

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



“Construcción y expresión recombinante de la proteína NS3 del virus del dengue serotipo 2 (cdenv) en *Escherichia coli*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA

PRESENTA

STEPHANIE VIRIDIANA LAREDO TISCAREÑO

REYNOSA, TAMPS.A 26 DE NOVIEMBRE DEL 2013.

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



“Construcción y expresión recombinante de la proteína NS3 del virus del dengue serotipo 2 (cdenv) en *Escherichia coli*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA

PRESENTA

STEPHANIE VIRIDIANA LAREDO TISCAREÑO

REYNOSA, TAMPS.A 26 DE NOVIEMBRE DEL 2013.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tam., el día 29 del mes Noviembre del año 2013, el (la) que suscribe Stephanie Viridiana Laredo Tiscareño alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica con número de registro B110667, adscrito a Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Xianwu Guo y Dr. Virgilio Bocanegra García cede los derechos del trabajo intitulado "Construcción y expresión recombinante de la proteína ns3 del virus del dengue serotipo 2 (cdenv) en *Escherichia coli*", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Blvd. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Stephanie', is written over a horizontal line.

Stephanie Viridiana Laredo Tiscareño
Nombre y firma

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS Y/O NOMENCLATURA	xiv
AGRADECIMIENTOS	xvi
DEDICATORIA	xvii
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Virus del dengue.....	3
2.2 Vectores epidemiológicos	4
2.3 Ciclo de transmisión del virus del dengue.....	4
2.4 Infección por el virus del dengue	5
2.5 Manifestaciones clínicas del DENV	7
2.5.1 Fiebre por Dengue (FD)	7
2.5.2 Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD)	7
2.5.3 Síndrome de Shock por Dengue (SSD).....	8
2.6 Respuesta Inmunológica por el DENV	8
2.7 Factores de transmisión del DENV.	9
2.8 Epidemiología del DENV	9

2.8.1 Situación epidemiológica del DENV a nivel mundial	10
2.8.2 Situación epidemiológica del DENV en México	11
2.9 Serotipos del DENV	11
2.10 Genotipos del DENV	12
2.11 Genoma del DENV	13
2.12 Proteínas estructurales del DENV (C, M, y E).....	15
2.12.1 Proteína C	16
2.12.2 Proteína prM/M	16
2.12.3 Proteína E	16
2.13 Proteínas no estructurales del DENV (NS)	17
2.13.1 NS1	17
2.13.2 NS2	18
2.13.3 NS3	18
2.13.4 NS4	19
2.13.5 NS5	19
2.14 Importancia, estructura y función de la proteína no estructural NS3 del DENV ..	20
2.15 Papel biológico de la proteína NS3	21
2.15.1 El dominio proteasa	21
2.15.2 El dominio helicasa	22
2.15.3 Actividad NTPasa.....	23
2.15.4 Actividad RNA trifosfatasa	23
2.16 La proteína NS3 del DENV-2 como blanco farmacológico.....	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVOS	27
5.1 General	27
5.2 Específicos.....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1 Construcción de la proteína recombinante his-tag NS3 del DENV-2 en el	28
6.1.1 Gen de la proteína NS3.....	28
6.1.2 Clonación en el plásmido pGEM T-easy®+NS3	29
6.1.2.1 Amplificación del gen de la proteína NS3 DENV-2 cepa Jam1409	29

6.1.2.2	Ligación del gen de la proteína NS3 y el plásmido pGEM T-easy®	29
6.1.2.3	Transformación celular en DH5 α de <i>E. coli</i>	29
6.1.2.4	Confirmación de la construcción de pGEM T-easy® + NS3 por PCR en colonia	30
6.1.2.4	Ligación del gen de la proteína NS3 y el plásmido digerido pPROEX HT-a	30
6.1.2.5	Secuenciación nucleotídica de la construcción pGEM T-easy® + NS3	30
6.1.2.6	Digestión del pGEM T-easy® + NS3 con las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI	30
6.1.2.7	Purificación en gel de la digestión del plásmido pGEM T-easy® y NS3 con las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III	31
6.1.3	Sub-clonación de la proteína NS3 en el plásmido pPROEX HT-a	31
6.1.3.1	Extracción de ADN del plásmido pPROEX HT-a	31
6.1.3.2	Digestión del plásmido pPROEX HT-a con las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III	32
6.1.3.3	Purificación en gel de la digestión del plásmido pPROEX HT-a con las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III	32
6.1.3.4	Ligación del gen de la proteína NS3 y el plásmido digerido pPROEX HT-a	32
6.1.3.5	Transformación celular en DH5 α de <i>E. coli</i>	33
6.1.3.6	Confirmación de la construcción de pPROEX HT-a+ NS3 por PCR en colonia	33
6.1.3.7	Secuenciación nucleotídica de la construcción pPROEX HT-a+ NS3	33
6.1.3.8	Transformación celular en las células de expresión Rosetta gami, XL-Blue, BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS y BL21(DE3) pLysS Single-Use de <i>E. coli</i>	33
6.1.3.9	Selección de las células transformadas	34
6.1.3.10	Confirmación de la construcción de pPROEX HT-a+ NS3 en las células de expresión de <i>E. coli</i> por PCR en colonia	34
6.2	Expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 de DENV-2	35
6.2.1	Sobre-expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 de DENV-2	35
6.2.2	Extracción de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2 a partir de cuerpos de inclusión	36
6.2.3	Purificación de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2 mediante cromatografía de afinidad	37
6.2.4	Electroforesis en gel de acrilamida (PAGE)	37
6.2.5	Western Blot (WB)	37
6.2.6	Espectros de Dicroísmo Circular (DC)	38
6.2.7	Espectros de emisión de fluorescencia	38
6.3	Modelaje por homología	38
6.3.1	Construcción tridimensional de la proteína NS3 DENV-2	38
6.4	Dinámica molecular (DM)	39
7.	RESULTADOS	41

7.1 Construcción de la proteína recombinante his-tag NS3 del DENV-2 en el plásmido de expresión pPROEX HT-a	41
7.1.2 Amplificación del gen de la proteína NS3	41
7.1.3 Clonación en el plásmido pGEM T- easy® + NS3	42
7.1.3.1 Ligación del plásmido pGEM ® T-Easy y NS3 del DENV-2 Jam1409.....	42
7.1.3.2 Transformación en celular en DH5α de <i>E. coli</i>	42
7.1.3.3 Confirmación de la construcción pGEM T-easy® + NS3 por PCR en	43
7.1.3.4 Secuenciación nucleotídica de la construcción pGEM T-easy® + NS3	43
7.1.3.5 Digestión del pGEM T-easy® + NS3 con las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III	44
7.1.3.6 Purificación en gel de la digestión del gen de la proteína NS3 DENV-2 con las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III.....	45
7.1.4 Sub-clonación de la proteína NS3 en el plásmido pPROEX HT-a	45
7.1.4.1 Extracción de ADN del plásmido pPROEX HT-a.....	45
7.1.4.2 Digestión del plásmido pPROEX HT-a con las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III	46
7.1.4.3 Purificación en gel de la digestión del plásmido pPROEX HT-a con las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III.....	47
7.1.4.4 Ligación del gen de la proteína NS3 y el plásmido digerido pPROEX HT-a	47
7.1.4.5 Confirmación de la construcción de pPROEX HT-a+ NS3 por PCR en colonia	48
7.1.4.6 Secuenciación nucleotídica de la construcción pPROEX HT-a+ NS3	49
7.1.4.7 Confirmación de la construcción de pPROEX HT-a+ NS3 en las células de expresión de <i>E. coli</i> por PCR en colonia.....	49
7.2 Expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 de DENV-2 cepa.....	50
7.2.1 Expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 de DENV-2 en las células de expresión Rosetta gami, XL-Blue, BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS y BL21(DE3) pLysS Single-Use de <i>E.coli</i>	50
7.2.2 Western Blot y SDS-PAGE de la Expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 de DENV-2 en las células de expresión Rosetta gami, XL-Blue, BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS y BL21(DE3) pLysS Single-Use de <i>E.coli</i>	52
7.2.3 Sobre-expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 de DENV-2 BL21(DE3) pLysS.....	53
7.2.4 Extracción de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2 a partir de cuerpos de inclusión.....	54
7.2.5 Purificación de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2 mediante cromatografía de afinidad a Ni ²⁺	55
7.2.6 Espectros de Emisión de Dicroísmo Circular (DC) de NS3 DENV-2	58

7.2.7 Espectros de Emisión de Fluorescencia	59
7.2.7.1 Representación en 3D de los espectros de Emisión de Fluorescencia	61
7.3 Modelaje por homología	63
7.3.1 Construcción tridimensional de la proteína NS3 DENV-2	63
7.4 Estudio de Dinamismo Molecular	68
8. DISCUSIÓN	71
8.1 Construir la proteína recombinante his-tag NS3 del DENV-2 en el plásmido de expresión pPROEX HT-a.....	72
8.2 Determinación de las condiciones óptimas para la expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2 en <i>E. coli</i>	73
8.3 Modelaje e imitación de la estructura tridimensional de la proteína NS3 DENV-2 cepa Jam1409	77
8.4 Estudio de Dinámica Molecular de la NS3 DENV-2	78
9. CONCLUSIONES	79
10. RECOMENDACIONES	80
11. REFERENCIAS	81

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Distribución geográfica mundial de los genotipos que componen cada uno de los cuatro serotipos del DENV	13

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Estructura del virión del DENV-2 determinada por microscopía crioelectrónica y esquematización de un flavivirus en su forma madura e inmadura..3	3
Figura 2. Transmisión del virus del dengue.....5	5
Figura 3. Diagrama esquemático de la organización estructural y el ciclo de replicación del DENV.....6	6
Figura 4. Virus del dengue, respuesta antigénica y anticuerpos usados en el diagnóstico8	8
Figura 5. Casos oficiales recientes de dengue a nivel local y regional.....10	10
Figura 6. Incidencia y serotipos aislados de casos de dengue por entidad federativa. México 2013.11	11
Figura 7. Predicción topológica de la poliproteína del virus del Dengue y sus sitios de escisión.....14	14
Figura 8. Estructura elemental de la poliproteína del DENV14	14
Figura 9. Mapa de la amplificación del gen de NS341	41
Figura 10. Mapa de ligación pGEM® T-Easy y NS3.....42	42
Figura 11. Mapa de resultados representativos de la amplificación por PCR43	43
Figura 12. Secuenciación nucleotídica de la construcción de pGEM T-easy® y NS3...44	44
Figura 13. Mapa de electroforesis de la digestión del pGEM T-easy® + NS3.44	44
Figura 14. Mapa de purificación del gen de la proteína NS3.45	45
Figura 15. Mapa de extracción de ADN del plásmido pPROEX HT-a46	46
Figura 16. Mapa de la digestión de pPROEX HT-a46	46
Figura 17. Mapa de la purificación en gel del plásmido pPROEX HT-a.47	47
Figura 18. Mapa de ligación de pPROEX HT-a y NS3.....48	48
Figura 19. Mapa de confirmación por PCR de la construcción de pPROEX HT-a+ NS3.48	48

Figura 20. Secuenciación de DNA para la confirmación de la construcción de pPROEX HT-a y NS3	49
Figura 21. Mapa de la confirmación por PCR de la construcción de pPROEX HT-a+ NS3.....	50
Figura 22. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% de la expresión de la proteína recombinante his-tag NS3.....	51
Figura 23. Análisis del Western blot de la proteína recombinante his-tag NS3 en membrana de PVFD.....	52
Figura 24. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% de la sobre-expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 en BL21(DE3) pLysS.....	54
Figura 25. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% de la extracción de la proteína a partir de cuerpos de inclusión.	55
Figura 26. Análisis en Western blot de la purificación de la proteína recombinante his-tag NS3 en membrana de Nitrocelulosa.....	56
Figura 27. Espectro de DC de la proteína recombinante his-tag NS3.	58
Figura 28. Espectro de Fluorescencia de la proteína recombinante his-tag NS3.....	60
Figura 29. Modelo en 3D de la superficie de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2	61
Figura 30. Degradación del color en la superficie del modelo en 3D del espectro de fluorescencia de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2.	62
Figura 31. Representación en modelo <i>cartoon</i> de la superficie de la proteína NS3 DENV-2	62
Figura 32. Estructura tridimensional de la proteína NS3 DENV-2 por modelaje por homología.....	63
Figura 33. Alineamiento estructural de la proteína modelo y la proteína modelada.	64
Figura 34. Localización de la tríada catalítica (His 51, Asp 75 y Ser 135)	65
Figura 35. Localización del sitio blanco farmacológico	66
Figura 36. Sitio específico interno de los flavivirus	67
Figura 37. La gráfica de Radio de giro (Rg) a 5ns de simulación de las dos proteínas a 310 K.....	68
Figura 38. Gráfica de RMSD en 5ns de simulación de las dos proteínas a 310 K	69

Figura 39. Gráfica de simulación de RMSF de 5ns en ambas proteínas a 310 K.....	69
Figura 40. Diferencias estructurales de la proteína NS3 DENV-2 y NS3 DENV-4 a partir de DM.....	70

LISTA DE SÍMBOLOS Y/O NOMENCLATURA

Å	Ångström
α	Alfa
β	Beta
%	Por ciento
°C	Grados Centígrados
h	Horas
K	Grados Kelvin
Kb	Kilobase
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
ns	Nanosegundos
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BLASTp	Basic Local Alignment Search Tool-protein
DENV	Virus del dengue
DGAE	Dirección General Adjunta de Epidemiología
DG-SIGN	Adhesión molecular dendrítica intracelular acoplada a la no integrina -3- de las células dendríticas.

dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
his-tag	Histidinas tag
IDAMS	Manejo de Software y Análisis de datos desarrollados Internacionalmente
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
kPA	Kilopascal
mmHg	Milímetros de mercurio
pH	Potencial de hidrógeno
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
RdRp	ARN dependiente de ARN polimerasa
Rg	Radio de giro (del inglés radius of gyration)
RMSF	Raíz cuadrada de la fluctuación (del inglés root mean square fluctuation)
RMSD	Desviación media de la raíz cuadrada (del inglés root mean square deviation)
SINA	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SUIV	Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Xianwu Guo por su guía, conocimientos y paciencia en la realización de esta tesis.

Al Dr. Virgilio García Bocanegra por sus consejos académicos durante la fase experimental.

También y esencialmente al M. en C. Erik de Jesús de Luna Santillana por haberme brindado su apoyo, consejos académicos y amistad a lo largo de esta carrera.

A la Dra. Claudia Gpe. Benítez Cardoza por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme terminar con éxito mis experimentos.

A los integrantes del Laboratorio de Biomedicina Molecular por haberme brindado su compañerismo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de beca de maestría.

Al Programa Integral de Fortalecimiento Institucional (PIFI) por el apoyo de beca institucional durante el periodo del postgrado.

Y finalmente al CBG-IPN por haberme abierto sus puertas y poder realizar mis estudios de postgrado.

DEDICATORIA

A Dios por su paciencia y amor que me han permitido afrontar cada desafío en mi camino y no abandonarme.

A mi familia (Muñe, Marita, Gabio, Fea y mi Lolita[†]) por apoyarme en cada etapa de mi vida con su incondicional amor y sobre todo en los momentos difíciles.

A mis amigos, compañeros de generación así como del laboratorio, que compartieron toda clase de momentos y me apoyaron en circunstancias complejas.

RESUMEN

El virus del dengue (DENV) es el agente causal más común transmitido por vectores en el mundo, causando entre 50-100 millones de infecciones y 25000 muertes por año. Es un arbovirus endémico de las regiones tropicales y sub-tropicales, y es transmitido por hembras virémicas de *Aedes aegypti* y *A. albopictus*. Una alternativa es por medio de vacunas o tratamientos antivirales, las cuales en la actualidad no se encuentran disponibles en el mercado. Recientemente, nuevos enfoques de control se han explorado, como es el desarrollo de fármacos dirigidos a proteínas blanco del virus, como la proteína viral no estructural 3 (NS3). Es una proteína multifuncional relacionada con actividades enzimáticas esenciales, como es la síntesis del ARN genómico e involucrada en el ciclo de replicación viral. El presente trabajo tuvo como objetivo construir la proteína recombinante his-tag NS3 del DENV-2 en un plásmido de expresión y determinar las condiciones óptimas para la sobre-expresión de la proteína en *Escherichia coli*. También modelar la estructura tridimensional de la proteína mediante estudios *in silico*. Adicionalmente se realizó la purificación de la proteína, fluimetría, pruebas de dicroísmo circular y dinamismo molecular con la finalidad de buscar cambios en la estructura de la proteína.

Para la construcción de la proteína recombinante his-tag NS3, se determinaron las condiciones óptimas de sobre-expresión y se utilizaron diversos plásmidos de expresión fusionados con una etiqueta de histidinas en la región N-terminal. Se probaron cinco cepas de *E. coli* en un rango de 37 a 20°C con diversos tiempos de inducción con IPTG. Para la identificación de la proteína recombinante his-tag NS3 se realizó Western Blot (WB) con Anti-His₆. El estudio *in silico*, se llevó en el software Modeller 9.2 para comparar la proteína NS3 DENV-4 del Protein Data Bank (PDB) (2VBC) y el tipo 2. Finalmente se realizó un acoplamiento con ambas proteínas para evaluar la reproducibilidad del modelo en un ambiente biológico.

La proteína recombinante his-tag se obtuvo en el plásmido pPROEX HT-a y en las células de expresión BL21(DE3) pLysS incubadas toda la noche a 20°C inducida con 1 mM de IPTG.

La construcción de la proteína recombinante his-tag en el plásmido de pPROEX HT-a y células de expresión BL21(DE3) pLysS se incubaron toda la noche a 20°C induciendo con 1 mM de IPTG. Mediante los estudios *in silico* de la estructura tridimensional de las proteínas se logró un modelado comparativo probable entre la NS3 DENV-2 y 4, también se localizaron funciones esenciales y sitios blancos farmacológicos. Las pruebas por fluimetría, indicaron la presencia de triptófanos y tirosinas poco expuestas en NS3. El Dicroísmo circular (DC) y el Dinamismo Molecular (DM) en solvente indicaron que la proteína recombinante adopta estructuras hélices α , hojas β y lazos.

ABSTRACT

Dengue fever is one of the most common vector-borne viral diseases in the world, causing an estimated 50–100 million infections and 25,000 deaths each year. Is an endemic arbovirus from tropical and sub-tropical regions, and is transmitted by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* infective females. An alternative to combat dengue disease is through vaccines or antiviral treatment but both remains not available in the market. Recently, new approaches to control have been explored such as drugs targeting specific dengue viral proteins, for example the NS3. The protein NS3 is a multifunctional protein related to essential enzymatic activities (protease and helicase). The principal objectives of this study were: firstly to construct the recombinant his-tag NS3 protein of dengue virus type 2 in an expression plasmid then to tested the optimal overexpression parameters in *Escherichia coli*, and finally modelate the tridimensional protein structure in silico. Additionally, protein purification, fluorometry to detect protein structural changes, circular dichroism and molecular dynamics were performed.

To construct his-tag NS3 recombinant protein, three expression plasmids were used to make NS3 fusion with a histidine-tag at the N-terminal region. Five *E. coli* strains, five incubation times for induction with IPTG and different temperature ranged from 20 to 37°C were evaluated. Western Blot with Anti-His₆ analyzes was used to confirm the his-tag NS3 protein construction. The *in silico* study was performed using the Modeller 9.12 software to compare the NS3 proteins of the dengue virus type 4 (from Protein Data Bank- 2VBC) and type 2. Finally, both proteins were docked *in silico* to evaluate the molecular design and biological protein behavior.

The optimal condition for the recombinant protein his-tag -NS3 were obtained using the pPROEX HT-a plasmid and the BL21 (DE3) pLysS cells incubated overnight at 20°C with 1 mM of IPTG. The *in silico* studies of tridimensional structure of proteins allowed a comparative modeled between the NS3 of dengue virus type 2 and 4, and found a “hole site” with probability use to been a, pharmacological target for both proteins. The fluorometry bioassay indicated the presence of tryptophan and tyrosine in NS3 structure. The circular dichroism (CD) and molecular dynamics (MD) demonstrate that NS3 forms different secondary structures such as α -helix, β -sheet, and loops.

1. INTRODUCCIÓN

El virus del dengue (DENV) es un arbovirus originario de África y Asia, transmitido por *Aedes aegypti* y *A. albopictus*. Está taxonómicamente clasificado dentro de la familia *Flaviviridae* y en el género *Flavivirus* (Salaeme *et al.*, 2010; Nemésio *et al.*, 2012). Es la arbovirosis más importante en el mundo ya que (Eltzov *et al.*, 2010; Guzmán *et al.*, 2006) se estima que afecta entre 70 y 100 millones de personas al año (OMS, 2013) además, recientemente las estadísticas documentadas indica que el DENV es la enfermedad con los mayores índices de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Paranjape *et al.*, 2010; Salazar *et al.*, 2010). Aproximadamente 500000 de estos casos requieren hospitalización con una tasa de 2.5% de mortalidad, la mayoría de los cuales son niños (Carter *et al.*, 2013). La distribución geográfica de la enfermedad abarca las áreas tropicales y subtropicales de 124 países (Dos Santos *et al.*, 2011). La infección por dengue es causada por uno de los cuatro serotipos que están genéticamente relacionados (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) de acuerdo a su origen geográfico (Asiático/Americano). Clínicamente, los serotipos se pueden manifestar en tres formas patológicas: 1) fiebre por dengue (FD), 2) fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y 3) síndrome de shock por dengue (SSD) (Alcaraz-Estrada *et al.*, 2010) y la severidad de la infección se incrementa cuando existe la combinación serotipo/genotipo en el huésped (Salazar *et al.*, 2010; Idrees *et al.*, 2013; Dos Santos *et al.*, 2011). Estudios epidemiológicos han identificado al DENV-2 como el serotipo más importante en el mundo (Pierro *et al.*, 2006). Este serotipo posee la mayor competencia vectorial en *A. aegypti*, ya que se ha asociado a los brotes epidemiológicos más importantes y con las formas clínicas más severas (Loroño-Pino *et al.*, 2004).

Al igual que otros flavivirus, el genoma viral del DENV es una sola cadena de ARN de polaridad positiva y presenta un marco de lectura abierto que se traduce en una poliproteína (Luo *et al.*, 2010). Durante la replicación viral, la poliproteína origina a 3 proteínas estructurales denominadas C, prM y E y siete proteínas no estructurales nombradas como NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Borowski *et al.*, 2002). Se ha documentado que las proteínas NS no son constituyentes de la partícula viral, sin

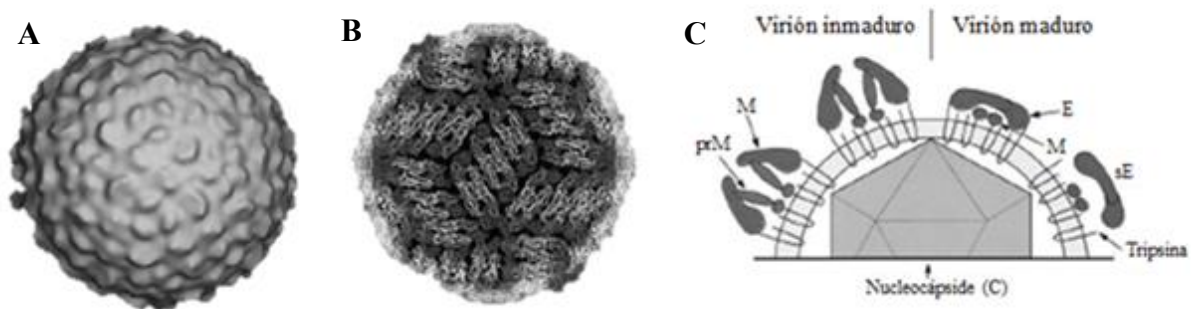
embargo, su función es esencial en la replicación viral ya que actúa como polimerasa (Borowski *et al.*, 2002). Dentro de las proteínas no estructurales, la NS3 tiene actividades multifuncionales y es la segunda mejor conservada de los flavivirus. La NS3 codifica un dominio serina-proteasa en la región N-terminal, el cual es requerido durante el ciclo viral durante el procesamiento proteolítico de la poliproteína (Luo *et al.*, 2012). En la región C-terminal se encuentra el dominio ARN helicasa, NTPasa y RTPasa en asociación con otras proteínas no estructurales. En el contexto de las funciones que asume la NS3 en el ciclo viral, ésta puede considerarse como un importante blanco farmacológico para el tratamiento del dengue. Sin embargo, para considerarse realmente como un blanco farmacológico se requieren llevar a cabo estudios moleculares y estructurales detallados en relación a la topología tridimensional de los dominios helicasa y proteasa de la NS3, los cuales se sabe llevan a cabo actividades enzimáticas del virus y además son esenciales para su replicación (Borowski *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se describe, una estrategia para expresar la proteína recombinante NS3 en un sistema procariota. Además se analiza la importancia que asume para ser considerada como un blanco farmacológico, para el desarrollo de inhibidores antivirales. Para esto, se emplearon diversas condiciones para la sobre-expresión y la purificación de la proteína recombinante his-tag NS3, en *E. coli*. En el Dicroísmo Circular (DC) se indican las estructuras alfas y betas que adopta la proteína purificada. También se presentan estudios biológicos estructurales que evalúan la homología de la proteína NS3 del DENV-2 con una estructura reportada de NS3 del DENV-4 que demuestre los posibles sitios catalíticos del blanco farmacológico. En adición se exploraron los estados conformacionales a partir de simulaciones de dinámica molecular (MD) que revelen los sitios flexibles de la proteína NS3.

2. ANTECEDENTES

2.1 Virus del dengue

El virus del dengue (DENV) es un miembro que pertenece a la familia *Flaviviridae* (del Latín *flavus* = “amarillo”, de la fiebre amarilla) y al género *Flavivirus*. Esta familia está conformada por alrededor de 70 virus dentro de los cuales sobresalen el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus del Oeste del Nilo (WNV), encefalitis Japonesa (JEV), entre otros (Mondotte *et al.*, 2007; Chambers *et al.*, 1990; Falgout *et al.*, 1993). El DENV presenta una morfología esférica de aproximadamente 40-60 nm de diámetro (Figura 1) (Alcázar-Estrada *et al.*, 2010), la cual deriva de la bicapa lipídica de la célula hospedera (Smith *et al.*, 2011). La nucleocápside recubre a la membrana lipídica y ésta a su vez rodea a la cápside viral, que protege al material genético del virus (ARN).



2.2 Vectores epidemiológicos

El virus del dengue es transmitido por picaduras de hembras virémicas de *Aedes aegypti* y *A. albopictus*, estos están clasificados epidemiológicamente como vector primario y secundario, respectivamente (Raharimalala *et al.*, 2012).

En el caso de *A. aegypti*, su mayor importancia epidemiológica está ligada a su papel como transmisor del dengue. Su presencia es detectada en la mayor parte de las áreas tropicales y subtropicales en las zonas isotermales intermedias a los 20°C (Salvatella, 1996).

Por otro lado, *A. albopictus*, es transmisor de dengue y es más tolerante a las bajas temperaturas y el mosquito se mantiene en una amplia variedad de criaderos, tanto en recipientes artificiales como naturales (Salvatella, 1996).

2.3 Ciclo de transmisión del virus del dengue

El virus es inoculado en los seres humanos a través de la picadura de hembras de *A. aegypti*, este se establece y se replica en diversos órganos “diana”, como nódulos linfáticos locales e hígado. Posteriormente se libera y se difunde por la sangre para infectar los leucocitos y otros tejidos linfáticos, de ahí se liberan y circulan en la sangre. El mosquito ingiere sangre que contiene el virus, que se replica en el intestino medio después atraviesa las barreras de competencia vectorial, posteriormente se difunde en la cavidad corporal por medio de la hemolinfa y posteriormente infecta las glándulas salivales, donde se replica para ser transmitido a otro ser humano (Acosta-Bas *et al.*, 2005). Se han identificado cuatro serotipos de DENV antigénicamente diferentes: (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4). Los cuatro serotipos pueden co-circular y co-infectar al humano pero cada serotipo tiene una característica común en algunos brotes (Timiryasova *et al.*, 2013).

Los cuatro serotipos del DENV se mantienen en dos ciclos de transmisión ecológicos y evolutivamente distintos (Figura 2). El ciclo selvático y el ciclo urbano. El ciclo selvático involucra a primates no humanos y mosquitos arbóreos del género *Aedes*.

Este foco de transmisión ha sido documentado en el este de África y la península de Malasia (Vasilaski *et al.*, 2011). El ciclo urbano involucra a mosquitos del género *A. aegypti*, y mosquitos del género *A. albopictus*. El mosquito *A. albopictus* sirve como vector primario del dengue en países en donde *A. aegypti* está ausente. En cambio en áreas rurales *A. aegypti* permanece como vector principal del dengue en donde ambas especies coexisten. En el ciclo urbano los humanos son los únicos hospederos definitivos conocidos donde el virus puede replicarse (Whitehead *et al.*, 2007).

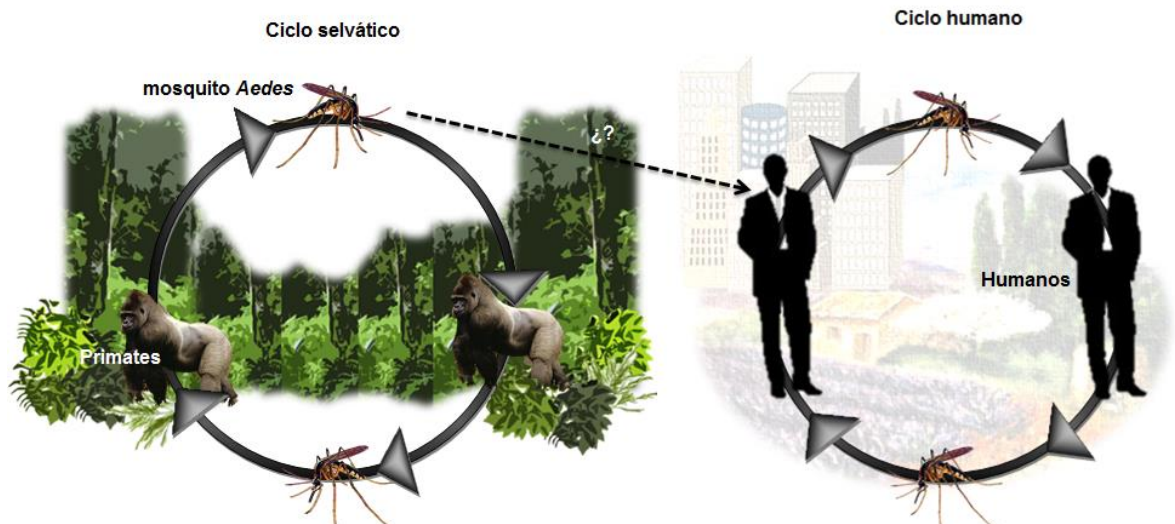


Figura 2. Transmisión del virus del dengue (modificado de Whitehead *et al.*, 2007).

2.4 Infección por el virus del dengue

El primer paso en la infección por DENV, es la unión a los receptores celulares (DG-SIGN) en la superficie de la célula blanco, donde el dominio III de la proteína viral E interactúa con este receptor (Clyde *et al.*, 2006; Velandia *et al.*, 2011). La interacción induce la internalización del virión mediado por endocitosis y subsecuentemente tras la fusión del virus en el endosoma de la membrana se presenta un cambio en el pH de la fusión de la envoltura de DENV. La modificación del pH induce un cambio en la conformación del dominio II de la proteína E, el cual favorece que se dé la exposición y el anclaje inmediato del péptido de fusión a la membrana de la vesícula y por consecuencia se libera la nucleocápside al citoplasma (Rodenhuis *et al.*, 2010; Velandia *et al.*, 2011). Una vez dentro de la célula el ARN viral puede actuar como ARNm, y este

se asocia con el retículo endoplásmico rugoso (RER) donde es traducido inicialmente en una poliproteína (Velandia *et al.*, 2011). La replicación viral ocurre en dos pasos: Primero el ARN de polaridad positiva es copiado a ARN de polaridad negativa, el cual sirve como plantilla para la síntesis de múltiples hebras de ARNs de polaridad positiva. Finalmente las proteínas virales inmaduras viajan a las vesículas del aparato de Golgi donde se someten a glicosilación y viajan a través de las vesículas secretoras fuera de la célula. Durante el último proceso, la furin proteasa procesa a la prM generándose de esta manera la proteína M, la cual está involucrada en generar partículas de viriones maduros durante, el cual es el último paso de la morfogénesis viral (Figura 3) (Alcaraz-Estrada *et al.*, 2010; Burke *et al.*, 2006).

Está documentado que la re-infección por cualquier serotipo de dengue puede causar condiciones clínicas más severas como es la fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y el síndrome de shock por dengue (SSD), las cuales pueden causar la muerte (de Almeida *et al.*, 2013).

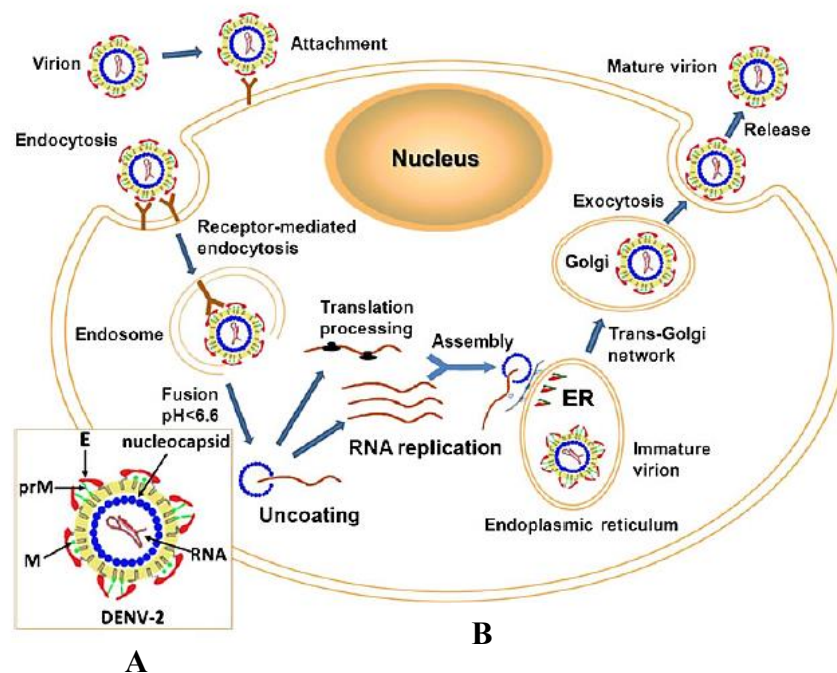


Figura 3. Diagrama esquemático de la organización estructural y el ciclo de replicación del DENV. A) La nucleocápside viral, está formado por el ARN genómico de polaridad positiva y las proteína C, prM/M y E. B) El DENV se unen a los receptores específicos para el virus y el DENV es internalizado. Bajo condiciones de pH el ARN viral es liberado para iniciar la traducción de la proteína en la célula hospedera. Las moléculas de ARN viral se acumula cerca del retículo endoplásmico para unirse a las

partículas virales inmaduras, después son transportados a la red trans del aparato de Golgi, donde las proteínas E son glicosiladas. El paso de liberación viral, es llevado por exocitosis (Shang *et al.*, 2012).

2.5 Manifestaciones clínicas del DENV

La mayoría de las infecciones por el DENV son asintomáticas, el espectro que constituye a la enfermedad por dengue es: fiebre por dengue (FD, fiebre hemorrágica por dengue (FHD), síndrome de shock por dengue (SSD) (Martina *et al.*, 2009).

2.5.1 Fiebre por Dengue (FD)

Se presenta un cuadro clínico caracterizado por la aparición repentina de fiebre así como la presencia de signos y síntomas no específicos, incluyendo dolor frontal de cabeza, retro-orbital, articular y muscular, náuseas, vómitos y debilidad, erupción en la piel, molestias a la luz, enrojecimiento de la faringe, conjuntivitis, dolor abdominal leve, insomnio, temor, depresión, así como bradicardia relativa y adenopatías (Acosta-Bas *et al.*, 2005). La temperatura inicial puede elevarse de 38.8°C a 40.5°C y la fiebre puede durar de 2 a 7 días (Gubler *et al.*, 1998).

2.5.2 Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD)

Se caracteriza por una repentina fiebre durante la fase aguda. Es difícil diferenciar la fiebre por dengue, pero en la fase crítica de la FHD, se manifiestan síntomas de falla circulatoria o se pueden presentar manifestaciones hemorrágicas cuando decrece la temperatura hasta estado normal. Los síntomas incluyen: hemorrágicas epiteliales, de mucosa y de órganos internos (petequias, púrpuras, equimosis, hematuria, epistaxis, sangrado de encías, sangrado intestinal y gástrico, derrame pleural, hepatomegalia y un aumento en la permeabilidad vascular, que puede ocasionar choque hipovolémico debido a la “fuga” de plasma hacia el espacio extravascular e intersticial (Acosta-Bas *et al.*, 2005; Gubler *et al.*, 1998; Simmons *et al.*, 2010).

2.5.3 Síndrome de Shock por Dengue (SSD)

Es la forma más grave de dengue, necesariamente requiere tratamiento hospitalario. Esta etapa es corta, el paciente puede morir de 12 a 24 horas o recuperarse con rapidez después del tratamiento; no corregido puede llevar a la acidosis metabólica, hemorrágica grave del aparato digestivo o cualquier otro órgano con un pronóstico desfavorable (Acosta-Bas *et al.*, 2005; Gubler, 2006).

2.6 Respuesta Inmunológica por el DENV

La respuesta inmunológica adquirida en la infección por dengue consiste en la producción de anticuerpos que son dirigidos en un principio a la proteína de envoltura del virus. La respuesta inmunológica varía dependiendo si es una infección primaria o secundaria (Figura 4). Una infección primaria se caracteriza por la aparición de la inmunoglobulina IgM en los primeros 3-5 días de la enfermedad. A diferencia durante una segunda infección, los anticuerpos de IgG es específica en dengue y presentan reacción cruzada con muchos flavivirus que son detectables incluso en la fase aguda y se incrementa radicalmente (Guzmán *et al.*, 2010; Velandia *et al.*, 2011).

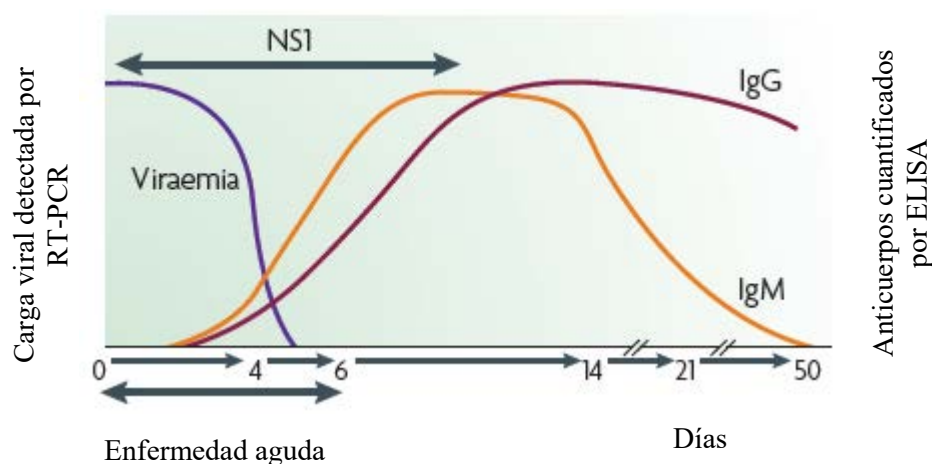


Figura 4. Virus del dengue, respuesta antigénica y anticuerpos usados en el diagnóstico. Ig, Inmunoglobulinas, NS, no estructural (Guzman *et al.*, 2010).

2.7 Factores de transmisión del DENV.

La descontrolada urbanización ha creado las condiciones ideales para el incremento de la dispersión del mosquito (Gubler, 1998), aunado a esto el insuficiente abastecimiento de agua potable, el aumento del número de viajeros y de las migraciones poblacionales, son factores que han favorecido que se presenten los mecanismos ideales, la transmisión del virus del dengue y (Guzmán *et al.*, 2006; Gubler, 1998; Shang *et al.*, 2012).

2.8 Epidemiología del DENV

Los primeros brotes epidémicos a causa por el dengue se registraron en 1779-1780 en Yakarta (Asia), El Cairo (África) y Filadelfia (América). La ocurrencia de casos por dengue en tres continentes indica que el virus del dengue se ha distribuido en regiones tropicales por más de 200 años (Mairuhu *et al.*, 2004). La mayoría de la población mundial vive en áreas potencialmente en riesgo de transmisión por dengue.

2.8.1 Situación epidemiológica del DENV a nivel mundial

La distribución geográfica incluye más de 100 países en todo el mundo (Figura 5). Muchos de estos países no habían reportado casos de dengue por más de 20 años y en algunos no se había reportado casos por dengue. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de 2500 millones de personas se encuentran en riesgo por infección de dengue. La mitad de la población vive en países endémicos de dengue. Se estiman alrededor de 50 millones de casos por dengue causando 24000 muertes cada año. Alrededor de 50000 casos por DHF/DSS requieren hospitalización al año, aproximadamente el 5% muere de acuerdo a las estadísticas de la OMS. Los cambios epidemiológicos como la demografía, la economía, factores ambientales y sociales a menudo son las claves para el control de la enfermedad (Guha-Sapir *et al.*, 2005).

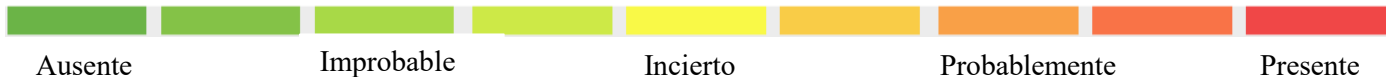
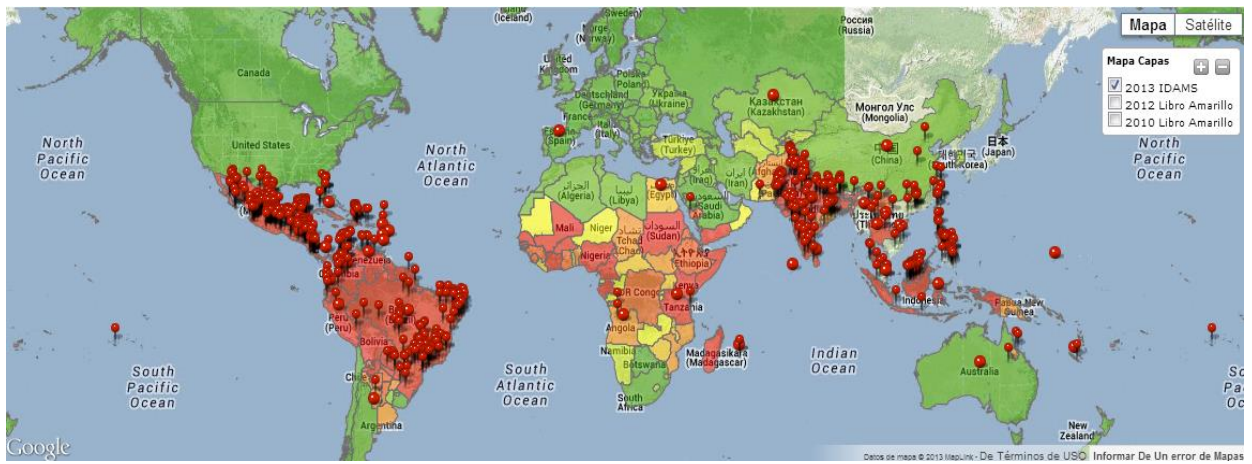


Figura 5. Casos oficiales recientes de dengue a nivel local y regional. Mapa de consenso global IDAMS: Estas áreas de riesgos se definen en base a un consenso entre una variedad de datos, incluyendo: sistemas nacionales de vigilancia, literatura publicada, cuestionarios y noticias oficiales. Los círculos grandes rojos (●) indican el país afectado por dengue, los círculos pequeños con hasta indican casos a nivel local o provincia (●). Los colores indican las áreas de riesgo por dengue. (Epidemiología del virus del dengue <http://www.healthmap.org/dengue/index.php>, 2013).

2.8.2 Situación epidemiológica del DENV en México

El primer registro que se tiene de la transmisión del DENV en México data de 1941, donde se informó de 6955 casos por cada 100000 habitantes (Narro -Robles *et al.*, 1995). Para el año 1963, los casos descendieron, debido a las campañas erradicación del mosquito. En 1978 se presentó la primera re-emergencia de DENV-1 en Tapachula, Chiapas con 38 casos, a consecuencia del abandono de las actividades de exterminación del mosquito. En 1984 se reportaron 5000 casos de FD y por FHD. En 1985, FD fue diagnosticada en 25 de los 32 estados con los serotipos DENV-1-2-4. Posteriormente en 1995 se demostró la circulación viral de más de un serotipo al mismo tiempo en 27 de los 32 estados de México (Narro-Robles *et al.*, 1995). En 1998-2002 se reportaron 52876 casos de FD, de los cuales 1637 se identificaron como FHD, presentados en Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz y Oaxaca (Pérez-Ramírez *et al.*, 2009). En el 2002 nuevamente se registró un aumento en casos de FHD/SSD con más de 1000 casos. Desde la re-emergencia del dengue en 1978 y hasta el 2011 se ha observado el comportamiento cíclico de sus formas más severas. Actualmente hasta el 23 de Septiembre del 2013 correspondiente a la semana 38, se han reportado un total de 33930

casos confirmados, de estos casos 22970 corresponde a FD, 9960 casos a FHD, se produjeron 40 defunciones por DHF con una letalidad** de 0.40 (SSA, 2012). ** Por cada 100 casos (Figura 6).



Figura 6. Incidencia y serotipos aislados de casos de dengue por entidad federativa. México 2013. En México se estima que cerca de 60% del territorio nacional presenta condiciones que favorecen la transmisión de dengue. El estado de Colima (recuadro rojo), presentó la incidencia más alta con 216.45 *Incidencia de casos de FD y FHD por cien mil habitantes. De acuerdo a la tonalidad de cada estado, indica la incidencia y el tipo de serotipo que se reporta. Información al 23 de septiembre de 2013. Fuente: SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue.

2.9 Serotipos del DENV

El agravamiento de la enfermedad se ha asociado de acuerdo al serotipo (Martina *et al.*, 2009), ya que una re-infección con un serotipo diferente al que estuvo presente en una primera infección, tiende a desencadenar la Fiebre Hemorrágica por Dengue. Durante una infección secundaria el gradiente de severidad de los serotipos varía y se considera que es en el siguiente orden: DENV2 > DENV3 > DENV1 > DENV4

(Guzmán *et al.*, 2000). Todos los serotipos del dengue (DENV1-4) comparten del 65-70% de identidad aminoacídica en su secuencia (Luo *et al.*, 2012)

2.10 Genotipos del DENV

Dentro de cada serotipo se encuentran variaciones genéticas que originan subtipos o genotipos filogenéticamente diferenciables por secuenciación del gen de la proteína de envoltura (E). Dentro de cada genotipo existen cepas caracterizadas por compartir un ancestro común, pero que difieren entre ellas por sustituciones nucleotídicas. Esto se debe al producto de la deriva genética y de eventos de selección específicos del hospedero (Quintero *et al.*, 2010). Además algunos genotipos tienen mayor “potencial epidémico” que otros, lo cual hace más probable los brotes en distintas regiones (Holmes *et al.*, 2003). Se piensa que los genotipos se originaron en el sureste de Asia y se ha postulado como la mejor causa del incremento de la virulencia (King *et al.*, 2008). Actualmente existen varios genotipos en cada serotipo: El DENV-1 comprende cinco genotipos: el genotipo I contiene virus de América, África y el Sureste de Asia. El DENV-2 se compone de 6 genotipos denominados Asiático I, Asiático II, Asiático/Americano, Cosmopolita y Selvático. El DENV-3 implica a cuatro genotipos compuesto de virus Indonesia, Malasia, Filipinas y el sur de las islas del pacífico, el genotipo II comprende virus de Tailandia, el genotipo III es representado por virus de Sri Lanka, India, África y América. El DENV-4 se clasifica dentro de dos distintos genotipos; El genotipo I incluye virus de Filipinas, Tailandia y Sri Lanka, el genotipo II incluye virus de Indonesia, Tahití y las Islas Caribeñas (Cuadro 1). (Amarilla *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Distribución geográfica mundial de los genotipos que componen cada uno de los cuatro serotipos del DENV (Quintero *et al.*, 2010, Holmes *et al.*, 2003).

Serotipo	Genotipo	Origen geográfico
DENV-1	I	Sudeste Asiático, China, Este de África
	II	Tailandia
	III	Cepas Selváticas aisladas en Malasia
	IV	Islas del oeste del Pacífico y Australia
	V	América, Oeste de África y algunas Asiáticas
DENV-2	Americano	América Latina, Caribe, India e islas del Pacífico
	Asiático 1	Malasia y Tailandia
	Asiático 2	Vietnam, China, Taiwan, Sri Lanka y Filipinas
	Americano/Asiático	Tailandia, Vietnam, América
	Cosmopolitan	Amplia distribución
DENV-3	I	Indonesia, Malasia, Filipinas, Islas del Pacífico
	II	Tailandia, Vietnam, Bangladesh
	III	Sri Lanka, África, India, Samoa
	IV	Puerto Rico, América central, América Latina, Tahití
DENV-4	I	Tailandia, Sri Lanka, Filipinas, Japón
	II	Indonesia, Malasia, Tahití, Caribe, América
	III	Tailandia
	IV	Selváticas

2.11 Genoma del DENV

El genoma viral consiste en una única hebra de ARN de polaridad positiva de aproximadamente de 11Kb. Este ARN contiene marco de lectura abierta (ORF), el cual codifica a una poliproteína ininterrumpida de 3000 residuos de aminoácidos (Figura 7) (Shy *et al.*, 2004). Esta poliproteína se encuentra flanqueada por dos regiones no traducidas (RNT). Las cuales contienen funciones estructurales y elementos requeridos para la transcripción y replicación del genoma del DENV (Alcaraz-Estrada *et al.*, 2010). La región N-terminal de la poliproteína codifica a tres proteínas estructurales (C, prM/M y E), seguida por las proteínas no estructurales (NS), NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Figura 8) (Alcaraz-Estrada *et al.*, 2010; King *et al.*, 2008). Una vez traducida la poliproteína, la peptidasa localizada en el lumen del RE reconoce una señal que hace que en la región N-terminal de las proteínas prM, E, NS1 y NS4B se lleve a cabo un rompimiento hidrolítico y se generen las proteínas individuales. El procesamiento de otras proteínas virales como es la proteína C se lleva por proteasas virales NS2B en el citoplasma de las células infectadas. En la C-terminal de la secuencia

de la proteína NS1 es llevada por una proteasa desconocida presente en el RE. La mayoría de las proteínas no estructurales están involucrados en la replicación de *Flavivirus* (Alcaraz-Estrada *et al.*, 2010).

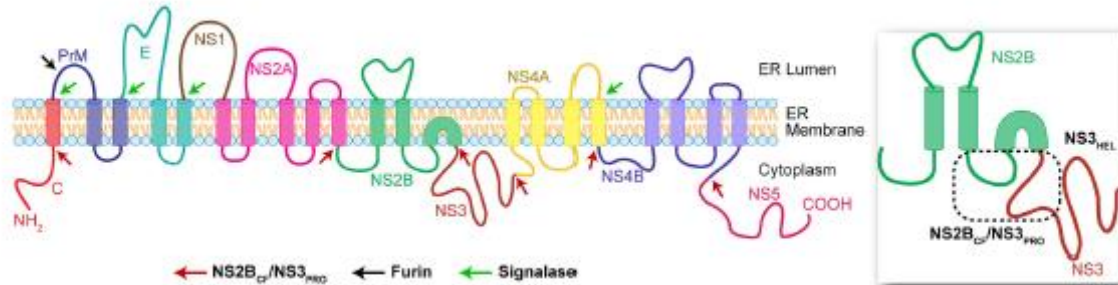


Figura 7. Predicción topológica de la poliproteína del virus del Dengue y sus sitios de escisión. La poliproteína se compone de tres proteínas estructurales. Cápside (C), precursor de la proteína de membrana (prM) y la proteína de envoltura (E). Así como siete proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. La NS3 es una proteína multifuncional conformada por un dominio helicasa NS3hel y un dominio proteasa NS3pro, el necesita un co-factor de la región hidrófila de la NS2B. Las flechas rojas indican los sitios procesados por la proteasa viral NS2B/NS3 (de Almeida *et al.*, 2013).

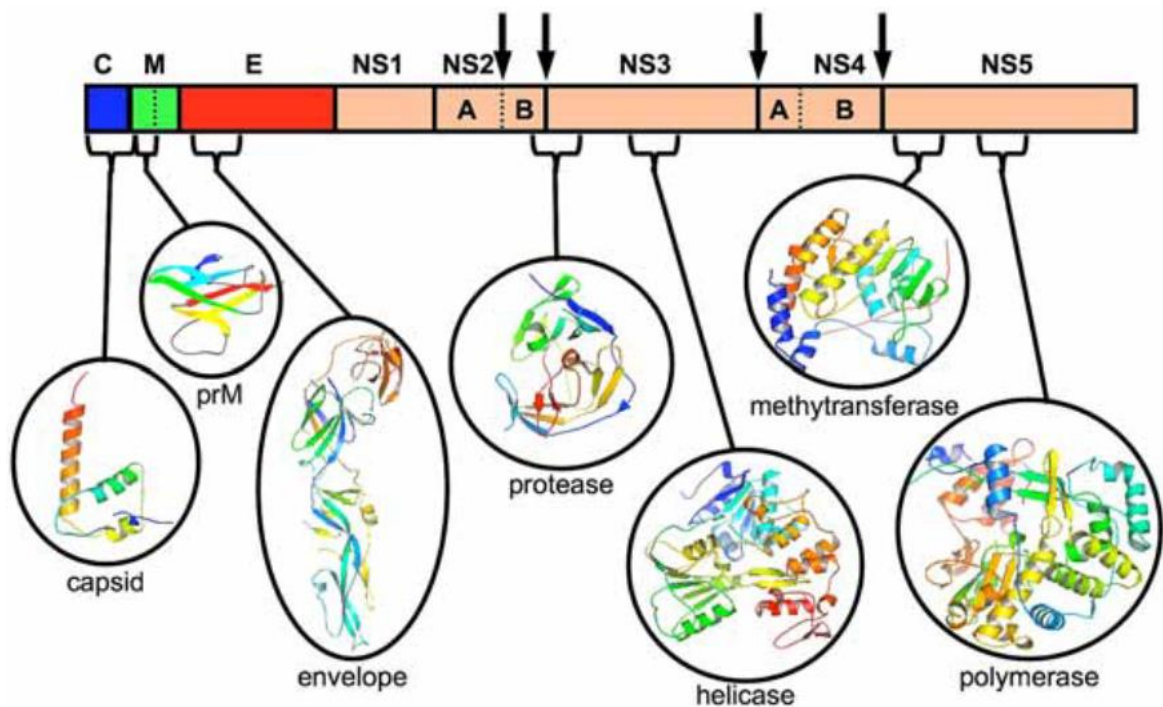


Figura 8. Estructura elemental de la poliproteína del DENV. Se muestran las estructuras individuales. Las flechas verticales indican los sitios de división de la poliproteína (Tomlinson *et al.*, 2009).

2.12 Proteínas estructurales del DENV (C, M, y E)

2.12.1 Proteína C

La proteína de la cápside (C) también conocida como core, o de cubierta, tiene un peso molecular de 12 kDa. Se conforma de una estructura secundaria que consiste en cuatro hélices alfa que cumplen diferentes funciones; la hélice 1 se orienta hacia el citoplasma, los aminoácidos que posee son de carácter básico, el cual le permite asociarse y unirse fuertemente al ARN genómico recién sintetizado, formando así el complejo riboproteico o nucleocápside la cual protege al ARN viral de la degradación y promueve la organización del ARN en el interior de la partícula viral en formación. La hélice 2 interviene durante: 1) El ensamblaje de la ribonucleoproteína, favoreciendo el acercamiento del ARN viral al resto de la proteína C y 2) El ensamblaje de la partícula viral, reclutando gotas lipídicas (*lipid droplets*) que promueven la formación de la partícula viral. Las hélices 3 y 4 son hidrofóbicas y anclan la proteína a la membrana del retículo endoplásmico (Velandia *et al.*, 2011). Es esencial en la unión del virus para encapsulación específica del genoma viral. La proteína C, es la más conservada entre los *Flavivirus*. La región N-terminal y C-terminal de la proteína C contiene una región altamente positiva separada por una región hidrofóbica que puede interactuar con la membrana lipídica de la célula. La proteína de la cápside naciente del DENV contiene una C-terminal hidrofóbica a lo ancho que sirve como una señal peptídica para la traducción en el retículo endoplásmico de la membrana precursora (Shang *et al.*, 2012).

La proteína C es un dímero que tiene un plegamiento helicoidal responsable del empaquetamiento del genoma. La proteína C aparentemente se asocia a la membrana intracelular a través de un dominio hidrofílico conservado, se ha encontrado que la proteína C acumula lípidos alrededor del retículo endoplásmico (RE) (Nemesio *et al.*, 2011).

2.12.2 Proteína prM/M

La proteína precursora (prM) con un peso de 26 kDa, se encuentra presente en los viriones inmaduros y junto a la proteína M, participa en el proceso de maduración de la partícula viral. La prM es procesada después de la transducción por la proteasa celular furina, la cual genera, el péptido pr y la proteína M con un peso molecular de 8 kDa, esto implica un incremento en la infectividad y la reorganización de la estructura de la superficie viral. (Velandia *et al.*, 2011; Bruke *et al.*, 2001).

La proteína prM es traducida en el RE por la región hidrofóbica de dominio C-terminal. La escisión es debido a peptidasas del hospedero y es removida de la cápside (Bruke *et al.*, 2001). En la región N-terminal de la pr contienen 6 sitios de glicosilación y 6 residuos conservados de cisteína, todas se encuentran unidas por disulfuro (Bruke *et al.*, 2001). El segmento pr de la prM se piensa que estabiliza y mantiene la forma E bajo arreglos donde se reduce el pH ambiental en la primera etapa de secreción. Enseguida de la escisión, la proteína M se encuentra en los viriones maduros, mientras que el fragmento pr es secretado (Bruke *et al.*, 2001).

2.12.3 Proteína E

Es una glicoproteína que posee un peso molecular de 50 kDa. Desempeña un papel durante la penetración del virus en la célula y en la respuesta inmunitaria (Guzmán *et al.*, 2006). Debido a que actúa como antígeno principal de protección, en consecuencia induce la producción de anticuerpos neutralizantes (Shang *et al.*, 2012). Es la única proteína viral que interactúa con las moléculas receptoras de la membrana plasmática de las células vulnerables que favorecen la endocitosis del virus (Velandia *et al.*, 2011). Esta proteína posee tres dominios I, II y III que se distribuyen sobre la superficie del virus. Dominio I es el dominio central que contiene la especificidad del virus. El dominio II es un dominio dimerizado que contiene una serie de epítopes. El dominio III tiene una inmunoglobulina para las interacciones entre el virus y los receptores de las células dianas (Shang *et al.*, 2012; Velandia *et al.*, 2011).

La proteína E es una proteína de fusión clase II, esencial para la fijación, unión a la membrana y unión. Entre los dominios comparte estructuras y funciones características en dominios específicos que interactúan y altera a la membrana biológica. Una serie de cambios conformacionales ocurren en la proteína E que ocurren en el endosoma a bajo pH y da lugar a la fusión viral. La proteína E inicia su primer contacto entre el virus y la célula del hospedero, es un determinante de tropismo y virulencia, como el mejor blanco para la neutralización de anticuerpos de DENV. En la región N-terminal del ectodominio de la proteína presenta tres dominios que consisten predominantemente en hojas β (aminoácidos 1-395). La fusión del bucle de la proteína E se localiza entre los aminoácidos 98-112. Dos α -hélices que unen al ectodominio soluble y a los dos dominios transmembrana de la proteína E que forman un tallo (aminoácidos 396 a 447) que contribuye a la flexibilidad que se requiere para cambios conformacionales. La proteína E puede interactuar con otras proteínas a través de un motivo conservado Pro-rich (Nemesio *et al.*, 2011).

2.13 Proteínas no estructurales del DENV (NS)

La mayoría de las proteínas NS se cree que son las responsables para el procesamiento de la poliproteína y la replicación del ARN viral, este último tiene lugar en la membrana asociada al complejo de replicación (CR) del virus (Nemesio *et al.*, 2012). Recientes estudios de proteínas no estructurales de algunos *Flavivirus* indican que estas actúan como antagonistas en la ruta de la señalización del interferón (INF) (Tajima *et al.*, 2010).

2.13.1 NS1

Es una glicoproteína de 45 a 48 kDa, que participa en la maduración viral (Guzmán *et al.*, 2006). Es traducida en el lumen del retículo endoplásmico (RE) como una glicoproteína monomérica, es transportada al aparato de Golgi donde sufre modificaciones y secretada de la célula (Lindenbach *et al.*, 2003). Se encuentra implicada en la replicación eficiente del ARN viral. La proteína NS1 ha estado asociada en la patogenicidad a consecuencia de una infección por *Flavivirus*. Los niveles altos de

NS1 en el suero de pacientes infectados por DENV se correlacionan con la enfermedad severa (Youn *et al.*, 2010). Se puede encontrar soluble en el citoplasma y en el espacio extracelular por esta razón la NS1 puede estimular al sistema inmunitario (Velandia *et al.*, 2011). La NS1 está asociada con la NS4A, pueden ser determinadas en los primeros pasos del ciclo de replicación viral (Nemesio *et al.*, 2012).

2.14.2 NS2

Se encuentra constituida por dos subunidades NS2A y NS2B

NS2A

Proteína de 22kDa, promueve el ensamblaje y la replicación viral. Al parecer, la NS2A coordina de un modo aún no muy bien definido, si el ARN genómico producido en cada ciclo de replicación se utiliza como plantilla para generar las formas replicativas o si se asocia dentro de la nucleocápside durante el ensamblaje viral (Velandia *et al.*, 2011; Zuo *et al.*, 2009).

NS2B+

Proteína de 14 kDa, posee una membrana hidrofóbica que se ancla a la membrana del RE. Por un procesamiento proteolítico, la proteína recién liberada NS2B interactúa con el dominio proteasa de la proteína NS3 para actuar como un co-factor de ésta (Velandia *et al.*, 2011), formando un complejo con NS3 (NS2B/NS3) para la función de serina proteasa (Zuo *et al.*, 2009; Yusof *et al.*, 2000).

2.13.3 NS3

Tiene un peso molecular de 70kDa. Es una proteína multifuncional de 618 aminoácidos, que funciona como: serina proteasa ARN helicasa, NTPasa (5' nucleósido trifosfatasa), RTPasa (5' ARN trifosfatasa). La función helicasa desenrolla las estructuras secundarias que se forman en el extremo 3' del ARN viral para favorecer la unión de la polimerasa NS5 sobre el ARN (Velandia *et al.*, 2011; Perera *et al.*, 2008; Sampath *et al.*, 2006).

2.13.4 NS4

Se encuentra conformada por dos subunidades NS4A y NS4B, estas proteínas son fundamentales en los procesos de replicación del ARN (Nemesio *et al.*, 2012).

NS4A

Es una proteína hidrofóbica de 16 kDa que consiste de una porción N-terminal expuesta al citoplasma y se localiza en los sitios de replicación del ARN viral (Tajima *et al.*, 2010), además interactúa con la proteína NS1 y aparentemente funciona como cofactor de la proteína NS3 en tres regiones hidrofóbicas (residuos 50 a 73, residuos 76 a 89 y residuos 101 a 127), las cuales están altamente asociadas a la membrana. Además la proteína NS4A mantiene la actividad de desdoblamiento bajo condiciones de ATP deficiente (Shiryaev *et al.*, 2006).

Otra función de la proteína NS4A en la replicación viral del DENV está dada por el hecho de que esta proteína se encontró en estructuras reticulares y citoplasmáticas (derivadas de la asociación al RE). Se ha encontrado que la NS4A induce autofagia en las células epiteliales, protegiendo a las células del hospedero contra la apoptosis (Nemesio *et al.*, 2012).

NS4B

Es una proteína de membrana altamente hidrofóbica de 27 kDa y se localiza en los sitios de replicación del ARN, que a su vez aparece dispersa en la membrana citoplasmática y en el núcleo (Bartenschlager *et al.*, 2008). La proteína NS4B es un modulador negativo de la función helicasa, esta modulación depende de la conformación de NS4B (Nemesio *et al.*, 2012).

2.13.5 NS5

Es la proteína más grande con un peso molecular de 103 kDa. Es la proteína más conservada del DENV, la proteína NS5 tiene un 67% de secuencia de identidad entre los

cuatro serotipos 1-4. Es una proteína bi-funcional con un dominio metiltransferasa, y guaniltransferasa, responsable del capping y la metilación del extremo 5' del ARN genómico. En el extremo C-terminal, se ubica el dominio de ARN polimerasa dependiente de ARN (RpolRd). La NS5 actúa como la única polimerasa durante la replicación y transcripción viral en el citoplasma de la célula infectada (Velandia *et al.*, 2011; Bartenschlager *et al.*, 2008). La proteína NS5 también ha mostrado que incrementa las actividades NTPasa y RTPasa de la proteína NS3 (Luo *et al.*, 2012).

Es la proteína mejor conservada en el DENV tiene actividad ARN polimerasa dependiente de ARN en el extremo C-terminal y actividad metiltransferasa en el extremo N-terminal. (Nemesio *et al.*, 2012).

2.14 Importancia, estructura y función de la proteína no estructural NS3 del DENV

La NS3 se encuentra dentro de la cadena polipeptídica con dos actividades enzimáticas aparentemente desconectadas: una actividad proteolítica que se necesita en el procesamiento post-traducciona l de la poliproteína viral y la helicasa/ATPasa/actividad 5' ARN trifosfatasa requerida para la replicación del ARN viral y el capping 5'. La proteína no estructural 3 (NS3) de los flavivirus es la segunda proteína más conservada entre las proteínas virales (Luo *et al.*, 2012). Se ha encontrado que es una de las más importantes proteínas no estructurales (Rothan *et al.*, 2012). Tiene una masa molecular de 69 kDa o 618 residuos de aminoácidos, contiene múltiples funciones que incluyen procesamiento proteolítico, desdoblamiento del dúplex del ácido nucleico, nucleosido trifosfatasa (NTPasa) y ARN nucleosido 5' trifosfatasa (RTPasa) (Luo *et al.*, 2012). Estas actividades enzimáticas se encuentran suficientemente conservadas dentro de los cuatro serotipos (Natarajan *et al.*, 2010). Tiene un papel crucial en la replicación viral y en el procesamiento proteolítico. La NS3 constituye un blanco farmacológico prometedor para la terapia antiviral (Assenberg *et al.*, 2009). La inhibición de una de estas funciones enzimáticas es el principal objetivo para la terapia farmacológica (Melino *et al.*, 2007).

La proteína NS3 de los flavivirus codifica a una serin proteasa en la región N-terminal que se requiere durante el ciclo viral para el procesamiento proteolítico de la poliproteína viral (Luo *et al.*, 2012).

2.15 Papel biológico de la proteína NS3

2.15.1 El dominio proteasa

El dominio de la proteasa (NS3pro), se encuentra en la posición N-terminal de la proteína NS3 (en los residuos 1-180). El dominio NS3Pro actúa hidrolizando los complejos NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/ NS5 del polipéptido (Salaemae *et al.*, 2010; Dewi *et al.*, 2009). La función del dominio NS3 proteasa depende de su asociación con la proteína NS2B, que le confiere estabilidad durante su actividad; mientras que la poliproteína viral se escinde en diversos sitios. La enzima proteasa consiste en hojas β que forman 2- β barriles, con la triada catalítica (His-51, Asp-75 y Ser-135) intercalada entre ellos. La actividad de la proteasa depende de la presencia de su co-factor NS2B. La proteína NS3 incluye residuos aminoacídicos del 49-66 del NS2B que están vinculados en la N-terminal de la secuencia completa de la NS3 por una unión serina-glicina. Los residuos 67-80 de la NS2B son de importancia crítica para la actividad proteasa. (Perera *et al.*, 2008).

Codifica a una tripsina como serina proteasa. El complejo proteasa NS2B-NS3 es esencial para el procesamiento de la poliproteína porque es la responsable de todas las divisiones entre las proteínas en el lado citoplasmático de la membrana del RE (Luo *et al.*, 2012). Como resultado de la actividad proteolítica, las proteínas no estructurales maduras se liberan de las células infectadas y, junto con los componentes celulares de unión del hospedero para formar el complejo de replicación viral asociada a la membrana.

El complejo dominio proteasa NS2B-NS3 preferentemente divide al puente peptídico río abajo o en un par de aminoácidos básicos altamente conservados (Arg o

Lys) en la posición P1 y P2, seguido por un aminoácido con una cadena lateral corta (Gly, Ala o Ser) en el sitio P1' (Luo *et al.*, 2012).

2.15.2 El dominio helicasa

El dominio helicasa (NS3Hel) (residuos 180-618), ha sido implicado en la interacción con la polimerasa NS5 además juega un papel en el ciclo de vida en la replicación del ARN (Bazán *et al.*, 1989; Chambers *et al.*, 1990). La NS3 también ha sido implicado en la inducción de apoptosis en células infectadas (Perera *et al.*, 2009).

La NS3 helicasa comprende tres subdominios, identificados como miembros de la superfamilia SF2 de las helicasas situadas dentro de los subdominios 1 y 2. La actividad ATPasa se encuentra alojada entre estos dos dominios y se encuentran estructuralmente bien conservadas en comparación con otras helicasas de otros flavivirus.

La ARN helicasa lleva la secuencia del motivo DEAH que pertenece a la superfamilia SF2, de acuerdo a la clasificación de las helicasas basadas en los motivos conservados (Luo *et al.*, 2012). La NS3 alberga dominios con actividad ARN helicasa requerida para el desdoblamiento del dúplex del ARN y/o estructuras secundarias durante la replicación del genoma por la RpolRd de la NS5. La actividad nucleosido 5' trifosfatasa (NTPasa) es requerida para proveer la energía para la actividad del desdoblamiento de la helicasa. Además la actividad ARN trifosfatasa en la región 5' terminal juega un papel esencial en la síntesis de la estructura 5' cap y recientemente se propuso la unión independiente de estas funciones enzimáticas (Luo *et al.*, 2012). La helicasa de la NS3 tiene una dirección 3' a 5' y puede desdoblar dsARN con una horquilla en el extremo 3'. La helicasa no aparenta ser una ARN helicasa procesiva. Como la región extendida del dúplex se extiende de 22 a 36 pares de bases, su habilidad de desdoblamiento decrece dramáticamente y la actividad de hidrólisis del ATP llega a ser absolutamente requerida (Luo *et al.*, 2012). La actividad helicasa de NS3 difiere de otras ARN helicasas del conjunto de DEAD. Usualmente el conjunto DEAD demuestra una actividad pobre en el desdoblamiento de la ARN y además requiere la asistencia de

cofactores (Luo *et al.*, 2012). El dominio helicasa de la proteína NS3 está conectado con el dominio proteasa a través de su conector altamente flexible abarcando los residuos 169-179 (Luo *et al.*, 2012).

2.15.3 Actividad NTPasa

La actividad NTPasa implica la unión de NTP y la hidrólisis de su puente anhídrido γ -fosfórico acoplado con la liberación de NDP y fosfato inorgánico (Luo *et al.*, 2012).

2.15.4 Actividad ARN trifosfatasa

Esta actividad es la primera de las tres reacciones enzimáticas requerida para la adición de una 5' cap para el ARN viral, un proceso que se necesita para la traducción del genoma viral. Las actividades de RTPasa y la NTPasa comparten un sitio activo en la proteína NS3 (Luo *et al.*, 2012).

2.16 La proteína NS3 del DENV-2 como blanco farmacológico

En la actualidad no hay vacunas específicas para la prevención y tratamiento para la fiebre por dengue y la fiebre hemorrágica por dengue. En recientes años, se han tenido importantes progresos en la comprensión del ciclo viral, ya que cada etapa de esta representa un blanco potencial para el desarrollo de fármacos contra el dengue. (Natarajan, 2009). Es de particular interés la NS3, sus actividades enzimáticas se encuentran conservadas dentro de los cuatro serotipos (comparten una identidad en su secuencia aminoacídica del 65-70%). Por lo tanto es posible desarrollar componentes activos contra todos los serotipos del DENV. Además la NS3 de DENV comparte una homología de más de un 50% en su secuencia aminoacídica con proteasas de WNV y YFV. Las proteasas virales, son a menudo propuestas como blancos farmacológicos debido a su misión esencial, en el procesamiento de la poliproteína viral y a su asociación con el cofactor NS2B. Este complejo es el responsable de la división entre las proteínas de la poliproteína viral que se encuentran en el citoplasma o en la membrana

del RE. Como resultado de esta actividad proteolítica, las proteínas NS maduras son liberadas en las células infectas y, junto con los componentes celulares del hospedero, se unen para formar un complejo de replicación viral asociado a la membrana. La interrupción de esta actividad enzimática muestra ser letal a la replicación viral (Luo *et al.*, 2012). De acuerdo a estudios computacionales se han identificado como substratos óptimos de inhibidores de proteasas: al tetrapéptido aldehído, Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H, el cual es un inhibidor competitivo del complejo proteasa (Lescar *et al.*, 2008). (Luo *et al.*, 2008) menciona al residuo Phe-116, Ile-123, Try-262, y Val-162 como el sitio blanco farmacológico para el desarrollo de un antiviral “alostérico”, ya que se encuentran evolucionariamente conservados ente los flavivirus. Se pretende prevenir la propagación del dengue al inhibir la actividad catalítica más funcional de la NS3pro His-51, Asp-75, y Ser-135 en la región N-terminal (Rothan *et al.*, 2012). Otra opción al desarrollo de inhibidores para las proteasa del dengue, son los péptidos que mimetizan la actividad proteasa ya que es poco probable de provoquen una respuesta inmune. Basados en la estructura cristalográfica de la proteasa del dengue se identificaron: al tetrapéptido (Lys-Gly-Pro-Glu), al pentapéptido (Ser-Ile-Lys-Phe-Ala) y el hexapéptido (Ala-Ile-Lys-Lys-Phe-Ser) como prometedores inhibidores que potencien el desarrollo de fármacos antivirales (Velmurugan *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

El dengue es la enfermedad viral más común en regiones tropicales y subtropicales del mundo. El aumento de la distribución geográfica, la incidencia y la severidad de las enfermedades en las últimas décadas, ha estimulado a nuevos tratamientos para combatir la enfermedad de dengue.

Actualmente, es la arbovirosis más prevalente en la salud pública de muchos países y está asociada a pobreza y mala urbanización. No existen antivirales ni vacuna efectiva y el control químico vectorial, aunque impredecible y caro por su operación es la única estrategia de combate para interrumpir la transmisión del virus.

Esta emergencia en América ha sido especialmente dramática. En el caso de México, la enfermedad se presenta cada año con un patrón de brotes de importancia, que ocurren prácticamente en todo el territorio nacional tanto en poblaciones urbanas como en rurales presentando picos en los meses de lluvia.

Se conoce que el dominio serina-proteasa de la proteína NS3 del DENV, es el responsable del procesamiento proteolítico de la poliproteína viral y la interrupción de esta actividad enzimática ha mostrado ser letal para la replicación viral. Siendo así que NS3, es considerada como un blanco potencial en el desarrollo de fármacos antivirales del dengue.

Sin embargo, para el diseño del fármaco, primeramente es esencial la manipulación *in vitro* de la proteína NS3, para permitir el desarrollo de proteínas en cantidades suficientes para el análisis de la estructura y función de la misma.

En el presente trabajo, se produjo la proteína recombinante his-tag NS3 en *E. coli*, a través de la tecnología del ADN recombinante, que requirió de un diseño adecuado para su producción. Posteriormente se modeló su estructura tridimensional en base a una estructura conocida de una proteína relacionada para la localización de las funciones esenciales de la proteína.

4. HIPÓTESIS

Es posible integrar un sistema en *E. coli*, para la producción de la proteína recombinante NS3 mediante sobre-expresión.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Obtener la proteína recombinante his-tag NS3 del DENV-2 de la cepa Jam1409 en un sistema de expresión procarionte.

5.2 Específicos

1. Construir la proteína recombinante his-tag NS3 del DENV-2 en el plásmido de expresión pPROEX HT-a
2. Determinar las condiciones óptimas para la expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 del DENV-2 en *E. coli*.
3. Modelar e imitar la estructura tridimensional de la proteína NS3 DENV-2 cepa Jam1409.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental que se utilizó para el desarrollo de esta investigación se dividió en 3 etapas: 1) Construcción de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2 en el plásmido de expresión pPROEX HT-a, 2) Determinación de las condiciones óptimas para la expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2 en *E. coli.*, 3) Modelaje e imitación de la estructura tridimensional de la proteína NS3 DENV-2.

6.1 Construcción de la proteína recombinante his-tag NS3 del DENV-2 en el plásmido de expresión pPROEX HT-a

6.1.1 Gen de la proteína NS3

El gen de la proteína NS3 proviene del plásmido pBAC1409ic que se construyó a partir del DENV-2 mediante el uso de un vector de un cromosoma artificial bacteriano pBeloBac, el cual contiene la secuencia completa del ADNc de la cepa Jamaiquina 83 1409 del virus. El gen de proteína NS3 fue donado por la Dra. María Isabel Salazar del Laboratorio de Inmunología Celular e Inmunopatogénesis de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México DF.

Se descargó la secuencia nucleotídica del virus y aminoacídica de la proteína NS3 (M20558.1). Después mediante el programa en línea <http://web.expasy.org/trasnlate/>, se tradujo la secuencia nucleotídica del virus. Posteriormente se buscó la región correspondiente de la proteína NS3 en el genoma traducido.

6.1.2 Clonación en el plásmido pGEM T-easy®+NS3

6.1.2.1 Amplificación del gen de la proteína NS3 DENV-2 cepa Jam1409

Para la amplificación del fragmento del gen se utilizó PCR de punto final. La mezcla de PCR contenía Buffer 1X, dNTPs 0.2 mM, 1.2 mM MgCl₂ (Promega), 1 mM de iniciadores NS3F (5'-AAAGGATCCAATGGCTGGAGTATTGTCCCACG -3', NS3Hind (5'-CGGAAAGCTTCTACTTTCTTCCAGCTGCAA-3'), 5 U/μl Taq polimerasa (Bioline, USA), 2 μl ADN y 17.15 μl H₂O Milli-Q estéril en un volumen final de 25 μl. La reacción se corrió en el termociclador (Bio-Rad, DNA Engine Dyad®). Los ciclos de PCR fueron: 1 ciclo de 2 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de amplificación a 94 °C por 45 s, 60 °C por 45 s, 72 °C por 50 s. La reacción se completó con la incubación con 1 ciclo a 72 °C a 7 min.

6.1.2.2 Ligación del gen de la proteína NS3 y el plásmido pGEM T-easy®

La reacción de ligación se realizó con 1 μl pGEM T-easy® (Promega, USA), 5 μl 2X rapid Buffer, 1 μl Ligasa T4 (Promega, USA), 3 μl gen NS3 (recién amplificado), en un volumen final de 10 μl.

6.1.2.3 Transformación celular en DH5α de *E. coli*

Se depositaron 2 μl de plásmido pGEM T-easy® en tubos eppendorf fríos, posteriormente se añadió 100 μl de células competentes DH5α y se incubaron en hielo durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se les dio un choque de calor al tubo con las células y el plásmido a 42 °C durante 50 s, finalizado el tiempo se incubó nuevamente el tubo en hielo por 2 min. Posteriormente se añadió 500 μl de medio LB, finalmente se incubaron los tubos a 37 °C durante 1 h en agitación. Posteriormente las células se sembraron en placas con medio LB con Ampicilina [100 μg/ml] y se incubaron por 12 h a 37 °C.

6.1.2.4 Confirmación de la construcción de pGEM T-easy® + NS3 por PCR en colonia

Antes de realizar la PCR en colonia, para confirmar la construcción pGEM T-easy® + NS3 se seleccionaron al azar 20 colonias y se desnaturalizaron. Después se tomó 5 µl de agua Milli-Q en tubos eppendorf PCR, a cada tubo se adicionó una asada de cada colonia, las colonias se lisaron a 99 °C por 20 min (Bio-Rad, DNA Engine Dyad®), se centrifugaron los tubos eppendorf PCR a 14000 x g, y se tomó 2 µl de cada colonia lisada para realizar la PCR directa. La mezcla de PCR contenía 2.5 µl Buffer 10 X (Promega), dNTPs 0.2 mM, 1.2 MgCl₂, 1 mM de iniciadores forward y reverse, 5 U/µl Taq polimerasa (marca), 2 µl ADN y 17.15 µl H₂O Milli-Q estéril en un volumen final de 25 µl. La reacción de PCR consistió de 1 ciclo de 2 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de amplificación a 94 °C por 45 s, 60 °C por 45 s, 72 °C por 50 s. La reacción se completa con la incubación con 1 ciclo a 72 °C a 7 min.

6.1.2.5 Secuenciación nucleotídica de la construcción pGEM T-easy® + NS3

Las colonias transformadas de *E. coli* se secuenciaron en ABI 3130 (Genetic Analyzer 3130 N/S=19336) para determinar el orden de los nucleótidos de la secuencia de ADN del gen de la proteína his-tag NS3.

6.1.2.6 Digestión del pGEM T-easy® + NS3 con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III

La reacción de digestión para se realizó con 10 µl Buffer E, 5 µl *Bam*HI, 5 µl *Hind*III, 1.1 µl BSA (Promega), ADN 25 µl, 63.9 µl H₂O Milli-Q en un volumen final de 110µl. La reacción de digestión se incubó por 3 h a 37 °C, una vez concluida la incubación se inactivó con 2 µl EDTA 0.5 mM a 70 °C durante 10 min.

6.1.2.7 Purificación en gel de la digestión del plásmido pGEM T-easy® y NS3 con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III

Se siguió el protocolo de acuerdo al fabricante QIAprep quick gel extraction kit 250 (Qiagen®). Se cortaron las bandas correspondientes al peso molecular de pGEM T-easy® (3 Kb) y NS3 (1.8 kb). Se sacó la diferencia de los tubos eppendorf vacíos y con los fragmentos a purificar en agarosa. Se agregaron 3 volúmenes de buffer QG, después se añadió un volumen de isopropanol al 100% y se mezcló cada tubo. Cada fragmento, se colocó en una columna Qiagen® y se centrifugaron a 14000 x g por 1 min. Posteriormente a cada columna se adicionaron 500 µl de buffer QG, se centrifugaron las columnas a 14000 x g por 1 min y se lavaron con 750 µl de buffer PE, posteriormente se centrifugaron las columnas a 14000 x g por 1 min. Cada columna se pasó a un tubo eppendorf estéril para eluir con 20 µl de H₂O Milli-Q.

6.1.3 Sub-clonación de la proteína NS3 en el plásmido pPROEX HT-a

El plásmido pPROEX HT-a (Invitrogene®, USA), contiene una región de 6 histidinas como etiqueta en su secuencia aminoacídica que facilitó la detección de la proteína recombinante NS3.

6.1.3.1 Extracción de ADN del plásmido pPROEX HT-a

La extracción del ADN plasmídico se realizó de acuerdo al fabricante QIAprep Spin Miniprep Kit (250) (Qiagen®). Se pasó del medio de cultivo con el plásmido pPROEX HT-a a tubos eppendorf de 1.5 ml, se centrifugaron los tubos eppendorf a 8000 x g durante tres minutos. Después las células bacterianas se re-suspendieron en 250 µl del buffer P1, enseguida se adicionó 250 µl del buffer P2 y 350 µl del buffer N3. La mezcla se centrifugó por 10 min a 13000 x g, el sobrenadante se pasó a una columna QIAprep y se agregó 500 µl del buffer PB, se centrifugó por 1 min y se descartó el

sobrenadante para después lavar la columna con 750 µl de buffer PE. La columna sin sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf estéril y se adicionó 50 µl de H₂O Milli-Q.

6.1.3.2 Digestión del plásmido pPROEX HT-a con las enzimas de restricción

***Bam*HI y *Hind*III**

La reacción de digestión para el plásmido pPROEX HT- a, se digirió con 12 µl Buffer E, 5 µl *Bam*HI, 5 µl *Hind*III, 1.2 µl BSA (Promega®), ADN 30 µl, 66.8 µl H₂O Milli-Q en un volumen final de 120 µl. Posteriormente se incubó la reacción de digestión por 3 h a 37 °C, una vez concluida la incubación se inactivaron con 2 µl EDTA 0.5 mM a 70 °C durante 10 min.

6.1.3.3 Purificación en gel de la digestión del plásmido pPROEX HT-a con las enzimas de restricción *Bam*HIy *Hind*III

Se siguió el protocolo de acuerdo al fabricante QIAprep quick gel extraction kit 250 (Qiagen®). Se cortó la banda correspondientes al peso molecular del pPROEX HT-a (4.7 kb). Se sacó la diferencia del tubo eppendorf vacío y con el fragmento a purificar en agarosa. Se agregaron 3 volúmenes de buffer QG, después se añadió un volumen de isopropanol al 100% y se mezcló cada tubo. El fragmento, se colocó en una columna Qiagen® y se centrifugó a 14000 x g por 1 min. Posteriormente a cada columna se adicionó 500 µl de buffer QG, se centrifugó la columna a 14000 x g por 1 min y se lavó con 750 µl de buffer PE, enseguida se centrifugó la columna a 14000 x g por 1 min. La columna se pasó a un tubo eppendorf estéril para eluir con 20 µl de H₂O Milli-Q.

6.1.3.4 Ligación del gen de la proteína NS3 y el plásmido digerido pPROEX HT-a

La reacción de ligación del gen de la proteína NS3 y el plásmido pPROEX HT-a, se realizó con 1 µl pPROEX HT-a (Promega®), 1 µl buffer T4 ligasa, 1 µl Ligasa T4

(Promega®, USA), 5 µl gen NS3, 2 µl de H₂O Milli-Q en un volumen final de 10 µl. Se incubó a 4°C toda la noche.

6.1.3.5 Transformación celular en DH5α de *E. coli*

Se siguió el mismo protocolo descrito en la sección 5.1.2.4

6.1.3.6 Confirmación de la construcción de pPROEX HT-a+ NS3 por PCR en colonia

Antes de realizar la PCR, se desnaturalizaron las colonias seleccionadas. Se tomaron 5 µl de agua Milli-Q en tubos eppendorf PCR, a cada tubo se adicionó una asada de cada colonia, las colonias se lisaron a 99 °C por 20 min (Bio-Rad, DNA Engine Dyad®, USA), se centrifugaron los tubos eppendorf PCR a 14000 x g, y se tomaron 2 µl de cada colonia lisada para realizar la PCR directa. La mezcla de PCR contenía Buffer 1X (Promega®), dNTPs 0.2 mM, 1.2 MgCl₂, 1 mM de iniciadores forward y reverse, 5 U/µl Taq polimerasa (Bioline®), 2 µl ADN y 17.15 µl H₂O Milli-Q estéril en un volumen final de 25 µl. La reacción de PCR consistió de 1 ciclo de 2 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de amplificación a 94 °C por 45 s, 60 °C por 45 s, 72 °C por 50 s. La reacción se completa con la incubación con 1 ciclo a 72 °C a 7 min.

6.1.3.7 Secuenciación nucleotídica de la construcción pPROEX HT-a+ NS3

Las colonias transformadas de *E. coli* se secuenciaron en ABI 3130 (Genetic Analyzer 3130 N/S=19336) para determinar el orden de los nucleótidos de la secuencia de ADN del gen de la proteína his-tag NS3.

6.1.3.8 Transformación celular en las células de expresión Rosetta gami, XL-Blue, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS y BL21(DE3)pLysS Single-Use de *E. coli*

Se llevaron a cabo por un choque de calor. Se siguió el siguiente protocolo: se depositaron 5 μ l de plásmido pPROEX HT-a, en tubos eppendorf fríos, posteriormente se añadió 100 μ l de células competentes Rosetta gami, XL-Blue, BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS y BL21(DE3) pLysS Single-Use de *E. coli* y se incubaron en hielo durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se le dio un choque de calor al tubo con las células y el plásmido a 42 °C durante 50 s, finalizado el tiempo se incubó nuevamente el tubo en hielo por 2 min. Posteriormente se añadió 500 μ l de medio 2xYT, finalmente se incubaron los tubos a 37 °C durante 1h en agitación. Posteriormente las células se sembraron en placas con medio 2xYT con ampicilina [100 μ g/ml], se incubaron toda la noche a 37 °C.

6.1.3.9 Selección de las células transformadas

La caracterización fenotípica de las células sometidas al proceso de transformación, fue el primer paso para la detección de la clona deseada. La selección de células transformadas se llevó a cabo con la toma de una colonia transformada (aproximadamente 15 colonias) del plásmido pPROEX HT-a. Se sembraron en medio 2xYT con ampicilina [100 μ g/ml], se incubaron toda la noche a 37 °C.

6.1.3.10 Confirmación de la construcción de pPROEX HT-a+ NS3 en las células de expresión de *E. coli* por PCR en colonia

Antes de realizar la PCR, se desnaturalizaron las colonias seleccionadas. Se tomó 5 μ l de agua Milli-Q en tubos eppendorf PCR, a cada tubo se adicionó una asada de cada colonia, las colonias se lisaron a 99 °C por 20 min (Bio-Rad, DNA Engine Dyad®, USA), se centrifugaron los tubos eppendorf PCR a 14000 x g, y se tomó 2 μ l de cada colonia lisada para realizar la PCR directa. La mezcla de PCR contenía Buffer 1X (Promega®), dNTPs 0.2 mM, 1.2 MgCl₂, 1 mM de iniciadores forward y reverse, 5 U/ μ l

Taq polimerasa (Bioline®), 2 µl ADN y 17.15 µl H₂O Milli-Q estéril en un volumen final de 25 µl. La reacción de PCR consistió de 1 ciclo de 2 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de amplificación a 94 °C por 45 s, 60 °C por 45 s, 72 °C por 50 s. La reacción se completa con la incubación con 1 ciclo a 72 °C a 7 min.

6.2 Expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 de DENV-2

Se probaron diferentes condiciones de expresión, se varió la temperatura a 25 y 20 °C, con una inducción con IPTG a 1 mM por más de 12 h de incubación en diferentes el medio de crecimiento 2xYT.

6.2.1 Sobre-expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 de DENV-2

Después de confirmar por PCR la construcción de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2. Se tomó una sola colonia fresca transformada de *E. coli* y se inoculó en un matraz con medio 2xYT con Ampicilina [100 µg/ml] a 37 °C toda la noche como pre-cultivo. Los medios frescos de 2xYT (Novagen, USA) se incubaron a 25 °C y 20 °C hasta alcanzar una OD₆₀₀₋₈₀₀ a 600 nm (Beckman Coulter TM DU 640 spectrophotometer), se tomó una muestra de 1 ml como tiempo cero (T0). Posteriormente se centrifugó la muestra a 12000 x g durante 2 min, se decantó el sobrenadante y se guardó la pastilla a 4°C. La producción de la proteína se indujo por la adición de IPTG al matraz a 1 mM y se incubó a 37 °C a 150 rpm por 5 h y toda la noche. Para seguir la dinámica de expresión se tomó 1 ml de muestra cada hora y se realizó el mismo procedimiento del tiempo cero. Después de la incubación por toda la noche, se sacó el matraz de la incubadora. Posteriormente se re-suspendieron las muestras (T0-toda la noche) en 50 µl buffer de carga 6X, se calentaron las muestras por 5 min a 99 °C. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron las muestras a 13000 g x por 2 min y se cargó 10 µl de muestra y se corrió SDS-PAGE de acrilamida.

6.2.2 Extracción de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2 a partir de cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión se disolvieron completamente en 8 M urea y la fusión de las proteínas también podría ser capturada por afinidad cromatografía a Ni²⁺ Sefarosa (GE Healthcare, USA).

Después de haber confirmado la expresión de la proteína en cuerpos de inclusión. Primero, se re-suspendió el pellet en 50 ml de buffer de re-suspensión (50 mM Tris-HCl pH 8.0, EDTA 1 mM; 150 mM NaCl, 0.1mM PMSF). Posteriormente se sonicó a 60% a 12 ciclos por 10s son intervalos de 20s entre cada ciclo. Después se añadió 1 ml MgSO₄ para eliminar el EDTA y 200 µl de lisozima (25 mg/ml) y se dejó incubar en agitación por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 9000 rpm a 4°C, se separó la pastilla del sobrenadante (se guardaron los sobrenadantes). Se re-suspendió la pastilla con 50 ml del Buffer de lavado 1 (Tritón X-100, 1% v/v disuelto en 50 mM, Tris HCl pH 8.0). Después se repitieron las mismas condiciones de sonicación de la pastilla, enseguida la adición de MgSO₄, para después centrifugar a 9000 rpm. Posteriormente se re-suspendió la pastilla con 5 ml de buffer de lavado 2 (TritónX-100, 1% v/v disuelto en 50 mM, Tris HCl pH 8.0) y 0.1 mM PMSF (5 µl en 50 ml). Después, se pasó a centrifugar a 9000 rpm por 20 min a 4°C, se separó la pastilla y el sobrenadante (igualmente se guardó el sobrenadante). Para continuar, la pastilla se re-suspendió en el buffer 3 (50 ml de agua desionizada) añadir 5 µl de 0.1mM PMSF y se dejó incubar en agitación por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 9000 rpm por 30 min a 4°C. Se separó el sobrenadante y pastilla, nuevamente el sobrenadante se guardó en refrigeración. Después, la pastilla se re-suspendió en 50 ml de urea 8M disuelta (Tris-HCl 50 mM pH 8 y 50 µl de PMSF 1 M). Posteriormente se dejó en agitación a 4 h a temperatura ambiente. Después, se centrifugó a 9000 rpm por 30 min. Por último se separó la pastilla y el sobrenadante, la pastilla se guardó en refrigeración.

6.2.3 Purificación de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2 mediante cromatografía de afinidad

Para la recuperación de esta proteína se empleó una resina His-Trap puesto que la proteína recombinante presenta en su amino terminal, una cola de seis histidinas que interaccionan con el níquel (Ni^{2+}) cargado en la resina (GE Healthcare). Se cargaron 3 ml de resina en una columna de cromatografía y se equilibró la columna con 5 volúmenes de Imidazol (Imidazol 5 mM e Imidazol 500 mM). De forma paralela, el extracto total de proteínas a partir de cuerpos de inclusión, se le adicionó imidazol 8 mM. La muestra que contenía la proteína recombinante fue adicionada a la resina. Se incubó la proteína recombinante con la columna 2 h a temperatura ambiente. Se recolectó lo que no se unió a la resina y se realizaron lavados con imidazol 15 mM. Finalmente, la proteína recombinante fue eluida con una concentración de 500 mM de imidazol. La resina fue lavada con 10 volúmenes de H_2O Milli-Q y 2 volúmenes de etanol al 20%.

6.2.4 Electroforesis en gel de acrilamida (PAGE)

La sobreexpresión de la proteína recombinante his-tag NS3 en las cepas de *E. coli*, se separaron en geles verticales SDS-PAGE poliacrilamida al 12% a 150 V por 30 min, en una cámara Mini Trans Blot Cell (Bio-Rad® Labs, USA). Se corrieron los geles con buffer de transferencia 1X a partir de un stock 10X (144 g Tris Base, 144g Glicina, 3.72 ml de EDTA y 10 g de SDS en 800 ml de H_2O Milli-Q y aforar a 1000 ml). Finalizada la transferencia electroforética fueron teñidas con Azul de Coomassie G-250.

6.2.5 Western Blot (WB)

Se verificó la presencia de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2 el gel SDS-PAGE al 12% y transferidos a la membrana de Nitrocelulosa, se bloqueó al aire durante 5 min y se dejó incubar a temperatura ambiente durante dos horas con el

anticuerpo primario de ratón Anti-His₆ (1:2000), seguido del anticuerpo secundario de conjugado de rábano de peroxidasa anti-raton IgG de cabra (1:2000) (Roche, USA). Después de 2 horas de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS 1X pH 7.4 por 10 min. Se continuó con el revelado, con la combinación de 500 µl super signal® west picoluminol enhancer solution y 500 µl super signal® west stable peroxidase solution del kit Super signal® West Pico Trial kit (Thermo Scientific®, USA), que fue visualizado en el WB.

6.2.6 Espectros de Dicroísmo Circular (DC)

Para analizar la estructura secundaria de la proteína his-tag NS3 purificada se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular de las muestras, en la región del UV lejano se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-815, equipado con un porta celdas tipo Peltier para el control de la temperatura y agitación magnética. Los espectros se obtuvieron de 280 a 295 nm, en celdas de cuarzo de 1 cm de recorrido óptico.

6.2.7 Espectros de emisión de fluorescencia

Los experimentos de espectroscopia de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS55. Este instrumento está equipado con un portaceldas con camisa de circulación de agua. Para la obtención de espectros, las muestras se excitaron a 280 nm y 295nm la emisión se detectó de 300 a 465 nm.

6.3 Modelaje por homología

6.3.1 Construcción tridimensional de la proteína NS3 DENV-2

Para obtener el modelo de la proteína NS3 DENV-2, se alineo la secuencia de la proteína estructural en 3D de NS3 DENV-4 disponible en PDB (2VBC). Se compararon las secuencias depositadas por Luo *et al.*, 2008 (P159795581). De este análisis se evaluaron tres diferentes modelos: triada catalítica del dominio proteasa, sitio blanco farmacológico, el conector entre el dominio proteasa y el dominio helicasa.

Primeramente se seleccionó el molde. A la secuencia problema se realizó BLASTp utilizando como base de datos las secuencias de las estructuras depositadas en la base de datos PDB (www.pdb.org). Se siguió con el alineamiento de las secuencias entre la proteína problema (NS3 DENV-2) y el molde (NS3 DENV-4), la secuencia de la proteína problema y el templado o molde, se alinearon y se depositaron en el programa *Modeller 9.12*. En segunda, el programa *Modeller 9.12* automáticamente computarizó y calculó el modelo que contuviera todos los átomos que no son hidrógenos. En tercera, se generaron 50 moldes de la proteína NS3 DENV-2 cepa Jam1409, que se evaluaron mediante el programa *Anolea* (Melo, 1998). Por último se seleccionó el modelo de mejor calidad.

6.4 Dinámica molecular (DM)

El primer paso en la construcción de los sistemas a simular fue la visualización de las estructuras 3D usando VMD (Humphrey W *et al.*, 1996), enfocándose en la identificación de regiones estructurales conservadas comunes entre las dos proteínas. Los refinamientos estructurales fueron realizados mediante métodos de equilibración y simulación de dinámica molecular usando NAMD 2.9 (Phillips *et al.*, 2005) con un modelo de caja de agua obtenido usando VMD.

La proteína modelada de NS3 DENV-2, fue sometida a una minimización estructural en una caja de dimensiones 83.97 Å x 68.13 Å x 103.27 Å, la proteína fue solvatada con 19619 moléculas de agua TIP3P (Jorgensen *et al.*, 1983).

Después de la minimización inicial, el sistema fue simulado en una dinámica molecular de 5 ns. Todas las simulaciones de dinámica molecular fueron hechas usando un paso de tiempo de 2 fs con condiciones periódicas en la frontera con un radio de corte de 12 Å en un sistema de caja rectangular con un ensamble isotérmico-isobárico, es decir, con número de partículas N, presión P y temperatura T fijos, usando el método SHAKE (Ryckaert, JP *et al.*, 1977) manteniéndose todos los enlaces de los átomos de hidrógeno rígidos.

Cada sistema fue minimizado y tratado bajo simulaciones de dinámica molecular manteniendo fija la cadena principal de la proteína. La temperatura fue mantenida a 310K. Las fuerzas electrostáticas de largo alcance fueron tomadas en cuenta por una aproximación PME (Schlick, 2002).

7. RESULTADOS

7.1 Construcción de la proteína recombinante his-tagNS3 del DENV-2 en el plásmido de expresión pPROEX HT-a

7.1.2 Amplificación del gen de la proteína NS3

De acuerdo a la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), se obtuvo a la secuencia correspondiente de la proteína NS3 (P29990) y al genoma del DENV-2 de la cepa Jam3 1409, (M20558.1). La amplificación del gen de la proteína NS3 con un PM de 1.8 Kb (Figura 9) se realizó por la técnica PCR en el termociclador (Bio-Rad, DNA Engine Dyad®).

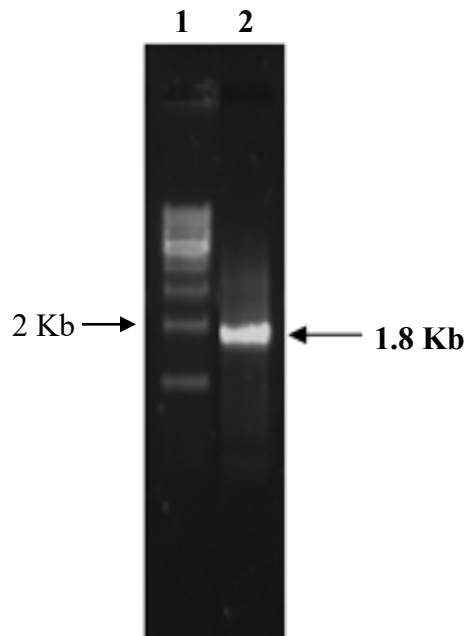


Figura 9. Mapa de la amplificación del gen de NS3. Marcador de DNA 1Kb (10- 1 Kb, Promega®, USA) (carril 1). Amplificación del gen de la proteína NS3 con un PM estimado en 1.8 Kb, indicando con la flecha a la derecha (carril 2). En gel de agarosa al 0.7%.

7.1.3 Clonación en el plásmido pGEM T- easy® + NS3

7.1.3.1 Ligación del plásmido pGEM® T-Easy y NS3 del DENV-2 Jam1409

El pGEM® T-easy, es un sistema de clonación conveniente para productos de PCR y provee una eficiente ligación de productos de PCR (NS3), para prevenir la re-circularización del plásmido. Se siguió el protocolo recomendado por Promega®. La amplificación del producto de PCR (Figura 10) se realizó el mismo día de la ligación 2X Rapid.

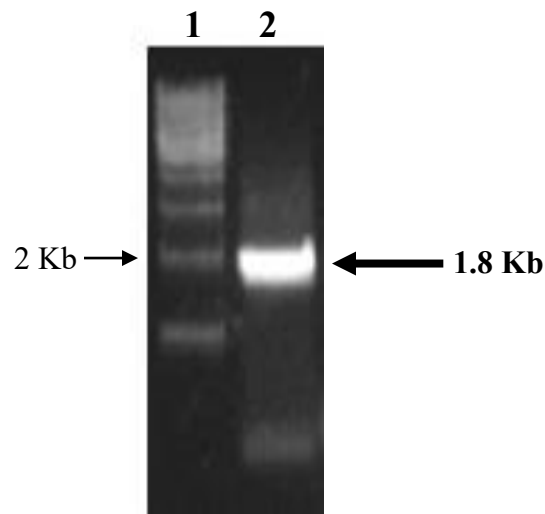


Figura 10. Mapa de ligación pGEM® T-Easy y NS3. Marcador de DNA 1Kb (carril 1) Promega®. Producto de PCR (carril 2), se esperó un producto de 1.8 Kb como está indicado por la flecha de color negro. En gel de agarosa al 0.7%.

7.1.3.2 Transformación en celular en DH5α de *E. coli*

Después de la reacción de ligación, se procedió a realizar la transformación de las células calcio competentes DH5α. Se prepararon placas que contenían el medio LB-Ampicilina a [100 µg/ml], en cada reacción de ligación, esto fue para determinar la eficiente transformación.

7.1.3.3 Confirmación de la construcción pGEM T-easy® + NS3 por PCR en

colonia

Para confirmar la inserción del gen de la proteína NS3 al plásmido pGEM® T-easy, se realizó PCR en colonia con los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la secuencia del gen de la proteína NS3 DENV-2 (Figura 11).

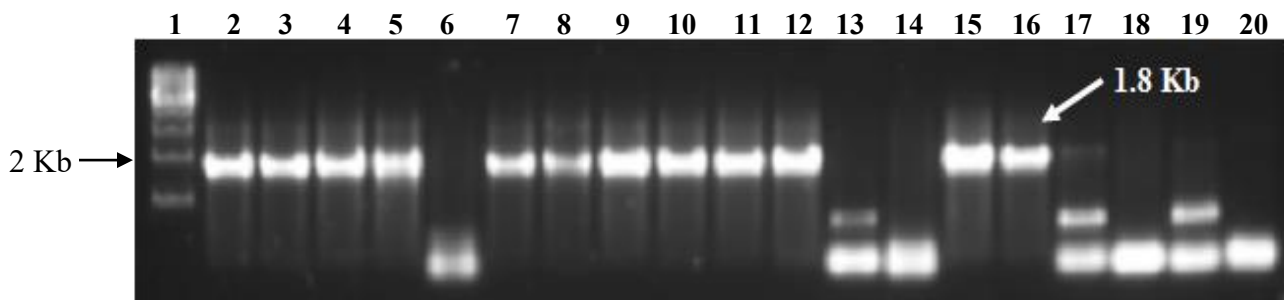


Figura 11. Mapa de resultados representativos de la amplificación por PCR. Marcador de DNA 1Kb (carril 1) Promega®. Productos de PCR (carril 2-19), estos representan una colonia de las placas de transformación, solo algunas presentaron amplificación del gen de la proteína NS3, con un producto esperado de 1.8 Kb, indicada por la flecha de color blanco. Como control negativo, una muestra sin ADN del gen de la proteína NS3 (carril 20). En gel de agarosa al 0.7%.

7.1.3.4 Secuenciación nucleotídica de la construcción pGEM T-easy® + NS3

Después de tener la clonación exitosa en pGEM® T-easy, se obtuvo el DNA de una colonia transformada con el posible inserto, se seleccionó la colonia no.1, para confirmar la construcción (Figura 12). El cromatograma es correcto de la construcción pGEM T-easy® + NS3 y no presenta mucho ruido de fondo.

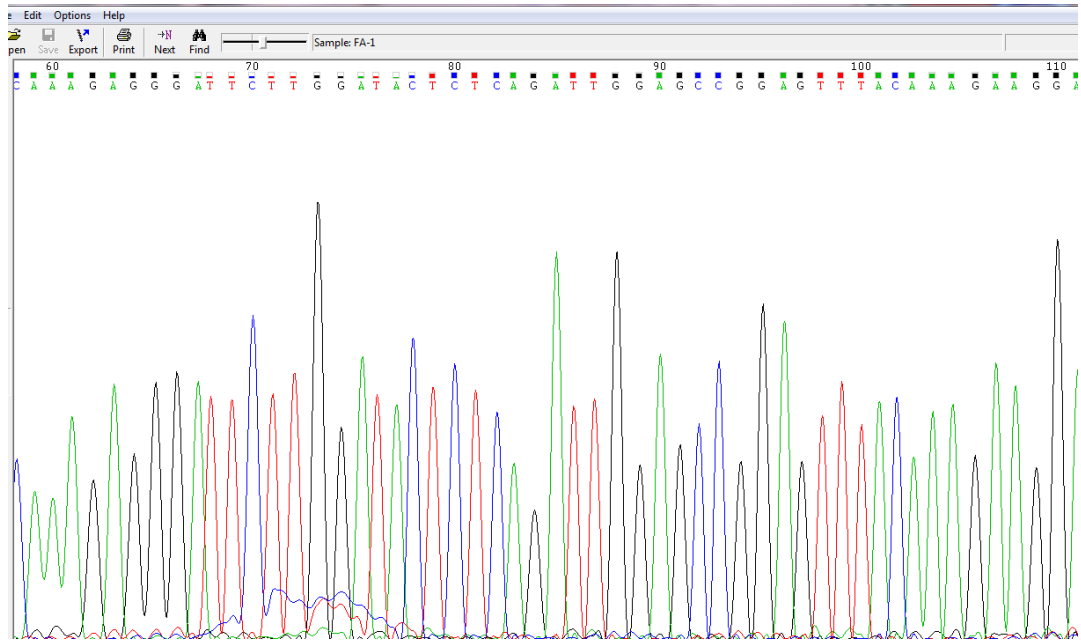


Figura 12. Secuenciación nucleotídica de la construcción de pGEM T-easy® y NS3. Alineada con la secuencia del DENV-2 cepa Jam1409, DataBank (M20558.1) con un máximo de identidad del 98%. Programa Chromas de Technelysium, Versión 2.4.

7.1.3.5 Digestión del pGEMT-easy® + NS3 con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III

DNA plasmídico de pGEM® T-easy, representativo de la colonia clonada (pGEM® T-easy + NS3) (carril 2), digerido con las enzima de restricción *Bam*HI y *Hind*III (Figura 13).

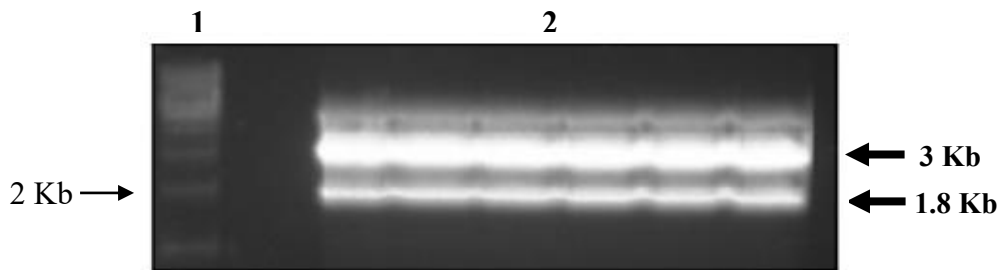


Figura 13. Mapa de electroforesis de la digestión del pGEMT-easy® + NS3. Marcador de DNA 1Kb (carril 1) Promega®, productos esperados de 3 Kb correspondiente al plásmido pGEM® T-easy y al gen del proteína NS3 DENV-2 con un peso de 1.8 Kb, indicados por las flechas de color negro (carril 2). En gel de agarosa al 0.7%.

7.1.3.6 Purificación en gel de la digestión del gen de la proteína NS3 DENV-2 con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III

Después de ser digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, se purificó el producto de acuerdo al manual QIAquick gel extraction kit (250) (Figura 14).

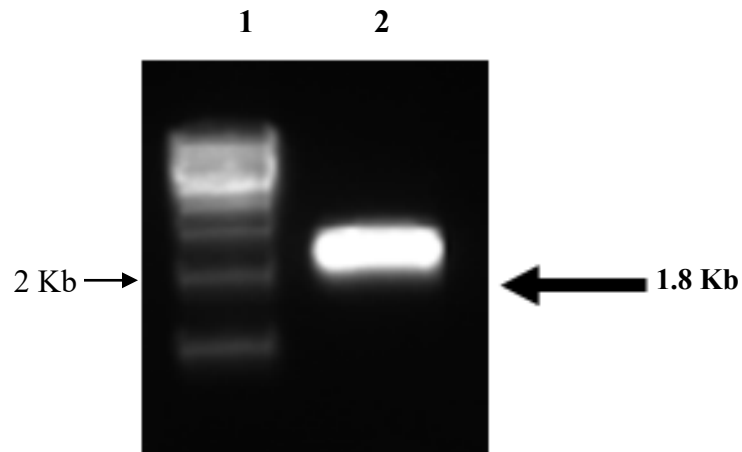


Figura 14. Mapa de purificación del gen de la proteína NS3. Marcador de DNA 1Kb (carril 1) Promega®. Gen de la proteína purificado para la posterior clonación del gen de la proteína NS3 DENV-2 con un producto esperado de 1.8 Kb, indicado por la flecha de color negro (Carril 2). En gel de agarosa al 0.7%.

7.1.4 Sub-clonación de la proteína NS3 en el plásmido pPROEX HT-a

7.1.4.1 Extracción de ADN del plásmido pPROEX HT-a

El DNA plasmídico presente en las bacteria de *Escherichia coli* cepa DH5 α , se realizó bajo el protocolo recomendado por QIAprep spin Miniprep kit (250) (Qiagen®) (Figura 15).

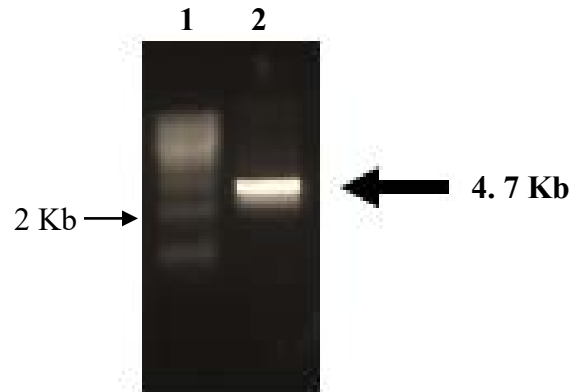


Figura 15. Mapa de extracción de ADN del plásmido pPROEX HT-a. Marcador de DNA 1Kb (carril 1) Promega®. 2) Extracción de DNA del plásmido pPROEX HT-a (carril 2), indicado con la flecha a la derecha. En gel de agarosa al 0.7%.

7.1.4.2 Digestión del plásmido pPROEX HT-a con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III

La digestión del plásmido pPROEX HT-a, se realizó con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (Figura 16).

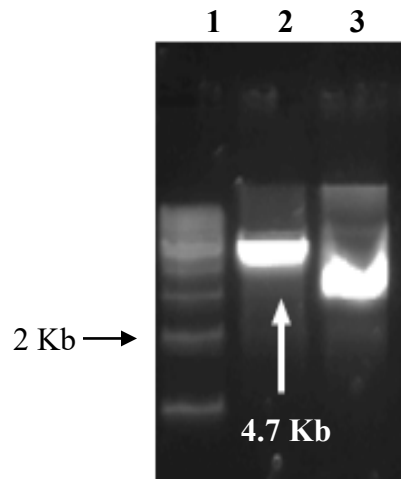


Figura 16. Mapa de la digestión de pPROEX HT-a. Marcador de DNA 1Kb (carril 1) Promega®. Plásmido pPROEX HT-a (carril 2), digerido con *Bam*HI y *Hind*III, fragmento esperado de 4.7 Kb, indicado por la flecha de color blanco. Plásmido pPROEX HT-a sin digerir (carril 3). En gel de agarosa al 0.7%.

7.1.4.3 Purificación en gel de la digestión del plásmido pPROEX HT-a con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III

Una vez digerido el fragmento correspondiente al plásmido pPROEX HT-a, se purificó de acuerdo al fabricante QIAprep quick gel extraction kit 250 (Qiagen®) (Figura 17).

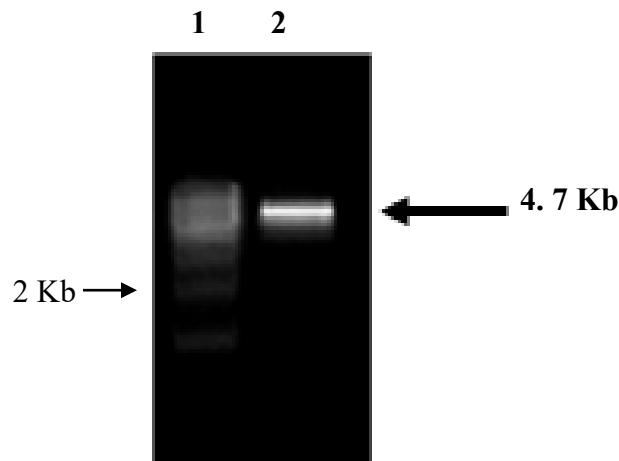


Figura 17. Mapa de la purificación en gel del plásmido pPROEX HT-a. Marcador de DNA 1Kb (carril 1) Promega®. Plásmido purificado pPROEX HT-a (carril 2), digerido con *Bam*HI y *Hind*III con un fragmento esperado de 4.7 Kb, indicado por la flecha de color negro. En gel de agarosa al 0.7%.

7.1.4.4 Ligación del gen de la proteína NS3 y el plásmido digerido pPROEX HT-a

Se ligó el gen de la proteína NS3 del DENV-2 de la cepa Jam1409 y el ADN plasmídico pPROEX HT-a, previamente se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III incubado bajo las condiciones apropiadas (Figura 18).

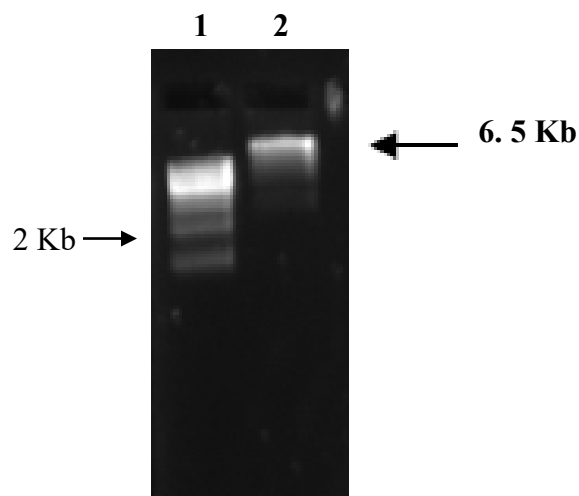


Figura 18. Mapa de ligación de pPROEX HT-a y NS3. Marcador de DNA 1Kb (carril 1). Producto de ligación bajo condiciones apropiadas del gen de la proteína NS3 DENV-2 y el plásmido de expresión pPROEX HT-a. Fragmento esperado de 6.5 Kb, indicado por la flecha de la derecha (carril 2). En gel de agarosa al 0.7%.

7.1.4.5 Confirmación de la construcción de pPROEX HT-a+ NS3 por PCR en colonia

Se confirmó la inserción del gen de la proteína NS3 en el plásmido pPROEX HT-a, por PCR en colonia con los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la secuencia del gen de la proteína NS3 DENV-2 (Figura 19).

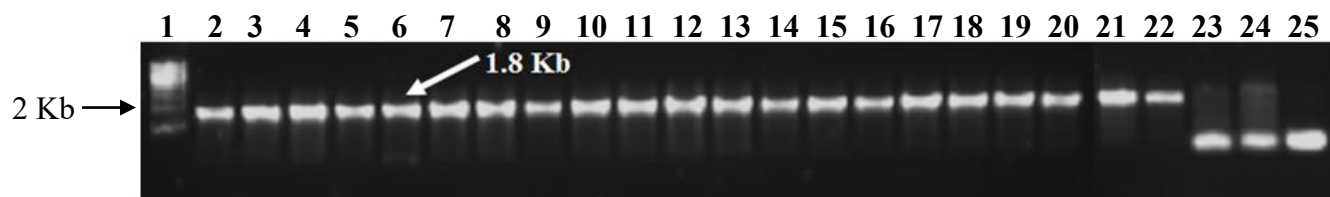


Figura 19. Mapa de confirmación por PCR de la construcción de pPROEX HT-a+ NS3. Marcador de DNA 1Kb Promega® (carril 1). Producto de PCR (carriles 2-22), colonias tomadas de placas de transformación de *E. coli* DH5 α , se presentó una amplificación de 1.8 Kb. Controles negativos, muestras sin oligonucleótidos que amplifiquen el gen de la proteína NS3 (carriles 23-25). En gel de agarosa al 0.7%.

7.1.4.6 Secuenciación nucleotídica de la construcción pPROEX HT-a+ NS3

Después de tener la sub-clonación, se seleccionó la colonia no.5, para confirmar la construcción (Figura 20). El cromatograma es correcto de la construcción pPROEX HT-a + NS3 no presentó mucho ruido de fondo aunque al inicio la reacción comenzó con una secuencia superpuesta.

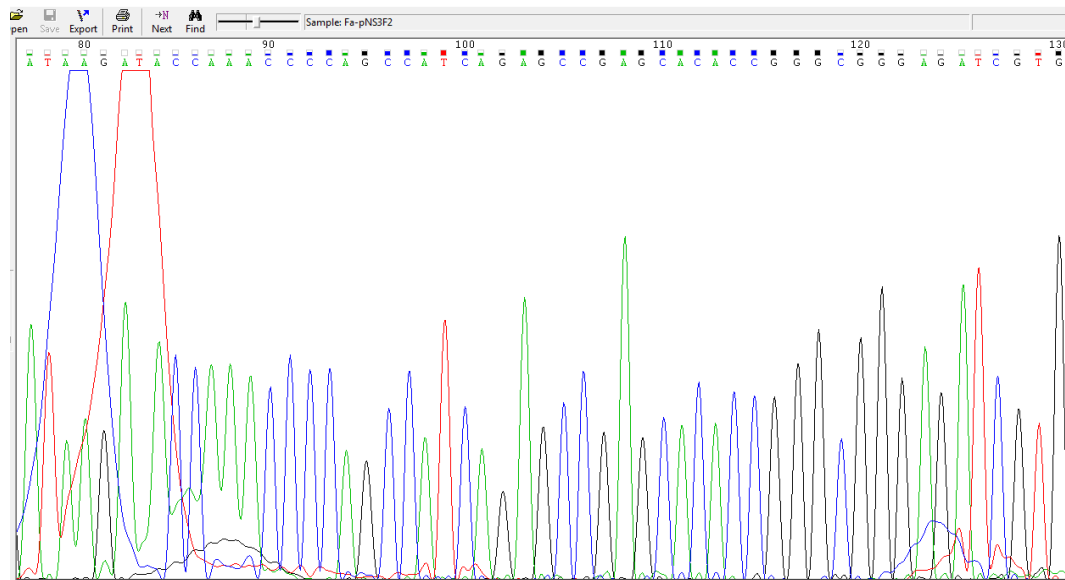


Figura 20. Secuenciación de DNA para la confirmación de la construcción de pPROEX HT-a y NS3. Alineada con la secuencia aminoacídica NS3 del DENV-2, con un máximo de identidad del 98%. DataBank (CAA40704.1), Programa Chromas de Technelysium, Versión 2.4.

7.1.4.7 Confirmación de la construcción de pPROEX HT-a+ NS3 en las células de expresión de *E. coli* por PCR en colonia

Por PCR se amplificó el gen de la proteína NS3 que confirmó la construcción pPROEX HT-a+ NS3, en las células de expresión BL21(DE3) pLysS y BL21(DE3) de *E. coli* (Figura 21).

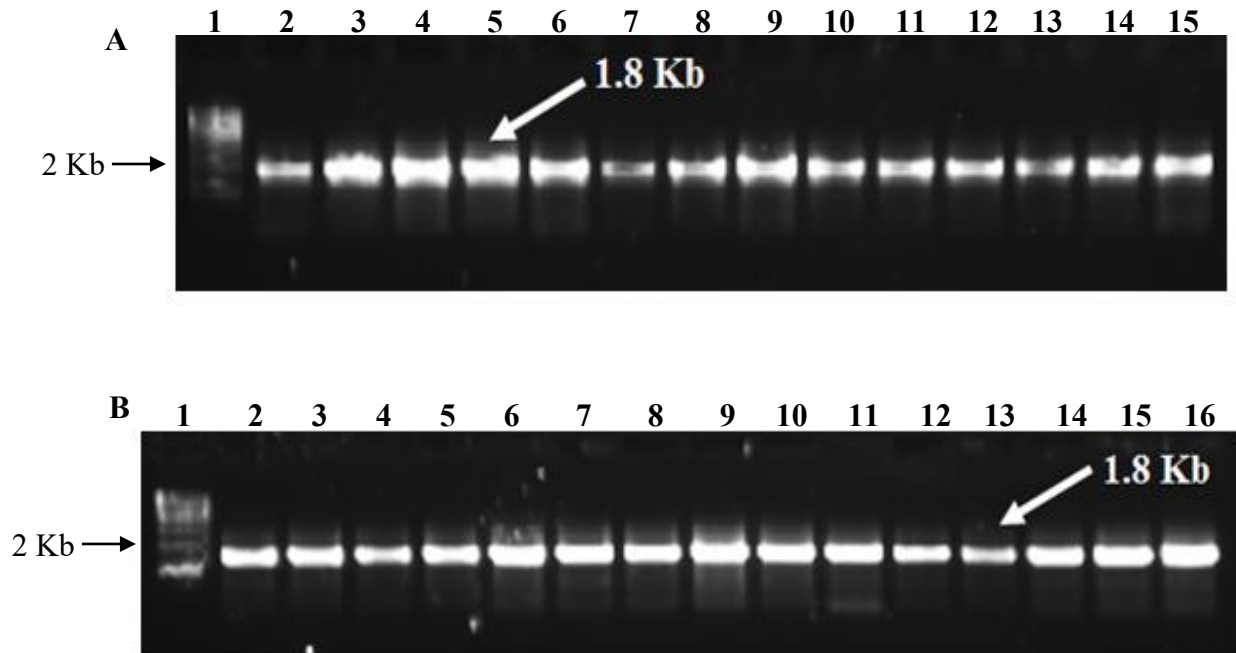


Figura 21. Mapa de la confirmación por PCR de la construcción de pPROEX HT-a+ NS3. Marcador de DNA 1Kb (carril 1) Promega®. A) Producto de PCR, de las colonias tomadas de placas de transformación de las células de expresión de *E. coli* BL21(DE3) pLysS (carriles 2-15) B) colonias transformadas de BL21(DE3) (carriles 2-16) con un producto de amplificación esperado de 1.8 Kb, señalado por la flecha. En gel de agarosa al 0.7%.

7.2 Expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 de DENV-2 cepa

7.2.1 Expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 de DENV-2 en las células de expresión Rosetta gami, XL-Blue, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS y BL21(DE3)pLysS Single-Use de *E.coli*.

Diferentes células de expresión de *E. coli* se crecieron en el medio 2xYT con 1mM IPTG. Las células se lisaron con el buffer SDS/ β -mercaptoentanol y se calentaron las muestras a 99 °C por 5 min antes de ser cargadas en el gel. Cada carril contiene 1 ml de células de expresión con una D. O. de 0.6 a una temperatura de 25 °C. (Figura 22).

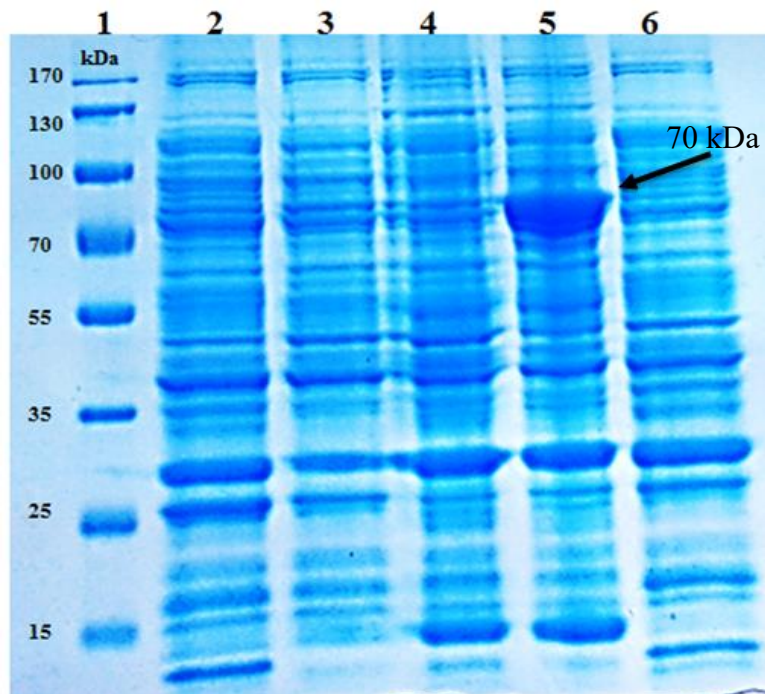
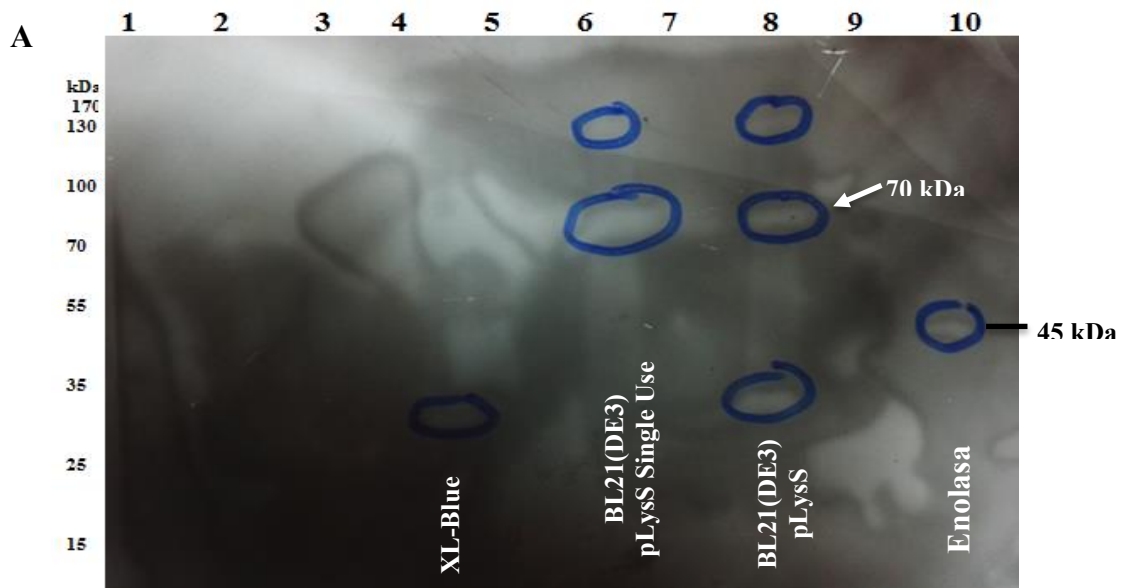


Figura 22. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% de la expresión de la proteína recombinante his-tag NS3. Marcador de proteínas 170-10 kDa *Fermentabs* (carril 1). Se muestran los tiempos incubados toda la noche de las células de *E. coli* Rosetta gami (carril 2), XL-Blue (carril 3), BL21(DE3) pLysS Single use (carril 4), BL21(DE3) pLysS (carril 5), la flecha de color negro indica la detección de la expresión del gen de la proteína NS3. Control negativo, Rosetta gami no inducida con IPTG (carril 6).

7.2.2 Western Blot y SDS-PAGE de la Expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 de DENV-2 en las células de expresión Rosetta gami, XL-Blue, BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS y BL21(DE3) pLysS Single-Use de *E. coli*

Las diferentes células de expresión de *E. coli* que crecieron en el medio 2xYT con 1mM IPTG. Se les realizó WB para reconocer el tag de histidinas en la proteína recombinante antes de pasar al proceso de purificación cromatográfica. A la par se realizó la réplica del WB en gel de acrilamida al 12% de las diferentes células de expresión. Las células se lisaron con el buffer SDS/ β -mercaptoentanol y se calentaron las muestras a 99 °C por 5 min antes de ser cargadas en el gel. Cada carril contiene 1 ml de células de expresión con una D. O. 0.6 a una temperatura de 25 °C. (Figura 23).



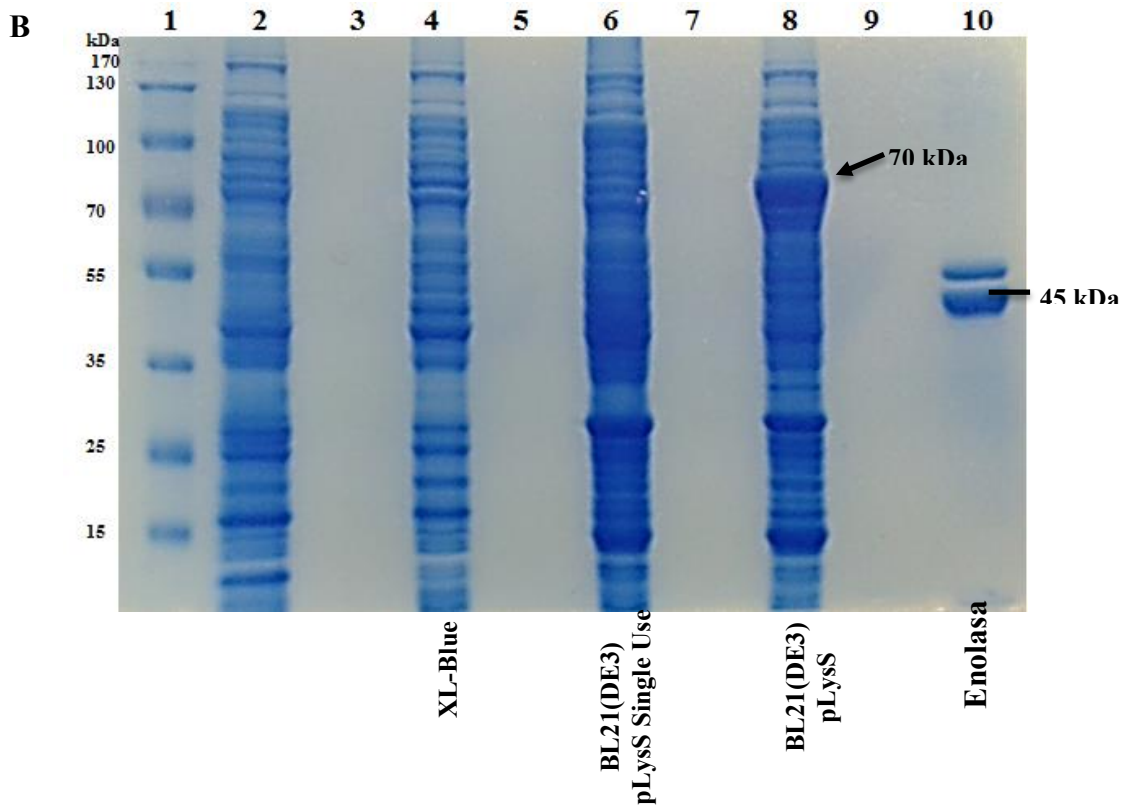


Figura 23. Análisis del Western blot de la proteína recombinante his-tag NS3 en membrana de PVFD. A) Reconocimiento de *tag* de histidinas en la proteína recombinante en diversas cepas de expresión de *E. coli* todas las cepas se llevaron a sobre-expresión por toda la noche usando Super signal® West Pico Trial, observándose una claro reconocimiento en el carril 4, 6 y 8 y como control positivo enolasa purificada (46 kDa) B) Replica del WB en gel de acrilamida al 12% como contraste de identificación en la expresión de la proteína recombinante his-tag NS3, se tiñó el gel con Azul de Comassie G 250.

7.2.3 Sobre-expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 de DENV-2 BL21(DE3) pLysS

Se presentan diferentes tiempos de expresión a 0, 3, 5, 6 h e incubado por toda la noche en el medio 2xYT con 1 mM IPTG en gel de acrilamida al 12%. Cada carril contiene 1 ml de células de expresión con una D. O._{0.6} 600 nm, a una temperatura de 20 °C (Figura 24).

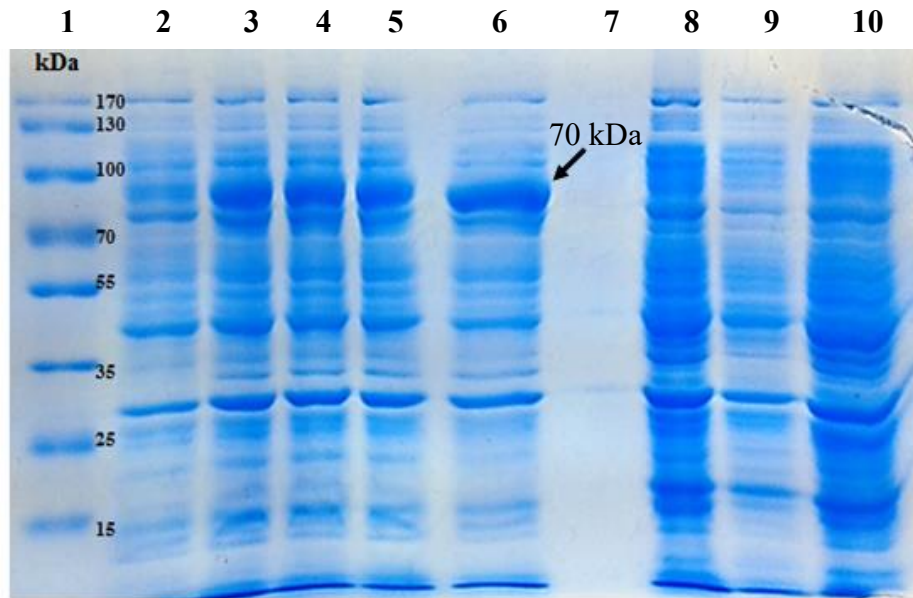


Figura 24. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% de la sobre-expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 en BL21(DE3)pLysS. Marcador de proteínas 170-10 kDa *Fermentabs* (carril 1). Células BL21(DE3) pLysS de *E. coli* a 0, 3, 5, 6 h e incubado toda la noche (carriles 2-6), conforme avanza el tiempo de inducción con 1 mM IPTG aumenta la visibilidad de la sobre-expresión de NS3 en *E. coli*, la flecha de color negro indica el mejor tiempo de visualización de la proteína NS3 en *E. coli*. Controles negativos, BL21(DE3) pLysS sin inductor IPTG (carriles 8-9) y BL21(DE3) pLysS sin construcción e inductor IPTG (carriles 10).

7.2.4 Extracción de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2 a partir de cuerpos de inclusión

Después de expresar a la proteína recombinante his-tag NS3, en diferentes tiempos de inducción con IPTG, se sometieron a sonicación para la extracción de la proteína almacenada en la célula para su posterior análisis. Cada carril contiene 1 ml de células de expresión con una D. O. 0.6 600 nm a una temperatura de 20 °C. (Figura 25).

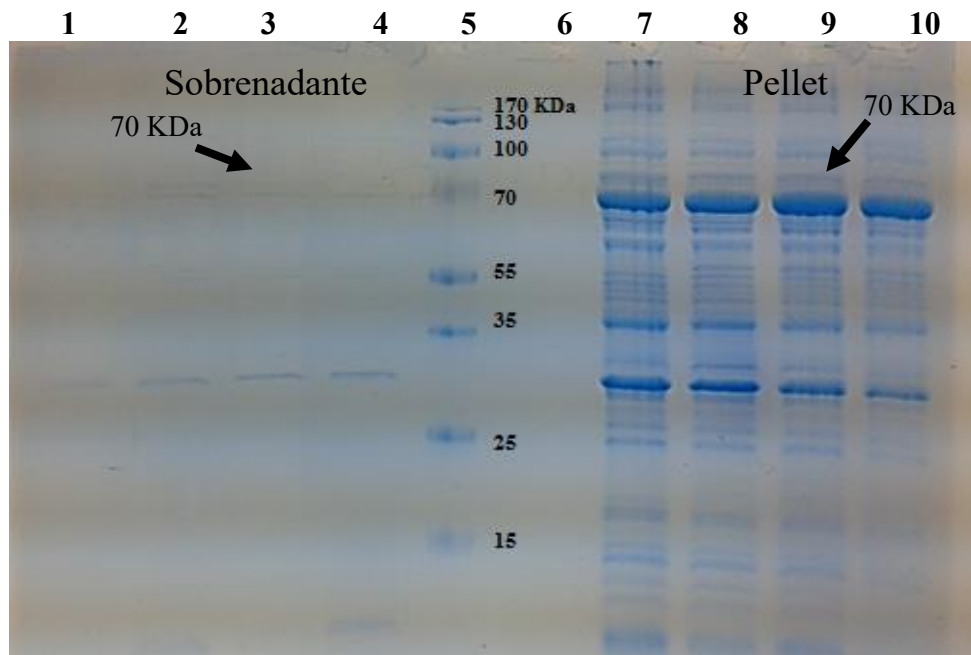
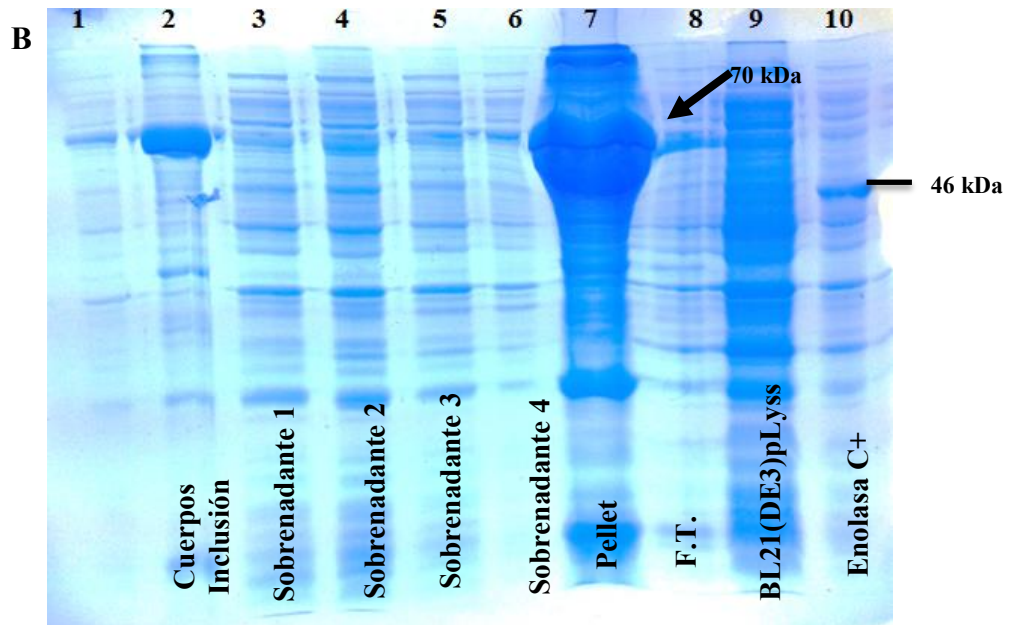
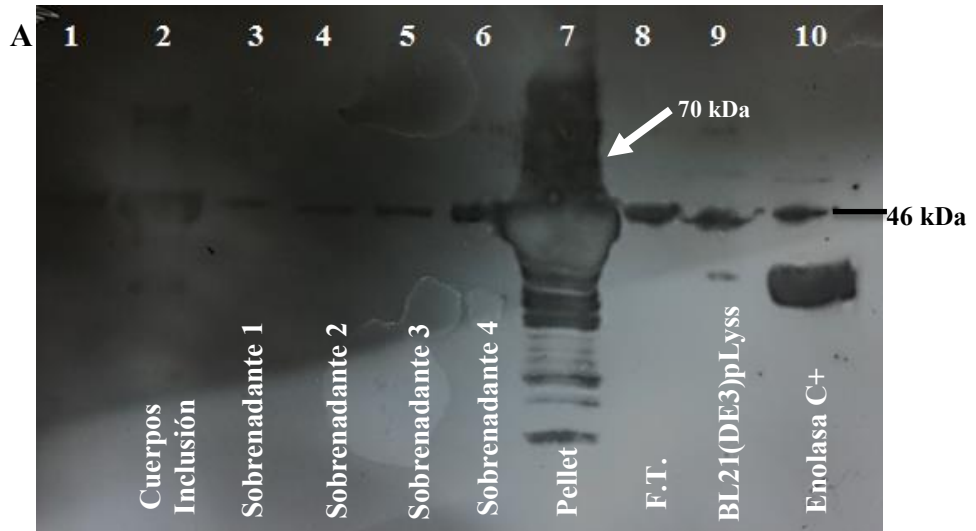


Figura 25. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% de la extracción de la proteína a partir de cuerpos de inclusión. Sobrenadante de las células BL21(DE3) pLysS de *E. coli* a 3, 5, 6 h e incubación por toda la noche (carriles 1-4), conforme avanza el tiempo de inducción con 1 mM IPTG aumenta la visibilidad de la sobre-expresión de NS3 en *E. coli*. Marcador de proteínas 170-10 kDa *Fermentabs* (carril 5). Pellet de las células BL21(DE3) pLysS de *E. coli* a 3, 5, 6 h e incubación por toda la noche (carriles 7-10). Las flechas de color negro indica el mejor tiempo de visualización de la proteína NS3 *E. coli*. La proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2, se localizó mayormente en pellet como cuerpos de inclusión.

7.2.5 Purificación de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2 mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺

Se siguió el protocolo para la extracción de la proteína NS3 a partir de cuerpos de inclusión recolectando los sobrenadantes. Posteriormente se realizó la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺. Cada uno de estos procesos, se realizó para el reconocimiento de la etiqueta de histidinas en la proteína recombinante. A la par se realizó la réplica del WB en gel de acrilamida al 12% y las células se lisaron con el buffer SDS/ β -mercaptoetanol, se calentaron las muestras a 99 °C por 5 min antes de ser cargadas en el gel. Cada carril

contiene 1 ml de células de expresión con una D. O. 0.6×10^6 600 nm a una temperatura de 25 °C. (Figura 26).



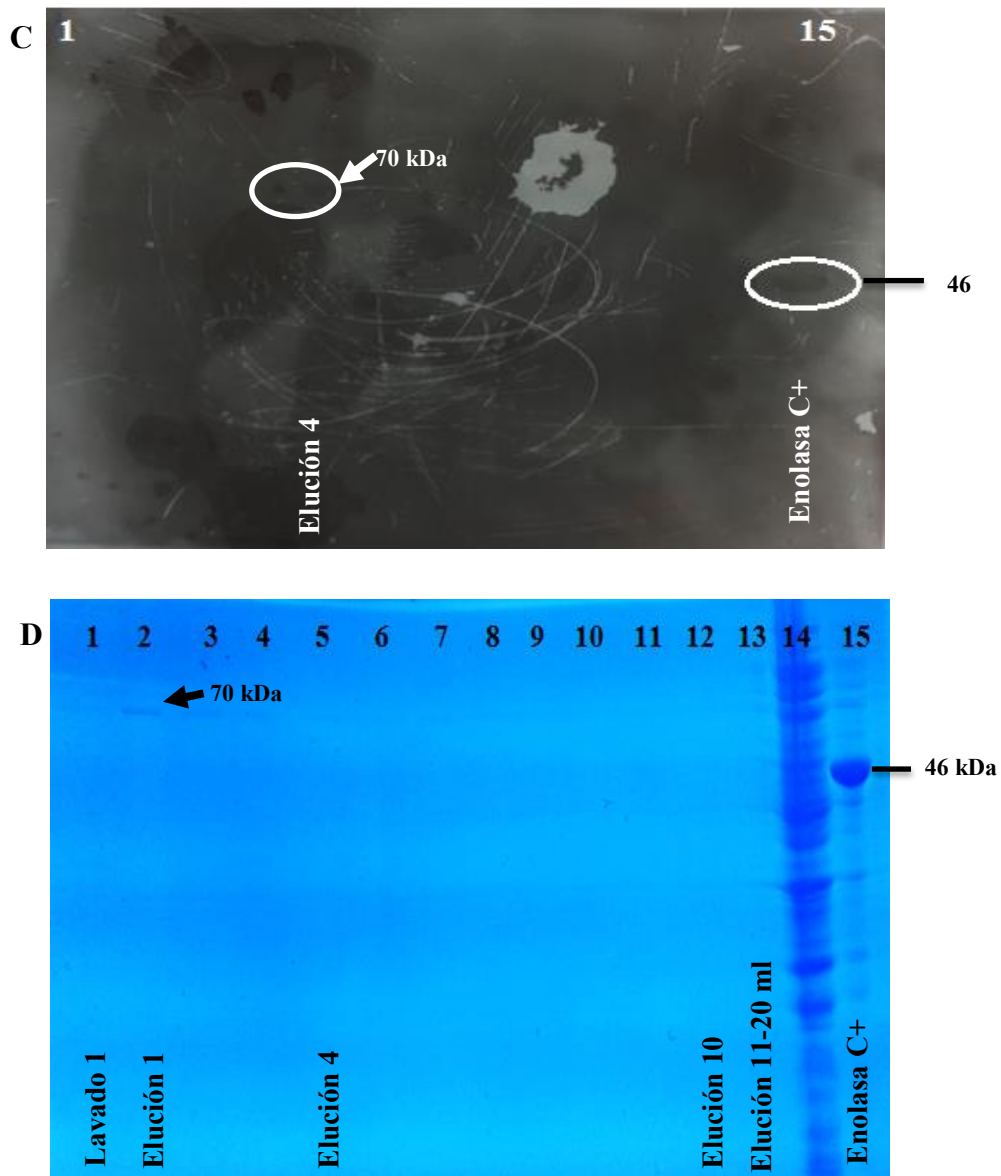


Figura 26. Análisis en Western blot de la purificación de la proteína recombinante his-tag NS3 en membrana de Nitrocelulosa. A) Reconocimiento del *tag* de histidinas en la proteína recombinante NS3 usando Anti-His₆, observándose la interacción Ag-Ac (carriles 2-8) donde la mayoría de la proteína se encontró detenida en el pellet (carril 7) antes de ser purificada en la columna por afinidad a con Níquel (GE Healthcare), se presenta una notable presencia de la proteína en el pellet reconocimiento en el carril 4, 6 y 8 y como control positivo enolasa purificada (46 kDa) B) Replica en gel de acrilamida al 12% del WB como contraste de identificación de la expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 antes de ser purificada, teñido con Azul de Coomasie 250. C) WB de la purificación de la proteína recombinante con Níquel (GE Healthcare), después de ser tratada con 8 M de Imidazol donde hay reconocimiento aparente de las histidinas en la elución 4 (carril , D) El gel de acrilamida al 12% se utiliza como testigo del WB, se observó presencia tenue de la proteína en las primeras eluciones de la proteína (carriles 2-12), y se perdió evidencia después de los primeros 10 ml de elución (carril 13), se incluyó como control positivo enolasa, el gel (carril 15).

7.2.6 Espectros de Emisión de Dicroísmo Circular (DC) de NS3 DENV-2

El DC en la zona UV lejana (180-250 nm) reflejó si la proteína recombinante his-tag NS3 está correctamente plegada después de ser purificada de la proteína mediante cromatografía de afinidad a Ni^{2+} (Figura 27).

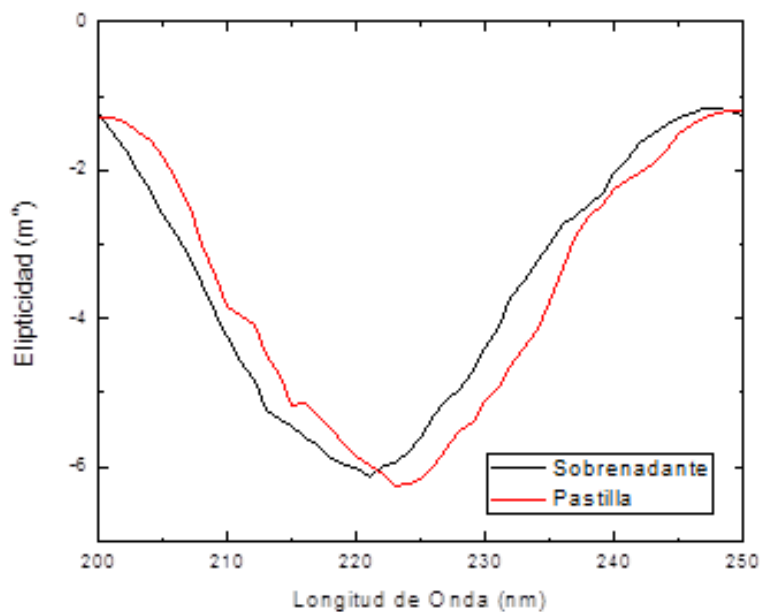
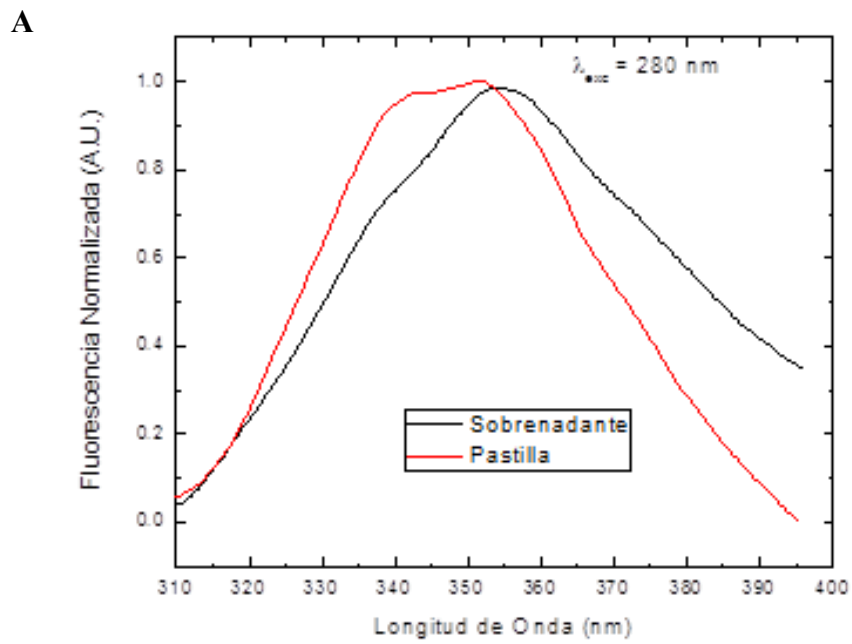


Figura 27. Espectro de DC de la proteína recombinante his-tag NS3. Se aprecia la campana de Gaus invertida del sobrenadante (línea negra) que presenta un pico alto A 220 nm a diferencia del pellet (línea roja) que tiene una máxima de 225 nm los picos representan a los grupos aromáticos expuestos en el pico más alto es la exposición de las tirosinas y triptófanos. Software de representación gráfica del Espectrofotómetro de UV-Visible Origen 7.5

7.2.7 Espectros de Emisión de Fluorescencia de NS3 DENV-2

Los espectros de emisión identificaron hidrocarburos aromáticos, como Tirosina y Triptófano que constituyen los fluoróforos intrínsecos de la proteína en la fracción soluble y en el pellet (Figura 28).



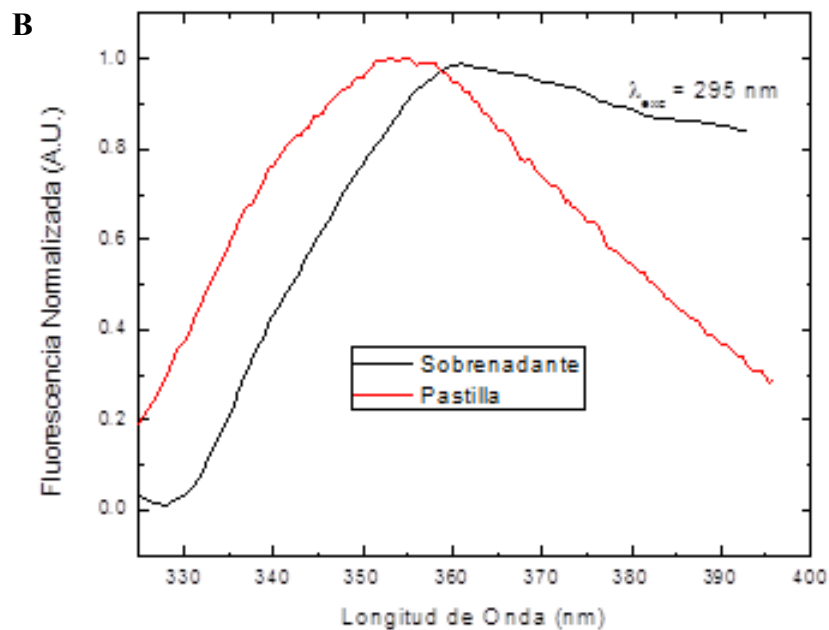


Figura 28. Espectro de Fluorescencia de la proteína recombinante his-tag NS3. A) Se aprecia dos picos altos seguidos en un rango de absorbancia (λ) de emisión de 335-350 nm a diferencia del pellet (línea negra) apreciando dos picos con menor distinción, el más característico con una λ de emisión de 355 nm correspondiente a tirosinas y triptófanos. Los grupos aromáticos (tirosinas y triptófanos) se encuentran mayor expuestos en el pellet compartiendo las mismas intensidades. La diferencia de estos espectros de fluorescencia el pellet (línea roja) presenta mayor cantidad de grupos aromáticos (tirosinas y triptófanos) expuestos que el sobrenadante. B) Se aprecia dos picos máximos con grupos aromáticos con mayor exposición en el pellet (línea roja) en especial a las tirosinas en una λ de excitación de 295 nm y una λ de emisión de 355 nm. Software de representación gráfica del Espectrofotómetro de UV-Visible Origen 7.5

7.2.7.1 Representación en 3D de los espectros de Emisión de Fluorescencia de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2 solvatada en moléculas de agua

Las siguientes figuras muestran el análisis estructural en 3D de los espectros de fluorescencia de la proteína recombinante his-tag NS3.

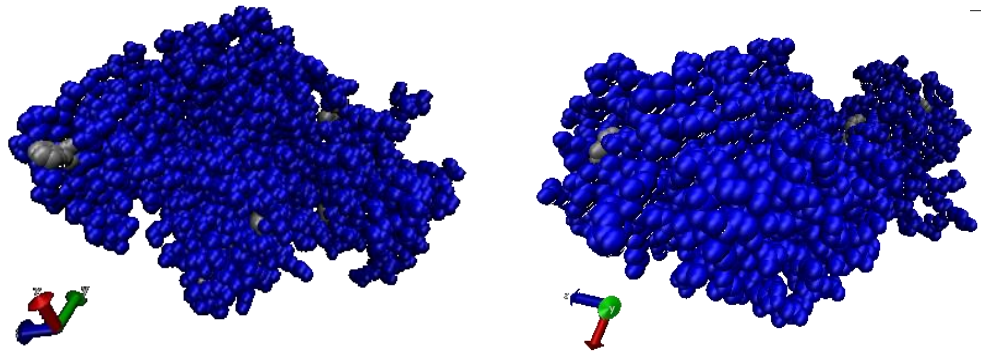


Figura 29. Modelo en 3D de la superficie de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2. Triptófanos resaltados en gris expuestos en la proteína plegada al lado izquierdo y al lado derecho de la imagen. El resto de la proteína en azul (opaco). Solo se aprecian los residuos expuestos. Esta figura se construyó resaltando las Tirosinas en verde pero no se aprecian en ninguna cara de la proteína porque todo está en opaco. Realizado en software VMD versión 1.9.1 (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

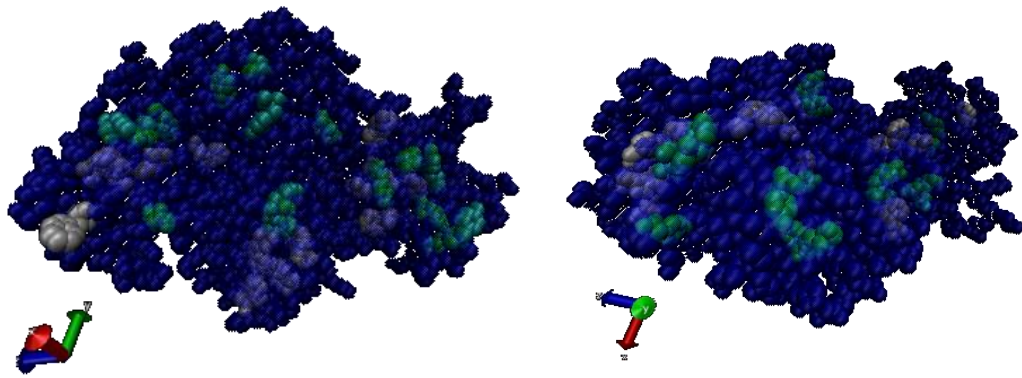


Figura 30. Degradación del color en la superficie del modelo en 3D del espectro de fluorescencia de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2. Degradación de color para apreciar dentro de la proteína los Triptófanos resaltados en color gris y morado (los más ocultos), las Tirosinas en color verde. El resto de la proteína en color azul (transparente), aquí se aprecian los residuos resaltados aunque estén ocultos al solvente. Realizado en software VMD versión 1.9.1 (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

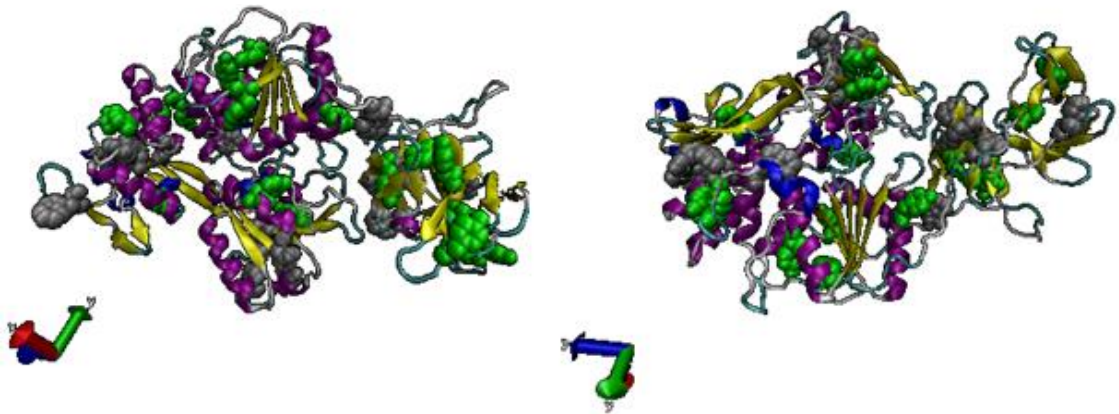


Figura 31. Representación en modelo *cartoon* de la superficie de la proteína NS3 DENV-2. Triptófanos resaltados en gris y morado (los más ocultos), las Tirosinas en verde. El resto de la proteína en representación de «cartoon». Las hélices- alfa en magenta, hojas-beta en amarillo y giros o loops en gris y azul claro, hélices 3_{10} en azul oscuro. Realizado en software VMD versión 1.9.1 (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

7.3 Modelaje por homología

7.3.1 Construcción tridimensional de la proteína NS3 DENV-2

El modelo comparativo de la proteína NS3 DENV-2 se desarrolló a partir de su secuencia aminoacídica utilizando como modelo tridimensional a la proteína NS3 DENV-4. Las siguientes imágenes del modelaje por homología se basaron en la identificación de residuos y sitios blancos farmacológicos probables para asemejarse a la estructura molde (Figuras 32-36).

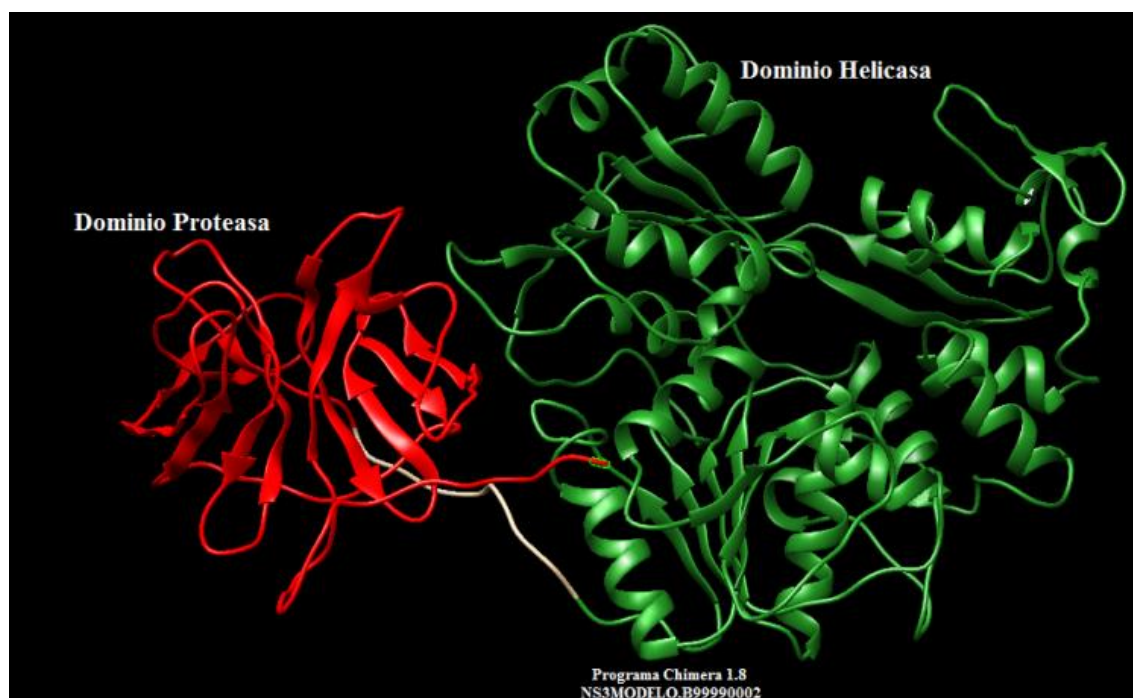


Figura 32. Estructura tridimensional de la proteína NS3 DENV-2 por modelaje por homología. Se seleccionó de 50 moldes por el programa *Anolea* (Melo, 1998), con la mejor similitud en comparación con la proteína molde (2BVC). Se presentó el dominio proteasa en color rojo (residuos 1-180) de la región N-terminal y el dominio helicasa en color verde (residuos 168-618) de la región C-terminal. La proteína modelada compartió un 77% de homología en su secuencia con NS3 DENV-4, con un RMSD: 0.167 Å. Programa Chimera 1.8

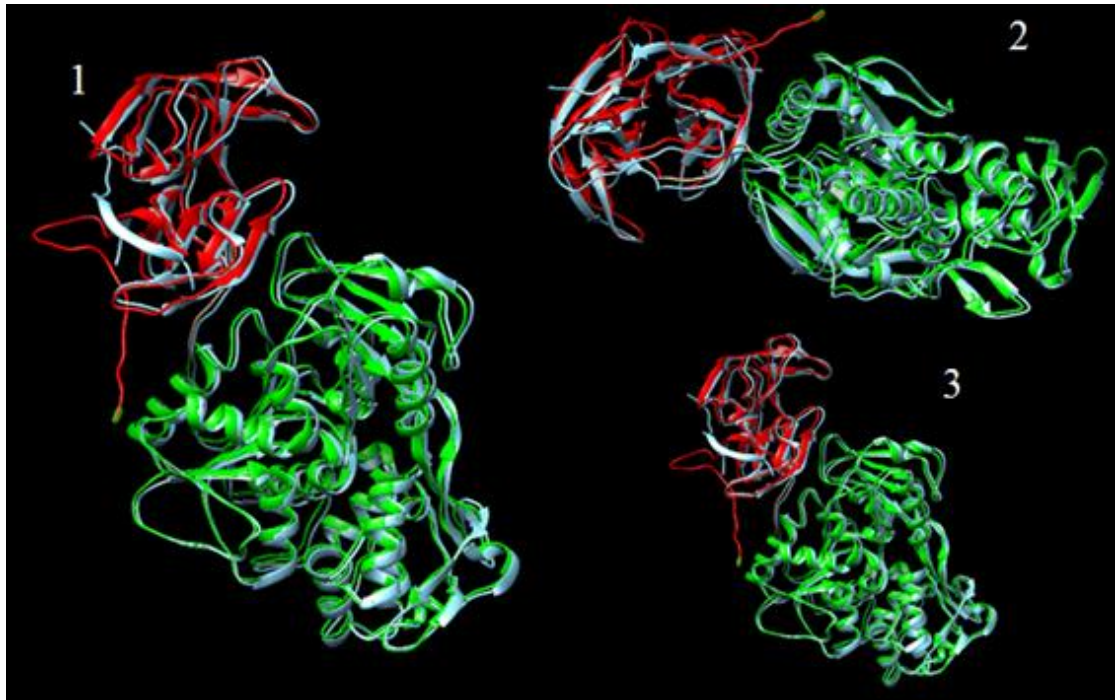


Figura 33. Alineamiento estructural de la proteína modelo y la proteína modelada. Diferentes ángulos de vista de la proteína modelo NS3 DENV-4 en color azul con acceso al PDB (2VBC) y la proteína modelada de NS3 DENV-2 en color verde (dominio helicasa) y rojo (dominio proteasa). Programa Chimera 1.8.

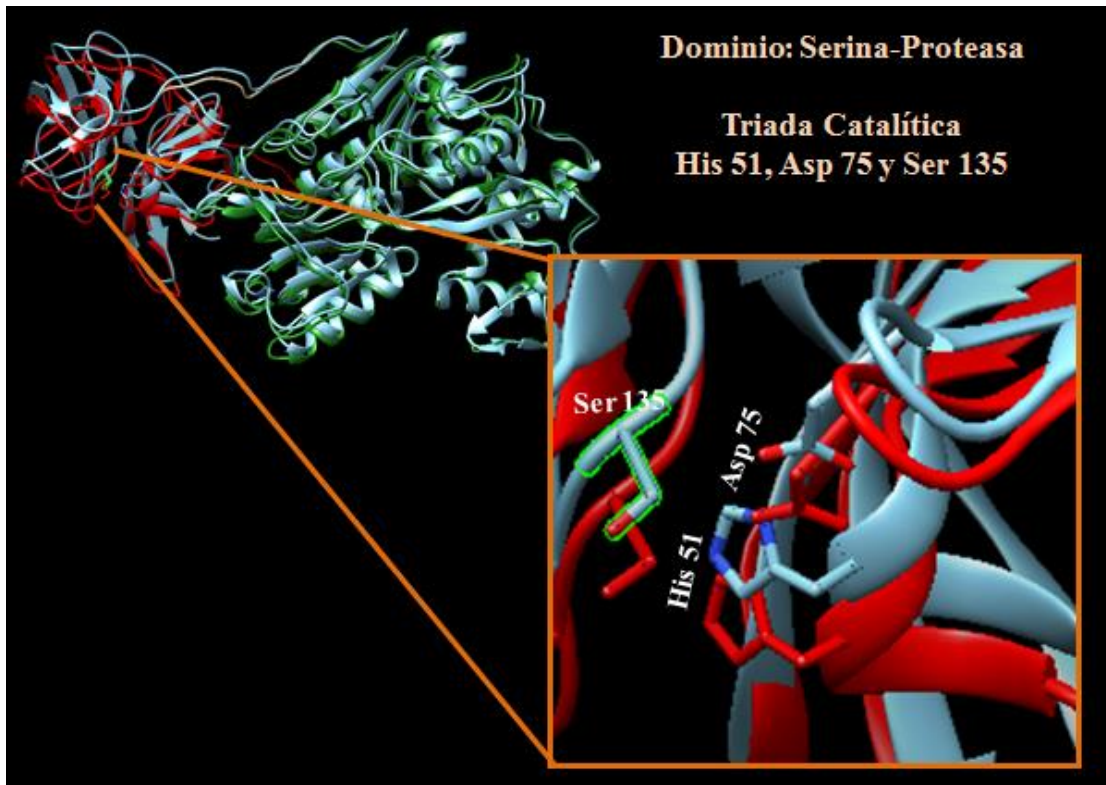


Figura 34. Localización de la tríada catalítica (His 51, Asp 75 y Ser 135). Se ubicó en el dominio serina-proteasa de la región N-terminal de la proteína modelada NS3 DENV-2 con respecto a la proteína molde (2VBD) de la NS3 DENV-4. En esta tríada catalítica la NS3 DENV-2 adoptó una misma orientación. Programa Chimera 1.8.

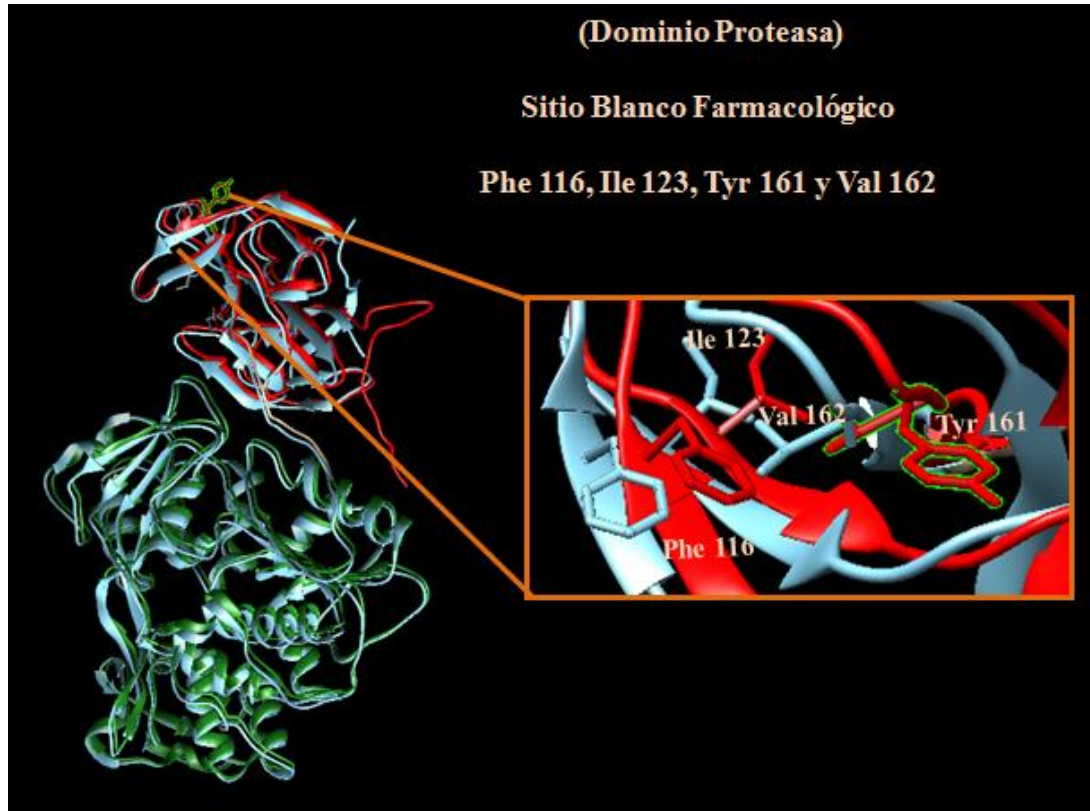


Figura 35. Localización del sitio blanco farmacológico. De acuerdo a Luo *et al.*, 2008, se describe la localización del blanco farmacológico “antiviral alostérico” (Phe 116, Ile 123, Tyr 161 y Val 162) conservado entre los flavivirus. La NS3 DENV-2 presentó la misma localización de los residuos que conforman el sitio blanco farmacológico en el dominio proteasa de la región N-terminal. Se presentó el mismo sitio blanco farmacológico en la proteína modelo de NS3 DENV-2. Programa Chimera 1.8.

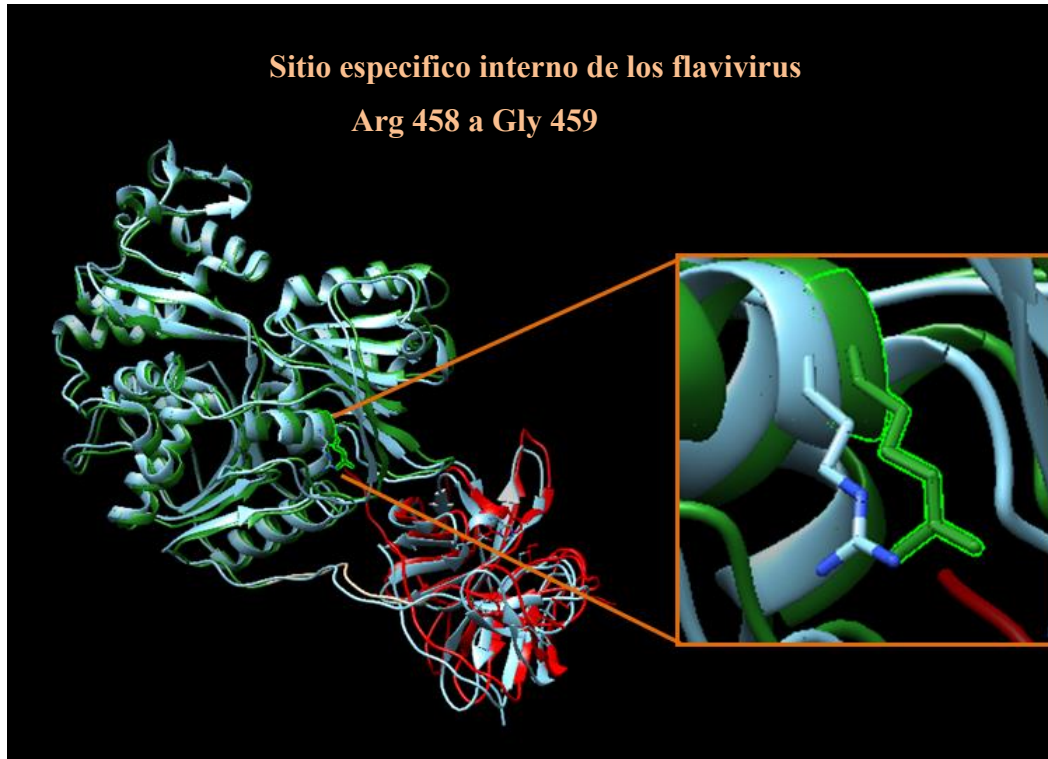


Figura 36. Sitio específico interno de los flavivirus. Se localizó en el subdominio 2 de la helicasa de la región C-terminal, ubicado en los residuos (Arg 458 a Gly 459), adoptando una configuración similar inaccesible para la proteasas. La división en esta posición podría requerir cambios conformacionales, reorientaciones de los dominios de la proteína incluso el desdoblamiento en el dominio helicasa. Esta implicación biológica se piensa que también se presenta en las células virales infectadas. Programa Chimera 1.8.

7.4 Estudio de Dinamismo Molecular

El dinamismo molecular simuló utilizando gráficos en 3D, el movimiento de las proteínas NS3 a nivel atómico, estas simulaciones describieron con precisión la interacción, las distancias entre las moléculas y el comportamiento de los iones de las proteínas en una solución (Figuras 37-40).

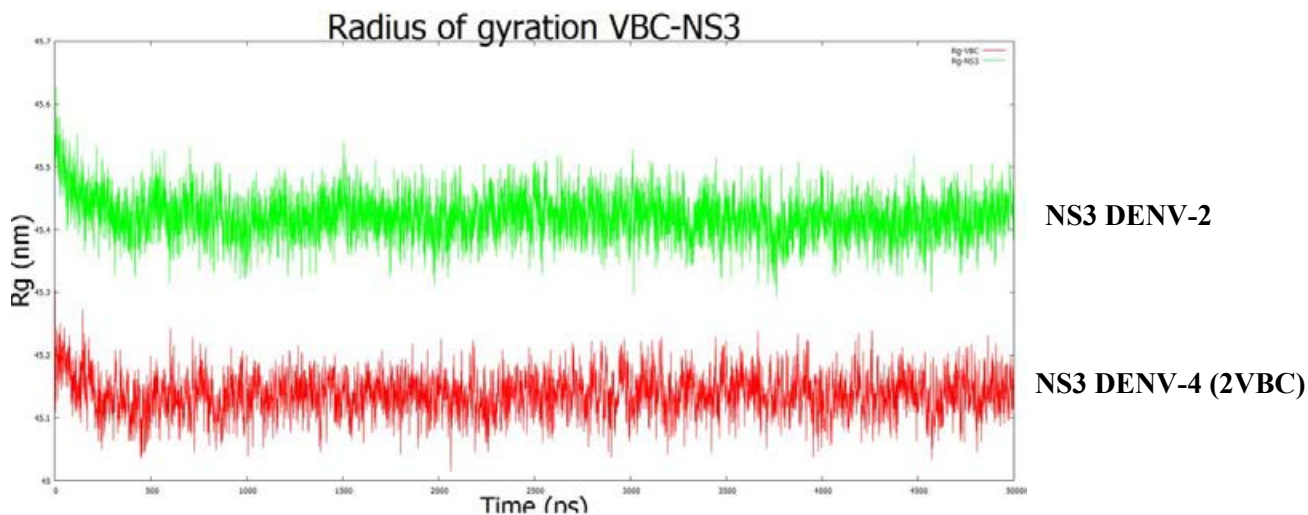


Figura 37. La gráfica de Radio de giro (Rg) a 5ns de simulación de las dos proteínas a 310 K. Indicó que 2VBC (rojo) es un poco más pequeña que la NS3 (verde), debido a que Luo *et al.*, 2008, retiraron 18 residuos de aminoácidos de los 40 residuos del cofactor NS2B de la región N-terminal, necesarios para obtener la enzima proteolíticamente activa en una resolución de 3.15 Å. No se aprecian variaciones importantes en la elongación de la cadena.

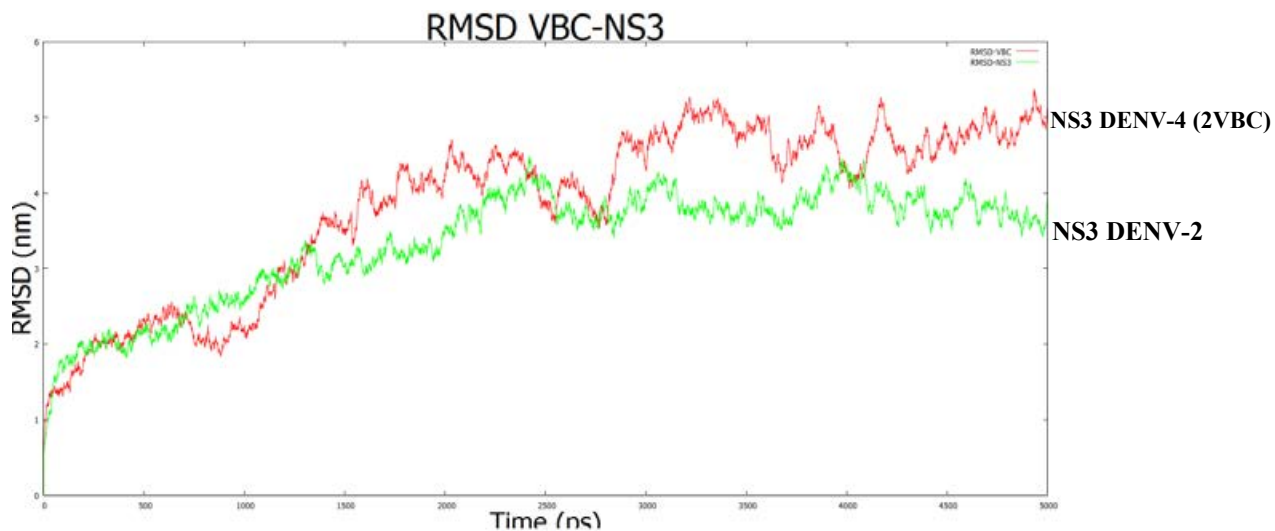


Figura 38. Gráfica de RMSD en 5ns de simulación de las dos proteínas a 310 K. Se aprecian fluctuaciones de amplitud un poco mayor en 2VBC (rojo), eso indica un poco mayor de estabilidad en NS3 DENV-2 (verde), lo importante es que las dos muestran una tendencia asintótica, lo que indica que el sistema proteína/solvente en la simulación está llegando a la estabilidad.

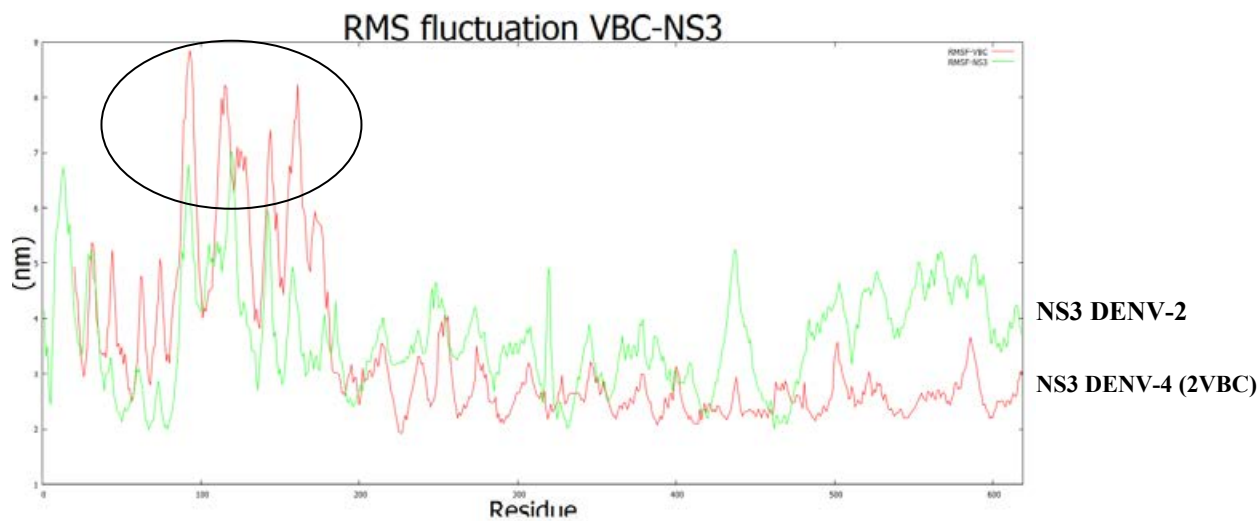


Figura 39. Gráfica de simulación de RMSF de 5ns en ambas proteínas a 310 K. El análisis medio de la raíz cuadrada (RMSF), revelaron diferencias importantes en regiones de movilidad media de cada residuo que podrían estar involucradas en la región proteasa de la NS3.

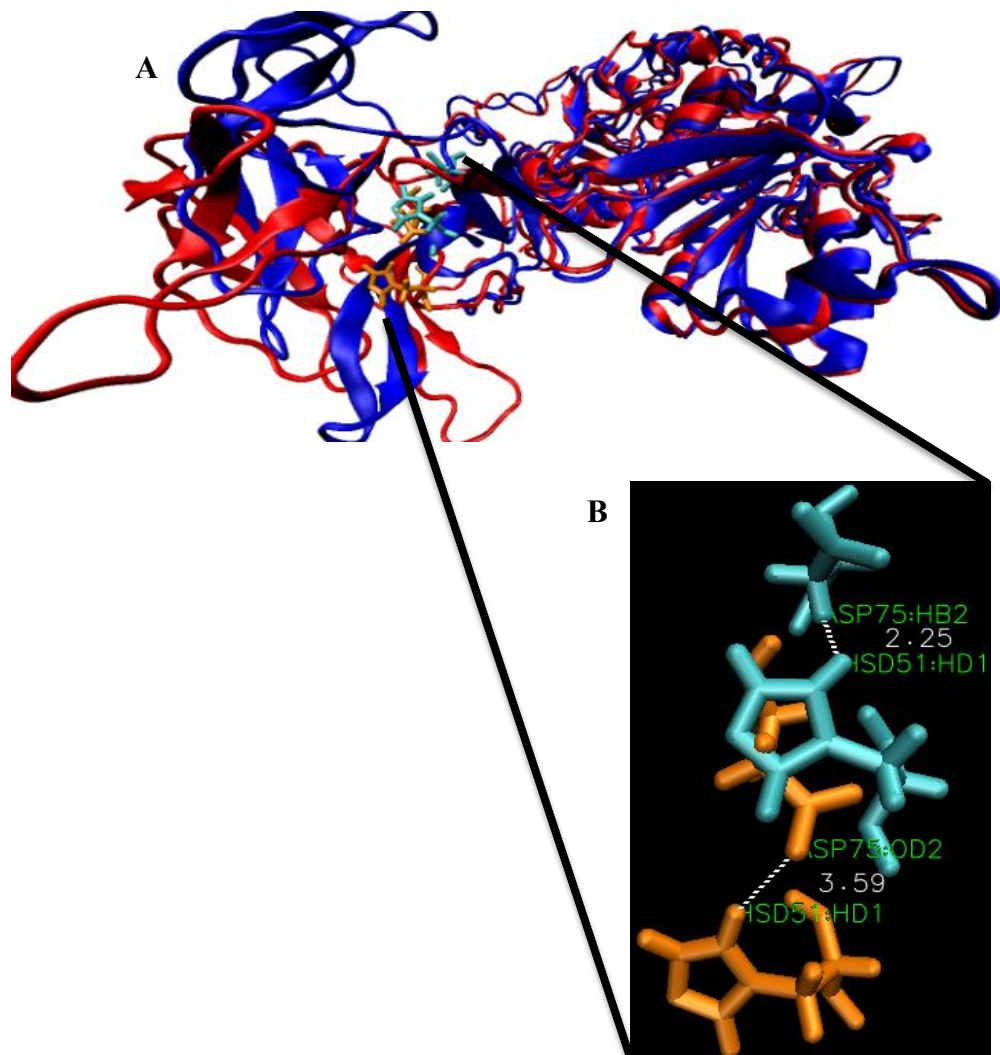


Figura 40. Diferencias estructurales de la proteína NS3 DENV-2 y NS3 DENV-4 a partir de DM. A) El programa CARMA 1.2 (Glykos, 2006), fue usado para remover el solvente y para el cálculo de la desviación cuadrática media (RMSD), radio de giro (Rg) y la fluctuación cuadrática media (RMSF). Alineamiento estructural «en cinta» de la proteína modelo (2VBC) y la proteína NS3 DENV-2 como se muestra en la figura, en donde NS3 DENV-2 (rojo) y NS3 DENV-4 (2VBC) en azul. B) En particular se encontró que los residuos His51 y Asp75, destacados en naranja (NS3 DENV-2) con una distancia de 3.59 Å y cyan (NS3 DENV-4) (2VBC) con una distancia de 2.25 Å se encuentran más alejados en NS3 DENV-2. Al parecer la afinidad entre estas dos estructuras no es la misma y pudiera alterar a la actividad de la triada catalítica del dominio proteasa.

8. DISCUSIÓN

Muchos expertos visualizan un incremento del dengue en un futuro, incluyendo su expansión geográfica e incidencia. Es por esto la importancia de elaborar estrategias para disminuir su actividad (Murray *et al.*, 2013).

La vacunación puede ser un efectivo método para el control de la enfermedad, los cuatro serotipos son antigénicamente diferentes, lo que hace considerar necesariamente la producción de cuatro vacunas monovalentes para posteriormente, la producir de una vacuna tetravalente. Sin embargo, es imposible de comprobar si la vacuna tetravalente pueda superar el problema de la protección contra los serotipos. Además es esencial una protección a largo plazo contra las formas más severas del dengue (Rodriguez-Roche y Gould, 2013).

El diseño de un fármaco antiviral puede ser una alternativa contra el DENV, para esto se requiere el comprender mecanismos moleculares sustanciales que se presenta en una infección viral por DENV. Es importante que el fármaco antiviral interfiera en la replicación del genoma del DENV. La proteína NS3 puede ser un excelente blanco para el diseño de fármacos debido a las actividades enzimáticas requeridas para la replicación del ARN del DENV, y estas actividades se conservan dentro de los 4 serotipos y la proteína NS3 comparte más del 50% de homología en su secuencia aminoacídica con las proteasas del WNV y YFV, que sugieren que la inhibición de las proteasas puede ser posible en los flavivirus (Luo *et al.*, 2012).

En este estudio se trabajaron dos plásmidos de expresión pET-19b (Novagen, USA), pPRSET-B (Invitrogene) anteriores a pPROEX HT-a (Invitrogene), todos los plásmidos utilizados se encontraban fusionados con una región de polihistidinas como etiqueta His (Histidinas) para la purificación de la proteína recombinante.

8.1 Construcción de la proteína recombinante his-tag NS3 del DENV-2 en el plásmido de expresión pPROEX HT-a

La clonación con el plásmido pET-19b, se realizó con una sola enzima de restricción *Bam*HI, y no se observó una digestión enzimática parcial del plásmido en gel de agarosa al 0.7%. Posterior a esto, se varió el volumen de la reacción de digestión sin éxito alguno. Después se continuó con el protocolo de transformación celular en *E. coli*, se varió el tiempo de exposición al choque térmico donde las colonias transformadas presentaron un color característico de las colonias clonadas y en la confirmación por PCR de estas colonias presentaron la amplificación del gen de la proteína NS3 DENV-2 (1.8 Kb).

Debido a los resultados negativos, se decidió cambiar de plásmido de expresión a PRSET-B (2.9 Kb) que contiene en su región N-terminal la etiqueta de hexahisidinas (His6x) que facilita la identificación y la purificación con resina quelante a la proteína recombinante. Se siguió el mismo protocolo de clonación, se trabajó con una sola enzima de restricción *Bam*HI, debido a que esta enzima era la única enzima de restricción tipo II que se podía utilizar con este plásmido. Además el gen de la proteína de NS3, tenía más de un sitio de reconocimiento en su secuencia aminoacídica, para este tipo de enzimas de restricción, no se tuvo éxito. Después se realizó la desfosforilación en los extremos 5' del plásmido pPRSET-B con Fosfatasa Alcalina de Intestino de Cordero (CIAP, Promega®), ya que los extremos del plásmido eran los mismos y así se evitó la recircularización del plásmido, la confirmación por PCR en colonia resultaron negativas. Se llegó a considerar que los plásmidos anteriormente utilizados se religaban y esto pudiera ser un factor que no permitió la inserción del gen de la proteína NS3 a los plásmidos pET-19b y pPRSET-B. Se optó por realizar electroporación, para transferir el gen de la proteína NS3 al plásmido de expresión pPRSET-B por descarga eléctrica (mV) en las células electrocompetentes JM109 de *E. coli*, en el electroporador (Bio-Rad, Gene Pulser Xcell™ Total System). Después se confirmó por PCR en colonia sin éxito.

Posteriormente se manejó al plásmido pPROEX HT-a, donde a diferencia de los plásmidos anteriores se digirió con *Bam*HI y *Hind*III, sin presentar algún

inconveniente de escisión en el gen de la proteína NS3. Primeramente se realizó una clonación en el plásmido pGEM T-easy ® junto con el gen de la proteína NS3 DENV-2 (con el objetivo de facilitar su manejo y mejorar la eficiencia de la ligación del producto de PCR), se observó en PCR en colonia, con la inserción del gen de la proteína NS3 con un fragmento esperado de 1.8 Kb.

A partir de la clonación en pGEM T-easy ®, se sub-clonó en el plásmido pPROEX HT-a con resultados positivos, es decir, el gen de la proteína NS3 se insertó en el plásmido pPROEX HT-a teniendo la proteína recombinante his-tag NS3. Los plásmidos anteriormente utilizados pudieron haber perdido la capacidad de expresión con el tiempo o debido al inadecuado manejo del tesista.

8.2 Determinación de las condiciones óptimas para la expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 DENV-2 en *E. coli*.

Se optó la expresión en *E. coli* por ser un hospedero de preferencia en la expresión de proteínas recombinantes. *E. coli* tiene múltiples y significantes beneficios en la sobreexpresión incluyendo el costo, fácil manejo y la obtención de colonias a gran escala (Francis *et al.*, 2010).

Se probaron diferentes cepas de expresión de *E. coli* BL21 (DE3), BL21(DE3) pLysS y BL21(DE3) pLysS Single-Use, provenientes del Laboratorio de Biomedicina Molecular del Centro de Biotecnología Genómica (CBG), Reynosa, Tamps. Así también en las cepas Rosetta gami, XL-Blue, BL21 (DE3) pLysS. Las tres primeras cepas de expresión se trabajaron dentro del CBG a condiciones sugeridas por el fabricante de Novagen® e Invitrogen®. Para la sobreexpresión se tomó el 10% del pre-cultivo de 18 h a 30 °C, se manejaron dos temperaturas a 30 y 37 °C, se probó la inducción de la proteína recombinante NS3 con IPTG a 0.05 y 1 mM con 6 horas de inducción en LB y 2xYT.

Mientras que en la estancia de investigación realizada en el Laboratorio de Bioquímica de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, México, D.F. se trabajó

con las cepas Rosetta gami, XL-Blue, BL21(DE3) pLysS de *E.coli*, a condiciones diferentes de expresión a 20 y 25°C, y solo se obtuvo sobreexpresión en las BL21(DE3) pLysS.

Dentro de las diferentes cepas de *E. coli* que se utilizaron para la sobreexpresión, solo en una sola cepa se obtuvo la expresión de la proteína NS3. El sistema de expresión de las diferentes cepas se pudo haber afectado a las proteínas y ocasionar una producción de proteínas blanco tóxicas con una insatisfactoria biosíntesis (Francis *et al.*, 2010). Otra posible causa de no haber tenido expresión en el resto de las cepas es que pudieron haber caducado o estar mal caracterizadas y su eficiencia pudo haber descendido sin la correcta operación del tesista.

BL21 (DE3)pLysS

En las células de *E.coli* BL21 (DE3)pLysS, se mejoró la viabilidad de células que expresan proteínas tóxicas. Debido a que estas células competentes permiten la alta eficiencia de expresión de la proteína recombinante de cualquier gen bajo el control del promotor T7. El promotor T7 no interfiere con el nivel de expresión después de ser inducida la proteína con IPTG.

pPROEX HT-a

El plásmido pPROEX HT-a en BL21 (DE3) pLysS de *E.coli*, fue usado para la alta expresión de la proteína recombinante his-tag NS3. El plásmido contiene el represor (lacI) y al promotor *trc*. El promotor *trc*, es considerado un fuerte promotor aproximadamente el 90% es activo, puede resultar en la acumulación de un 15-30% del total de la proteína celular (Francis *et al.*, 2010).

Medio de cultivo 2xYT

El medio de cultivo 2xYT contiene todos los nutrientes como aminoácidos esenciales, triptona, extracto de levadura, vitaminas y cloruro de sodio, y este último promovió los iones sodios para mantener el balance osmótico, todos estos nutrientes se requirieron para el crecimiento de las células bacterianas con la proteína recombinante (Francis *et al.*, 2010).

Temperatura

Las bajas temperaturas mejoraron la solubilidad de la expresión de la proteína recombinante his-tag NS3 y facilitó la producción del plegamiento, también permitió la reducción de la agregación de la proteína. Sin embargo la mayoría de las proteasas son menos activas al bajar la temperatura que dan como efecto una reducción de la degradación de proteínas proteolíticamente sensibles y el tiempo de inducción fue prolongado para un rendimiento óptimo de la proteína recombinante (Francis *et al.*, 2010).

IPTG

La sobreexpresión de la proteína recombinante his-tag NS3, se controló por la concentración del inductor IPTG en el medio de crecimiento. Churchward *et al.*, 1983 menciona que al disminuir el IPTG se aumenta la producción de la proteína soluble cuando las proteínas son inducidas en un rango de 0.1 a 1.0 mM IPTG, este acontecimiento se asoció con la proteína recombinante his-tag NS3.

Tag Hexahistidinas (H₆)

El utilizar etiquetas fusionadas con la proteína blanco, fue útil porque podemos mejorar la expresión de la proteína, promover el plegamiento e incrementar la

solubilidad de la proteína y facilitar procesos posteriores como la purificación y la detección de la proteína. La presencia de una etiqueta fusionado puede interferir con la actividad biológica de la proteína recombinante, es importante remover enzimáticamente la etiqueta después de que la proteína ha sido purificada. La etiqueta de hexastidina (His₆) empleado en esta sobreexpresión, no aumentó la expresión de la proteína soluble pero facilitó la purificación. Esto es debido a que la etiqueta de histidinas fusionado en la proteína, la inmoviliza en la columna por afinidad cromatográfica a un metal (Níquel) y esto permite la rápida purificación de un lisado de *E. coli*.

Se esperaba obtener la proteína NS3 solo en las eluciones por la afinidad cromatográfica a Ni²⁺ en resina de Sefarosa (GE healthcare). Sin embargo, se encontró que la mayoría de la proteína NS3 se concentró como cuerpos de inclusión. Esta formación se aprovechó para una mayor obtención de proteína.

Estudios comparativos han mostrado que la probabilidad de expresión en *E. coli* en la fracción soluble decrece con el aumento de peso molecular, especialmente en proteínas mayores a 60 kDa. La expresión de proteínas recombinantes grandes en *E. coli* a gran escala, (600 a 800 aminoácidos) se expresan en forma soluble solo un 33% de los casos (Francis *et al.*, 2010). Pero muchas veces las proteínas recombinantes son insolubles y no pueden degradarse por los mecanismos normales de las células, por lo que se acumulan como cuerpos de inclusión, lo cual la asociación intramolecular de los dominios hidrofóbicos, también la insolubilidad de la proteína a las concentraciones que está siendo producida, inhabilidad del correcto plegamiento en el ambiente bacteriano o inhabilidad de formar puentes disulfuro, además el factor ambiental de la colonia bacteriana afecta a la formación de inclusión insoluble (Palmer *et al.*, 2012).

El WB, mostró el reconocimiento de la proteína recombinante his-tag NS3 con los anticuerpos monoclonales anti-His₆, con un tamaño aproximado de 70 KDa, sin embargo, se apreciaron impurezas o truncamientos de la proteína recombinante his-tag NS3 con diversos pesos. Estos truncamientos no fueron del producto de proteólisis mediante proteasas bacterianas endógenas o por autoproteólisis de la proteína recombinante his-tag NS3. Estos truncamientos fueron más propensos a ser los

productos de la terminación prematura de la traducción y / o a la degradación proteolítica durante la expresión de la proteína (Tian *et al.*, 2006).

Al realizar los espectros de emisión de fluorescencia y dicroísmo circular a la proteína recombinante his-tag NS3, mostraron un plegamiento desigual en el dominio proteasa rica en hélices-beta. El plegamiento independiente en los dominios pudo haber sido causado por la remoción de la urea como agente desnaturizante. La his-tag NS3 al ser una proteína superior a 60 kDa aumenta al azar en estas condiciones las posibilidades de interacciones de plegamiento entre los dominios. El dicroísmo circular no permite discriminar la formación entre estos dominios proteínicos.

Luo *et al.*, 2012 menciona que el dominio helicasa de NS3 puede funcionar independientemente del dominio proteasa. La secuencia completa de NS3 exhibe una actividad helicasa/ATPasa superior comparada con el dominio proteasa solo. Es posible que la NS3 adopte diferentes modificaciones durante el ciclo de replicación, una configuración en la asociación de la proteína-membrana durante el procesamiento de la poliproteína viral y otra durante la replicación del genoma viral (Luo *et al.*, 2012; Debmalaya *et al.*, 2010).

8.3 Modelaje molecular e imitación de la estructura tridimensional de la proteína NS3 DENV-2 cepa Jam1409

El estudio de modelaje de la proteína NS3 se aprovechó para la comparación de los centros de reconocimientos del sitio catalítico del blanco farmacológico y cotejar las regiones más interesantes de la estructura 3D modelada. Se obtuvo un nivel de identidad del 77% con la secuencia aminoacídica modelo. Su calidad fue buena, al mostrar un RMSD de 0.167 Å, que midió la distancia media entre los átomos de las proteínas evaluadas. En general se obtienen estructuras convenientes cuando su identidad homóloga no sobrepasa un RMSD mayor a 2 Å (Sali *et al.*, 1993).

Estudio de Dinámica Molecular de la NS3 DENV-2

Mediante la técnica de simulación por computadora, se permitió que los átomos y moléculas de la proteína NS3 DENV-2, interactúen por un período de 5 ns a 310 K, permitiendo una visualización del movimiento de las partículas y simular el comportamiento microscópico del sistema.

La movilidad media de cada residuo, presentada en la triada catalítica (His 51, Asp 75, Ser 135) del dominio proteasa indica una movilidad distinta en los extremos N-terminal de ambas proteínas. Es probable que la afinidad no sea la misma debido a la falta de los 18 residuos de la N-terminal del dominio proteasa de la proteína modelo, necesarios para obtener toda la enzima proteolíticamente activa (Lou *et al.*, 2007).

Esta triada catalítica es indispensable para estimular los efectos que sugieren que el dominio proteasa se pliegue en su totalidad para contribuir en su perfeccionamiento. La actividad proteasa de NS3 requiere a la proteína integral de membrana NS2B como cofactor ya que la presencia de este co-factor peptídico de 47 aminoácidos le permite ser muy soluble y ser activa (Luo *et al.*, 2010).

9. CONCLUSIONES

De acuerdo a nuestro diseño, la construcción de la proteína recombinante his-tag NS3 del DENV-2, se logró por medio de la sub-clonación en el plásmido pPROEX HT-a y la expresión de la proteína recombinante his-tag en las células de expresión BL21(DE3) pLysS de *E. coli* a una concentración de inducción de 1mM IPTG en incubación a 20°C por toda la noche.

La proteína recombinante his-tagNS3 formó cuerpos de inclusión y se trataron con agentes desnaturizantes como la urea. El análisis de purificación se realizó mediante cromatografía por afinidad a Níquel empleando una resina de Sefarosa (GE Healthcare). El plegamiento correcto de la proteína no se facilitó al no emplearse concentraciones bajas de urea con remoción lenta.

Diversos parámetros pudieron haber afectado la expresión y solubilidad de la proteína, como pudo ser las múltiples características de la proteína, así como el plásmido de expresión empleado, la cepa hospedera, y/o los parámetros empleados para expresar la proteína recombinante prolongando el tiempo para lograr la expresión.

Mediante el modelaje molecular por homología comparo los posibles 'sitios blanco' farmacológicos de la proteína NS3 DENV-2 y la de referencia, además el dinamismo molecular detecto un cambio en la estructura del extremo N-terminal de la proteína NS3 DENV-2.

10. RECOMENDACIONES

Se tendrá que estandarizar el protocolo de purificación por afinidad cromatográfica a Ni^{2+} en resina de Sefarosa (GE Healthcare), donde la remoción del agente desnaturizante sea lentamente mediante una simple dilución o diálisis en intervalos de concentraciones menores a 8 M, con el fin de evitar ser agresivo a la proteína recombinante y así se pueda tener el plegamiento secundario ideal.

En el estudio de dinámica molecular, se tendrá que hacer una simulación con el ligando para observar si la diferencia estructural impide completamente la interacción y si los cambios en los aminoácidos pueden contribuir a la diferenciación en la transmisión y virulencia del DENV.

11. REFERENCIAS

- Acosta-Bas C., Gómez-Cordero I. 2005. Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Revista Biomédica*. 16:113-137.
- Alcaraz-Estrada SL., Yocupicio-Monroy M., Del Angel RM. 2010. Insights into dengue virus genome replication. *Future Virology*. 5 (5): 575-92.
- Assenberg R., Mastrangelo E., Walter TS., Verma A., Milani M., Owens RJ., Stuart DI., Grimes JM., Mancini EJ. 2009. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *Jornal of Virology*. Dec; 83(24):12895-906.
- Amarilla AA., de Almeida FT., Jorge DM., Alfonso HL., de Castro-Jorge LA., Nogueira NA., Figueiredo LT., Aquino VH. 2009. Genetic diversity of the E protein of dengue type 3 virus. *Jornal of Vurology*. 6:113.
- Bartenschlager R., Miller S. 2008. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiology*. 3(2):155-65.
- Borowski P., Niebuhr A., Schmitz H., Hosmane RS., Bretner M., Siwecka MA., Kulikowski T. 2002. NTPase/helicase of Flaviviridae: inhibitors and inhibition of the enzyme. *Acta Biochimica Polonica*. 49(3):597-614.
- Burke DS., Kliks S. Antibody-dependent enhancement in dengue virus infections. *Journal Infectious Diseases*. 2006 Feb 15;193(4):601-3.
- Carter JR, Balaraman V, Kucharski CA, Fraser TS, Fraser MJ Jr. 2013. A novel dengue virus detection method that couples DNAzyme and gold nanoparticle approaches. *Journal of Virology* 2013 Jun 28;10(1):201.

Casos oficiales recientes de dengue a nivel local y regional. Disponible en:

<http://www.healthmap.org/dengue/index.php>. Fecha de consulta Octubre de 2013

Chambers TJ., Weir RC., Grakoui A., McCourt DW., Bazan JF., Fletterick RJ., Rice CM. 1990. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.* 87(22):8898-902.

Chambers TJ., Monath TP. 2003. *The Flaviviruses: structure, replication and evolution.* Vol. 59. Academic Press US. 25 p.

Churchward G., Holmans P., Bremer H. 1983. Increased expression of the dnaA gene has no effect on DNA replication in a dnaA⁺ strain of *Escherichia coli*. *Molecular Genetic and Genomics* 192(3):506-8.

Clyde K., Kyle JL., Harris E. 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of Virology.* 80(23): 11418-31.

de Almeida H., Bastos IM., Ribeiro BM., Maigret B., Santana JM. 2013. New binding site conformations of the dengue virus NS3 protease accessed by molecular dynamics simulation. *PLoS One.* Aug 21;8(8):e72402.

Barh D., Blum K., Madigan M. 2011. *Omics: Biomedical perspectives and applications.* Editorial CRC Press. US 33 p.

Dewi BE., Takasaki T., Tajima S., Sudiro TM., Larasati RP., Corwin ALo., Kurane I. 2009. Genotypic and phenotypic characteristic of DENV-3 isolated from

- patients with different disease severities in Indonesia. *Dengue Bulletin*. 33: 45-58.
- dos Santos FB., Nogueira FB., Castro MG., Nunes PC., de Filippis AM., Faria NR., Simões JB., Sampaio SA., Santos CR., Nogueira RM. 2011. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Virology* Aug 3;8:387.
- Eltzov E., Atias D., Gheber L., and Marks R. S. 2010. Detection of Bacteria, Viruses, Parasites and Fungi. (M. Viola Magni, Ed.), 275–295.
- Falgout B., Miller RH., Lai CJ. 1993. Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. *Journal of Virology*. 1993 Apr; 67(4):2034-42.
- Francis DM., Page R. 2010. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current Protocols in Protein Science* Wiley. Aug; Chapter 5: Unit 5.24.1-29.
- Glykos NM. 2006. Software news and updates. Carma: a molecular dynamics analysis program. *Journal of Computational Chemistry*. Nov 15; 27(14):1765-8.
- Guzman MG., García G, Kourí G. 2006. Dengue and dengue hemorrhagic fever: research priorities. *Revista Panamericana de Salud Pública*. Mar;19(3):204-15.
- Guzman MG., Halstead SB., Artsob H., Buchy P., Farrar J., Gubler DJ., Hunsperger E., Kroeger A., Margolis HS., Martínez E., Nathan MB., Pelegriño JL., Simmons C., Yoksan S., Peeling RW. 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology* Dec; 8(12 Suppl):S7-16.
- Guzman MG., Kouri G., Valdés L., Bravo J., Álvarez M., Vazqués S., Delgado I., Halstead SB. 2000. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *American Journal of Epidemiology*. 152(9):793-9.

- Gubler DJ. 1998. El dengue y el dengue hemorrágico. *Clinical Microbiology Reviews*. Jul. 11 (3):480-96.
- Gubler DJ. 2006. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Foundation Symposia*. 277:3-16.
- Guha-Sapir D., Schimmer B. 2005. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerging Themes in Epidemiology*. Mar 2;2(1):1
- Holmes EC., Twiddy SS. 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection Genetics and Evolution*. ; 3(1): 19-28.
- Humphrey W., Dalke A, Schulten K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. Feb;14(1):33-8, 27-8.
- Idrees S., Ashfaq UA., Khaliq S. 2013. RNAi: antiviral therapy against dengue virus. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Mar;3(3):232-6.
- Incidencia y serotipos aislados de casos de dengue por entidad federativa. México 2013. Disponible:http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS_2. Fecha de consulta Octubre de 2013.
- Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D., Impey R. W., and Klein M. L. 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *Journal of Chemical Physics*. 79: 926-935.
- King CC., Chao DY., Chien LJ., Chang GJ., Lin TH., Wu YC., Huang JH. 2008. Comparative analysis of full genomic sequences among different genotypes of dengue virus type 3. *Journal of Virology*. 5:63.

- Lescar J., Luo D., Xu T., Sampath A., Lim SP., Canard B., Vasudevan SG. Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. *Antiviral Reseach*. 2008 Nov; 80(2):94-101.
- Lindenbach BD., Rice CM. 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*. 59:23-61.
- Loroño-Pino MA., Farfán-Ale JA., Zapata-Peraza AL., Rosado-Paredes EP., Flores-Flores LF., García-Rejón JE., Díaz FJ., Blitvich BJ., AndradeNarváez M., Jiménez-Ríos E., Blair CD., Olson KE., Black W 4th., Beaty BJ. 2004. Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* .71(4):485-92.
- Luo D., Pheng S., and Lescar J. 2012. Molecular Virology and Control of Flaviviruses. *In: The Flavivirus NS3 Protein: Structure and Functions*. Novartis Institute for Tropical Diseases, Singapore. Pp 77-100.
- Luo D., Wei N., Doan DN., Paradkar PN., Chong Y., Davidson AD., Kotaka M., Lescar J., Vasudevan SG. 2010. Flexibility between the protease and helicase domains of the dengue virus NS3 protein conferred by the linker region and its functional implications. *Journal Biological Chemistry*. Jun 11;285(24):18817-27.
- Luo D., Xu T., Hunke C., Grüber G., Vasudevan SG., Lescar J. 2008. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *Journal of Virology*. Jan;82(1):173-83.

- Mairuhu AT., Wagenaar J., Brandjes DP., van Gorp EC. 2004. Dengue: an arthropod borne disease of global importance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Dis.* Jun; 23(6):425-33.
- Martina BE., Koraka P., Osterhaus AD. 2009. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical Microbiology Reviews.* 4: 564-81.
- Melino S., Paci M. Progress for dengue virus diseases. 2007. Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. *FEBS Journal.* Jun;274(12):2986-3002.
- Melo F., Feytmans E. 1998. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *Journal of Molecular Biology.* Apr 17;277(5):1141-52.
- Mondotte JA., Lozach PY., Amara A., Gamarnik AV. 2007. Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *Journal of Virology.* 81(13):7136-48.
- Murray NE., Quam MB., Wilder-Smith A. 2013. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Journal of Clinical Epidemiology.* Aug 20;5:299-309.
- Narro-Robles J., Gómez-Dantés H. 1995. Dengue in Mexico: a priority problem of public health. *Salud Pública Mex.* 37(suppl s): 12-20.
- Natarajan S. 2010. NS3 protease from flavivirus as a target for designing antiviral inhibitors against dengue virus. *Genetics and Molecular Biology.* Apr; 33(2):214-9.
- Nemésio H., Palomares-Jerez F., Villalaín J. 2011. The membrane-active regions of the dengue virus proteins C and E. *Biochimica et Biophysica Acta.* Oct;1808(10):2390-402.

- Nemésio H., Palomares-Jerez F., Villalaín J. 2012. NS4A and NS4B proteins from dengue virus: membranotropic regions. *Biochimica et Biophysica Acta*. Nov;1818(11):2818-30.
- Paranjape SM., Harris E. 2010 Control of dengue virus translation and replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2010; 338:15-34.
- Perera R., Kuhn RJ. 2008. Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion Microbiology*. 11(4):369-77.
- Perez-Ramirez G., Díaz-Badillo A., Camacho-Nuez M., Cisneros A., Muñoz M de L. 2009. Multiple recombinants in two dengue virus, serotype-2 isolates from patients from Oaxaca, México. *BMC Microbiology*. 9: 260.
- Personas afectadas anualmente por el virus del dengue. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html>. Fecha de consulta Octubre de 2013.
- Phillips JC., Braun R., Wang W., Gumbart .J, Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel RD., Kalé L., Schulten K. 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*. Dec; 26(16):1781-802.
- Pierro DJ., Salazar MI., Beaty BJ., Olson KE. 2006. Infectious clone construction of dengue virus type 2, strain Jamaican 1409, and characterization of a conditional E6 mutation. *Journal of General Virology*. 87(Pt 8):2263-8.
- Quintero D., Osorio J., Martínez M. 2010. Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del Dengue. *Iatreia*. 23(2): 146-156.

- Raharimalala FN., Ravaomanarivo LH., Ravelonandro P., Rafaraso LS., Zouache K., Tran-Van V., Mousson L., Failloux AB., Hellard E., Moro CV., Ralisoa BO., Mavingui P. 2012. Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar. *Parasites and Vectors*. 2012 Mar 20;5:56.
- Rodenhuis-Zybert IA., Wilschut J., Smit JM. 2010. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67(16): 2773-86.
- Rodriguez-Roche R., Gould EA. 2013. Understanding the dengue viruses and progress towards their control. *Biomed Research International*. 2013:690835.
- Rothan HA., Han HC, Ramasamy TS., Othman S., Rahman NA., Yusof R.2012. Inhibition of dengue NS2B-NS3 protease and viral replication in Vero cells by recombinant retrocyclin-1. *BMC Infect Dis*. Nov 21;12:314.
- Ryckaert, JP., Ciccotti G., Berendsen HJC. Numerical integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *Journal of Computational Physics*. 1977 23 (3): 327-341.
- Salaemae W., Junaid M., Angsuthanasombat C., Katzenmeier G. 2010. Structure-guided mutagenesis of active site residues in the dengue virus two-component protease NS2B-NS3. *J Biomed Sci*. 24;17:68.
- Salazar MI., López-Ortega O., León-Avila G., Ramírez-González JE., Castro-Musot ME. 2010. The origin of the genetic variability of influenza viruses. *Gac Med Mex*. May-Jun;146(3):199-206.
- Sali A., Blundell TL. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*. 1993 Dec 5;234(3):779-815.

- Salvatella R. 1996. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay. *Revista Médica del Uruguay*. 12: 28-36.
- Sampath A., Xu T., Chao A., Luo D., Lescar J., Vasudevan SG. 2006. Structure-based mutational analysis of the NS3 helicase from dengue virus. *Journal of Virology*. Jul;80(13):6686- 90.
- Schlick Schlick T. 2002. *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide* Springer-Verlag Interdisciplinary Applied Mathematics, Mathematical Biology, Vol. 21. New York, NY.
- Simmons M., Burgess T., Lynch J., Putnak R. 2010. Protection against dengue virus by non-replicating and live attenuated vaccines used together in a prime boost vaccination strategy. *Virology*. 396(2):280-8.
- Shang W., Liu J., Yang J., Hu Z., Rao X. 2012. Dengue virus-like particles: construction and application. *Appl Microbiol Biotechnol*. 94(1):39-46.
- Shiryaev SA., Ratnikov BI., Chekanov AV., Sikora S., Rozanov DV., Godzik A., Wang J., Smith JW., Huang Z., Lindberg I., Samuel MA., Diamond MS., Strongin AY. 2006. Cleavage targets and the D-arginine-based inhibitors of the West Nile virus NS3 processing proteinase. *Biochemical Journal*. Jan 15; 393(Pt 2):503-11.
- Shy PY., Huang JH. 2004. Current advances in dengue diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11(4): 642-50.

- Smith KM., Nanda K., Spears CJ., Ribeiro M., Vancini R., Piper A., Thomas GS., Thomas ME., Brown DT., Hernandez R. 2011. Structural mutants of dengue virus 2 transmembrane domains exhibit host-range phenotype. *Journal of Virology*. Jun 9; 8:289.
- Tian Y., Zhang J., Chen Zongtao., Peng Tao., Xu Xiaofeng., Jiang W., An J. 2006. Expression, Purification of DENV-2 Nonstructural Protein 3 (NS3) and Production of the Polyclonal Antibody for NS3. *Dengue Bulletin*, Vol 30: ISSN 0250-8362, 146-156.
- Tomlinson SM., Malmstrom RD., Watowich SJ. 2009. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. *Infectious Disorders Drug Targets*. 9(3): 327-43.
- Tajima S., Takasaki T., Kurane I. 2010. Restoration of replication-defective dengue type 1 virus bearing mutations in the N-terminal cytoplasmic portion of NS4A by additional mutations in NS4B. *Archives of Virology* 156(1):63-9.
- Timiryasova TM., Bonaparte MI., Luo P., Zedar R., Hu BT., Hildreth SW. 2013. Optimization and validation of a plaque reduction neutralization test for the detection of neutralizing antibodies to four serotypes of dengue virus used in support of dengue vaccine development. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. May;88(5):962-70.
- Vasilakis N., Cardoso J., Hanley KA., Holmes EC., Weaver SC. 2011. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nature Reviews Microbiology*. 9(7): 532-41.
- Velandia ML., Castellanos J.E. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. 15(1):33-4).

- Velmurugan D., Mythily U., Rao K. 2013. Design and Docking Studies of Peptide Inhibitors as Potential Antiviral Drugs for Dengue Virus NS2B/NS3 Proteas. Protein and Peptide Letters. Jul 9.
- Whitehead SS., Blaney JE., Durbin AP., Murphy BR. 2007. Prospects for dengue virus vaccine. Nature Reviews Microbiology. 5(4): 518-28.
- Yusof R., Clum S., Wetzel M., Murthy HM., Padmanabhan R. 2000. Purified NS2B/NS3 serine protease of dengue virus type 2 exhibits cofactor NS2B dependence for cleavage of substrates with dibasic amino acids in vitro. Journal of Biological Chemistry 7;275(14):9963-9.
- Youn S., Cho H., Fremont DH., Diamond MS. A short N-terminal peptide motif on flavivirus nonstructural protein NS1 modulates cellular targeting and immune recognition. Journal of Virology. 2010 84(18):9516-32.
- Zuo ZO., Liew W., Chen G., Chong P., Lee SH., Chen H., Jisng C., Puah CM., Zhu W. 2009. Mechanism of NS2B-mediated activation of NS3pro in dengue virus: molecular dynamics simulations and bioassays. Journal of Virology. 83(2):1060-70.