

Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana
Instituto de Ciencias Médicas y Pre-clínicas “Victoria de Girón”
Instituto FINLAY
Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

**Identificación de epítomos de proteínas del virus
Dengue utilizando una biblioteca de péptidos
presentados en fagos filamentosos**

Tesis presentada en opción al grado científico
Doctor en Ciencias Médicas

Autor: Dra. Nevis Amin Blanco, MsC

**La Habana
2014**

Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana
Instituto de Ciencias Médicas y Pre-clínicas “Victoria de Girón”
Instituto FINLAY
Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

**Identificación de epítomos de proteínas del virus
Dengue utilizando una biblioteca de péptidos
presentados en fagos filamentosos**

Tesis presentada en opción al grado científico
Doctor en Ciencias Médicas

Autor: Dra. Nevis Amin Blanco, MsC

Tutores: Prof. Maritza Pupo Antunez, Dr C
Prof. Ela María Pérez, Dr C

**La Habana
2014**

La frase mas excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es "¡Eureka!" (¡Lo encontré!) sino 'Es extraño ...'.

Isaac Asimov

SINTESIS

La tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos es una alternativa para identificar epítomos de las proteínas del virus dengue de potencial uso en el desarrollo de vacunas y ensayos diagnósticos. En el presente trabajo, el empleo de esta tecnología permitió identificar cuatro mimotopos que simulan epítomos de este virus, basado en el reconocimiento por anticuerpos contra el serotipo 3 del virus, presentes en sueros humanos. Uno de dichos mimotopos mostró una secuencia aminoacídica similar a una región de la proteína no estructural NS3, altamente conservada entre los cuatro serotipos del virus, y una de las más potentes inductoras de la respuesta de linfocitos T. Los tres mimotopos restantes mostraron similitud aminoacídica con la proteína no estructural NS4B. Se demostró que el mimotopo de NS4B en sus dos variantes peptídicas, acoplado a la albúmina bovina sérica así como en forma de un sistema de péptidos de múltiples antígenos, detectó anticuerpos a tres de los cuatro serotipos. Los mayores niveles de detección se encontraron al serotipo 3 del virus, en sueros de pacientes con una infección secundaria, lo cual sugiere la potencialidad de los mismos para aplicarse como herramienta diagnóstica para la tipificación viral. El sistema de péptidos de múltiples antígenos indujo en ratones una respuesta de anticuerpos específica, lo que corrobora el papel de la proteína NS4B en la respuesta inmune del hospedero durante la infección. Se confirmó también que la secuencia aminoacídica correspondiente al mimotopo de NS4B, mostró “*in silico*” elevada probabilidad de presentarse como epítomo de células T por una proporción de individuos de la población cubana y de otras zonas geográficas, todo lo cual apoya la inclusión del mismo en el diseño de futuras vacunas de subunidades.

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

aa: aminoácidos
ABS: Albúmina Bovina Sérica
AcM: anticuerpo monoclonal
ACF Adyuvante Completo de Freund
ADA Amplificación Dependiente de Anticuerpos
ADN: ácido desoxirribonucleico
AIF: Adyuvante Incompleto de Freund
ARN: ácido ribonucleico
C: proteína del la cápsida del virus dengue
CDR: regiones determinantes de la complementariedad (-del inglés- *Complementary Determinant Region*)
CRL cerebro de ratón lactante
DC-SIGN: la molécula de adhesión intercelular específica 3-no integrina agarradora de célula dendrítica (-del inglés -dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin)
DENV-1: serotipo 1 del virus dengue
DENV-2: serotipo 2 del virus dengue
DENV-3: serotipo 3 del virus dengue
DENV-4: serotipo 4 del virus dengue
DO: densidad óptica
E: proteína de la envoltura del virus dengue
EEE: Encefalitis equina del este
ELISA: ensayo inmunoenzimático de fase sólida (-del inglés- *enzyme-linked immunosorbent assays*)
ESI-MS espectrometría de masas de ionización por *electrospray*
Fc: fragmento cristalizante de la molécula de inmunoglobulina
FD: fiebre del dengue
FHD: fiebre hemorrágica por dengue
FITC: isotiocianato de fluoresceína
Hsp: proteína de choque térmico (-del inglés- *heat shock protein*)
HLA: Antígenos leucocitarios humanos del Sistema principal de Histocompatibilidad, (-del inglés- *Human Leucocyte Antigens*)
HRP: peroxidasa de rábano picante (-del inglés- *horse rabbit peroxidase*)
IFI: inmunofluorescencia indirecta
Ig: inmunoglobulina
INF: interferón
IL: interleuquina
IPK: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"
KLH: Hemocianina de lapa (del-inglés- *Keyhole limpet hemocyanin*),
LAH: Líquidos Ascítico Hiperinmune
LAN: Líquidos Ascítico Negativo
L-SIGN la molécula de adhesión intercelular específica 3-no integrina agarradora de nódulos linfáticos (-del inglés- *lymphnode specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*)
M: proteína de membrana del virus dengue
MAP: Sistema de péptidos de múltiples antígenos (MAP- del inglés- *Multi Antigen Peptide*).
MEI: método de ELISA de inhibición
MEM: medio mínimo esencial
NS: proteína no estructural del virus dengue (-del inglés- *nonstructural*)

OMS: Organización Mundial de la Salud
OPD: Ortofenilendiamina, (-del inglés -*Orthophenylendiamine*)
RCP: reacción en cadena de la polimerasa
SCD: síndrome de choque por dengue
SFB: suero fetal bovino
Slot Blot Ensayo de transferencia por ranuras (-del inglés- *Slot blot*)
STAT: Proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción, (-del inglés -*Signal Transducers and Activators of Transcription*)
TA: Temperatura ambiente
Th: Linfocito T auxiliador, (-del inglés -*T helper cells*)
TNF: factor de necrosis tumoral (-del inglés- *tumoral necrosis factor*)
UFC: unidades formadoras de colonias
UFP: unidades formadoras de placas
VHA: Virus de la Hepatitis A
VNO: Virus del Nilo Occidental
VEJ: Virus de la Encefalitis japonesa

INDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis	4
1.2. Objetivos	5
1.3. Novedad científica y valor teórico	6
1.4. Valor práctico	7
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA	8
2.1. Características de los virus del dengue	8
2.2. Proteínas virales	
2.2.1. Proteínas estructurales	9
2.2.2. Proteínas no estructurales	10
2.3. Replicación viral	12
2.4. Manifestaciones clínicas de la enfermedad	13
2.5. Situación epidemiológica y epidemias de dengue en Cuba	14
2.6. Papel de la respuesta inmune contra el dengue en la patogenia de la enfermedad	15
2.6.1. Papel de los anticuerpos en la patogenia de la infección por dengue	16
2.6.2. Factores del hospedero relacionados con la patogenia de la infección por dengue	16
2.6.3. Papel de la respuesta celular en la patogenia de la infección secundaria por dengue	17
2.6.4. Papel de las citoquinas en la patogenia de la infección por dengue	18
2.7. Diagnóstico	19
2.8. Vacunas	20
2.9. Tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos	21
2.9.1. Características fundamentales de los fagos filamentosos	21
2.9.2. Exposición de bibliotecas de péptidos en fagos filamentosos	22
2.9.3. Aplicaciones de la tecnología de presentación de péptidos en fagos filamentosos para el diseño de vacunas y como herramienta de diagnóstico	23
2.10. La tecnología de presentación de péptidos en fagos filamentosos en virus dengue	25
2.11. Péptidos sintéticos	29
2.11.1 Empleo de los péptidos en dengue.	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Medios de cultivos y soluciones	35
3.2 Líneas celulares	35
3.3. Microorganismos	36
3.4. Anticuerpos	36
3.5. Biblioteca J404 de péptidos expuestos en fagos filamentosos.	37
3.6. Péptidos.	37
3.7. Aspectos éticos de la investigación	37
3.8. Muestras serológicas para la evaluación del péptido	38
3.9. Selección por afinidad.	39
3.9.1. Inmunoidentificación de colonias	40
3.9.2. Selección de fagos empleando ensayo de transferencia por ranuras (Slot-Blot).	41

3.10. Caracterización de la especificidad de los clones de fagos seleccionados	41
3.10.1. Reactividad de los clones de fago frente a LAH	41
3.10.2. Ensayo de inhibición competitiva de los fagos seleccionados	42
3.10.3. Reactividad específica de los clones de fagos al AcM H3-6.	43
3.11. Análisis de la secuencia aminoacídica de los péptidos expuestos en los fagos seleccionados	44
3.11.1. Predicción de epítomos B	44
3.11.2. Predicción de epítomos T	45
3.11.3. Estudio de la presentación del epítomo de células T correspondiente con el mimotopo identificado por una muestra de la población cubana	45
3.12. Síntesis de péptidos mimotopos de dengue y conjugación a la proteína portadora	46
3.13. Evaluación de antigenicidad	47
3.13.1. Caracterización antigénica de los clones de fagos y de dos construcciones peptídicas de mimotopo de dengue empleando un suero policlonal anti-NS4B.	47
3.13.2. ELISA indirecto para la detección de los anticuerpos anti- NS4B en sueros humanos empleando dos construcciones peptídicas	48
3.14. Esquema de inmunización.	49
3.15. Ensayos para la evaluación de la respuesta inmune humoral en ratón.	49
3.15.1. ELISA para la detección de los anticuerpos anti-MAP en los sueros de ratones inmunizados.	49
3.15.2. ELISA para la detección de los anticuerpos IgG totales anti-dengue en el suero de ratones.	51
3.15.3. Ensayo de Inmunofluorescencia. Cinética de expresión de la proteína NS4B mediante IFI. Evaluación de la funcionalidad de la respuesta humoral	51
3.16. Análisis estadístico	52
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1 Selección de fagos portadores de péptidos miméticos del virus dengue	53
4.1.2 Ensayo de competencia de los fagos seleccionados	58
4.1.3 Reactividad de los clones de fagos seleccionados con el AcM H3-6	61
4.1.4 Análisis de la secuencia aminoacídica de los péptidos expuestos en los fagos seleccionados	62
4.2 Reconocimiento del mimotopo NS4B por anticuerpos	66
4.2.1 Comparación de la antigenicidad del mimotopo en diferentes formatos antigénicos	66
4.2.2 Comparación de la antigenicidad del MAP NS4B y el péptido NS4B conjugado a ASB empleando sueros humanos	68
4.2.3 Reconocimiento del MAP NS4B por anticuerpos producidos contra el virus en pacientes con diagnóstico de dengue.	72
4.3. Evaluación de la capacidad inmunogénica del MAP NS4B.	76
4.4. Análisis de predicción de regiones antigénicas para células B y epítomos de células T de la proteína NS4B del virus DENV-3 usando herramientas bioinformáticas.	85
5. DISCUSIÓN INTEGRADA	94
6. CONCLUSIONES	99
7. RECOMENDACIONES	100
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
9. ANEXOS	
10. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR	

1. INTRODUCCIÓN

El dengue se considera una de las enfermedades virales de mayor importancia dentro de las enfermedades emergentes y re-emergentes transmitidas por mosquitos. Alrededor de 50- 200 millones de personas se infectan anualmente, de las cuales aproximadamente 500 000 resultan en casos graves de la enfermedad y 20 000 mueren (1). El virus responsable de esta enfermedad se conoce como virus del dengue y comprende cuatro serotipos designados como dengue 1 (DENV-1), dengue 2 (DENV-2), dengue 3 (DENV-3) y dengue 4 (DENV-4) (2). La infección por cualquiera de los cuatro serotipos del virus dengue (DENV 1-4) puede cursar en forma asintomática o expresarse con un espectro clínico amplio que incluye la forma grave y la no grave de la enfermedad (3).

La respuesta de anticuerpos a dengue usualmente actúa para prevenir o controlar la infección, mediando tres funciones fundamentales: la neutralización del virus extracelular al bloquear la unión o fusión de la envoltura viral a su receptor en la membrana plasmática celular, la eliminación de las células infectadas por el virus, a través de un mecanismo de citotoxicidad celular o de citólisis mediada por complemento. Sin embargo, los anticuerpos que se originan durante una infección por dengue o por otro flavivirus pueden amplificar una siguiente infección con un serotipo diferente de dengue, fenómeno este llamado Amplificación Dependiente de Anticuerpos (ADA) (4).

La presencia de anticuerpos contra las proteínas de los virus del dengue se ha demostrado, mediante técnicas como Western Blot y ensayos inmunoenzimáticos de fase sólida. Los anticuerpos a la proteína estructural Envoltura (E) y a las proteínas no estructurales NS3 y NS5 se han detectado en sueros de pacientes con infección primaria y secundaria (5). Los pacientes con una infección secundaria producida por alguno de los virus del dengue, presentan anticuerpos de tipo inmunoglobulina (Ig) IgG con títulos elevados contra muchas otras proteínas virales, incluyendo NS1, Cápsida (C), prM y NS4 (6-8).

Durante décadas los anticuerpos monoclonales (AcM) anti-dengue se han utilizado exitosamente como herramientas útiles en múltiples investigaciones. La mayoría de estos AcM se han obtenido a través de la tecnología clásica de hibridomas (9) y se han evaluado en cuanto a las propiedades de neutralización, amplificación de la infección y de protección pasiva (10-15).

El dengue es una de las enfermedades infecciosas en las cuales la obtención de preparaciones de antígenos virales para fines, preventivos, diagnósticos o investigativos, se realiza a partir de cultivos celulares infectados o tejidos animales, lo cual implica el empleo de animales experimentales así como procesos largos, laboriosos y costosos (16, 17). Por ello es de gran importancia disponer de nuevas fuentes alternativas de antígenos para el desarrollo de candidatos vacunales y herramientas para el diagnóstico, y de esta forma evitar las principales desventajas relacionadas con la manipulación del virus.

En la década de los 80 se describió la tecnología de presentación de péptidos y proteínas sobre fagos filamentosos (18). Esta tecnología consiste en la modificación por ingeniería genética de las partículas virales, de esta forma, cada partícula de fago puede incorporar a su material genético genes foráneos de interés, y exponer en su superficie las secuencias proteicas codificadas por ellos (fusionadas a proteínas de la cápsida viral) (18). Investigaciones recientes han mostrado que los péptidos expuestos en fagos, seleccionados empleando anticuerpos producidos contra antígenos relacionados con determinada patología, pueden ser una herramienta importante tanto para el diagnóstico como para la prevención de enfermedades (19-21). Estos péptidos no necesariamente presentan una similitud de secuencia con el antígeno, pero sí suficiente homología conformacional para inducir anticuerpos de alta afinidad capaces de unirse a ellos y al antígeno natural (22).

Numerosos grupos de investigadores han dirigido sus trabajos a identificar epítomos del virus del dengue a partir de bibliotecas de péptidos presentados en fagos, empleando

AcM. Algunos de ellos, (valiosos por su especificidad) se han utilizado exitosamente y han permitido la detección de anticuerpos y la tipificación del serotipo de infección a partir de muestras clínicas (23-25). En el laboratorio de Arbovirus del Instituto “Pedro Kouri” (IPK), existen mimotopos del virus del dengue obtenidos empleando una biblioteca de péptidos y el AcM murino H3-6, el cual reconoce a los cuatro serotipos del virus dengue. El péptido derivado de esta selección presenta similitud con la proteína de la envoltura, y presenta reactividad con anticuerpos anti-dengue presentes en muestras de sueros humanos y de ratones inmunizados (Comunicación Personal, Dra. Maritza Pupo, Instituto de Medicina Tropical IPK, 2012).

El uso de AcMs en esta metodología tiene limitantes (23), los AcMs presentan solamente una fracción del total de la respuesta de anticuerpos a un antígeno determinado, en cambio los sueros policlonales tienen un amplio repertorio de la población de anticuerpos producidos, lo que incrementa las posibilidades de su utilización para la selección de mimotopos útiles (26).

El suero humano es una fuente valiosa de información de los antígenos que han estado en contacto con el organismo. Esta información existe en forma de respuesta inmune humoral y está dada por los anticuerpos policlonales presentes en el suero, los cuales son producidos por diferentes clones de linfocitos B, presentan diferente clase, afinidad y reconocen diferentes epítomos (27).

La utilidad de los sueros policlonales humanos y bibliotecas de péptidos expuestos en fagos filamentosos, para la identificación de epítomos específicos se ha validado para patógenos causantes de enfermedades infecciosas virales (20, 28-30). Folgori y colaboradores en el año 1994 (22) desarrollaron una metodología que facilita la selección en estas bibliotecas de los ligandos reconocidos por los sueros de pacientes de una determinada enfermedad y que no son reconocidos por los sueros de los individuos sanos. Esto es posible ya que a pesar de la diversidad de la respuesta inmune humoral

que se genera a un determinado agente etiológico en individuos diferentes, de modo general se producen un conjunto de anticuerpos comunes en la población afectada por una misma enfermedad (22).

Hasta el momento no se ha explotado la obtención de mimotopos del virus del dengue empleando sueros humanos y bibliotecas de péptidos expuestas en fagos filamentosos. Considerando lo expuesto anteriormente y que su aplicación pudiera constituir una vertiente en las investigaciones dirigidas al diseño de un candidato vacunal efectivo, al desarrollo de reactivos de nueva generación de uso potencial en técnicas de diagnóstico (31, 32), además de permitir definir los epítomos relacionados con la inmunopatogénesis de la enfermedad (33) nos planteamos la siguiente hipótesis:

1.1. Hipótesis

El empleo de sueros humanos que contienen anticuerpos específicos al virus dengue y bibliotecas de péptidos presentados en fagos filamentosos, permite identificar mimotopos del virus con potencialidad diagnóstica y vacunal.

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivo general

- Identificar mimotopos del virus dengue, a partir de una biblioteca de péptidos presentados en fagos filamentosos, utilizando sueros humanos inmunes al serotipo 3 del virus.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Identificar mimotopos del virus del dengue a partir de una biblioteca de péptidos presentados en fagos filamentosos.
2. Determinar la utilidad de los mimotopos identificados para la detección de anticuerpos anti-dengue presentes en muestras de sueros humanos.

3. Evaluar la respuesta inmune humoral específica inducida en ratones BALB/c por variantes peptídicas de los mimotopos seleccionados.

4. Identificar regiones antigénicas para células B y epítomos de células T de la proteína del virus dengue correspondiente con el mimotopo identificado, mediante el empleo de programas bioinformáticos.

Tareas

Para cumplimentar los objetivos anteriores nos trazamos las siguientes tareas.

Objetivo 1.

- Seleccionar clones individuales de los fagos reconocidos por anticuerpos anti-dengue presentes en sueros humanos, mediante una biblioteca de péptidos lineales de 9 aminoácidos (a.a) presentados en fagos filamentosos.
- Caracterizar los clones de fagos aislados utilizando Líquidos Ascítico Hiperinmune (LAH) murinos que contienen anticuerpos contra los cuatro serotipos del virus dengue y otros arbovirus.
- Definir cuáles clones de fagos presentan los epítomos capaces de competir con el virus por su sitio de unión con los anticuerpos anti-dengue, mediante un ensayo inmunoenzimático de fase sólida (ELISA -del inglés- *Enzime Linked Immunosorbent Assay*) ELISA de inhibición.
- Determinar el reconocimiento de los fagos específicos de virus dengue con un AcM anti-complejo dengue.
- Analizar la similitud entre las secuencias de los péptidos expuestos en los clones de fago y las proteínas del virus dengue.

Objetivo 2.

- Diseñar y sintetizar péptidos sintéticos a partir de la secuencia expuesta en los clones de los fagos seleccionados.
- Determinar la capacidad de los péptidos sintéticos de detectar anticuerpos en el suero de pacientes con diferentes tipos de infección a dengue.

Objetivo 3.

- Evaluar la respuesta de anticuerpos inducida en ratones inmunizados con el péptido sintético correspondiente con el mimotopo seleccionado.

Objetivo 4.

- Identificar “*in silico*” los epítomos B, T y T promiscuos de la proteína del virus dengue que simulan los mimotopos identificados.
- Analizar “*in silico*” la cobertura poblacional frente al epítomo seleccionado.

1.3. Novedad científica y valor teórico

Se describe por primera vez la utilización de sueros humanos positivos a anticuerpos contra el virus del dengue para seleccionar mimotopos del virus, a partir de bibliotecas de péptidos presentados en fagos filamentosos.

Se describen secuencias aminoacídicas de las proteínas NS3 y NS4B (NS proteína no estructural del virus dengue (del inglés- *nonstructural*) identificadas empleando sueros humanos inmunes al virus del dengue, demostrando la importancia de las mismas en la respuesta inmune del hospedero durante la infección viral.

Se demostró la utilidad del mimotopo de la proteína NS4B del DENV-3 para la detección de anticuerpos presentes en sueros humanos inmunes.

Se presentan nuevos y valiosos aportes al conocimiento de la proteína NS4B, basados en los resultados de la inmunogenicidad del mimotopo de la proteína NS4B, al demostrarse

que la respuesta de anticuerpos inducida reconoció, en etapas temprana de la infección, a la proteína nativa en cultivos celulares.

Se identificó la presencia potencial de epítomos B, T y T promiscuos en la proteína NS4B, se demostró además, que el epítomo seleccionado –FEKQLGQV- de la proteína NS4B tiene elevadas probabilidades de ser presentado por una gran proporción de individuos de la población cubana.

1.4. Valor práctico

Los resultados expuestos en esta tesis son de utilidad para el diseño de candidatos vacunales contra el virus del dengue. Al mismo tiempo, este trabajo propone dos formatos de péptidos sintéticos con potencialidades para el diagnóstico de la infección por el virus del dengue y aporta una estrategia para la selección de mimotopos específicos de DENV-1, 2 y 4 con sueros humanos con presencia de anticuerpos a estos serotipos virales.

Los resultados presentados en esta tesis se obtuvieron a partir del proyecto de colaboración: Identification of Dengue Virus Specific Epitopes, llevado a cabo entre el Instituto Finlay y la Universidad de Glasgow (Reino Unido). Estos resultados se han presentado en diferentes eventos científicos y han sido publicados en revistas nacionales (1) e internacionales (2).

2. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características de los virus del dengue

El virus dengue pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* en la cual se agrupan aproximadamente 70 miembros. Existen cuatro serotipos (DENV-1, 2, 3, 4), para los cuales se ha descrito una homología de secuencia de alrededor de un 70 % (2).

Las partículas maduras del virus son esféricas, presentan un diámetro entre 40 y 60 nm (34) y contienen una nucleocápsida de 30 nm de diámetro rodeada por una bicapa lipídica de 10 nm de espesor (35). El genoma viral consiste en una molécula de ácido ribonucleico (ARN) de simple cadena positiva, de aproximadamente 11 kb de longitud y 4,2 kDa de peso molecular. Posee en el extremo 5' una caperuza m⁷G5'ppp5'A y no presenta cola poliadenilada en el extremo 3' (34). Contiene un solo marco de lectura que codifica para tres proteínas estructurales: cápsida, envoltura y membrana (M). Esta última se obtiene durante la maduración de la partícula viral a partir del precursor denominado prM y para siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (34, 35). En los extremos 5' y 3' presenta secuencias no codificantes que dirigen los procesos de amplificación, de traducción y de empaquetamiento del genoma viral (Figura 1).

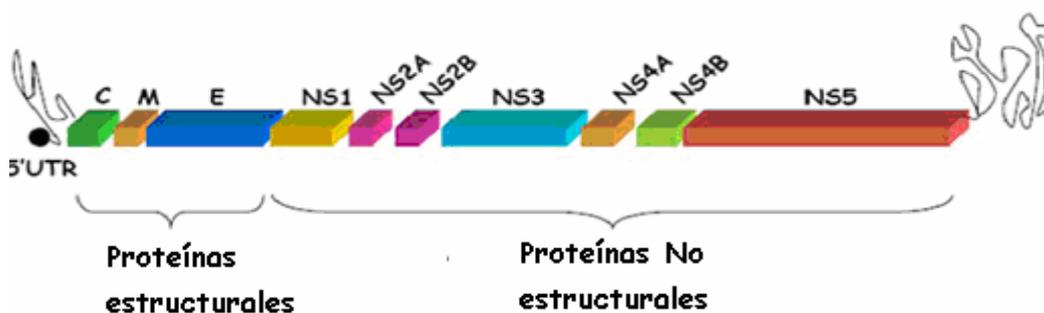


Figura. 1. Genoma de los DENV. Tomado de Clyde K y colaboradores, 2006

2.2. Proteínas virales

2.2.1. Proteínas estructurales

La proteína C tiene un peso molecular de 13,5 kDa y es el primer polipéptido sintetizado durante la traducción (35). El carácter altamente básico que posee esta proteína podría permitirle interactuar con el ARN que se encuentra en el interior de la nucleocápsida para formar un complejo ribonucleotídico. El dominio hidrofóbico en su extremo C-terminal le sirve de anclaje transitorio a la membrana en el sitio de replicación. Además, actúa como transductor de señales de transmembrana para la inserción de la prM dentro del retículo endoplasmático rugoso e interviene en el ensamblaje del virión. Este dominio hidrofóbico puede ser eliminado por una proteasa codificada por el virus antes de completar su maduración, dando lugar finalmente a la proteína C que forma el virión maduro (34).

Durante la maduración y después de la ruptura de la proteína C tiene lugar la escisión proteolítica específica del precursor prM glicosilado de 22 kDa, liberándose su extremo N-terminal que da lugar a la proteína no glicosilada M de 8 kDa (36). Esta digestión parece ocurrir en las vesículas ácidas del post-Golgi y precede a la liberación del virus de la célula. La proteína prM es considerada no estructural y se localiza en viriones que tienen defecto en la maduración (2).

La proteína E tiene un peso molecular de 53 a 54 kDa y se encuentra glicosilada en la mayoría de los virus de esta familia. Contiene aproximadamente 500 residuos aminoacídicos (35) y un dominio N-terminal anclado en la membrana. Presenta en su estructura 12 residuos aminoacídicos de cisteína que forman seis puentes disulfuros intramoleculares (37). La cadena polipeptídica que conforma el fragmento soluble de la proteína E se ensambla en tres dominios: un dominio central en hoja plegada (dominio I), una región de dimerización elongada (dominio II) y una tercera región tipo inmunoglobulina (dominio III) que constituye el dominio carboxilo-terminal (aa 303-

395) (38). De acuerdo a la estructura del virión, el dominio III se encuentra expuesto (39, 40). La proteína E desempeña un papel esencial en la unión a los receptores celulares, en la fusión a las membranas de las células y en el ensamblaje de los viriones, y constituye el determinante antigénico principal del virus del dengue (39). Particularmente, el dominio III de la proteína E presenta epítomos inductores de anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo y en él se encuentra el sitio de unión al receptor celular (41).

2.2.2. Proteínas no estructurales

NS1 es una glicoproteína de 48 kDa de peso molecular, es sintetizada y modificada en el retículo endoplasmático rugoso, que se transporta al aparato de Golgi donde completa su glicosilación. Puede permanecer intracelular, expresarse en la membrana plasmática o ser secretada por la célula. Presenta un mosaico de determinantes antigénicos específicos de serotipo, así como de complejo y grupo. Esta proteína puede intervenir en el ensamblaje y la maduración del virión facilitando la conformación apropiada de la proteína E (42).

Algunos autores, basados en la detección de niveles más elevados de NS1 en plasma para los casos de fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y en su correlación con los niveles de viremia, han sugerido la implicación de esta proteína en la patogénesis de la enfermedad por dengue(43).

La región que codifica para la proteína NS2 se divide en NS2A y NS2B. NS2A se ha identificado como una proteína hidrofóbica de 20 kDa que se localiza en los posibles sitios de replicación del ARN, donde participa en el reclutamiento de las copias de ARN necesarias para la replicasa que se encuentra unida a la membrana. Además, presenta varios dominios de transmembrana que se requieren para el procesamiento proteolítico del extremo C-terminal de NS1(44). NS2B es una proteína hidrofóbica de 14,5 kDa que se encuentra asociada a la membrana. El funcionamiento como cofactor en el complejo NS2B-NS3 con actividad proteasa requiere de una región de 40 a.a presente en su

dominio central conservado. Este complejo es responsable, junto con la peptidasa señal del hospedero, del procesamiento de las uniones entre las proteínas no estructurales NS2A-NS2B-NS3-NS4A y NS4B-NS5, y de mediar la ruptura proteolítica del precursor E-prM-C (34).

La proteína hidrofóbica NS3 es la segunda proteína en tamaño del virus, con un peso molecular de 70 kDa y se encuentra muy conservada en los flavivirus (35). La comparación de secuencias nucleotídicas y los análisis bioquímicos de NS3 sugieren que es una proteína trifuncional, con actividad proteasa, helicasa y trifosfatasa del ARN. En cuanto a su actividad proteasa, NS3 es una proteasa específica de serina que requiere tanto de una peptidasa señal del hospedero, como de un cofactor, que es NS2B (34). Se ha demostrado que la misma es la fuente principal de epítomos de células T(45).

La proteína NS4 es modificada postraduccionalmente y se divide en NS4A y NS4B. Ambas proteínas son hidrofóbicas y presentan 16 y 27 kDa de peso molecular, respectivamente (35). Se plantea que NS4A participa en la replicación del ARN, quizás anclando componentes de la replicasa a la membrana celular. NS4B, igualmente puede encontrarse en los sitios de replicación del ARN (46). Está involucrada en la interferencia con la respuesta tipo I de interferón en células huésped (47). Se ha informado NS4B es responsable de la inducción de inmunomediadores tales como Interleuquina (IL) IL6, IL-8, IP-10, el factor de necrosis tumoral α (TNF -del inglés- *tumoral necrosis factor*) e interferón (IFN) IFN $-\gamma$ (48) y que es una diana para inhibir la infección por el virus del dengue (49).

La proteína NS5 es la de mayor tamaño de los flavivirus, con 104 kDa de peso molecular y se encuentra altamente conservada en los mismos (35). Es una proteína básica y se ha sugerido podría funcionar como ARN polimerasa dependiente de ARN, lo cual se fundamenta en la presencia de una región altamente conservada, característica de este tipo de enzima presente en los virus de ARN de cadena positiva (50). La homología de

algunas regiones de NS5, con secuencias características de las enzimas metiltransferasas involucradas en la formación de la caperuza del ARN, indican su posible participación en la metilación de la caperuza del extremo 5' del ARN viral (34).

2.3. Replicación viral

Después de la picadura del mosquito *Aedes aegypti*, y la inoculación del virus dengue a través de la piel, éste se replica inicialmente en las células dendríticas con la subsiguiente diseminación sistémica y la infección de los macrófagos y monocitos (51, 52).

El virus dengue entra a las células hospederas por endocitosis mediada por un receptor celular (53). Si bien se ha demostrado que el sitio de unión viral se encuentra en el dominio III de la proteína E el receptor celular aún no está definido. Se postula que la primera interacción del virus tiene lugar con elementos de unión de baja afinidad presentes en la superficie celular que tienen la función de concentrar el virus (53). Entre estos elementos se encuentran el heparán sulfato, lectinas de tipo C como DC-SIGN, molécula de adhesión intercelular específica 3-no integrina agarradora de célula dendrítica (-del inglés- *dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*) (54) y un homólogo de DC-SIGN, el L-SIGN, molécula de adhesión intercelular específica 3-no integrina agarradora de nódulos linfáticos (-del inglés- *lymphnode specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*). Al parecer el virus es internalizado por receptores de alta afinidad entre los que se han propuesto las proteínas de choque térmico (Hsp -del inglés- *heat shock protein*), los proteoglicanos de heparán sulfato y el receptor de laminina de alta afinidad (55-57).

Después de la internalización del virus se forman los endosomas, cuyo pH ligeramente ácido induce un cambio conformacional en la proteína E que provoca su re-asociación en trímeros y la exposición del dominio de fusión (58). Consecutivamente ocurre la fusión entre el virus y la membrana del endosoma con la liberación de la nucleocápsida viral al

citoplasma celular. La proteína C se disocia del ARN viral y comienza su traducción en los ribosomas asociados al retículo endoplasmático rugoso (59). La poliproteína resultante es procesada co y postraduccionalmente por proteasas de la célula (peptidasas señales) y del virus (complejo NS2B-NS3) para dar lugar a las 10 proteínas virales (34).

Una vez sintetizado el complejo de replicación viral comienza la síntesis del ARN viral en las membranas de la región perinuclear (35, 60). Después de sucesivas rondas de transcripción y traducción comienza el ensamblaje de las partículas virales. Para ello, el ARN viral se une a la proteína C y luego pasa hacia el retículo endoplasmático rugoso, donde la nucleocápsida es envuelta en una bicapa lipídica que contiene a las proteínas prM y E, formando heterodímeros prM/E unidos de forma no covalente (2). Posteriormente, estas partículas son dirigidas hacia el retículo a través del aparato de Golgi, donde el ambiente ácido favorece el clivaje del heterodímero prM/E por una proteasa del hospedero. Como resultado se obtiene la proteína M a partir de la proteína prM y se libera la proteína E. Las partículas virales maduras son liberadas de las células mediante un proceso de exocitosis a través de vesículas secretorias (61).

2.4. Manifestaciones clínicas de la enfermedad

La infección provocada por cualquiera de los cuatro serotipos del virus dengue puede cursar de forma asintomática, conllevar a una enfermedad benigna denominada fiebre del dengue (FD), u ocasionar las formas más severas conocidas como FHD o síndrome de choque por dengue (SCD) (62, 63). El período de incubación de la enfermedad puede variar de cuatro a catorce días, pero generalmente es de cuatro a siete días (64).

La FD se caracteriza por la presencia de fiebre alta de inicio abrupto, cefalea severa, dolor retro-orbital, mialgias, artralgias, rash y en ocasiones se observan manifestaciones hemorrágicas leves (65). La FHD se caracteriza por fiebre, trombocitopenia, manifestaciones hemorrágicas fuertes y por el incremento de la permeabilidad vascular

con extravasación de plasma (66). En el SCD se produce un deterioro súbito del paciente luego de una fiebre de corta duración. La temperatura desciende y aparecen signos indicadores de insuficiencia del sistema circulatorio (frialdad de la piel, congestión, cianosis peri-labial y tensión arterial baja) que desencadenan la muerte del paciente (67).

El sistema de clasificación actual de DEN no es completamente efectivo y útil. Con la extensión del DEN a nuevas regiones se han observado manifestaciones clínicas que contrastan con las encontradas en los niños del sudeste asiático (Tailandia) en la década del sesenta, las cuales forman la base de la clasificación de la Organización Mundial de la salud (OMS) (68).

Desafortunadamente, existe entrecruzamiento entre las manifestaciones clínicas y los exámenes de laboratorio de la FD y la FHD. Es así que últimamente se ha hecho énfasis en desarrollar algoritmos simples y reproducibles, los cuales sean aplicables al diagnóstico, definición de casos y manejo del DEN. Estos algoritmos están basados en estudios clínicos de múltiples países endémicos en diferentes grupos étnicos. Actualmente la nueva clasificación se está evaluando en 18 países para su validación y la misma establece dos formas de la enfermedad, dengue (con y sin signos de alarma) y dengue grave (69, 70) (Anexo 1).

2.5. Situación epidemiológica y epidemias de dengue en Cuba

El dengue afecta a numerosos países de las zonas tropicales y subtropicales del planeta. La enfermedad ha sido reconocida en más de 100 países y es endémica en África, el Mediterráneo Oriental, el Sudeste Asiático, el Pacífico Occidental y en América (69). Anualmente se reportan entre 50 a 100 millones de casos de FD y entre 250 000 a 500 000 enfermos de FHD/SCD en el mundo (1).

La primera epidemia de dengue en Cuba, después de la segunda mitad del siglo pasado, ocurrió por el virus DENV-1 entre los años 1977-1979 (71). En 1981 ocurrió otra

epidemia provocada por el virus DENV-2 y apareció por primera vez en el país y en América la FHD (72). En el período comprendido entre 1986 hasta 1996 no hubo transmisión de dengue en el país, sin embargo en 1997 volvió a detectarse el virus DENV-2 en el municipio de Santiago de Cuba (73).

En el año 2000 ocurrió un pequeño brote de dengue en la entonces provincia de Ciudad de la Habana, donde se aislaron como causantes a los serotipos 3 y 4 (74). Más tarde, entre los años 2001-2002 se produjo otra epidemia en Ciudad de la Habana que tuvo al virus DENV-3 como agente etiológico (75).

Después de la última epidemia ocurrida en el período 2001-2002, han ocurrido brotes de dengue en diferentes regiones del país, todos de corta duración. En las mismas se aislaron los serotipos DENV-3 y DENV-4 (Comunicación Personal Dra. María G Guzmán, Instituto de Medicina Tropical “IPK”, 2012).

2.6. Papel de la respuesta inmune contra el dengue en la patogenia de la enfermedad

La respuesta inmune contra el virus del dengue está implicada, además, en la patogenia de la FHD/SCD. En este sentido, existen varias hipótesis que tratan de explicar la participación de los diferentes elementos de la respuesta inmune en el incremento de la carga viral en sangre, descrito en los pacientes que desarrollan las formas severas de la enfermedad (76, 77).

2.6.1. Papel de los anticuerpos en la patogenia de la infección por dengue

La ADA es un fenómeno serológico demostrado *in vitro* donde la infección viral de células susceptibles es modificada por la adición de anticuerpos que reconocen al virus. Durante la infección primaria por un serotipo determinado se originan anticuerpos capaces de neutralizar a los virus homólogos y por tanto proteger al individuo a largo

plazo; pero igualmente se originan anticuerpos neutralizantes heterólogos de corta duración responsables del efecto ADA. Estos anticuerpos heterólogos formados durante la infección primaria en concentraciones subneutralizantes son capaces de reconocer epítomos presentes en el virus que ocasiona la infección secundaria, formando complejos inmunes que facilitan la entrada del virus a las células susceptibles a través de los receptores celulares Fc presentes en las células B, en las células dendríticas y en los monocitos-macrófagos, todas dianas de la infección por el virus del dengue (4).

La importancia de la ADA en el desarrollo de las formas severas de la enfermedad del dengue ha sido sustentada fundamentalmente por estudios seroepidemiológicos (78).

El fenómeno de la ADA se había asociado anteriormente de forma exclusiva a los anticuerpos inducidos por la proteína E (53). Sin embargo, posteriormente se demostró que los anticuerpos contra la proteína prM pueden mediar la ADA e incluso se evidenció una vía de amplificación independiente de los receptores para Fc, mediada por la unión específica dual de los anticuerpos anti-prM a los antígenos propios (como la proteína de choque térmico 60) y a la superficie del virión (79). Por otra parte, se demostró la participación de las células dendríticas maduras en la ADA, en las que la amplificación se correlacionó directamente con los niveles de expresión de los receptores para Fc y de forma inversa con la expresión de DC-SIGN (80).

También se sugiere que la ADA puede ser inhibida por la acción del factor C1q del complemento de manera dependiente de las subclases de inmunoglobulinas que se unen con mayor avidez al mismo (81).

2.6.2. Factores del hospedero relacionados con la patogenicidad de la infección por dengue

Kourí y cols en 1987 (82) plantearon una hipótesis integral para explicar el desarrollo de las formas severas de la enfermedad en la que se incluyen los factores de riesgo individual relacionados con la existencia de anticuerpos contra los virus del DEN, la

edad, el sexo, la raza y las enfermedades crónicas como el asma, la diabetes y la siclemia; factores de riesgo epidemiológico relacionados con el vector (capacidad de ser transmisor y alta densidad), el intervalo entre infecciones y la amplia circulación viral; y factores relacionados con el serotipo y la virulencia del agente. Esta hipótesis plantea que la presencia de los factores de riesgo individual en el contexto de los factores epidemiológicos y virales posibilita la ocurrencia de una epidemia de FHD/SCD.

En varios estudios se relaciona también el genotipo del individuo con la susceptibilidad ante el desarrollo de la enfermedad por dengue, incluyendo el polimorfismo de los genes para los antígenos de leucocitos humanos del Sistema principal de Histocompatibilidad (HLA –del inglés- *human leucocyte antigen*) (83-85) y de otros genes no HLA (86-88).

2.6.3. Papel de la respuesta mediada por células T en la patogenia de la infección secundaria por dengue

La hipótesis acerca de la implicación de los linfocitos T en el desarrollo de la FHD plantea que tras la infección secundaria heterotípica se activan principalmente los clones de células T de memoria estimulados en respuesta a la infección primaria, los que generan la producción de una serie de citoquinas inflamatorias que participan en el desarrollo de la FHD/SCD (89). Más tarde se demostró que efectivamente las células T de reactividad cruzada activadas durante la infección secundaria reconocen epítomos con diferencias de pocos aminoácidos entre los cuatro serotipos del DEN y que después de la activación sufren el proceso de apoptosis en el período agudo de la enfermedad. Estos linfocitos T de memoria no son capaces de proliferar ni de secretar INF- γ , por lo que se retarda la eliminación del virus y se incrementan los títulos virales (90, 91). Estos linfocitos T de memoria se detectaron luego de más de 20 años después de la infección primaria por DENV-1 o DENV- 2 (92).

2.6.4. Papel de las citoquinas en la patogenia de la infección por dengue

La liberación de citoquinas inflamatorias y de otros mediadores químicos está implicada en el incremento de la permeabilidad vascular en la FHD (93).

La IL-12 tiene un efecto marcado en la diferenciación hacia células Th1 (Th: Linfocito T auxiliador, del inglés *T helper cells*), mientras que su ausencia cambia el balance hacia la producción de citoquinas de tipo Th2 (94). En un estudio realizado para investigar el rol de esta citoquina en la inmunopatogenia, se encontraron niveles elevados de la misma en pacientes con FD, mientras que no se detectó la presencia de IL-12 en los los pacientes de FHD (95).

Las células T reguladoras también están implicadas en la severidad de la enfermedad (96), lo que se corresponde con el incremento en los niveles de IL-10 y de TGF- β observado en los pacientes con FHD (97, 98).

La IL-8 se asoció con el incremento de la severidad de la enfermedad y los casos fatales (99). Esta citoquina promueve la activación de los neutrófilos (100), que una vez activados participan en el daño endotelial a través de la liberación de proteínas como la elastasa. El TNF- α puede inducir directamente la muerte de las células endoteliales infectadas con el virus DEN y como consecuencia el daño endotelial y la hemorragia (101).

La IL-6 también se encontró en cantidades elevadas en los pacientes que desarrollan FHD/SCD (102) y se demostró que ésta puede incrementar la permeabilidad de las células endoteliales(103). Las células dendríticas maduras que median la ADA secretan cantidades elevadas de IL-6 y TNF- α (104).

2..7. Diagnóstico

El diagnóstico de laboratorio del virus dengue puede realizarse a través del aislamiento del virus, la detección del genoma, de antígenos virales, y anticuerpos a estos antígenos.

La serología, es la más ampliamente aplicada en el diagnóstico y en la vigilancia sero-epidemiológica (105).

El aislamiento del virus suele realizarse a partir de los sueros colectados en la fase aguda de la enfermedad o de los tejidos (hígado, bazo, linfonodos, pulmón o timo) obtenidos de la necropsia. Para el aislamiento se inocula la muestra en líneas celulares de mosquito o por inoculación directa en el mosquito y líneas celulares de mamíferos con alta sensibilidad. La inoculación intracerebral en ratones lactantes es el método más antiguo y menos sensible para el aislamiento viral. Un ensayo de inmunofluorescencia (IF) con anticuerpos serotipo-específicos permite la identificación del virus. La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) o el ensayo inmunoenzimático tipo ELISA también pueden ser empleados (106).

Detección de antígeno: Se ha demostrado que la detección de la proteína NS1 mediante técnicas de ELISA puede emplearse como un marcador de diagnóstico durante la fase temprana de la infección. Por otro lado, las técnicas inmunohistoquímicas son útiles para la detección del antígeno en las muestras de tejido de los casos fatales (107).

Detección del Genoma: Mediante el uso de la RCP puede detectarse el ARN viral directamente de muestras clínicas como: el suero, el plasma, o los tejidos. En la actualidad la RCP en tiempo real está sustituyendo a la RCP convencional por su elevada sensibilidad y rapidez (108, 109).

Diagnóstico serológico: Durante una infección primaria del virus, los anticuerpos IgM se detectan 5 a 6 días después del inicio de la fiebre, y persisten entre 30 y 60 días. La IgG se hace detectable al noveno a décimo día después del inicio de la fiebre. Por el contrario, en una infección secundaria, hay un rápido aumento de la IgG (1 o 2 días después del inicio de la fiebre) (110). Para definir serológicamente el serotipo infectante es necesario determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes por un ensayo de reducción del número de placas (110).

2.8. Vacunas

La obtención de una vacuna contra el dengue enfrenta algunos obstáculos, entre ellos esta la falta de un modelo animal que desarrolle la enfermedad como el humano para evaluar la protección, la dificultad en lograr una respuesta balanceada de inmunogenicidad a los 4 serotipos y el correlato de protección aún no establecido (111).

Una vacuna ideal para esta enfermedad debería tener las siguientes características: contener los 4 serotipos del virus, tener un buen perfil de seguridad, y una respuesta balanceada de inmunogenicidad (para los 4 serotipos) y de reactogenicidad. Esquema de inmunización corto (ej. 1 ó 2 - dosis de vacuna a intervalos breves) que hiciera práctica su utilización, incluso para el control de brotes. Debe ofrecer una protección duradera, y ser de fácil aplicación, transporte y almacenamiento. Accesibilidad en costos para su implementación y sustentabilidad en calendarios nacionales de vacunación (111).

De un modo general, los esfuerzos actuales en investigaciones en vacunas contra el dengue se han enfocado principalmente en los modelos de vacunas vivas atenuadas, inactivadas y a sub-unidades (112).

El candidato en desarrollo que se encuentra en etapa más avanzada está basado en la quimerización del virus vacunal atenuado contra la fiebre amarilla (cepa 17D) al cual se le insertan genes que codifican proteínas del virus salvaje del dengue. Actualmente esta vacuna completó la fase I de investigación clínica en EEUU, Australia, Asia y América Latina y se están llevando a cabo diversos estudios fase II en poblaciones endémicas de diversos países de Asia y América Latina, tanto en adultos, adolescentes y niños desde los 12 meses a los 45 años de edad con un esquema de 3 dosis, por vía subcutánea. Los resultados en cuanto a seguridad y seroconversión obtenidos hasta la fecha, respaldan la continuación del programa de desarrollo de esta vacuna y la preparación para iniciar estudios fase III de eficacia en 2011 en varios países endémicos de América Latina y Asia (111).

La estrategia desarrollada por investigadores cubanos se basa en el desarrollo de una vacuna de sub-unidades, que contiene la proteína de fusión del DIII de la envoltura y la cápsida del DENV-2, expresadas en *E. coli*. Los estudios realizados hasta el momento de las variantes evaluadas en distintos modelos animales muestran resultados alentadores en cuanto a una respuesta inmunológica tanto humoral como celular (112).

2.9. Tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos

2.9.1. Características fundamentales de los fagos filamentosos

Los fagos filamentosos (M13, fd, f1) son partículas largas, de aspecto filamentosas con un peso molecular de 12×10^6 Da. Su genoma está compuesto por una molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) circular de simple cadena, que tiene una longitud de alrededor de 6 400 nucleótidos e incluye 9 genes que codifican para diez proteínas, debido a que uno de sus genes, el 2, codifica para dos proteínas: la PII y la PX. Estas proteínas se clasifican en tres grupos: las de la cápsida (PIII, PVI, PVII, PVIII y PIX), las que participan en la replicación (PII, PV y PX) y las que intervienen en la morfogénesis (PI y PIV). La molécula de ADN está rodeada por una cubierta proteica de 6 a 10 nm de diámetro y 900 nm de largo, formada por, aproximadamente, 2 700 copias de la proteína mayoritaria PVIII y 5 copias de cada una de las proteínas minoritarias, agrupándose PIII y PVI en un extremo y PVII y PIX en el otro. La partícula viral no contiene lípidos ni carbohidratos (113).

Los fagos filamentosos infectan bacterias Gram negativas, que expresan el pili F en la superficie celular. Estos bacteriófagos coexisten con el hospedero en un estado permanente de infección y no producen la lisis o muerte de la célula hospedera, la cual, una vez infectada, permanece aparentemente intacta, aunque su crecimiento se retarda con respecto a células no infectadas (113).

2.9.2. Exposición de bibliotecas de péptidos en fagos filamentosos

El desarrollo de la tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos se basa en la capacidad de estos fagos de exponer en su superficie secuencias peptídicas foráneas fusionadas a las proteínas de la cápsida viral. La secuencia nucleotídica correspondiente a estos péptidos se inserta dentro del gen que codifica para alguna proteína de la cápsida del fago y de esta forma se expone el péptido de interés en la superficie viral. Si se insertan oligonucleótidos sintetizados al azar, las partículas virales que se obtienen exponen una biblioteca de péptidos, formada, al menos en teoría, por todas las combinaciones posibles de aminoácidos que pueden darse para una talla determinada de los péptidos (114). Las proteínas virales más empleadas con este propósito han sido PIII y PVIII (115) aunque se han reportado como fusión a la PVI (116).

Las secuencias peptídicas expuestas en la superficie de las partículas virales son fácilmente accesibles y potencialmente capaces de unirse de manera específica a los anticuerpos (monoclonales o policlonales), receptores, enzimas, células, etc. y por lo tanto pueden ser seleccionados sobre la base de dicha afinidad. La secuencia de un péptido de una biblioteca escogido por una determinada propiedad, puede ser fácilmente deducida de la secuencia nucleotídica del fago que lo expone (18, 117-119). De ahí que las bibliotecas de péptidos expuestos en fagos filamentosos constituyan una fuente de ligandos peptídicos con diferentes actividades biológicas (31, 114).

Para péptidos pequeños (hasta seis a.a) se emplean fagos recombinantes, o sea fagos que exponen todas las copias de PIII o PVIII con un péptido foráneo fusionado. Para péptidos mayores es necesario utilizar partículas híbridas, en las cuales la cápsida viral está formada por una mezcla de PIII o PVIII nativas y recombinantes (115). Las estructuras peptídicas expuestas en fagos pueden ser lineales o cíclicas (115). La ciclización de los péptidos se lleva a cabo incluyendo cisteínas en diferentes regiones de

las secuencias de interés con el objetivo de formar puentes disulfuros y de esta manera el péptido es presentado en forma de lazo (120). También se han construido bibliotecas de péptidos restringidos conformacionalmente insertando las estructuras peptídicas de interés dentro de la secuencia de una proteína cuya conformación sea restringida, de manera que funcionen como un andamiaje que limite el número de conformaciones que pueda adoptar dicho péptido (121).

2.9.3. Aplicaciones de la tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos para el diseño de vacunas y como herramienta de diagnóstico

La tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos para el desarrollo de vacunas tiene un amplio rango de aplicaciones incluyendo el uso directo de los fagos como inmunógenos, la identificación de mimotopos y la especificidad antigénica de las células T (122).

Estudios de inmunogenicidad en diferentes modelos animales, empleando fagos portadores de mimotopos, han demostrado la generación de respuesta inmune específica contra la secuencia peptídica expuesta en el fago (28, 123). Una de las aplicaciones más importante de la tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos es la identificación de péptidos que actúen como miméticos inmunogénicos y sean capaces de inducir una respuesta de anticuerpos “*in vivo*” similar o idéntica a la utilizada para la selección del mimotopo(32).

La capacidad de un péptido de simular el comportamiento de un antígeno natural debe considerarse en dos niveles: simulación antigénica y simulación inmunogénica. Un péptido tiene la propiedad de simulación antigénica cuando es capaz de interactuar específicamente con el sitio de unión funcional al antígeno presente en el anticuerpo (paratopo) y de competir con el antígeno natural por su unión. Esto es lo que permite que un péptido de una biblioteca sea seleccionado con un anticuerpo determinado. Un

péptido tiene la propiedad de simulación inmunogénico cuando adicionalmente simula o mimetiza el comportamiento inmunológico del antígeno original, denominándose entonces mimotopo inmunogénico. Esta condición es necesaria cuando la finalidad del trabajo es la utilización del péptido identificado como un candidato vacunal (124, 125). Aunque muchos de los trabajos publicados describen la selección de mimotopos empleando AcM (19), los anticuerpos policlonales provenientes del suero de pacientes también han sido empleados exitosamente para identificar mimotopos de agentes etiológicos involucrados en el desarrollo de una enfermedad (30) y posteriormente evaluar la inmunogenicidad de los mismos, ya sea en el ambiente del fago o utilizando derivados sintéticos de la secuencia expuesta en el mismo (126).

Los péptidos mimotopos han sido objeto de estudios intensos en la búsqueda de nuevas herramientas para el diagnóstico (31). Diversos formatos de péptidos sintéticos o como estructuras peptídicas presentados sobre la superficie de los fagos han resultado útiles para evaluar esta aplicación (26, 29, 127). El uso de los fagos presenta como principal ventaja que el proceso de producción es muy rápido, barato y reproducible. Las estructuras peptídicas expuestas en fagos filamentosos son estables con una elevada especificidad y sensibilidad por el anticuerpo de interés. Es por eso que la posibilidad de utilizar los fagos directamente como herramientas para el diagnóstico, expande la disponibilidad de un mayor número y diversidad de moléculas (128).

De igual forma, se han empleado los péptidos aislados por la tecnología de presentación sobre fagos filamentosos como una fuente alternativa de antígenos en inmunoensayos en fase sólida tipo ELISA (123). Los péptidos sintéticos tienen generalmente como inconveniente el tamaño pequeño, lo cual trae aparejado una pobre capacidad de adherirse a las superficies sólidas resultando ineficaces. Para evaluar su utilidad como herramienta diagnóstica muchos de ellos se han fusionado a moléculas proteicas

portadoras (129) o se ha recomendado su uso como MAP (Sistema de péptidos de múltiples antígenos - del inglés- *Multi Antigen Peptide*). Los MAP están formados por un núcleo ramificado sobre el que se sintetizan copias del péptido correspondiente. De esta forma se convierten en antígenos útiles para inmunoensayos en fase sólida y mantienen su capacidad de unión mejorando la sensibilidad del método diagnóstico (130).

2.10. La tecnología de presentación o exposición de péptidos en fagos filamentosos en virus dengue

La tecnología de presentación o exposición de péptidos en fagos filamentosos ha permitido la identificación o selección de secuencias de péptidos que mimetizan epítomos del virus dengue. Existen dos estrategias experimentales para este fin, emplear como fuente de anticuerpos, AcM dirigidos contra algún antígeno de interés o sueros de individuos con una determinada enfermedad (126).

Los primeros acercamientos en dengue fueron para el mapeo epitópico de cuatro AcM específicos de serotipos, [15 F-3 (DENV-1), 3H5-1 (DENV-2), 5D4-11 (DENV-3), 1H10-6 (DENV-4)]. Después de tres pasos de selección, se aislaron 24 clones reactivos al AcM 15F3. En el 45 % de ellos se obtuvo la secuencia -HRYSWK- que corresponde a los residuos 111 -116 de la proteína NS1. Esta misma secuencia en un formato de MAP de ocho ramas mostró ser específico de serotipo DENV- 1 en un ensayo de competencia tipo ELISA (131).

En un segundo estudio, el AcM 15F3 DENV-1 se enfrentó a una biblioteca de 12 aminoácidos. En esta ocasión se confirmó que la secuencia motivo se localiza entre los residuos 111 y 116 de la proteína NS1, es serotipo específico 1, y además resultó capaz de detectar anticuerpos en 20 muestras de pacientes confirmados con enfermedad del dengue. Adicionalmente, se demostró que la presencia de una histidina en la posición 111 de esta región influye en la actividad de unión al anticuerpo (23).

En el año 2003 y por el mismo grupo de investigadores, se obtuvo un nuevo AcM contra DENV- 2, denominado D216-1Ab 4. El Ab4 demostró reconocer la proteína NS1 por ELISA, IF y análisis de inmunodetección y ser específica de serotipo 2. El mapeo epitópico del Ab4 con una biblioteca resultó que reconocía un nuevo epitopo de la proteína NS1 y reveló una vez más que, el residuo de histidina es responsable de la unión con el anticuerpo. Este epítopo, en forma de péptido MAP de ocho cadenas, compitió con el antígeno NS1 del virus DENV-2 y también reconoció muestras de sueros de animales previamente inmunizados con el virus dengue serotipo 2. Este mismo péptido no reaccionó con los restantes serotipos del virus dengue (24).

En una investigación reciente, se seleccionaron siete epítomos de células B de la proteína NS1 usando un suero policlonal obtenido tras la inmunización de conejos Nueva Zelanda con la proteína recombinante NS1 de DENV-2. En esa ocasión, con el uso de herramientas bioinformáticas se seleccionaron dos secuencias, denominadas PA10 y AA10, específicas del serotipo 2 que además resultaron ser capaces de competir con porcentos de inhibición desde 22 a 55 % (132).

La proteína NS1 ha sido uno de los blancos más analizados, empleando AcM y algunos de los péptidos identificados están en uso de forma exitosa, como herramienta de diagnóstico para la detección de anticuerpos (23).

Por otra parte, varios trabajos se han centrado, naturalmente, en la proteína E la cual porta los principales determinantes antigénicos del virus. Para la identificación de epítomos se han utilizado AcMs obtenidos contra esta proteína y que son serotipo-específicos (13, 133)

Thullier y colaboradores en el año 2001 (134) utilizando el AcM 4 E11, obtenido contra DENV-3, seleccionaron fagotopos (bacteriófagos que exponen un epítopo) a partir de dos bibliotecas de 9 a.a expuestas en pVIII, una de las cuales era una biblioteca de insertos constreñidos. Los fagos seleccionados comparten tres de los nueve a.a entre el

residuo 306-314 de la secuencia de la proteína E. El clon del fago, C1 mostró la reactividad más elevada frente al AcM 4E11, al igual que el péptido sintético derivado de dicho fago. Por otro lado, el C1 fue capaz de inducir una respuesta de anticuerpos en ratones que, aunque no resultó capaz de neutralizar a los cuatro serotipos del dengue, sí bloqueó la entrada del virus del dengue a la célula vía receptor heparan sulfato.

De los múltiples AcMs anti-proteína E, dos neutralizantes y específicos a DENV-1 (DA67 y DA11 13), fueron directamente adsorbidos sobre una superficie sólida y sometidos a un proceso de selección con una biblioteca de péptidos de 12 a.a. En el primer caso, con el AcM DA67 se seleccionaron 15 clones de fagos y con el segundo, el DA11 13 reaccionaron 36 clones, que a sus vez inhibieron la unión de la proteína E con sus respectivos AcM. Los clones inmuno-reactivos reconocieron la presencia de anticuerpos en ocho muestras de sueros de paciente confirmados positivos de infección por DENV-1, sin embargo estos mismos clones no fueron capaces de reconocer muestras positivas al DENV- 2 (25).

El AcM anti-E H3-6, reconoce los 4 serotipos del virus dengue, y ha resultado útil para el diagnóstico y la investigación (11). En este sentido se han desarrollado estudios en la selección de fragmentos de antígenos virales utilizando una biblioteca de péptidos aleatoria y el AcM H3-6, como molécula selectora. Después de varios ciclos de selección por afinidad e inmuno-identificación se seleccionaron 9 clones de fagos reconocidos por el H3-6. El análisis de las secuencias peptídicas presentadas sobre los fagos evidenció la existencia de similitudes que condujeron a la identificación de secuencias consenso que podrían mediar la interacción con el anticuerpo (Comunicación Personal Dra. Maritza Pupo, Instituto de Medicina Tropical “IPK”, 2012).

La presencia de secuencias de la proteína prM de dengue en las futuras vacunas es interesante, por la alta reactividad cruzada y la ADA en este caso específicos a prM que se encuentran en la respuesta inmune anti-dengue en humanos (135).

El AcM anti- prM 70-21, que reconoce a todos los serotipos del complejo dengue, es no neutralizante y amplificador de la infección por virus dengue. El mapeo del epítipo reconocido por el AcM 70-21 usando una biblioteca de 7 a.a dió como resultado diez clones de fagos con una significativa unión al AcM. Los anti-sueros de los ratones inmunizados mostraron ADA en células BHK- 21 y el péptido sintético del fago seleccionado fue reconocido por un número importante de muestras de suero de pacientes con la forma severa de la enfermedad (136).

Una biblioteca de anticuerpos tipo Fab humano dirigida contra los cuatro serotipos del virus dengue, permitió aislar al anticuerpo D29 que presentó amplia eactividad cruzada, prM específica. Este anticuerpo es capaz de restaurar la capacidad de infección de las partículas virales inmaduras (imDENV) y no infecciosas en células K562. Una biblioteca de 12 a.a se empleó para realizar el mapeo epitópico del D29-Fab. Sorprendentemente, D29 reconoce dos epítipos (P3 y P9), un epítipo accesible en prM como el epítipo de unión principal, y un epítipo críptico sobre la proteína E situado en la unión de los dominios antígenicos DI / DII, que imita el epítipo prM y aunque inaccesible a la unión de anticuerpos en una partícula de virus nativo, puede llegar a ser expuesto si la proteína E no está correctamente plegada. Ambos epítipos son altamente conservados a través de los cuatro serotipos virales, así como en otros dos flavivirus, virus de la Encefalitis Japonesa (VEJ) y el virus del Nilo Occidental (VNO); pero presenta divergencias en el virus de la Fiebre Amarilla y virus de la encefalitis transmitida por garrapatas. Estos hallazgos sugieren que la generación de anticuerpos anti-prM que amplifiquen la infección por el virus no puede evitarse por completo, incluso con las estrategias de inmunización que emplean la proteína E completa o subunidades de la misma (33).

En la búsqueda de nuevas herramientas para el estudio de los procesos involucrados en el mecanismo de replicación del virus dengue así como para el desarrollo de alternativas para el diagnóstico, se han obtenido AcMs contra proteínas no estructurales como la NS3

(137). Se identificó un epítopo de células B utilizando una biblioteca de 7 a.a expuesta en fagos y el AcM neutralizante 4F5, desarrollado contra la proteína NS3 del DENV-2. Los resultados de los trece clones seleccionados indicaron que el péptido se encuentra entre los residuos 460 a 469 (U460-469 RVGRNPKNEN) de la proteína NS3 de DENV-2. El ensayo de inhibición competitiva con el antígeno viral, reveló la especificidad del epítopo identificado. La inmunización con el péptido sintético provocó un alto nivel de anticuerpos en ratones BALB/c, y la IF mostró que dicha respuesta es específica (138). Los AcM obtenidos contra el virus dengue han sido los de mayor atención para la identificación y caracterización de determinantes antigénicos de proteínas virales diversas mediante pesquisas de bibliotecas de péptidos. Estos resultados han permitido contar con nuevos y valiosos péptidos que pueden tener varias aplicaciones entre las que se incluyen el diseño de candidatos vacunales, el desarrollo de reactivos de diagnóstico, el diseño de moléculas que actúen como antivirales importantes y el estudio de la patogénesis (23, 134). También los mimotopos han irrumpido en otros campos de la investigación como la biología del fenómeno de ADA (136).

2.11. Péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos son una elección atractiva para reemplazar antígenos virales en el diseño de candidatos vacunales y para el desarrollo de ensayos de diagnóstico (17, 139).

Las vacunas mayoritariamente aprobadas para su uso en humanos se obtienen de manera convencional, y consisten en el agente infeccioso muerto o atenuado. Una alternativa a las vacunas convencionales pudiera ser el uso de las vacunas de subunidades, específicamente las basadas en péptidos sintéticos. Este tipo de vacuna tiene tres ventajas fundamentales sobre las vacunas convencionales: (I) son seguras debido a su naturaleza no replicativa, (II) presentan alta pureza y una estructura definida y (III) son resistentes a la desnaturalización y por tanto, pueden ser almacenadas y transportadas sin necesidad

de refrigeración. Entre sus desventajas están: que necesitan de adyuvantes para inducir una respuesta inmune óptima lo que puede incrementar la reactogenicidad, y se requieren múltiples dosis para lograr una inmunidad de larga duración (140).

Diversas estrategias han sido desarrolladas para mejorar la inmunogenicidad de los péptidos y obtener respuestas de anticuerpos neutralizantes, así como protectoras, entre las que se encuentran: la conjugación de péptidos a proteínas portadoras (141), y la formulación MAP al emplearlos como inmunógenos (142).

Tradicionalmente las vacunas se han diseñado para inducir respuestas de anticuerpos, con altos títulos circulantes contra el patógeno de interés. Con los nuevos conocimientos de la interacción hospedero-patógeno, se ha hecho evidente que la inducción de la rama celular de la respuesta inmune es crucial para la eficacia de las vacunas contra patógenos intracelulares y así proporcionar la ayuda adecuada para la inducción de anticuerpos. Una de las actuales estrategias en el diseño de las vacunas peptídicas y así mejorar su inmunogenicidad se concentra en la incorporación de epítomos de células T a los candidatos peptídicos o la fusión entre ambos tipos de epítomos B y T(143).

Se han evaluado numerosas formulaciones que con el objetivo de inducir protección contra inmunógenos peptídicos se coadmisnitran con adyuvantes (144, 145). Los adyuvantes aumentan la amplitud y profundidad de la respuesta inmunológica de péptidos débilmente inmunogénicos. Sin embargo pocos adyuvantes están autorizados para su uso en humanos (146).

Otra opción para incrementar la inmunogenicidad es la incorporación de péptidos a liposomas, el uso de la forma lipidada de los inmunógenos peptídicos y la encapsulación de los inmunógenos peptídicos en microesferas de polímero. Estas variantes de péptidos pueden provocar respuestas inmunes tanto humorales como celulares (147 -149).

El aumento de la longitud del péptido puede ser otro aspecto a considerar en el contexto de la inmunidad protectora (150).

Los péptidos sintéticos son altamente valiosos por su especificidad y sensibilidad en ensayos inmunoenzimáticos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas virales y algunos de ellos están siendo utilizados con este fin de forma exitosa (151-153). Entre las principales ventajas de los péptidos sintéticos como sustitutos de antígenos para el diagnóstico son la simplicidad de su empleo, seguros, químicamente bien definidos, y baratos (149).

En los finales de la década de los 80 surgieron las construcciones MAP (154). Este sistema de péptidos posee una serie de ventajas, ya que presentan múltiples sitios de contacto y por tanto aumenta la superficie de unión a la fase sólida y brinda una unión más fuerte con el anticuerpo, incrementando las propiedades antigénicas e inmunogénicas del péptido (130). El uso de MAP como antígenos para inmunoensayos en fase sólida, es una herramienta prometedora para el diagnóstico serológico en los individuos vacunados o infectados naturalmente. Mejora la detección precoz de anticuerpos de baja afinidad, tales como los de isotipo IgM, durante la fase temprana de las infecciones (155).

2.11.1 Empleo de los péptidos en dengue.

Las proteínas no estructurales NS1 y NS3 del virus del dengue están involucradas en la respuesta inmune durante la infección natural en el hombre. En un trabajo publicado por García y colaboradores en 1997 (156), se observó el reconocimiento por parte de sueros de pacientes con infección primaria y secundaria a cinco péptidos de la proteína no estructural NS1 y un péptido de NS3 del DENV-4, lo que sugiere que estos epítomos se encuentran expuestos durante la infección natural por dengue.

A partir de este estudio, un grupo de 15 péptidos sintéticos de epítomos de células B de la proteína NS1, pero del DENV-2, se analizaron mediante ELISA y se demostró la presencia de respuesta de anticuerpos a estos péptidos en sueros de pacientes con antecedentes de infección por virus dengue y el VEJ. El péptido correspondiente a los

primeros 15 a.a, resultó inmunodominante reaccionando solamente con sueros de FD y fue negativo frente a los sueros de los pacientes con VEJ. Anticuerpos contra los cuatro serotipos reaccionan con el péptido seleccionado como inmunodominante y pueden ser detectados tan pronto como a los dos días del comienzo de los síntomas de la enfermedad. En este propio estudio se demostró un reconocimiento cercano al 45% en muestras de pacientes con infección primaria, secundaria y con la forma severa de la enfermedad (157).

Anandarao y colaboradores en el año 2005, identificaron péptidos de las proteínas C y NS4A del serotipo 2 del virus dengue, empleando programas para la predicción de epítomos B. Se sintetizó un total de 90 péptidos que reaccionaron con los LAH del serotipo homólogo; pero no reaccionaron con los desarrollados a otros flavivirus como Fiebre amarilla y VEJ. Las construcciones ensayadas de ambas proteínas mostraron reactividad positiva con muestras de sueros de pacientes con historia de infección por dengue. Estos resultados constituyen la primera evidencia de la presencia de anticuerpos contra NS4A en muestras humanas de pacientes con historia de dengue (8).

El dominio III de la proteína E es inductor de una respuesta de anticuerpos neutralizantes específica de serotipo, la identificación de epítomos, que sean reconocidos por el sistema inmune del hospedero y sean capaces de inducir una respuesta inmune protectora es un paso primordial en la obtención de un candidato vacunal. En este sentido, Amexis y colaboradores en el 2007 (158) identificaron epítomos de células B con potencialidad antigénica empleando métodos computacionales de predicción. Se diseñaron 11 péptidos tipo MAP y dos de ellos se conjugaron a KLH (hemocianina de lapa, del-inglés- *Keyhole limpet hemocyanin*). Los ratones inmunizados con estas formulaciones indujeron anticuerpos anti-péptidos y de ellos sólo 7 mostraron títulos neutralizantes serotipo-específico, comparables con los encontrados al estudiar otros candidatos vacunales, ya sean de tipo atenuado o recombinante.

En el año 2009, con la aplicación de los métodos computacionales para la identificación de epítomos, se diseñaron 95 construcciones peptídicas de la proteína E del DENV-3, de las cuales once reaccionaron con una mezcla de sueros de pacientes con historia de infección de DENV-3, y tres de estos péptidos reconocieron los sueros correspondientes a los serotipos DENV-1 y DENV-2. Estudios con el serotipo DENV-4 no fueron incluidos al no existir disponibilidad de muestras de este serotipo. La evaluación de 5 variantes de péptidos en ratones indujo una respuesta de anticuerpos neutralizantes y respuesta de células T específica a los cuatro serotipos (159).

Otros autores desarrollaron péptidos que contenían el dominio III de la proteína E del DENV-2 acoplados a KLH. Los anticuerpos inducidos por estos péptidos protegieron a los ratones frente al reto viral homólogo y originaron anticuerpos neutralizantes además de inducir una marcada respuesta mediada por células (160).

Numerosos hallazgos han demostrado que la proteína prM no sólo juega un papel crítico en el ensamblaje y la maduración del virión, sino que también participa en el fenómeno de la ADA (79). Un análisis de predicción de regiones antigénicas para células B y epítomos de células T de la proteína prM obtuvo tres secuencias aminoacídicas de interés. Utilizando como base dichas secuencias se sintetizaron 5 péptidos, 4 correspondientes al segmento pr y un último a la proteína M. La respuesta de anticuerpos anti-péptido en suero de ratones inmunizados mostró altos títulos. Adicionalmente dichos péptidos, enfrentados a un panel de 118 muestras de suero de pacientes, brindaron porcentajes de positividad entre un 50 a 80 %. Dos de los péptidos presentaron capacidad neutralizante y se detectó una respuesta linfoproliferativa significativa al virus dengue en los linfocitos de ratones inmunizados con los mismos (161).

Se describen epítomos T a lo largo de toda la poliproteína de los virus del dengue. Recientemente, 22 epítomos de células T con una alta afinidad por alelos HLA –del

inglés- *human leucocyte antigen*- de clase I (H-2Kd, H-2dd, alelos H-2LD) o de clase II (alelos IAD) y conservados entre los cuatro serotipos del virus, fueron predichos a partir de secuencias de la poliproteína del virus de dengue. Algunos de estos epítomos se identificaron en las siguientes proteínas: NS5: 7, E: 5, NS4A: 4, NS3: 2 y uno de NS1, NS2B y NS4B. Los ratones inmunizados con estos candidatos desarrollaron una respuesta elevada de anticuerpos tipo IgG. De los 5 péptidos correspondientes a la proteína E solo uno presentó actividad neutralizante. Nueve péptidos indujeron una respuesta celular de linfocitos T CD4 + y CD8 + (162).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Medios de cultivos y soluciones

Medio de Crecimiento: Medio Mínimo Esencial (MEM, Gibco, EUA), suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (100X), 2mM de glutamina, antibióticos (penicilina 100 UI/mL y estreptomycin 100 µg/mL) y 10 % de suero fetal bovino inactivado (SFBI) por calor (30 min. a 56°C).

Medio de Mantenimiento: Medio de crecimiento con 2 % de SFBI

Medio de cultivo líquido Luria Bertani (LB): 5 g/L de cloruro de sodio, 16 g/L triptona, 10 g/L de extracto de levadura, pH 7,0-7,5.

Medio de cultivo sólido LB: medio líquido de cultivo LB con agar bacteriológico, 15 g/L.

SSTF: solución salina tamponada por fosfato compuesta por cloruro de sodio 140 mmol/L, cloruro de potasio 2,6 mmol/L, dihidrógeno fosfato de potasio 1,5 mmol/L, hidrógeno fosfato de sodio 8,5 mmol/L, pH 7,4.

Solución de recubrimiento: 35 mM NaHCO₃, Na₂CO₃ 14 mM pH 9.6.

Solución fosfato-citrato: ácido cítrico 24 mmol/L, hidrógeno fosfato de sodio 53 mmol/L, pH 5,5.

Solución sustrato: 500 µg/mL de ortofenilendiamina (OPD) y 0,015% de peróxido de hidrógeno diluidos en solución fosfato-citrato.

3.2 Líneas celulares

C6/36 HT: células de mosquito *Aedes albopictus*, obtenida a partir de la línea celular C6/36 y donada al Laboratorio de Cultivo de Células, del Departamento de Virología, del Instituto de Medicina Tropical, IPK por el Dr. Javier Díaz (Laboratorio

Departamental de Medellín, Colombia). Las células se mantuvieron en medio de crecimiento a 33°C en atmósfera de CO₂ al 5 %, a una razón de pase semanal de 1:6.

3.3. Microorganismos

Fago filamentoso salvaje M13 K07 (Pharmacia, Suecia).

Cepa de *Echerichia coli* TG1 (K12_(*lac-pro*), *supE*, *thi*, *hsdD5/F'* *traD36*, *proA+B+*, *lacI^q*, *lacZ_M15* (Pharmacia, Suecia)

Clon de fago # 50 obtenido de una selección con el AcM H3-6 y una biblioteca lineal de péptidos fusionados a la proteína pVIII de la cápsida del fago.

Cepa 116/00 correspondiente al serotipo 3 del virus dengue, con las siguientes características: historia de cinco pases en células C6/36 HT (5p C636) y un pase en células Vero (1p Vero) con título de $1,2 \times 10^5$ unidades formadoras de placas (UFP) UFP/mL determinado por el método de placas (163). Esta cepa se aisló durante el brote epidémico de DENV-3 del año 2000 (75).

3.4. Anticuerpos

AcM de ratón H3-6 que reconoce a los cuatro serotipos del virus dengue, del Laboratorio de Arbovirus, del Departamento de Virología, del IPK. El AcM H3-6 fue purificado por cromatografía de afinidad utilizando una columna de proteína A acoplada a Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia-170974-01) y se procedió a su concentración utilizando un equipo de ultrafiltración Centriprep Centrifugal Filter Devices con membrana YM-10 y resulto en una concentración de 1,10 mg/mL.

El suero policlonal dirigido contra la proteína NS4B fusionada a Glutation S transferasa (GST), obtenido en conejos raza Nueva Zelanda fue donado por el Dr. Ralf Bartenschlager, del Departamento de Virología Molecular, Universidad de Heidelberg, Alemania (164).

LAH producidos en ratones BALB/c contra los cuatro serotipos del dengue: DENV-1, DENV- 2, DENV-3, DENV-4. Se incluyó también el virus de la encefalitis equina del este (EEE), VNO y un Líquido ascítico negativo (LAN), como control. Todos los LAH se obtuvieron en el Laboratorio de Producción del Departamento de Virología del IPK.

3.5. Biblioteca J404 de péptidos expuestos en fagos filamentosos.

Se utilizó una biblioteca de péptidos expresada en fagos filamentosos (J404) derivada del vector M13mp18, donada por el Dr. Jim Burrit (Universidad del Estado de Montana, Estados Unidos). Esta es una biblioteca lineal de péptidos al azar que contiene 5×10^8 fagos únicos, donde cada uno expresa una secuencia nonapeptídica diferente fusionada al extremo amino-terminal de la proteína pIII de la cápsida del fago. La biblioteca J404 tiene la ventaja que presenta muchas copias de la forma replicativa, y un gen de resistencia a la kanamicina que permite la selección de las colonias de *E.coli* infectadas por el fago (165).

3.6. Péptidos.

Péptido E: Péptido lineal de 9 a.a, que contiene la secuencia aminoacídica del clon de fago # 50 obtenido de una selección con el AcM H3-6 y una biblioteca lineal de péptidos fusionados a la proteína pVIII de la cápsida del fago. Este péptido pertenece al Laboratorio de Arbovirus del Departamento de Virología del IPK.

MAP 46-56: MAP no relacionado utilizado como control negativo. MAP heterodimérico de cuatro ramificaciones que contiene la secuencia de los mimotopos del Virus de la Hepatitis A (VHA) (166).

3.7. Aspectos éticos de la investigación

Todo el procedimiento experimental que se expone en el presente trabajo se ha formulado en Proyectos de Investigación aprobados por el Comité de Ética del IPK, que actúa en conformidad con las leyes y reglamentos vigentes dictados por el MINSAP y el CITMA, el cual contempla los principios enunciados en la Declaración de Helsinki de la

Asociación Médica Mundial para las investigaciones médicas en humanos (167). Se respetó la confidencialidad de la información de los individuos estudiados, y las muestras obtenidas sólo se utilizaron en las investigaciones para las cuales se previeron originalmente. Se muestra en la sección de Anexos (Anexo # II) el modelo de consentimiento informado del estudio.

3.8. Muestras serológicas para la selección y evaluación del mimotopo.

Para este estudio se utilizaron muestras de sueros pertenecientes al Banco de Sueros del laboratorio de Arbovirus, del Departamento de Virología del IPK, Habana, Cuba. Todas las muestras se colectaron de adultos. La confirmación del diagnóstico se realizó mediante la detección de anticuerpos IgM anti-DEN.

Para el paso de selección e identificación se emplearon muestras de sueros positivas a la presencia de anticuerpos anti-dengue 3, clasificados como sueros primarios.

Los sueros utilizados para la evaluación del mimotopo se agruparon de la forma siguiente:

Grupo A: 28 muestras de sueros colectados entre el 5to y 7mo día de comienzo de la fiebre, de individuos inmunes al serotipo DENV-1 (n = 10), DENV-3 (n = 10) y DENV-4 (n = 8), los cuales se utilizaron para probar la especificidad del mimotopo.

Grupo B: 20 muestras de sueros obtenidas entre el 5to y 7mo día de comienzo de la fiebre, de ellas 10 clasificadas como infección primaria y 10 como infección secundaria.

Grupo C: Sueros colectados durante la fase convaleciente, 2 meses posteriores del inicio de los síntomas, con previa clasificación de los mismos en primarios (13) y secundarios (15).

Ambos grupos de muestras (B y C) pertenecen a individuos con una infección confirmada por el virus dengue durante la epidemia de DENV-3 ocurrida en el 2001-2002 (75).

La clasificación de la infección en primaria o secundaria de los sueros de pacientes convalecientes de dengue se realizó mediante el Método de ELISA de Inhibición (MEI) desarrollado en el Laboratorio de Arbovirus del IPK (168)

Toda muestra de suero con niveles de anticuerpos de tipo IgG anti-virus DEN, con un título ≥ 20 se consideró indicativo de una infección primaria y con un título de anticuerpos IgG anti-virus $\geq 1/1280$ se consideró como un caso de infección secundaria.

La presencia de anticuerpos neutralizantes a cada serotipo viral se detectó a través del ensayo de neutralización por reducción del número de placas (163).

Grupo D: Se utilizaron como controles negativos muestras de suero de adultos sanos del Banco Nacional de Sangre, con anticuerpos IgM negativos al virus dengue.

Para la detección de anticuerpos IgM se empleó la técnica de ELISA de captura de IgM y desarrollada en el laboratorio de Arbovirus del IPK(169).

3.9. Selección por afinidad.

La metodología seguida para identificar mimotopos del virus dengue empleando anticuerpos policlonales del suero es esencialmente similar a la descrita por Folgori y colaboradores en 1994 (22), con algunas modificaciones. Brevemente, microperlas magnéticas con 100 μL de un anticuerpo anti- IgG humana obtenido en ratón (MACS, Miltenyi Biotec, Reino Unido) se bloquearon con SSTF/0.1% Albúmina Bovina Sérica (ABS) durante toda la noche a 4°C agitándose suavemente. Después del bloqueo, las microperlas magnéticas se incubaron toda la noche a 4°C con 30 μL del suero (S982) positivo a anticuerpos contra el serotipo 3 del virus del dengue, y se unieron a una columna magnética (Magnetic cell separator MiniMACS, Miltenyi Biotec, Reino Unido). Las perlas se lavaron cuatro veces con SSTF /0.1% Tween 20. Posteriormente,

las microperlas se liberaron de la columna y se bloquearon con un exceso de partículas de fago M13K07 salvaje (tratado con luz ultravioleta) durante 4h a 4°C. A continuación, se incubaron con 10¹² unidades formadoras de colonia (UFC) de la biblioteca J404 toda la noche a 4°C, agitándose suavemente. Las perlas se aplicaron nuevamente a la columna magnética y se lavaron 6 veces con SSTF-T/0.1% Tween 20. Después del lavado, los fagos adsorbidos se eluyeron con 0.1 M de glicina HCl, pH 2.2 durante 10 minutos y el eluato se neutralizó de inmediato con Tris HCl 1M pH 9.1. Los fagos eluidos se amplificaron en células de *E. coli* cepa TG1. De los fagos se extrajeron 10 µL para realizar una titulación (170), brevemente, diluciones en base 10 del fago eluido se incubaron v/v con *E. coli* cepa TG1 en fase exponencial de crecimiento y se incubó durante 30 min a 37°C sin agitación, al cabo de este tiempo las bacterias infectadas con el fago se sembraron en placas que contenían LB sólido y kanamicina (75 µg/mL), se incubó a 37°C durante 16-24 h y las colonias se contaron.

3.9.1. Inmunoidentificación de colonias

Se realizó según Felici y colaboradores, en 1996 (171), se colocaron discos de membrana de nitrocelulosa durante 4h a temperatura ambiente (TA) sobre placas que contenían aproximadamente 100 colonias de *E. coli* TG1 infectadas con los fagos seleccionados. Las membranas se incubaron con SSTF/0.1% Nonidet P40 (N) v/v (SSTFN) y 5% leche descremada (SSTFN/M) por 2h a TA, cambiando la solución 4 veces. Un segundo suero (S219) positivo a anticuerpos contra el serotipo 3 del virus del dengue, dilución 1/50 en SSTFN/M se adsorbió por 2h a TA con extracto de *E. coli* TG1 y fago salvaje M13K07 tratado con luz ultravioleta. Dicho suero se añadió a los discos de nitrocelulosa y se incubó durante toda la noche a 4°C agitándose suavemente, seguido de 10 lavados con SSTFN. Las membranas lavadas se incubaron con un anticuerpo anti- IgG humano conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma - Aldrich, Reino Unido) a una dilución de 1:5000 en SSTFN/M durante 4h a 4°C. Posteriormente se lavaron con SSTFN y la

reacción se desarrolló por 5 minutos en presencia de nitroazul de tetrazolio/ 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/BCIP) (Pierce, Reino Unido).

3.9.2. Selección de fagos empleando ensayo de transferencia por ranuras (Slot-Blot).

El ensayo se realizó según lo descrito por Prezzi y colaboradores, en 1996 (28). Las colonias identificadas como positivas se inocularon en tubos que contenían 1 mL de medio LB líquido. Después de una incubación a 37°C durante toda la noche se centrifugó a 6000 g, durante 10 min. a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de cultivo con 1 mL de medio LB líquido, incubándose durante 20 min. a 70°C y centrifugado a 6000 g, 30 min. a 4°C. El sobrenadante de los clones de fago y M13K07 (control negativo) se titularon y su concentración se ajustó a 7.5×10^7 UFC/mL. Se aplicaron 50 μ L de cada muestra a una membrana de nitrocelulosa en un equipo de Slot-Blot. Las membranas se bloquearon con SSTFN/ M durante 2h a TA cambiando la solución 4 veces. Los pasos siguientes se llevaron a cabo según el procedimiento descrito en el acápite anterior, pero en este caso se emplearon tres sueros negativos a anticuerpos anti-DENV y tres positivos con altos niveles de anticuerpos totales contra el virus y diferentes a los dos empleados en los pasos anteriores.

3.10. Caracterización de la especificidad de los clones de fagos seleccionados

Cada clon de fago seleccionado se amplificó y purificó mediante precipitación con polietilenglicol 8000/NaCl (172). Los clones y el fago M13K07 salvaje (control) se titularon y su concentración se ajustó a 2.5×10^{12} UFC/mL para su posterior uso en los diferentes ensayos de caracterización.

3.10.1. Reactividad de los clones de fago frente a LAH

Para confirmar la reactividad específica con anticuerpos del virus del dengue, los clones de fagos seleccionados, se evaluaron con LAH contra los cuatro serotipos del dengue, VNO, virus de la EEE, y LAN como control, utilizando un ELISA descrito por Folgori y

colaboradores, en 1994 (22) con algunas modificaciones. Brevemente, las placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc, Reino Unido) se recubrieron con 100 μL / pozo de 10^9 UFC/mL de cada clon de fago purificado, incluyendo el fago salvaje M13K07 como control, en solución de recubrimiento. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C , se lavaron 4 veces con SSTF- T 0,05% de Tween 20 (SSTF-T) y se bloquearon con SSTF-T/3% ABS durante 1 h a 37°C . Posteriormente se añadieron 100 μL /pozo de cada LAH diluidos 1/100, 4h a TA. Las placas se lavaron cuatro veces con SSTF-T y se añadió el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma - Aldrich, Reino Unido) a una dilución de 1:5000 en SSTF. Después de 1 h a 37°C , se lavaron cinco veces y se incubaron con solución sustrato durante 15 minutos a TA. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 0,1 M. Las absorbancias a 492 nm se determinaron mediante un lector de ELISA automático (Dinex Technologies, Reino Unido). Para cada LAH se evaluaron los valores promedio de dos experimentos independientes. Los valores se consideraron positivos cuando la relación de la absorbancia de los clones de fago analizados (P) y el M13K07 como control (N) (P/N) fue > 2 y que además, este valor de relación, sea dos veces el valor de la relación P/N del LAN (control del ensayo). Aquellos clones con una relación de P/N del LAN mayor de 2 fue considerado no relacionado.

3.10.2. Ensayo de inhibición competitiva de los fagos seleccionados

La capacidad de los clones de fagos seleccionados para competir con el virus del dengue por la unión a los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes con dengue, se evaluó empleando para ello el MEI desarrollado en el Laboratorio de Arbovirus del IPK (168). El título de anticuerpos anti-dengue DEN 1, 3 y 4 de los sueros positivos y tres negativos se midió antes y después de la adsorción de los mismos con cada uno de los fagos y el fago salvaje M13K07 (10^8 UFC de cada fago en 50 μL SSTF + 50 μL de suero diluido 1/10).

La fórmula utilizada para calcular el porcentaje de inhibición de unión de los anticuerpos anti-virus de dengue al virus debido a la adsorción de los mismos por los clones de fago fue la siguiente:

% de inhibición = $\frac{\text{Densidad óptica, (D.O)}}{1 - \frac{\text{D.O muestra de suero antes de la adsorción con los clones de fagos}}{\text{D.O muestra de suero después de la adsorción con los clones de fagos}}} \times 100$

3.10.3. Reactividad de los clones de fagos con el AcM H3-6.

Las placas de 96 pozos (Maxisorp, Nunc, Reino Unido) se recubrieron con el AcM H3-6 a 10 µg/mL en solución de recubrimiento (23). Las placas se incubaron durante la noche a 4 °C, luego se lavaron tres veces con SSTF-T y se bloquearon con SSTF/ M durante 1 h a 37°C. Posteriormente se añadieron cada una de las preparaciones de los clones de fagos y los controles y se incubaron durante 4 h a TA. Se añadió el AcM anti-M13 (dirigido contra la proteína pVIII del fago) conjugado a HRP (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido), diluido 1:5000 en SSTF/ M, se incubó 1 h a 37° C y los pasos siguientes del sustrato y la determinación de la absorbancia se realizaron como se describió en el acápite 3.10.1.

Controles de los ensayos: El fago M13K07 (control negativo) y el clon de fago # 50 obtenido de una selección con el AcM H3-6 (control positivo).

Los valores se consideraron positivos cuando la relación de la D.O de los clones de fago analizados (C) y el M13K07 como control (N) (C/N) fue > 2.

3.11. Análisis de la secuencia aminoacídica de los péptidos expuestos en los fagos seleccionados.

Las bacterias *E. coli* de la cepa TG1 se infectaron (en fase exponencial de crecimiento) con los clones de fagos seleccionados previamente y se sembraron en placas de cultivo que contenían medio LB sólido con kanamicina (Sigma-Aldrich, Reino Unido) a 75 µg/mL. Las colonias aisladas se sembraron en medio LB líquido conteniendo kanamicina (75 µg/mL) durante toda la noche para proceder a la purificación del ADN de los clones de fago mediante el estuche comercial de purificación Miniprep (QIA prep Spin, Miniprep KIT, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADN de los fagos se secuenció empleando un cebador de 27 nucleótidos específico del gen III descrito por Burrit y colaboradores, 1995 (173), utilizando el servicio de MacroGen, Inc (Korea). Las secuencias aminoacídicas se dedujeron usando el programa GENERUNNER. Las secuencias peptídicas expresadas en el fago se alinearon utilizando los proteomas de los cuatro serotipos del virus dengue así como las secuencias aminoacídicas de cepas de dengue del serotipo DENV- 3 disponibles en las bases de datos BLAST (174).

La secuencia aminoacídica de la proteína del virus dengue correspondiente con el mimotopo identificado, se obtuvo de la Base de Datos Secuencias de Referencia (RefSeq) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih>) (175). El número de acceso para la cepa D3 Martinica 1243/99 es Q6YMS3.

3.11.1. Predicción de epítomos B

La predicción de epítomos B se realizó con una combinación de los servidores BcePred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred>) y ABCpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred>) (176).

Para el servidor BcePred, teniendo en cuenta que el mismo posee diferentes valores de corte para cada una de las propiedades físico-químicas seleccionadas, a partir de las cuales los péptidos predichos se consideraron como epítomos, se determinó un índice de 2,38%. Para el servidor de ABCpred se seleccionaron epítomos de células B de 9 aminoácidos de longitud con un índice de 0,5%.

3.11.2. Predicción de epítomos T

La predicción de epítomos T se realizó a través del servidor HLApred (<http://www.imtech.res.in/raghava/hlapred/>) (177), diseñado por el Centro de Bioinformática del Instituto de Tecnología Microbiológica de la India. Los epítomos T promiscuos para moléculas HLA clase I se identificaron con el servidor ProPred1 (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/>) (178) y para HLA clase II se utilizó el servidor ProPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/index.html>) (179). Los valores de corte utilizados fueron los predeterminados por ambas herramientas bioinformáticas.

La predicción de epítomos T se realizó para alelos de las moléculas HLA-I y HLA-II, teniendo en cuenta los reportes de la distribución de estos alelos en una muestra de la población cubana de Ciudad de la Habana (180).

3.11.3. Estudio de la presentación del epítomo de células T correspondiente con el mimotopo identificado por una muestra de la población cubana

Para conocer la cobertura poblacional frente al epítomo seleccionado se utilizó el servidor [Population Coverage](http://tools.immuneepitope.org/tools/population/iedb_input) (http://tools.immuneepitope.org/tools/population/iedb_input).

Como referencia se utilizaron estudios de la distribución de HLA en muestras de 129 individuos sanos (donantes de sangre) de la población cubana de Ciudad de la Habana, para alelos de HLA clase I (180). Los resultados se expresaron como el porcentaje de la población con potencialidad para presentar el epítomo seleccionado.

Empleando el epítipo seleccionado, se realizó además la predicción teórica de la presentación para alelos clase I de HLA de las poblaciones de Brasil, México, y Malasia, aplicando el programa de cálculo de cobertura poblacional (181).

3.12. Síntesis de péptidos mimotopos de dengue y conjugación a la proteína portadora

La secuencia aminoacídica de los péptidos expuestos en los clones de fagos seleccionados se utilizó para la síntesis de péptidos. A uno de ellos se le adicionó una cisteína en su carboxilo-terminal, para la conjugación a la proteína ABS. Dicho péptido se nombró péptido P1 conjugado a ABS.

El otro péptido se sintetizó como un MAP de dos ramificaciones, para ello al carboxilo terminal de cada MAP se añadió un residuo de cisteína por donde se estableció una unión por puente disulfuro dando lugar al MAP homodimérico de cuatro ramificaciones (Figura 2). La síntesis se desarrolló manualmente en fase sólida empleando la estrategia Fmoc/tBu (182). Los MAP de dos ramificaciones se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se sometieron a un proceso de dimerización. La formación del homodímero se confirmó mediante análisis por espectrometría de masas de ionización por *electrospray* (ESI-MS). El MAP de cuatro ramificaciones se purificó por HPLC. A dicho péptido se le denominó MAP P1.

Todos los formatos peptídicos se sintetizaron por el Laboratorio de Péptidos Sintéticos, de la División de Química-Física, del CIGB, La Habana, Cuba.

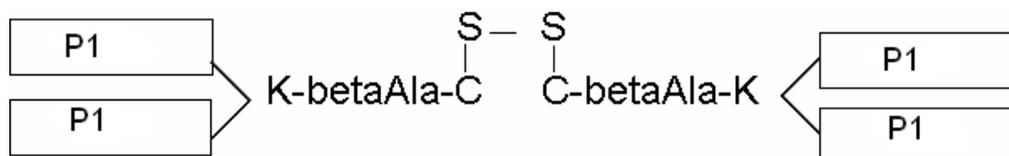


Figura 2. MAP que contiene la secuencia del péptido.mimotopo de DENV, MAP P1.

Concentración de proteínas. La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA™ Protein Assay (Pierce, Reino Unido UK) (183).

3.13. Evaluación de la antigenicidad

3.13.1 Caracterización antigénica de los clones de fagos y de dos construcciones peptídicas de mimotopo de dengue empleando un suero policlonal anti-NS4B.

El volumen del ensayo fue de 100 µL por pocillo. Placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc, Reino Unido) se recubrieron con los fagos purificados que expresan los mimotopos de dengue a una concentración de 10^8 UFC/ pozo (22), MAP P1 (5µg/mL) y P1 conjugado a ABS (20µg/mL) (155) en solución de recubrimiento durante 16 h a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con SSTF-T y se bloquearon con SSTF-T/M durante 1 h a 37 °C. El suero policlonal anti-NS4B específico se diluyó a 1:500 en SSTF-T/ M y se añadió a las placas incubándose durante 1 h a 37 °C. Las placas se lavaron cuatro veces con SSTF-T y se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Sigma-Aldrich, Reino Unido) durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, las placas se lavaron y se incubaron con solución sustrato durante 15 minutos a TA. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 0,1 M y se leyó la absorbancia a 492 nm en un lector de placas ELISA. Todas las muestras se evaluaron por duplicado y los resultados se expresaron como valores medios de absorbancia.

Controles negativos de los ensayos: Fago M13K07, el clon de fago # 50 y el MAP 46-56.

Se consideraron positivos aquellos clones de fagos y péptidos que mostraron un valor de absorbancia superior a dos veces el valor de la absorbancia producida por los controles del ensayo.

3.13.2. ELISA indirecto para la detección de los anticuerpos anti- NS4B en sueros humanos empleando dos construcciones peptídicas.

Para determinar si la construcción peptídica del mimotopo identificado era adecuada para ser reconocida por los anticuerpos presentes en las muestras de sueros inmunes, se realizó un ELISA con las muestras de los sueros pertenecientes al grupo A. Los péptidos empleados para el ensayo se utilizaron a la misma concentración de recubrimiento expuesta en el acápite anterior y las placas de microtitulación se incubaron durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron con SSTF-T y se bloquearon SSTF-M durante 1h a 37°C. Posteriormente, se añadieron 100 µL/pozo de las muestras de suero diluidas 1/20 en SSTF-M y se incubaron durante 2 h a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces con SSTF-T, se incubaron 1h a 37°C con 100 µL/pozo de un anticuerpo anti-IgG humano conjugado a HRP (Sigma-Aldrich, Reino Unido) diluida 1: 20 000 en SSTF-T/M, posteriormente se lavaron y se añadió el sustrato para el desarrollo de la reacción a TA durante 20 minutos en la oscuridad. La reacción se detuvo con 100µL de ácido sulfúrico 0,1 M por pocillo y se midió la absorbancia a 492 nm mediante un lector de ELISA (Dynex Technologies, Reino Unido). Como control negativo se utilizó una mezcla de los sueros del grupo D. Cada ensayo se realizó dos veces. Como control del ensayo se empleó el MAP 46-56.

Criterio de positividad. Para comparar los resultados del formato peptídico P1 conjugado a ABS y el MAP P1, se calculó la relación S/NO, donde S es la D.O obtenida en la muestra y NO es la media de los valores de DO del control negativo. Una relación ≥ 2 se consideró como positiva.

La construcción peptídica seleccionada se empleó en un ELISA con los grupos B y C de las muestras de sueros humanos, siguiendo el protocolo descrito anteriormente, Como control del ELISA se incluyó el péptido E como antígeno de captura para detectar

anticuerpos anti-dengue en la fase convaleciente de la enfermedad. La relación S/NO se utilizó como el valor de corte para la selección de una muestra de suero como positiva.

3.14. Esquema de inmunización

Animales de experimentación.

En todos los ensayos se emplearon animales de experimentación provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) avalados por un certificado de calidad. La dieta suministrada consistió en pienso y agua *ad libitum*. Se garantizaron las condiciones higiénicas sanitarias y las medidas epizootiológicas correspondientes para asegurar el buen estado de salud de los animales.

Se inmunizaron 10 ratones BALB/c, machos, de 6 y 8 semanas de edad, con 50 µg del MAP P1 emulsionados 1:1 con adyuvante completo de Freund (ACF) y se reinmunizaron con 50 µg del antígeno emulsionado 1:1 en adyuvante incompleto de Freund (AIF) a los días 14, 35 y 56 días (161). El grupo control se inmunizó con SSTF incorporados en los adyuvantes ACF y AIF. El volumen de inmunógeno administrado fue de 200 µL por vía intraperitoneal. Las muestras de suero se colectaron del plexo retroorbital antes de la primera inmunización (suero preinmune) y 14 días después de cada una de ellas y se conservaron a -20°C hasta su utilización para la evaluación de la respuesta inmune humoral.

Todos los experimentos en animales se llevaron a cabo de acuerdo con los requerimientos legales de las autoridades nacionales conforme a los principios éticos mundialmente aceptados según la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, dictada por la Comunidad Económica Europea (184).

3.15. Ensayos para la evaluación de la respuesta inmune humoral en ratón.

3.15.1. ELISA indirecto para la detección de los anticuerpos anti-MAP en los sueros de ratones inmunizados.

La detección de anticuerpos anti-péptido se realizó de forma similar a lo descrito por Sánchez Burgos y colaboradores, 2010 (162), placas de poliestireno de 96 pozos (Maxisorp, Nunc) se recubrieron con el péptido MAP P1 (10µg/mL) a razón de 100 µL por pozo y se incubaron a 4 °C durante toda la noche. El bloqueo de las placas se realizó con SSTF-T 3% ABS a 37°C durante 1 hora. Luego de tres lavados con SSTF-T, se añadieron los sueros de los ratones inmunizados con el antígeno peptídico a una dilución de 1/50 y se incubaron a 37 °C por 2 h, posteriormente las placas se lavaron nuevamente. A continuación las placas se incubaron a 37 °C por 1 h con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a HRP (Sigma-Aldrich, UK/ Estados Unidos); diluido 1/5 000 en SSTF-T a razón de 100 µL por pozo. Después de tres lavados, se añadieron 100 µL/pozo de la solución sustrato, y las placas se incubaron a TA durante 30 minutos. La reacción se detuvo con 50 µL por pozo de ácido sulfúrico 0,1 M y se determinó la absorbancia a 492 nm.

Como control del ensayo se empleó el péptido E como un antígeno de captura no relacionado (control negativo). Cada inmunoensayo se realizó dos veces. Todas las muestras de suero se analizaron por duplicado y la media de los valores se utilizó para el análisis.

Criterio de positividad: Los resultados se expresan como la relación de las DO (492 nm) de sueros inmunes / de sueros preinmunes. Una relación de ≥ 2 con respecto al grupo control se determinó como el valor de corte para considerar la muestra de suero positiva. El perfil de las subclases de anticuerpos IgG (isotipos IgG1 e IgG2a) de los anticuerpos producidos contra el MAP P1 se determinó empleando un ELISA de manera similar al descrito previamente, pero a partir de mezclas de sueros de cada grupo de ratones

lámina se añadieron 15µL de suero de ratón inmune diluido 1:20 en SSTF. Después de una incubación de 30 min a 37°C y 3 lavados con SST se añadió un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (SIGMA, Estados Unidos) a una dilución 1/40 en SSTF. Se incubó nuevamente como se ha descrito, y se adicionó una solución de Azul de Evans a cada lámina. Finalmente, las láminas se observaron en el microscopio de fluorescencia (Leitz Wetzlar, Alemania).

Como control positivo se utilizó un suero policlonal específico a la proteína NS4B del virus dengue (164): en este caso se utilizó como anticuerpo secundario un anti-IgG de conejo conjugado a FITC (Sigma, Estados Unidos) diluido 1:40 en SSTF. Se utilizaron como controles negativos los sobrenadantes colectados de células no inoculadas y una mezcla de sueros de los ratones preinmunes.

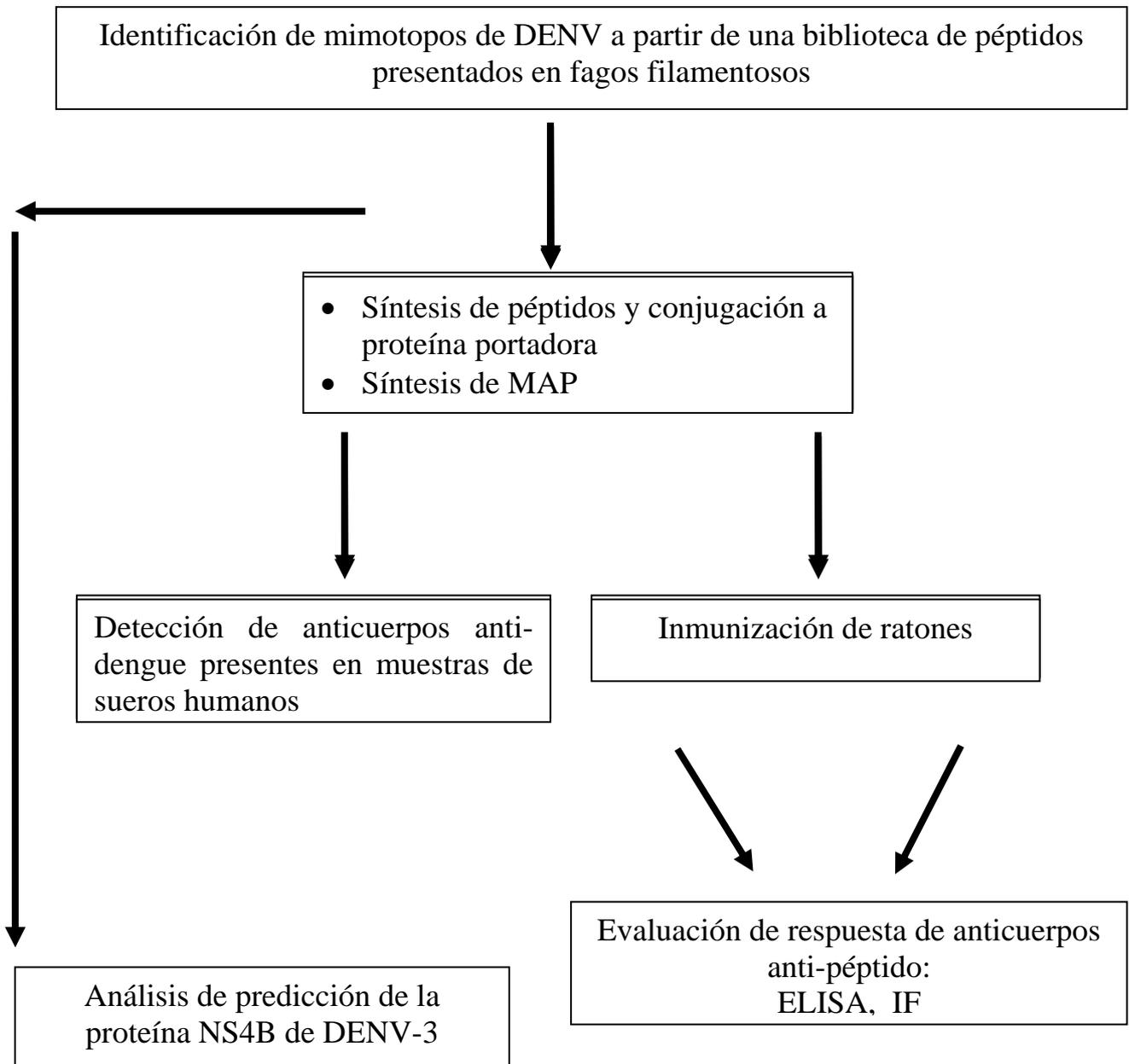
Todas las fotografías se tomaron con la ampliación 400x.

3.16. Análisis estadístico

En todos los análisis estadísticos realizados se utilizó el paquete estadístico *GraphPad Prism* (San Diego, CA, USA, <http://www.graphpad.com>). Dichos análisis se aplicaron a la evaluación de dos construcciones peptídicas del mimotopo identificado para la detección de anticuerpos anti-dengue en muestras humanas y al estudio de la respuesta de anticuerpos anti-peptido inducida por el inmunógeno sintético MAP P1. La normalidad de los datos fue comprobada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov con Dallal-Wilkinson Lillie y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Bartlett.

Los datos que no mostraron una distribución normal, fueron analizados mediante la prueba no paramétrica Wilcoxon- Mann-Whitney, el nivel de significación en todos los análisis fue del 95% ($p < 0.05$).

FLUJO GENERAL DE TRABAJO



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección de los fagos portadores de péptidos miméticos del virus dengue.

La tecnología de presentación de péptidos sobre fagos filamentosos constituye una de las vías más rápidas y eficientes para la identificación de mimotopos antigénicos del antígeno original, o sea, de estructuras peptídicas que simulan las propiedades de unión del antígeno natural con el anticuerpo que se generó (187). La pesquisa de bibliotecas de péptidos, se lleva a cabo tanto con AcM dirigidos contra antígenos de patógenos, como con sueros de interés. Cuando se utilizan sueros provenientes de individuos aquejados de alguna enfermedad es posible identificar mimotopos de epítomos que se expresan por el agente etiológico de la enfermedad durante el curso de la misma y que son capaces de generar una respuesta inmune. También es posible, la identificación de los péptidos implicados en la generación de la respuesta inmune protectora conferida por una vacuna eficaz si se realiza la pesquisa de la biblioteca con sueros de individuos inmunizados con dicha vacuna (126).

La aplicación de esta tecnología ha permitido el aislamiento de mimotopos de algunos patógenos virales. Entre estos se encuentran los mimotopos del virus de la hepatitis B, C y A (22, 28, 166), del virus de la rabia (30), virus Epstein–Barr (188), VNO (189) y Virus de la Inmunodeficiencia Humana (20), cuyas propiedades los han convertido en candidatos para el desarrollo de nuevas formulaciones vacunales y de nuevos métodos de diagnóstico.

Este enfoque se ha utilizado previamente para identificar mimotopos específicos de serotipo de los virus del dengue utilizando AcM de ratón (23, 25, 131, 134, 136, 138). Esta metodología también se ha empleado, para la obtención de anticuerpos recombinantes anti-dengue, a partir de bibliotecas de anticuerpos sobre fagos filamentosos (190, 191).

(grupos inmunizados y control). Se utilizaron los correspondientes anticuerpos de cabra específicos de cada isotipo murino (Sigma, Estados Unidos) y la reactividad se reveló con un conjugado anti- IgG de cabra obtenida en conejo (Sigma, Estados Unidos).

Criterio de positividad: Los valores de absorbancia superior a dos veces el valor de la absorbancia producida por el suero preinmune.

3.15.2. ELISA para la detección de los anticuerpos IgG totales anti-dengue en el suero de los ratones inmunizados.

Para la evaluación de la respuesta anti-viral se empleó el ELISA descrito por Gil y colaboradores., 2009 (185). Se evaluaron las diluciones en base 2 de las muestras de sueros de los animales inmunizados con el MAP P1. Las DO (492nm) se analizaron para determinar las diferencias en los niveles de anticuerpos anti-virales después de la última inmunización.

Criterio de positividad: Los valores de absorbancia superior a dos veces el valor de la absorbancia producida por el grupo control. El título de anticuerpos de cada suero se expresó como la máxima dilución del mismo que mostró un valor positivo.

3.15.3. Ensayo de Inmunofluorescencia. Cinética de expresión de la proteína NS4B mediante IFI. Evaluación de la funcionalidad de la respuesta humoral

Se inocularon células C6/36-HT en monocapa confluyente (sembradas en placas de cultivo de 24 pozos) con 100 μ L de la cepa 116/00 (5p C636, 1p Vero), DENV-3, a una multiplicidad de infección de 0.01. La adsorción viral se favoreció por el método de centrifugación rápida (186). Posteriormente, se añadió 1mL de medio de mantenimiento y las células se incubaron a 33°C. Se colectaron células inoculadas desde las 10 h hasta las 48 h post-infección (pi). Las células se lavaron por centrifugación a 1500 g, durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en SSTF a razón de 10^5 cels/mL. Se añadieron 15 μ L/pozo de la suspensión en cada lámina para fijarlas con acetona fría por 10 min. Las láminas se conservaron a -70°C hasta el momento de la IFI. Sobre cada pocillo de la

La estrategia del presente trabajo consistió en aplicar esta metodología para la selección de fagos miméticos de los virus dengue empleando por primera vez sueros humanos como fuente de anticuerpo, para lo cual se inició la selección de afinidad con 10^{12} UFC/mL de la biblioteca de péptidos expuestos en fagos filamentosos, J404 y un suero con anticuerpos anti-DENV3 (suero S982). De los fagos adsorbidos, 2×10^4 UFC/mL se eluyeron. La primera y única ronda de selección por afinidad se amplificó a 2.5×10^{12} UFC/mL, y se realizó directamente la inmunodetección de colonias y empleando un suero positivo (S219) diferente al empleado en la selección y además un suero negativo. Realizar múltiples pasos en la selección no necesariamente favorece el enriquecimiento de los fagotopos específicos en detrimento de los no específicos, debido a que en el suero pueden existir anticuerpos no específicos de la enfermedad que pudieran seleccionar fagotopos irrelevantes y no deseados (171), de ahí que se recomienda reducir el número de rondas de selección al mínimo (en muchos casos una ronda es suficiente).

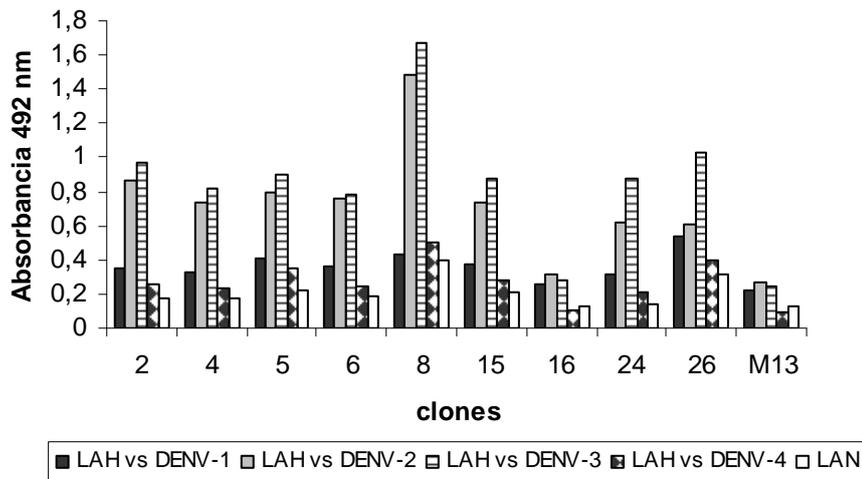
Para la selección de los clones de fagos específicos a DENV se emplearon diferentes sueros, según recomiendan Folgori y colaboradores, (22) y Prezzi y colaboradores, (28), ya que emplear diferentes combinaciones de sueros en los procesos de selección, aumenta la probabilidad de identificar un mayor número de epítomos virales diferentes

Para la identificación de los positivos, se recomienda evaluar por tamizaje una gran cantidad de los clones seleccionados (22), por lo antes expuesto, los 84 clones de fago que resultaron positivos en la inmunodetección de colonias (50% de las colonias evaluadas) se evaluaron posteriormente mediante Slot Blot empleando 3 sueros positivos y negativos. Este paso, facilitó la selección de los clones antes de la evaluación con un panel de sueros, disminuyendo el laborioso trabajo de seleccionar por ELISA un gran número de clones no específicos. De esta manera, se obtuvieron 17 clones de fagos

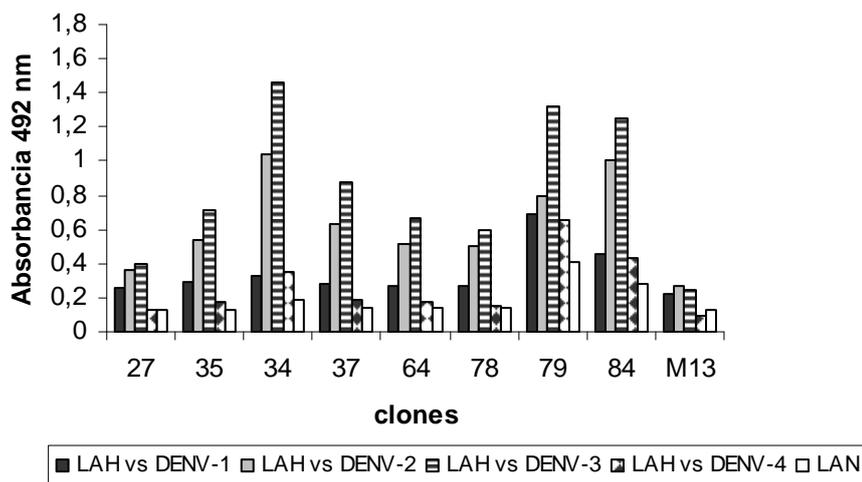
positivos de un total de 84 clones identificados previamente. Estos clones no reaccionaron con los sueros negativos.

En el presente trabajo se comprobó la utilidad de la biblioteca de péptidos presentados en fagos filamentosos J404, como fuente de epítomos, la cual se ha aplicado exitosamente para la identificación de péptidos que semejen la estructura antigénica de epítomos de VHA (166).

El complejo dengue se encuentra formado por cuatro serotipos diferentes que están antigénicamente relacionados, por lo tanto en nuestro caso al emplear sueros humanos de individuos inmunes al serotipo dengue 3 en la selección, es necesario contar con anticuerpos policlonales contra los cuatro serotipos. Teniendo en cuenta que disponer de un panel de sueros con anticuerpos anti-dengue serotipo específico resulta difícil, se realizó una modificación del método de evaluación de los fagos seleccionados, que consistió en utilizar los anticuerpos policlonales de captura diferentes a los de la selección. Se empleó un sistema de identificación de los fagos positivos con LAH producidos en ratones BALB/c contra los cuatro serotipos del dengue, de este modo fue posible evaluar la inmunorreactividad específica de los 17 clones de fagos mediante ELISA en el cual la superficie de las placas se sensibilizó con los clones de los fagos purificados. Los resultados del reconocimiento de los 17 clones de fagos seleccionados por LAH de cada serotipo de dengue, se muestran en la Figura 3.



A)



B)

Figura 3. Especificidad de reconocimiento de los clones de fagos seleccionados con LAH contra los cuatro serotipos del virus dengue (ELISA). A) Ocho clones de fagos y el control negativo M13 B). Ocho clones de fagos y el control negativo M13. M13: Fago salvaje M13K07 Se consideraron positivos aquellos fagos con un valor de absorbancia, superior a dos veces el valor de la absorbancia producida por el mismo fago frente al LAN.

Para los clones de fagos 2, 15, 24, 34, 35, 37, 79 y 84 se observó una inmunorreactividad superior a los LAH contra los cuatro serotipos (Tabla 1). El mejor reconocimiento se obtuvo para LAH contra el virus del dengue 3. El uso de sueros provenientes de pacientes que presentaban anticuerpos anti-DENV-3 en el proceso de

selección, podría explicar el reconocimiento óptimo de los clones de fagos por LAH contra el DENV- 3.

Tabla. 1. Reactividad de los LAH contra los cuatros serotipos del virus dengue con los clones de fagos seleccionados por ELISA ^a.

Clon de fago	LAH				VNO	EEE	LA Normal
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4			
2	1,23	3,00	3,36	0,88	0,61	1,20	1,28
4	0,61	1,37	1,53	0,43	0,94	1,14	1,09
5	0,59	1,15	1,32	0,50	1,15	1,30	1,11
6	0,72	1,54	1,58	0,49	0,67	1,14	1,16
8	1,70	5,80	6,56	1,95	2,05	1,31	2,08
15	1,18	2,32	2,76	0,90	1,03	1,04	1,00
16	1,15	1,43	1,28	0,47	0,97	1,29	1,03
24	1,42	2,78	3,92	0,93	1,42	1,37	1,73
26	1,09	1,23	2,07	0,80	1,89	1,40	2,08
27	1,14	1,62	1,76	0,57	1,49	1,39	1,24
34	1,31	4,10	5,75	1,37	1,42	1,09	1,55
35	1,31	2,42	3,21	0,78	1,34	1,31	1,48
37	1,24	2,82	3,91	0,84	1,21	1,36	1,85
64	1,22	2,29	2,99	0,78	1,32	1,35	2,23
78	1,22	2,26	2,69	0,70	1,16	1,63	1,68
79	2,69	3,10	5,17	2,56	1,21	1,15	1,70
84	1,57	3,46	4,30	1,48	1,81	1,38	1,71

* Los resultados son expresados como la relación (P/N), donde la absorbancia de cada clon de fago es (P) y la absorbancia del Fago M13 es (N). Se consideraron positivos aquellos clones cuya relación fue \geq a 2 y que además fuera dos veces mayor que la del LAN. Los valores sombreados se consideran resultados positivos.

Los 17 clones de fagos seleccionados se evaluaron con el LAH contra los virus de EEE y VNO, con el objetivo de extender el análisis de la reactividad cruzada contra otros flavivirus y el LAN como control de la especificidad. Los resultados de la

Tabla 1 demuestran que ninguno de estos clones de fagos presentan reactividad cruzada con el LAH contra EEE, en cambio los clones de fagos 8 y 26 mostraron reactividad con el LAH contra VNO. Los clones 8, 26 y 64 fueron eliminados del estudio por presentar reactividad con el LAN usado como control. No se detectó reconocimiento específico al LAN en los ocho clones de fagos seleccionados.

El hecho de que los clones sólo reaccionaron con LAH contra el dengue y que la mayoría no reaccionaron con el LAH contra el VNO y EEE sugiere que no comparten epítomos con estos arbovirus, si bien varios de los virus que pertenecen al género *Flavivirus* (virus de la fiebre amarilla, VEJ, VNO, virus de San Luis) comparten entre ellos y con el virus dengue epítomos que los relacionan antigénicamente (2), los cuatro virus del complejo dengue presentan una mayor identidad de secuencia aminacídica entre sí que con el resto de los flavivirus (34). Era de esperar entonces que los fagos seleccionados no reconocieran al LAH del VNO, convirtiéndoles en blancos atractivos para fines de diagnóstico para dengue.

La reactividad de estos 17 clones de fagos con los diferentes LAH mediante ELISA, permitió seleccionar ocho fagotopos específicos del DENV-3 y cuatro de DENV-2 y, los cuales continuaron al paso de identificación.

4.1.2 Ensayo de competencia de los fagos seleccionados

El ensayo de competencia utilizando un péptido que simula funcionalmente al epítomo nativo, nos permite demostrar como el peptido empleado puede desplazar al antígeno natural, al unirse al paratopo del anticuerpo específico y lo cual puede ser demostrado mediante un ensayo en el que se empleen ambos (32).

La reacción de los ochos clones de fagos con los anticuerpos anti-DENV- 3 presentes en los sueros humanos evaluados se muestra en la Tabla 2 y se expresa como el porcentaje de inhibición de la unión de los anticuerpos anti-DENV-3 al virus, en comparación con el suero no adsorbido.

Tabla 2. Ensayo de competencia con los sueros colectados de los individuos inmunes a DENV-3

Clon de fago	Porcentaje de Inhibición (%)*		
	Sueros Positivos a Acs contra DENV- 3		
	Suero 1	Suero 2	Suero 3
2	21,73	4,55	9,86
15	6,37	4,08	7,98
24	1,34	1,01	0
34	1,17	0,67	3,2
35	4,24	8,99	3,58
37	16,61	13,80	9,36
79	-8,90	-13,79	0,81
84	-5,57	-9,92	-2,54
M13	0,84	-14,02	-8,52

* El porcentaje de inhibición de la unión de anticuerpos humanos anti-dengue al virus, por los clones de fagos seleccionados. Se calculó como:

$1 - \frac{\text{D.O muestra de suero antes de la adsorción con los clones de fagos}}{\text{D.O muestra de suero después de la adsorción con los clones de fagos}} \times 100$

D.O muestra de suero después de la adsorción con los clones de fagos

M13 = Fago salvaje M13K07

De los ochos fagos, solo los clones 2, 15, 35 y 37 mostraron porcentajes de inhibición de la unión de los anticuerpos anti-DENV- 3 al virus en los sueros evaluados, mientras que este efecto no se evidenció en ninguno de los restantes clones de fagos.

A partir de estos resultados, los cuatro clones seleccionados se evaluaron con anticuerpos anti-DENV- 1, anti-DENV-3 y anti-DENV-4 presentes en los sueros humanos. En la Tabla 3 se muestra que los mayores porcentajes de inhibición se presentaron con el anti- DENV -3, lo que apoya la presencia de péptidos que imitan epítomos específicos de serotipo 3 del dengue en los cuatro fagotopos en estudio. Resultados similares se obtuvieron por otros autores al evaluar fagotopos que mimetizaban antígenos específicos de serotipo (24). No se detectó reacción con los sueros usados como controles negativos.

Tabla. 3 Ensayo de competencia con los sueros colectados de los individuos inmunes con anticuerpos anti-dengue

Clon de fago	Porcentaje de Inhibición (%)*				
	Suero positivo			Suero negativo	
	DENV- 1	DENV- 3	DENV- 4	M30	M37
2	17,2	27,08	13,3	1,033	1,069
15	16,8	33,12	13,8	-7,20	-9,0
35	1,8	35,5	15,9	2,04	8,81
37	-6,5	32,9	25	0,13	0,757
M13	-10,02	0,84	-5,52	0,33	-0,78

* La inhibición de la unión de los anticuerpos anti-dengue al virus del dengue se expresa como el porcentaje de inhibición. El porcentaje de inhibición de la unión de los anticuerpos humanos anti-dengue al virus, por los clones de fagos seleccionados, se calculó como:

$$1 - \frac{\text{D.O muestra de suero antes de la adsorción con los clones de fagos}}{\text{D.O muestra de suero después de la adsorción con los clones de fagos}} \times 100$$

Yao y colaboradores en el año 1995 (131) describieron que el péptido NS1 (HKYSWK) de DENV-1, sintetizado como un MAP de ocho ramificaciones, inhibió la unión del AcM 15F3-1 al virus, con porcentos de inhibición que fluctúan entre 20 a un 70 %. Wu y colaboradores en el año 2003 encontraron que los fagos portadores de los mimotopos de las regiones comprendidas entre los a.a 36-45 y 187-196 de NS1 compitieron por unirse a anticuerpos con porcentos de inhibición de 22 a 55 %. Dichos anticuerpos procedían de un suero policlonal producido contra la proteína NS1 de la cepa Nueva Guinea C de DENV-2 (24). Los resultados obtenidos en el presente trabajo mediante un ensayo de competencia, en el cual se emplearon tanto el virus como los sueros positivos, fueron similares a los obtenidos por estos autores, con un rango entre un 27 y 35 % de inhibición de la unión.

Los ensayos competitivos son particularmente útiles en casos como este, donde un gran conjunto de sueros de la entidad estudiada no está disponible, o cuando no es posible secuenciar todos los clones seleccionados (32). En este estudio cuatro clones de fagos

fueron capaces de unirse al paratopo de los anticuerpos presentes en los sueros desplazando al virus por la unión a los mismos, demostrando que los péptidos expuestos en estos clones mimetizan epítomos de dengue.

4.1.3 Reactividad de los clones de los fagos seleccionados con el AcM H3-6

El AcM H3-6 es un AcM de ratón que reconoce los cuatro serotipos del virus dengue, y que no presenta reactividad cruzada con otros flavivirus (13). Este AcM se ha empleado previamente como molécula selectora para la selección de mimotopos del virus del dengue, utilizando una biblioteca de secuencias al azar de péptidos de 9 aminoácidos. Al contar con clones de esta selección, se diseñó como parte del presente trabajo un sistema de ELISA que pudiera demostrar la presencia de epítomos que correspondieran al virus dengue. Para ello, se utilizó el AcM H3-6 como anticuerpo de captura y se evaluó la inmunoreactividad de los cuatro clones de fagos seleccionados por el ensayo de competencia. En la figura 4, se muestran los resultados de la evaluación de dichos clones frente al AcM H3-6, los cuales resultaron negativos y demostraron que ninguno de estos clones de fagos presentan péptidos reconocidos por el AcM H3-6. Se observó un reconocimiento elevado del clon de fago # 50 al H3-6, incluido como control positivo, lo que evidencia que este clon expone péptidos que son reconocidos por el AcM (Figura 4). Este mimotopo tiene similitud con la secuencia aminoacídica correspondiente al segmento entre los a.a 393 y 401 de la proteína E. Esta región antigénica coincide con los hallazgos de Falconar y colaboradores, en el año 2008 (192) donde el AcM 3A8.1 generado contra la cepa PR159 del DENV-2 desarrolló una fuerte reactividad con un péptido sintético correspondiente a dicho segmento de la proteína E.

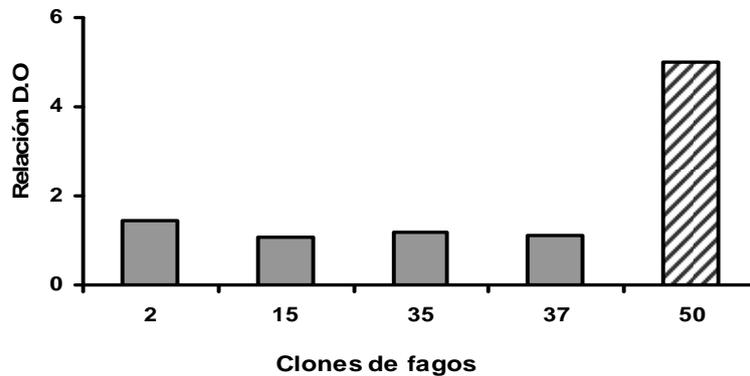


Figura 4. Reactividad específica del AcM H3-6, anti-complejo del dengue con los clones de fagos seleccionados por ELISA. Se recubrieron placas de ELISA con el AcM H3-6 y se incubaron con las preparaciones de fagos diluidas (10^9 fagos/mL para los todos los clones). Los fagos unidos se detectaron con el AcM anti-M13 conjugado a peroxidasa. Los resultados son expresados como la relación (C/N), donde la absorbancia de cada clon de fago es (C) y la absorbancia del Fago M13 es (N). Se consideraron positivos aquellos clones de fagos cuya relación fue \geq a 2

Considerando que ninguno de los cuatro clones fue reconocido por el AcM H3-6, denota que los mismos no presentan péptidos que imitan epítomos específicamente de la proteína E del virus dengue.

De este modo fue posible contar con un sistema de ELISA útil para la evaluación de la inmunoreactividad de los cuatro clones de fagos seleccionados.

4.1.4 Análisis de la secuencia aminoacídica de los péptidos expuestos en los fagos seleccionados

El análisis de las secuencias mostró que los clones de fagos 2, 15, 35 y 37 comparten varios aminoácidos con regiones de las proteínas NS3 y NS4B de cepas de los cuatro serotipos del virus del dengue. No se encontró similitud con las restantes proteínas del virus del dengue.

Las secuencias expuestas en los fagos 2, 15 y 35 mostraron similitud de aminoácidos con la proteína NS4B del virus dengue (Fig. 5A, con 4 residuos en la región aa 164 al 172 para los serotipos DENV-1, 2 y 3, y entre los residuos 161 al 168 para DENV- 4).

La secuencia expuesta en el fago 37 mostró similitud continua de a.a con dos regiones de la proteína NS3, 5 residuos en la región aa 425 al 432 y 5 residuos en la región aa 537 al 544 (Fig. 5B).

A través de la tecnología de presentación de péptidos en fagos filamentosos y con el empleo de sueros humanos inmunes a Dengue ha sido posible, en el presente trabajo, obtener péptidos mimotopos de células B de las proteínas no estructurales NS3 y NS4B de los cuatro serotipos del virus del dengue.

A)

```
>YP_001531175|NS4B
      Length = 248

Score = 12.7 bits (21), Expect = 4.9
Identities = 4/8 (50%), Positives = 6/8 (75%), Gaps = 0/7 (0%)

Query: 1   FERVPGEV 8
        FE+  G+V
Sbjct: 164 FEKQLGQV 171
```

B)

```
>YP_001531172|NS3
      Length = 619

Score = 14.2 bits (26), Expect = 1.6
Identities = 5/7 (71%), Positives = 5/7 (71%), Gaps = 0/7 (0%)

Query  1   RRALPPV 7
        RR  L PV
Sbjct  426 RRCLKPV 432

Score = 10.0 bits (16), Expect = 30
Identities = 5/8 (62%), Positives = 5/8 (62%), Gaps = 2/8 (25%)

Query  1   RRA-LPPV 7
        RR  LP V
Sbjct  538 RRGDLP-V 544
```

Figura.5 Secuencias de aminoácidos de los mimotopos y alineamiento con la poliproteína de la cepa Martinica del serotipo 3 del virus dengue. (A) Alineamiento de los mimotopos 2, 15 y 35 con la proteína NS4B. (B) Alineamiento del mimotopo 37 con la proteína NS3. Los alineamientos en ambos casos fueron similares para los restantes serotipos.

El clon de fago 37 expone un péptido similar a dos regiones de la proteína NS3 de los cuatro serotipos del virus. Este péptido comparte cinco residuos de a.a entre la región

537 al 547, la cual está altamente conservada con un 80% o más de identidad entre un total de 44 cepas de todos los serotipos y no compartida con otros flavivirus (193), lo cual confirma los resultados obtenidos con este clon respecto al reconocimiento con los LAH.

Dicho clon, también mostró similitud con cinco residuos de aminoácidos en la región comprendida entre los a.a 421 al 481 de la proteína NS3. Estudios recientes describen la secuencia identificada como una de las más potentes inductoras de la respuesta de linfocitos T, en los pacientes infectados con el virus del dengue (45).

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran la identificación por primera vez de mimotopos de la proteína NS3 utilizando sueros humanos positivos a dengue. El empleo de sueros humanos en la selección permitió identificar determinantes antigénicos de dicha proteína, que pudieran ser inmunológicamente relevantes para el hospedero. Confirmando, además, lo encontrado en la literatura que la proteína NS3 es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos protectora (14).

Los tres clones de fagos obtenidos, 2, 15 y 35 exponen la misma secuencia de aminoácidos (FERVPGEV), es posible que por esta razón estos clones de fagos en el ensayo de competencia mostraron reactividades similares con los sueros de los pacientes (Tabla 3). El hecho de encontrar la misma secuencia de a.a en los tres clones de fagos pudiera ser debido a que durante el paso de amplificación, los fagotopos seleccionados presentan diferentes niveles de crecimiento, lo que hace que en ocasiones el mayor porcentaje de los fagos cultivados sea más bien por la selección biológica que por la de afinidad (22). Este péptido comparte homología parcial con la proteína NS4B del virus dengue. Aunque esta proteína no está considerada dentro de las principales dianas virales implicadas en la respuesta de anticuerpos al virus del dengue, este mimotopo se identificó con sueros humanos que presentaban anticuerpos anti-dengue, lo cual sugiere que simula un epítipo inmunológicamente importante durante la infección. Este

resultado confirma un informe que describe una respuesta consistente de anticuerpos a la proteína NS4B, en el 78% de las muestras de pacientes con infección aguda de dengue, estudiadas por Lázaro y colaboradores en el año 2008 (194).

Por lo que los dos péptidos miméticos de determinantes antigénicos de NS3 y NS4B se podrían utilizar para el desarrollo de sistemas de diagnóstico y para la formulación de un candidato vacunal contra el dengue.

Varios estudios se han realizado para caracterizar la proteína NS3 del virus dengue; sin embargo, la proteína NS4B, ha sido poco estudiada.

La proteína NS4 forma parte del complejo enzimático de replicación del ARN en los flavivirus, pues interviene en la transcripción y traducción del genoma viral. NS4B se deriva de esta proteína y puede encontrarse dispersa en la membrana, posiblemente en el núcleo (164). La NS4B bloquea la transducción de señales inducidas por IFN alfa/ beta aparentemente por disminuir la fosforilación o favorecer la degradación de las proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción STAT1/STAT2 -del inglés- *Signal Transducers and Activators of Transcription*. El procesamiento secuencial de la proteína NS4AB por las proteasas virales y celulares es necesario para iniciar esta función antagonista (47). Kelley y colaboradores en el año 2011(48) describieron esta proteína como inductora de niveles significativamente altos de inmuno-mediadores asociados al riesgo de la forma severa de la enfermedad. Así mismo, esta proteína es un blanco importante para inhibir la infección por el virus (49).

Por la importancia que puede tener la proteína NS4B como diana de la respuesta inmune al virus dengue y el poco conocimiento que existe de la misma, se decidió continuar este estudio con el mimotopo de NS4B y evaluar la antigenicidad e inmunogenicidad en ratones BALB/c mediante la utilización de variantes de péptidos sintéticos.

4.2. Reconocimiento del mimotopo NS4B por anticuerpos

4.2.1 Comparación de la antigenicidad del mimotopo en diferentes formatos antigénicos

El péptido sintetizado comercialmente (CIGB, Cuba) se obtuvo con más del 95% de pureza. Se nombró NS4B, en dependencia de la proteína del virus con la cual mostraron similitud los clones de fago 2, 15 y 35. El péptido conjugado a la proteína portadora ABS se nombró, NS4B conjugado a ABS.

En la síntesis del MAP homodimérico de cuatro ramificaciones se empleó el péptido mimotopo NS4B, el mismo se nombró MAP NS4B y se obtuvo con un 97,28 % de pureza. La masa molecular determinada experimentalmente por ESI-MS (4552,65 Da).

Se realizó un ELISA para evaluar la capacidad de unión de los fagotopos, 2, 15 y 35, del MAP NS4B y de NS4B conjugado a ABS frente al suero policlonal específico contra la proteína NS4B.

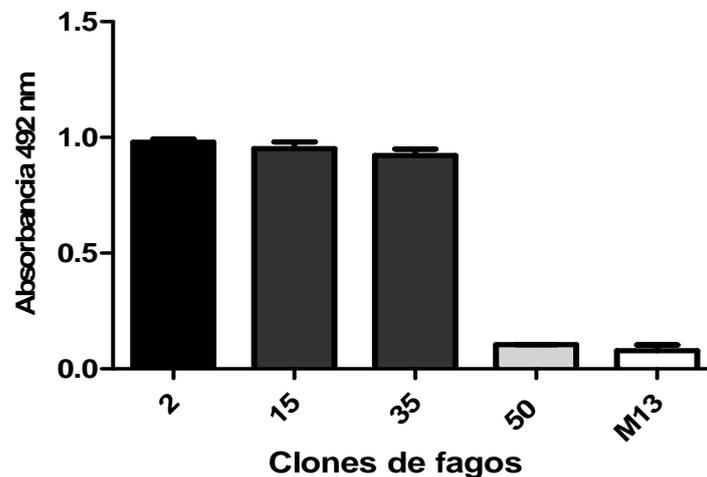


Figura 6. Reactividad del antisuero policlonal NS4B con los fagos portadores de mimotopos de la proteína NS4B del virus dengue por ELISA. Se recubrieron placas de microtitulación con las preparaciones de los fagos diluidas (10^9 fagos/mL para todos los clones). Se incubaron con un antisuero policlonal NS4B y los anticuerpos se detectaron con el anticuerpo anti-IgG conejo conjugado a HRP. Se incluyó como control negativo el clon # 50 de fago obtenido por selección con el AcM H3-6. Se consideraron positivos aquellos clones de fagos que mostraron un valor de absorbancia superior a dos veces el valor de la absorbancia producida por el fago salvaje M13.

Como se muestra en la Figura. 6 todos los clones de los fagos correspondientes al mimotopo NS4B fueron reconocidos específicamente por el antisuero policlonal NS4B, lo que indica que el péptido expuesto mimetiza al antígeno natural, en este caso la proteína NS4B.

Al valorar los dos formatos peptídicos, ambos presentaron inmunorreactividad con el antisuero policlonal (Fig 7). El sistema de MAP se ha utilizado para mejorar la antigenicidad de las secuencias peptídicas dada su naturaleza multimérica. Esta alternativa permite superar la capacidad de unión de los péptidos a la superficie de la placa de microtitulación y aumenta la sensibilidad de la detección (155).

En contraste, el péptido sintético MAP46-56, usado como control en el ensayo, no fue reconocido por este suero policlonal específico (Fig.7), comportamiento similar al encontrado con el fago salvaje M13K07 (Fig.6).

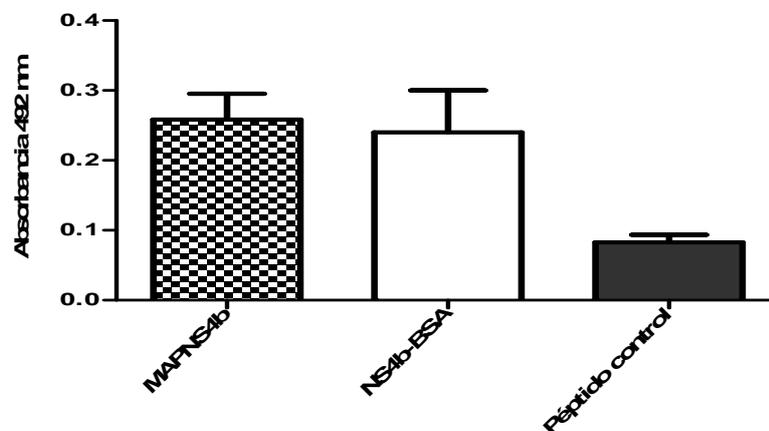


Figura 7. Reactividad del antisuero policlonal NS4B con los péptidos mimotopos de la proteína NS4B del virus dengue por ELISA. Se recubrieron placas de ELISA con el MAP NS4B y el péptido NS4B conjugado a ABS. Se incubaron con antisuero policlonal anti-NS4B y los anticuerpos unidos se detectaron con el el anticuerpo anti- IgG conejo conjugado a HRP. Se incluyó como control negativo el MAP 46-56. Se consideraron positivos los formatos peptídicos que mostraron un valor de absorbancia superior a dos veces el valor de la absorbancia producida por el péptido MAP 46-56.

El criterio esencial para que se produzca la unión efectiva de un anticuerpo a un péptido, es que la complementariedad entre el sitio de combinación del anticuerpo y la superficie

molecular del péptido al que éste se une, se mantenga en relación con la forma y la carga eléctrica. De ahí que un péptido al que se acople un anticuerpo puede definirse como un mimotopo, aun cuando él no sea una reproducción exacta del epítipo y no se conozca su secuencia de aminoácidos (195).

Se ha demostrado que la antigenicidad y la inmunogenicidad de un péptido mimotopo podrían variar cambiando el contexto molecular en el que el péptido se identificó por primera vez (196). El mimotopo NS4B mostró su capacidad de unirse a un antisuero específico en un contexto diferente al del fago filamentoso. El poder de la tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos consiste en reducir los antígenos proteicos complejos a pequeñas estructuras peptídicas que retengan las propiedades biológicas de dichos antígenos de forma tal que se comporten como sustitutos de los mismos (114).

Al evaluar el reconocimiento específico con el anticuerpo policlonal contra la proteína NS4B los valores de absorbancia obtenidos con el ELISA de fagos fueron superiores, sin embargo es necesario obtener preparaciones de bacteriófagos altamente purificados y libres de contaminantes, cuando van a ser utilizados como sustitutos de antígenos o para estudios de inmunogenicidad (126). Tomando en consideración los elementos anteriores y el hecho de que existía la disponibilidad de las variantes peptídicas del mimotopo NS4B para posteriores evaluaciones, se continuó el estudio con estos formatos y así superar las principales desventajas asociadas con la purificación de los fagotopos.

4.2.2 Comparación de la antigenicidad del MAP NS4B y el péptido NS4B conjugado a ABS empleando sueros humanos

Se han obtenido resultados contradictorios con respecto a la antigenicidad de los péptidos, debido a que los mismos pueden adoptar diferentes conformaciones al ser empleados en inmunoensayos. Estas diferencias se han descrito al usarlos como péptidos libres en solución, conjugados a proteínas, y MAP, entre otras. Por otra parte, la conformación peptídica particular que preferiblemente reconocen los anticuerpos, no es

posible predecirla, por lo cual, para emplear péptidos como antígenos de recubrimiento en ensayos inmunoenzimáticos, es indispensable evaluar su antigenicidad en diferentes formatos (125). Por lo tanto, para comprobar la capacidad del mimotopo de ser reconocido por los anticuerpos presentes en muestras de sueros inmunes, era necesario conocer cual de las construcciones peptídicas MAP NS4B y NS4B conjugado a ABS, podía ser mejor como antígeno de recubrimiento en un ensayo tipo ELISA. Para ello se enfrentaron ambos formatos a muestras de sueros de DENV-1, DENV-3 y DENV-4. No se incluyeron sueros de individuos inmunes a DENV-2, debido a la falta de disponibilidad en el momento del estudio.

El mimotopo NS4B en sus dos formatos presentó los niveles más altos de positividad con las muestras de DENV -3 (Fig 8).

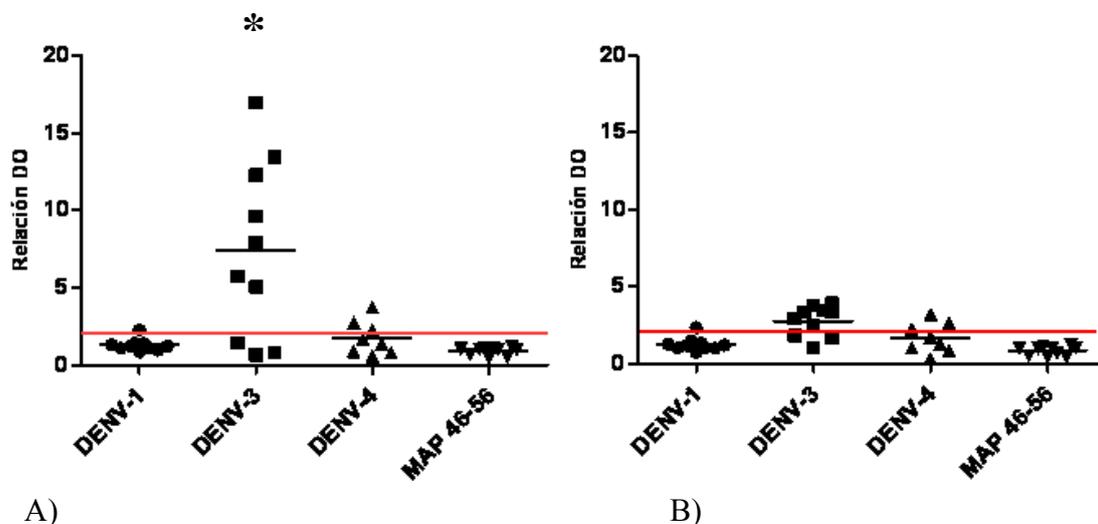


Figura 8. Comparación de la reactividad de anticuerpos anti-dengue en muestras de sueros humanos: (A) con un MAP del mimotopo NS4B (B) y el mimotopo conjugado a una proteína portadora BSA. En el ensayo se emplearon muestras de sueros, positivas a anticuerpos contra DENV- 1, DENV-3, DENV-4 y una mezcla de suero negativas a anticuerpos anti-dengue, control negativo. El MAP 46-56 se incluyó como MAP no relacionado. Los resultados se expresan como la relación de las DO y se presentan como muestras individuales n=10. Fórmula de la relación= M/C donde M es la DO de la muestra positiva y C es la DO obtenida en la muestra control negativo. El valor de corte es cuando la relación $M/C \geq 2$ y se señala con una línea horizontal. Las diferencias se indican en la figura como $p < 0.05^*$.

Como se ilustra en la Figura 8, se encontraron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos detectados en el suero de los pacientes infectados con DENV-1 y DENV-4 con respecto a DENV-3 en las construcciones peptídicas estudiadas ($p \leq 0,05$), mediante la prueba de Mann Whitney. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas de DENV-1 y DENV-4, para ambas construcciones. Ambos antígenos fueron reconocidos por el 37,5 % de los sueros positivos de DENV-4, sin embargo los sueros con anticuerpos anti-DENV-1 mostraron las más bajas reactividades (10%) (Figura 8).

Un anticuerpo contacta con el antígeno por las regiones hipervariables también conocidas como regiones determinantes de la complementariedad, (CDR –del inglés *Complementary Determinant Region*), de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas. En el potencial de unión de una inmunoglobulina con el antígeno intervienen aproximadamente de 50 a 70 residuos de a.a, distribuidos en las 6 regiones CDR (3 de cada cadena), aunque se conoce que dicha unión implica verdaderamente entre 10 y 20 a.a del CDR de cada paratopo individual con un número similar de a.a del epítipo del antígeno. De ahí que un grupo importante de residuos aminoacídicos del CDR también pueden reaccionar con aquellos aminoácidos que suministran el andamiaje de la unión y que tienen semejanzas con los que dieron lugar a la inmunoglobulina (27). Esto pudiera explicar el mejor reconocimiento con sueros de DENV-3, un menor reconocimiento de los anticuerpos anti- DENV-4 y muy poco de los anticuerpos anti - DENV-1. El mimotopo de la proteína NS4B del dengue se seleccionó con sueros anti-DENV- 3. Como muestra la figura 9 este mimotopo presento homología parcial con la región entre los a.a (164-172) de la proteína NS4B de los cuatro serotipos, epítipo que dio lugar a las anticuerpos. Para DENV-1 en el residuo 172 se encuentra una Isoleucina¹⁷² y el resto de los serotipos en este residuo incluyen la Valina¹⁷², si tenemos

en cuenta que el tamaño de la isoleucina es mayor, este cambio de a.a pudiera estar influyendo igualmente en esta diferencia del reconocimiento para el serotipo DENV-1.

Péptido presentado en los fagos 2,15 y 35 **FERVPGEV**

NS4B Dengue 1 160YDAK	FEKQLGQI	MLLILC
NS4B Dengue 2 160YDPK	FEKQLGQV	MLLVLC
NS4B Dengue 3159FDSK	FEKQLGQV	MLLVLC
NS4B Dengue 4156YDPK	FEKQLGQV	MLLVLC

Figura. 9. Alineamiento del péptido mimotopo expuesto en los clones de los fagos 2,15 y 35 con la proteína NS4B de los cuatro serotipos del virus dengue.

La complementariedad entre el paratopo y el epítipo esta determinada por uniones físico químicas: puentes de hidrogeno, hidrofobicidad, enlaces electrostáticos y fuerzas de van der Waals. Es un hecho que este reconocimiento no ocurre solamente a nivel del residuo aminoacídico completo, sino que implica átomos individuales de cada residuo (27). De esta misma manera, pudiera estar influyendo en este resultado el hecho que los residuos de a.a no homólogos del mimotopo de esta región de NS4B a su vez muestran similitudes en sus propiedades físico-químicas.

Estos datos se correlacionan con estudios realizados por varios autores donde identificaron mimotopos específicos de serotipo utilizando la tecnología de presentación de péptidos en fagos, pero dichos mimotopos tuvieron dificultades para distinguir entre los otros serotipos (23, 24, 131). Teniendo en cuenta lo anterior y los resultados del presente trabajo, la evaluación de un panel de sueros inmunes con anticuerpos a DENV-2 permitirá definir el reconocimiento serotipo específico del mimotopo y su potencialidad como herramienta para la tipificación en el diagnóstico.

Estudios comparativos entre los MAP y los péptidos lineales muestran que el arreglo multimérico de los MAP permite superar la dificultad de los péptidos lineales para unirse a las superficies sólidas, resultando en una mejor capacidad de unión a dichas superficies

y por tanto, en un aumento de la sensibilidad en comparación con sus respectivos monómeros, por lo cual se han podido detectar concentraciones bajas de anticuerpos presentes en el suero (155, 197).

Los niveles de anticuerpos detectados cuando se empleó el MAP como antígeno de recubrimiento resultaron mayores que al emplear el péptido lineal conjugado a ABS; discrepando con resultados obtenidos por varios autores cuando han usado la conjugación del antígeno o péptidos a la proteína ABS para la detección serológica de la infección por el virus del dengue (129).

De lo anterior podemos afirmar que ambas construcciones peptídicas resultaron útiles, siendo el MAP el mejor formato, por lo cual se seleccionó para continuar el estudio con un mayor número de muestras pertenecientes al serotipo 3.

4.2.3 Reconocimiento del MAP NS4B por los anticuerpos producidos contra el virus en pacientes con diagnóstico de dengue.

El uso de los MAP se ha extendido para un diverso número de antígenos, con prometedoras aplicaciones en la medicina y la biología. Se ha planteado que los MAPs son capaces de unir una cantidad significativamente mayor de anticuerpos, y esto puede estar favorecido debido a que en la estructura del MAP el péptido antigénico representa más del 80% de la misma. El aumento del peso molecular y la repetición de la estructura del péptido en el MAP ha demostrado que mejora el reconocimiento de las células B y la especificidad del anticuerpo por el antígeno natural (130). Lázaro y colaboradores, en el año 2008 (194) desarrollaron el único estudio encontrado en la literatura revisada y que antecede al nuestro, donde se describe la presencia de anticuerpos a NS4B en muestras de pacientes con infección por DENV utilizando una proteína recombinante. Cuando se estudia la respuesta de anticuerpos a dengue se debe tener en cuenta fundamentalmente la dicotomía entre una infección primaria y una infección secundaria (198). Varios

autores han encontrado una prevalencia de anticuerpos frente a diversas proteínas no estructurales del dengue generalmente más alta en la infección secundaria (5-7, 76) y la infección secundaria constituye el factor de riesgo principal para el desarrollo de las formas severas de la enfermedad (78). Para estudiar si los anticuerpos anti-NS4B presentes en el suero se pueden relacionar con la etiopatogenia de la enfermedad, se evaluaron muestras de suero empleando el MAP NS4B. Se analizaron un total de 48 muestras de suero no pareadas que pertenecían a pacientes inmunes a DENV-3, con 5 a 7 días de iniciado los síntomas y postconvalescente de 2 meses, clasificados como infecciones primarias y secundarias.

En la Figura 10 se muestra que los sueros de pacientes con infección secundaria y de 5 a 7 días de comenzados los síntomas reaccionaron mejor con el MAP NS4B, estos resultados son coincidentes con los trabajos que describen una respuesta de anticuerpos a proteínas no estructurales mayor en las infecciones secundarias que en las infecciones primarias (7). Además se ha observado, que en las infecciones secundarias se detectan altos niveles de anticuerpos IgG en la fase aguda, los cuales se incrementan en las siguientes 2 semanas (199).

El MAP NS4B fue reconocido por el 92,3 % de los sueros clasificados como primarios y con el 100 % de los secundarios, de individuos en fase convalescente (Fig. 10), y se confirma que los niveles de anticuerpos de tipo IgG específica permanecen elevados durante varias semanas.

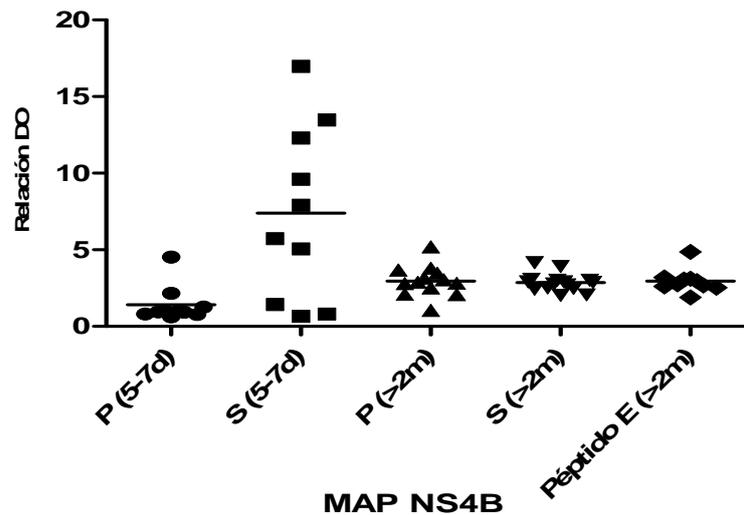


Figura. 10. Reactividad de los sueros positivos al MAP NS4B, en casos primarios (P) y secundarios (S). En el ensayo se emplearon muestras de sueros de pacientes con 5 días y de dos meses de inicio de los síntomas y positivas a anticuerpos contra DENV-3. El péptido E se incluyó como control positivo. Los resultados se expresan como la relación de M/ C donde M es la DO de la muestra positiva y C es la DO obtenida en la muestra control negativo. El valor de corte es cuando la relación $M/C \geq 2$

Anandarao y colaboradores en el 2005 (8) encontraron la presencia de anticuerpos tipo IgG específicos a NS4A de DENV en el suero de pacientes con DENV-2, utilizando péptidos sintéticos como antígenos de captura. Estudios previos han descrito aproximadamente un 50% de seroprevalencia de anticuerpos anti-NS4A en la infección secundaria (6). Los resultados del presente estudio correlacionan, por primera vez, la presencia de anticuerpos tipo IgG anti-NS4B en pacientes con infección primaria y secundaria a dengue, usando un MAP del mimotipo identificado como antígeno.

El péptido E (utilizado como control positivo del ELISA) presentó los niveles más elevados de reactividad para las muestras estudiadas, colectadas dos meses después del desarrollo de la enfermedad (Fig.10). Dicho péptido se identificó con el AcM H3-6, el cual tiene similitud con la secuencia correspondiente al segmento entre los a.a 393 y 401 de la proteína E, considerada la proteína inmunodominante del virión (112).

La identificación de anticuerpos se ha convertido en uno de los enfoques más prácticos en el diagnóstico del dengue. La mayoría de los métodos de detección de anticuerpos se basan en el uso de antígenos completos del virus del dengue. Los antígenos implicados en este tipo de ensayo son los de cerebro de ratón lactante (CRL) o cultivo celular. Para

su preparación se necesitan laboratorios con condiciones para el cultivo celular o animales de laboratorio, lo cual los convierte en un reactivo limitante y costoso. Estos extractos crudos de CRL presentan numerosos antígenos no específicos que no solo comprometen la sensibilidad y la especificidad de los ensayos sino que, además, se asocian con el peligro de riesgo biológico (17). Estas dificultades han aumentado el interés en el desarrollo de antígenos recombinantes y péptidos sintéticos con la finalidad de incrementar la especificidad del diagnóstico basado en la detección de anticuerpos y que además sean económicos, rápidos y fáciles de ejecutar. Los avances en el campo de los péptidos sintéticos han aumentado su interés en sus aplicaciones como formulaciones terapéuticas o profilácticas y para el desarrollo de métodos de diagnóstico para el virus del dengue (159). El uso de péptido epítipo en el diagnóstico tiene múltiples ventajas, que incluyen la definición química, seguridad, bajo costo, facilidad de fabricación y almacenamiento (125).

Otro aspecto importante, es la ventaja que ofrece el hecho de utilizar directamente las construcciones peptídicas para el paso de recubrimiento en los ensayos tipo ELISA que se emplean para el diagnóstico serológico de la infección por dengue. Estos ensayos utilizan anticuerpos fijados a la fase sólida de la placa para capturar el antígeno que debe ser reconocido por los anticuerpos presentes en la muestra a evaluar, lo cual aumenta un paso de reacción en el mismo (168).

La disponibilidad de bibliotecas de péptidos presentados en fagos ha proporcionado una poderosa herramienta para la selección de secuencias que imitan las propiedades de unión de los epítipos de antígenos naturales (mimotopos). En el presente estudio péptidos sintéticos derivados del mimotopo NS4B detectaron anticuerpos específicos de antígeno en el suero. Los mimotopos han generado grandes expectativas cuando se han utilizado en ensayos indirectos tipo ELISA para la detección de anticuerpos IgG e IgM. A pesar de que las secuencias aminoacídicas del epítipo de NS4B son similares entre

los cuatro serotipos, el mimotopo mostró un patrón de serotipo individual del virus (DENV-3) lo cual sería valioso en estudios epidemiológicos y en el diagnóstico del dengue. Este resultado avala lo obtenido por varios autores (23, 132, 134, 136, 138).

En resumen, en la evaluación del reconocimiento del mimotopo NS4B por anticuerpos producidos contra el virus dengue presentes en muestras de individuos inmunes, los mejores resultados se presentaron con DENV-3, en infección secundaria y aguda.

4.3. Evaluación de la capacidad inmunogénica del MAP NS4B.

Se inmunizaron ratones BALB/c con ACF y AIF con el objetivo de evaluar la inmunogenicidad del MAP que contiene el mimotopo de NS4B. El empleo de los adyuvantes tuvo como propósito la inducción de una respuesta inmune que permita demostrar la potencialidad de este mimotopo.

La inmunogenicidad del mimotopo se analizó primeramente mediante un ensayo ELISA, con la medición de los niveles de anticuerpos IgG totales anti-péptidos en los sueros colectados de los ratones inmunizados. Los sueros se ensayaron de forma individual utilizando como antígeno de captura el MAP NS4B. La respuesta de anticuerpos antipéptido se muestra en la Figura 11. Como se puede apreciar se constatan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$), los niveles de anticuerpos anti-péptido MAP NS4B fueron mayores que los del grupo control después de la cuarta dosis. El grupo control inmunizado con SSTF no desarrolló anticuerpos anti -NS4B en el tiempo evaluado.

Adicionalmente, se incluyó el péptido E como control negativo del ensayo, y en este caso no se observó reactividad, lo cual permitió descartar la posibilidad de un reconocimiento inespecífico de los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados con el MAP NS4B.

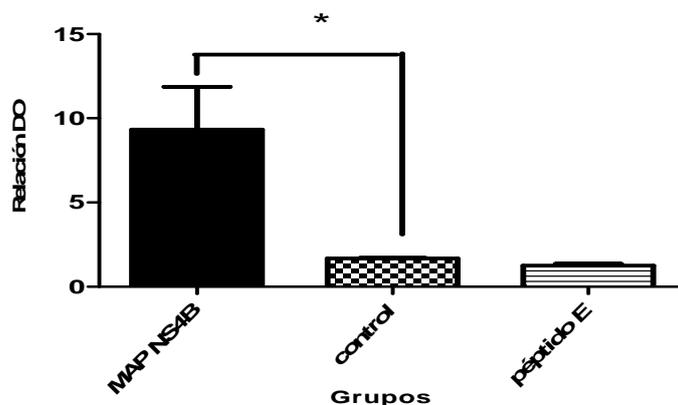


Figura. 11. Respuesta de anticuerpos anti-péptidos inducida al día 56 por el MAP NS4B. Los ratones recibieron cuatro dosis de 50 μ g del antígeno MAP NS4B. Los sueros se colectaron al día 0 y a los 15 días después de la cuarta dosis. Los Acs IgG se detectaron por ELISA y los sueros se utilizaron a una dilución fija de 1:50. Los resultados se expresan como la relación entre las DO del día 56, sobre la DO de los sueros pre-inmune para cada grupo \pm Desviación estándar. El valor de corte es una relación ≥ 2.0 . Análisis estadístico: Prueba de Mann Whitney. Las diferencias se indican en la figura como $p < 0.05^*$.

Varios trabajos abordan el uso de variantes peptídicas de proteínas virales del DENV principalmente, dominio III de la E, prM y proteínas no estructurales como, NS5, NS1, NS2a, NS3 y NS4A como inmunógenos (8, 158-162). La mayoría de estas formulaciones no solo indujeron anticuerpos anti-péptidos sino también mostraron títulos neutralizantes específicos de serotipo DENV comparables con otros candidatos vacunales de tipo atenuados o proteínas recombinantes.

En cuanto a la respuesta anti-viral, no se detectaron anticuerpos IgG totales específicos a DENV-3 mediante ELISA en los sueros de los animales inmunizados con el MAP NS4B, después de la cuarta inmunización. Los títulos inducidos por DENV-3 en los ratones para obtener LAH, usado como control positivo, resultaron elevados. La ausencia de anticuerpos anti-DENV-3, puede deberse a que para la evaluación de este tipo de respuesta se emplean cepas de DENV multiplicadas en CRL y a pesar de que dichas mezclas antigénicas están formadas por la mayoría de las proteínas del virus, es posible que la proteína NS4B se presente en baja proporción.

La proteína NS4B participa en la replicación del ARN viral, y se expresa en las primeras etapas del ciclo de vida del virus en la célula hospedera. Puede encontrarse en los sitios de replicación del ARN asociada a las membranas celulares específicamente del retículo endoplasmático rugoso. Este hecho ha sido demostrado satisfactoriamente mediante la técnica de inmunofluorescencia en diferentes sustratos celulares (164). Con estas consideraciones, nos propusimos realizar un estudio para determinar la cinética de expresión de la proteína NS4B en células de mosquitos, C636 HT durante la infección por virus del dengue. Las células C636 HT se infectaron con la cepa DENV-3 116/00 en un intervalo de tiempo entre 10 a 48 h post-infección, la expresión se detectó empleando una mezcla de sueros de los ratones inmunizados con el MAP NS4B. A las 10 h post-infección (pi) se observó una ligera fluorescencia en el citoplasma (Fig. 12A), mientras que la señal se hizo más intensa con un punteado en la región perinuclear del citoplasma principalmente a las 12h pi (Fig. 12B). Entre las 16 y 20h (Fig. 12C) después de la infección las células presentaron un patrón de tinción fuerte en el citoplasma, y alcanzó su mayor intensidad a las 24h pi (Fig. 12D). La intensidad de la señal disminuyó a partir de las 48h pi (Fig. 12E). El uso del suero policlonal con altas concentraciones de anticuerpos contra NS4B como control, permitió la identificación del antígeno viral en un corto período de tiempo (Fig. 12G). No se observó inmunofluorescencia en las células C6/36-HT no infectadas (Fig. 12F). Estos resultados, confirman los hallazgos previos de Miller y colaboradores (164), en los que la proteína NS4B se expresa en las etapas tempranas de la replicación viral en células de Hepatoma Humano, Huh-7 y en células de riñón de mono verde africano, Vero.

Similar a lo demostrado por estos autores, también encontramos que la proteína viral se localizó en la región alrededor del núcleo de las células infectadas, probablemente asociada a membranas producidas en el proceso de infección viral, con la mayor expresión a las 12 horas.

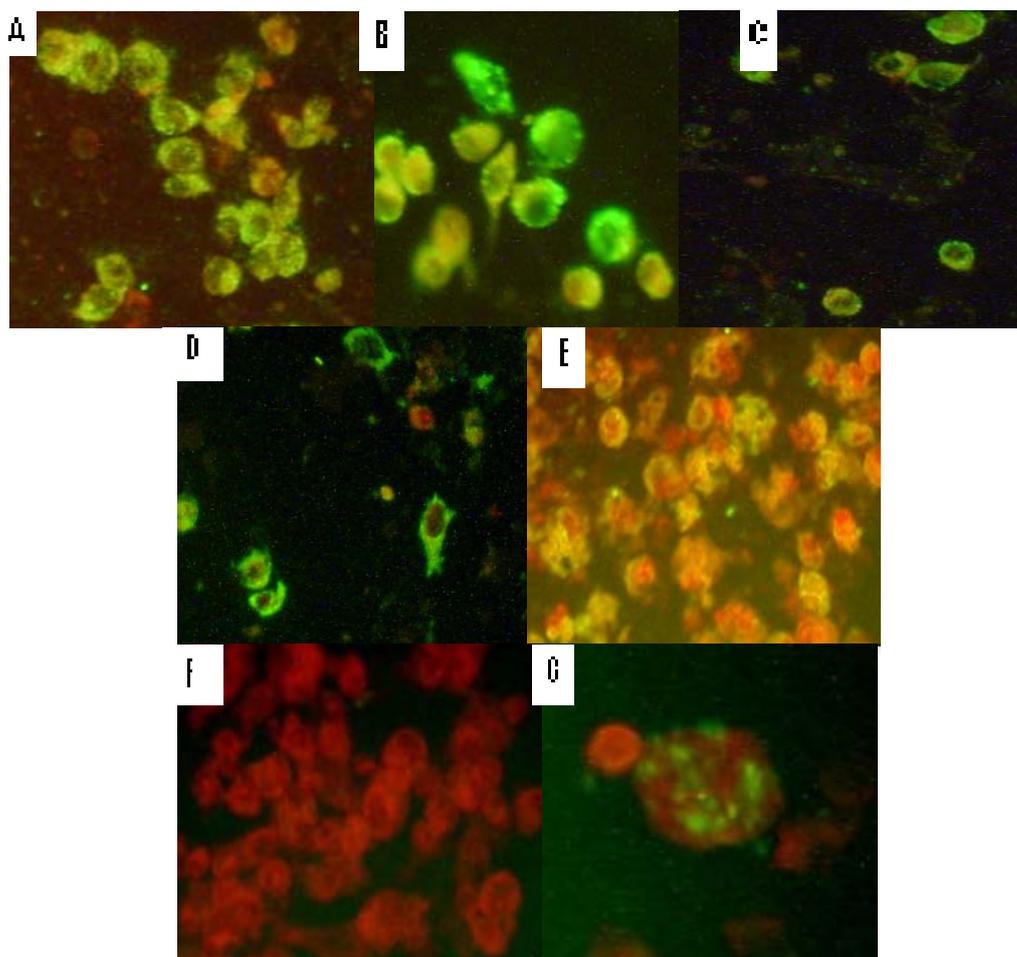


Figura 12. Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de las células C6/36 HT inoculadas con virus dengue 3. Las células infectadas reaccionaron con el suero de los ratones inmunizados con 50 μ g del antígeno MAP NS4B y un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína. En la presente figura se muestran los resultados de la IFI de las células 10h (A), 12h (B), 20h (C), 24h (D), y 48 h p.i. (E), Control negativo, células C6/36 HT no infectadas (F). Control positivo, antisuero policlonal contra la proteína NS4B (G). Magnificación 400X.

En el presente trabajo, se determinó la especificidad de la respuesta inducida por el MAP NS4B mediante una IFI, a las 12 horas posteriores a la infección con el virus, tiempo máximo de expresión de la proteína. Se detectó inmunofluorescencia en cuatro sueros de los 5 ratones inmunizados en comparación con los sueros de ratones pre-inmunes (figura 13, Anexo III). No se detectó fluorescencia en el suero obtenido a partir de los animales inmunizados con SSTF incorporados en los adyuvantes ACF y AIF, en células C6/36 HT

infectadas. Estos resultados muestran que el MAP NS4B indujo una respuesta específica a virus dengue en ratones BALB/c, 56 días después de la inmunización.

Es de aceptación general que altos títulos de anticuerpos antipéptidos, presentarán reactividad cruzada con la proteína nativa si la conformación del péptido que se emplea como inmunógeno es semejante a la del segmento correspondiente en la proteína nativa (125). Con los resultados anteriores, se puede afirmar que el MAP NS4B se comportó como un mimotopo inmunogénico de DENV en un contexto diferente al del fago y estimuló una respuesta inmune humoral específica.

En el caso de este virus, es necesario lograr un candidato vacunal que induzca protección contra los 4 serotipos, lo cual reviste extrema importancia, aunque en este primer acercamiento solo se evaluó la respuesta inducida con el serotipo 3 del virus como antígeno mediante IFI. Es importante tener en cuenta que esta pequeña región de la proteína NS4B es altamente conservada entre los cuatro serotipos del dengue (Fig. 9), por lo que es posible encontrar un comportamiento similar para los restantes serotipos.

En el presente trabajo se determinó mediante ELISA, el perfil de las subclases de IgG de los anticuerpos producidos contra el MAP NS4B, a partir de la mezcla de los sueros de los ratones inmunizados y del grupo control.

Como se muestra en la figura 14, a diferencia de lo observado con los niveles de anticuerpos del subtipo IgG1, los del subtipo IgG2a fueron elevados y al compararlos con los niveles de los controles (preinmune) fueron significativamente mayores ($p=0,004$).

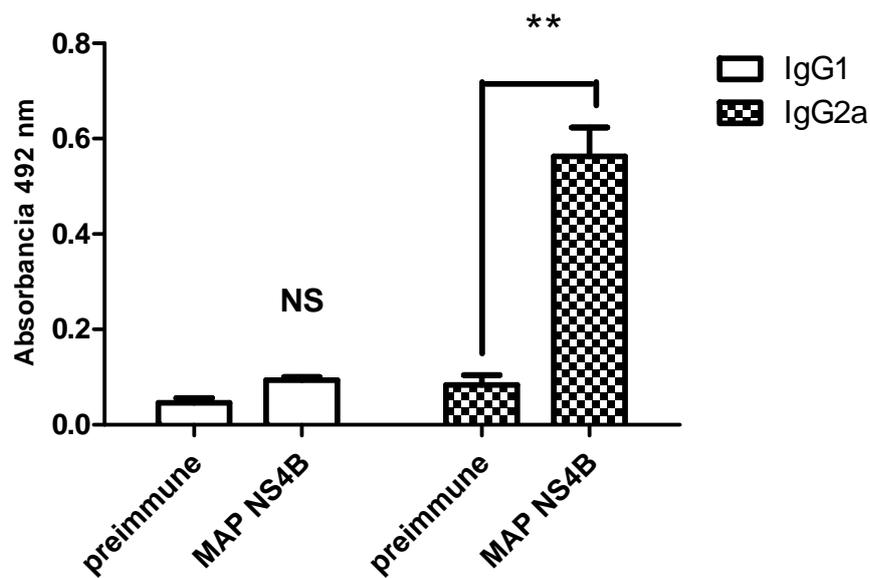


Figura 14. Perfil de subclases tipo IgG1 e IgG2a de los anticuerpos anti-péptidos inducidos al día 56 por el MAP NS4B. Se evaluaron mezclas de las muestras de sueros de los ratones. Los Acs IgG se detectaron por ELISA. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones +/- Desviación estándar. Análisis estadístico: Prueba de Mann Whitney. Las diferencias se indican en la figura como $P < 0,01$ ** y ns: no existencia de diferencias.

Dadas las diferencias estadísticamente significativas obtenidas al comparar los niveles del subtipo IgG1 e IgG2a en la respuesta contra MAP NS4B, se esperaría la inducción de un patrón de respuesta Th1, esta respuesta sería deseable, ya que este isotipo murino (IgG2a) se ha relacionado particularmente como eficaz para el control de la infección viral, contribuyendo a la protección contra el dengue, mientras que la respuesta de tipo Th2 influye en el desarrollo de la forma severa de la enfermedad (89).

El $IFN\gamma$ es un marcador de las células de fenotipo Th1, las cuales se asocian a la respuesta inmune contra patógenos intracelulares. Se describe por varios autores, una relación entre elevados niveles de $IFN\gamma$ y la gravedad de la enfermedad (200, 201), aunque también ha sido demostrado, su papel en el control de la infección (202, 203).

Los resultados obtenidos confirman lo previamente demostrado para un péptido de la proteína NS4 identificado por análisis bioinformático, el cual indujo una respuesta de anticuerpos anti-péptido no significativa, sin embargo, se comportó como un buen

inductor de $\text{IFN}\gamma$ por los dos tipos celulares de linfocitos T CD4 y CD8 + (162). Por otra parte, es de destacar que la región comprendida entre los a.a 164-171 de la proteína NS4B del dengue y que el mimotopo simula, fue identificada como un epítipo de células T por Van y colaboradores en el año 2006 (204). Debido a ello es necesario, en estudios futuros, medir la respuesta inmune celular y determinar qué patrón de citoquinas predomina al estimular linfocitos T CD8+ y CD4+ en el bazo de los ratones inmunizados con MAP NS4B.

Uno de los parámetros que confieren efectividad a un posible inmunógeno es su potencialidad de inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos significativa, para destruir las células infectadas por el virus en los estadios tempranos de la infección, y aun más provocar una respuesta de linfocitos T CD4+ que colaboren con la respuesta inmune humoral (89).

Lo expuesto corrobora la inmunogenicidad de la proteína NS4B del virus y su potencialidad de ser incluida en el diseño de candidatos vacunales resultado demostrado en este trabajo.

Los péptidos sintéticos y los MAP han demostrado ser valiosos en los estudios inmunológicos para el desarrollo de futuros candidatos vacunales contra diferentes agentes patógenos (139, 196, 205) y constituyen una estrategia útil para formular vacunas sintéticas de dengue (69). Estudios realizados por Amexis y colaboradores, 2007 (158), da Silva y colaboradores, 2009 (159), Shangfeng Li y colaboradores, 2011 (160) avalan este uso y muestran la habilidad de péptidos de epítipos B de la proteína E para inducir una respuesta de anticuerpos neutralizante, necesaria para la protección frente al reto viral, así como la producción de $\text{IFN}\gamma$ por las células T auxiliaadoras, objetivos principales en la obtención de un candidato vacunal.

Hallazgos precedentes donde igualmente utilizaron una proteína del virus no inmunodominante, la prM, brindaron resultados similares a los de la presente

investigación, sin embargo los péptidos evaluados en el citado estudio fueron capaces de inducir una respuesta neutralizante y protectora en los ratones inmunizados (161).

Los péptidos-mimotopos seleccionados de las bibliotecas de péptidos presentados en fagos son capaces de inducir una respuesta inmune específica de reactividad cruzada (21, 30, 196). Nuestros resultados constituyen el primer estudio de inmunogenicidad de un MAP de cuatro ramificaciones que contiene un péptido mimotopo de la proteína NS4B de DENV-3, en ratones BALB/c. Las evidencias previas sobre la presencia de anticuerpos inducidos por la proteína NS4B son escasas y provienen de la evaluación de las proteínas recombinantes con los sueros humanos inmunes al virus dengue (194).

Desde hace varios años, la OMS ha dirigido sus esfuerzos a la búsqueda de una vacuna contra el virus dengue. El objetivo principal es definir epítomos que puedan estar involucrados en la protección localizados en las principales proteínas diana de la respuesta inmune.

Epítomos de las células B se han identificado en diferentes proteínas estructurales y no estructurales del virus dengue (206) sin embargo, las características antigénicas e inmunogénicas de la proteína NS4B de virus del dengue, han sido poco exploradas. El empleo de bibliotecas de péptidos expuestas en fagos permitió identificar un péptido que mimetiza un epítomo de la proteína NS4B DENV-3, basado en el reconocimiento por anticuerpos contra el virus presente en el suero de los pacientes convalecientes. El hecho de que este epítomo- mimotopo de células B induce una respuesta de anticuerpos y la significación que pudieran tener dichos anticuerpos los cuales reconocieron al antígeno natural, demostró que el mismo pudiera ser biológicamente relevante y con potencial aplicación en el diseño de una vacuna contra el epítomo para prevenir la infección por virus dengue.

Como se observa en la Figura 9, la secuencia expuesta en los clones de los fagos 2, 15 y 35 presenta cuatro residuos homólogos con la proteína dengue NS4B (FERVPGEVT) en

las posiciones aa 164 al 165, 169, 171, esta región está altamente conservada entre los cuatro serotipos del virus (164). La evaluación de las similitudes en las propiedades físico-químicas de los residuos de a.a no homólogos es importante en el análisis estructural de las secuencias lineales. La Figura 9 muestra que este mimotopo difiere de la secuencia de NS4B en cuatro a.a (R166K, V167Q, P168L, E169Q) y estos residuos a su vez muestran similitudes en el tamaño, polaridad y carga neta, y la característica alifática. Estas similitudes fisicoquímicas podrían resultar en que el péptido adopte una conformación homóloga con el epítipo del virus del dengue, lo que explicaría el reconocimiento del péptido seleccionado por los anticuerpos anti-dengue, a pesar de la homología parcial de la secuencia con la proteína original.

Es interesante señalar que los estudios de topología de NS4B muestran que la secuencia homóloga con el mimotopo (aa 164-171) parece residir en la región transmembrana del retículo endoplásmico (164). Los resultados expuestos nos permiten sugerir que el epítipo NS4B que mimetiza el péptido expuesto en estos fagos pudiera hacerse accesible para la unión a los receptores de las células B, durante la lisis inducida por el efecto citopático provocado por el virus o por las células T citotóxicas (89). Otra posible explicación pudiera ser que durante el ciclo de replicación, la proteína NS4B puede sintetizarse en el citoplasma de las células dendríticas, los monocitos / macrófagos, y las células B, las cuales son las células dianas de la infección por el virus del dengue (51, 52). La proteína NS4B en el citoplasma de estas células infectadas, es degradada en péptidos que pueden ser reconocidos por los linfocitos T CD4⁺ asociados a las moléculas de HLA clase II.

4.4 Análisis de predicción de las regiones antigénicas para las células B y epítomos de las células T de la proteína NS4B del virus DENV-3 utilizando herramientas bioinformáticas.

La inmunoinformática consiste en la aplicación de las herramientas computacionales al estudio de las moléculas del sistema inmune y constituye una disciplina emergente, capaz de guiar el diseño de experimentos para responder a importantes interrogantes en la inmunobiología y la vacunología (207). La predicción de los epítomos de las células B podría disminuir en gran medida el trabajo experimental en la búsqueda de nuevos candidatos vacunales. Se han identificado epítomos de células B de las proteínas del virus dengue (206).

La tecnología de presentación de péptidos en la superficie de los bacteriófagos se aplica en la selección de determinantes antigénicos. Como resultado de esta investigación se identificó un mimotopo de la proteína NS4B de DENV por lo cual resultaría de interés, identificar nuevos epítomos con capacidad de ser reconocidos por las células B en la proteína NS4B basado en lo demostrado en este estudio acerca de la posible expresión del mimotopo identificado durante el curso de la enfermedad, que además fue capaz de inducir una respuesta inmune humoral específica.

Existen diversos servidores que permiten identificar la presencia de epítomos de células B en una proteína, uno de los utilizados para el análisis es el BcePred, el cual predice epítomos lineales de células B basado en las propiedades físico-químicas de la proteína de interés, tales como hidrofobicidad, flexibilidad, accesibilidad, presencia de lazos en la estructura, polaridad, exposición de epítomos en la superficie, propiedades antigénicas o una combinación de algunas de estas propiedades. La exactitud de la predicción para los modelos basados en estas propiedades varía de 52,7% a 57,53% (176). A través de dicho servidor se identificaron 27 epítomos de células B para las características físico-químicas

mencionadas, excepto para la correspondiente a la presencia de lazos en la estructura (Tabla 4). Igualmente se identificaron 27 epítomos de células B con puntuaciones entre 0,83 y 0,52 para el programa ABCpred (Tabla5). Este servidor se emplea ampliamente, ya que selecciona epítomos con un elevado porcentaje de seguridad (65,93%).

Tabla 4. Epítomos de células B identificados en la proteína NS4B del virus dengue 3 para cada propiedad físico-química seleccionada por el programa Bcepred.

Propiedades físico-químicas seleccionadas por Bcepred	<i>Secuencia de la proteína NS4B del virus dengue 3</i>
	NEMGLLETTKRDLGMSKEPGVVSPTS YLDVDLHPASAWTLYAVATTVITPML RHTIENSTANVSLAAIANQAVVLMGLDKGWPI SKMDLGVPLLALGCYSQVNP LTLTAAVLLLITHYAIIGPGLQAKATREAQKRTAAGIMKNPTVDGIMTIDLDSV IFDSKFEKQLGQVMLLVLC AVQLLL MRTSWALCEALTLATGPITTLWEGSPG KFWNTTIAVSMANIFRGSYLAGAGLAFSIMKSVGTGKR
Hidrofilicidad	ENSTANV, QAKATREAQKRTA, KNPTVDG, DSKFEKQ
Flexibilidad	GLLETTK, KATREAQ, VIFDSKFE , TLWEGSP, SIMKSVGTGK
Accesibilidad	LLETTKRDLG, LQAKATREAQKRTAAGIMKNPTVDG, FDSKFEKQLGQ , RHTIENS
Exposición en superficie	LETTKRDL, TREAQKRT, DSKFEKQL , TGKR
Polaridad	LLETTKRDL, MLRHTIENS, QAKATREAQKRTA, IFDSKFEKQLG
Antigenicidad	EPGVVSPTS YLDVDLHP, DLGVPLLALGCYSQVNPLTL VLLLITHY, QLGQVMLLVLC AVQLLL MR , IDLDSVIFD, VVLMGLD

La secuencia determinada “*in silico*” por BcePred que se señala en negrita es la correspondiente al mimotopo NS4B

Entre los epítomos B obtenidos por la combinación de ambas herramientas bioinformáticas (Tabla 4 y 5), se encuentra el correspondiente al mimotopo NS4B. Es de señalar, además, que este epítomo está altamente conservado entre los cuatro serotipos, según las comparaciones de la secuencia de a.a, que codifica para esta proteína evidenciada en la Figura 9. El estudio actual permitió describir por primera vez secuencias aminoacídicas de la proteína NS4B del virus DENV-3 implicadas en el reconocimiento de las células B.

Tabla 5. Epítomos de células B identificados en la proteína NS4B del virus dengue 3 por el programa ABCpred.

Número	Epítomos predichos ABCpred
1	DLDSVIFDSKFE
2	GPGLQAKATREA
3	AVVLMGLDKGWP
4	KFEKQLGQVMLL
5	LLETKRDLGMS
6	QVNPLTLTAAVL
7	DLGMSKEPGVVS
8	LTAAVLLLITHY
9	LHPASAWTLYAV
10	REAQKRTAAGIM
11	QLGQVMLLVLCA
12	ENSTANVSLAAI
13	TLYAVATTVITP
14	AIANQAVVLMGL
15	VSPTSYLDVDLH
16	VIFDSK FEKQLG
17	LALGCYSQVNPL
18	AKATREAQKRTA
19	KMDLGVPLLALG
20	ITPMLRHTIENS
21	VDGIMTIDLDSV
22	ITHYAIIGPGLQ
23	MGLDKGWPIKSM
24	SYLDVDLHPASA
25	LCAVQLLLMRTS
26	TAAGIMKNPTVD
27	KNPTVDGIMTID

La secuencia determinada “*in silico*” por ABCpred que se señala en negrita es la correspondiente al mimotopo NS4B

La respuesta inmune inducida por dengue incluye la inmunidad humoral, protagonizada por los anticuerpos neutralizantes, así como la respuesta de linfocitos T CD4+ tipo auxiliares y linfocitos T CD8 + tipo citotóxicas. El principal papel de la inmunidad celular es a través de la cooperación de los linfocitos T CD4+ y la lisis eficiente de las células infectadas, por las células T citotóxicas (53).

Los linfocitos T son capaces de reconocer los péptidos extraños en el contexto de las moléculas del HLA propio, a través de su receptor reconocen el determinante antigénico formado por un péptido asociado a las moléculas del HLA. Los linfocitos T CD4+ reconocen péptidos asociados a la molécula de HLA clase II, mientras que los linfocitos

T CD8⁺ reconocen péptidos asociados a la molécula de HLA clase I, este fenómeno se conoce como restricción por el HLA (27).

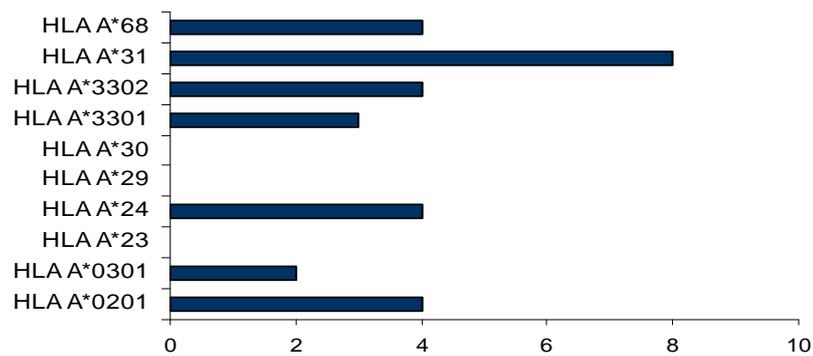
La variabilidad de los alelos HLA puede impactar en la respuesta inmune individual durante la vacunación. Numerosos algoritmos se desarrollan para realizar estudios de predicción de la posible afinidad de las secuencias peptídicas a los diferentes alelos HLA clase I y II, esta afinidad puede ser importante para el diseño de candidatos vacunales basados en epítomos (206).

Se ha demostrado que el virus del dengue incrementa la expresión de las moléculas HLA clase I y II en las células infectadas, en varios trabajos se describen epítomos T a lo largo de toda la poliproteína de los virus del dengue (206) los cuales se encuentran localizados principalmente en la proteína NS3, también se han identificado epítomos de linfocitos T en las proteínas virales C, M, NS5, NS4A y E, utilizando tanto los métodos computacionales como los métodos inmunológicos tradicionales (85). Por todo ello nos propusimos realizar una predicción de epítomos T de la proteína NS4B del serotipo viral dengue 3, los epítomos de linfocitos T se seleccionaron con respecto a los reportes de la distribución de los mismos en una muestra de la población de La Habana (180), un total de 126 epítomos T se identificaron en la proteína NS4B con el servidor HLA Pred; de ellos 101 HLA clase I y 11 clase II.

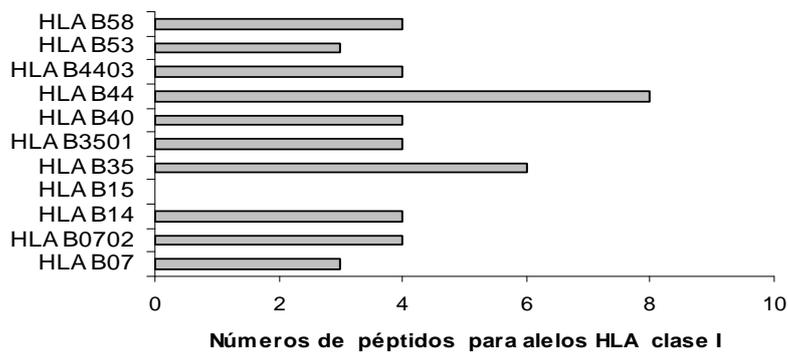
En las Figuras 15 y 16 se muestran el número de epítomos predichos con cada uno de los alelos incluidos en el análisis, tanto para la mayor cantidad de alelos posibles de los descritos para una muestra de la población cubana (180), así como para los asociados con la protección o susceptibilidad a la infección por virus del dengue (85).

Se lograron identificar 13 epítomos T promiscuos, utilizando los servidores Proped y Proped1, los cuales pueden unirse a varios alelos del HLA (Tabla 6, Anexo IV). Estos resultan potenciales candidatos vacunales debido a la posibilidad teórica que tienen de

unirse a una gran diversidad del producto de expresión de las variantes alélicas de las moléculas HLA existentes en las poblaciones y conformar determinantes antigénicos que son reconocidos por los linfocitos T(181). De esta manera, se amplían las posibilidades de inducir respuestas inmunes protectoras en el contexto del desarrollo de vacunas.



A)



B)

Figura. 15. Epítomos predichos de la proteína NS4B para alelos de clase I. A) Alelos HLA-A B) Alelos HLA-B.

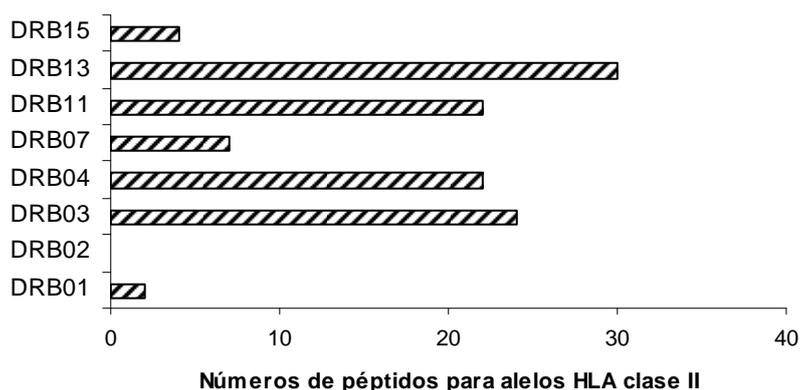


Figura. 16. Epítomos predichos de la proteína NS4B para alelos HLA de clase II.

El polimorfismo de los genes para los antígenos HLA se relaciona con la protección o la susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad por dengue. Sierra y colaboradores, en el año 2007 (85) demostraron que los alelos clase I HLA A31 y el HLA B15 tienen una frecuencia incrementada en individuos cubanos con historia de infección clínica por el virus del dengue. En este estudio de predicción de epítomos en la proteína NS4B se identificaron ocho péptidos para el alelo HLA A31 y no se encontró ningún epítomo para el alelo B15 (Fig. 15). En un trabajo previo realizado en la población de La Habana el alelo HLA clase I B15, se asoció con la forma grave de la enfermedad (180).

Investigaciones similares realizadas en una población vietnamita encontraron una fuerte asociación entre la presencia del alelo HLA A24 con las formas clínicas graves de la enfermedad (208), dicho alelo es uno de los más frecuentes expresados en el presente análisis, especialmente con cuatro péptidos de la proteína NS4B capaces de unirse al alelo A24.

Otros alelos clase I HLA A26 y 68 se identificaron y asociaron con posible riesgo para la aparición de las formas graves de la enfermedad en una población malaya (45). En este estudio de predicción de epítomos de la proteína NS4B de DENV-3 se presentó un total de cuatro péptidos capaces de unirse al alelo HLA A68 (Fig. 15).

La presencia de alelos asociados con la susceptibilidad a las formas severas de la enfermedad por dengue induciría una respuesta inmune patológica, por lo cual dichos epítomos deberán ser excluidos de un posible candidato vacunal contra el dengue.

La asociación positiva más descrita entre el polimorfismo de los genes HLA con la protección a la infección por virus dengue ha sido la presencia de los alelos protectores DRB107 y DRB104 (206), este estudio encontró un número importante de péptidos predichos en la proteína NS4B con capacidad para unirse a estos alelos (Fig. 16).

Otra investigación realizada en la población tailandesa demostró una asociación entre el alelo HLA B44 y la protección a padecer las formas graves de la enfermedad (206). La Figura 15 muestra el alelo HLA B44 descrito para ocho péptidos.

Aún cuando en este análisis de predicción se encontró numerosos epítomos que se relacionan con alelos de susceptibilidad a la infección por dengue, se detectó un número importante de alelos protectores. En este sentido, la utilización de estos últimos, como parte de una vacuna de subunidades antidengue, permitiría incluir en la formulación final dichos epítomos protectores de cada uno de los serotipos virales, lo que tendría implicaciones en la respuesta inmune a la vacunación.

Un determinante indispensable de inmunogenicidad para los péptidos es su capacidad de unión a las moléculas HLA. La selección de péptidos con especificidades de unión diferentes al HLA amplía la cobertura poblacional, condición aprovechable en el diseño de vacunas de subunidades.

La cobertura para alelos de HLA clase I resultó para la población cubana euroide del 59,93% y para la africanoide del 58,8% (Tabla.7). Teóricamente, la inclusión de este epítomo pudiera producir una adecuada estimulación de la respuesta inmune específica en la población utilizada como referencia, aunque debe tomarse en consideración que estos resultados no son extrapolables al conjunto de la población cubana debido al tamaño de

la muestra analizada y a la no representación en las poblaciones de distintas regiones del país .

Existen pocos trabajos en la literatura que identifican epítomos de células específicas del virus dengue protectores en diversas poblaciones del mundo, con la aplicación de métodos computacionales (45, 208-210). El uso de estos sistemas de estimación teórica de cobertura vacunal para poblaciones específicas, pudiera ser de gran utilidad para el desarrollo de vacunas, teniendo en cuenta la composición genética de poblaciones determinadas. En la Tabla 7 se presentan los porcentajes de cobertura en tres poblaciones diferentes tomadas como modelos: mexicanos, brasileños y malayos, los cuales difieren en su constitución genética, localización geográfica e incidencia de dengue.

La cobertura de los alelos HLA clase I correspondientes al epítomo en estudio fue similar al de las poblaciones de la región de las Américas. La población malaya mostró un valor relativamente más bajo en comparación con las restantes analizadas (Tabla 7). Dicha población esta conformada por diferentes grupos étnicos: malayo, indio y chino, con una diversidad genética que revela la frecuencia de las variantes alélicas HLA diferentes (45). El análisis de la cobertura poblacional se realizó a la población correspondiente al grupo étnico malayo, lo cual explica la diferencia encontrada con las restantes poblaciones que se estudiaron.

A pesar de que el epítomo en estudio no se presentó con igual cobertura para las diferentes poblaciones estudiadas sí presentó buenos porcentajes, lo cual sugiere que si se utilizara como parte de candidatos vacunales basados en epítomos pudiera obtenerse una adecuada respuesta protectora.

Tabla 7. Cobertura poblacional del epítipo –FEKQLGQV- correspondiente al mimotopo de la proteína NS4B para los alelos HLA clase I.

Población	HLA Clase I	Muestra poblacional (Donantes sanos)
Cubanos europoides	59,93%	129 (85)
Cubanos mestizos	58,18%	129 (85)
Brasileños	62,87%	101 (210)
Brasileños mestizos	54,26%	101(210)
Mexicanos	60,29%	90 (209)
Malayo	24,20%	95 (45)

La respuesta inmune contra el dengue incluye ambos alelos: HLA clase I y HLA clase II, por lo cual es importante considerar que se realice en el futuro un estudio relacionado con la presentación del epítipo de células T–**FEKQLGQV**- de la proteína NS4B para los alelos HLA clase II.

El estudio de predicción realizado en este trabajo permitió revelar nuevos epítipos de células B y T de la proteína NS4B del virus dengue 3, que pudieran estar implicados en la respuesta inmune al virus. La secuencia del mimotopo de la proteína NS4B fue predicha como un epítipo de células B y mostró elevada probabilidad de ser presentado por una proporción de individuos de la población cubana y de otras zonas geográficas. El empleo de las herramientas bioinformáticas tiene el potencial de acelerar las investigaciones, entre las que se encuentran el desarrollo de vacunas, lo cual en combinación con ensayos *in vitro* son una excelente estrategia para la identificación de péptidos inmunogénicos.

5. DISCUSIÓN INTEGRADA

En las últimas décadas se han aislado y caracterizado un gran número de péptidos de proteínas del virus del dengue, los que se han utilizado para estudiar la estructura antigénica de proteínas del virus (193, 211), y como nuevas herramientas para el diagnóstico y la identificación del serotipo de infección (156, 157). De igual forma, han demostrado su utilidad en la caracterización de epítomos específicos que pudieran constituir candidatos potenciales para el desarrollo de vacunas (158-160, 162).

El poder de la tecnología de exposición de péptidos en los fagos filamentosos, consiste en reducir antígenos proteicos complejos a pequeñas estructuras peptídicas que retengan las propiedades biológicas de dichos antígenos, de forma tal que se comporten como sustitutos de los mismos. Estas estructuras peptídicas o mimotopos revelan su potencialidad en el desarrollo de reactivos de nueva generación, de uso potencial en el diagnóstico o la prevención de las enfermedades infecciosas (32, 114).

Cuando se aplica dicha tecnología para la selección de secuencias de péptidos que mimetizan epítomos del virus dengue, los trabajos concuerdan desde un inicio hasta la actualidad en el empleo de AcMs como la estrategia más explorada. Los primeros trabajos permitieron, la identificación de epítomos reconocidos por AcMs específicos de serotipos, tanto para la proteína NS1, como para la proteína NS3 (131, 138). Estos péptidos mimotopos reconocieron la presencia de anticuerpos en muestras de sueros inmunes a dengue al utilizarse como antígenos de captura, en los ensayos desarrollados. Las evidencias acumuladas en estas investigaciones revelan que la especificidad del epítomo identificado siempre estuvo limitada a un serotipo, convirtiéndolo en una herramienta atractiva para la detección pero más que nada para la tipificación viral (23). Teniendo en cuenta que la utilidad de los sueros policlonales ha sido demostrada para la identificación de epítomos específicos relacionados con enfermedades virales (21, 28-30, 187) y que las bibliotecas de péptidos expuestos en los fagos filamentosos, han permitido

la caracterización de la respuesta inmune a dengue (33, 134, 138), con el presente trabajo nos propusimos como primer objetivo seleccionar mimotopos del virus del dengue. Los resultados demostraron que se identificaron epítomos de células B de las proteínas no estructurales del virus del dengue, NS3 y NS4B utilizando una biblioteca de péptidos presentados en fagos. Este trabajo confirmó lo descrito con anterioridad acerca de la presencia de anticuerpos a las proteínas NS4B y NS3 (7, 16, 194), al evidenciar la reacción del mimotopo NS4B con anticuerpos presentes en las muestras de los pacientes con infección de dengue.

Este trabajo mostró además, la capacidad de los péptidos sintéticos formados por el mimotopo de la proteína NS4B (ya sea acoplados a una proteína portadora ABS o en el formato peptídico MAP) para la detección de anticuerpos a tres de los cuatro serotipos del virus, presentes en el suero de individuos inmunes. Este resultado es de importancia si se tiene en cuenta que actualmente, se dedican grandes esfuerzos a la búsqueda de métodos rápidos, sensibles y a la vez específicos para la detección y la tipificación de los virus dengue (110). En este contexto la búsqueda de nuevos mimotopos del virus dengue a través de las bibliotecas de péptidos pudiera definir nuevos epítomos involucrados en la generación de la respuesta inmune específica y con reactividad cruzada. Los mimotopos identificados de estas dos proteínas del virus, son alternativas atractivas para aplicarse como sustitutos de antígenos en el diagnóstico serológico, ya que los antígenos que se emplean en estos momentos, tanto los provenientes de CRL como los de cultivo celular, utilizan para su obtención métodos engorrosos y costosos que entrañan además un riesgo biológico. Los péptidos mimotopos identificados pudieran utilizarse en la evaluación de las muestras de suero con el objetivo de verificar el serotipo de infección que circula en áreas endémicas o de baja circulación. Esta información resulta crucial para el cuidado y manejo de los pacientes así como para el control de la enfermedad

Una de las aplicaciones más importantes de la tecnología de exposición de péptidos en los fagos filamentosos es la identificación de péptidos que actúen como miméticos inmunogénicos y que sean capaces de inducir una respuesta de anticuerpos “*in vivo*” similar o idéntica a la utilizada para la selección del mimotopo (32). Una vez identificado y caracterizado el mimotopo de NS4B, se confirmó la inmunogenicidad utilizando un derivado sintético de la secuencia expuesta en el mismo. Los resultados mostraron, que el MAP NS4B fue capaz de generar una respuesta inmune en ratones BALB/c. El empleo de esta forma de presentación al sistema inmune, demostró que los MAP mantienen la multimericidad al estar formado por varias copias del péptido identificado, como cuando se utiliza para inmunizar el fago seleccionado directamente o el péptido unido a una proteína portadora (126).

Varios autores han demostrado que los anticuerpos generados no sólo se limitan a reconocer en inmunoensayos el péptido empleado en la inmunización, también es posible la generación de anticuerpos capaces de reconocer el antígeno original (130), por lo que se evaluó por IFI, la reactividad cruzada de los anticuerpos, desarrollados, al inmunizar con el MAP NS4B, con la proteína natural durante el ciclo de replicación viral. Como resultado se obtuvo una respuesta inmune humoral específica que reconoció al DENV-3 y que la conformación del péptido que se empleó como inmunógeno es semejante a la del segmento correspondiente en la proteína NS4B, por lo que esta conformación no se afecta al ser separada del fago que la expone.

Debido a que diferentes investigaciones han defendido el papel de la respuesta Th1/Th2 en la inmunopatogénesis de la enfermedad (89), se estudió la presencia de las subclases IgG1 e IgG2a en la respuesta contra MAP NS4B. Los resultados obtenidos sugieren un predominio de la respuesta tipo Th1, que se asocia a una adecuada recuperación y mejor evolución frente a la infección.

Actualmente se desarrollan varias estrategias para la obtención de una vacuna contra el dengue, entre las que se encuentran: las vacunas atenuadas por vía convencional, vacunas quiméricas o vacunas vivas atenuadas recombinantes, las vacunas de subunidad y las vacunas de ADN (112). Las evidencias expuestas hasta este punto, apoyan el uso de los mimotopos identificados como posibles candidatos vacunales utilizando estrategias de inmunización combinadas.

Los resultados sugieren además la presencia de un epítipo de células T. La aplicación de las herramientas computacionales al estudio de las moléculas del sistema inmune constituye una disciplina emergente, capaz de guiar el diseño de experimentos para responder a importantes interrogantes en la inmunobiología y la vacunología (207). Definir los epitopos del virus dengue que pueden estar involucrados en la protección o en la reacción inmunopatológica es de extremo interés en el desarrollo de vacunas. Por esta razón decidimos complementar los hallazgos experimentales con la posibilidad que ofrece explotar estas herramientas computacionales para predecir nuevos epítipos de células B y T de la proteína NS4B del virus dengue 3 que pudieran estar implicados en la respuesta inmune al virus. Los epítipos T y B identificados “*in silico*” sugieren la inclusión de algunos de ellos como parte de nuevos candidatos vacunales; además se identificó la secuencia del mimotopo de la proteína NS4B como un epítipo de células B y mostró elevada probabilidad de presentarse por una proporción de individuos de la población cubana y de otras zonas geográficas.

La presente investigación avala la potencialidad del empleo de las bibliotecas de péptidos expuestos en fagos para identificar péptidos que mimetizan epítipos biológicamente relevantes del virus dengue, basado en el reconocimiento de los péptidos por los anticuerpos contra el virus, presentes en el suero de los pacientes. Todos estos resultados constituyen un avance en cuanto a la disponibilidad de nuevas herramientas

de investigación y con una aplicación potencial en el diagnóstico, así como para el desarrollo de nuevos candidatos vacunales.

6. CONCLUSIONES

1. El uso de bibliotecas de péptidos presentados en fagos y sueros humanos inmunes permitió la identificación de mimotopos con similitud a las secuencias aminoacídicas de la proteína NS4B y NS3 del virus dengue.
2. El mimotopo de la proteína NS4B, en sus dos variantes peptídicas, fue capaz de detectar anticuerpos mayoritariamente al serotipo de selección en sueros humanos inmunes, mostrando su potencialidad como posible herramienta en el diagnóstico serotipo específico del virus dengue.
3. Las diferencias encontradas en la detección de anticuerpos de acuerdo a la infección primaria o secundaria, corroboran la relación de las proteínas no estructurales con la infección secundaria.
4. Los anticuerpos inducidos por el péptido mimotopo de NS4B reconocieron a la proteína en etapas tempranas de la infección viral, demostrando la importancia de la proteína NS4B en la respuesta inmune.
5. Se demostró la presencia “*in silico*” de epítomos de células T y B en la proteína NS4B que indican la potencialidad de esta proteína para ser incluida en formulaciones vacunales contra este virus.

7. RECOMENDACIONES

- 1.-Determinar la respuesta celular y el perfil de citoquinas tras la inmunización con el MAP de NS4B en ratones.
- 2.-Evaluar la capacidad protectora de la respuesta inmune inducida por el MAP de NS4B en ratones, a través del modelo de encefalitis viral por dengue.
- 3.- Obtener mimotopos específicos de los serotipos 1, 2 y 4 de los virus dengue a partir de bibliotecas de péptidos presentados en fagos filamentosos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol*. 2013;5:299-309.
2. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*. 1990 Oct;3(4):376-96.
3. Rodriguez-Roche R, Gould EA. Understanding the Dengue Viruses and Progress towards Their Control. *Biomed Res Int*. 2013;2013:690835.
4. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med*. 1970 Apr;42(5):311-28.
5. Churdboonchart V, Bhamarapavati N, Peampramprecha S, Sirinavin S. Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1991 May;44(5):481-93.
6. Se-Thoe SY, Ng MM, Ling AE. Retrospective study of Western blot profiles in immune sera of natural dengue virus infections. *J Med Virol*. 1999 Mar;57(3):322-30.
7. Valdes K, Alvarez M, Pupo M, Vazquez S, Rodriguez R, Guzman MG. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000 Sep;7(5):856-7.
8. Anandarao R, Swaminathan S, Khanna N. The identification of immunodominant linear epitopes of dengue type 2 virus capsid and NS4a proteins using pin-bound peptides. *Virus Res*. 2005 Sep;112(1-2):60-8.
9. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Aug 7;256(5517):495-7.
10. Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol*. 2001 Aug;75(16):7769-73.
11. Hermida Diaz C, Pupo M, Guzman Tirado MG, Gonzalez Garriga M, Marcet Sanchez R. Use of a dengue anti-complex monoclonal antibody in viral purification. *Rev Cubana Med Trop*. 1992;44(3):171-6.
12. Moreland NJ, Tay MY, Lim E, Rathore AP, Lim AP, Hanson BJ, et al. Monoclonal antibodies against dengue NS2B and NS3 proteins for the study of protein interactions in the flaviviral replication complex. *J Virol Methods*. 2012 Jan;179(1):97-103.
13. Pupo-Antunez M, Rodriguez H, Vazquez S, Vilaseca JC, Alvarez M, Otero A, et al. Monoclonal antibodies raised to the dengue-2 virus (Cuban: A15 strain) which recognize viral structural proteins. *Hybridoma*. 1997 Aug;16(4):347-53.
14. Tan CH, Yap EH, Singh M, Deubel V, Chan YC. Passive protection studies in mice with monoclonal antibodies directed against the non-structural protein NS3 of dengue 1 virus. *J Gen Virol*. 1990 Mar;71 (Pt 3):745-9.
15. Luo YY, Feng JJ, Zhou JM, Yu ZZ, Fang DY, Yan HJ, et al. Identification of a novel infection-enhancing epitope on dengue prM using a dengue cross-reacting monoclonal antibody. *BMC Microbiol*. 2013 Aug 29;13(1):194.
16. dos Santos FB, Miagostovich MP, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Riley LW, Harris E. Analysis of recombinant dengue virus polypeptides for dengue diagnosis and evaluation of the humoral immune response. *Am J Trop Med Hyg*. 2004 Aug;71(2):144-52.
17. Maldaner FR, Aragao FJ, dos Santos FB, Franco OL, da Rocha Queiroz Lima M, de Oliveira Resende R, et al. Dengue virus tetra-epitope peptide expressed in

lettuce chloroplasts for potential use in dengue diagnosis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013 Jul;97(13):5721-9.

18. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985 Jun 14;228(4705):1315-7.

19. Menendez T, Santiago-Vispo NF, Cruz-Leal Y, Coizeau E, Garay H, Reyes O, et al. Identification and characterization of phage-displayed peptide mimetics of *Neisseria meningitidis* serogroup B capsular polysaccharide. *Int J Med Microbiol.* 2010 Jan;301(1):16-25.

20. Gazarian KG, Palacios-Rodriguez Y, Gazarian TG, Huerta L. HIV-1 V3 loop crown epitope-focused mimotope selection by patient serum from random phage display libraries: implications for the epitope structural features. *Mol Immunol.* 2013 Jun;54(2):148-56.

21. Zhong Y, Cai J, Zhang C, Xing X, Qin E, He J, et al. Mimotopes selected with neutralizing antibodies against multiple subtypes of influenza A. *Virology.* 2011;8:542.

22. Folgori A, Luzzago A, Monaci P, Nicosia A, Cortese R, Felici F. Identification of disease-specific epitopes. *Methods Mol Biol.* 1998;87:195-208.

23. Wu HC, Huang YL, Chao TT, Jan JT, Huang JL, Chiang HY, et al. Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. *J Clin Microbiol.* 2001 Mar;39(3):977-82.

24. Wu HC, Jung MY, Chiu CY, Chao TT, Lai SC, Jan JT, et al. Identification of a dengue virus type 2 (DEN-2) serotype-specific B-cell epitope and detection of DEN-2-immunized animal serum samples using an epitope-based peptide antigen. *J Gen Virol.* 2003 Oct;84(Pt 10):2771-9.

25. Chen YC, Huang HN, Lin CT, Chen YF, King CC, Wu HC. Generation and characterization of monoclonal antibodies against dengue virus type 1 for epitope mapping and serological detection by epitope-based peptide antigens. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Apr;14(4):404-11.

26. Casey JL, Coley AM, Parisi K, Foley M. Peptide mimics selected from immune sera using phage display technology can replace native antigens in the diagnosis of Epstein-Barr virus infection. *Protein Eng Des Sel.* 2009 Feb;22(2):85-91.

27. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Elsevier/Saunders (eds). Seventh Edition. Philadelphia: Estados Unidos. 2011.

28. Prezzi C, Nuzzo M, Meola A, Delmastro P, Galfre G, Cortese R, et al. Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients. *J Immunol.* 1996 Jun 1;156(11):4504-13.

29. Santamaria H, Manoutcharian K, Rocha L, Gonzalez E, Acero G, Govezensky T, et al. Identification of peptide sequences specific for serum antibodies from human papillomavirus-infected patients using phage display libraries. *Clin Immunol.* 2001 Dec;101(3):296-302.

30. Houimel M, Dellagi K. Peptide mimotopes of rabies virus glycoprotein with immunogenic activity. *Vaccine.* 2009 Jul 23;27(34):4648-55.

31. Irving MB, Pan O, Scott JK. Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. *Curr Opin Chem Biol.* 2001 Jun;5(3):314-24.

32. Wang LF, Yu M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics. *Curr Drug Targets.* 2004 Jan;5(1):1-15.

33. Chan AH, Tan HC, Chow AY, Lim AP, Lok SM, Moreland NJ, et al. A human PrM antibody that recognizes a novel cryptic epitope on dengue E glycoprotein. *PLoS One*. 2012;7(4):e33451.
34. Lindenbach BD RC. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Knippe DM HP, editor. *Fields Virology*. London: Lippincott Williams & Wilkins;; 2007. p. 991-1042.
35. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*. 1990;44:649-88.
36. Randolph VB, Stollar V. Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. *J Gen Virol*. 1990 Aug;71 (Pt 8):1845-50.
37. Nowak T, Wengler G. Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus. *Virology*. 1987 Jan;156(1):127-37.
38. Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*. 1995 May 25;375(6529):291-8.
39. Rey FA. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 10;100(12):6899-901.
40. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002 Mar 8;108(5):717-25.
41. Gromowski GD, Barrett AD. Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. *Virology*. 2007 Sep 30;366(2):349-60.
42. Parrish CR, Woo WS, Wright PJ. Expression of the NS1 gene of dengue virus type 2 using vaccinia virus. Dimerisation of the NS1 glycoprotein. *Arch Virol*. 1991;117(3-4):279-86.
43. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 2002 Oct 15;186(8):1165-8.
44. Chambers TJ, McCourt DW, Rice CM. Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B, and NS4B: identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. *Virology*. 1989 Mar;169(1):100-9.
45. Appanna R, Ponnampalavanar S, Lum Chai See L, Sekaran SD. Susceptible and protective HLA class I alleles against dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in a Malaysian population. *PLoS One*. 2010;5(9).
46. Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol*. 2006 Sep;87(Pt 9):2605-14.
47. Munoz-Jordan JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martinez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, et al. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol*. 2005 Jul;79(13):8004-13.
48. Kelley JF, Kaufusi PH, Volper EM, Nerurkar VR. Maturation of dengue virus nonstructural protein 4B in monocytes enhances production of dengue hemorrhagic fever-associated chemokines and cytokines. *Virology*. 2011 Sep 15;418(1):27-39.
49. Xie X, Wang QY, Xu HY, Qing M, Kramer L, Yuan Z, et al. Inhibition of dengue virus by targeting viral NS4B protein. *J Virol*. 2011 Nov;85(21):11183-95.

50. Tan BH, Fu J, Sugrue RJ, Yap EH, Chan YC, Tan YH. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology*. 1996 Feb 15;216(2):317-25.
51. Marovich M, Grouard-Vogel G, Louder M, Eller M, Sun W, Wu SJ, et al. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2001 Dec;6(3):219-24.
52. Kou Z, Quinn M, Chen H, Rodrigo WW, Rose RC, Schlesinger JJ, et al. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol*. 2008 Jan;80(1):134-46.
53. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*. 2006 Dec;80(23):11418-31.
54. Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, Staropoli I, Fong S, Amara A, et al. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem*. 2003 May 30;278(22):20358-66.
55. Hilgard P, Stockert R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology*. 2000 Nov;32(5):1069-77.
56. Moreno-Altamirano MM, Sanchez-Garcia FJ, Munoz ML. Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2. *J Gen Virol*. 2002 May;83(Pt 5):1123-30.
57. Thepparit C, Smith DR. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol*. 2004 Nov;78(22):12647-56.
58. Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol*. 1995 Feb;69(2):695-700.
59. Clyde K, Harris E. RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *J Virol*. 2006 Mar;80(5):2170-82.
60. Westaway EG, Khromykh AA, Mackenzie JM. Nascent flavivirus RNA colocalized in situ with double-stranded RNA in stable replication complexes. *Virology*. 1999 May 25;258(1):108-17.
61. Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev SV, Sedlak D, et al. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J*. 2003 Jun 2;22(11):2604-13.
62. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M, Vazques S, et al. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol*. 2000 Nov 1;152(9):793-9; discussion 804.
63. Endy TP, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Libraty DH, Green S, Rothman AL, et al. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am J Epidemiol*. 2002 Jul 1;156(1):40-51.
64. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg*. 1952 Jan;1(1):30-50.
65. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jul;11(3):480-96.
66. Carlos CC, Oishi K, Cinco MT, Mapua CA, Inoue S, Cruz DJ, et al. Comparison of clinical features and hematologic abnormalities between dengue fever

and dengue hemorrhagic fever among children in the Philippines. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Aug;73(2):435-40.

67. Diaz A, Kouri G, Guzman MG, Lobaina L, Bravo J, Ruiz A, et al. Description of the clinical picture of dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) in adults. *Bull Pan Am Health Organ.* 1988;22(2):133-44.

68. Horstick O, Farrar J, Lum L, Martinez E, San Martin JL, Ehrenberg J, et al. Reviewing the development, evidence base, and application of the revised dengue case classification. *Pathog Glob Health.* 2012 May;106(2):94-101.

69. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Dec;8(12 Suppl):S7-16.

70. Gutierrez G, Gresh L, Perez MA, Elizondo D, Aviles W, Kuan G, et al. Evaluation of the Diagnostic Utility of the Traditional and Revised WHO Dengue Case Definitions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(8):e2385.

71. Cantelar de Francisco N, Fernandez A, Albert Molina L, Perez Balbis E. Survey of dengue in Cuba. 1978-1979. *Rev Cubana Med Trop.* 1981 Jan-Apr;33(1):72-8.

72. Kouri G, Mas P, Guzman MG, Soler M, Goyenechea A, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: rapid diagnosis of the etiologic agent. *Bull Pan Am Health Organ.* 1983;17(2):126-32.

73. Kouri G, Guzman MG, Valdes L, Carbonel I, del Rosario D, Vazquez S, et al. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis.* 1998 Jan-Mar;4(1):89-92.

74. Guzman MG, Pelegrino JL, Pumariega T, Vazquez S, Gonzalez L, Kouri G, et al. Quality control of the serological diagnosis of dengue in laboratories throughout the Americas, 1996-2001. *Rev Panam Salud Publica.* 2003 Dec;14(6):371-6.

75. Pelaez O, Guzman MG, Kouri G, Perez R, San Martin JL, Vazquez S, et al. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerg Infect Dis.* 2004 Apr;10(4):719-22.

76. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 2000 Jan;181(1):2-9.

77. Libraty DH, Endy TP, Hough HS, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis.* 2002 May 1;185(9):1213-21.

78. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol.* 2013 Jul;158(7):1445-59.

79. Huang KJ, Yang YC, Lin YS, Huang JH, Liu HS, Yeh TM, et al. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):2825-32.

80. Boonnak K, Slike BM, Burgess TH, Mason RM, Wu SJ, Sun P, et al. Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol.* 2008 Apr;82(8):3939-51.

81. Mehlhop E, Ansarah-Sobrinho C, Johnson S, Engle M, Fremont DH, Pierson TC, et al. Complement protein C1q inhibits antibody-dependent enhancement of flavivirus infection in an IgG subclass-specific manner. *Cell Host Microbe.* 2007 Dec 13;2(6):417-26.

82. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):821-3.
83. Soundravally R, Hoti SL. Significance of transporter associated with antigen processing 2 (TAP2) gene polymorphisms in susceptibility to dengue viral infection. *J Clin Immunol.* 2008 May;28(3):256-62.
84. Soundravally R, Hoti SL. Polymorphisms of the TAP 1 and 2 gene may influence clinical outcome of primary dengue viral infection. *Scand J Immunol.* 2008 Jun;67(6):618-25.
85. Sierra B, Alegre R, Perez AB, Garcia G, Sturn-Ramirez K, Obasanjo O, et al. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol.* 2007 Jun;68(6):531-40.
86. Chaturvedi U, Nagar R, Shrivastava R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006 Jul;47(2):155-66.
87. Vejbaesya S, Luangtrakool P, Luangtrakool K, Kalayanaroj S, Vaughn DW, Endy TP, et al. TNF and LTA gene, allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais. *J Infect Dis.* 2009 May 15;199(10):1442-8.
88. Garcia G, Sierra B, Perez AB, Aguirre E, Rosado I, Gonzalez N, et al. Asymptomatic dengue infection in a Cuban population confirms the protective role of the RR variant of the FcγRIIa polymorphism. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Jun;82(6):1153-6.
89. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* 2011 Aug;11(8):532-43.
90. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003 Jul;9(7):921-7.
91. Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Avirutnan P, Jairungsri A, et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol.* 2006 Mar 15;176(6):3821-9.
92. Sierra B, Garcia G, Perez AB, Morier L, Rodriguez R, Alvarez M, et al. Long-term memory cellular immune response to dengue virus after a natural primary infection. *Int J Infect Dis.* 2002 Jun;6(2):125-8.
93. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008 Aug;53(3):287-99.
94. Gagnon SJ, Mori M, Kurane I, Green S, Vaughn DW, Kalayanaroj S, et al. Cytokine gene expression and protein production in peripheral blood mononuclear cells of children with acute dengue virus infections. *J Med Virol.* 2002 May;67(1):41-6.
95. Pacsa AS, Agarwal R, Elbishbishi EA, Chaturvedi UC, Nagar R, Mustafa AS. Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000 Jun;28(2):151-5.
96. Chaturvedi UC, Shrivastava R, Tripathi RK, Nagar R. Dengue virus-specific suppressor T cells: current perspectives. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007 Aug;50(3):285-99.
97. Agarwal R, Elbishbishi EA, Chaturvedi UC, Nagar R, Mustafa AS. Profile of transforming growth factor-beta 1 in patients with dengue haemorrhagic fever. *Int J Exp Pathol.* 1999 Jun;80(3):143-9.

98. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol*. 1999 Nov;59(3):329-34.
99. Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, et al. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol*. 1998 Nov;56(3):280-5.
100. Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, 3rd, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science*. 1991 Oct 4;254(5028):99-102.
101. Chakravarti A, Kumaria R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res*. 2006 Jan;123(1):25-30.
102. Juffrie M, Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJ, et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Jul;65(1):70-5.
103. Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL, Lin YS, Huang KJ, Le BL, et al. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis*. 2004 Jan 15;189(2):221-32.
104. Shi YJ, Jiang ZY, Zeng K. [Effect of IL-6 and TNF-alpha on Dengue virus infection of human dendritic cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2006 Jul;22(4):469-71.
105. Teixeira MG, Barreto ML. Diagnosis and management of dengue. *BMJ*. 2009;339:b4338.
106. Domingo C, de Ory F, Sanz JC, Reyes N, Gascon J, Wichmann O, et al. Molecular and serologic markers of acute dengue infection in naive and flavivirus-vaccinated travelers. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Sep;65(1):42-8.
107. de Araujo JM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, Dos Santos FB, Cardoso MA, Britto C, et al. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J Virol Methods*. 2009 Jan;155(1):34-8.
108. Sadon N, Delers A, Jarman RG, Klungthong C, Nisalak A, Gibbons RV, et al. A new quantitative RT-PCR method for sensitive detection of dengue virus in serum samples. *J Virol Methods*. 2008 Oct;153(1):1-6.
109. Anwar A, Wan G, Chua KB, August JT, Too HP. Evaluation of pre-analytical variables in the quantification of dengue virus by real-time polymerase chain reaction. *J Mol Diagn*. 2009 Nov;11(6):537-42.
110. Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis*. 2004 Mar;8(2):69-80.
111. Zambrano-Mora BM. Estado actual de las vacunas contra el Dengue. *Perspectivas. Rev Biomed*. 2010; 21(3):197-211.
112. Guzman MG, Hermida L, Bernardo L, Ramirez R, Guillen G. Domain III of the envelope protein as a dengue vaccine target. *Expert Rev Vaccines*. 2010 Feb;9(2):137-47.
113. Rasched I, Oberer E. Ff coliphages: structural and functional relationships. *Microbiol Rev*. 1986 Dec;50(4):401-27.
114. Haq IU, Chaudhry WN, Akhtar MN, Andleeb S, Qadri I. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virol J*. 2012;9:9.
115. Cesareni G. Peptide display on filamentous phage capsids. A new powerful tool to study protein-ligand interaction. *FEBS Lett*. 1992 Jul 27;307(1):66-70.

116. Jespers LS, Messens JH, De Keyser A, Eeckhout D, Van den Brande I, Gansemans YG, et al. Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. *Biotechnology (N Y)*. 1995 Apr;13(4):378-82.
117. Parmley SF, Smith GP. Filamentous fusion phage cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines. *Adv Exp Med Biol*. 1989;251:215-8.
118. Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*. 1990 Jul 27;249(4967):386-90.
119. Cwirla SE, Peters EA, Barrett RW, Dower WJ. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Aug;87(16):6378-82.
120. Luzzago A, Felici F, Tramontano A, Pessi A, Cortese R. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene*. 1993 Jun 15;128(1):51-7.
121. Santiago Vispo N, Felici F, Castagnoli L, Cesareni G. Hybrid Rop-pIII proteins for the display of constrained peptides on filamentous phage capsids. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1993;51(10-11):917-22.
122. Gao Jianming YW, Zhaoqi Liu, Zhiqiang Wang. Phage display and its application in vaccine design. *Ann Microbiol*. 2010;60:13-9.
123. de la Cruz VF, Lal AA, McCutchan TF. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J Biol Chem*. 1988 Mar 25;263(9):4318-22.
124. Deroo S, Muller CP. Antigenic and immunogenic phage displayed mimotopes as substitute antigens: applications and limitations. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2001 Feb;4(1):75-110.
125. Van Regenmortel MH. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. *Biologicals*. 2001 Sep-Dec;29(3-4):209-13.
126. Menéndez. Fagos filamentosos como inmunógenos. En *Combinatoria Molecular*. Vispo NS, editor. La Habana: Elfos Scientiae; 2004.
127. Alban SM, de Moura JF, Minozzo JC, Mira MT, Soccol VT. Identification of mimotopes of *Mycobacterium leprae* as potential diagnostic reagents. *BMC Infect Dis*. 2013;13:42.
128. Mehta J VDB, Devriese L, Rouah-Martin E, Bekaert K, Somers K, Somers V, Scippo M-L, Blust R and Robbens J. . The Use of Phages and Aptamers as Alternatives to Antibodies in Medical and Food Diagnostics. Komorowska M. A and Olsztynska-Janus S e, editor.: *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies InTech*, ; 2011.
129. Kumbhat S, Sharma K, Gehlot R, Solanki A, Joshi V. Surface plasmon resonance based immunosensor for serological diagnosis of dengue virus infection. *J Pharm Biomed Anal*. 2010 Jun 5;52(2):255-9.
130. Tam JP. Synthesis and applications of branched peptides in immunological methods and vaccine In: B G, editor. *Peptide: Synthesis, structures and applications*. New York: Academic press; 1995. p. 455-500.
131. Yao ZJ, Kao MC, Loh KC, Chung MC. A serotype-specific epitope of dengue virus 1 identified by phage displayed random peptide library. *FEMS Microbiol Lett*. 1995 Mar 15;127(1-2):93-8.
132. Jiang L, Zhou JM, Yin Y, Fang DY, Tang YX, Jiang LF. Selection and identification of B-cell epitope on NS1 protein of dengue virus type 2. *Virus Res*. 2010 Jun;150(1-2):49-55.

133. Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology*. 1998 Jul 5;246(2):317-28.
134. Thullier P, Demangel C, Bedouelle H, Megret F, Jouan A, Deubel V, et al. Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism. *J Gen Virol*. 2001 Aug;82(Pt 8):1885-92.
135. Guzman MG, Vazquez S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses*. 2010 Dec;2(12):2649-62.
136. Chung-I Rai H-YL, Yee-Shin Lin, Hsiao-Sheng Liu, Shun-Hua Chen,, Trai-Ming CL-CaY. Epitope Mapping of Dengue-Virus-Enhancing Monoclonal-Antibody Using Phage Display Peptide Library. *American Journal of Infectious Diseases* 2008 4 (1):76-84.
137. Chen Z, Tian Y, Liu L, An J. Production of a monoclonal antibody against non-structural protein 3 of dengue-2 virus by intrasplenic injection. *Hybridoma (Larchmt)*. 2008 Dec;27(6):467-71.
138. Tian Y, Chen W, Yang Y, Xu X, Zhang J, Wang J, et al. Identification of B cell epitopes of dengue virus 2 NS3 protein by monoclonal antibody. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 Oct 19.
139. Zhao G, Lin Y, Du L, Guan J, Sun S, Sui H, et al. An M2e-based multiple antigenic peptide vaccine protects mice from lethal challenge with divergent H5N1 influenza viruses. *Virol J*. 2010;7:9.
140. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Jul;5(7):518-28.
141. Haro I, Pinto RM, Gonzalez-Dankaart JF, Perez JA, Reig F, Bosch A. Anti-hepatitis A virus antibody response elicited in mice by different forms of a synthetic VP1 peptide. *Microbiol Immunol*. 1995;39(7):485-90.
142. Zhang F, Lu YJ, Malley R. Multiple antigen-presenting system (MAPS) to induce comprehensive B- and T-cell immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Aug 13;110(33):13564-9.
143. Calvo-Calle JM, Oliveira GA, Watta CO, Soverow J, Parra-Lopez C, Nardin EH. A linear peptide containing minimal T- and B-cell epitopes of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein elicits protection against transgenic sporozoite challenge. *Infect Immun*. 2006 Dec;74(12):6929-39.
144. Asahi-Ozaki Y, Itamura S, Ichinohe T, Strong P, Tamura S, Takahashi H, et al. Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. *Microbes Infect*. 2006 Oct;8(12-13):2706-14.
145. Pascual DM, Morales RD, Gil ED, Munoz LM, Lopez JE, Casanueva OL. Adjuvants: present regulatory challenges. *Vaccine*. 2006 Apr 12;24 Suppl 2:S2-88-9.
146. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol*. 2004 Oct;82(5):488-96.
147. Espuelas S, Roth A, Thumann C, Frisch B, Schuber F. Effect of synthetic lipopeptides formulated in liposomes on the maturation of human dendritic cells. *Mol Immunol*. 2005 Apr;42(6):721-9.
148. Haro I, Perez S, Garcia M, Chan WC, Ercilla G. Liposome entrapment and immunogenic studies of a synthetic lipophilic multiple antigenic peptide bearing VP1 and VP3 domains of the hepatitis A virus: a robust method for vaccine design. *FEBS Lett*. 2003 Apr 10;540(1-3):133-40.

149. Azizi A, Diaz-Mitoma F. Viral peptide immunogens: current challenges and opportunities. *J Pept Sci.* 2007 Dec;13(12):776-86.
150. Johansen P, Haffner AC, Koch F, Zepfer K, Erdmann I, Maloy K, et al. Direct intralymphatic injection of peptide vaccines enhances immunogenicity. *Eur J Immunol.* 2005 Feb;35(2):568-74.
151. Zhao K, Liu Q, Yu R, Li Z, Li J, Zhu H, et al. Screening of specific diagnostic peptides of swine hepatitis E virus. *Virology.* 2009;6:186.
152. Fernandez L, Chan WC, Egido M, Gomara MJ, Haro I. Synthetic peptides derived from an N-terminal domain of the E2 protein of GB virus C in the study of GBV-C/HIV-1 co-infection. *J Pept Sci.* 2012 May;18(5):326-35.
153. Dubois ME, Hammarlund E, Slifka MK. Optimization of peptide-based ELISA for serological diagnostics: a retrospective study of human monkeypox infection. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012 May;12(5):400-9.
154. Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Aug;85(15):5409-13.
155. Gomara MJ, Riedemann S, Vega I, Ibarra H, Ercilla G, Haro I. Use of linear and multiple antigenic peptides in the immunodiagnosis of acute hepatitis A virus infection. *J Immunol Methods.* 2000 Feb 3;234(1-2):23-34.
156. Garcia G, Vaughn DW, Del Angel RM. Recognition of synthetic oligopeptides from nonstructural proteins NS1 and NS3 of dengue-4 virus by sera from dengue virus-infected children. *Am J Trop Med Hyg.* 1997 Apr;56(4):466-70.
157. Huang JH, Wey JJ, Sun YC, Chin C, Chien LJ, Wu YC. Antibody responses to an immunodominant nonstructural 1 synthetic peptide in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol.* 1999 Jan;57(1):1-8.
158. Amexis G, Young NS. Multiple antigenic peptides as vaccine platform for the induction of humoral responses against dengue-2 virus. *Viral Immunol.* 2007 Dec;20(4):657-63.
159. da Silva AN, Nascimento EJ, Cordeiro MT, Gil LH, Abath FG, Montenegro SM, et al. Identification of continuous human B-cell epitopes in the envelope glycoprotein of dengue virus type 3 (DENV-3). *PLoS One.* 2009;4(10):e7425.
160. Li S, Peng L, Zhao W, Zhong H, Zhang F, Yan Z, et al. Synthetic peptides containing B- and T-cell epitope of dengue virus-2 E domain III provoked B- and T-cell responses. *Vaccine.* 2011 May 9;29(20):3695-702.
161. Vazquez S, Guzman MG, Guillen G, Chinea G, Perez AB, Pupo M, et al. Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. *Vaccine.* 2002 Mar 15;20(13-14):1823-30.
162. Sanchez-Burgos G, Ramos-Castaneda J, Cedillo-Rivera R, Dumonteil E. Immunogenicity of novel Dengue virus epitopes identified by bioinformatic analysis. *Virus Res.* 2010 Oct;153(1):113-20.
163. Alvarez Vera M, Valdes Palacios D, Vazquez Ramudo S, Delgado Hernandez I, Garcia Infante S, Morier Diaz L, et al. The standardization of the plaque reduction technic for differentiating a dengue infection from a yellow fever infection. *Rev Cubana Med Trop.* 1998;50(3):177-81.
164. Miller S, Sparacio S, Bartenschlager R. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J Biol Chem.* 2006 Mar 31;281(13):8854-63.
165. Burritt JB, Doss KW, Jesaitis AJ. Filamentous phage display of oligopeptide libraries. *Anal Biochem.* 1996;238:1-13.

166. Aguilar A, Camacho F, Martinez R, Huerta V, Garay H. E, Amin N et al Study of Peptide Mimetics of Hepatitis A Virus Conjugated 4 to Keyhole Limpet Hemocyanin and as Multiple Antigen Peptide System. *Int J Pept Res Ther. Int J Pept Res Ther.* 2014; 20(1): 33-42
167. OMS. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 59ª Asamblea General, 2008; Seúl, Corea.; 2008.
168. Vazquez S, Bravo JR, Perez AB, Guzman MG. Inhibition ELISA. Its utility for classifying a case of dengue. *Rev Cubana Med Trop.* 1997;49(2):108-12.
169. Vazquez S, Saenz E, Huelva G, Gonzalez A, Kouri G, Guzman M. Detection of IgM against the dengue++ virus in whole blood absorbed on filter paper. *Rev Panam Salud Publica.* 1998 Mar;3(3):174-8.
170. Felici F, Castagnoli L, Musacchio A, Jappelli R, Cesareni G. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J Mol Biol.* 1991 Nov 20;222(2):301-10.
171. Felici F, Galfre G, Luzzago A, Monaci P, Nicosia A, Cortese R. Phage-displayed peptides as tools for characterization of human sera. *Methods Enzymol.* 1996;267:116-29.
172. Sambrook J R, DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.
173. Burritt JB, Quinn MT, Jutila MA, Bond CW, Jesaitis AJ. Topological mapping of neutrophil cytochrome b epitopes with phage-display libraries. *J Biol Chem.* 1995 Jul 14;270(28):16974-80.
174. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10.
175. Jain E, Bairoch A, Duvaud S, Phan I, Redaschi N, Suzek BE, et al. Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:136.
176. Saha SR, G.P.S. BcePred: prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. In: Nicosia G, Cutello, V., Bentley, P.J., Timis, J., editor. *Artificial Immune Systems, Third International Conference 2004; Italy Catania, Sicily.* 2004. p. 197-204.
177. Bhasin M, Raghava GP. A hybrid approach for predicting promiscuous MHC class I restricted T cell epitopes. *J Biosci.* 2007 Jan;32(1):31-42.
178. Singh H, Raghava GP. ProPred1: prediction of promiscuous MHC Class-I binding sites. *Bioinformatics.* 2003 May 22;19(8):1009-14.
179. Singh H, Raghava GP. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics.* 2001 Dec;17(12):1236-7.
180. Paradoa ML MD, Acosta A, Sarmiento ME, Leyva J. Genes HLA en una muestra de la población cubana. *VacciMonitor.* 2000;9(3):1-5.
181. Bui HH, Sidney J, Dinh K, Southwood S, Newman MJ, Sette A. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:153.
182. Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res.* 1990 Mar;35(3):161-214.
183. Smith PK KR, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76-85.

184. Guide for the care and use of laboratory animal. EEC council Directive 86 / 09, OJL 358, 1, Dec. 12, 1987.
185. Gil L, Lopez C, Blanco A, Lazo L, Martin J, Valdes I, et al. The cellular immune response plays an important role in protecting against dengue virus in the mouse encephalitis model. *Viral Immunol.* 2009 Feb;22(1):23-30.
186. Roche RR, Alvarez M, Guzman MG, Morier L, Kouri G. Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C6/36-HT cells. *J Clin Microbiol.* 2000 Sep;38(9):3508-10.
187. Yang L, Cen J, Xue Q, Li J, Bi Y, Sun L, et al. Identification of rabies virus mimotopes screened from a phage display peptide library with purified dog anti-rabies virus serum IgG. *Virus Res.* 2013 Jun;174(1-2):47-51.
188. Casey JL, Coley AM, Street G, Parisi K, Devine PL, Foley M. Peptide mimotopes selected from a random peptide library for diagnosis of Epstein-Barr virus infection. *J Clin Microbiol.* 2006 Mar;44(3):764-71.
189. Sun EC, Zhao J, Yang T, Liu NH, Geng HW, Qin YL, et al. Identification of a conserved JEV serocomplex B-cell epitope by screening a phage-display peptide library with a mAb generated against West Nile virus capsid protein. *Viol J.* 2011;8:100.
190. Cabezas S, Rojas G, Pavon A, Alvarez M, Pupo M, Guillen G, et al. Selection of phage-displayed human antibody fragments on Dengue virus particles captured by a monoclonal antibody: application to the four serotypes. *J Virol Methods.* 2008 Feb;147(2):235-43.
191. Cabezas S, Rojas G, Pavon A, Bernardo L, Castellanos Y, Alvarez M, et al. Phage-displayed antibody fragments recognizing dengue 3 and dengue 4 viruses as tools for viral serotyping in sera from infected individuals. *Arch Virol.* 2009;154(7):1035-45.
192. Falconar AK. Use of synthetic peptides to represent surface-exposed epitopes defined by neutralizing dengue complex- and flavivirus group-reactive monoclonal antibodies on the native dengue type-2 virus envelope glycoprotein. *J Gen Virol.* 2008 Jul;89(Pt 7):1616-21.
193. Khan AM, Heiny AT, Lee KX, Srinivasan KN, Tan TW, August JT, et al. Large-scale analysis of antigenic diversity of T-cell epitopes in dengue virus. *BMC Bioinformatics.* 2006;7 Suppl 5:S4.
194. Lázaro L, Mellado, G., García, J., Escobar, A., Santos, L., Gutiérrez, B., et al. Analysis of antibody responses in human dengue patients from the mexican coast using recombinant antigens Vector Borne and zoonotic diseases. 2008; 8:69-79.
195. Mattioli S, Imberti L, Stellini R, Primi D. Mimicry of the immunodominant conformation-dependent antigenic site of hepatitis A virus by motifs selected from synthetic peptide libraries. *J Virol.* 1995 Sep;69(9):5294-9.
196. Garay H, Menendez T, Cruz-Leal Y, Coizeau E, Noda J, Morera V, et al. Study of various presentation forms for a peptide mimetic of *Neisseria meningitidis* serogroup B capsular polysaccharide. *Bioconjug Chem.* 2011 Jan 19;22(1):33-41.
197. Habluetzel A, Pessi A, Bianchi E, Rotigliano G, Esposito F. Multiple antigen peptides for specific detection of antibodies to a malaria antigen in human sera. *Immunol Lett.* 1991 Sep;30(1):75-80.
198. Wahala WM, Silva AM. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses.* 2013 Dec;3(12):2374-95.

199. Vazquez S, Perez AB, Ruiz D, Rodriguez R, Pupo M, Calzada N, et al. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *J Clin Virol.* 2005 Jun;33(2):132-7.
200. Imrie A, Meeks J, Gurary A, Sukhbataar M, Kitsutani P, Effler P, et al. Differential functional avidity of dengue virus-specific T-cell clones for variant peptides representing heterologous and previously encountered serotypes. *J Virol.* 2007 Sep;81(18):10081-91.
201. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 2008;8:86.
202. Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, Harris E. Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol.* 2000 Jun;74(11):4957-66.
203. Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, Alvarez M, et al. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol.* 2010 Nov;71(11):1135-40.
204. Van HV, Phuong, C.T.N., Thuoc, T.L. Establishing a genomic and proteomic database to assist the design of vaccine in silico and the prediction of epitopes towards a multivalent peptide vaccine against dengue virus Nong Lam university Ho Chi Minh city. 2006: 20 -1.
205. Choy WY, Lin SG, Chan PK, Tam JS, Lo YM, Chu IM, et al. Synthetic peptide studies on the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus spike glycoprotein: perspective for SARS vaccine development. *Clin Chem.* 2004 Jun;50(6):1036-42.
206. Vaughan K, Greenbaum J, Blythe M, Peters B, Sette A. Meta-analysis of all immune epitope data in the Flavivirus genus: inventory of current immune epitope data status in the context of virus immunity and immunopathology. *Viral Immunol.* 2010 Jun;23(3):259-84.
207. Tomar N, De RK. Immunoinformatics: an integrated scenario. *Immunology.* 2010 Oct;131(2):153-68.
208. Nguyen TP, Kikuchi M, Vu TQ, Do QH, Tran TT, Vo DT, et al. Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(10):e304.
209. Falcon-Lezama JA, Ramos C, Zuniga J, Juarez-Palma L, Rangel-Flores H, Garcia-Trejo AR, et al. HLA class I and II polymorphisms in Mexican Mestizo patients with dengue fever. *Acta Trop.* 2009 Nov;112(2):193-7.
210. Nigam P, Dellalibera E, Mauricio-da-Silva L, Donadi EA, Silva RS. Polymorphism of HLA class I genes in the Brazilian population from the Northeastern State of Pernambuco corroborates anthropological evidence of its origin. *Tissue Antigens.* 2004 Aug;64(2):204-9.
211. Leclerc C, Deriaud E, Megret F, Briand JP, Van Regenmortel MH, Deubel V. Identification of helper T cell epitopes of dengue virus E-protein. *Mol Immunol.* 1993 May;30(7):613-25.

9. ANEXOS

ANEXO I

Nueva clasificación de casos de dengue (OMS) (69)

Dengue con o sin signos de alarma		Dengue grave
Dengue probable	Signos de alarma	Criterio de severidad
Vivir o viajar a un país endémico	Dolor abdominal	Extravasación de plasma severa
Fiebre mas dos de los siguientes criterios:	Vómitos persistentes	Signos de choque
Nausea/ vómitos	Acumulación de fluidos	Acumulación de fluidos con distress respiratorio
Rash	Sangramientos en mucosas	Manifestaciones hemorrágicas severos
Urticaria y dolor	Letargo y/ inquietud	Daño de órganos severo
Prueba del Torniquete positiva	Hepatomegalia de >2 cm	Hígado TGP/TGO>1000
Leucopenia	Incremento hematocrito y disminución del conteo de plaquetas	SNC afectaciones de la conciencia
Cualquier signo de alarma		Corazón y otros órganos

ANEXO II

Instituto de Medicina Tropical: “Pedro Kouri”.

Investigador principal: **Dra. María G. Guzmán DrCs**

PLANILLA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Ciudad de la Habana, ----- del mes de ----- del 200 -----.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Yo ----- con carné de identidad -----

Conozco que:

El dengue es una enfermedad infecciosa transmitida por el mosquito *Aedes aegypti*, que afecta a toda la población. Puede cursar de forma asintomática o causar una enfermedad más grave que ponga en riesgo la vida de quien la padece. El Departamento de virología del IPK ha estado desarrollando estudios de importancia científica y social sobre esta patología. Este estudio permitirá profundizar en el conocimiento sobre la misma, y los factores de riesgo para padecer la forma más grave; además podré conocer si he padecido infección anterior con algún serotipo del dengue. Conociendo lo anteriormente expuesto hago constar por este medio mi consentimiento informado para participar en el estudio: “Papel de la infección secundaria en la epidemia de Dengue-4 de las provincias habaneras”.
Accediendo a la toma de una muestra de 10 ml de sangre para dicho estudio. Declaro que he sido informado del objetivo del estudio, que participo en el mismo de forma voluntaria y gratuita, conociendo además que tengo el derecho de abandonar el estudio en el momento en que lo desee.

Nombre y apellidos de quien recibe consentimiento:

Firma del paciente

ANEXO III

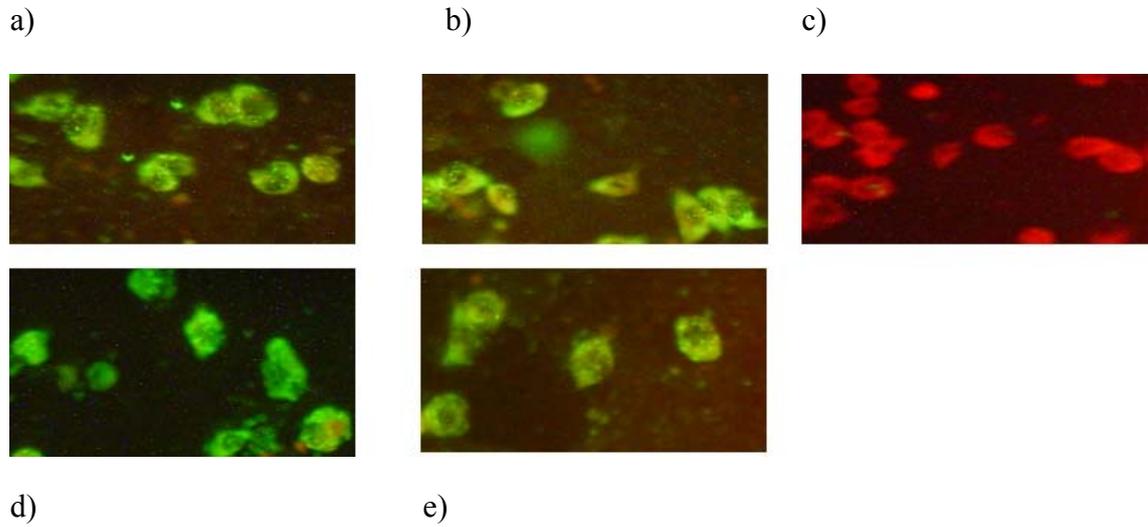


Figura 13. Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de las células C6/36 HT inoculadas con el virus dengue 3. Las partículas virales se detectaron con el suero de cada ratón inmunizado con el MAP NS4B, día 56 después de la inmunización, utilizando un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína. (a) ratón 1, (b) ratón 2, (c) ratón 3 (d) ratón 4 y (e) ratón 5. Aumento 400X.

ANEXO IV

Tabla 6. Epítomos promiscuos identificados en la proteína NS4B para alelos de HLA.

Secuencia	Alelos HLA tipo I	Alelos HLA tipo II
MGLLETTKR	HLA A*3302, HLA B35 B44	HLA DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0405, DRB1*0408, DRB1*0410, DRB1*0421, DRB1*0423, DRB1*0426, DRB5*0101, DRB5*010
MKSVGTGKR	HLA A20	HLA DRB5*0101, DRB5*0105
FRGSYLAGA	HLA B*2702	HLA DRB1*0305, DRB1*0309, DRB1*1101, DRB1*1307
LLLITHYAI	HLA A11, A3, A31	HLA DRB1*0701, DRB1*0703, DRB1*1501, DRB1*1506, DRB5*0101, DRB5*0105
LLITHYAI	HLA B*5201, B8	HLA DRB1*1501, DRB1*1506
LTLTAAVLL	HLA B7	HLA DRB1*0701, DRB1*0703
FSIMKSVGT	HLA A*3301	HLA DRB1*0101, DRB1*0102, DRB1*0405, DRB1*0408
LLLITHYAI	HLA A11, A3, A31,	HLA DRB1*0701, DRB1*0703, DRB1*1501, DRB1*1506, DRB5*0101, DRB5*0105
LYAVATTVI	HLA A11, A24, B*5201,	HLA DRB1*0404, DRB1*0423
MRTSWALCE	HLA A*2402	HLA DRB1*0817, DRB1*1321
VIFDSKFEK	HLA A*3101	HLA DRB1*0301, DRB1*0305, DRB1*0306, DRB1*0307, DRB1*0308 DRB1*0309, DRB1*0311, DRB1*1107
YAIIGPLQ	HLA A31, B8	HLA DRB1*0305, DRB1*0309, DRB1*0801, DRB1*0802, DRB1*0817, DRB1*1101, DRB1*1128, DRB1*1305, DRB1*1307, DRB1*1321, DRB5*0101, DRB5*0105
MLRHITIENS	HLA A*0205	HLA DRB1*0301, DRB1*0306, DRB1*0307, DRB1*0308 DRB1*0311, DRB1*0401, DRB1*0426, DRB1*1102, DRB1*1107, DRB1*1114, DRB1*1120, DRB1*1121, DRB1*1301, DRB1*1302, DRB1*1304, DRB1*1322, DRB1*1323, DRB1*1327, DRB1*1328

10. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR

Publicaciones de la tesis

Amin N, A Aguilar, F Camacho y col. Identification of dengue-specific B-cell epitopes by phage display random peptide library. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 2009; 16(4):4-14.

Amin N, Pupo M, Aguilar A, y col. Immunogenicity of NS4b Dengue 3 Virus Mimotope Presented to the Immune System as Multiple Antigen Peptide System, *ISRN Virology*, Volume 2013 (2013), Article ID 924057, 7 pages

Amin N, Fátima Reyes, Romel Calero, y col. Predicción de epítomos T y B de la proteína NS4b del virus dengue tipo 3. *VacciMonitor* 2013;22(3):14-21

Amin N, Pupo M, Vázquez S, y col. Recognition of a Multiple Antigenic Peptide containing sequence from mimotope of the dengue type 3 virus NS4b protein by human antibodies. *BMC Immunology*

Publicaciones relacionadas con el tema:

Larralde O, Martínez R, Camacho F, **Amin N**, Aguilar A y col. Identification of hepatitis A virus mimotopes by phage display, antigenicity and immunogenicity. *Journal of Virological Methods*.2007;140:49-58.

Camacho F, Puchades Y, Aguilar A, **Amin N**, García A, Otero O y col. Cromatografía de exclusión molecular como metodología para la purificación de bacteriófagos. *Vaccimonitor*. 2012; 2012; 21 (2):6-10.

Aguilar A, Camacho F, **Amin N**, Prieto JL, Garay HE, Reyes O, Acosta A. Comparación de la antigenicidad de dos construcciones peptídicas de mimotopos del virus de la hepatitis A empleando suero de ratones inmunizados. *Vaccimonitor*. 2013; 22(3):43-46

Presentaciones en eventos:

Simposio “25 años de experiencia en la lucha contra el dengue” IPK. Cuba. 2007
Evaluation of dengue phagotopes using a ELISA inhibition assay.
Use of hiperimmune ascetic fluid (HAF) to characterize phagotopes selected with human positive serum to dengue virus type 3. **Amin N**

Workshop Human RNA Viruses 2008..Italia Characterization of dengue phagotopes selected with human positive serum to dengue virus type 3. **Amin N**

Biotechnology Havana 2009.Cuba.2009. Identificación mediante la tecnología de expresión en fagos filamentosos, de mimotopes de proteínas No estructurales del virus Dengue de potencial aplicación al desarrollo de medios diagnósticos y vacunas. **Amin N**.

EMBO World Lecture course: Virus-Host partners in pathogenicity. 2010. Costa Rica Identification of B cell epitopes specific to dengue non structural proteins. **Amin N**

XII International dengue course. 2011. Cuba. B cell epitopes of dengue NS4B nonstructural protein identified by phage displayed peptides libraries: its possible implications of the humoral response. **Amin N**

Third Pan American Dengue Research Network Meeting. 2012. Colombia. Immunogenicity of NS4b Dengue 3 virus mimotope identified from the phage display peptide library **Amin N**