



Laboratorio de Virología Molecular
Centro de Investigaciones Nucleares
Facultad de Ciencias
UdelAR, Uruguay



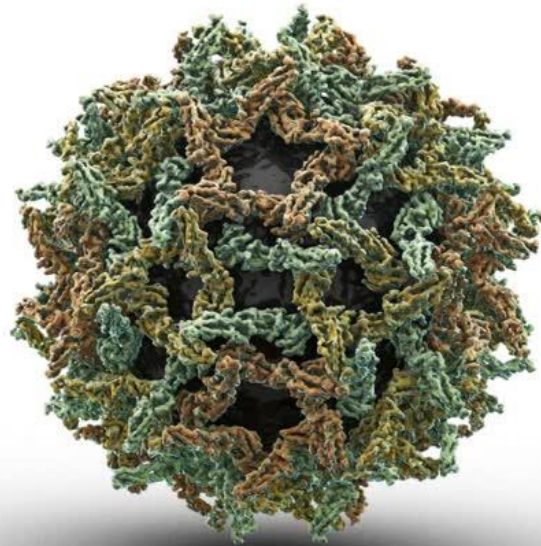
FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Puesta a punto de técnicas moleculares para el diagnóstico diferencial de infecciones por Flavivirus en muestras clínicas

Patricia Nuñez Castro
Tesina de Grado
Licenciatura en Bioquímica
Laboratorio de Virología Molecular



Orientadora: Dra. Pilar Moreno
Co-orientador: MSc. Álvaro Fajardo
Corrector externo: Dra. Adriana Delfraro
Montevideo, Marzo 2015

ÍNDICE

Abreviaturas	4
Resumen	6
1. Introducción	7
1.1. Género Flavivirus	7
1.1.a. Generalidades.....	7
1.1.b. Epidemiología de Flavivirus en la región.....	8
1.1.c. Vías de transmisión	8
1.1.d. Estructura del virión	9
1.1.e. Genoma viral	10
1.1.f. Ciclo replicativo	11
1.1.g. Variabilidad genética	12
1.2. Importancia de contar con herramientas moleculares para la detección de Flavivirus.....	13
2. Objetivos	14
2.1. Objetivo general	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. Materiales y métodos	15
3.1. Revisión bibliográfica	15
3.2. Evaluación y optimización de protocolos mediante análisis bioinformáticos .	15
3.3. Muestras.....	20
3.3.a. Controles positivos	20
3.3.b. Muestras clínicas con sintomatología compatible con infección por Flavivirus	21
3.4. Transcripción reversa (RT).....	21
3.5. Puesta a punto de diferentes técnicas de PCR para la detección de Flavivirus	22
3.5.a. Puesta a punto de la metodología a tiempo final descrita por Ayers y cols., 2006	22
3.5.b. Puesta a punto de una Nested-PCR descrita por Vázquez y cols., 2011	23
3.5.c. Puesta a punto de una Heminested-PCR descrita por Scaramozzino y cols., 2000	23

3.5.d.i. Puesta a punto de una Real Time PCR (qPCR) llevada a cabo modificando el protocolo descrito por Scaramozzino y cols., 2000	24
3.5.d.ii. Ensayo de sensibilidad de la qPCR	25
3.6. Confirmación de productos amplificados	25
3.6.a. Electroforesis	25
3.6.b. Purificación de productos de PCR	25
3.6.c. Secuenciación	26
3.7. Análisis de muestras provenientes de pacientes con síntomas clínicos compatibles con infecciones por Flavivirus.....	26
3.8. Obtención de controles positivos de amplificación	26
3.8.a. RT-PCR Vázquez y cols. 2011	26
3.8.b. Purificación de los productos amplificados	27
3.8.c. Clonación y transformación	27
3.8.d. Minipreps por lisis alcalina	27
3.8.e. Verificación de la presencia del inserto por digestión con EcoRI	28
4. Resultados y discusión	29
4.1. Revisión bibliográfica	29
4.2. Evaluación y optimización de protocolos mediante análisis bioinformáticos..	29
4.2.a. Evaluación de primers	29
4.2.b. Mapeo de máxima verosimilitud.....	30
4.2.c. Análisis Filogenéticos	32
4.3. Puesta a punto de diferentes metodologías de RT-PCR para la detección y clasificación de virus pertenecientes al género Flavivirus	35
4.3.a. Puesta a punto de la metodología a tiempo final descrita por Ayers y cols., 2006	35
4.3.b. Puesta a punto de la Nested-PCR descrita por Vázquez y cols., 2011	36
4.3.c. Puesta a punto de una Heminested-PCR descrita por Scaramozzino y cols., 2000	37
4.3.d.i. Puesta a punto de una qPCR llevada a cabo modificando el protocolo descrito por Scaramozzino y cols., 2000	39
4.3.d.ii. Ensayo de sensibilidad para la qPCR	41

4.4. Análisis de muestras provenientes de pacientes con síntomas clínicos compatibles con infecciones por Flavivirus	42
4.5. Obtención de controles de amplificación	43
6. Conclusiones	45
7. Perspectivas	46
8. Referencias bibliográficas	47

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
AEFV	Aedes Flavivirus
ALFV	Alfuy virus
APOIV	Apoi virus
ARN	Ácido Ribonucleico
BAGV	Bagaza virus
BANV	Banzi virus
BOUV	Bouboi virus
Cap	capuchón
CAV	Cell Fusing Agent virus
CFV	Culex Flavivirus
CRV	Complejo de Replicasa Viral
CS	Secuencia de Ciclación
DEDSV	Duck Egg Drop Syndrome virus
DENV-1	Dengue virus 1
DENV-2	Dengue virus 2
DENV-3	Dengue virus 3
DENV-4	Dengue virus 4
DF	Fiebre del Dengue
DHF	Fiebre Hemorrágica del Dengue
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato
EHV	Edge Hill virus
Γ	Distribución gama
GGEV	Greek Goat Encephalitis virus
GGYV	Gadgets Gully virus
GTR	General Time Reversible
I	Sitios Invariables
JEV	Japanese Encephalitis virus
JUGV	Jugra virus
KADV	Kadam virus
Kb	Kilobases
KOUV	Koutangovirus
KRV	Kamiti River virus
KSIV	Karshi virus
KYDV	Kyasanur forest Disease virus
LGTV	Langat virus
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LF-FIOCRUZ	Laboratorio de Flavivirus, IOC/Fiocruz
LIV	Louping Ill virus
LVM	Laboratorio de Virología Molecular
M	Molar
min	minutos
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
µg	microgramos
ml	mililitros
mM	milimolar
MEAV	Meaban virus
ML	Máxima Verosimilitud

MMLV	Montana Myotis Leukoencephalitis virus
MODV	Modoc virus
MSP	Ministerio de Salud Pública
MVEV	Murray Valley Encephalitis virus
NCR	Región no codificante
Nested PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada
NS	Proteína no estructural
nt	Nucleótidos
NTAV	Ntaya virus
OHFU	Omsk Hemorrhagic Fever virus
pb	Pares de bases
PCV	Palm Creek virus
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
POVV	Powassan virus
QBV	Quang Binh virus
qPCR	PCR cuantitativa
RBV	Rio Bravo virus
RE	Reticulo Endoplasmático
RFV	Royal Farm virus
rpm	revoluciones por minuto
RT	Transcripción Reversa
SABV	Saboya virus
seg	segundos
SEPV	Sepik virus
SL	Horquilla estabilizante
SLEV	Saint Louis Encephalitis virus
SREV	Saumarez Reef virus
SSEV	Spanish Sheep Encephalitis virus
TBEV	Tick Borne Encephalitis virus
TN	Tamura Nei
TYUV	Tyuleniy virus
UAR	Región corriente arriba de AUG
UGSV	Uganda S virus
μL	microlitros
μM	micromolar
UV	Usutu virus
WESSV	Wesselsbron virus
WNV	West Nile virus
YAOV	Yaounde virus
YFV	Yellow Fever virus

RESUMEN

El género *Flavivirus*, perteneciente a la familia *Flaviviridae*, comprende una amplia gama de virus que son transmitidos principalmente por vectores artrópodos. Este género incluye más de 70 virus ARN de simple cadena, que comparten determinantes antigénicos comunes. Los miembros de este género son responsables de una considerable morbilidad y mortalidad, pudiendo causar desde cuadros asintomáticos, hasta graves enfermedades febriles, encefálicas, hemorrágicas y hepáticas en los vertebrados, incluidos los humanos. Este género está constituido, entre otros, por los virus de la fiebre amarilla, el virus dengue, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la encefalitis del Oeste del Nilo. Debido a la amplia gama de enfermedades causada por estos virus, a los síntomas clínicos muchas veces indiferenciables entre sí y la naturaleza emergente de los mismos en la región sudamericana, las pruebas de laboratorio con fines diagnósticos resultan cada vez de más importancia. Debido a esto, se ha realizado un gran esfuerzo a fin de desarrollar diversas metodologías que permitan una detección rápida y sensible de estos virus.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar diferentes técnicas moleculares para el diagnóstico diferencial de virus pertenecientes al género *Flavivirus*. Se pusieron a punto diferentes metodologías de RT-PCR, tanto a tiempo final como a tiempo real, contra regiones genómicas conservadas entre los *Flavivirus* (región codificante para la polimerasa viral, NS5). Se logró la puesta a punto en nuestro laboratorio de técnicas moleculares sensibles capaces de detectar estos virus en diferentes muestras clínicas de pacientes con síntomas clínicos compatibles con estas infecciones.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Género *Flavivirus*.

1.1.a. Generalidades

El género *Flavivirus*, perteneciente a la familia *Flaviviridae* (ver figura 1), comprende una amplia gama de virus que son transmitidos principalmente por vectores artrópodos (Arbovirus). Este género incluye más de 70 virus ARN de simple hebra de sentido positivo (+), que comparten determinantes antigénicos comunes. Los *Flavivirus* son responsables de una considerable morbilidad y mortalidad, pudiendo causar desde cuadros asintomáticos hasta graves enfermedades febriles, encefálicas, hemorrágicas y hepáticas en los vertebrados, incluidos los humanos. En este género se incluyen, entre otros, los virus de la Fiebre Amarilla (YFV), Dengue (DENV-1, 2, 3 y 4), Encefalitis Japonesa (JEV), Encefalitis de San Luis (SLEV), Encefalitis del Oeste del Nilo (WNV) y el virus de la Encefalitis transmitido por garrapatas (TBEV) (Monath & Heinz, 1996).

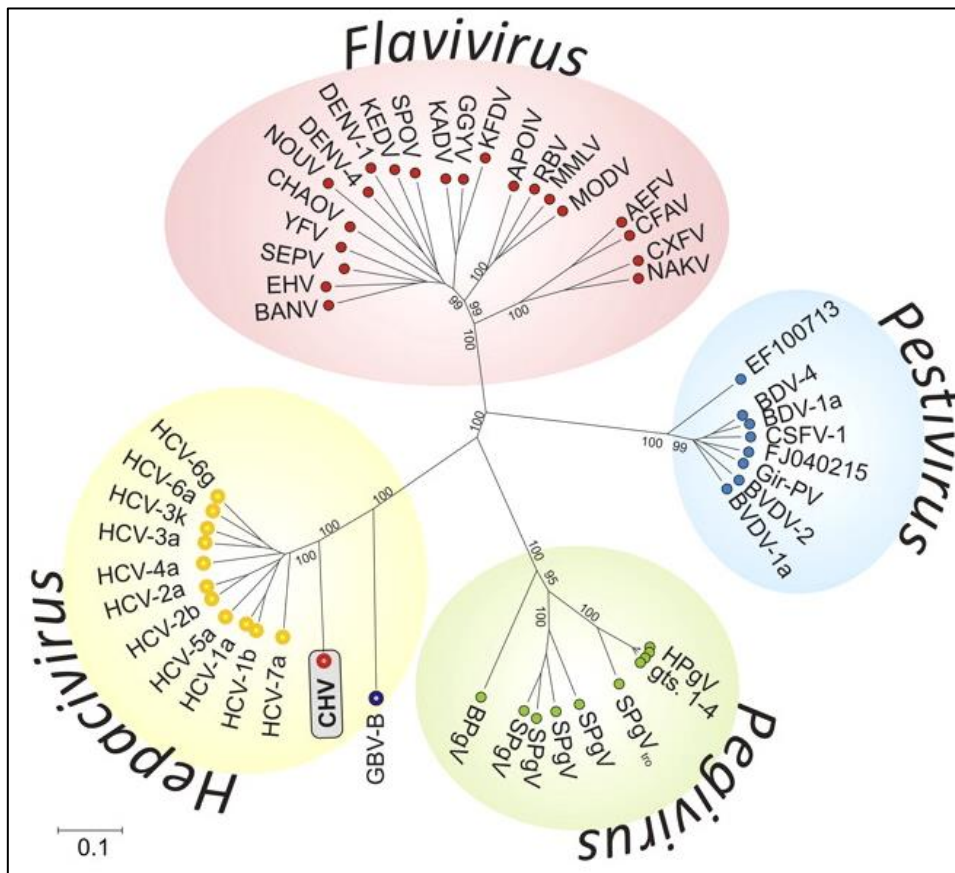


Figura 1: Miembros de la familia *Flaviviridae*. Se indican las relaciones filogenéticas obtenidas en base al análisis comparativo del gen de la polimerasa viral de especies pertenecientes a los 4 géneros miembros de esta familia: Hepacivirus, Flavivirus, Pegivirus y Pestivirus (Kapoor y cols., 2011).

1.1.b. Epidemiología de los Flavivirus en la región.

En el Uruguay se ha reportado seropositividad para WNV y SLEV en niños y adultos en las décadas del 60 y 70 (Somma, 1970; Somma y cols., 1970). Asimismo, en los últimos años, han sido reportados casos esporádicos de SLEV en humanos y la actividad de SLEV y de WNV en equinos de nuestro país (Delfraro, 2002; Burgueño y cols., 2013).

En cuanto al DENV, no se registran en nuestro país casos autóctonos desde 1916, cuando fueron notificados los últimos casos en el Departamento de Salto (Sosa, 1916), consecuencia de una epidemia que abarcó el cono Sur de América (Gratz & Knudsen, 1996). Sin embargo, nuestro país se encuentra en riesgo de re-emergencia de este virus, ya que su principal vector (el mosquito *Aedes aegypti*) circula nuevamente en Uruguay desde 1997 (Salvatella, 1997; Salvatella & Rosa, 2003). Asimismo, tanto DENV como otros Flavivirus, se encuentran ampliamente distribuidos en la región sudamericana, siendo una de las principales causas de morbilidad infantil y de adultos. Desde el reingreso a las Américas del mosquito *Aedes aegypti*, la fiebre del Dengue (DF) y el Dengue hemorrágico (DHF) se han convertido en un importante problema de salud pública para esta región (Vezzani & Carbajo, 2008).

Es importante destacar que en Argentina se ha reportado la circulación de DENV y es considerada la arbovirosis de mayor importancia en el país desde fines de la década del 90. También se ha documentado en el pasado la ocurrencia de ciclos selváticos y urbanos del YFV, y si bien no se han notificado nuevos casos, existen características ecológicas que ponen a este país en riesgo de una posible re-emergencia de este virus. Por otro lado, recientemente Valinotto y colaboradores (2012) reportaron dos casos de encefalitis de San Luis en la ciudad de Buenos Aires, los cuales fueron detectados por métodos moleculares. Por su parte, en Brasil se reporta la circulación de diversos Flavivirus, entre los que se encuentran los 4 serotipos de DENV, SLEV y YFV, entre otros (Figueiredo y cols., 2000).

1.1.c. Vías de transmisión.

Los Flavivirus pueden ser transmitidos biológicamente por vectores artrópodos o directamente de un huésped vertebrado a otro. La transmisión mediante un vector artrópodo implica que el virus provoque una alta viremia en el huésped vertebrado y replique en los tejidos del artrópodo infectado (Weaver & Barrett, 2004). La mayoría de los Flavivirus son transmitidos biológicamente mediante dos grupos de artrópodos: las garrapatas y los mosquitos. Por otra parte, existen algunos Flavivirus cuyo vector de transmisión aún no ha sido reportado (Billoir y cols., 2000; Kuno & Chang, 2006).

Los artrópodos se infectan al ingerir el virus con la sangre de un individuo infectado en el momento de alimentarse. Luego de la ingesta, el virus infecta las células del

intestino medio, esparciéndose al hemocele y luego a una gran variedad de tejidos. Finalmente, se infectan las glándulas salivales, por lo que el artrópodo es capaz de transmitir el virus mediante su picadura a otro vertebrado. Asimismo, las larvas de mosquitos pueden ser infectadas si su desarrollo transcurre en aguas contaminadas con el virus (Mitzel y cols., 2007).

Muchos arbovirus también pueden ser transmitidos directamente entre vertebrados. El modo de transmisión es vía oral e intranasal. Esto se puede dar mediante la materia fecal, la orina y la saliva. Los comportamientos animales que favorecen este modo de transmisión incluyen comer, beber, estornudar, el canibalismo y agresiones que impliquen lastimaduras físicas (Kuno & Chang, 2006). Algunos Flavivirus como WNV pueden ser transmitidos a los recién nacidos mediante el consumo de leche materna. También se han reportado infecciones por Flavivirus asociadas a transfusiones de sangre y trasplante de órganos (Iwamoto y cols., 2003; Stramer y cols., 2005).

1.1.d. Estructura del virión.

La partícula viral está constituida por una cápside icosaédrica envuelta por una bicapa lipídica, obtenida por el virus en el proceso de gemación de la célula del hospedero, en la cual se encuentran insertas las proteínas M (Matriz) y E (Envoltura). El tamaño del virión es de aproximadamente 30 nm (Ver figura 2).

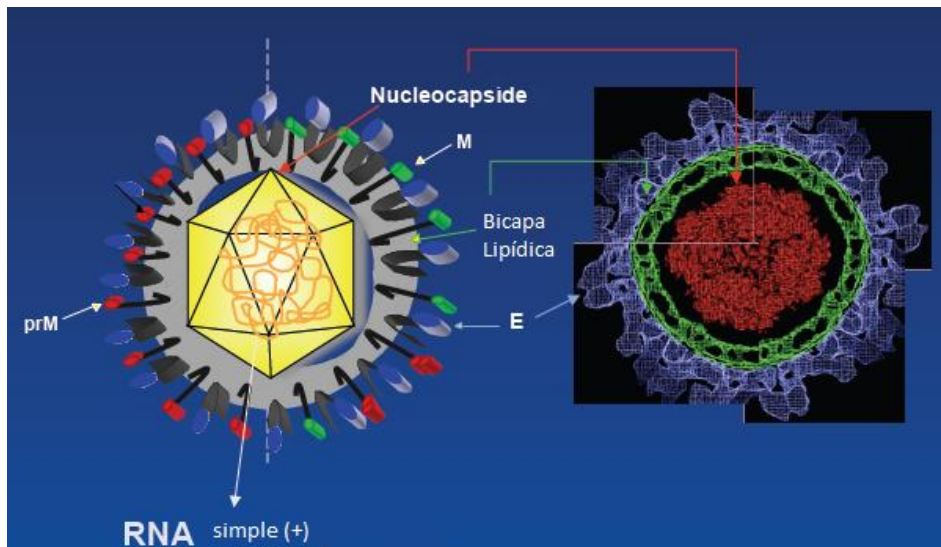


Figura 2: Estructura del virión de Flavivirus (Figura obtenida del Curso Biología de Flavivirus, Fundación Oswaldo Cruz, 2013).

1.1.e. Genoma viral.

El genoma se encuentra conformado por ARN simple hebra de polaridad positiva, de aproximadamente 10,7 kilobases (kb), contenido en una nucleocápside. En su extremo 5' presenta un capuchón (cap) y carece de cola poli A en el extremo 3'. Posee un único marco abierto de lectura, flanqueado por dos regiones no codificantes (NCR), que codifica para una única poliproteína. Esta última luego es clivada mediante proteasas celulares y virales dando lugar a 3 proteínas estructurales (C, M y E) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A y NS4B y NS5) (Linderbach & Rice, 2003) (Ver figura 3).

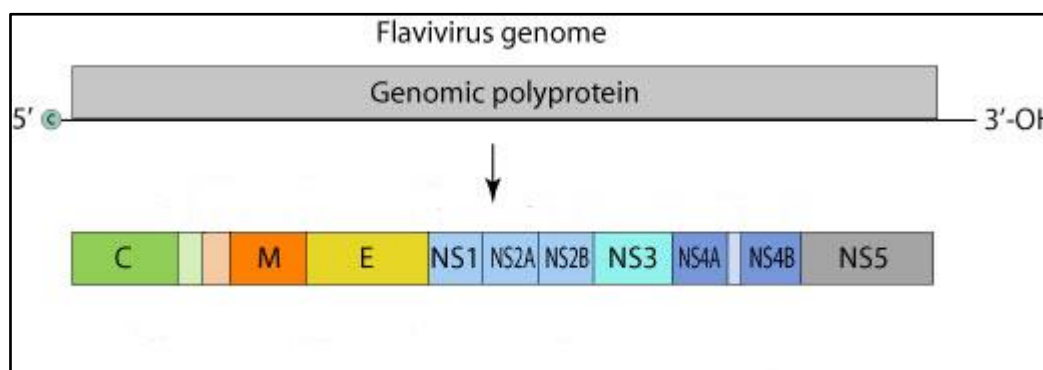


Figura 3: Organización genómica de los Flavivirus. Se indica la disposición de los distintos genes a lo largo del genoma viral (Extraído de viralzone.expasy.org). C: Cápside; M: Membrana; E: Envoltura; NS: Proteínas no estructurales.

Con respecto a las proteínas estructurales, la C, compone la cápside que rodea al ácido nucleico y le brinda protección. La proteína M, que deriva de la proteólisis de prM, se inserta en la membrana viral. Por su parte, la proteína E es una glicoproteína que conforma la envoltura viral y está involucrada en la unión y la penetración del virus en la célula (Chambers y cols., 1990; Rey, 2003; Hung y cols., 2004; Mondotte y cols., 2007).

Entre las proteínas no estructurales, una de las más importantes es la NS5. Ésta codifica para la polimerasa viral, siendo una ARN polimerasa ARN dependiente. Presenta un dominio metiltransferasa y un dominio C-terminal (polimerasa) (Li y cols., 1999). Al ser una proteína fundamental para la replicación viral, se encuentra muy conservada entre los diferentes miembros del género Flavivirus. Por este motivo, la proteína NS5 resulta ser un blanco ideal para la realización de análisis moleculares por PCR con fines diagnósticos.

Otra de las proteínas no estructurales más estudiadas es la NS3, que actúa en la síntesis de ARN viral y en la formación del cap. Presenta dos dominios: un dominio N-terminal con actividad proteasa (al formar el complejo NS2B-NS3), que es responsable

del corte de NS2, NS3, NS4A, NS5, así como del extremo carboxilo de la proteína C; y un dominio C-terminal con actividad helicasa (Li y cols., 1999).

Por otra parte, la proteína NS1 es la única proteína viral que se secreta durante la infección viral, motivo por el cual es altamente inmunogénica y funciona como biomarcador de la infección (Muller y cols., 2013).

1.1.f . Ciclo replicativo.

El primer paso de la infección requiere la interacción entre la partícula viral y receptores presentes en la superficie de la célula huésped, que llevan a la entrada del virión a través de una endocitosis mediada por receptores. La proteína viral responsable de esta unión es el glicoproteína E, mediante su dominio III localizado hacia su extremo carboxiterminal (Crill y Roehring, 2001).

Diversos estudios indican que el glucosaminoglicano heparán sulfato (HS), presente en la membrana plasmática, está involucrado en la unión del virión a las células de mamíferos. El HS se encuentra presente en una gran diversidad de células, por este motivo, su interacción con el virus permite la adsorción viral a la superficie de distintos tipos celulares, pero otros receptores más específicos serían necesarios (Navarro-Sanchez y cols., 2003; Tassaneetrithep y cols., 2003).

Luego de la internalización de los viriones, se produce la acidificación del endosoma por la fusión con los lisosomas, produciendo cambios conformacionales en la glicoproteína E. De esta forma se induce la fusión de las membranas celular y viral, liberándose la nucleocápside al citoplasma, donde ocurre el desnudamiento y la consiguiente liberación del genoma viral (Clyde y cols., 2006).

La traducción del genoma viral resulta en la síntesis de una única poliproteína, a través de un mecanismo dependiente del cap (Gingras y cols., 1999). Este proceso ocurre en el retículo endoplasmático (RE) rugoso, lo que facilita la localización de las proteínas virales dentro y alrededor de él para su posterior ensamblaje en viriones maduros (Yu y cols., 2006). El procesamiento proteolítico de la poliproteína ocurre co y post-traduccionalmente por proteasas virales (NS2B-NS3) y celulares, lo que da lugar a tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales (Chambers y cols., 1990).

En cuanto las proteínas necesarias para la replicación viral han sido sintetizadas, NS5 y NS3 forman un complejo replicasa viral (CRV). Éste es capaz de reconocer una estructura secundaria característica presente en el extremo 5' del ARN viral. Esta estructura, altamente conservada entre los diferentes Flavivirus, consiste de una gran horquilla estabilizante (SLA) seguida de una pequeña (SLB), ubicadas justo antes del codón de iniciación AUG (Filomatori y cols., 2006).

Para que la replicación viral se lleve a cabo es necesario ubicar el CRV en el extremo 3'. Esto es posible gracias a que se establecen interacciones ARN-ARN de largo alcance mediadas por secuencias complementarias ubicadas en ambos extremos del genoma. Estas secuencias son: 5'-UAR y 3'-UAR (región corriente arriba de AUG), ubicadas en las regiones NCR 5' y 3', respectivamente; y 5'-CS y 3'-CS (secuencia de circularización), que se ubican en la secuencia codificante de la cápside, y corriente arriba de la horquilla estabilizante 3' (3'-SL), respectivamente (Brinton y cols., 1986; Zeng y cols., 1998; Tilgner y cols., 2005).

Asimismo, el ARN genómico funciona como molde para la síntesis de cadenas de polaridad negativa, las que luego generan copias de ARN de polaridad positiva. Estas cadenas ARN positivas servirán nuevamente como plantillas transcripcionales, podrán actuar como mensajeros para la síntesis de proteínas, o ensamblarse dentro de la nucleocápside y transformarse en el genoma viral de la nueva progenie (Diamond, 2003).

Para el ensamblado de las nuevas partículas virales, inicialmente se forman partículas virales inmaduras no infecciosas a nivel del RE, formadas por las proteínas E y prM, además de la nucleocápside y lípidos de membrana. La ruptura proteolítica de prM ocurre en el aparato de Golgi y resulta en la maduración de la partícula viral que en este punto se convierte en infecciosa. El virión maduro abandona la célula por exocitosis para poder luego infectar nuevas células (Diamond, 2003).

1.1.g. Variabilidad genética.

Los virus ARN se replican con una alta tasa de error debido a la carencia de actividad correctora de su ARN polimerasa. Esto les permite a este tipo de virus circular como poblaciones que presentan una alta diversidad genética, es decir, una nube de mutantes estrechamente relacionados a nivel genético denominadas cuasiespecies, (Domingo, 2002; Wang y cols., 2002). Estas características les confieren a los virus ARN una gran capacidad de adaptación a los cambios en las presiones selectivas.

Asimismo, se ha descrito que estos virus pueden utilizar la recombinación como otro mecanismo para generar variabilidad. Se ha reportado la recombinación intraespecie entre los diferentes miembros del género Flavivirus. Esto es posible debido a la circulación simultánea de diferentes variantes dentro de un mismo hospedero. Este mecanismo le confiere a estos virus un importante grado de generación de diversidad genética, promoviendo la aparición de cepas con mayor capacidad replicativa, mayor transmisión, o más virulentas (Twiddy y Holmes, 2003).

1.2. Importancia de contar con herramientas moleculares para la detección de Flavivirus.

Debido a la amplia gama de enfermedades causada por estos virus, a los síntomas clínicos muchas veces indiferenciables entre sí y a la naturaleza emergente de los mismos, su diagnóstico de laboratorio es de suma importancia.

Sin embargo, las metodologías de diagnóstico directo actuales son un obstáculo para la detección e identificación de distintos Flavivirus, entre otras razones debido a que el aislamiento de estos virus lleva su considerable tiempo, así como también, por el requerimiento de instalaciones de nivel 3 de bioseguridad para el trabajo a nivel de laboratorio de varios de ellos. Asimismo, los ensayos de serología suelen dar resultados falsos positivos debido a la existencia de reactividad cruzada entre diferentes Flavivirus por la presencia de epítopes comunes en sus glicoproteínas de superficie. Por estas razones, el desarrollo de métodos moleculares sensibles y específicos para estos agentes es esencial (Ayers y cols., 2006).

Debido a esto, se ha realizado un gran esfuerzo a fin de desarrollar diversas metodologías de diagnóstico que permitan una detección directa, rápida y sensible de estos virus. Con este objetivo se han implementado metodologías de RT-PCR, tanto a tiempo final como a tiempo real, contra regiones genómicas conservadas entre los diferentes Flavivirus (en particular, la región que codifica para la polimerasa viral, NS5) (Ayers y cols., 2006; Moureau y cols., 2007; Sánchez-Seco y cols., 2005; Scaramozzino y cols., 2000; Vázquez y cols., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

El presente proyecto tiene como objetivo central la puesta a punto de técnicas moleculares para el diagnóstico diferencial de virus pertenecientes al género Flavivirus, así como la búsqueda de estos virus en muestras clínicas pertenecientes a pacientes con síntomas compatibles con infecciones por Flavivirus.

2.2. Objetivos específicos.

2.2.a. Revisión bibliográfica a fin de conocer los diferentes protocolos moleculares reportados para la detección y diferenciación de Flavivirus.

2.2.b. Evaluación y optimización de protocolos mediante análisis bioinformáticos.

2.2.c. Optimización de técnicas de PCR a tiempo final (PCR convencional, Nested-PCR y Heminested-PCR) y a tiempo real para la detección de Flavivirus.

2.2.d. Análisis de muestras provenientes de pacientes con síntomas clínicos compatibles con infecciones por Flavivirus.

2.2.e. Obtención de controles de amplificación para las diferentes metodologías puestas a punto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Revisión bibliográfica.

A fin de conocer los diferentes protocolos moleculares reportados en la literatura para la detección y diferenciación de Flavivirus, se exploró la base de datos bibliográfica Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

La gran mayoría de las metodologías descritas buscan amplificar regiones parciales del gen NS5 de los Flavivirus, correspondiente a la región codificante para la ARN polimerasa ARN dependiente. Este es uno de los genes más conservados de este género debido a la funcionalidad de esta proteína, por lo que resulta un blanco ideal para el desarrollo de este tipo de metodologías (Iacono-Connors & Schmaljohn, 1992). Se consideraron diferentes metodologías, evaluándose la utilidad de los enfoques en términos de diversidad de especies detectadas, requerimiento o no de aislamiento en cultivos celulares, eficiencia de amplificación, entre otros (Ayers y cols., 2006; Deubel y cols., 1997; Sánchez-Seco y cols., 2005; Scaramozzino y cols., 2000; Vázquez y cols., 2011).

3.2. Evaluación y optimización de protocolos mediante análisis bioinformáticos.

Con el objetivo de evaluar *in silico* la especificidad de los primers reportados en cada metodología, así como evaluar la señal filogenética presente en cada blanco de amplificación, se descargaron secuencias nucleotídicas correspondientes a diversos miembros del género Flavivirus. Para ello se utilizaron tanto la base de datos nucleotídica de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), como bases de datos específicos para Flavivirus (<http://cvc.dfci.harvard.edu/flavi/>; Misra & Schein, 2007). Se consideraron Flavivirus estrictamente circulantes en mosquitos, así como aquellos que infectan vertebrados, distinguiéndose entre ellos aquellos cuyo vector es desconocido, los transmitidos por garrapatas y los transmitidos por mosquitos. Entre estos últimos consideramos Flavivirus pertenecientes a los siguientes complejos antigénicos: Encefalitis Japonesa; Fiebre amarilla; Dengue y Ntaya (Tabla 1). De esta forma se obtuvo un set de datos con los siguientes Flavivirus: AEFV (Aedes Flavivirus); ALFV (Alfuy virus); APOIV (Apoi virus); BAGV (Bagaza virus); BANV (Banzi virus); BOUV (Bouboi virus); CFAV (Cell Fusing Agent virus); CFV (Culex Flavivirus); DEDSV (Duck Egg Drop Syndrome virus); DENV-1 (Dengue virus 1); DENV-2 (Dengue virus 2); DENV-3 (Dengue virus 3); DENV-4 (Dengue virus 4); EHV (Edge Hill virus); GGEV (Greek Goat Encephalitis virus); GGYV (Gadgets Gully virus); JEV (Japanese Encephalitis virus); JUGV (Jugra virus); KADV (Kadam virus); KOUV (Koutango virus); KRV (Kamiti River virus); KSIV (Karshi virus); KYDV (Kysanur forest Disease virus); LGTV (Langat virus); LIV

(Louping Ill virus); MEAV (Meaban virus); MMLV (Montana Myotis Leukoencephalitis virus); MODV (Modoc virus); MVEV (Murray Valley Encephalitis virus); NTAV (Ntaya virus); OHFU (Omsk Hemorrhagic Fever virus); PCV (Palm Creek virus); POWV (Powassan virus); QBV (Quang Binh virus); RBV (Rio Bravo virus); RFV (Royal Farm virus); SABV (Saboya virus); SEPV (Sepik virus); SLEV (Saint Louis Encephalitis virus); SREV (Saumarez Reef virus); SSEV (Spanish Sheep Encephalitis virus); TBEV (Tick Borne Encephalitis virus); TYUV (Tyuleniy virus); UGSV (Uganda S virus); UV (Usutu virus); WESSV (Wesselsbron virus); WNV (West Nile virus); YAOV (Yaounde virus); YFV (Yellow Fever virus) (ver tabla 1).

Abreviatura	Especie	Vector/Hospedero	Flavivirus transmitidos por mosquitos		
AEFV	Aedes Flavivirus	Circulantes en mosquitos, sin hospedero vertebrado conocido	Abreviatura	Especie	Complejo antigénico
CAV	Cell Fusing Agent virus		DENV-1	Dengue virus 1	Dengue
CFV	Culex Flavivirus		DENV-2	Dengue virus 2	
KRV	Kamiti River virus		DENV-3	Dengue virus 3	
PCV	Palm Creek virus		DENV-4	Dengue virus 4	
QBV	Quang Binhvirus		BAGV	Bagaza virus	Ntaya
GGEV	Greek Goat Encephalitis virus	DEDSV	Duck Egg Drop Syndrome virus		
GGYV	Gadgets Gully virus	NTAV	Ntaya virus		
KADV	Kadam virus	Transmitidos por garrapatas a hospederos mamíferos	BANV	Banzi virus	Fiebre Amarilla
KSIV	Karshi virus		BOUV	Bouboi virus	
KYDV	Kyasanur forest Disease virus		EHV	Edge Hill virus	
LGTV	Langat virus		JUGV	Jugra virus	
LIV	Louping Ill virus		SABV	Saboya virus	
OHFV	Omsk Hemorrhagic Fever virus		SEPV	Sepik virus	
POWV	Powassan virus		UGSV	Uganda S virus	
RFV	Royal Farm virus		WESSV	Wesselsbron virus	
SSEV	Spanish Sheep Encephalitis virus		YFV	Yellow Fever virus	
TBEV	Tick Borne Encephalitis virus		ALFV	Alfuy virus	
MEAV	Meaban virus		JEV	Japanese Encephalitis virus	
SREV	Saumarez Reef virus		KOUV	Koutango virus	
TYUV	Tyuleniy virus		MVEV	Murray Valley Enceph. Virus	
APOIV	Apoi virus		SLEV	Saint Louis Encephalitis virus	
MMLV	Montana Myotis Leukoenceph. virus	UV	Usutu virus		
MODV	Modoc virus	WNV	West Nile virus		
RBV	Rio Bravo virus	YAOV	Yaounde virus		
		Vector desconocido			

Tabla 1: Miembros del género Flavivirus. Se detallan los Flavivirus considerados en este estudio, agrupándose sombreadas con distintos colores las especies que circulan únicamente en mosquitos (negro), las transmitidas por garrapatas (rojo) y las especies cuyo vector es desconocido (gris). Entre los miembros de este género que son transmitidos por mosquitos a vertebrados, se distinguen de acuerdo a su complejo antigénico: Dengue (verde); Ntaya (Mostaza); Fiebre amarilla (violeta); y Encefalitis Japonesa (azul).

A continuación se procedió al alineamiento de secuencias descargadas utilizando la aproximación CLUSTAL W implementada en el programa MEGA 5.2 (Tamuray cols., 2011; Thompson y cols., 1994).

Se procesaron las secuencias obteniéndose un dataset conteniendo el gen completo que codifica para la NS5 de los Flavivirus mencionados (2772 pares de bases). Se incluyeron las secuencias nucleotídicas de los *primers* utilizados en diferentes metodologías de diagnóstico reportadas, con el fin de visualizar los blancos de amplificación de los mismos y la identidad de cada *primer* con respecto a las secuencias referencia de cada especie. Entre los *primers* testeados por este abordaje, se incluyen: Flavi-1 y Flavi-2 (Ayers y cols., 2006); MAMD, cFD2 y FS778 (Scaramozzino y cols., 2000); y 1NS5F; 1NS5Re; 2NS5F, 2NS5Re (Vázquez y cols., 2011) (ver tabla 2).

Se evaluó *in silico* la efectividad de los *primers* reportados para identificar a los distintos Flavivirus procediendo a modificar la secuencia de los *primers* en casos que fuera notoria una discrepancia (*mismatch*) entre éstos y los blancos de amplificación. En este sentido, se valoraron especialmente las especies con mayor incidencia en los humanos: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, JEV, SLEV, TBEV, WNV y YFV (Monath & Heinz, 1996). Asimismo, se procesó el dataset inicial para generar diferentes conjuntos de secuencias correspondientes a las longitudes amplificables por cada metodología analizada. En consecuencia, se obtuvieron 4 datasets que incluyen secuencias nucleotídicas de 49 Flavivirus, difiriendo en sus longitudes de acuerdo al blanco de amplificación de cada metodología utilizada: 2772 pb (NS5 completa); 1019 pb (Vázquez y cols., 2011), 863 pb (Ayers y cols., 2006) y 214 pb (Scaramozzino y cols., 2000) (Figura 4).

Primer	Secuencia	Referencia
Flavi-1	5'-ATGTACGCTGATGACACAGCCTGGCTGGGACAC-3'	Ayers y cols., 2006
Flavi-2	5'-TCCAGACCTTCAGCATGTCTTCTGTGGTCATCCA-3'	Ayers y cols., 2006
1NS5F	5'-GCATCTAYAWCAYNATGGG-3'	Vázquez y cols., 2011
1NS5Re	5'-CCANACNYNRTCCANAC-3'	Vázquez y cols., 2011
2NS5F	5'-GCNATNTGGTWTYATGTGG-3'	Vázquez y cols., 2011
2NS5Re	5'-CATRTCTTCNGTNGTCATCC-3'	Vázquez y cols., 2011
MAMD	5'-AACATGATGGGRAARAGRGARAA-3'	Scaramozzino y cols., 2000
cFD2	5'-GTGTCCCAGCCGGCGGTGCATCAGC-3'	Scaramozzino y cols., 2000
FS778	5'-AARGGHAGYMSDGCHATHTGGT-3'	Scaramozzino y cols., 2000 (modificado)

Tabla 2: Secuencias de *primers* utilizados en este estudio.

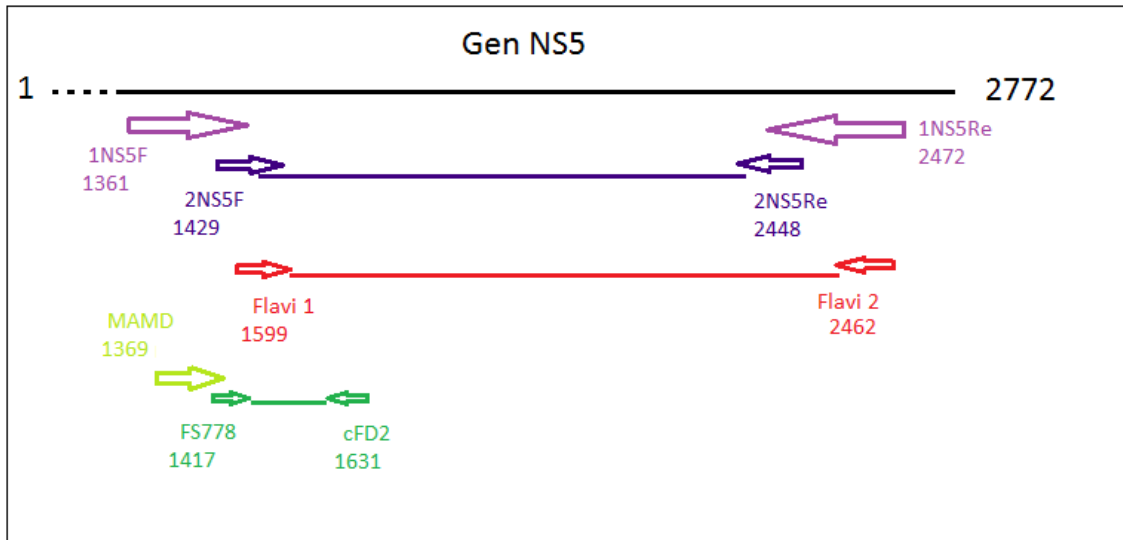


Figura 4: Posición relativa de los primers. Ubicación de los *primers* utilizados en este trabajo (ver tabla 2). Los números y las flechas indican las posiciones con respecto al gen NS5. Las líneas completas se corresponden con los amplicones completos generados en cada metodología.

Con el objetivo de valorar la señal filogenética contenida en cada set de datos, se realizó un análisis de mapeo de máxima verosimilitud (*likelihood mapping*) (Strimmer & Haeseler, 1997), implementado en el programa TREE-PUZZLE v.5.2 (Schmidt y cols., 2002). Este método consiste en analizar mediante máxima verosimilitud (ML), las tres topologías que pueden resolverse completamente a partir de cuatro secuencias (cuartetos) seleccionadas al azar del alineamiento (Strimmer & von Haeseler, 1997). El mapa de verosimilitud resultante es un triángulo equilátero en el que la verosimilitud de los 3 posibles árboles (una por cada topología) son representadas como puntos internos. El triángulo es dividido en diferentes regiones (Figura 5). La zona central representa los árboles no resueltos (A*), los vértices representan una filogenia bien resuelta (A1, A2 y A3) y en las aristas reflejan los casos en los que no se puede definir entre las tres topologías (A12, A13 y A23). La localización de las verosimilitudes en el triángulo define el modo de evolución. De esta forma, la distribución de puntos resultante indica si los datos presentan suficiente señal o no para realizar una reconstrucción filogenética. Un alineamiento con valores de árboles definidos superiores a 90% presenta un fuerte apoyo desde el punto de vista estadístico (Schmidt y cols., 2002).

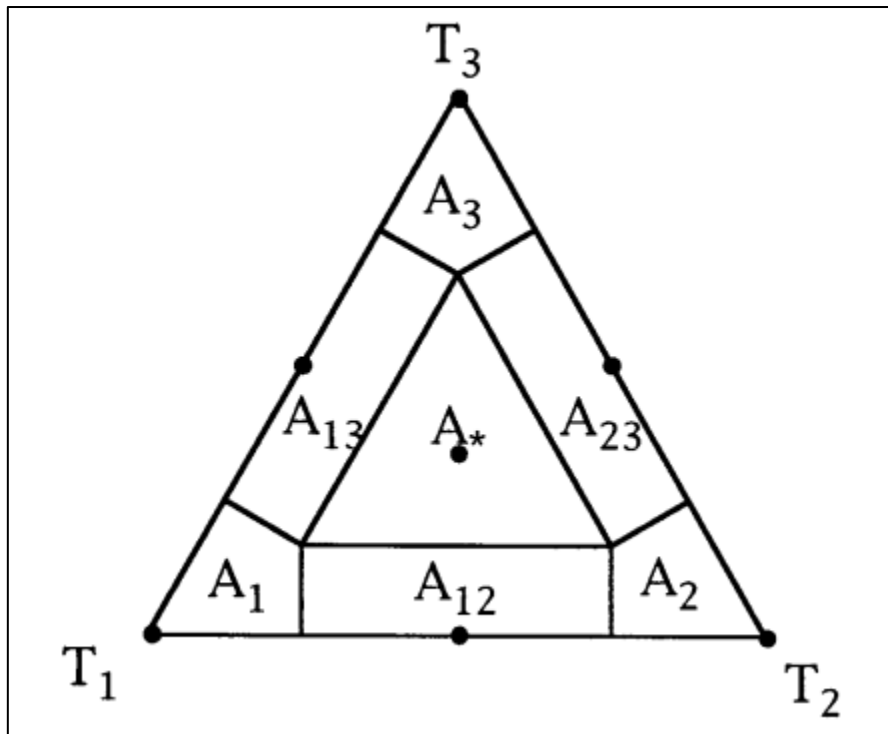


Figura 5: Mapa de verosimilitudes. El triángulo está dividido en 7 regiones, donde se distribuyen las verosimilitudes de las posibles topologías para cada cuarteto. Las regiones A1, A2 y A3 corresponden a árboles bien resueltos; A* representa los árboles no resueltos; y A12, A13, y A23 reflejan los casos en los que no se puede definir entre las tres topologías.

Se determinó el modelo de sustitución nucleotídica óptimo para cada dataset mediante el programa Modelgenerator (Keane y cols., 2006), en base al criterio informativo de Akaike (AIC). Utilizando este modelo evolutivo óptimo para cada dataset, se realizaron árboles de ML mediante el programa PhyML (Guidon y cols., 2005), utilizándose como medida de robustez para cada nodo el método bootstrap (100 pseudo-réplicas). Una vez obtenidos los árboles filogenéticos, se procedió a la edición de los mismos utilizando el programa FigTree v1.4.1 (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

3.3. Muestras.

3.3.a. Controles positivos.

La ausencia de circulación de DENV y otros Flavivirus en el Uruguay, dificulta el contar con controles positivos necesarios para realizar los objetivos planteados. La imposibilidad de trabajar con sueros positivos o crecer estos virus en cultivos celulares, hace que únicamente podamos trabajar con muestras de ARNs o ADNc obtenidos fuera del Uruguay a partir de muestras positivas para Flavivirus. Los controles positivos utilizados a lo largo de este proyecto fueron proporcionados por el laboratorio de Flavivirus, IOC/FIOCRUZ (LF-FIOCRUZ), Río de Janeiro, Brasil. Se trata de las cepas

prototipo de los diferentes serotipos de DENV: Cepas *Hawaii* (DENV-1), *NG-C* (DENV-2), *H-87* (DENV-3) y *H-241* (DENV-4). El ARN de estas variantes fue aislado de sobrenadantes de cultivos celulares (línea C6/36 de *Aedes albopictus*) en el laboratorio LF/FIOCRUZ y enviado al Laboratorio de Virología Molecular (LVM), Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Vale destacar que a efectos de cumplir con las normas de bioseguridad nacionales e internacionales, no se utilizaron muestras de suero, sino que únicamente se trabajó a partir de ácidos nucleicos. Por consiguiente, estas muestras no representan ningún riesgo físico, químico o biológico.

3.3.b. Muestras con sintomatología compatible con infección por Flavivirus.

En el marco de una colaboración con el Ministerio de Salud Pública (MSP), el mismo cedió a nuestro laboratorio 24 muestras de suero de pacientes con síntomas clínicos compatibles con una infección por DENV tomadas en el año 2007 en un presunto brote de Dengue ocurrido en la ciudad de Salto. En aquella oportunidad nuestro laboratorio procedió a realizar el diagnóstico molecular utilizando un protocolo de PCR específico para DENV descrito previamente por Lanciotti y cols. (1992). Este análisis arrojó resultados negativos en todos los casos. De todas formas, no se determinó el agente etiológico de dicho brote, por lo que en el marco de este proyecto nos propusimos analizar estas muestras una vez optimizadas las diferentes metodologías de diagnóstico (será detallado en el punto 3.7). A partir de estas muestras se realizó la extracción de ARN utilizando el kit *QIAmp Viral RNA* de QIAGEN, de acuerdo con instrucciones suministradas por los fabricantes.

3.4. Transcripción Reversa (RT)

La síntesis de ADNc *in vitro* se realizó mediante la utilización de *primers* hexámeros al azar tanto para los ARN virales usados como controles positivos, como para los ARNs extraídos de las muestras problema.

Se realizó una mix utilizando 1 microlitro (μL) de *primers* hexámeros al azar a una concentración inicial de 100 micromolar (μM), 1 μL de desoxi-nucleótidos-tri-fosfato (dNTP's) 10 milimolar (mM) y 10 μL de ARN de la muestra problema. Se incubó esta mix a 65°C por 5 minutos (min) y luego en hielo por 1 min. Posteriormente se adicionaron 4 μL del buffer 5X, 2 μL de Ditiotretitol (DTT), 1 μL de H₂O bidestilada/deionizada y 1 μL de la enzima ADN polimerasa ARN dependiente *SuperScript II* (Invitrogen), a una concentración de 200 unidades de enzima (U)/ μL . La mix final de 20 μL se incubó en un termociclador programable *2720 ThermalCycler* (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones:

- 1) 25°C por 10 min.
- 2) 42°C por 50 min.
- 3) 70°C por 15 min.

3.5. Puesta a punto de diferentes técnicas de PCR para la detección de Flavivirus.

Con el fin de evaluar diferentes metodologías de detección de Flavivirus, se optimizaron las condiciones de amplificación reportadas por los diferentes protocolos moleculares previamente descritos en 3.1. En todos los casos se utilizaron como controles positivos las cepas prototipo de DENV (previamente detalladas en 3.3.a.), mientras que los controles negativos fueron realizados con H₂O bidestilada y deionizada.

3.5.a. Puesta a punto de la metodología de PCR a tiempo final para la región NS5 descrita por Ayers y cols., 2006.

La metodología reportada por Ayers y cols. (2006), plantea la amplificación de una región parcial del gen NS5, utilizando *primers* genéricos que detectan diferentes Flavivirus. En particular, es capaz de identificar los principales Flavivirus transmitidos por vectores mosquitos, pertenecientes a los grupos antigénicos Dengue, Encefalitis Japonesa y Fiebre amarilla (ver tabla 1). Si bien esta metodología fue previamente utilizada en el LVM, llevando incluso a la publicación de un reporte científico (Regato y cols., 2008), se procedió a la optimización de las condiciones a efectos de poder comparar con las demás metodologías abordadas en esta tesis.

Para esta PCR se utilizaron los *primers*: Flavi-1: 5'- ATG TAC GCT GAT GAC ACA GCC TGG CTG GGA CAC- 3'; y Flavi-2: 5'- TCC AGA CCT TCA GCA TGT CTT CTG TGG TCA TCC A- 3'. Estos *primers* amplifican una región de 854 pb de DENV-1 y DENV-2; 857 pb de DENV-3 y DENV-4; y 863 pb de YFV, WNV, JEV y SLEV (ver figura 4).

La mix de reacción para la PCR fue preparada en un volumen final de 50 µL conteniendo: buffer de reacción 1X; 1,5 mM de cloruro de magnesio (MgCl₂); 200 µM de dNTP's; 30 pmol de *primers* Flavi-1 y Flavi-2; 2,5 U de la enzima *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) y H₂O bidestilada y deionizada. A los 45 µL de la mix se le adicionaron 5 µL de ADNc. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador programable 2720 *ThermalCycler* (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones:

- 1) 2 min a 94°C (para la desnaturalización).

- 2) 35 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 94°C; 1 min a 58°C (temperatura de *annealing* de los *primers*); 2 min a 72°C (activación de la enzima *Taq DNA Polymerase*).
- 3) 10 min de extensión a 72°C y un período final a 4°C.

3.5.b. Puesta a punto de una Nested-PCR para la región NS5 descripta por Vázquez y cols., 2011.

La metodología reportada por Vázquez y cols. (2011), plantea la amplificación de una región parcial del gen NS5, utilizando cuatro *primers* genéricos que detectan diferentes Flavivirus. Los *primers* 1NS5F: 5'- GCA TCT AYA WCA YNA TGG G -3' y 1NS5Re: 5'- CCA NAC NYN RTT CCA NAC -3', amplifican una región de 1111 pb para los diferentes Flavivirus en un primer round de PCR (ver figura 4).

La mix para el primer round de la PCR fue preparada en un volumen final de 50 µL conteniendo: buffer de reacción 1x; 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTP's; 60 pmol de los *primers* 1NS5F y 1NS5Re; 2,5 U de la enzima *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) y H₂O bidestilada y deionizada. A los 45 µL de la mix se le adicionaron 5 µL de ADNc, incubándose bajo las siguientes condiciones:

- 1) 10 min a 94°C.
- 2) 40 ciclos de: 1 min a 94°C; 1 min a 50°C; 2 min a 72°C.
- 3) 10 min a 72°C y un período final a 4°C.

Usando como molde 1 µL del producto del primer round de PCR se realizó una Nested-PCR con *primers* internos: 2NS5F: 5'- GCN ATN TGG TWY ATG TGG -3' y 2NS5Re: 5'- CAT RTC TTC NGT NGT CAT CC -3' (ver figura 4). Estos *primers* amplifican una región de 1019 pb de la región NS5 de los diferentes Flavivirus. La mix de reacción se realizó de igual forma que la del primer round con la sustitución de los *primers*, incubándose bajo las siguientes condiciones:

- 1) 2 min a 94°C.
- 2) 40 ciclos de: 1 min a 94°C; 1 min a 50°C; 2 min a 72°C.
- 3) 10 min a 72°C y un período final a 4°C.

3.5.c. Puesta a punto de una Heminested-PCR para la región NS5 descripta por Scaramozzino y cols., 2000.

La metodología reportada por Scaramozzino y cols. (2000), plantea la amplificación de una región parcial del gen NS5 a través de una Heminested-PCR, lo que aumenta la

sensibilidad respecto a otras técnicas. Asimismo, ha sido reportada su utilidad para la detección directa a partir de LCR de pacientes con encefalitis.

Para esta metodología se utilizan *primers* genéricos que detectan diferentes Flavivirus, haciendo hincapié en los Flavivirus que integran complejos antigénicos de interés médico (Dengue, Encefalitis Japonesa y Fiebre Amarilla), así como los principales virus transmitidos por garrapatas como el TBEV (ver tabla 1). Los *primers* degenerados: MAMD: 5'- AAC ATG ATG GGR AAR AGR GAR AA -3' y cFD2: 5'- GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA GC -3', amplifican una región de 262 pb del gen NS5 de diferentes Flavivirus en un primer round de PCR (ver figura 4).

La mix para la PCR fue preparada en un volumen final de 50 µL conteniendo: buffer de reacción 1x; 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTP's; 25 pmol de los *primers* MAMD y cFD2; 2,5 U de la enzima *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) y H₂O bidestilada y deionizada. A los 45 µL de la mix se le adicionaron 5 µL de ADNc. Las reacciones de amplificación se realizaron bajo las siguientes condiciones:

- 1) 10 min a 94°C.
- 2) 30 ciclos de: 1 min a 94°C; 1 min a 53°C; 2 min a 72°C.
- 3) 10 min a 72°C y un período final a 4°C.

Usando como molde 1 µL del producto del primer round se realizó una Heminested-PCR con los *primers*: cFD2: 5'- GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA GC -3'; FS778: 5'- AAR GGH AGY MSD GCH ATH TGG T -3'. Estos *primers* amplifican una región de 214 pb del gen NS5 de diferentes Flavivirus (ver figura 4). Se realizó una mix idéntica a la del primer round con la sustitución de los *primers*, y se incubó bajo las siguientes condiciones:

- 1) 2 min a 94°C.
- 2) 35 ciclos de: 1 min a 94°C; 1 min a 54°C; 2 min a 72°C.
- 3) 10 min a 72°C y un período final a 4°C.

3.5.d.i. Puesta a punto de una Real Time PCR (qPCR) llevada a cabo modificando el protocolo descrito por Scaramozzino y cols., 2000.

Para la realización de la PCR cuantitativa se adaptó el protocolo de Scaramozzino y colaboradores (2000). La importancia de esta metodología radica en la alta sensibilidad, ya que permite la detección directa de Flavivirus a partir de diferentes muestras clínicas, así como la rapidez, lo que es sumamente valioso en especial para fines diagnósticos. Se utilizaron los *primers* MAMD y cFD2 que amplifican una región de 262 pb (ver figura 4).

La mix fue preparada en un volumen final de 25 μL conteniendo: 10 μL de *Master Mix Kapa 2x* (Kapa Biosystems); 1 μL de los *primers* MAMD y cFD2 (10 μM); y 6 μL de H_2O bidestilada y deionizada. Posteriormente se le adicionaron 2 μL de ADNc para obtener una mix final de 20 μL .

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador *Rotor-Gene 6000* (Corbett Life Science) bajo las siguientes condiciones:

- 1) 3 min a 95°C.
- 2) 40 ciclos de: 3 segundos (seg) a 95°C; 20 seg a 53°C; 20 seg a 72°C.
- 3) Período de *melting* de 60°C a 90°C, con posterior incubación por 1 min a 60°C.

3.5.d.ii. Ensayo de sensibilidad de la qPCR.

Con el fin de determinar la sensibilidad de la qPCR puesta a punto previamente, se procedió a realizar una dilución seriada de los ARN de DENV-3 provenientes del LF-FIOCRUZ: Cepa *H-87*. Se realizaron diluciones seriadas al décimo hasta la dilución 1/100000.

Posteriormente se realizó una RT de cada una de las diluciones (descrita en punto 3.4.) y se procedió al realizar el ensayo de qPCR descrito en el punto anterior.

3.6. Confirmación de productos amplificados.

3.6.a. Electroforesis.

Los productos de PCR obtenidos mediante las metodologías descritas en 3.5 fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 1,2% y la tinción del mismo se realizó con SYBR Green. Los geles fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta y fueron fotografiados en un procesador de imágenes *UNIVERSAL HOOD II* de BIO-RAD.

3.6.b. Purificación de productos de PCR.

Los amplicones resultantes fueron purificados (desde el mismo tubo de amplificación o luego de recortarse de los geles de agarosa), mediante el kit *PCR Purification Kit* de Invitrogen, según las instrucciones suministradas por el fabricante.

3.6.c. Secuenciación.

Los productos purificados fueron secuenciados por la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Institut Pasteur de Montevideo, en un secuenciador automático de 4 capilares ABI3130 de Applied Biosystems. Todos los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones a los efectos de evitar cualquier discrepancia posible. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa *Seqman* implementado en el paquete *DNASTar 5.01* (DNASTAR, Madison, USA). Las secuencias editadas fueron analizadas con el algoritmo Nucleotide BLAST (NCBI) para corroborar su identidad.

3.7. Análisis de muestras provenientes de pacientes con síntomas clínicos compatibles con infecciones por Flavivirus.

Se procedió al análisis de las 24 muestras de suero descritas en 3.3.b. Inicialmente, se extrajo el ARN total a partir de 200 µL de suero, utilizando el kit *QIAmp Viral RNA* de QIAGEN, de acuerdo con instrucciones suministradas por los fabricantes. El ARN obtenido fue retrotranscrito tal como se indica en 3.4. Finalmente, los ADNc fueron sujetos a una Heminested-PCR según se detalla en el punto 3.5.c.

3.8. Obtención de controles positivos de amplificación.

Debido a la dificultad anteriormente mencionada para la obtención de controles positivos, decidimos generar productos de PCR de una longitud suficiente para servir como moldes de amplificación en cualquiera de las metodologías descritas. Es por ello que decidimos obtener amplicones de 1111 pb, mediante el protocolo de Vázquez y cols. (2011) detallado en 3.3.b (primer round). Este fragmento comprende las regiones amplificables de las PCR que se abordaron en ese proyecto (ver figura 4). Si bien estos productos no son los controles positivos ideales ya que no sirven como controles de extracción ni retrotranscripción, sí permiten validar el proceso de amplificación. La obtención de gran cantidad de este producto nos permitirá contar con controles de amplificación en el futuro.

3.8.a. RT-PCR Vazquez y cols. 2011

Se procedió en una primera instancia a la amplificación y purificación (utilizando un kit comercial *PCR Purification Kit* de Invitrogen) de una región de 1111 pb previamente amplificada mediante el protocolo de Vázquez y cols. (2011). Ésta amplificación se llevó a cabo con muestras de ADNc de las cepas *NG-C* (DENV-2) y *H-87* (DENV-3). Como se comentó anteriormente, estos controles fueron proporcionados por el LF-FIOCRUZ, Río de Janeiro, Brasil.

3.8.b. Purificación de los productos amplificados

Dado que se obtuvo una banda más fuerte del producto de amplificación de *H-87* (DENV-3), se realizó la purificación del gel de agarosa de este producto obtenido en este primer round de PCR mediante el kit *PCR Purification Kit* de Invitrogen, según las instrucciones suministradas por el fabricante.

3.8.c. Clonación y transformación.

Se ligó el purificado obtenido de esta PCR en un vector *pGEM[®]-T Easy* (Promega) realizando la siguiente mix: 5 μ L de buffer de ligación 2x; 1 μ L del vector *pGEM[®]-T Easy* (50ng/ μ L); 1 μ L de DNA Ligasa T4 (3U/ μ L); y 3 μ L del producto de purificado. La mix se incubó a 4°C *overnight*.

Se transformaron células *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1-Blue por shock térmico. Esta cepa de *E. coli* presenta delección del operón Lac y un episoma con el Gen Lac Z cuyo producto es la *b-Galactosidasa*. Se produce *b-Galactosidasa* cuando la información faltante en el episoma es provista por el plásmido. Se procedió a agregar 5 μ L del producto de ligación a un tubo conteniendo 50 μ L de la células *E. coli* quimiocompetentes, incubándose en hielo por 20 min. Posteriormente se realizó el *shock térmico* por 1 min a 42°C. Inmediatamente se adicionaron 500 μ L de medio LB y se incubó a 37° por 1 hora con agitación a 220 revoluciones por minuto (rpm).

Las células XL1 transformantes fueron plaqueadas, en condiciones asépticas, en placas de LB-agar con ampicilina (100 μ g/mL). Estas placas fueron previamente preparadas con 40 μ L de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -Dgalactopiranosido) 20 ng/ μ L y 7 μ L de IPTG (isopropil β -tiogalactopiranosido) 1M. El X-Gal da un color azul cuando es hidrolizado por la β -Galactosidasa, mientras que el IPTG es un inductor de Lac Z. Se sembraron, en primer lugar, 150 μ L de las células transformantes en cada placa. Las células restantes se centrifugaron a máxima velocidad por 30 seg, descartándose el sobrenadante. El pellet celular fue resuspendido en 150 μ L de LB y posteriormente plaqueado en las placas LB-ampicilina. Una vez culminado el proceso se dejaron las placas en estufa a 37 °C durante toda la noche.

Se realizó la selección de colonias blancas que contenían el inserto de interés. Para esto se prepararon tubos con 4 μ L de LB y se adicionó 1 μ L de ampicilina. Se picaron cuatro colonias blancas, introduciendo el tip en el tubo de crecimiento correspondiente e incubándose a 37°C con agitación a 220 rpm durante 18 horas.

3.8.d. Minipreps por lisis alcalina.

Una vez pasadas las 16 horas, se procedió a tomar 2 mL del cultivo y se centrifugó a 12000 rpm por 3 min, descartándose el sobrenadante, para proceder a la extracción del plásmido por lisis alcalina.

El precipitado se resuspendió en 100 μ L de solución fría I conteniendo: glucosa 50mM, 25mM de Tris-Cl (pH=8) y 10nM de EDTA (pH=8). A cada tubo se le adicionó 200 μ L de solución fresca II conteniendo: 0,2N de NaOH y SDS al 1% (peso/volumen). Se incubó en hielo por 5 min y se adicionó 150 μ L de solución III conteniendo: 60 mL de acetato de potasio 5M, 11,5 mL de ácido acético glacial y 28,5mL de H₂O bidestilada y deionizada. Se incubó en hielo por 5 min y luego se centrifugó a máxima velocidad por 8 min, descartándose el precipitado. Al sobrenadante (conteniendo el ADN plasmídico) se le adicionaron 800 μ L de EtOH 100% y se centrifugó a máxima velocidad por 5 min a 4 °C. El precipitado resultante se lavó con 1mL de EtOH 70% y se centrifugó a máxima velocidad por 2 min a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se dejó secar el precipitado, que fue luego resuspendido en 50 μ L de H₂O bidestilada y deionizada con 1 μ L de la enzima ARNasa (10 mg/mL). Se incubó por 10 min a 65°C.

3.8.e. Verificación de la presencia del inserto por digestión con EcoRI.

Se procedió a la digestión de las cuatro minipreps para liberar el inserto de interés del Vector *pGEM[®]-T Easy* utilizando la enzima EcoRI. A 10 μ L de ADN de cada miniprep se le adicionaron 2 μ L de Buffer 10x de la enzima EcoRI, 10 unidades de EcoRI y 7 μ L de H₂O bidestilada y deionizada. Esto se incubó por 2 horas a 37°C.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Revisión bibliográfica.

A fin de conocer los diferentes protocolos moleculares reportados para la detección e identificación de virus pertenecientes al género Flavivirus, se investigaron diversas metodologías de diagnóstico molecular reportadas en la base de datos bibliográfica (Pubmed) y se evaluaron las que resultaban ser más apropiadas para los objetivos planteados.

Se valoraron especialmente que las técnicas no requirieran aislamiento en cultivo celular dado que en Uruguay no nos es posible llevar a cabo este tipo de metodologías para virus exóticos. Asimismo, este abordaje resulta inconveniente cuando un diagnóstico temprano es necesario debido al tiempo que insume.

Se consideraron 3 artículos científicos que se ajustaban a nuestros requerimientos:

1 Ayers y cols., 2006: describe una PCR a tiempo final con los *primers* Flavi1 y Flavi2 que amplifican una región de aproximadamente 860 pb de la región genómica que codifica para la NS5.

2 Scaramozzino y cols., 2000: describe una Heminested-PCR con los *primers* MAMD, cFD2 y FS778 que amplifican una región final de 214 pb de la región genómica que codifica para la NS5.

3 Vázquez y cols., 2011: describe una Nested-PCR con los *primers* 1NS5F, 1NS5Re, 2NS5F y 2NS5Re que amplifican una región final de 1019 pb de la región genómica que codifica para la NS5.

Estas técnicas de PCR (detalladas en materiales y métodos) son efectivas para detectar diversos Flavivirus, haciendo hincapié particularmente en los de mayor importancia para la salud humana (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, JEV, SLEV, TBEV, WNV y YFV).

4.2. Evaluación y optimización de protocolos mediante análisis bioinformáticos.

4.2.a. Evaluación de *primers*.

Con el objetivo de evaluar *in silico* la especificidad de los *primers* reportados por cada metodología considerada (Ayers y cols., 2006; Scaramozzino y cols., 2000;

Vázquez y cols., 2011), se generó un dataset de secuencias nucleotídicas de diversos Flavivirus. Para ello se descargaron secuencias correspondientes al gen NS5 completo de 49 miembros del género Flavivirus (Tabla 1). Los *primers* de cada protocolo fueron alineados con este dataset inicial, que luego fue procesado de acuerdo a las longitudes amplificables por cada metodología, obteniéndose 3 nuevos conjuntos de datos: de 1019 pb (Vázquez y cols., 2011), 863 pb (Ayers y cols., 2006) y 214 pb (Scaramozzino y cols., 2000).

A partir de este análisis se desprendió que la identidad del *primer* FS778 (5'- AAR GGH AGY MCD GCH ATH TGG T- 3'), reportado por Scaramozzino y cols. (2000), presenta una base que no se corresponde con ningún Flavivirus considerado. Más específicamente, presenta una Citosina en la undécima posición (indicada en negrita y cursiva) que corresponde al sitio 68 de la NS5, en el cual el 100% de las secuencias analizadas presentan una Guanina. Se dedujo que pudo haber un error a la hora de reportar este *primer* por lo que solicitamos su síntesis sustituyendo esta C por una S (nucleótido degenerado C/G) con el fin de mejorar la eficiencia de amplificación. El resto de los *primers* utilizados a lo largo de esta tesis se corresponde con los reportados en los artículos mencionados (ver tabla 2).

4.2.b. Mapeo de máxima verosimilitud.

Con el objetivo de evaluar la señal filogenética contenida en cada set de datos, se sometieron los 4 alineamientos diferentes (NS5 completa y regiones parciales amplificables) a un análisis de mapeo de máxima verosimilitud (*likelihood mapping*). Los resultados se resumen en la figura 5.

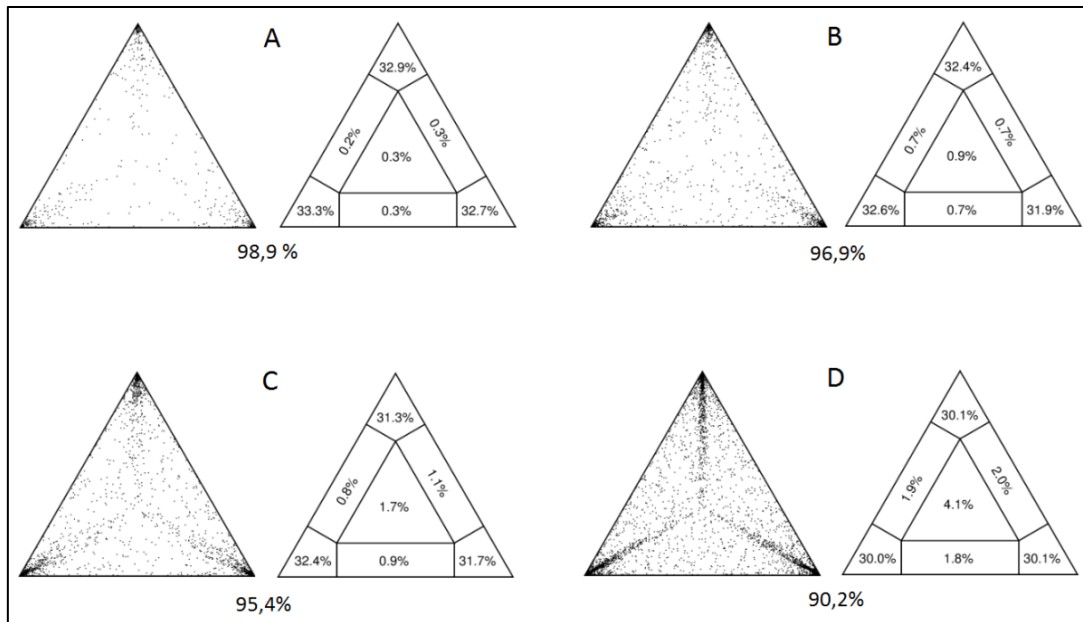


Figura 5: Mapeo de verosimilitudes. Se observan los resultados obtenidos al analizar los alineamientos del gen NS5 completo (A), y de regiones parciales amplificables por los diferentes protocolos: (B) 1019 pb (Vázquez y cols., 2011); (C) 863 pb (Ayers y cols., 2006); (D) 214 pb (Scaramozzino y cols., 2000). En cada caso se indican dos triángulos correspondientes al patrón de distribución (izquierda) y al resumen de porcentajes obtenidos (derecha). El porcentaje de árboles bien resueltos se aprecia en los vértices de los triángulos, en comparación con las topologías no resueltas (centro) y parcialmente resueltas (aristas). Asimismo, se indica el porcentaje total de árboles bien resueltos para cada caso (debajo).

Se observa una variación en el porcentaje de árboles bien resueltos de acuerdo al dataset considerado, con valores de 98,9% (gen NS5 completo; 2772 pb), 96,9% (1019 pb), 95,4% (863 pb) y 90,2% (214 pb) (Figuras 5A, 5B, 5C y 5D, respectivamente). Asimismo, el porcentaje de árboles sin resolver aumenta a medida que la información filogenética disminuye, como lo indican los valores obtenidos: 0,3% (5A); 0,9% (5B); 1,7% (5C) y 4,1% (5D).

Este análisis permitió evaluar la robustez de cada región genética considerada, para la realización de análisis con vistas a investigar las relaciones filogenéticas entre distintos miembros del género *Flavivirus*. Como es lógico, a medida que se disminuye la longitud del alineamiento, también lo hace la señal filogenética. Esto se aprecia al observar una reducción del porcentaje de topologías bien resueltas, asociada a una disminución de la longitud del alineamiento. Sin embargo, a partir de este análisis podemos interpretar que todos los alineamientos tienen un fuerte apoyo estadístico para realizar inferencias filogenéticas debido a que el porcentaje de árboles bien resueltos supera el 90% en todos los casos.

4.2.c. Análisis Filogenéticos.

Con el fin de investigar las relaciones filogenéticas existentes entre los miembros del género *Flavivirus*, se realizaron análisis filogenéticos a partir de los alineamientos correspondientes tanto al gen NS5 completo, como a las regiones amplificables por cada protocolo descripto. En todos los casos, se evaluó el modelo evolutivo que mejor se ajustaba a los datos de secuencias, para realizar árboles filogenéticos de ML (Figura 6). El modelo de sustitución nucleotídica óptimo resultó ser en todos los casos GTR (*General Time Reversible*) + gama (Γ) + sitios invariables (I), exceptuando el dataset que contempla regiones amplificadas por Scaramozzino y cols., (2000) que se ajusta mejor por el modelo *Tamura Nei* (TN) + gama + I.

Los resultados se resumen en la figura 6 e indican que los distintos *Flavivirus* se agrupan en clados genéticos claramente separados de acuerdo al vector que lo transmite o a su complejo antigénico. Se distingue un clado evolutivamente distante al resto (en negro) que está integrado por especies que infectan únicamente mosquitos, con hospederos vertebrados desconocidos hasta el momento (AEFV, CFAV, CFV, KRV, PCV y QBV).

Asimismo, los *Flavivirus* que no poseen un vector conocido hasta el momento (APOIV, MMLV, MODV y RBV), se encuentran estrechamente relacionados formando un clado único en todos los casos (en gris). También se pueden observar agrupados todos los *Flavivirus* que son transmitidos por garrapatas (en rojo), distinguiéndose en dos subclados las especies que infectan a aves (MEAV, SREV y TYUV) de las que tienen hospederos mamíferos (GGEV, GGYV, KSIV, KYDV, LGTV, LIV, OHFV, POWV, RFV, SSEV y TBEV). Entre ambos subclados se ubica un virus que infecta mamíferos (KADV), pero que de acuerdo a dos de las regiones parciales analizadas (figuras 6B y 6C) aparenta tener una relación genética más estrecha con los virus aviares.

Por otra parte, todos los virus transmitidos por mosquitos a vertebrados se encuentran agrupados de acuerdo a los determinantes antigénicos que comparten. Se distinguen en complejos antigénicos denominados: Dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4); Fiebre amarilla (BANV, BOUV, EHV, JUGV, SABV, SEPV, UGSV, WESSV y YFV); Encefalitis Japonesa (ALFV, JEV, KOUV, MVEV, SLEV, UV, WNV y YAOV); y Ntaya (BAGV, DEDSV y NTAV), indicados en verde, violeta, azul y mostaza, respectivamente.

Si bien se observa una pequeña diferencia entre el miembro KDAV en el árbol que comprende la región más pequeña de la NS5 (214 pb) con los árboles de secuencias parciales de mayor tamaño, se mantiene la tendencia de seguir agrupando con los *Flavivirus* transmitidos por garrapatas. Por este motivo este cambio no se considera significativo ya que la topología general del árbol se conserva en los cuatro casos analizados.

Los resultados de estos análisis confirman la utilidad de las diferentes regiones genómicas consideradas para inferir relaciones filogenéticas. La topología del árbol filogenético generado con el alineamiento más pequeño (214 pb) es altamente similar a la obtenida cuando se consideraron secuencias completas del gen NS5 (2772 pb). Esto indica que las regiones parciales amplificables por las diferentes metodologías investigadas, no sólo presentan una fuerte señal filogenética, sino que permiten deducir relaciones filogenéticas finas (por ejemplo, diferenciar entre distintos complejos antigénicos) con sensibilidad similar a la comparación de secuencias del gen NS5 completo. Esto permite afirmar las metodologías utilizadas en el marco de esta tesis son apropiadas tanto para fines diagnósticos como para desarrollar análisis taxonómicos.

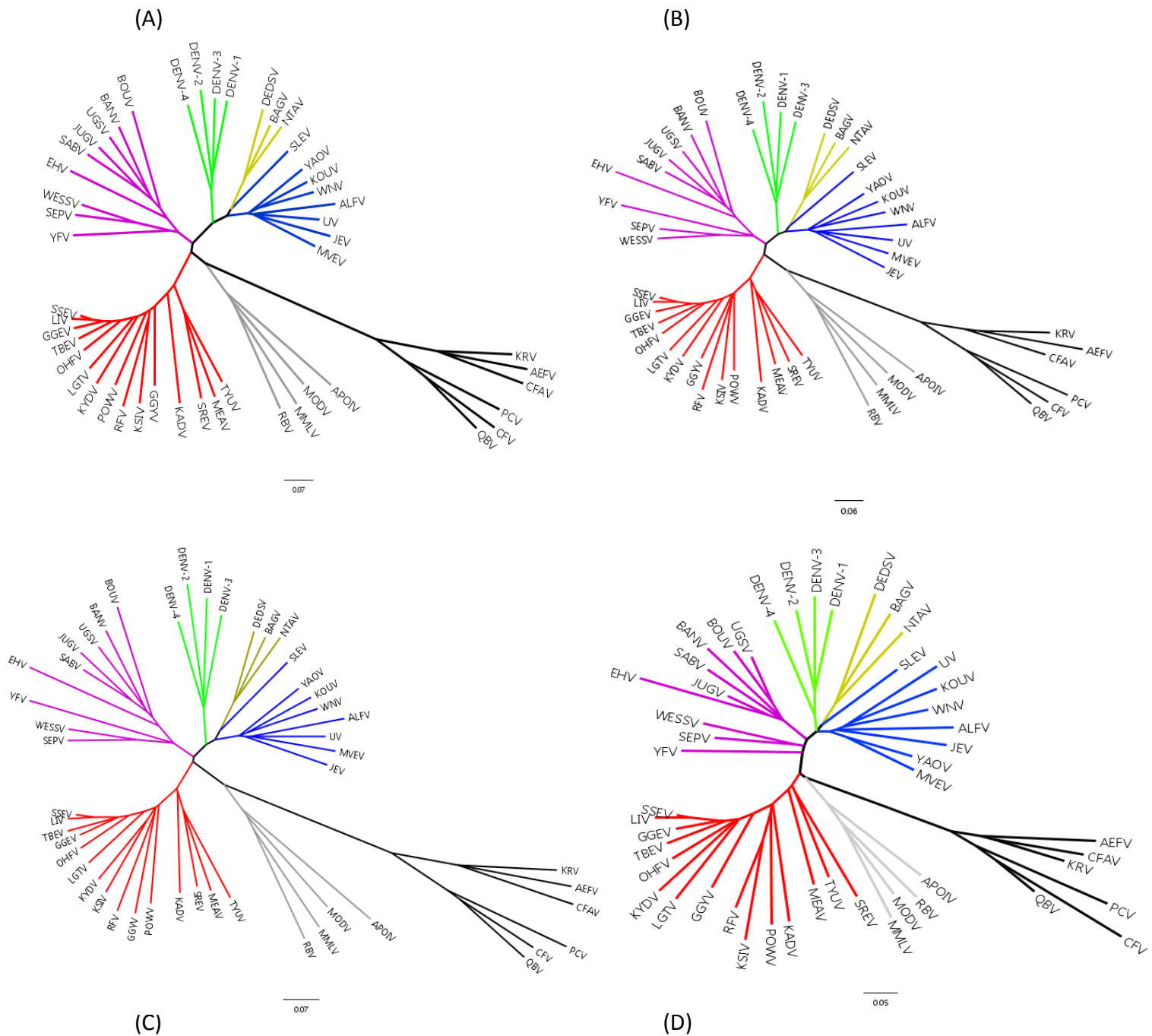


Figura 6: Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud generados a partir del análisis de los diferentes datasets: (A) secuencias completas del gen NS5 (2772 pb), modelo evolutivo GTR + Γ + I; regiones amplificables según (B) Vázquez y cols., 2011 (1019 pb), modelo evolutivo GTR + Γ + I; (C) Ayers y cols., 2006 (aproximadamente 860 pb), modelo evolutivo GTR + Γ + I; y (D) Scaramozzino y cols., 2000 (214 pb), modelo evolutivo TN + Γ + I. Todas las especies se agrupan según sus complejos antigénicos y/o vector de transmisión según se indica a continuación: Complejo antigénico Fiebre Amarilla (Violeta); Complejo antigénico Dengue (Verde); Complejo antigénico Ntaya (Mostaza); Complejo antigénico Encefalitis Japonesa (Azul); Flavivirus con vector garrapata (Rojo); Vector desconocido (Gris); Sin hospedero vertebrado conocido (Negro). Las barras de escala denotan distancia genética. Los valores de bootstrap son superiores a 70% en todos los clados y no se indican con el fin mejorar la visualización de los diferentes árboles.

4.3. Puesta a punto de diferentes metodologías de RT-PCR para la detección y clasificación de virus pertenecientes al género Flavivirus.

Con el propósito de poder contar con metodologías sensibles para la detección e identificación de virus pertenecientes al género Flavivirus se realizaron las puestas a punto en nuestro laboratorio de las metodologías moleculares seleccionadas luego de una exhaustiva búsqueda bibliográfica y evaluación a nivel filogenético.

Como mencionamos anteriormente, de acuerdo a este relevamiento, las metodologías más aptas para la detección por métodos moleculares de virus pertenecientes al género Flavivirus fueron las descritas por Ayers y cols., 2006; Scaramozzino y cols., 2000; Vázquez y cols., 2011.

Para la puesta a punto de las técnicas seleccionadas se utilizaron como controles positivos ADNc obtenidos a partir de RTs realizadas con primers aleatorios a partir de muestras de ARN viral de los 4 serotipos de DENV: Cepas *Hawaii* (DENV-1), *NG-C* (DENV-2), *H-87* (DENV-3) y *H-241* (DENV-4). Asimismo, en todos los casos, se adicionaron los controles negativos correspondientes.

4.3.a. Puesta a punto de la metodología a tiempo final descripta por Ayers y cols., 2006.

Se realizó la puesta a punto de esta PCR para la región NS5 descrita por Ayers y cols. (2006). Mediante esta metodología se amplifica una región parcial del gen NS5 de tamaño variable: 854 pb (DENV-1 y DENV-2); 857 pb (DENV-3 y DENV-4); y 863 pb (YFV, WNV, JEV y SLEV).

En la figura 7 se visualiza el gel de electroforesis en el que se corrieron los productos de PCR obtenidos a partir de esta técnica. Se aprecian bandas en los carriles 2, 3, 4 y 5 correspondientes a DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, respectivamente. La altura de las bandas fue la esperada que se corresponde con un peso molecular de aproximadamente 860 pb.

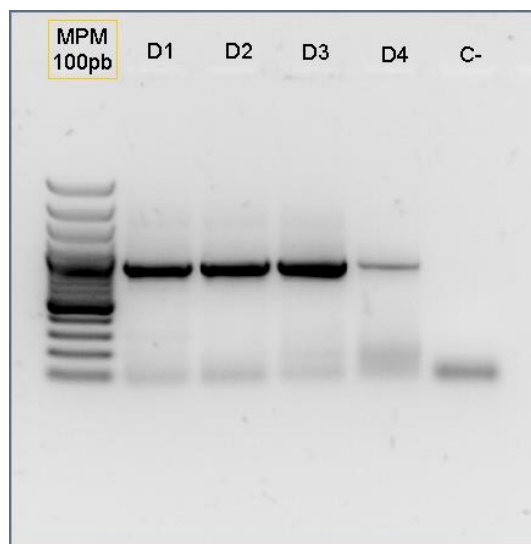


Figura 7: Gel de agarosa al 1,2% de los productos de PCR obtenidos a partir de la puesta a punto del protocolo de Ayers y cols. (2006). Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; carriles 2, 3, 4 y 5: productos de PCR de cepas prototipo de DENV-1, 2, 3 y 4, respectivamente; carril 6: Control negativo.

Asimismo no se observa banda en el carril correspondiente al control negativo.

Los resultados obtenidos nos indican la exitosa puesta a punto en nuestro laboratorio del protocolo descrito por Ayers y cols. (2006) para la amplificación de una región interna del gen que codifica para la NS5 mediante RT-PCR.

4.3.b. Puesta a punto de la Nested-PCR descrita por Vázquez y cols., 2011.

Para la puesta a punto de esta PCR se utilizó un juego de *primers* que amplifica una región interna de la NS5 de diversos Flavivirus: 1111 pb en el primer round y 1019 pb en el segundo round (ver tabla 2). Se llevó a cabo el primer round de PCR con los *primers* 1NS5F y 1NS5Re. Utilizando 1 μ L de cada uno de los productos de este *primer* round como muestra, se procedió a realizar el segundo round de PCR con los *primers* 2NS5F y 2NS5Re. Los productos de este segundo round se visualizaron en un gel de agarosa al 1,2%.

En la figura 8 se pueden observar los resultados obtenidos luego de la segunda ronda de amplificación. Como se puede apreciar se obtuvieron bandas de 1019 pb en los carriles 3, 4 y 5 correspondientes a DENV-2, DENV-3 y DENV-4, respectivamente, no así en el carril 2 (correspondiente a DENV-1).

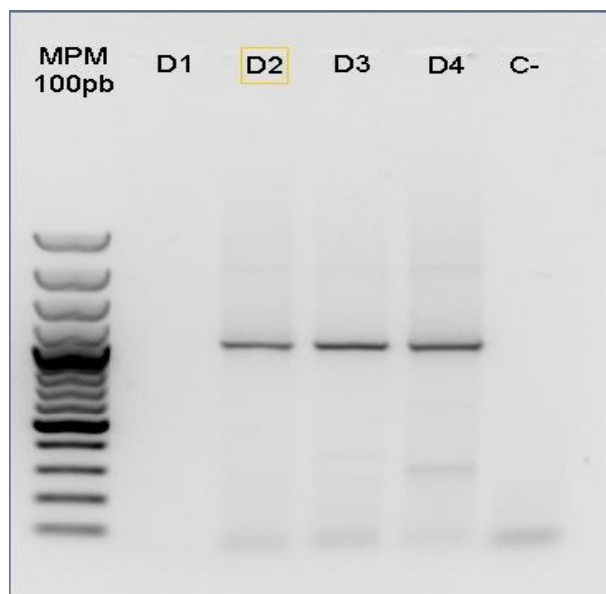


Figura 8: Gel de agarosa al 1,2% de los productos de PCR amplificados mediante el protocolo de Vázquez y cols. (2011). Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; carriles 2, 3, 4 y 5: Productos de PCR de cepas prototipo de DENV-1, 2, 3 y 4, respectivamente; carril 6: Control negativo.

Para corroborar el correcto apareamiento de los *primers* utilizados con la cepa prototipo de DENV-1 (*Hawaii*), se alinearon sus secuencias nucleotídicas mediante el programa MEGA 5. El alineamiento indicó que los *primers* se aparean correctamente por lo que descartamos la posibilidad de que estos *primers* no fueran específicos para este serotipo. Por consiguiente, los resultados de este ensayo podrían explicarse por una menor concentración del control DENV-1 con respecto al resto de los controles, lo que dificulta la amplificación de un fragmento superior a 1000 pb. Asimismo, no podemos descartar que haya habido un error en la manipulación.

Por otra parte, no se observó banda en el carril correspondiente al control negativo, por lo cual se puede afirmar que no hubo contaminación en el ensayo de PCR.

Los resultados obtenidos nos indican la exitosa puesta a punto en nuestro laboratorio del protocolo descrito por Vázquez y cols. (2006) para la amplificación de una región interna del gen que codifica para la NS5 mediante RT-Nested-PCR.

4.3.c. Puesta a punto de la Heminested-PCR para la región que codifica para la NS5 descrita por Scaramozzino y cols., 2000.

Se realizó la puesta a punto de la Heminested-PCR para la región parcial de NS5 descrita por Scaramozzino y cols. (2000). Se utilizó un juego de *primers* que amplifica un fragmento de 262 pb luego de una primera ronda de amplificación y 214 pb luego de la segunda ronda de amplificación (ver tabla 2).

En la figura 9 se pueden observar los resultados obtenidos luego de la segunda ronda de amplificación. Como se puede apreciar se obtuvieron bandas de 214 pb en los carriles 2, 3, 4 y 5 correspondientes a DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, respectivamente.

A diferencia de la Nested-PCR realizada, utilizando este protocolo fue posible amplificar los 4 serotipos. Esto puede deberse a la diferencia entre los tamaños de los amplicones que se obtienen mediante ambas técnicas (1019 vs 214 pb). En el carril correspondiente al control negativo no se observó banda lo cual confirma que no hubo contaminación en el ensayo de PCR.

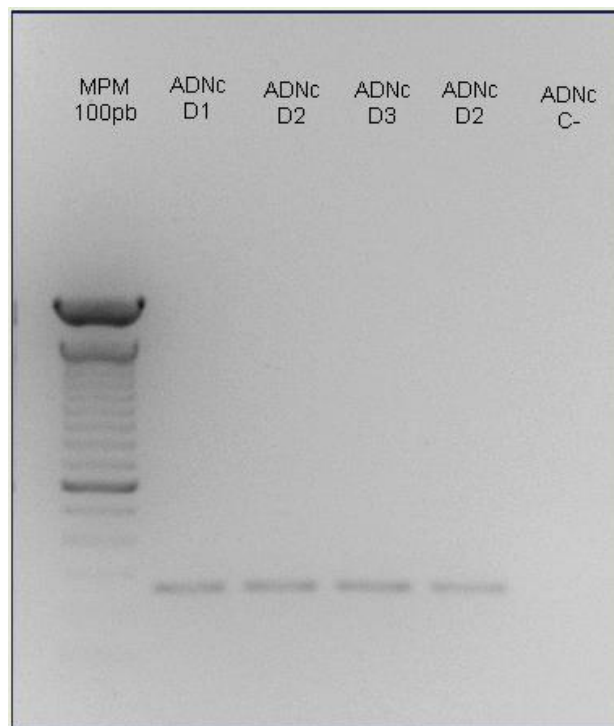


Figura 9: Gel de agarosa al 1,2% de los productos de PCR amplificados mediante el protocolo de Scaramozzino y cols. (2000). Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; carriles 2, 3, 4 y 5: Productos de PCR de cepas prototipo de DENV-1, 2, 3 y 4, respectivamente; carril 6: Control negativo.

Los resultados obtenidos sugieren una mayor sensibilidad de esta última metodología con respecto a la propuesta por Vázquez y cols. (2011). En particular, la mayoría de las técnicas de diagnóstico para Flavivirus requieren del aislamiento en cultivo celular debido a la baja carga viral que contienen, sumado a que la fase virémica en este tipo de infecciones es baja (por ejemplo, 3-5 días para DENV). En base a ello, consideramos que dentro de las PCR a tiempo final evaluadas, las técnicas de Heminested-PCR descrita por Scaramozzino y cols. (2000), así como la PCR descrita por Ayers y cols. (2006) son las más sensibles y por lo tanto las más apropiadas para llevar a cabo el diagnóstico en muestras clínicas.

4.3.d.i. Puesta a punto de una qPCR llevada a cabo modificando el protocolo descrito por Scaramozzino y cols., 2000.

A modo de contar con un ensayo molecular más sensible, más rápido y potencialmente cuantitativo, que los mencionados anteriormente, se procedió a la puesta a punto de una qPCR mediante la adaptación del protocolo a de Scaramozzino y cols. (2000).

La importancia en el desarrollo de una qPCR radica en que permite mejorar la relación costo-beneficio con respecto a la Heminested-PCR dado que se utiliza un solo juego de *primers* y se basa en un único round de amplificación. Este hecho no sólo disminuye los riesgos de contaminación, sino que permite una mayor sensibilidad y rapidez que una PCR a tiempo final. En base a todas las ventajas mencionadas anteriormente, consideramos esta metodología como la más apropiada para ser transferible a un laboratorio de diagnóstico clínico.

Para la puesta a punto de esta metodología se utilizó el juego externo de *primers* (MAMD-cFD2) que amplifican una región de la NS5 de 262 pb, así como el juego de *primers* (FS778 y cFD2) que amplifican una región de la NS5 de 214 pb (ver figura 4). Se utilizaron los ADNc derivados de las cepas prototipo de los 4 serotipos de DENV como controles de amplificación. Los resultados indicaron una mayor eficiencia de la qPCR para el juego de *primers* MAMD-cFD2.

Como se muestra en la figura 10, se logró la amplificación de los 4 serotipos de DENV. Los amplicones obtenidos fueron posteriormente separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1,2% (ver figura 11). En el gel se pueden observar bandas intensas y bien definidas para los cuatro serotipos, a diferencia del carril correspondiente al control negativo donde no se observó producto amplificado.

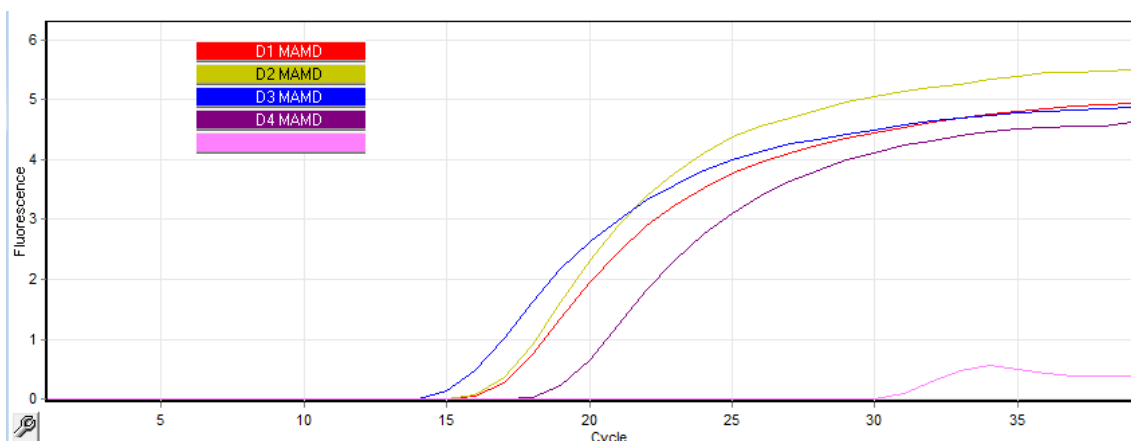


Figura 10: qPCR con protocolo adaptado de Scaramozzino y cols. (2000) para los diferentes serotipos de DENV. Se observan en los colores rojo, verde, azul y violeta los productos amplificados de DENV-1, 2, 3 y 4, respectivamente; en color rosado se visualiza el control negativo.

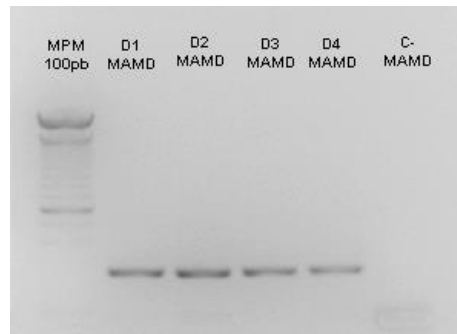


Figura 11: Gel de agarosa al 1,2% de los productos amplificados mediante la real time PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; carriles 2, 3, 4 y 5: Productos de Real time PCR de cepas prototipo de DENV-1, 2, 3 y 4; carril 6: Control negativo.

En la figura 12 podemos apreciar las curvas de *melting* correspondientes a las 4 muestras analizadas.

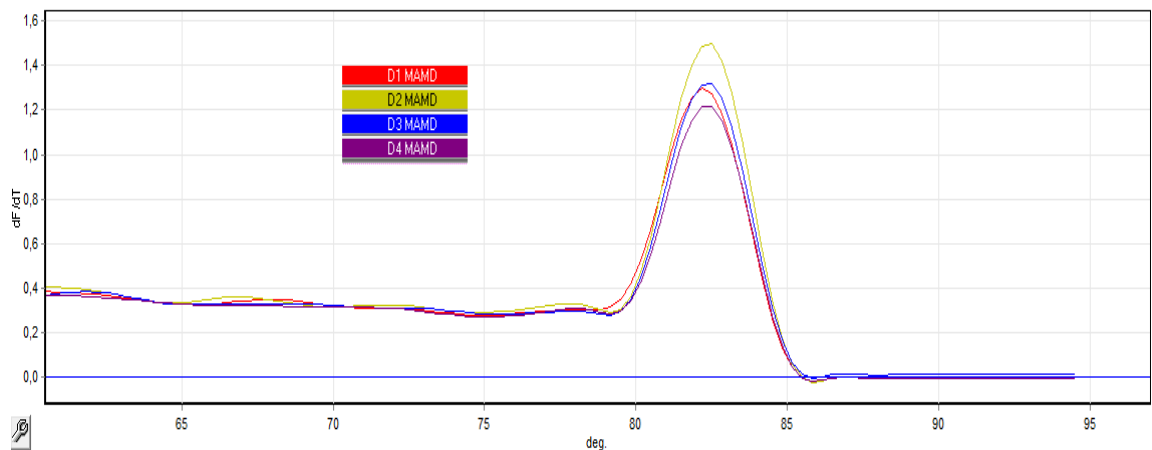


Figura 12: Curva de *Melting* de qPCR con protocolo adaptado de Scaramozzino y cols. (2000). En la figura se observan los resultados con los primers MAMD y cFD2 que amplifican una región de 262 pb. Se visualizan las curvas de *melting* de DENV-1, 2, 3 y 4 en los colores rojo, verde, azul y violeta, respectivamente.

Los resultados nos permiten concluir que se realizó una exitosa puesta a punto de una qPCR para la detección e identificación de virus pertenecientes al género Flavivirus. Esta metodología constituye una herramienta rápida, sensible, potencialmente cuantitativa y de fácil implementación en laboratorios de diagnóstico clínico cuya utilización permitiría la detección de diferentes Flavivirus en muestras clínicas, aunque la carga viral de éstas sea baja.

4.3.d.ii. Ensayo de sensibilidad de la qPCR.

Con el fin de determinar la sensibilidad del ensayo de la qPCR y poder evaluar dicha sensibilidad en comparación con la sensibilidad de la Heminested-PCR descrita anteriormente, se procedió a realizar una dilución seriada de los ARN de DENV-3 provenientes del LF-FIOCRUZ (Cepa *H-87*). Se realizaron diluciones seriadas al décimo hasta la dilución 1/100000. Posteriormente se realizó una RT de cada una de las diluciones y se procedió al realizar tanto el ensayo de qPCR descrito en el punto anterior, como el ensayo de Heminested-PCR descrito en el punto 3.5.c.

En la figura 13 se observan los resultados obtenidos de la amplificación de las diferentes diluciones mediante qPCR. Como se puede observar, se necesita un mayor número de ciclos para lograr la amplificación a medida que aumenta el grado de dilución. La muestra pura de DENV-3 presentaba una concentración de 9,4 µg/mL y al diluirla cien mil veces, se sigue evidenciando su amplificación.

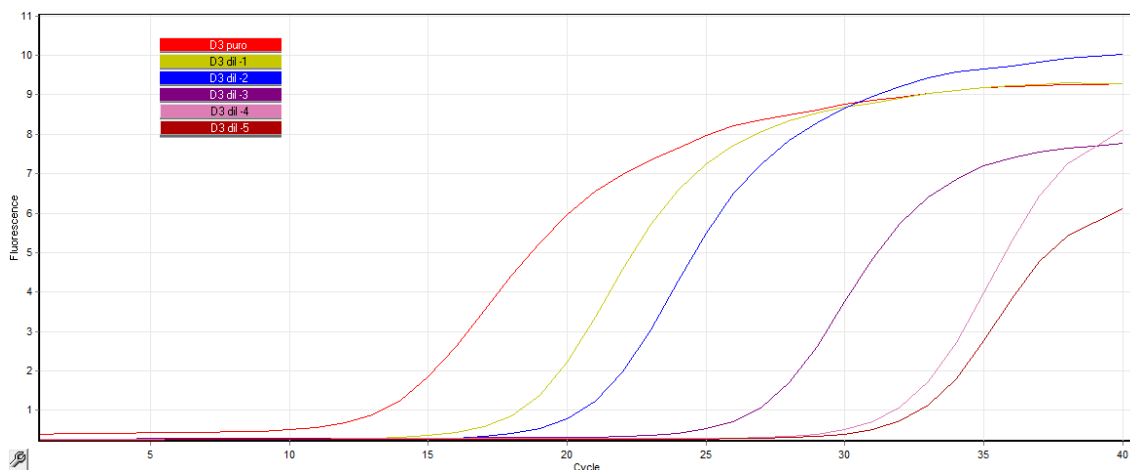


Figura 13: qPCR de diluciones seriadas de DENV-3. Se observa en color rojo el producto amplificado de DENV-3 puro; en los colores verde, azul, violeta, rosado y bordeaux se observan los productos amplificados de las diluciones 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, respectivamente.

A fin de comparar la sensibilidad de la qPCR con respecto a una PCR a tiempo final, se realizó en paralelo la Heminested-PCR descrita en 3.5.c., utilizando las mismas diluciones seriadas de los ARN de DENV-3 provenientes del LF-FIOCRUZ (Cepa *H-87*), hasta la dilución 1 en 100000, con su posterior retrotranscripción.

Al correr los productos amplificados mediante ambas técnicas en un gel de agarosa al 1,2% se observa en ambos casos una clara disminución de las bandas con cada dilución. Además, se evidencia producto amplificado en la dilución de 1 en 100000 en ambos casos, lo que permite concluir que ambas técnicas amplifican con un alto grado de sensibilidad.

4.4. Análisis de muestras provenientes de pacientes con síntomas clínicos compatibles con infecciones por Flavivirus.

Se procedió al análisis de 24 muestras de pacientes con síntomas clínicos asociados a una infección por DENV. Se realizó la extracción del ARN viral de las diferentes muestras de suero y se procedió a la retrotranscripción de las mismas, para su posterior amplificación mediante Heminested-PCR.

Los resultados no mostraron señal positiva en ninguna de las muestras analizadas. Cabe destacar que los métodos diagnósticos directos, como es el caso de las PCR, únicamente detectan al virus en los primeros 3-5 días *post* aparición de signos. Asimismo, los protocolos de diagnóstico para Flavivirus estipulan la obtención de la muestra en la fase aguda (primeros 5 días), así como el aislamiento por cultivo celular del agente viral en células C6/36. Este último paso no puede llevarse a cabo en nuestro país debido a la ausencia del DENV.

En la figura 14 se muestra el resultado (a modo representativo) de algunas de las muestras analizadas.

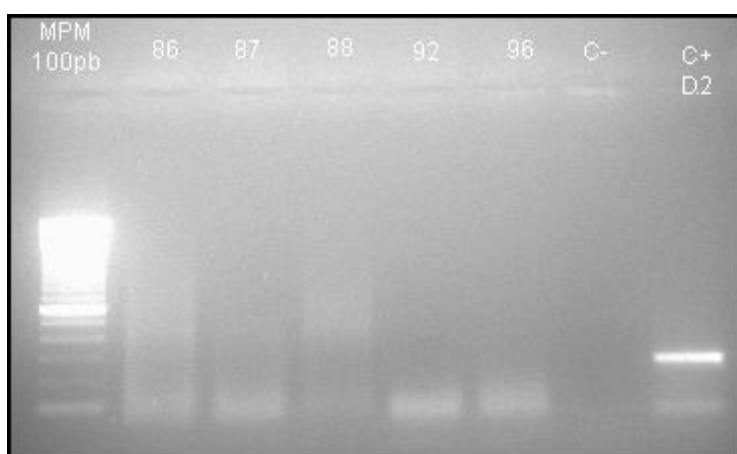


Figura 14: Gel de agarosa al 1,2% de los productos amplificados mediante la heminested PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; carriles 2, 3, 4, 5 y 6: Productos de amplificación de cinco de las muestras analizadas; carril 7: control negativo; carril 8: control positivo de DENV-2.

No se aprecia amplificación de ninguna de las muestras analizadas. Vale destacar, como se comentó anteriormente, que estas muestras resultaron ser negativas mediante una metodología de PCR específica para DENV (protocolo de Lanciotti y cols., 1992) en análisis previos realizados en el LVM.

Los resultados de este análisis nos permiten confirmar que las muestras analizadas no presentan carga viral detectable para ningún Flavivirus. De todas formas, dado que se desconoce el período de toma de muestras, no se puede confirmar la negatividad de la infección de estos pacientes por algún Flavivirus, ya que este muestreo pudo darse en

la fase convaleciente. En consecuencia, no se pudo determinar el agente etiológico responsable de este brote.

4.5. Obtención de controles de amplificación.

Con el fin de obtener controles positivos para utilizar en futuros ensayos de las metodologías previamente puestas a punto se procedió en una primera instancia a la amplificación y purificación (utilizando un kit comercial *PCR Purification Kit* de Invitrogen) de una región de 1111 pb previamente amplificada mediante el protocolo de Vázquez y cols. (2011).

El producto de PCR de DENV-3 proveniente del LF-FIOCRUZ: Cepa *H-87* fue purificado (ver figura 15), clonado y transformado en células quimiocompetentes *E. coli* (XL1-Blue).



Figura 15: Gel de agarosa al 1,2% del producto purificado de DENV-3 (Vázquez y cols., 2011). Carril 1: Marcador de peso molecular de 100pb; carril 2: Purificado de DENV-3.

En el proceso de transformación y posterior al plaqueo se obtuvieron cuatro colonias blancas que fueron crecidas posteriormente por 16 hrs en LB-ampí. A partir de estos minicultivos se realizó la extracción de plásmidos, que fueron corridos posteriormente en gel de agarosa (ver figura 16). En los carriles 1, 2 y 3 se pueden observar tres de los cuatro plásmidos extraídos mientras que en los carriles 4 a 7 se visualizan las digestiones de las cuatro minipreps donde se evidencia la desaparición de la

conformación superenrollada con presencia de ADN plasmídico, pero no se observa en ninguna de las muestras la escisión del inserto de interés. Se procedió a confirmar la presencia del inserto mediante PCR (segundo round de Vázquez), lo que arrojó resultados negativos por lo que se presume que el producto de interés no fue ligado.

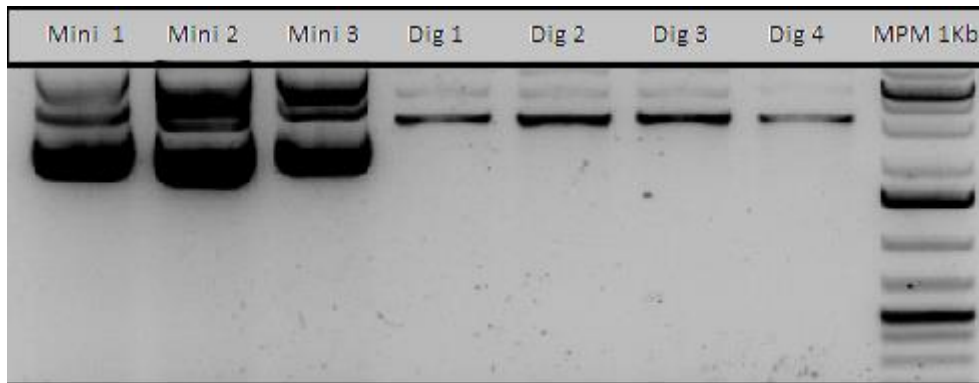


Figura 16: Gel de agarosa al 1,2% de productos de minipreps caseras. Carriles 1, 2 y 3: minipreps de colonias 1, 2 y 3, respectivamente; carriles 4, 5, 6 y 7: digestiones de minipreps de colonias 1, 2, 3 y 4, respectivamente; carril 8: Marcador de peso molecular de 1 kb.

Las bacterias que no presentan el fragmento de interés son capaces de hidrolizar el X-Gal presente en el agar del medio y las colonias se visualizan de color azul. Las bacterias que han sido transformadas, es decir, que presentan el fragmento, no pueden procesar el X-Gal y permanecen con su coloración blanca natural. Dado que las colonias picadas para la preparación de las minipreps fueron blancas, se presume que el X-Gal no funcionó de manera adecuada.

6. CONCLUSIONES

- ✓ Se logró la puesta a punto de técnicas de PCR que tienen sensibilidad suficiente para la detección de fragmentos genómicos que permiten la identificación de virus pertenecientes al género Flavivirus a partir de muestras clínicas, sin el requerimiento del aislamiento viral en cultivo celular:
 - 1) Una PCR a tiempo final que amplifica una región de 860 pb de la NS5.
 - 2) Una Nested-PCR que amplifica una región de 1019 pb de la NS5.
 - 3) Una Heminested-PCR que amplifica una región de 214 pb de la NS5.
 - 4) Una PCR a tiempo real que amplifica una región de 262 pb de la NS5.

- ✓ Se confirmó la utilidad de las diferentes regiones amplificables por estas metodologías para desarrollar análisis filogenéticos que permiten distinguir el tipo de vector y el grupo antigénico de Flavivirus.

- ✓ Se analizaron 24 muestras de suero de pacientes con sintomatología compatible con infecciones por Flavivirus, observándose resultados negativos para todos los casos.

- ✓ Logré aprender a manejarme en un laboratorio de manera independiente y responsable, así como también aprendí a plasmar en palabras escritas todo el conocimiento adquirido durante este tiempo.

7. PERSPECTIVAS

- ✓ Análisis de 50 líquidos cefalorraquídeos (LCR) de pacientes con encefalitis o meningitis de supuesta etiología viral, que fueron diagnosticados negativos para Enterovirus y Herpesvirus. Estas muestras fueron cedidas por la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos (AEPSM), en el marco del Proyecto Alianzas para la Innovación, denominado "Diagnóstico molecular de virosis emergentes de gran impacto en salud pública", que vinculó a nuestro laboratorio con el Laboratorio de Virología Molecular de la Regional Norte en Salto, y la AEPSM.
- ✓ Poder llevar a cabo la transferencia de la PCR a tiempo real al sector salud para que pueda ser utilizada como una herramienta rápida, sensible y potencialmente cuantitativa en laboratorios de diagnóstico clínico.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Anisimova M, Gascuel O (2006). Approximate likelihood ratio test for branches: A fast, accurate and powerful alternative. *Syst Biol* **55**, 539-552.

Artsob H, Gubler DJ, Enria DA, Morales MA, Pupo M, Bunning ML, Dudley JP (2009). West Nile Virus in the New World: Trends in the Spread and Proliferation of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Zoonoses Public Hlth* **56**, 357-69.

Ayers M, Adachi D, Johnson G, Andonova M, Debrot M, Tellier R (2006). A single tube RT-PCR assay for the detection of mosquito-borne Flaviviruses. *J Virol Methods* **135**, 235-9.

Billoir F, de Chesse R, Tolou H, de Micco P, Gould EA, de Lamballerie X (2000). Phylogeny of the genus Flavivirus using complete coding sequences of arthropod-borne viruses and viruses with no known vector. *J Gen Virol* **81**, 781-790.

Brinton MA, Fernandez AV, Dispoto JH (1986). The 3' nucleotides of Flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology* **153**, 113-121.

Burgueño A, Spinsanti L, Díaz LA, Rivarola ME, Arbiza J, Contigiani M, Delfraro A (2013). Seroprevalence of St. Louis Encephalitis Virus and West Nile Virus (Flavivirus, Flaviviridae) in Horses, Uruguay. *BioMed Res Int* 582957.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM (1990). Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol* **44**, 649-688.

Clyde K, Kyle JL, Harris E (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* **80**, 11418-31.

Crill WD, Roehring JT (2001). Monoclonal antibodies that bind to domain III of DEN E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol* **75**, 4002-7.

De Mora D, Andrea LD, Alvarez M, Regato M, Fajardo A, Recarey R, Colina R, Khan B, Cristina J (2009). Evidence of diversification of dengue virus type 3 genotype III in the South American region. *Arch Virol* **154**, 699-707.

Delfraro A (2001). Arbovirus en Uruguay: Dengue-Diagnóstico. *Virus y Virología Médica en Uruguay* **17**, 53-7.

Deubel V, Huerre M, Cathomas G, Drouet MT, Wuscher N, Le Guenzo B, Widmer AF (1997). Molecular detection and characterization of yellow fever virus in blood and liver specimens of a non-vaccinated fatal human case. *J Med Virol* **53**, 212–7.

Diamond MS (2003). Evasion of Innate and Adaptive Immunity by Flavivirus. *Immunol Cell Biol* **81**, 196-206.

Díaz LA, Komar N, Visintin A, Dantur MJ, Stein M, Aguilar J (2008a). West Nile Virus in Birds, Argentina. *Emerg Infect Dis* **14 (4)**, 1-3.

Díaz LA, Komar N, Visintin A, Dantur MJ, Stein M (2008b). West Nile Virus in Birds, Argentina. *Emerg Infect Dis* **14 (4)**, 689-691.

Domingo E (2002). Quasispecies theory in virology. *J Virol* **76 (1)**, 463-465.

Fajardo A, Recarey R, de Mora D, D' Andrea L, Alvarez M, Regato M, Colina R, Khan B, Cristina J (2009). Modeling gene sequence changes over time in type 3 dengue viruses from Ecuador. *Virus Res* **141(1)**, 105-9.

Figueiredo LT (2000). The Brazilian Flaviviruses. *Microbes Infect* (**13**), 1643-9.

Filomatori CV, Lodeiro MF, Alvarez DE, Samsa MM, Pietrasanta L, Gamarnik AV (2006). A 5'RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev* **20**, 2238-49.

Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, Sonenberg N (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* **13**, 1422-37.

Guidon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O (2005). PHYML Online – a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* **33**, Web Server issue W557-9.

Iacono-Connors LC, Schmaljohn CS (1992). Cloning and sequence analysis of the genes encoding the non-structural proteins of Langkat Virus and comparative analysis with other flaviviruses. *Virology* **188**, 875–80).

Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, Trepka MJ, Blackmore CG, Hellinger WC, Pham SM, Zaki S, Lanciotti RS, Lance-Parker SE, DiazGranados CA, Winquist AG, Perlino CA, Wiersma S, Hillyer KL, Goodman JL, Marfin AA, Chamberland ME (2003). Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med* **348**, 2196–2203.

Kapoor A, Simmonds P, Gerold G, Qaisar N, Jain K, Henriquez JA, Firth C, Hirschberg DL, Rice CM, Shields S, Lipkin WI (2011). Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 11608–13.

- Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, Naughton TJ, McInerney JO (2006).** Assessment of methods of amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol* **6**, 29.
- Kuno G, Chang GJ (2006).** Characterization of Sepik and Entebbe bat viruses closely related to yellow fever virus. *Am J Trop Med Hyg* **75**, 1165-70.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV (1992).** Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* **30**, 545-51.
- Misra M, Schein CH (2007).** Flavitrack: an annotated database of flavivirus sequences. *Bioinformatics* **23**, 2645-7.
- Mitzel DN, Wolfinbarger JB, Long RD, Masnick M, Best SM, Bloom ME (2007).** Tick-borne flavivirus infection in *Ixodes scapularis* larvae: development of a novel method for synchronous viral infection of ticks. *Virology* **365**, 410-8.
- Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, García GB, Vissani A, Trono K (2006).** West Nile virus isolation from equines in Argentina. *Emerg Infect Dis* **12**, 1559-61.
- Moratorio G, Iriarte A, Moreno P, Musto H, Cristina J (2013).** A detailed comparative analysis on the overall codon usage patterns in West Nile virus. *Infect Genet Evol* **14**, 396-400.
- Moureau G, Temmam S, Gonzalez JP, Charrel RN, Grard G, de Lamballerie X (2007).** A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of Flaviviruses. *Vector Borne Zoonot Dis* **7**, 467-77.
- Monath TP, Heinz FX (1996).** Flaviviruses, p. 961-1034. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.*
- Muller DA, Young PR (2013).** The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antivir Res* **98**, 192-208.
- Navarro-Sanchez 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. *Am J Trop Med Hyg* **45**, 173-81.
- Regato M, Recarey R, Moratorio G, de Mora D, Garcia-Aguirre L, González M, Mosquera C, Alava A, Fajardo A, Alvarez M, D' Andrea L, Dubra A, Martínez M, Khan B, Cristina J (2008).** Phylogenetic analysis of the NS5 gene of dengue viruses isolated in Ecuador. *Virus Res* **132 (1-2)**, 197-200.

Sánchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán MG, Tenorio A (2005). Generic RT-nested-PCR for detection of Flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J Virol Methods* **126 (1-2)**, 101-9.

Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F (2001). Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of Flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol* **39**, 1922-7.

Schmidt HA, Strimmer K, Vingron M, von Haeseler A (2002). TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* **18**, 502-4.

Somma R. (1969-1970). Encefalitis Virósicas. Medicina en el Uruguay, Montevideo: *Warner-Chilcott*, **7**, 5-30.

Somma R, Campione P, Russi JC, Hortal de Giordano M, Bauzá CA, Peluffo G, et al. (1970). Arbovirus en el Uruguay. *Arch Pediatr Urug* **41 (4)**, 359-63.

Sosa P (1916). Informe del médico del Servicio Público del Departamento de Salto, relativo a una epidemia de Dengue desarrollada en la capital de aquel departamento. *Bol Cons Nal Hig* **11**, 222-3.

Stramer SL, Fang CT, Foster GA, Wagner AG, Brodsky JP, Dodd RY (2005). West Nile virus among blood donors in the United States, 2003 and 2004. *N Engl J Med* **353**, 451-9.

Strimmer K, von Haeseler A (1997). Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proc Natl Acad Sci USA* **24**, 6815-9.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-9.

Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* **197**, 823-9.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* **22**, 4673-80.

Tilgner M, Deas TS, Shi PY (2005). The Flavivirus-conserved penta-nucleotide in the 3_{stem}-loop of the West Nile virus genome requires a specific sequence and structure for RNA synthesis, but not for viral translation. *Virology* **331**, 375-86.

Twiddy SS, Holmes EC (2003). The extent of homologous recombination in members of the genus Flavivirus. *J Gen Virol* **84**, 429-40.

Vezzani D, Carbajo AE (2008). Aedesaegypti, Aedesalbopictus, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103** (1), 66-74.

Valinotto VE, Barrero PR, Viegas M, Alvarez López MC, Mistchenko AS (2012). Molecular evidence of St Louis encephalitis virus infection in patients in Buenos Aires, Argentina. *Pan Am Soc Clin Virol* **54** (4), 349-51.

Vázquez A, Sánchez-Seco M-P, Palacios G, Molero F, Reyes N, Ruiz S, Aranda C, Marqués E, Escosa R, Moreno J, Figuerola J, Tenorio A (2011). Novel Flaviviruses Detected in Different Species of Mosquitoes in Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* **12** (3), 223-9.

Wang WK, Lin SR, Lee CM, King CC, Chang SC (2002). Dengue type 3 virus in plasma is a population of closely related genomes: quasispecies. *J Virol* **76**, 4662-5.

Weaver SC, Barrett AD (2004). Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol* **2**, 789-801.

Yu CY, Hsu YW, Liao CL, Lin YL (2006). Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. *J Virol* **80**, 11868-80.

Zeng L, Falgout B, Markoff L (1998). Identification of specific nucleotide sequences within the conserved 3_{SL} in the dengue type 2 virus genome required for replication. *J Virol* **72**, 7510-22.

FINANCIACIÓN: Beca de iniciación a la investigación ANNI

