas (correspondiente a dos quintos de la población mundial) radican en los 100 países endémicos (Fig. 6), por lo tanto, se incrementa el riesgo de contraer la enfermedad mientras que antes de 1970 sólo nueve países presentaban este riesgo. La OMS calcula que cada año puede haber 50 millones de casos de fiebre por Dengue, y se calcula que anualmente se producen unas 500 000 hospitalizaciones con una tasa de mortalidad de 2.5%. Conforme la enfermedad se distribuye ampliamente a distintas zonas no solo se aumenta el número de casos, sino que se producen brotes explosivos; como en el año 2007, donde Venezuela notificó más de 80 000 casos, entre ellos más de 6 000 de FHD, y en general en las Américas se registraron más de 890 000 casos, de los cuales 26 000 eran de FHD. (OMS, 2010)

La infección por cualquier serotipo del virus del Dengue es capaz de inducir la FD en infecciones primarias, y FHD/SCH en caso de infecciones secundarias. En estudios retrospectivos, el DEN-2 ha sido asociado a los cuadros clínicos más severos de FHD/SCH tanto en casos de infecciones secundarias como primarias, habiendo reportes de epidemias de proporciones considerables en Cuba y otros países; mientras que otros reportes parecen indicar de una susceptibilidad de la población a un serotipo, ya que de igual manera se detectaron cuadros clínicos más severos asociadas a la infección por DEN-3 en epidemias ocurridas en Nicaragua y Panamá. (CDC, 2008)

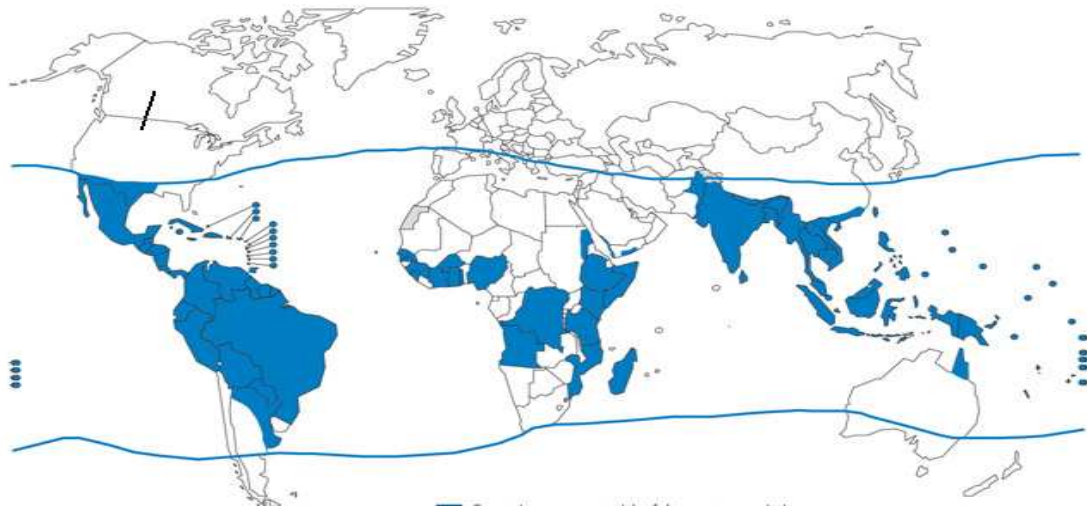


Figura 6.- Distribución de países o áreas en riesgo de transmisión del Dengue.

(OMS, 2008)

2.2.1 Epidemiología en México.

El Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE), se encarga de señalar la distribución de los serotipos del virus del Dengue en distintos estados de la República Mexicana, donde la presencia de varios serotipos en una misma área provoca un aumento en la probabilidad de presencia de casos de FHD.

En el período de 1995-2002, se ha reportado una alta prevalencia de los serotipos DEN-2 y DEN-3, donde el DEN-2 se ha asociado con los casos clínicos de mayor severidad, mientras que en el transcurso del período de 2005-2007 se ha observado variaciones en los porcentajes de los serotipos identificados, donde el DEN-2 predominó en el año 2005, el DEN-1 y DEN-3 durante el año 2006 y el DEN-1 durante el año 2007

En el período de 2004-2009 se observó un incremento en el número de casos de FD y FHD (Tabla 1), y la mayoría de éstos se presentaron entre los meses de septiembre a noviembre que corresponden a la temporada de lluvias favoreciendo así la multiplicación del mosquito vector. (Secretaría de Salud, 2009).

Tabla 1.- Cierres anuales de casos confirmados de infección por virus del Dengue en México 2004-2009.

| | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 |
|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Fiebre por Dengue | 6 243 | 16 862 | 17 487 | 42 936 | 27 964 | 47 972 |
| Fiebre Hemorrágica por Dengue | 1 959 | 4 255 | 4 418 | 9 433 | 7 560 | 10 562 |

(CENAVECE, 2010).

2.3 Cuadro clínico de la enfermedad.

La infección por alguno de los serotipos del virus del Dengue puede cursar desde ser asintomática hasta fiebre con episodios de hemorragias, y en algunos casos hasta presentar trastornos hipovolémicos del sistema vascular.

Tras la infección por la picadura del mosquito, el virus es incubado por 3 días antes de iniciar la patogénesis. En la mayoría de los casos de FD, los signos y síntomas se caracterizan por una fiebre repentina con dolor de cabeza, retro-orbital y abdominal, falta de apetito, náuseas, prurito en tórax, superficie plantar y palmar, mialgias y artralgias, razón por la cual se le conoce como la fiebre “quebranta-huesos”, y en análisis clínicos se ha reportado cuadros de leucopenia y trombocitopenia durante la infección. Estas manifestaciones se pueden presentar en la población en general pero se ha observado que afecta principalmente a jóvenes.

Los casos de FHD se caracterizan por iniciar con signos y síntomas similares a FD, pero durante la disminución de la fiebre se presentan de manera inmediata episodios graves de leucopenia y trombocitopenia (<100,000 plaquetas/mm³), manifestaciones hemorrágicas como lo es la fragilidad capilar, aparición de petequias, sangrado gastrointestinal y en mucosas; además puede presentarse un incremento de permeabilidad vascular con derrame de fluido intravascular en los espacios intersticiales, provocando así los trastornos hipovolémicos. En algunos casos se han reportado hepatomegalias y problemas neurológicos (Patey, *et al.*, 2003) donde las causas aún no han sido elucidadas por completo. (Halstead, *et al.*, 1973; Lei, *et al.*, 2001; Whitehead, *et al.*, 2007; Limonta, *et al.*, 2010)

Para el diagnóstico de la severidad de FHD/SCH, la OMS estableció 4 grados de la enfermedad: el grado I es el caso menos severo, el cual se caracteriza por presentar aparición de petequias, aumento de permeabilidad vascular, y trombocitopenia; en el grado II se presenta un aumento en el hematocrito y trastornos hemorrágicos; en el grado III se presenta hipovolemia, hipotensión y pulso débil; y en el grado IV se manifiestan casos de choques hipovolémicos profundos, coagulopatías diseminadas y sangrados severos. Los casos de FHD/SCH se presentan en mayor proporción en niños menores de 15 años en zonas endémicas con los cuatro serotipos (OMS, 2010).

En infecciones secundarias se ha observado que los individuos reinfectados con un serotipo diferente al primero presentan cuadros clínicos característicos de FHD/SCH, por lo cual han surgido algunas hipótesis para explicar el desarrollo de esta patogénesis, y una de estas es la Amplificación Dependiente de Anticuerpos (ADA) que sugiere que la presencia de anticuerpos contra el primer serotipo da reacción cruzada con el nuevo serotipo infectante, los cuales son incapaces de neutralizarlo y además les confiere un mayor flujo de entrada a los macrófagos a través del receptor Fc en donde se replican y promueven una estimulación en la producción de citocinas (principalmente IFN, TNF- α , IL-2), las cuales alcanzan concentraciones elevadas en sangre periférica provocando así los trastornos en la homeostasis vascular. En un estudio retrospectivo se observó el papel de los niveles de anticuerpos en el desarrollo de FHD, en el que infantes alimentados con leche materna de madres que presentaban anticuerpos específicos para DEN-2 desarrollaron solamente FD después de haber sido infectados por el mismo serotipo; mientras que en el grupo de infantes que habían dejado de recibir los anticuerpos maternos habían desarrollado FHD, calculándose que la ventana de este riesgo consistía en los primeros 2 meses de haber dejado recibir dichos anticuerpos, por lo tanto, este estudio sugiere que los anticuerpos de la leche materna inicialmente protegen al infante contra la infección por DEN-2 pero cuando éstos se degradan y bajan a niveles no protectores pueden predisponer al desarrollo de FHD en el infante. (Kliks, *et al.*, 1988). Por otro lado, no todos los casos de FHD/SCH son reinfecciones, sino también se ha presentado en infecciones primarias, por lo que se piensa que factores como la virulencia del serotipo o predisposición genética de la población puedan influir en el desarrollo de la patogénesis. (Kliks, *et al.*, 1989; Lei, *et al.*, 2001; Whitehead, *et al.*, 2007).

Un factor que ha sido asociado a beneficiar el desarrollo de la patogénesis, es la citocina MIF; donde los pacientes que fallecieron por FHD presentaban niveles séricos altos mientras que los pacientes sobrevivientes a FD y FDH presentaban niveles inferiores a 50 ng/mL, sugiriendo que el MIF podría ser utilizado como un agente predictor en el desarrollo de la enfermedad. (Chen, *et al.*, 2006). Además, se ha observado que los ratones Balb/c deletados para el gen del MIF presentan un índice de letalidad y viremia menor en comparación con la cepa “wild type” ante una infección por el virus del Dengue. (Assuncao-Miranda, *et al.*, 2010)

En pacientes con casos graves de FHD/SCH se ha detectado la presencia de apoptosis en leucocitos y células endoteliales de pulmón, intestino, y cerebro; lo cual podría explicar las extravasaciones de plasma, hemorragias e isquemias observadas en algunos pacientes. Además, los macrófagos infectados son estimulados para la producción de TNF- α , lo cual a su vez aumenta la producción de RNS y ROS en las células endoteliales infectadas provocando la muerte celular en endotelios y un cambio de la permeabilidad vascular (Cardier, *et al.*, 2006; Wu-Hsieh, *et al.*, 2009; Limonta, *et al.*, 2010).

2.4 Métodos de detección de infección por virus del Dengue.

En la actualidad, los métodos usados por la mayoría de los laboratorios para la detección de infección por el virus del Dengue son: el aislamiento, cultivo y detección del virus por pruebas serológicas, la detección del genoma viral por medio de RT-PCR y qPCR, y la detección de anticuerpos IgG e IgM específicos para el virus (Del Pilar, 2000; Shu y Huang, 2004). El método de aislamiento y cultivo del virus ha sido desplazado por los métodos de RT-PCR y de anticuerpos específicos, ya que estos últimos son métodos rápidos con resultados que se obtienen en 24 hrs mientras que el otro método tarda de 4 - 5 días. El virus puede ser aislado a partir de sangre periférica y tejidos linfoides entre los días 3 a 7 cursantes de la infección, mientras que en suero debe realizarse antes de los 3 días de infección ya que su presencia se reduce drásticamente (Wang, *et al.* 2000).

La detección de anticuerpos específicos en suero contra los distintos serotipos del virus del Dengue se realiza por medio de la técnica de ELISA, donde las placas son recubiertas con las proteínas estructurales E/M ó la proteína no estructural NS1, las

cuales no solo han demostrado ser capaces de detectar la infección por el virus, sino que es posible serotipificar >80% de los casos de infecciones primarias (IgM) y un >40% en infecciones secundarias (IgG), indicando que el uso del método ELISA para la detección de infecciones primarias posee potencial para serotipificación del virus (Shu, *et al.*, 2004 a,b).

2.5 Desarrollo de inmunidad contra el virus del Dengue.

Una de las principales metas contra la infección por el virus del Dengue es la inducción de niveles protectores de anticuerpos neutralizantes en el organismo. A pesar de la hipótesis ADA y su posible participación en el desarrollo de los cuadros clínicos más severos, hay suficiente evidencia de que los candidatos a vacunas que provocan una fuerte inducción de anticuerpos neutralizantes contra un serotipo proporcionan una protección de por vida contra la reinfección por el mismo, y que éstos no contribuyen a la amplificación dependiente de anticuerpos de la enfermedad. (Whitehead, *et al.*, 2007).

Uno de los principales obstáculos en el área de inmunizantes es el limitado entendimiento de la patogénesis de la enfermedad por Dengue y la ausencia de un modelo animal idóneo, económico, y confiable, donde el mono Rhesus es el más aproximado al desarrollo de la enfermedad en el hombre pero éste tiene la desventaja de ser costoso. Uno de los modelos planteados es el ratón Balb/c de un mes de edad que demostró presentar una sensibilidad a la exposición con el DEN-2, la presencia de éste en sangre fue confirmada por RT-PCR al día 2 después de la infección, y en 5 a 6 días todos los ratones mostraron cuadros clínicos severos con anorexia y pérdida de peso terminando en parálisis lumbar y con una tasa de mortalidad del 100% a los 7 días, donde el cambio más impresionante fue el aumento abrupto de TNF- α 24 horas antes de la muerte, pero si se les mantenía en tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-TNF- α se redujo la mortalidad hasta un 40%. Este modelo implica que la activación del sistema inmune innato es parcialmente responsable en la mortalidad por la infección con el DEN-2. También se ha propuesto como modelo al ratón AG129, el cual es un ratón deficiente en la respuesta de IFN, en el cual se observó una mortalidad del 100 % 7 días después de la inoculación intraperitoneal con DEN-2 mientras que en los ratones que se les administró IFN exógeno se disminuyó drásticamente la mortalidad (40%),

evidenciando así el rol protectorio del IFN ante la infección por el virus del Dengue. (Sierra, et al., 1999; Peng, et al., 2004)

Hay distintos tipos de candidatos vacunales, donde algunos se basan en el uso del virus modificado mientras que otros se basan en el uso de moléculas propias del virus para inducir una respuesta inmune específica. Los virus atenuados fueron los primeros candidatos vacunales, los cuales fueron obtenidos mediante el pase seriado en cerebro de ratón lactante, estos trabajos permitieron demostrar que era posible lograr la atenuación del virus y que la administración de dichos virus atenuados en humanos son capaces de inducir inmunidad de tipo específica. (Sabin, 1945).

Las vacunas del virus del Dengue inactivado, aunque presentan la inconveniencia de tener una pobre replicación en cultivos celulares, no han sido del todo descartadas. Se ha desarrollado un candidato vacunal inactivado en células Vero y se evaluó la respuesta inmunológica en ratones Balb/c, obteniendo altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra el serotipo homólogo y una protección parcial temporal contra los otros serotipos. (Putnak, *et al.* 1996).

Otro candidato de vacuna es el uso de ADN recombinante codificante para las proteínas de premembrana y de envoltura del virus del Dengue serotipo 1. La inmunización se realizó en monos *Rhesus* por vía intramuscular e intradérmica con el fin de determinar la vía de administración para una obtener una respuesta inmune idónea. Los resultados mostraron que los monos inoculados por vía intramuscular presentaban una seroconversión más rápida, altos títulos de anticuerpos y una mayor reducción en los niveles de viremia al ser retados con el virus (Raviprakash *et al.*, 2000).

Una de las proteínas recombinantes evaluadas es el dominio III de la proteína E de los cuatro serotipos formando una poliproteína tetravalente, la cual fue probada en ratones Balb/c y se obtuvo una sobrevivencia del 70% de los retados con el DEN-1, DEN-2 y DEN-4, mientras que para el DEN-3 se obtuvo un 18% (Chen, et al., 2007). Otro candidato como vacuna tetravalente es la mezcla de los 4 serotipos del virus del Dengue atenuados, la cual se utilizó para inmunizar monos *Rhesus*, los que mostraron una protección total contra la viremia al ser retados con el DEN-2, mientras que un

80%, 80% y 50% de protección para DEN-1, DEN-3 y DEN-4, respectivamente. (Sun, *et al.*, 2006)

Ratones inmunizados con virus recombinantes que expresaban la proteína preM ó M del DEN-4 mostraron niveles óptimos de protección al ser retados con el virus homólogo, mientras con la proteína E del DEN-2 se observó una protección parcial contra el virus homólogo; por otro lado, en un estudio similar se observó que tanto la proteína M como la E del DEN-2 por si solos solo inducían una protección parcial, sin embargo, se observó que si eran administradas juntas en forma de una sola poliproteína o como dos proteínas independientes se lograba la inducción de altos niveles de protección, principalmente en ésta última forma. (Bray y Lai, 1991). Se ha reportado que la proteína M, además de dar una protección, puede estar implicada en el proceso de apoptosis en las células infectadas (Catteau, *et al.*, 2003), proceso al que se le atribuye como la posible causa de las complicaciones desarrolladas durante el cuadro de FHD/SCH (Limonta, *et al.*, 2010).

2.6 Aspectos generales de la tecnología recombinante.

El desarrollo de la ingeniería genética, específicamente el área de la tecnología de ADN recombinante ha revolucionado el campo de la medicina clínica, ya que ha impulsado el desarrollo de la preparación de vacunas, pruebas diagnosticas de laboratorio con alta especificidad, producción de proteínas sintéticas a gran escala, donde esté ultimo caso ha mejorado la obtención de proteínas de interés humano, como la insulina y la hormona de crecimiento.

Los inicios de la manipulación del ADN tomaron lugar a finales de los años 50's, donde Arthur Kornberg realizó los primeros intentos para sintetizarlo, y esto provocó el descubrimiento de un gran número de enzimas que tenían una actividad sobre el ADN. Una de estas enzimas es la ADN polimerasa, aislada a partir de *Escherichia coli*, que demostró la actividad de ensamblar nucleótidos en una cadena de ADN sencilla formando así una cadena complementaria. Otra enzima es la ligasa, descubierta a través de los mecanismos de reparación del ADN de *Escherichia coli* infectada con el bacteriófago T40, es capaz de unir extremos de cadenas de ADN a través de su enlace fosfodiéster dando como resultado una sola molécula de ADN integra. Otras de las herramientas descubiertas son las enzimas de restricción, descubiertas como el mecanismo de control en bacterias sobre la propagación del ADN

de virus invasores, son capaces de reconocer cierto patrón de nucleótidos y cortar en él dando como resultado fragmentos de ADN con extremos inapareados, los cuales pueden ser después unidos a extremos complementarios de otra cadena por acción de la enzima ligasa. Una de las enzimas que impulsó de manera considerable la ingeniería genética fue la transcriptasa reversa, descubierta en los retrovirus por su capacidad de copiar su ARN a forma de ADN, que abrió paso al convertir el ARN mensajero en ADN para su posterior manipulación. Finalmente se desarrolló la técnica de producción en masa del ADN mediante su inserción en células eucariotas ó procariotas, las cuales al crecer y reproducirse no solo replican al ADN insertado, sino también son capaces de producir la proteína codificada por ese ADN, la cual posteriormente es recolectada y purificada del medio de cultivo. (Wright, 1986; Ohtsuka, et al., 2009)

2.6.1 Expresión de proteínas heterólogas en *Escherichia coli*.

En la actualidad hay distintos sistemas de expresión de proteínas basados en cultivos celulares de mamíferos, insectos, levaduras, bacterias y sistemas libre de células, de los cuales el de bacterias ha demostrado ser un método eficiente para la producción de proteínas recombinantes debido al bajo costo del material, a la alta productividad, y a su uso sencillo y rápido.

La cepa *Escherichia coli* es la entidad biológica más utilizada para la producción de proteínas recombinantes, donde sus características principales son: facilidad de cultivo, un genoma caracterizado por completo, y la amplia gama de herramientas moleculares desarrolladas que son compatibles con este sistema. Algunas cepas de *Escherichia coli* han sido modificadas en su genotipo con el fin de incrementar la producción y estabilidad de las proteínas recombinantes expresadas a la vez que se reducen los costos necesarios para el proceso (Terpe, 2006).

Las proteínas heterólogas expresadas pueden localizarse en distintos compartimentos celulares como: citoplasma, membrana interna, periplasma, membrana externa, y espacio extracelular. Esto es determinado por el péptido señal que contenga y en algunos casos el grado de solubilidad de la proteína. Algunos de los problemas que se presenta en las proteínas destinadas al perisplasma son la translocación incompleta a través de la membrana interna, la degradación proteolítica, y la falta de capacidad de la maquinaria de transportación. El péptido señal generalmente se compone de 20 aa

hidrofóbicos en el extremo N terminal sirviendo como base de reconocimiento para proteínas chaperonas que interaccionan y translocan la proteína recombinante al compartimiento celular correspondiente; una vez ahí, la proteína adopta su forma madura mediante el plegamiento estructural de la misma y la remoción del péptido señal por medio de proteasas propias del área celular (Terpe, 2006; Chou, 2007).

La mayoría de los vectores de expresión utilizados poseen características como: el poseer promotores fuertes con una expresión basal baja (la cual puede ser regulada), el ser transferibles a otras cepas de *Escherichia coli*, y ser inducidos por métodos simples y económicos. El promotor T7lac es inducido por la lactosa o su análogo sintético el IPTG promoviendo una fuerte inducción en el sistema de ARN polimerasa T7, siendo ideal para altos niveles de expresión de las proteínas recombinantes pero posee la desventaja de que puede promover la formación de cuerpos de inclusión, y por consiguiente, provocar una baja tasa de obtención de proteína recombinante madura; así mismo la producción elevada de proteínas tóxicas podría afectar el crecimiento de la bacteria hospedera, pero aún así ha sido posible la expresión de éstas. Los vectores de expresión basados en el promotor ara, que es inducido por la arabinosa, poseen la ventaja de ser un sistema de niveles bajos de expresión que favorece la tolerancia de la síntesis de proteínas tóxicas, pero los niveles de expresión suelen ser demasiado variables obteniéndose desde una concentración aceptable de producto (pero no masiva a la obtenida con el promotor T7lac) hasta concentraciones no detectables. (Hashemzadeh-Bonehi, *et al.*, 1998)

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS

La clonación del gen M en un vector regulado por un promotor constitutivo permite inducir la expresión de la proteína M del Virus del Dengue serotipo 2 en un sistema de expresión procariote basado en *Escherichia coli*.

CAPÍTULO 4
OBJETIVO GENERAL.

Clonar y expresar el gen M del virus del Dengue serotipo 2 en el sistema de expresión en *Escherichia coli*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Diseñar los oligonucleótidos específicos para el gen M y el sistema de expresión en procariontas.
- Realizar la construcción del plásmido de expresión pET22b-DEN2M.
- Inducir y detectar la expresión de la proteína recombinante en *Escherichia coli* BL21 DE3.

CAPÍTULO 5

MÉTODOS

5.1 Diseño de oligonucleótidos para el gen M del virus de Dengue serotipo 2.

Para el diseño de los oligonucleótidos se consultó la secuencia del gen M en la base de datos VBRC, y se utilizaron las herramientas Primer3 y BLAST para el diseño y especificidad de los mismos.

5.2 Obtención del gen M del virus de Dengue serotipo 2.

El gen de interés se obtuvo a partir del plásmido p2DEN2 que contiene clonado el genoma completo del virus del Dengue serotipo 2. El plásmido fue donado por el Dr. Stephen Whitehead, responsable de la Unidad de Enfermedades Infecciosas y Reemergentes del NIH. (Anexo 1)

5.3 Amplificación del gen M a partir del plásmido p2DEN2 por PCR.

La mezcla de reacción y programa de PCR utilizados se muestran en las Tablas 2 y 3, respectivamente. La temperatura óptima de fusión de los oligonucleótidos se determinó mediante un PCR en gradiente en el termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research).

Tabla 2.- Mezcla de reacción para PCR convencional.

| <i>Reactivo</i> | <i>Concentración final</i> | <i>Volumen empleado</i> |
|------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| H ₂ O MQ | -- | 13 µL |
| Buffer PCR | 1 x | 2.5 µL |
| MgCl ₂ | 2.5 mM | 3 µL |
| dNTP's | 0.8 mM | 1 µL |
| Oligo 5' | 20 pmol | 0.5 µL |
| Oligo 3' | 20 pmol | 0.5 µL |
| ADN | -- | 4 µL |
| Taq ¹⁰ polimerasa | 1 U | 0.5 µL |
| <i>Volumen final</i> | -- | <i>25µL</i> |

Tabla 3.- Programa de temperaturas y tiempos para PCR convencional.

| <i>Paso</i> | <i>Temperatura</i> | <i>Tiempo</i> | <i>Proceso</i> |
|-------------|-----------------------------------|---------------|------------------------------------|
| 1 | 94 °C | 5 min | Separación inicial de doble hélice |
| 2 | 92 °C | 45 seg | Separación de doble hélice |
| 3 | 50-63 °C | 45 seg | Alineamiento de oligonucleótidos |
| 4 | 72 °C | 45 seg | Elongación de la cadena |
| 5 | Regresar al paso 2 por 30 ciclos. | | |
| 6 | 72 °C | 7 min | Elongación final |

5.4 Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa.

Los ácidos nucleicos fueron analizados en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1x. En el gel se colocaron 5µL de muestra con Buffer de Carga para ADN 6x. La electroforesis se realizó a 100 volts por 25 min, después el gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio (1 µg/mL) y se observó bajo luz UV.

5.5 Cuantificación de ADN y proteínas por espectrofotometría UV.

La cuantificación de las muestras se realizó en el equipo Nanodrop Spectrophotometer (Thermo Scientific). Las longitudes de onda utilizadas son: 260 nm para ácidos nucleicos y 280 nm para proteínas.

5.6 Clonación del gen M en pGEMT Easy Vector.

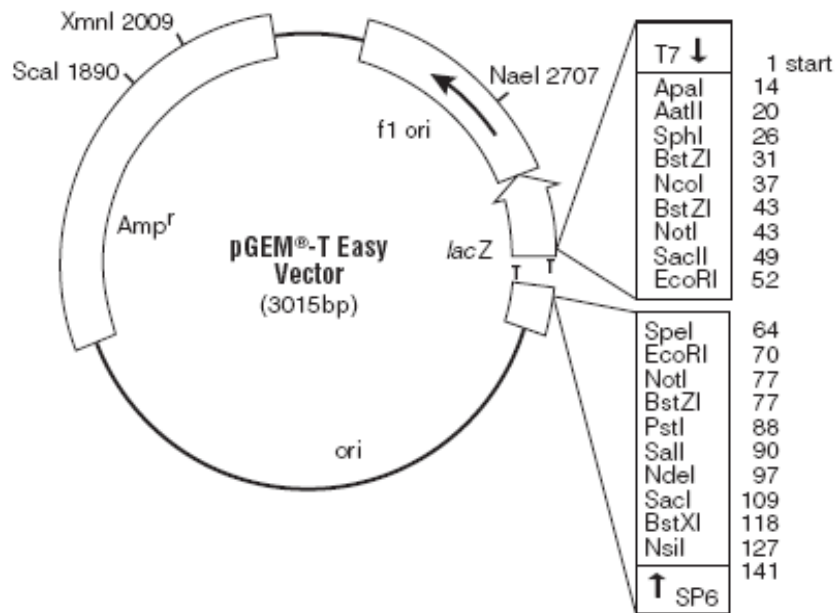
El producto de PCR se clonó en el plásmido pGEMT Easy Vector (Promega) en una relación 1:1 inserto-plásmido (50 ng), en presencia de buffer de ligación 1x y 1U de T4 ADN Ligasa (Promega), y se incubó a 4 °C por 16 hrs. La acción enzimática se detuvo a 65 °C por 15 min y se almacenó a -20 °C.

El cálculo de las concentraciones necesarias para cumplir la relación inserto-plásmido se realizó en base a la siguiente fórmula:

$$A = [\text{ng Plásmido a utilizar} \times \text{Tamaño inserto en kb}] / \text{Tamaño plásmido en kb}$$

$$B = \text{Relación molar entre inserto-plásmido.}$$

$$(A \times B) = \text{ng necesarios de inserto para la reacción.}$$



**Figura 7.- Mapa de vector de clonación de productos de PCR:
pGEMT Easy Vector**

5.7 Preparación de bacterias *Escherichia coli* calcio competentes.

Las cepas de *Escherichia coli* (DH5 α y BL21 DE3) se activaron sembrando 5 μ l de cultivo primario en 7 mL de caldo LB base y se incubaron a 37°C por 16 hrs.

Se inoculó 1 mL del cultivo activado en 30 mL de caldo LB base y se incubó a 37 °C con 300 rpm hasta conseguir una densidad óptica (D.O.) de 0.5 a 600 nm. Se centrifugó a 6 000 rpm por 10 min a 4°C (Centrífuga BeckmanAllegra 64R). La pastilla celular se resuspendió en una mezcla de 800 mM de MgCl₂ y 200 mM de CaCl₂ (soluciones frías estériles). Se dejó reposar en hielo por 3 min y se centrifugó bajo las mismas condiciones, y la pastilla celular se resuspendió en 1 mL de CaCl₂ 0.1M frío. Las bacterias calciocompetentes se dividieron en alícuotas de 80 μ l en glicerol al 25 % y se almacenaron a -70 °C.

5.8 Transformación de *Escherichia coli* DH5 α con pGEMT-DEN2M.

Una alícuota de *Escherichia coli* DH5 α calciocompetente se descongeló en hielo por 5 min, se añadieron 5 μ L de la reacción de ligación pGEMT-DEN2M y se incubó en hielo por 20 min. Después se le realizó el choque térmico en baño de agua a 42°C por 1 min e inmediatamente se regresó a incubar en hielo por 5 min. Se agregaron 900 μ L de caldo LB base y se incubó a 37 °C con agitación de 500 rpm por 1 h. Se plaquearon 200 μ L de la transformación en cajas Petri con Agar LB con Ampicilina

(100 µg/mL) impregnadas con 600 ng de IPTG (isopropil β-D-tiogalactosido) y 800 ng de X-Gal (5-Bromo,4-Cloro,3-indolil- β -D-Galactosido), y se incubaron a 37 °C por 12-16 hrs.

5.9 Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli* por Miniprep.

Las colonias seleccionadas de la transformación se inocularon en 7 mL de caldo LB base con Ampicilina (100µg/mL) y se incubaron a 37°C por 12-16 hrs. Cada cultivo se procesó de la siguiente manera: se centrifugó a 8 000 rpm por 10 min, la pastilla celular se resuspendió en 200 µL de Solución I por agitación en vortex(S/P Vortex mixer), después se añadieron 400 µL de Solución II, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, se le añadió 300 µL de Solución III, se mezcló nuevamente por inversión y se incubó en hielo por 20 min. Se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min, el sobrenadante se recolectó y se mezcló con un volumen igual de isopropanol, precipitándose el ADN plasmídico, y se incubó por 30 min a -20 °C. Se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min, y la pastilla se lavó con etanol al 70%, se secó a 60 °C y se resuspendió en 25 µL de H₂O MQ. Los plásmidos obtenidos fueron almacenados a -20 °C.

5.10 Análisis de los plásmidos pGEMT-DEN2M por PCR y digestión con enzimas de restricción.

A los plásmidos se les realizó un PCR para determinar la presencia o ausencia del inserto en el plásmido. A los plásmidos positivos por PCR se les realizó una digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. La reacción consistió en 1 µg de plásmido, 2 µg de BSA, buffer de digestión 1X y 1U de la enzima de digestión (*BamHI/XhoI/EcoRI*), se incubó a 37°C por 1 h, y la reacción se detuvo a 65°C por 10 min.

5.11 Amplificación del gen M en pGEMT-DEN2M por PCR con oligonucleótidos M13.

El plásmido positivo para el gen M confirmado por PCR y digestión con enzimas de restricción, se le realizó un PCR utilizando oligonucleótidos complementarios a las secuencias M13 en el pGEMT Easy Vector, las cuales se encuentran adyacentes a la zona de clonación donde se encuentra el gen clonado, amplificando así un fragmento que contiene el gen de interés y los sitios multicorte para

las enzimas de restricción. La temperatura óptima de fusión para los oligonucleótidos M13 es de 55°C.

5.12 Digestión del producto de PCR de DEN2M-M13 y del plásmido pET22b(+).

El producto de PCR de DEN2M-M13 y el plásmido pET22b(+) (Promega) fueron sometidos a digestión con las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI*, siguiendo el protocolo de digestión descrito en 5.10. Los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1%.

5.13 Purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa.

Los fragmentos obtenidos fueron cortados del gel de agarosa, y por cada 10 mg de gel se le añadió 10 µl de la Solución de unión a membrana (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega), y se incubó a 55°C hasta la disolución total del gel.

Se ensambló la Minicolumna SV en un tubo colector y se transfirió el gel disuelto en la Minicolumna SV, se incubó por 1 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm por 1 min. Se lavó con 700 µl de la Solución de lavado de membrana y se centrifugó a 14 000 rpm por 1 min. Se descartó lo recolectado, se repitió nuevamente el lavado con 500 µl y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min. Se centrifugó nuevamente la columna a 14 000 rpm por 1 min para eliminar toda traza de solución en la membrana. Se ensambló la Minicolumna SV a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se añadió de 25 µl de H₂O MQ y se dejó incubando por 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14 000 rpm por un minuto y lo recolectado se almacenó a -20°C.

5.14 Subclonación del gen M en el plásmido de expresión pET22b(+).

Se realizó la ligación de los productos purificados siguiendo el protocolo mencionado en el punto 5.6. Se utilizó una relación de 1:5 de plásmido-inserto.

5.15 Transformación de *Escherichia coli* DH5α con pET22b-DEN2M.

Se realizó la transformación de *Escherichia coli* DH5α con pET22b-DEN2M por medio del protocolo mencionado en el punto 5.8.

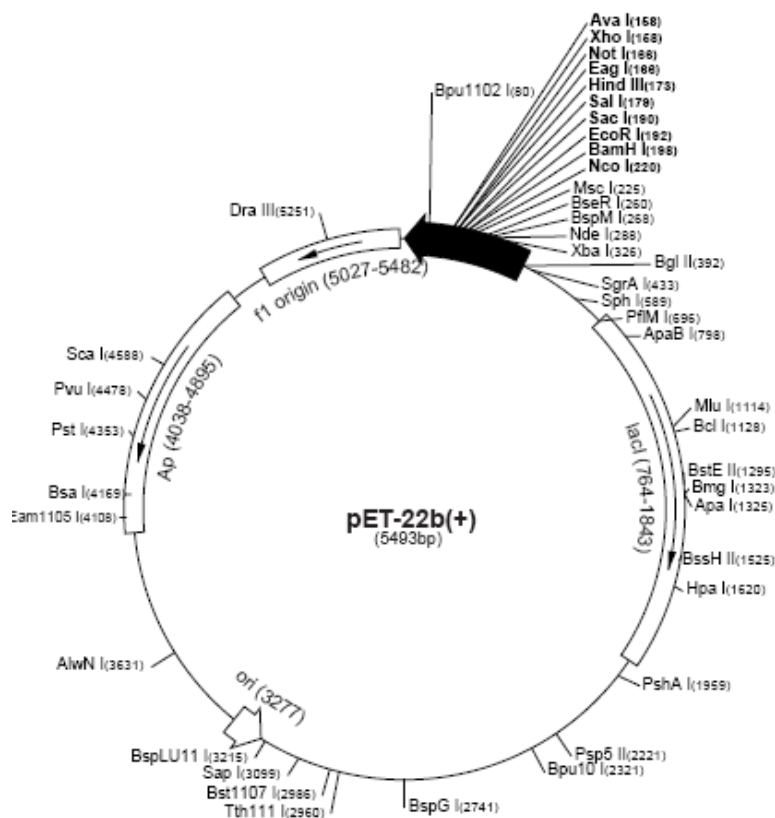


Figura 8.- Mapa de vector de expresión en procariotas pET22b(+)

5.16 Análisis y caracterización del plásmido pET22b-DEN2M.

Las colonias *E. coli* transformadas con pET22b-DEN2M fueron cultivadas y se les realizó extracción del plásmido. Los plásmidos positivos por PCR se les realizó una caracterización, esto consistió en una digestión con enzimas de restricción (*XbaI/XhoI* y *XbaI/BamHI*) y poder así determinar la orientación del inserto en el plásmido por medio de la ausencia o presencia de fragmentos generados. Los plásmidos confirmados se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.17 Transformación de *Escherichia coli* BL21 DE3 con pET22b-DEN2M.

Los plásmidos pET22b-DEN2M se utilizaron para la transformación de la cepa de expresión de proteínas recombinantes, *Escherichia coli* BL21 DE3, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. A las clonas obtenidas se les realizó PCR para constatar la presencia del pET22b-DEN2M.

5.18 Inducción de la expresión de la proteína M en *Escherichia coli* BL21 DE3.

Se inocularon 500 μ L del cultivo de las clonas pET22b-DEN2M en 20 mL de caldo LB con Ampicilina (50 μ g/mL), y como controles negativos se utilizaron clonas con plásmido pET22b sin inserto. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación de 300 rpm hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.6, a esta densidad óptica se indujo la expresión con IPTG 1 mM de concentración final. Se incubaron a 30 °C con agitación de 300 rpm por 4 hrs. Se centrifugaron los cultivos a 8 000 rpm por 10 min, se decantó y la pastilla celular obtenida se almacenó a -70°C.

5.19 Extracción de proteínas totales de *Escherichia coli* BL21 DE3.

Las pastillas celulares se descongelaron en hielo y se resuspendieron en PBS-EDTA hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 10.0. La suspensión celular se lisó utilizando el sonicador Ultrasonic Cleaner 3210 (Branson) con pequeños pulsos de 30 segundos seguido de 30 segundos de incubación en hielo, este proceso se repitió hasta acumular un total de 7 min de sonicación. Se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min a 4 °C, y el sobrenadante recolectado se almacenó a -20 °C.

5.20 Análisis de proteínas totales de *Escherichia coli* BL21 DE3 en SDS-PAGE.

Los sobrenadantes se prepararon con Buffer de Muestra 1x, se mezcló por inversión, y se sometieron a ebullición en baño de agua por 5 min.

En el gel se cargó 50-100 μ g de las muestras y como marcador de peso molecular se utilizó el Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad), y se realizó el corrimiento electroforético en Buffer Tris-Glicina 1x a 100V/20mA por 2 hrs. Posteriormente, el gel se tiñó en solución de Azul de Coomassie por 30 min, se retiró el excedente de colorante con H₂O dd, y finalmente se mantuvo en Solución Decolorante por 16 hrs.

5.21 Detección de la proteína M recombinante por Western Blot.

Después del corrimiento electroforético se realizó la transferencia de las proteínas en el gel hacia una membrana de PVDF (Immobilon). Se armó el transblot (Mini-V 8-10) de la siguiente manera (en dirección de cátodo a ánodo): pad, filtro, gel de poliacrilamida, membrana de PVDF, filtro, pad; y la transferencia se realizó en Buffer de Transferencia 1x a 25V/100mA a 4°C por 12 hrs.

Después de la transferencia, la membrana de PVDF se tiñó con Rojo de Ponceau (Sigma-Aldrich) por 2 min. Se eliminó el colorante por medio de 3 lavados de 5 min con PBST 0.05%. Se añadió Solución de Bloqueo 5% y se incubó por espacio de 1 h en agitación suave. Se realizaron 3 lavados de 10 min con PBST 0.05%. Posteriormente se añadió el anticuerpo primario Anti-His 1:2000 (Qiagen/Sigma), y se incubó a 4°C en agitación suave por 16 hrs. Se procedió nuevamente con 3 lavados de 10 min con PBST 0.05%. Se añadió el anticuerpo secundario IgG-HRP caprino anti-ratón 1:5000 y se incubó a temperatura ambiente en agitación suave por 1 h. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min con PBST 0.05%. Se agregó 1mL de sustrato para peroxidada, se dejó incubando hasta la aparición de la señal, y la reacción se detuvo con H₂O dd.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 Diseño de los oligonucleótidos.

La secuencia del gen M del virus del Dengue serotipo 2 contenida en el plásmido pDEN2, que contiene el genoma completo del virus del Dengue serotipo 2, se obtuvo de la base de datos VBRC a través del número de acceso, VP0048827, proporcionado por el National Institute of Health (Fig. 9).



Viral Bioinformatics Resource Center

| | | |
|-----------------------------|--|---------------------------------|
| GENE | VBRC accession: VP0048827 | name: DENV-2-TONGA74_p2-M |
| | (3 older abbreviations) | |
| Protein Family (VOC) | VOC ID: VBRC VC939 | name: Membrane glycoprotein M |
| | abbr: M | function: Membrane glycoprotein |
| | alternate abbr: 005 | |
| Molecule | type: mature_protein | length: 225 bp, 75 aa |
| | molecular weight: 8,379 | pl: 8.39 |
| Annotation | added: 12/3/2004 | source: genbank |
| Location | (712..936) in: Dengue virus type 2 strain Tonga_74 vector p2 (GenBank: AY744148) | |
| VBRC Taxonomy | Flaviviridae > Flavivirus > Dengue virus > 2 | |

Protein Analysis
Blast Analysis
Sequence
Immune Epitopes
Curation
Notes

Protein Sequence

From:
To:

1
SVALVPHVGM GLETRTETWM SSEGAWKHAQ RIETWILRHP GFTIMAAILA YTIGTTHFQR VLIFILLTAI AFSMT
75

Nucleotide Sequence

From:
To:

| | | |
|-----|--|-----|
| 1 | TCAGTGGCGC TTGTTCCACA CGTGGGAATG GGATTGGAGA CACGAACTGA AACATGGATG TCATCAGAAG GGGCCTGGA | 80 |
| 81 | ACATGCCAG AGAATTGAAA CTTGGATTCT GAGACATCCA GGCTTTACCA TAATGGCCGC AATCCTGGCA TACACCATAG | 160 |
| 161 | GGACGACGCA TTTCCAAAAGA GTCTGATAT TCATCTACT GACAGCCATC GCTCCTCAA TGACA | 225 |

Figura 9.- Secuencia del gen M del virus del Dengue serotipo 2

En base a esta secuencia obtenida, se realizó el diseño de los oligonucleótidos flanqueando la secuencia que codifica para la proteína M, los cuales poseen adaptadores para las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI* (Tabla 4), y se realizó un PCR *in silico* en el programa Primer 3 Output, obteniendo la amplificación esperada de 247 pb.

Tabla 4.- Secuencia de oligonucleótidos específicos para DEN2M.

| Oligonucleótidos | Longitud (pb) | Tm calculada (°C) | Secuencia |
|------------------|---------------|-------------------|--|
| denM2 5' Forward | 25 | 68.0 | tcc gga tcc gat gtc agt ggc gct t <i>Sitio BamHI</i> |
| denM2 3' Reverse | 24 | 65.9 | gag ctc gag tgt cat tga agg agc <i>Sitio XhoI</i> |

6.2 Obtención del gen M del virus de Dengue serotipo 2.

El plásmido pDEN2 donado por el National Institute of Health (NIH), además de contener el genoma del virus del Dengue serotipo 2, posee una región codificante para resistencia a Tetraciclina. Se recibieron 10 µg de plásmido liofilizado, el cual se reconstituyó en H₂O MQ a una concentración final de 100ng y se verificó la integridad del mismo por medio de una electroforesis. Con el fin de preservar el plásmido en bacterias, se realizó una transformación en *Escherichia coli* DH5α, y se sembró en agar LB con Tetraciclina (30 µg/mL). A las colonias se les realizó una extracción de plásmidos mediante un Miniprep (Fig. 10). Las colonias positivas se almacenaron en glicerol al 25% a -70°C, y los plásmidos a -20°C

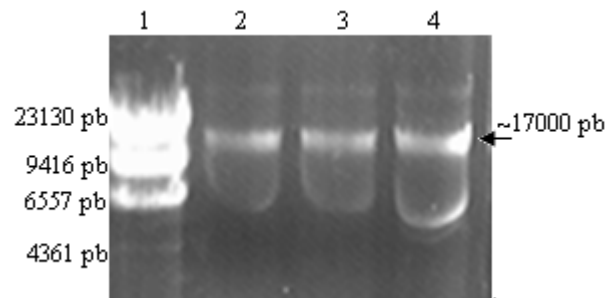


Figura 10.- Electroforesis del plásmido p2DEN2 en gel de agarosa al 0.8%. Los carriles corresponden a: 1) Marcador Lambda DNA Hind III (Promega), 2-4) Plásmidos p2DEN2 extraídos por Miniprep.

6.3 Construcción del plásmido pGEMT-DEN2M.

Se determinó la temperatura óptima de fusión de los oligonucleótidos mediante un PCR en gradiente, obteniendo como resultado una Tm de 57°C, ya que se observó la amplificación del fragmento esperado (247pb) con una mayor intensidad y limpieza en

la banda (Fig. 11a). Posteriormente se realizó un PCR convencional y se procedió con una electroforesis en gel de agarosa 1% del producto obtenido (Fig. 11b).

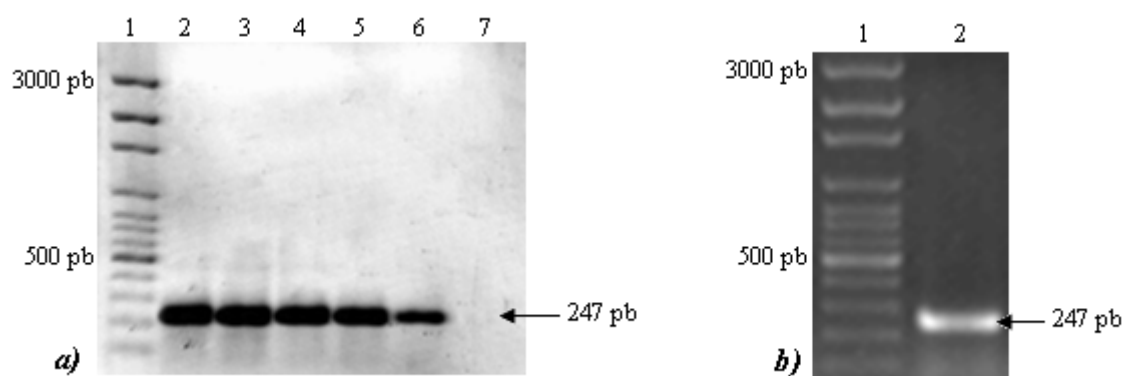


Figura 11.- Electroforesis del PCR del DEN2M en gel de agarosa al 1%. a) Electroforesis del PCR en gradiente. Los carriles corresponden a: 1) Marcador de peso molecular 100-3000pb (Axygen), 2) 50°C, 3) 53°C, 4) 57°C, 5) 60°C, 6) 62°C, y 7) Control negativo de la reacción. **b)** Electroforesis del PCR convencional con Tm de 57°C. Los carriles corresponden a: 1) Marcador de peso molecular 100-3000pb (Axygen), 2) PCR del DEN2M.

La transformación y selección de colonias de *E.coli* DH5 α con el producto de PCR ligado al plásmido pGEMT-Easy Vector se realizó utilizando el sistema de “blue/white screening” del mismo vector, donde la presencia de la coloración azul en la colonia indica la ausencia del inserto.

Las colonias seleccionadas fueron cultivadas, se les realizó la extracción del plásmido, y se confirmó la presencia del inserto por PCR (Fig.12a), y las muestras positivas se sometieron a digestión con *EcoRI* para liberar el inserto del plásmido y confirmar la presencia del gen M clonado (Fig. 12b).

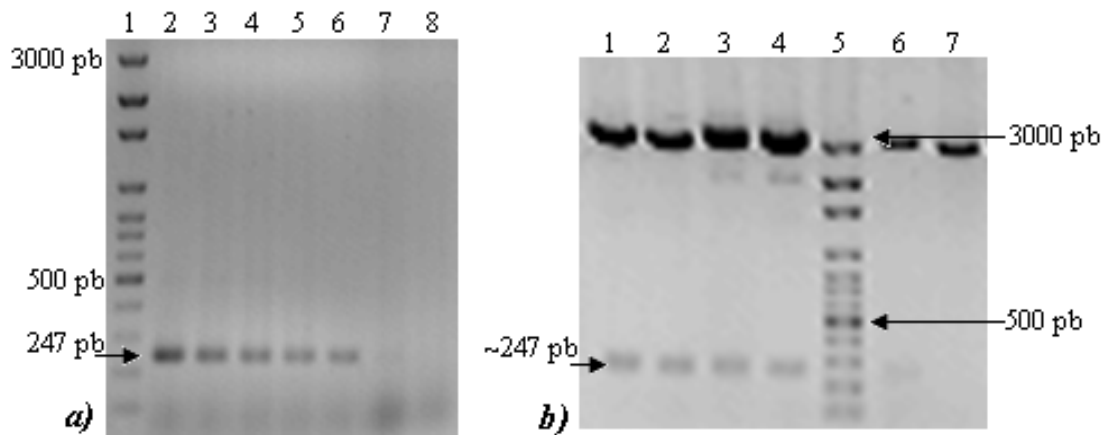


Figura 12.- Análisis de clonas recombinantes pGEMT-DEN2M por PCR y digestión con enzimas de restricción. *a)* Electroforesis del PCR de los plásmidos pGEMT-DEN2M en gel de agarosa al 1%. Los carriles corresponden a: 1) Marcador de peso molecular 100pb-3000pb (Axygen), 2-6) Plásmidos muestra pGEMT-DEN2M, 7) pGEMT Easy Vector, y 8) Control negativo de la reacción. *b)* Electroforesis de digestiones de pGEMT-DEN2M con EcoRI en gel de agarosa al 1%. Los carriles corresponden a: 1-4) Plásmidos muestra pGEMT-DEN2M, 5) Marcador de peso molecular 100-3000pb (Axygen), 6) Plásmido muestra pGEMT-DEN2M, y 7) pGEMT Easy Vector como control negativo.

6.4 Construcción del plásmido pET22b-DEN2M.

Con la finalidad de obtener una mayor cantidad de inserto, se realizó un PCR del plásmido pGEMT-DEN2M utilizando los oligonucleótidos M13 para amplificar la zona de clonación que contiene al gen M. El producto de PCR-M13 y el plásmido pET22b(+) se sometieron a digestión con las enzimas de restricción BamHI y XhoI, y se realizó una electroforesis del producto en gel de agarosa 1%. Se observó que el producto de PCR con los oligonucleótidos M13 daban por resultado una amplificación de ~450 pb; y su digestión con las enzimas mencionadas resultaron en 3 fragmentos, donde el fragmento de ~450 pb consiste en producto no digerido, el de ~350 pb consiste en el producto digerido por solo una de las enzimas, y el de 247 pb corresponde al producto con digestión completa con ambas enzimas (Fig. 13a). En la digestión del plásmido pET22b(+) se observó la linearización de éste en comparación con el control negativo que muestra las formas del plásmido sin digerir (Fig. 13b).

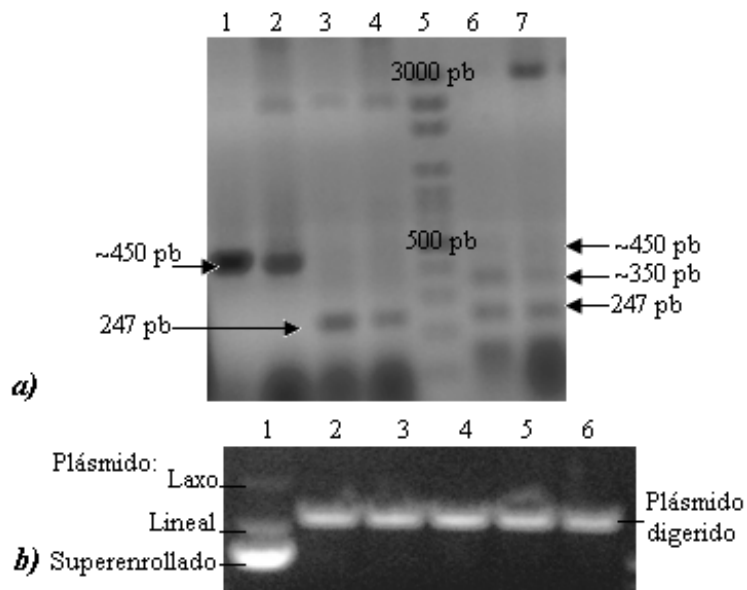


Figura 13.- Obtención del gen DEN2M y del plásmido pET22b(+) digeridos con **BamHI/XhoI**. *a)* Electroforesis de PCR con M13 y su digestión con las enzimas de restricción BamHI/XhoI en gel de agarosa al 1%. Los carriles corresponden a: 1-2) PCR de pGEMT-DEN2M con oligonucleótidos M13, 3-4) PCR de pGEMT-DEN2M, 5) Marcador de peso molecular 100-3000pb (Axygen), 6-7) Digestión de PCR-M13 con BamHI/XhoI. *b)* Electroforesis de la digestión del plásmido pET22b(+) con las enzimas de restricción BamHI/XhoI en gel de agarosa 0.8%. Los carriles corresponden a: 1) Plásmido pET22b(+) sin digerir, 2-6) Plásmido pET22b(+) digerido con BamHI/XhoI.

Los fragmentos anteriormente obtenidos fueron extraídos del gel de agarosa por medio del kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), y al finalizar se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% para constatar la presencia y pureza de los fragmentos (Fig. 14).

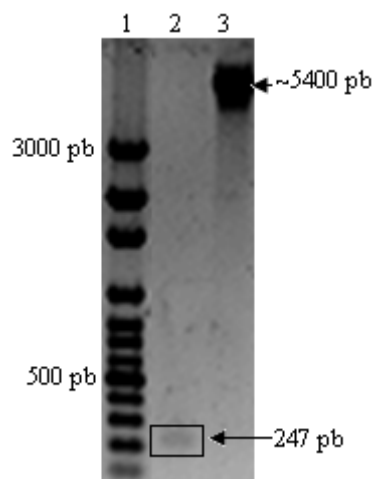


Figura 14.- Electroforesis en gel de agarosa 1% de fragmentos purificados del gen DEN2M y del plásmido pET22b(+). Los carriles corresponden a: 1) Marcador de peso molecular 100-3000pb (Axygen), 2) Fragmento gen DEN2M, y 3) Fragmento pET22b(+).

Los fragmentos purificados se subclonaron mediante una reacción de ligación (relación 1:5 de vector-inserto), el producto se utilizó para transformar *Esherichia coli* DH5alpha, las colonias seleccionadas se cultivaron, se les realizó la extracción de plásmidos, y la presencia del inserto se detectó por PCR. Se efectuó la caracterización del plásmido para poder confirmar la presencia y orientación correcta del inserto subclonado, para esto se realizó la digestión del pET22b-DEN2M con *XbaI/BamHI*, en la cual no se obtuvo un fragmento visible, mientras que en la digestión con *XbaI/XhoI* se apreció una banda de ~247 pb, confirmando así la orientación correcta del inserto (Fig. 15a,b).

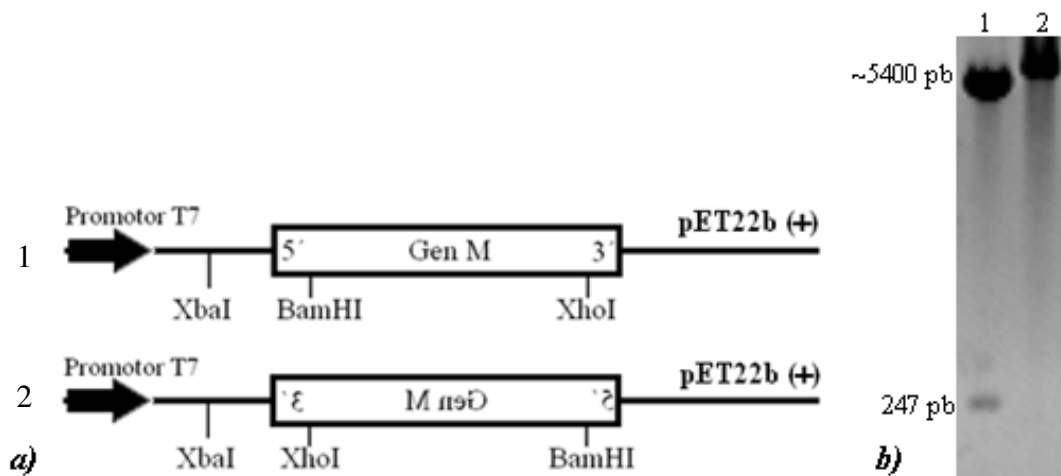


Figura 15.- Caracterización de plásmido pET22b-DEN2M con enzimas de restricción. *a)* Diagrama para caracterización de la orientación del inserto en el plásmido. La imagen 1) corresponde a la orientación correcta del inserto, mientras que la imagen 2) corresponde a la inversión del inserto. *b)* Electroforesis de caracterización de pET22b-DEN2M con *XbaI/BamHI* y *XbaI/XhoI* en gel de agarosa 1.2%. Los carriles corresponden a: 1) Digestión con *XbaI/XhoI*, y 2) Digestión con *XbaI/BamHI*.

Los plásmidos pET22b-DEN2M secuenciados por el IBT de la UNAM fueron analizados con ayuda de los programas BLAST del NCBI y CLC Main Workbench 5, donde se obtuvo que el gen clonado corresponde al gen M del virus del Dengue serotipo 2, y que además no presenta cambios en su secuencia con respecto a la reportada (DEN-2-Tonga74) por el NIH (Fig. 16).

| | | | | | | |
|--------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| | | | 20 | | 40 | |
| DEN-2-Tonga74 | TCAGTGGCGC | TTGTTCCACA | CGTGGGAATG | GGATTGGAGA | CACGAACTGA | 50 |
| Clona recombinante | TCAGTGGCGC | TTGTTCCACA | CGTGGGAATG | GGATTGGAGA | CACGAACTGA | 50 |
| Consensus | TCAGTGGCGC | TTGTTCCACA | CGTGGGAATG | GGATTGGAGA | CACGAACTGA | |
| | | 80 | | 80 | | 100 |
| DEN-2-Tonga74 | AACATGGATG | TCATCAGAAG | GGGCCTGGAA | ACATGCCAG | AGAATTGAAA | 100 |
| Clona recombinante | AACATGGATG | TCATCAGAAG | GGGCCTGGAA | ACATGCCAG | AGAATTGAAA | 100 |
| Consensus | AACATGGATG | TCATCAGAAG | GGGCCTGGAA | ACATGCCAG | AGAATTGAAA | |
| | | 120 | | 140 | | |
| DEN-2-Tonga74 | CTTGGATTCT | GAGACATCCA | GGCTTTACCA | TAATGGCCGC | AATCCTGGCA | 150 |
| Clona recombinante | CTTGGATTCT | GAGACATCCA | GGCTTTACCA | TAATGGCCGC | AATCCTGGCA | 150 |
| Consensus | CTTGGATTCT | GAGACATCCA | GGCTTTACCA | TAATGGCCGC | AATCCTGGCA | |
| | | 160 | | 180 | | 200 |
| DEN-2-Tonga74 | TACACCATAG | GGACGACGCA | TTTCCAAAGA | GTCCTGATAT | TCATCCTACT | 200 |
| Clona recombinante | TACACCATAG | GGACGACGCA | TTTCCAAAGA | GTCCTGATAT | TCATCCTACT | 200 |
| Consensus | TACACCATAG | GGACGACGCA | TTTCCAAAGA | GTCCTGATAT | TCATCCTACT | |
| | | 220 | | | | |
| DEN-2-Tonga74 | GACAGCCATC | GCTCCTTCAA | TGACA | | | 225 |
| Clona recombinante | GACAGCCATC | GCTCCTTCAA | TGACA | | | 225 |
| Consensus | GACAGCCATC | GCTCCTTCAA | TGACA | | | |

Figura 16.- Análisis del alineamiento de la secuencia del gen M recombinante.

6.5 Detección de la proteína M recombinante por SDS-PAGE y Western Blot.

El plásmido de expresión pET22-DEN2M se utilizó para transformar *Esherichia coli* BL21 DE3. Las colonias resultantes se analizaron por PCR para corroborar la presencia del pET22-DEN2M, y las positivas se cultivaron en caldo LB con Ampicilina (50 µg/mL) a 37 °C con 300 rpm hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.6, momento en el que se añadió IPTG al 1mM para iniciar con la inducción de la expresión de la proteína recombinante.

Los cultivos se centrifugaron y se resuspendieron con PBS-EDTA hasta una D.O._{600 nm} de 10.0. Las bacterias fueron lisadas por sonicación, se recolectó el sobrenadante y se desnaturizó por calentamiento a ebullición por 5 min en presencia de Buffer de Muestra 1x. Se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes. Se detectó que en la clona recombinante había una sobreexpresión de 2 bandas en el rango de 11-15 kDa, mientras que en el control negativo se observó una baja presencia de éstas (Fig. 17a,b). De acuerdo al programa Protparam, la proteína M recombinante tiene un peso de ~13 kDa.

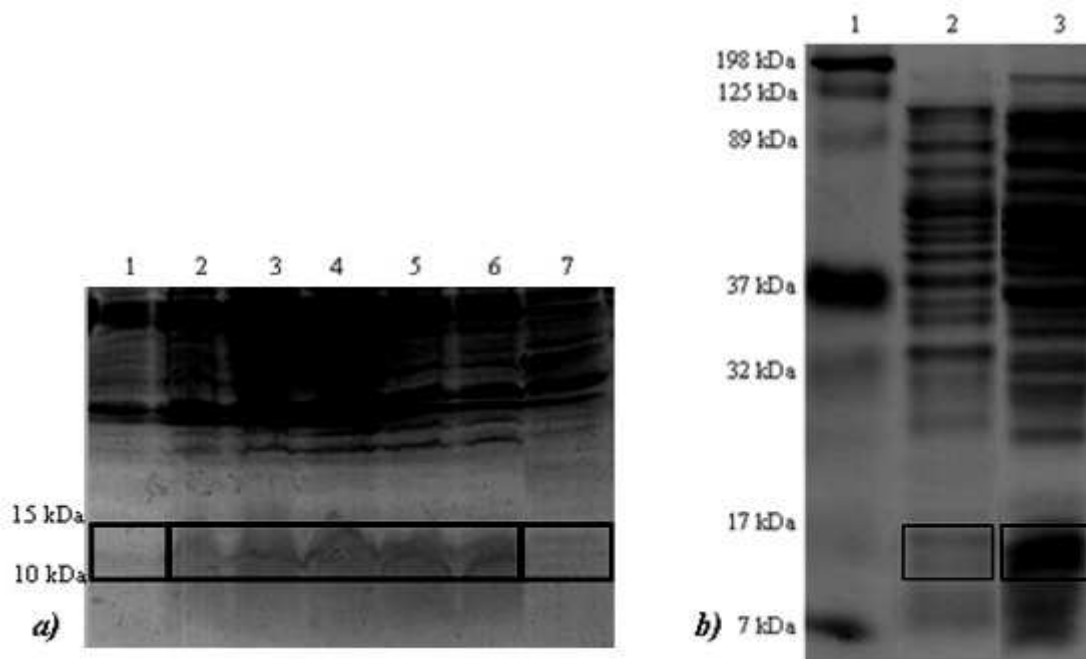


Figura 17.- Electroforesis de proteínas totales de *Escherichia coli* BL21DE3 pET22b-DEN2M en gel de poliacrilamida al 15%. a) SDS-PAGE de expresión de proteína recombinante a distintos tiempos. Los carriles corresponden a: 1 y 7) Control negativo 2) Inicio de inducción, 3) 1 hora, 4) 2 horas, 5) 3 horas, y 6) 4 horas b) SDS-PAGE de expresión de proteína recombinante tras 4 horas de inducción. Los carriles corresponden a: 1) Marcador de peso molecular Kaleidoscope prestained standards (Bio-Rad) 2) Control negativo, y 3) Clona recombinante.

Posteriormente se procedió a la detección de la proteína recombinante por medio de la técnica de Western Blot, la cual consistió en el reconocimiento de la cola de histidinas añadida por el sistema pET22b en el extremo C-terminal; el anticuerpo utilizado es el Penta-His (Qiagen), el cual reconoce la secuencia de 5 histidinas continuas. Con este anticuerpo detectaron bandas de distintos pesos moleculares: 11, 28, 31, 34, 54, 70 y 85 kDa; pero en lo que concierne a la proteína recombinante de interés, observamos la presencia de una banda bajo la marca de los 17 kDa, la cual es más intensa en comparación con el control negativo (Fig. 18a).

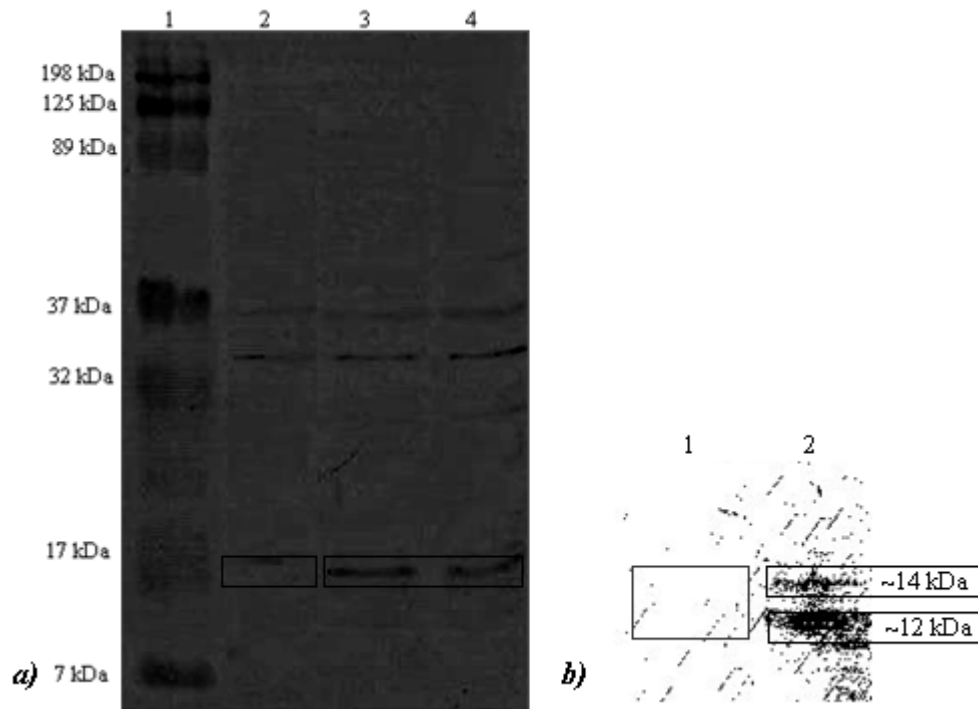


Figura 18.- Western Blot para detección de la proteína M recombinante por reconocimiento del His-tag. a) Western Blot con anticuerpo primario Mouse Penta-His (Qiagen). Los carriles corresponden a: 1) Marcador de peso molecular Kaleidoscope prestained standars (Bio-Rad), 2) Clona control negativo, 3-4) Clonas recombinantes pET22b-DEN2M **b)** Western Blot con anticuerpo primario Mouse Anti-His (Promega). Los carriles corresponden a: 1) Control negativo, y 2) Clona recombinante.

Se repitió el procedimiento utilizando un anticuerpo primario Anti-His (Promega), el cual reconoce a 6 histidinas continuas en C terminal. En este Western Blot se detectó la presencia de dos únicas bandas de un peso molecular de ~12 y ~14 kDa, y su ausencia de éstas en el control negativo (Fig. 18b). De estas dos bandas, se observa que la banda de ~12 kDa se presenta en mayor proporción con respecto a la de ~14 kDa (Fig. 18b); la obtención de estas dos bandas posiblemente se deba a la ausencia y presencia, respectivamente, del péptido líder pelB (~2 kDa), el cual es incorporado en la proteína recombinante por parte del plásmido de expresión pET22b(+), para el traslado de la proteína al periplasma de la bacteria.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

En nuestro país, el número de los casos de FD y FHD ha aumentado de forma considerable, donde los serotipos que han presentado una mayor prevalencia son el serotipo 1 y 2, de los cuales, el 2 ha sido asociado a los cuadros clínicos más severos. La proteína M del virus del Dengue es una proteína transmembranal implicada en la interacción con los receptores celulares durante la entrada de la partícula viral a la célula. Se ha observado que esta proteína es capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes en el organismo, hecho por cual se ha planteado su aplicación en los diseños de agentes inmunizantes y de pruebas utilizadas para el diagnóstico de infección por este virus.

En este estudio se planteó el clonar y expresar la proteína M recombinante del virus del Dengue serotipo 2 en un sistema basado en *Escherichia coli* y poder disponer de ésta para futuras evaluaciones inmunológicas.

A los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen M se les incorporaron secuencias específicas para las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI* para facilitar la subclonación, por lo tanto, fue necesario determinar la nueva especificidad de éstos mediante un análisis BLAST, el cual dio como resultados que la secuencia de estos oligonucleótidos presenta una especificidad (<70%) para algunos genes de otros organismos (*Drosophila*, *Mus musculus*, *Candida albicans*), pero que ninguno de estos produce un fragmento de ~200 pb, descartándose así posibles interferencias o falsos negativos.

Durante la construcción del plásmido de expresión se presentaron dificultades en la subclonación debido a la pérdida del inserto durante la purificación del mismo, por lo que se decidió a utilizar el protocolo de construcción de recombinantes por PCR descrito por Ausubel y col.(2003), el cual consiste en la amplificación del gen de interés junto con la zona de clonación (sitios de restricción) del plásmido que lo contiene, y de esta manera obtener un mayor número de copias del inserto, atenuando así la pérdida presentada durante la purificación facilitando la construcción del plásmido de expresión y sin producir mutaciones en su secuencia.

En las electroforesis en los geles de acrilamida se observó que cuando la clona recombinante era inducida con IPTG se presentaba un aumento en la densidad de las bandas situadas dentro del rango de 11-15 kDa (Fig.17), hecho que concuerda con lo obtenido por Rath y col. (2009). Además fue posible observar de manera cualitativa el aumento de la densidad de la banda tras diferentes horas de inducción (Fig. 17a), donde a partir de las 3 hrs se observaba una mayor densidad de la banda en el gel. (Zomorodipour A, *et al.*,2003).

La expresión de la proteína recombinante se detectó mediante Western Blot, para lo cual se utilizó un anticuerpo monoclonal dirigido a 5 histidinas continuas, el cual reconoció no solo a la proteína recombinante sino que también a proteínas constitutivas de *E. coli* (Fig. 18a) que poseen 5 histidinas continuas dentro de su estructura, estos resultados son similares a los obtenidos por Wahle y col. (1999), los cuales además fueron corroborados mediante un análisis en el programa BLAST del NCBI; mientras que en el Western Blot con el anticuerpo monoclonal que reconoce 6 histidinas en C-terminal se detectó solamente la proteína recombinante (Fig.18b).

Un punto crítico en la producción de proteínas recombinantes es la formación de cuerpos de inclusión ocasionada por la síntesis elevada de las proteínas durante la inducción, éstos consisten en agregados densos insolubles de las proteínas recombinantes sintetizadas que se depositan en el citoplasma y no son transportados para su procesamiento; un factor que tiene impacto sobre la formación de éstos es el grado de solubilidad de dichas proteínas, donde las proteínas con mas dominios lipofílicos presentan una mayor tendencia a formar cuerpos de inclusión (Villaverde y Carrio, 2003; Ventura y Villaverde, 2006; González-Montalbán, *et al.*, 2007). En este trabajo se observó que posiblemente, debido a la naturaleza transmembranal de la proteína M, haya ocurrido dicho fenómeno en bajas proporciones, esto en base a la señal tenue de ~14 kDa obtenida en el Western Blot (Fig. 18b), la cual posiblemente consista en una pequeña fracción de la proteína recombinante que aún presenta el péptido líder pelB de 2 kDa (añadido por el sistema pET22b), indicando que esta fracción quedo atrapada en cuerpos de inclusión y no pudo ser transportada al periplasma, mientras que la señal de ~12 kDa (Fig. 18b) corresponde a la proteína M recombinante que fue transportada y procesada de manera completa, estos resultados

son similares a los obtenidos por Zomorodipour A y col. (2003) en el estudio de diversos vectores de expresión a zona del periplasma.

La producción de proteínas recombinantes es un campo que representa un área de oportunidades para el desarrollo de biológicos que pueden ser incorporados como componentes para herramientas de detección en diagnóstico clínico (Hogrefe, *et al.*, 2004; Shu, *et al.*, 2004); en la obtención de proteínas, por mencionar enzimas y hormonas, que puedan sustituir la inactividad o carencia de dichas proteínas mediante su administración exógena (Walsh, 2006), y por último, la capacidad de producir proteínas (“wild type” y mutadas) de entidades biológicas con propiedades antigénicas y ser utilizadas para inducir niveles óptimos de inmunidad (Sierra, *et al.*, 1999; Chen, *et al.*, 2007; Whitehead, *et al.*, 2007) en el humano contra una posible infección por el microorganismo.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

Escherichia coli BL21 DE3 fue capaz de expresar la proteína M recombinante del virus del Dengue serotipo 2 clonada bajo el promotor de T7 lac.

El péptido señal PelB funcionó eficientemente para el envío de la proteína M recombinante al espacio periplasmático de *Escherichia coli*.

CAPÍTULO 9

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar A, Amin N, Pérez EA. 2003. Vacunas contra el virus dengue: Desarrollo histórico. *VacciMonitor*, 12(2):19-25.

Andersen DC, Krummen L. 2002. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(2):117–123

Assuncao-Miranda I, Amaral FA, Bozza FA, Fagundes CT, Sousa LP, Souza DG, Pacheco P, Barbosa-Lima G, Gomes RN, Bozza PT, Da Poian AT, Teixeira MM, Bozza MT. 2009. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 24(1):218-28.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 2003. Constructing Recombinant DNA Molecules by the Polymerase Chain Reaction. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Elion EA (eds). John Wiley & Sons Inc, pp. 439-448

Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. 1998. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *The Journal of Immunology*. 161(11): 6338–6346.

Barrett A. 2008. Flavivirus DNA vaccine with a kick. *Nature Biotechnology* 26(5):525-526

Blaney JE Jr, Matro JM, Murphy BR, Whitehead SS. 2005. Recombinant, liveattenuated tetravalent dengue virus vaccine formulations induce a balanced, broad and protective neutralizing antibody response against each of the four serotypes in rhesus monkeys. *Journal of Virology*. 79(9):5516–5528

Bray M, Lai CJ. 1991. Dengue virus premembrane and membrane proteins elicit a protective immune response. *Virology*, 185:505-508.

Cabrera-Hernandez A, Smith D. 2005. Mammalian Dengue Virus Receptors. *Dengue Bulletin*, 29:119-128.

Calandra T, Echtenacher B, Roy D, Pugin J, Metz C, Hultner L, Heumann D, Mannel D, Bucala R, Glauser M. P. 2000. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nature Medicine*, 6:164–170.

Cardier JE, Rivas B, Romano E, Rothman AL, Perez-Perez C, Ochoa M, Caceres AM, Cardier M, Guevara N, Giovannetti R. 2006. Evidence of vascular damage in dengue disease: demonstration of high levels of soluble cell adhesion molecules and circulating endothelial cells. *Endothelium*, 13(5):335–340.

Catteau A, Kalinina O, Wagner MC, Deubel V, Courageot MP, Despre P. 2003. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *Journal of General Virology* 84: 2781–2793.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. 1990. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annual Review of Microbiology*. 44:649–688.

Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, Lin YS, Wang ST, Shyu HW, Yeh TM. 2006. Correlation of serum levels of Macrophage Migration Inhibitory Factor with disease severity and clinical outcome in Dengue patients. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74(1):142–147

Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM. 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Medicine*, 3(8):866–871

Chen S, Yu M, Jiang T, Deng Y, Qin C, Qin E. 2007. Induction of Tetravalent Protective Immunity Against Four Dengue Serotypes by the Tandem Domain III of the Envelope Protein. *DNA and Cell Biology*, 26(6):361-367.

Chen YC, Huang HN, Lin CT, Chen YF, King CC, Wu HC. 2007. Generation and Characterization of Monoclonal Antibodies against Dengue Virus Type 1 for Epitope Mapping and Serological Detection by Epitope-Based Peptide Antigens. *Clinical And Vaccine Immunology*. 14(4):404-411

Choi JH, Lee SY. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(5):625–635

Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. 2010. Panorama del Dengue. Secretaría de Salud. (Online). Disponible en: <http://www.cenave.gob.mx/dengue/>

Del Ángel RM. 2006. Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogenicidad viral. *Cinvestav*, 38-43.

Del Pilar Crespo M. 2000. El diagnóstico viral por el laboratorio. *Colombia Médica*, 31: 135-150.

Dimitrov, D. S. 2004. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2):109–122.

Dubel S. 2007. Recombinant therapeutic antibodies. *Applied Microbiology Biotechnology*, 74:723–729.

Dumon-Seignovert L, Cariot G, Vuillard L. 2004. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expression and Purification*, 37(1):203-206.

Gary Walsh. 2006. Biopharmaceutical benchmarks. *Nature Biotechnology* 24, 769 - 776
González-Montalbán N, García-Fruitós E, Villaverde A. 2007. Recombinant protein solubility-does more mean better?. *Nature Biotechnology*, 25(7):718-720

Gubler DJ. 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3): 480-496.

Gubler DJ, Clark GG. 1994. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. *The American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 50(6):50-60.

Gubler DJ, Trent DW. 1994. Emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infectious Agents and Disease*, 2(6):383-93.

Gubler DJ, Clark GG. 1995. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem. *Emerging Infectious Diseases*. 1(2):55-57.

Guzman MG, Kouri G. 2008. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations 1987–2007. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(6):522–523

Guzmán MG, Vázquez S, Kouri G. 2009. Dengue: where are we today?. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 16(3):5-12.

Halstead SB. 1970. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. I. Experience with classification of dengue viruses. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 42(5):261–275.

Halstead SB, Shotwell H, Casals J. 1973. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. Clinical laboratory responses to primary infection. *Journal of Infectious Diseases*, 128:7–14.

Halstead SB, Shotwell H, Casals J. 1973. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. Clinical laboratory responses to heterologous infection. *Journal of Infectious Diseases*, 128:15–22

Harrington LC, Scott TW, Lerdthusnee K, Coleman RC, Costero A, Clark GG. 2005. Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 72(2):209-220.

Hashemzadeh-Bonehi L, Mehraein-Ghomi F, Mitsopoulos C, Jacob JP, Hennessey ES, Broome-Smith JK. 1998. Importance of using lac rather than ara promoter vectors for modulating the levels of toxic gene products in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 30:673–678

Hilgard P, Stockert R. 2000. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 32(5):1069–1077.

Hoffmann F, Rinas U. 2004. Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* 89:73–92

Hogrefe WR, Moore R, Lape-Nixon M, Wagner M, Prince HE. 2004. Performance of Immunoglobulin G (IgG) and IgM Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using a West Nile Virus Recombinant Antigen (preM/E) for Detection of West Nile Virus- and Other Flavivirus-Specific Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10):4641-4648.

Hombach J. 2007. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 21(4):254-260

Huang KJ, Li SY, Chen SC, Liu HS, Lin YS, Yeh TM, Liu CC, Lei HY. 2000. Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *Journal of General Virology*, 81(9): 2177–2182.

Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, Viramitrachai W, Ratanachu-ek S, Kiatpolpoj S, Innis BL, Rothman AL, Nisalak A, Ennis FA. 1997. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *Journal of Infectious Diseases*, 176(2):313–321.

Kliks SC, Nimmannitya S, Nisalak A, Burke DS. 1988. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 38:411–419

Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. 1989. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40(4):444-451.

Kochel T, Wu S-J, Raviprakash K, Hobart P, Hoffman S, Porter K. 1997. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*, 15:547-552.

Kuhn R, Zhang W, Rossmann M, Pletnev S, Corver J, Lenches E. 2002. Structure of Dengue Virus Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell* 108(5):717-725.

Kurane I, Ennis F. 1994. Cytotoxic T lymphocytes in dengue virus infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 189:93-108.

Lee SY. 1996. High cell density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*. 14(3):98-105

Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. 2001. Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *Journal of Biomedical Science*. 8:377-388

Limonta D, Capó V, Torres G, Guzmán MG, López LX, Pérez AB, González D, Álvarez M, Rosario D, Rodríguez R, Díaz J, Pelegrino JL. 2010. New evidence of the contribution of apoptosis to dengue hemorrhagic fever pathophysiology. *Biotechnología*, 27(1):63-65.

López Antuñano FJ, Mota J. 2000. Desarrollo de agentes inmunizantes contra el dengue. *Revista Panamericana de Salud Pública* 7(5): 285-292.

Makrides SC. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Reviews*, 60(3):512-538.

Marty AM, Jahrling PB, Geisbert TW. 2006. Viral Hemorrhagic Fevers. *Clinics in Laboratory Medicine*. 26:345–386.

Mathew A, Rothman AL. 2008. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunological Reviews*, 225: 300–313

Missiakas D, Raina S. 1997. Protein folding in the bacterial periplasm. *The Journal of Bacteriology*, 179(8):2465-2471

Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu X, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, Sawasdivorn S, Duangchinda T, Dong T, Rowland-Jones S, Yenichitsomanus P, McMichael A, Malasit P, Screaton G. 2003. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature Medicine*, 9(7):921-927.

Moingeon P. 2006. Sublingual immunotherapy: from biological extracts to recombinant allergens. *Allergy* 61(Suppl. 81):15–19

Moreno MB, Sánchez FJ, Muñoz ML. 2002. Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2. *Journal of General Virology*. 83(5):1123–1130.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A Structural Perspective of the Flavivirus Life Cycle. *Nature Microbiology*, 3:13-22.

Myint S, Endy TP, Mongkolsirichaikul D, Manomuth C, Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nisalak A, Green S, Rothman AL, Ennis FA, Libraty DH. 2006. Cellular Immune Activation in Children with Acute Dengue Virus Infections Is Modulated by Apoptosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 194:600 – 607

Navarro E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Despres P. 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Reports*. 4(7):723–728

- Ocazonez RE, Gómez SY, Cortés FM. 2007. Serotipo, Patrón de Infección y Dengue Hemorrágico en Área Endémica Colombiana. *Revista Salud Pública*. 9(2):262-274.
- Organización Mundial de la Salud. 2010. Panorama Dengue y Dengue Hemorrágico (Online). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html>
- Ohtsuka M, Kimura M, Tanaka M, Inoko H. 2009. Recombinant DNA Technologies for Construction of Precisely Designed Transgene Constructs. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 244-251
- Op De Beeck A, Molenkamp R, Caron M, Ben Younes A, Bredenbeek P, Dubuisson J. Role of the transmembrane domains of prM and E proteins in the formation of yellow fever virus envelope. *Journal of Virology*, 77(2):813–820.
- Peng T, Zhang J, An J. 2004. The Animal Models for Dengue Virus Infection. *Dengue Bulletin* 28:168-17.
- Perry Chou C. 2007. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76:521–532.
- Pryor KD, Leiting B. 1997. High level expression of soluble proteins in *Escherichia coli* using a His6-tag and the maltose-binding protein double-affinity fusion system. *Protein Expression and Purification*, 10(3):309-319.
- Putnak R, Barvir DA, Burrous JM, Dubois DR, D'Andrea VM, Hoke CH. 1996. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *The Journal of Infectious Diseases*, 174(6):1176-84.
- Putnak J, Coller B, Voss G, Vaughn D, Clements D, Peters I, Bignami G, Hough H, Chen R, Barvir D, Seriwatana J, Cayphas S, Garcon N, Gheysen D, Kanesa-thasan N, McDonnell M, Humphreys T, Eckels K, Prieels J, Innisa B. 2005. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine* 23(35):4442–4452.

Ramos JDA, Valmonte GR, De Guia RM. 2007. Recombinant Proteins and Peptides as Diagnostic and Therapeutic Reagents for Arthropod Allergies. *Protein & Peptide Letters*, 14: 992-1002

Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. 2009. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6): 1760–1765.

Raviprakash K, Porter KR, Kochel TJ, Ewing D, Simmons M, Phillips I, et al. 2000. Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in rhesus macaques. *Journal of General Virology* 81, 1659–1667.

Schmidt M, Hoffman DR. 2002. Expression systems for production of recombinant allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 128(4):264–270.

Seema, Jain SK. 2005. Molecular Mechanism of Pathogenesis of Dengue Virus : Entry and Fusion with Target Cell. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20(2):92-103.

Shu PY, Huang JH. 2004. Current Advances in Dengue Diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(4): 642–650.

Shu PY, Huang JH. 2004. Current Advances in Dengue Diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(4):642–650

Shu PY, Chen LK, Chang SF, Su CL, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. 2004. Dengue Virus Serotyping Based on Envelope and Membrane and Nonstructural Protein NS1 Serotype-Specific Capture Immunoglobulin M Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6):2489–2494

Sierra B, Pérez A, Vázquez V, Rodríguez R, García G, Guzmán MG. 1999. Evaluación de la respuesta inmune celular inducida en ratones Balb/C por la proteína de envoltura del virus dengue 2. *Revista Cubana De Medicina Tropical*, 51(2):95-8.

Simmons M, Porter KR, Escamilla J, Graham R, Watts DM, Eckels KH. 1998. Evaluation of Recombinant Dengue Viral Envelope B Domain Protein Antigens For The Detection Of Dengue Complex-Specific Antibodies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 58(2):144-151.

Sorensen HP, Mortensen KK. 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 4(1) 190-197.

Srivastava AK, Putnak JR, Warren RL, Hoke CH. 1995. Mice immunized with a dengue type 2 virus E and NS1 fusion protein made in *Escherichia coli* are protected against lethal dengue virus infection. *Vaccine* 13(13):1251-1258.

Sun W, Nisalak A, Gettayacamin M, Eckels KH, Putnak JR, Vaughn DW. 2006. Protection of Rhesus Monkeys against Dengue Virus Challenge after Tetravalent Live Attenuated Dengue Virus Vaccination. *Journal of Infectious Diseases* 193(15):1658-1665.

Terpe K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72:211-222.

Thomas SJ, Strickman D, Vaughn DW. 2003. Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. *Advances in Virus Research*, 61:235–289.

Tsuda Y, Takagi M, Wang S, Wang Z, Tang L. 2001. Movement of *Aedes aegypti* released in a small isolated village on Hainan Island, China. *Journal of Medical Entomology*, 38(1):93-98.

Umareddy I, Pluquet O, Wang QY, Vasudevan SG, Chevet E, Gu F. 2007. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virology Journal*, 4:91-99

Uzcategui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M. 2003. Molecular epidemiology of dengue virus 3 in Venezuela. *Journal of General Virology*, 84:1569-1575.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. 2000. Dengue virus serotype, virus titers, and antibody response patterns correlate with dengue disease severity. *Journal of Infectious Diseases*, 181(1):2-9

Vázquez S, Guzmán MG, Guillen G, China G, Pérez AB, Pupo M, Rodríguez R, Reyes O, Garay HE, Delgado I, García G, Álvarez M. 2002. Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. *Vaccine* 20(13):1823-1830.

Ventura S, Villaverde A. 2006. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends in Biotechnology* 12(4):179-185.

Villaverde A, Carrio MM. 2003. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters*, 25(17):1385-1395.

Wahle S, Rohweder H, Ribbe J, Steinert K. 1999. Purification of 6xHis-tagged proteins from mammalian expression systems using Ni-NTA Magnetic Agarose Beads. *Qiagen News*. 4:1-6

Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. 2007. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature*. 5:518-528.

Wilkinson DL, Harrison RG. 1991. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 9(5):443-448.

Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS. 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature Medicine*, 6(7):816-820.

Wu-Hsieh BA, Yen YT, Chen HC. 2009. Dengue Hemorrhage in a Mouse Model. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1171: E42–E47.

Yabar C, Carrillo C, Nolasco O, García M, Montoya Y. 1999. Diagnóstico Temprano del Virus Dengue 1 usando RT-PCR y Perspectivas para la Caracterización Molecular de Cepas Autóctonas. *Revista Médica Experimental*. 15(1-2).

Yenchitsomanus PT, Sricharoen P, Jaruthasana I, Pattanakitsakul SN, Nitayaphan S, Mongkolsapaya J, Malasit P. 1996. Rapid detection and identification of dengue viruses by polymerase chain reaction (PCR). *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 27(2):228–236.

Zhang C, Mao C. 2008. Bacteria as factories. *Nature Nanotechnology* 3(1):707-709

Zomorodipour A, Borjaliloo S, Yakhchali B, Shojai S. 2003. Comparison of T7- and lac-based systems for the periplasmic expression of human granulocyte macrophage colony stimulating factor in *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 1(2):101-108.

CAPÍTULO 10

ANEXO 1



DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES

NIAID / NIH

Laboratory of Infectious Diseases
Building 33, Room 3W10A
33 North Drive, MSC 3203
Bethesda, MD 20892-3203

Tel: 301-496-7692
Fax: 301-480-4873
email: swhitehead@niaid.nih.gov

8/24/2009

MC José Luis Méndez Vázquez
Universidad Autónoma de Nuevo León
Laboratorio de Inmunología y Virología, Unidad "C" 3° piso
Ciudad Universitaria
Pedro de Alba S/N
San Nicolás de los Garza, Nuevo León
México 66451

(81) 83 29 41 15

Please find enclosed the following cDNA plasmid (p2) encoding the wildtype DEN2 Tonga/74 genome. The vector encodes tetracycline resistance. The GenBank accession number for the annotated plasmid sequence is AY744148.

| <u>Vial</u> | <u>Label</u> | <u>Amount</u> |
|-------------|----------------------------|---------------|
| 1 | p2 #8A 10 µg 7/29/08 | 10 µg (dry) |

Please do not hesitate to contact me if you have any questions.

Best regards,

Stephen Whitehead

ANEXO 2
SOLUCIONES DE TRABAJO

SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

- **Gel de Agarosa 1 %**

| | |
|--------------------------|--------|
| Agarosa pura | 1.0 g |
| Buffer de Corrida TAE 1x | 100 mL |

Calentar hasta disolver agarosa.

- **Buffer de Corrida TAE 50x**

| | |
|-----------------------------------|----------|
| Trizma Base | 242 g |
| EDTA 0.5M pH8.0 | 100 mL |
| Ácido acético glacial | 57.2 mL |
| Aforar con H ₂ O dd a: | 1 000 mL |

- **Buffer de Corrida TAE 1x**

| | |
|---------------------------|--------|
| Buffer de Corrida TAE 50x | 20 mL |
| H ₂ O dd | 980 mL |

- **Buffer de Carga para DNA 6x**

| | |
|---------------------|---------|
| Glicerol 100% | 3.75 mL |
| H ₂ O dd | 6.25 mL |

Añadir una pizca de Xilen Cianlol y Azul de Bromofenol.

- **Bromuro de Etidio (Solución stock)**

| | |
|---------------------|--------|
| Bromuro de Etidio | 1 g |
| H ₂ O dd | 100 mL |

El bromuro de etidio es mutágeno, utilizar en todo momento guantes.

SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

- **Solución I Miniprep**

| | |
|-----------------------------------|--------|
| Tris-HCl 1.0M pH 7.6 | 2.5 mL |
| EDTA 0.5 M pH 8.0 | 2 mL |
| Glucosa 0.5 M | 9 g |
| Aforar con H ₂ O dd a: | 100 mL |

- **Solución II Miniprep**

| | |
|-----------------------------------|--------|
| NaOH 5.0M | 4 mL |
| SDS 10% | 10 mL |
| Aforar con H ₂ O dd a: | 100 mL |

- **Solución III Miniprep**

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Acetato de potasio 5M pH 7.6 | 60 mL |
| Ácido acético glacial | 11.5 mL |
| Aforar con H ₂ O dd a: | 100 mL |

SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

- **Buffer de Lisis**

| | |
|-----------------------------------|--------|
| Tris-HCl 1M pH8.0 | 5 mL |
| Sucrosa | 25 g |
| EDTA 0.5M pH8.0 | 0.2 mL |
| Aforar con H ₂ O dd a: | 100 mL |

- **Acrilamida Mix 30 %**

| | |
|---------------------|--------|
| Acrilamida | 29.2 g |
| Bis acrilamida | 0.8 g |
| H ₂ O dd | 100 mL |

Almacenar a 4°C en envase oscuro. Estable por 3 meses. La acrilamida es neurotóxica, es necesario el uso de cubrebocas, lentes y guantes.

- **PSA 10 %**

| | |
|---------------------|------|
| PSA | 0.1g |
| H ₂ O dd | 1 mL |

Vida media corta en solución, por lo que se recomienda utilizar preparación nueva para maximizar polimerización de acrilamida.

- **Solución de Gel Separador de Poliacrilamida al 15 % (10mL)**

| | |
|---------------------|----------|
| H ₂ O dd | 2.3 mL |
| Acrilamida Mix 30 % | 5.0 mL |
| Tris 1.5M (pH 8.8) | 2.5 mL |
| SDS 10 % | 0.1 mL |
| PSA 10 % | 0.1 mL |
| TEMED | 0.004 mL |

- **Solución de Gel Concentrador de Poliacrilamida (3 mL)**

| | |
|---------------------|----------|
| H ₂ O dd | 2.1 mL |
| Acrilamida Mix 30 % | 0.5 mL |
| Tris 0.5M (pH 6.8) | 0.38 mL |
| SDS 10 % | 0.03 mL |
| PSA 10 % | 0.03 mL |
| TEMED | 0.003 mL |

- **Buffer SDS de Muestra 6x**

| | |
|--------------------------|-------|
| Tris-Fostato 0.5M pH 6.8 | 25 mL |
| Glicerol 100% | 20 mL |
| SDS 10% | 40 mL |
| Azul de bromofenol 5% | 2 mL |
| H ₂ O dd | 13 mL |

Por cada 950 µL de buffer de Muestra 1x añadir 50 µL de β-mercaptoetanol

- **Buffer Tris-Glicina de corrida 10x**

| | |
|---|----------|
| Trizma Base | 30.25 g |
| Glicina | 144.13 g |
| SDS | 10 g |
| Disolver en 900 mL de H ₂ O dd | |
| Ajustar pH a 8.2 - 8.3 con HCl | |
| Aforar con H ₂ O dd a: | 1 000 mL |

- **Azul de Coomassie**

| | |
|-----------------------------------|-------|
| Azul brillante de Coomassie R-250 | 0.25g |
| Metanol | 40 mL |
| Ácido acético | 10 mL |
| H ₂ O dd | 50 mL |

- **Solución Decolorante I**

| | |
|-----------------------------------|----------|
| Metanol | 400 mL |
| Ácido acético | 70 mL |
| Aforar con H ₂ O dd a: | 1 000 mL |

SOLUCIONES PARA WESTERN BLOT

- **Buffer de Transferencia 1x**

| | |
|--------------------------------|--------|
| Tris Base | 3.03 g |
| Glicina | 14.4g |
| SDS | 1.0g |
| H ₂ O dd | 800 ml |
| Ajustar pH a 8.2 - 8.4 con HCl | |
| Metanol | 200 ml |

- **Solución de PBS 10x**

| | |
|---|----------|
| NaCl | 80.0 g |
| KCl | 2.0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2.4 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 14.4g |
| Disolver en 900 mL de H ₂ O dd | |
| Ajustar el pH a 7.2 - 7.4 con HCl | |
| Aforar con H ₂ O dd a: | 1 000 mL |

- **Solución Buffer de Lavado (PBST 1x)**

| | |
|----------|----------|
| PBS 1x | 1 000 mL |
| Tween 20 | 0.5 mL |

- **Solución de bloqueo 5%**

| | |
|------------------|--------|
| Leche Descremada | 5 g |
| PBST 1x | 100 mL |

- **Solución de Anticuerpo**

| | |
|------------|-------------------|
| Anticuerpo | 5 µL para 1:2 000 |
| | 2 µL para 1:5 000 |
| PBST 1x | 10 mL |

- **Solución de Revelado para peroxidasa**

| | |
|-----------------------------------|-------|
| Diaminobencidina | 10 mg |
| H ₂ O ₂ 38% | 20 µL |
| Tris 0.1 M (pH 7.2) | 20 mL |

- **Colorante Rojo de Ponceu**

| | |
|---------------------|--------|
| Rojo de Ponceu | 100 mg |
| Ácido acético | 1 mL |
| H ₂ O dd | 99 mL |

RESUMEN BIOGRÁFICO

José Juan Pérez Trujillo

Candidato para el Grado de
Maestro en Ciencias con Acentuación en Inmunobiología

Tesis: CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE DEL
GEN M DEL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 2

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 28 de septiembre de 1986, hijo de José Juan Pérez Padilla y Rosa Laura Trujillo García.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2007.

Experiencia Profesional: Atención y Asesoría Farmacéutica a pacientes en la Farmacia Universitaria, UANL en 2007. Asistente en Vigilancia Farmacéutica de pacientes, y encargado en preparación de formulaciones magistrales en la Clínica Nova en 2008.