

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”



Centro de Investigaciones, Diagnóstico y Referencia

Departamento de Virología

***Título: Obtención y evaluación inmunológica de la proteína
recombinante NS3 del virus dengue 2***

***Tesis Presentada en Opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias de la Salud***

Autora: Lic. Rosa Liset Ramírez Bartutis, M.Cs.

Tutoras: Prof. Rosabel Falcón Márquez, Dr.C.

Prof. Mayra Muné Jiménez, Dr.C.

Asesoras: Prof. Ana Beatriz Pérez Díaz, Dr.C.

Prof. María G. Guzmán Tirado, Dr.Cs.

***La Habana
2019***

La clave es mantener la compañía de gente que te aporta, cuya presencia saca lo mejor de tí

Epícteto
(Filósofo griego)

*A mi Masha porque solo el amor engendra la maravilla.
A mi Mamá. Siempre en mi corazón.*

LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviaturas más empleadas en el texto, organizadas por orden alfabético:

aa	aminoácido
A	absorbancia
Acs	anticuerpos
AcM	anticuerpo monoclonal
ADA	amplificación dependiente de anticuerpos
ADCC	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos -en inglés- <i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico
Amp	antibiótico ampicilina
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASB	albúmina sérica bovina
BCA	ácido bicinconínico -en inglés- <i>Bicinchoninic Acid</i>
Bcl-2	-en inglés- <i>B cell lymphoma</i>
β MeOH	β -mercaptoetanol
BSC II	-en inglés- <i>Biosafety Cabinet class II</i>
C	cápsida
CENPALAB	Centro de Producción de Animales de Laboratorio
CIs	cuerpos de inclusión
CIGB	Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
CN	suspensión celular del cerebro de ratón lactante
ConA	concanavalina A
CSF	factor estimulante de colonias -en inglés- <i>Colony Stimulating Factor</i>
CTL	linfocitos T citotóxicos -en inglés- <i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>
DIII	dominio III de la proteína de la envoltura del virus dengue
DO	densidad óptica
E	envoltura
EUA	Estados Unidos de América
ELISA	ensayo inmunoenzimático de adsorción -en inglés- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Fc	fragmento cristalino
FHD	fiebre hemorrágica por dengue
GF	gel filtración
GSK	Glaxo Smith Kine
HLA	antígenos leucocitarios de histocompatibilidad inglés, -en inglés- <i>Histocompatibility Leucocyte Antigen</i>
HPRT	hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa, -en inglés- <i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase-1</i>
IFN	interferón
IFI	inmunofluorescencia indirecta
Igs	inmunoglobulinas
IgM	inmunoglobulina M
IgG	inmunoglobulina G
IL	interleuquina

IMAC	cromatografía de afinidad por iones metálicos -en inglés- <i>Immobilized Metal Ion Adsorption Chromatography</i>
ip.	intraperitoneal
IPK	Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”
IPTG	tiogalactopiranosido de isopropilo -en inglés- <i>Isopropyl Thiogalactopyranoside</i>
Kan	antibiótico kanamicina
Kb	kilobases
kDa	kilodalton
LAH	líquido ascítico hiperinmune
LB	medio de cultivo Luria Bertania
LBA	medio de cultivo Luria Bertania con antibiótico
LD50	dosis letal media
M	proteína de la membrana
MBP	proteína de unión a maltosa de <i>Escherichia coli</i> -en inglés- <i>Maltose Binding Protein</i>
MHC	complejo principal de histocompatibilidad –en inglés- <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NIH	Instituto Nacional de Salud –en inglés- <i>National Institute of Health</i>
NK	células asesinas naturales -en inglés- <i>Natural Killers</i>
NRNP	técnica de neutralización por reducción del número de placas
NS	no estructural -en inglés- <i>Non Structural</i>
Nt	neutralizantes
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	marco abierto de lectura -en inglés- <i>Open Reading Frame</i>
pb	pares de bases
PC6/36HT	pases en la línea celular C6/36 HT
PNH	primates no humanos
PR	pases en cerebro de ratón
prM	proteína precursora de la membrana
PV	pases en la línea celular Vero
pNA	paranitilado
RE	retículo endoplasmático
RMN	resonancia magnética nuclear
RPMI	medio de cultivo celular líquido -en inglés- <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa -en inglés- <i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SAGE	Grupo de Expertos en Asesoramiento Estratégico sobre Inmunización
SCD	síndrome de choque por dengue
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes -en inglés- <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Poliacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SHN	suero humano normal
SNC	sistema nervioso central
SFT	suero fetal de ternera
TEM	tampón estabilizador de muestra
TGF β	factor transformador de crecimiento
Th	respuesta de células T cooperadoras –en inglés- <i>T helper</i>
TNF α	factor de necrosis tumoral alfa -en inglés- <i>Tumour Necrosis Factor alpha</i>
TPG	título promedio geométrico
ufp	unidades formadoras de placas

UTR	regiones no codificantes -en inglés- <i>Untranslated Regions</i>
VDEN	virus del dengue
VEJ	virus de la encefalitis japonesa
VFA	virus de la fiebre amarilla
VHC	virus de la hepatitis C
VNO	virus del nilo occidental
WB	inmunoelctrotransferencia -en inglés- <i>Western Blotting</i>
WRAIR	Instituto de Investigaciones de la Armada Americana Walter Reed

SÍNTESIS

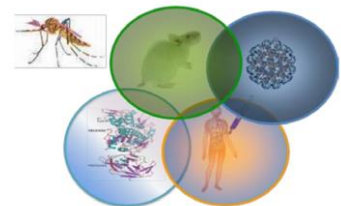
En la presente investigación se obtuvo por vía recombinante en *E.coli* la proteína NS3 del VDEN 2, la cual mostró actividad proteasa y se reconoció por los anticuerpos presentes en los líquidos ascíticos hiperinmunes inducidos por los cuatro serotipos del virus dengue en ratones BALB/c. Se demostró la antigenicidad para las células T de la proteína recombinante NS3 a través de la secreción de IFN γ por las células del bazo de los ratones BALB/c, previamente inmunizados con el VDEN 2, cultivadas y estimuladas *in vitro* con dicha proteína. Igualmente, indujo Acs IgG anti-NS3 y una respuesta de células T, la cual no fue protectora en el modelo de encefalitis viral en ratón. Sin embargo, la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 potencia la respuesta inmune inducida por la proteína DIII-C-2 frente al VDEN 2, lo que contribuye al control de la infección viral.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	4
Objetivos	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
Novedad científica	5
Valor teórico-práctico	5
Publicaciones donde se han presentado los resultados de la Tesis	6
Tesis tutoradas que han contenido resultados de esta Tesis	6
Eventos científicos donde se han expuestos los resultados de la presente Tesis	7
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
I.1. La enfermedad del dengue	8
I.2. Epidemiología	9
I.3. Los virus del dengue	10
I.3.1 La proteína no estructural NS3	13
I.4. Respuesta inmune e inmunopatogenia de la infección del VDEN	14
I.4.1 Respuesta mediada por anticuerpos	14
I.4.2 Respuesta mediada por células	15
I.4.3 Inmunopatogenia	16
I.4.4 Papel de la proteína NS3	18
I.5. Desarrollo de vacunas contra el VDEN	21
I.6. <i>Escherichia coli</i> como sistema de expresión para las proteínas del VDEN	23
I.7. Modelos experimentales para la evaluación de vacunas contra el VDEN	25
I.7.1 El hombre como modelo de infección del VDEN	25
I.7.2 Modelos animales para la evaluación de vacunas contra el VDEN	26
II. MATERIALES Y MÉTODOS	29
II.1. Cepas bacterianas y virales	29
II.2. Cebadores, plásmidos y enzimas de restricción	31
II.3. Anticuerpos monoclonales, policlonales y proteína recombinante	32
II.4. Animales de experimentación	32
II.5. Consideraciones éticas en el uso de animales de laboratorio	33
II.6. Obtención de los plásmidos recombinantes pGEMT-NS3, pQE30-NS3 y pET21d-NS3	34
II.6.1 Extracción del ARN del VDEN 2	34
II.6.2 Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de la región correspondiente al gen ns3 del VDEN 2.	34
II.6.3 Determinación de la concentración de ADN mediante espectrofotometría	35

II.6.4 Electroforesis de ADN _____	35
II.6.5 Inserción del gen ns3 del VDEN 2 en el vector pGEM-T _____	35
II.6.6 Transformación de las bacterias y selección de los plásmidos recombinantes _____	36
II.6.7 Secuenciación nucleotídica del fragmento de ADN del gen ns3 del VDEN 2 _____	37
II.6.8 Subclonación del gen ns3 del VDEN 2 en el vector de expresión pQE30 _____	38
II.6.9 Clonación del gen ns3 del VDEN 2 en el vector de expresión pET21d _____	39
II.7. Obtención de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 _____	39
II.7.1 Miniexpresión de los clones recombinantes _____	39
II.7.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida _____	40
II.7.3 Inmunodetección por Western Blot _____	40
II.7.4 Determinación de las condiciones óptimas de expresión de la proteína NS3 _____	41
II.7.5 Determinación de la concentración de proteínas _____	42
II.7.6 Proceso de purificación de la proteína recombinante NS3 _____	42
II.7.7 Determinación de los parámetros de control del proceso _____	44
II.8. Caracterización biológica de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 _____	44
II.8.1 Ensayo enzimático para la detección de la actividad proteasa _____	44
II.8.2 ELISA para la evaluación de la antigenicidad de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 con Acs anti-VDEN de ratón _____	45
II.8.3 Ensayo para evaluar la antigenicidad de la proteína recombinante NS3 para células del bazo de ratones inmunizados con el VDEN _____	46
II.8.3.1 Cultivo de las células del bazo y estimulación con la proteína recombinante NS3 _____	46
II.8.3.2 ELISA para la determinación de citoquinas _____	47
II.9. Evaluación inmunológica de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 en ratones _____	47
II.9.1 Esquema de inmunización _____	47
II.9.2 ELISA para la evaluación de la respuesta de anticuerpos anti-NS3 recombinante _____	48
II.9.3 Reconocimiento antigénico de la proteína NS3 nativa del VDEN2 por anticuerpos anti-NS3 recombinante _____	48
II.9.3.1 Inmunofluorescencia Indirecta _____	48
II.9.3.2 Western Blot _____	49
II.9.4 Ensayo para la determinación de la frecuencia de células específicas a la proteína NS3 productoras de IFN γ por la técnica de ELISPOT _____	49
II.9.5 Ensayo de protección _____	50
II.10. Evaluación en ratones de la capacidad inmunopotenciadora de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 sobre la respuesta inmune generada por la formulación vacunal DIII-C-2 _____	50
II.10.1 ELISA para la determinación de la respuesta de anticuerpos anti-VDEN 2 _____	51
II.10.2 Ensayo de neutralización por reducción del número de placas _____	52
II.10.3 Ensayo de protección en ratones inmunizados tras el reto con el VDEN 2 _____	53
II.10.3.1 Detección de la proteína NS1 en el tejido cerebral _____	53
II.10.3.2 Cuantificación de la expresión de genes de citoquinas en el tejido cerebral _____	54
II.11. Análisis Estadístico _____	56
II.12. Limitaciones del estudio _____	56
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	57
III.1. Obtención de los plásmidos recombinantes pQE30-NS3 y pET21d-NS3 _____	57
III.2. Obtención de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 _____	58
III.2.1 Expresión de la proteína NS3 del VDEN 2 en tres cepas de <i>Escherichia coli</i> _____	58
III.2.2 Purificación de la proteína NS3 del VDEN 2 _____	63

III.3. Caracterización biológica de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2	67
III.3.1 Actividad enzimática mediante ensayo de proteasa	67
III.3.2 Reconocimiento de la proteína recombinante NS3 por anticuerpos anti-dengue	69
III.3.3 Antigenicidad de la proteína recombinante NS3 para células T de ratón	70
III.4. Respuesta inmune inducida por la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 en ratones	72
III.4.1 Títulos de anticuerpos anti-NS3 inducidos	72
III.4.2 Reconocimiento de la proteína NS3 nativa por los anticuerpos anti-NS3 recombinantes de ratón	74
III.4.3 Respuesta inmune celular inducida por la proteína recombinante NS3	76
III.5. Respuesta inmune protectora inducida por la proteína recombinante NS3 del VDEN 2	77
III.6. Capacidad inmunopotenciadora de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2	80
III.6.1 Respuesta inmune humoral inducida por la formulación vacunal DIII-C-2/NS3	80
III.7. Capacidad protectora de la formulación DIII-C-2/NS3	87
III.7.1 Determinación de la proteína viral NS1 del VDEN 2 en el cerebro de los ratones inmunizados y tras el reto con el VDEN 2	87
III.7.2 Expresión de genes de citoquinas en tejido cerebral de ratones inmunizados tras el reto con el VDEN 2	88
IV. DISCUSIÓN INTEGRADA	91
CONCLUSIONES	95
RECOMENDACIONES	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	120



INTRODUCCIÓN

El dengue es actualmente la enfermedad viral de mayor impacto en términos de morbilidad y mortalidad transmitida por artrópodos. Reportes recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) muestran un incremento dramático de los casos de dengue notificados por los países donde circulan estos virus. Aproximadamente 390 millones de personas en el mundo se infectan cada año con uno de los virus del dengue (VDEN); de ellas, 96 millones desarrollan la enfermedad, y de estas personas, alrededor de 1 millón se clasifican como dengue severo (1), por lo que el control del dengue constituye una de las prioridades de los sistemas de salud pública en los países endémicos, en aquellos con transmisión de dengue y en aquellos donde exista el vector. Recientemente, una vacuna tetravalente contra el dengue (Dengvaxia), desarrollada por Sanofi Pasteur, se licenció en 19 países endémicos. Sin embargo, los resultados de los ensayos clínicos fase 3 realizados en 10 países endémicos y que involucraron más de 35 000 niños entre 2 y 16 años de edad, revelan que esta vacuna muestra una baja eficacia protectora contra dos de los cuatro serotipos del VDEN (2). Además, en el tercer año posterior a la primera dosis de inmunización, se observa un incremento en el índice de hospitalización de individuos seronegativos inmunizados, principalmente niños menores de cinco años, con un cuadro de dengue severo y un comportamiento que sugiere el desarrollo del fenómeno de amplificación dependiente de anticuerpos (ADA), lo cual se asocia a la vacunación (3-5). Por lo antes expuesto, continúa siendo de prioridad máxima para la comunidad científica internacional, la obtención de una vacuna que induzca inmunidad protectora de larga duración contra los cuatro serotipos del VDEN. Esta protección no solo deberá generarse a través de una respuesta de anticuerpos (Acs) neutralizantes (Nt), sino además, por una respuesta inmune celular, a la cual actualmente se le demuestra su papel relevante en la eliminación de la infección por el VDEN (6-8). En este sentido, se identifican a las proteínas no estructurales (NS) del VDEN como las fuentes de los epítotos inmunodominantes reconocidos por las células T CD8⁺ citotóxicas (9).

Otra terapia alternativa en el manejo de los casos clínicos de dengue para evitar el riesgo del dengue severo y las muertes causadas por este agente es la introducción de fármacos anti-virales que puedan emplearse con seguridad en la profilaxis o tratamiento efectivo de la enfermedad (10-12). La acción de estas moléculas anti-virales deberá dirigirse contra las funciones de las proteínas virales, principalmente las proteínas NS, pues estas son los componentes esenciales de la maquinaria de replicación del genoma viral durante la infección (13-17).

Estudios recientes demuestran que la interacción de las proteínas NS con los factores del hospedero conducen a la supresión de la respuesta inmune innata que puede contribuir a la inmunopatogenia de la infección por el VDEN (18-20). Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, la caracterización de las proteínas NS, determinantes en el ciclo de replicación viral y en la respuesta inmune celular generada contra la infección por el VDEN, permitirá el desarrollo de estrategias eficaces para combatir la enfermedad del dengue.

Los cuatro virus del complejo dengue (VDEN 1, VDEN 2, VDEN 3, VDEN 4) son antigénicamente diferentes (21, 22) con un 70% de similitud entre las secuencias aminoacídicas. De las 10 proteínas que se obtienen después de la traducción del genoma viral y el procesamiento post-traducciona l de la poliproteína viral, siete son NS (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) y tienen como función coordinar los mecanismos intracelulares de la replicación y del ensamblaje viral, y la modulación de los mecanismos de defensa del hospedero (23, 24). Entre las proteínas NS, la proteína NS3 resulta de particular interés tanto para el desarrollo de fármacos anti-virales (25) como para la inducción de una respuesta inmune celular protectora en una formulación vacunal (26).

La proteína NS3 se encuentra en el citoplasma celular asociada a la membrana intracelular por interacción con el cofactor NS2B para formar parte del complejo de replicación viral (13). Esta proteína posee múltiples funciones enzimáticas: participa en el procesamiento de la poliproteína viral, en la formación de la caperuza del extremo 5' del ácido ribonucleico (ARN) y en la formación de la partícula viral (27-29). En esta proteína se identifican dos dominios funcional-estructurales denominados en correspondencia con sus dos actividades enzimáticas principales: la función proteasa la realiza el dominio ubicado hacia el extremo N-terminal, el cual contiene los primeros 169 aminoácidos (aas) (30) y el dominio responsable de la actividad helicasa ubicado en la región C-terminal, el cual comprende desde el aa 180 hasta el 618 (31, 32). Este dominio

helicasa es responsable, además, de las actividades nucleósido trifosfatasa (NTPasa), 5' ARN trifosfatasa (RTPasa), y de la hibridación de las moléculas de ARN independiente de ATP (33-35).

La proteína NS3 es además una fuente de epítomos inmunodominante para las células T CD8⁺ citotóxicas, un principal mecanismo efector de la respuesta inmune antiviral (36-38). Numerosos estudios basados en la caracterización de la respuesta inmune celular generada en los humanos tras la infección con el VDEN identifican a la proteína NS3 como la más reconocida por las células T CD8⁺ citotóxicas en las células mononucleares de sangre periférica de los individuos provenientes de regiones diferentes del mundo (39-41). En el modelo de ratón, la proteína NS3 se identifica como la principal diana para los linfocitos T citotóxicos (CTL, *cytotoxic T lymphocytes*) específicos para el dengue (42). Por otra parte, esta proteína es capaz de inducir una respuesta de Acs que puede mediar la lisis de las células infectadas por el VDEN. Además, los Acs monoclonales (AcM) anti-NS3 confieren protección pasiva frente al reto con el virus salvaje en ratones inmunizados con la misma (43, 44). Recientemente se ha demostrado el papel directo de los linfocitos T CD8⁺ en la protección contra la infección por el VDEN en los ratones (45), por lo que resulta interesante desarrollar y evaluar candidatos vacunales basados no solo en la generación de Acs Nt sino también en la inducción de una respuesta de células T citotóxicas contra el VDEN.

El proyecto cubano para la búsqueda de una vacuna contra el VDEN, desarrollado como una colaboración entre el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) y el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), contempla entre sus estrategias, la obtención y evaluación inmunológica de proteínas quiméricas basadas en la fusión del dominio III de la proteína de la envoltura (E) a la proteína de la cápsida viral (DIII-C). Las formulaciones monovalentes DIII-C de los cuatro serotipos del VDEN (DIII-C-1, DIII-C-2, DIII-C-3, DIII-C-4) evaluadas en ratones y primates no humanos (PNH) demuestran la inducción de una respuesta inmune funcional con capacidad protectora (46, 47). Por su parte en la evaluación de la formulación tetravalente DIII-C en modelos animales se demuestra la potencialidad de la misma al inducir una respuesta protectora en ratones inmunocompetentes y ser inmunogénica en los PNH (48, 49). A pesar de estos resultados, se continúa investigando el papel que juegan otras

proteínas virales que aporten epítomos que incrementen la inmunogenicidad y la capacidad protectora de nuevos candidatos vacunales.

En este contexto, resulta interesante conocer si la proteína NS3 del VDEN 2 obtenida por vía recombinante conserva los determinantes antigénicos funcionales, de modo que pudiera considerarse un inmunógeno atractivo para su inclusión en una posible formulación vacunal contra el VDEN. Consecuentemente, es de gran importancia caracterizar y evaluar la respuesta inmune inducida por la proteína recombinante NS3 en la recuperación y/o la protección contra la infección por el VDEN, así como determinar su papel inmunomodulador sobre la respuesta inmune inducida por una formulación vacunal contra el VDEN. Por lo antes expuesto, el presente trabajo se plantea la siguiente hipótesis:

Hipótesis

La proteína recombinante NS3 del VDEN 2 expresada en *Escherichia coli* conserva los determinantes antigénicos de la proteína nativa, genera una respuesta inmune protectora contra el VDEN 2 en ratones BALB/c y potencia la inmunogenicidad de la formulación vacunal monovalente contra el VDEN 2, DIII-C-2.

Para validar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la capacidad inmunogénica, protectora e inmunomoduladora de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 expresada en *Escherichia coli*.

Objetivos específicos

1. Obtener la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 con el empleo de diferentes estrategias de expresión y purificación.
2. Evaluar la antigenicidad de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 para anticuerpos y células del bazo de los ratones inmunizados con el VDEN 2.
3. Caracterizar la respuesta inmune inducida por la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 y evaluar su capacidad protectora frente al reto viral homotípico en ratones.

4. Demostrar la capacidad inmunopotenciadora de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 sobre la respuesta inmune inducida por la proteína recombinante DIII-C-2.

Novedad científica

Este estudio constituye el primer trabajo científico a nivel mundial que evalúa la respuesta inmune de la proteína NS3 del VDEN 2 obtenida por vía recombinante en *Escherichia coli*. Se demuestra por primera vez que esta proteína recombinante conserva los determinantes antigénicos nativos, es altamente inmunogénica y estimula una respuesta celular de tipo Th1, lo que convierte a esta proteína en un candidato atractivo para su inclusión en una formulación vacunal.

Este trabajo es el primer estudio que demuestra la capacidad inmunopotenciadora de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 combinada en una formulación con la proteína DIII-C-2 en el modelo de encefalitis de ratón.

Valor teórico-práctico

Los elementos que sustentan el valor teórico y práctico de los resultados del presente trabajo son los siguientes:

- Se aportan resultados que incrementan el conocimiento acerca de la antigenicidad e inmunogenicidad de la proteína NS3 del VDEN 2. Esto abre la posibilidad de implementar un ensayo diagnóstico con una sensibilidad elevada para la detección del antígeno NS3 en casos de dengue y dengue grave.
- La respuesta inmune celular inducida y la capacidad protectora de la proteína NS3 corrobora la necesidad de contar con un modelo animal adecuado que permita interpretar los mecanismos inmunológicos protectores contra el VDEN 2.
- Se aportan nuevas evidencias que demuestran las potencialidades de la proteína NS3 para ser utilizada en formulaciones vacunales contra el VDEN.
- La obtención de altos niveles de expresión de la proteína NS3 en *Escherichia coli* con la estrategia aplicada, permite que se amplíen las potencialidades del Laboratorio Vacuna

Dengue del IPK para la clonación y expresión de otras proteínas virales, así como para el estudio de la respuesta inmune en animales inmunizados.

Publicaciones donde se han presentado los resultados de la Tesis

- Guzmán MG, Hermida L, Bernardo L, **Ramírez R**, Guillén G. **2010**. Domain III of the envelope protein as a dengue vaccine target. **Expert Rev. Vaccines** 9(1): 87-97.
- **Ramírez R**. **2011** Expression in *E.Coli* and Characterization of Dengue 2 Virus Recombinant NS3 Protein. **ISID News** 11(3): 9-10.
- **Ramírez R.**, Falcón R., Izquierdo A., García A., Alvarez M., Pérez A. B., Soto Y., Muné M., Mandarano da Silva E., Ortega O., Mohana-Borges R., Guzmán M. G. **2014** Recombinant dengue 2 virus NS3 protein conserves structural antigenic and immunological properties relevant for dengue vaccine design. **Virus Genes** 49: 185-195. DOI 10.1007/s11262-014-1087-3.
- **Ramírez R.**, **2016**. Estructura y composición del virus dengue. Proteínas estructurales y no-estructurales. En: Guzmán MG. Editores. Dengue. Editorial de Ciencias Medicas; p. 99-110. ISBN: 978-959-212-909-2.
- Gil L., Lazo L., Valdés I., Suzarte E., Yen P., **Ramírez R.**, Álvarez M., Dung L. T., Cobas K., Marcos E., Pérez Y., Guzmán M.G., Hien N.G., Guillén G., Hermida L. **2017**. The tetravalent formulation of domain III-capsid proteins recalls memory B- and T-cell responses induced in monkeys by an experimental dengue virus infection. **Clinical & Translational Immunology** 6, 148; doi:10.1038/cti.2017.24.

Tesis tutoradas que han contenido resultados de esta Tesis

- Clonación y expresión en *E. coli* de la proteína NS3 del virus dengue 2. Tesis de diploma. Autora: Sheila Gutierrez López. 2008.
- Expresión e inmunodetección de la proteína recombinante NS3 del virus dengue 2 en forma soluble. Tesis de Maestría en Virología. Autora: María Soledad Hernández Mena. 2012.
- Caracterización funcional de la proteína recombinante NS3 del virus dengue 2. Tesis de diploma. Autor: Oney Ortega Granda. 2013.

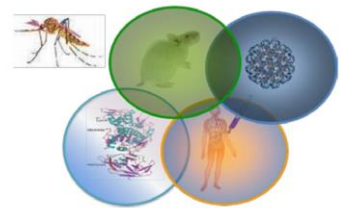
- Evaluación de la inmunogenicidad y capacidad protectora en ratones de una formulación vacunal basada en las proteínas DIII-C y NS3 del virus DEN-2. Tesis de Maestría en Virología. Autora: Aina Méndez Gorrín. 2016.
- Evaluación de la respuesta inmune celular y la capacidad protectora en ratones de la proteína recombinante NS3 del virus dengue 2. Tesis de Diploma. Autora: Nankyu Sánchez Vega. 2018.

Eventos científicos donde se han expuestos los resultados de la presente Tesis

- VIII Congreso de Microbiología y Parasitología. 14-16 octubre 2014, Palacio de Convenciones, La Habana, Cuba.
- Primera Convención de Inmunofarmacología-Vaccipharma 2015, 14-19 junio, 2015, Varadero, Cuba.
- IX Congreso Internacional de Ciencias Químicas, Tecnología e Innovación “Quimicuba 2015”, 13-16 octubre, 2015, Palacio de las Convenciones, Cuba.
- 5ta Reunión Panamericana de Investigaciones en Dengue. 21-23 abril, 2016, Panamá.
- Vaccipharma 2017/ 4to Simposio sobre Farmacología de las Vacunas Profilácticas/ Simposio sobre Vacunas Virales, junio, 2017, Varadero, Cuba.
- Congreso “80 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical, Pedro Kourí”. IX Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. VI Congreso Nacional de Medicina Tropical. VI Seminario Internacional sobre la Infección por el VIH y el SIDA en Cuba. 4-8 diciembre, 2017, Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba.
- 33 Congreso Latinoamericano de Química (CLAQ) y 10mo Congreso de Ciencias Químicas, Tecnología e Innovación “QUMICUBA’2018”. 9-12 octubre, 2018, Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba.



Capítulo I
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1. La enfermedad del dengue

La enfermedad del dengue representa en la actualidad una de las principales problemáticas de salud pública en el mundo (50). Anualmente se estiman 390 millones de infecciones por el VDEN, de las cuales aproximadamente 100 millones manifiestan algún síntoma de la enfermedad (1) y más de 500 000 personas son hospitalizadas con las manifestaciones más severas. En los años últimos, la magnitud y la trascendencia mundial de la infección por el VDEN aumenta debido a la expansión geográfica de los VDEN y de su principal vector, que convierte, a las personas infectadas en portadores y multiplicadores potenciales del virus. La región de América Latina evoluciona progresivamente de ser un área de baja endemicidad a una de hiperendemicidad con transmisión local de los cuatro VDEN en prácticamente todos los países (51).

La infección por los VDEN se manifiesta como una sola enfermedad en cada individuo y tiene un espectro amplio de presentaciones clínicas, con evolución impredecible (52-54). Estas pueden ser asintomáticas, aproximadamente 300 millones de infecciones al año (1), o sintomáticas en dependencia de determinados factores de riesgo, entre los que se encuentran los relacionados con el virus, los genéticos del individuo y los socio-epidemiológicos (55-58). Las infecciones sintomáticas pueden transcurrir desde una fiebre indiferenciada, pasando por la fiebre dengue (FD), hasta el cuadro severo de la enfermedad, con sus dos manifestaciones clínicas más graves: la fiebre hemorrágica (FHD) y el síndrome de choque por dengue (SCD) (59). El desarrollo de estas últimas formas clínicas se asocia no solo, a los factores señalados anteriormente, sino también a la presencia de Acs pre-existentes ante la infección secundaria con un serotipo diferente, el asma bronquial, la anemia de células falciformes, la diabetes mellitus y la raza (60-64).

Una serie de parámetros clínicos, de laboratorio, o ambos, definen la enfermedad del VDEN como dengue o dengue grave según la nueva clasificación de la OMS (65). De manera general, aunque la mayoría de los pacientes se recuperan después de un curso clínico benigno y de resolución espontánea, una proporción pequeña progresa hacia la etapa más grave, caracterizada principalmente por el aumento de la extravasación intensa del plasma (66, 67); las hemorragias masivas (68) y una afectación importante de órganos como el hígado, el corazón, y con menos frecuencia el riñón y el sistema nervioso central (SNC) (69-72). En este último órgano la afectación no solo se evidencia a través de las hemorragias, sino también a través de la encefalitis, la cual ha dejado de ser infrecuente tanto en niños como en adultos, para convertirse en un criterio diagnóstico de la enfermedad por dengue (73, 74). La incidencia de la infección por el VDEN asociada a manifestaciones neurológicas, tales como las encefalitis, las encefalopatías, las meningitis, el síndrome de Guillan-Barré, la mielitis, la polineuropatía y la hemorragia cerebromeningeal, alcanza hasta un 5% (75, 76), y su frecuencia, principalmente en la encefalitis, depende del serotipo predominante durante la epidemia (77-79).

I.2. Epidemiología

En los últimos años existe una emergencia dramática del dengue a nivel mundial como resultado del cambio climático, la explosión demográfica y las inequidades sociales, así como el deterioro de los sistemas de salud de los países más pobres (80, 81). Asimismo, en los últimos 50 años, la incidencia del VDEN ha aumentado 30 veces por la creciente expansión geográfica del vector hacia nuevos países y por el aumento de la resistencia a insecticidas.

En la región de las Américas se registra el incremento más drástico en la actividad del dengue, sostenida en los últimos 25 años, con brotes epidémicos que se repiten de manera cíclica especialmente en Brasil, Colombia, Costa Rica, Perú, Venezuela y México (82, 83). El número de casos de dengue y dengue grave, en el 2017 alcanzó la cifra de 1 574 028 casos, de los cuales 36 688 fueron casos de FHD. En este mismo período, el número total de muertes por dengue fue de 843 con una tasa de letalidad por la forma grave de 2,30%. La circulación de los cuatro serotipos del VDEN se mantiene en la región y agrava la situación epidemiológica (83).

En Cuba el dengue no se reporta hasta el año 1977 cuando se produjo una epidemia causada por el VDEN 1 que afectó el 50% de la población (84). Cuatro años más tarde se produjo la

primera epidemia de dengue hemorrágico en la región, causada por el VDEN 2 genotipo asiático, con más de 10 000 casos graves y 158 fallecidos, de ellos 101 niños y 57 adultos (85). En 1997 ocurre otra epidemia de dengue en la cual se aisló el VDEN 2 genotipo americano/asiático con un número de casos de 2 946, de ellos 205 casos hemorrágicos y 12 fallecidos en el municipio de Santiago de Cuba (86). Entre los años 2001 y 2002, una epidemia, pero en esta ocasión causada por el VDEN 3, se produjo en Cuba, principalmente en la Ciudad de La Habana y se reportaron más de 14 000 casos, 79 graves y tres fallecidos (87, 88). En el año 2005 se describieron dos brotes de dengue en el país, el primero con 198 casos confirmados, correspondientes al VDEN 2, y el segundo, con 148 casos confirmados, correspondientes al VDEN 4. En este último, localizado en La Habana y Camagüey, se diagnosticó un caso de FHD (89). Durante el año 2006 se confirma la presencia de los VDEN3 y VDEN 4 en seis provincias del país mientras que en otras dos se pudo aislar únicamente el VDEN 3.

En el periodo 2007-2015 se observa un acortamiento entre los brotes de dengue en diferentes regiones del país; pero se controlan rápidamente. En la actualidad se trabaja intensamente en el país para la sostenibilidad de las actividades de vigilancia y control del dengue y su vector.

I.3. Los virus del dengue

Los VDEN son transmitidos por el mosquito de más rápida propagación en el mundo el *Aedes* (*Stegomyia*), principalmente *Aedes aegypti*. Además, el *Aedes albopictus* y algunos vectores endémicos como el *Aedes polynesiensis*, en la polinesia francesa, son también agentes transmisores de estos virus (90).

El VDEN es un complejo de 4 serotipos (VDEN 1, VDEN 2, VDEN 3, VDEN 4) pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, en el que se agrupan alrededor de 70 miembros, los cuales comparten aproximadamente el 50% de sus secuencias aminoacídicas (91).

Los VDEN son estables a temperaturas por encima de -70°C y en estado de liofilización a 5°C . Por otro lado, son inestables si se someten al calor y se inactivan bajo la acción de la luz ultravioleta (92). Estos son esféricos, de aproximadamente 50 nm de diámetro, además, poseen una densidad de $1,23\text{ g/cm}^3$ y un coeficiente de sedimentación de 210 S (93).

Las células infectadas con el VDEN producen una mezcla heterogénea de partículas virales estructuralmente distintas que varían desde partículas completamente inmaduras y parcialmente

maduras, hasta completamente maduras (94, 95). Estas partículas virales pueden distinguirse por su talla, su morfología y el estado de clivaje de la proteína precursora de la membrana (prM). Este último proceso es esencial para producir una partícula viral madura e infectiva (96). Aunque los viriones inmaduros generalmente se consideran productos irrelevantes de las células infectadas con el VDEN (97), la detección de una proporción elevada de Acs anti-prM en los pacientes con infección secundaria comparados con los detectados en pacientes con infección primaria, sugiere la funcionalidad de las partículas virales inmaduras en la infección por dengue (98, 99). Las diferencias encontradas en el virión del VDEN, según el hospedero infectado, pudieran tener implicaciones en la presentación de las partículas virales al sistema inmune humano y en el desarrollo de una vacuna efectiva contra el VDEN (100, 101).

Las partículas virales poseen un anillo glicoproteínico externo bien organizado, una bicapa lipídica derivada del retículo endoplasmático (RE) y un núcleo interno que contiene a la nucleocápsida, de aproximadamente 30 nm de diámetro, formada por la proteína de la cápsida (C) y un ARN (102). Este ARN es un ARN mensajero (ARNm) de cadena simple y polaridad positiva, compuesto aproximadamente por 11000 b, de las cuales, un poco más de 10000 b se integran en un único marco abierto de lectura (ORF, *open reading frame*) que varía en tamaño de acuerdo con cada serotipo del VDEN, e incluso entre un mismo serotipo (103). El ORF se encuentra flanqueado en los extremos 5' y 3' por las regiones no codificantes (UTR, *untranslated regions*). Estas UTR contienen los elementos conservados de la estructura secundaria del ARN, que son esenciales para la replicación eficiente y la traducción del ARN viral de los flavivirus (104, 105). La presencia de estos elementos, específicamente en la región UTR 3', propicia el desarrollo de los estudios de atenuación, patogenicidad e inmunogenicidad de las cepas del VDEN para su empleo en el desarrollo de los candidatos vacunales contra el dengue (106-108). Al igual que en todos los flavivirus, el ARN del VDEN presenta una caperuza en su extremo 5' (m7GpppAmp) y carece de un tracto poliadenilado (cola Poli A) en su extremo 3'.

La traducción del ARN viral da lugar a una poliproteína de aproximadamente 3400 aas, que tras su procesamiento co- y post-traducciona produce tres proteínas estructurales hacia el extremo N-terminal: la proteína C, la proteína de la envoltura (E) y la proteína de membrana (M), y siete proteínas NS (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (109, 110).

La tabla I.1 muestra las propiedades, características y funciones de las proteínas producidas

Tabla I.1. Proteínas codificadas por el ARN genómico del VDEN.

Proteína	Longitud (aas)	Peso Molecular (kDa)	Características y Función
Cápsida (C)	112-127	9-12	Proteína dimérica, básica, asociada al RE. Inmunodominancia de epítomos de células T CD4 ⁺ . Esencial en el ensamblaje del virión y en la protección del genoma viral. Inductor de una respuesta inmunológica celular contra el VDEN.
Membrana (M)	75	8-9	En el virión inmaduro se presenta como un precursor glicosilado de 26kDa (prM). La formación de M por escisión proteolítica con furina es crucial en la morfogénesis del virión maduro. Protege a la proteína E de cambios conformacionales irreversibles durante su tránsito por la vía secretora.
Envoltura (E)	495	60	Proteína glicosilada dimérica con dos sitios esenciales de N-glicosilación, Asn 67 (específico para los VDEN) y Asn 153. Sus tres dominios antigénicos C, A y B se corresponden con los tres estructurales I, II y III. Principal antígeno que induce inmunidad protectora. Esencial en la unión del virus al receptor celular y en la fusión de las membranas viral y celular.
NS1		46-55	Se presenta en forma monomérica, dimérica o hexamérica. Está asociada a la membrana celular, liberada al medio extracelular o reside en el RE. Posee dos sitios de glicosilación Asp 130 y 207. Implicación en la replicación viral. Diana de células T citotóxicas y Acs específicos que la hacen blanco del complemento o de la ADCC. Biomarcador para el diagnóstico temprano de la infección por VDEN.
NS2A		22	Proteína pequeña hidrofóbica con cinco regiones transmembranas. Participa en la síntesis del ARN viral y en el ensamblaje del virión.
NS2B		14	Proteína pequeña asociada a membrana que forman un complejo con NS3, (cofactor para la función serina proteasa). Posee tres regiones transmembranas hidrofóbicas y una región hidrofílica necesaria para la unión de la NS3.
NS3	618	70	La segunda proteína más grande del VDEN. Proteína citoplasmática con múltiples funciones enzimáticas en la replicación viral. Principal fuente de epítomos de células T citotóxicas CD4 ⁺ y CD8 ⁺ .
NS4A	150	16	Proteína pequeña, integral de membrana con cuatro regiones hidrofóbicas. Participa en la replicación del ARN viral y en la regulación de las actividades del dominio helicasa de la proteína NS3.
NS4B	248	27	Proteína pequeña hidrofóbica con dominios en el citoplasma y en el RE separados por regiones transmembranas. Antagoniza la acción antiviral del interferón (IFN) tipo I y modula la replicación del VDEN.
NS5		95-105	La más grande y conservada de las proteínas de los flavivirus. Proteína básica con dos dominios estructurales y funcionales que participan en la replicación viral, el dominio polimerasa y el metiltransferasa.

I.3.1 La proteína no estructural NS3

La proteína NS3 es altamente conservada entre los flavivirus y comparte entre el 66-76% de identidad entre las secuencias aminoacídicas de los cuatro serotipos del VDEN (111). En la estructura tridimensional de esta proteína se identifican dos dominios estructurales, el dominio proteasa, el cual se ubica hacia el extremo N-terminal y abarca los primeros 171 aas (32) y el dominio helicasa, el cual abarca desde el aa 180 hasta el aa 618 (Figura I.2). Estos dominios se unen por una región de aproximadamente 10 aas, cuya secuencia aminoacídica no se conserva entre los cuatro serotipos, ni entre los flavivirus, solamente se conserva el aa ácido glutámico en la posición 173, seguido por el aa prolina o glicina (112). Este interdominio adopta una conformación extendida y flexible que permite la asociación e interacción entre ambos dominios durante el proceso de replicación viral.

La proteína NS3 es el componente más importante de la maquinaria de replicación del ARN viral. Un estudio de mutagénesis sitio-dirigida basado en las regiones de la superficie de NS3 accesibles a los solventes revela que además de la importancia de esta proteína en la replicación del ARN viral, los dominios de la NS3 son críticamente requeridos para la producción de partículas virales infecciosas (27). En ese trabajo las mutaciones puntuales realizadas en los dominios helicasa, proteasa y en el interdominio son suficientes para eliminar la formación de la partícula viral sin afectarse la traducción, el procesamiento de la poliproteína o la replicación del ARN viral. Además se identifica en el extremo N-terminal una región poco estructurada rica en residuos del aa prolina involucrada en la formación de la partícula viral infectiva. Estos resultados evidencian el papel central de la proteína NS3 en la coordinación de la replicación viral y en la formación de los viriones maduros.

El dominio proteasa de la proteína NS3 posee la función serino-proteasa de la superfamilia de la tripsina compuesta por la tríada catalítica histidina 51, ácido aspártico 75, y serina 135, la cual es conservada entre los flavivirus (113). Este dominio realiza la actividad proteolítica necesaria para el procesamiento postraducciona de la poliproteína viral, para lo cual además requiere de la presencia de la proteína NS2B que actúa como cofactor (114). Por su parte, el dominio helicasa es el responsable de las actividades ARN helicasa (115), NTPasa (33), RTPasa (28) y la actividad de hibridación dependiente de ARN (34).

Todas estas funciones son requeridas para la replicación viral (116) y la formación de la caperuza en el extremo 5' del ARN viral. Mutaciones realizadas en esta proteína pueden disminuir sus funciones, lo que abre un camino para el diseño de inhibidores anti-virales alostéricos (10, 31).

En tejidos humanos la proteína NS3 puede encontrarse en el bazo, los linfonodos, los macrófagos alveolares, los hepatocitos y las células perivasculares del cerebro (117). Recientemente, Nunes y colaboradores detectan las proteínas NS1 y NS3 del VDEN en macrófagos y células endoteliales de la placenta y el cordón umbilical de mujeres embarazadas fallecidas. Ese estudio sugiere la transmisión vertical del VDEN con impacto en la muerte materna y fetal por este virus. Igualmente, demuestra la importancia de la detección de la proteína NS3 en los pacientes con un cuadro clínico de dengue severo, para el seguimiento y manejo de la enfermedad en estos casos (118).

I.4. Respuesta inmune e inmunopatogenia de la infección del VDEN

La conjugación de mecanismos de neutralización viral, citotoxicidad celular dependiente de Acs (ADCC, *antibody dependent celular cytotoxicity*) y activación de linfocitos T y del complemento son invocados en la respuesta protectora frente al virus dengue (119).

I.4.1 Respuesta mediada por anticuerpos

Las células B activadas por el virus producen Acs que median las funciones de neutralización del virus extracelular al bloquear la unión o fusión de la envoltura viral a su receptor en la membrana plasmática celular, pero también son capaces de mediar la eliminación de las células infectadas por el virus a través de un mecanismo de ADCC o de citólisis mediada por complemento (CMC) (120). La presencia de Acs Nt a uno de los serotipos del VDEN o Acs mediadores de ADCC se asocian a un curso clínico de la infección más benigno. Además, los Acs IgM e IgG se unen a los antígenos virales solubles y favorecen la eliminación de estos de la circulación por células fagocíticas (121).

Los Acs Nt se consideran el mecanismo protector más importante contra la infección por el VDEN (122), por lo que la inducción de niveles elevados de los mismos es el objetivo principal de los candidatos vacunales.

Los Acs Nt serotipo específicos pueden permanecer de por vida en los individuos luego de su infección. Hasta el presente no se conocen con exactitud los títulos de Acs Nt necesarios para proteger frente a la infección con cada uno de los serotipos, aunque se han propuesto títulos entre 10 y 10^2 (123).

Además de la neutralización, los Acs contra el VDEN pueden participar en otros mecanismos protectores frente a la infección. La formación de inmunocomplejos entre la proteína E del VDEN y los Acs pueden activar el complemento, mientras que la vía clásica de este sistema puede ser activada durante la infección primaria por este virus (124). En correspondencia con ello se pueden encontrar moléculas de IgM específicas al virus en esta fase de la infección (125). Durante la infección secundaria, también ocurre la activación de la vía clásica del complemento. Muy interesante es el hecho de que las subclases IgG1 e IgG3, las más importantes activadoras del complemento durante una respuesta secundaria, son las subclases de IgG más producidas en los casos de individuos que desarrollan las formas más graves de la infección (126).

I.4.2 Respuesta mediada por células

Las células T ejercen dos funciones principales: (1) la producción de citoquinas que juegan un papel crucial en la regulación de las funciones inmunológicas, el desarrollo de una respuesta antiviral eficaz y la activación de las células T CD8⁺, los macrófagos y las células B; y (2) la lisis de células infectadas. Tanto los linfocitos T CD4⁺ como los CD8⁺ son capaces de eliminar las células infectadas por mecanismos citotóxicos, lo que contribuye a la recuperación de la infección (127).

Aunque el papel patogénico de las células T CD4⁺ y CD8⁺ se ha caracterizado con profundidad, el papel protector de estas poblaciones celulares es menos conocido. No obstante, varios estudios sugieren la inducción de una respuesta inmune mediada por células en los individuos inmunizados con los candidatos vacunales atenuados u obtenidos por la vía recombinante, como resultado de la no correlación entre la generación de una respuesta de Acs Nt y la protección frente al reto viral (128-130).

Estudios realizados por van der Most y colaboradores en los años 2000 y 2003, con un virus recombinante que contiene la cepa vacunal atenuada 17D del VFA que expresa las proteínas prM y E del VDEN 2, constituyen los primeros indicios sobre el papel protector de las células

T CD8⁺ frente al reto intracraneal en los ratones (131, 132). Por otra parte, Yauch y colaboradores, en el 2009 publican que la inmunización con los epítomos de las proteínas C, NS2A, NS4B y NS5, genera células productoras de IFN γ con actividad citotóxica, y que media la disminución de la carga viral *in vivo* tras el reto en un modelo de ratones C57BL/6 transgénicos, que no expresan el receptor para los IFN α/β (133). En el mismo año, Gil y colaboradores analizan el papel de las poblaciones celulares CD4⁺ y CD8⁺ en la protección contra el VDENV en el modelo de encefalitis viral en ratones. En este estudio se demuestra que la protección conferida frente al serotipo homólogo depende de las células T CD8⁺. Además, esta población celular prolifera tras la estimulación *in vitro* con el virus homólogo y, junto a la población CD4⁺, es la responsable de la secreción de IFN γ (134, 135).

En el dengue la respuesta citotóxica de las células T CD8⁺ contribuye al daño de células no infectadas por el virus, tal como los hepatocitos (136). Es posible que una activación celular temprana e inadecuada de los linfocitos T CD8⁺ se relacione directamente con la gravedad de la enfermedad (137, 138).

I.4.3 Inmunopatogenia

En relación con la patogenia de la enfermedad se plantean algunas hipótesis para explicar el cuadro grave:

La infección con un serotipo del dengue provee inmunidad homóloga de larga duración, pero sólo hay protección cruzada transitoria contra los otros serotipos, lo que hace posible una infección secuencial que pudiera agravar la sintomatología del paciente (139). El cuadro grave se explica en función del fenómeno de ADA, que expresa que la respuesta inmune humoral a una infección primaria por un determinado serotipo origina Acs Nt capaces de proteger al individuo contra el virus homólogo y, en menor medida, contra serotipos heterólogos (140).

La formación de inmunocomplejos, formados fundamentalmente por Acs de subclases IgG1 e IgG3, serían internalizados, por las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos), al interactuar con los receptores Fc γ tipo I (CD64) y II (CD32) en ellas presentes. De esta manera, se favorecería, la diseminación viral, ya que estos inmunocomplejos entran a las células hospederas más rápido que los viriones no acomplexados.

Se ha demostrado que los Acs contra las proteínas prM y E facilitan la unión eficiente y la entrada de las partículas inmaduras a las células que expresen el receptor Fc, los cuales están presentes en las células B, en las células dendríticas y en los monocitos-macrófagos fundamentalmente, dianas de la infección por el VDEN (61, 141). El incremento de la replicación viral durante las infecciones secundarias heterotípicas, desencadena procesos donde participa activamente el sistema monocito-macrófago que concluyen con el aumento de la permeabilidad vascular responsable de los síntomas severos de la enfermedad (142). La infección mediada por la ADA suprime, además, la producción de interleuquina (IL)-12 e IFN γ , lo que conduce a una respuesta inmune de células T cooperadoras (Th, *T helper*) 2, descrita en los pacientes con FHD (143).

La reactividad cruzada de células T (144, 145), produce daños inmunológicos pues tras la infección secundaria heterotípica se activan principalmente clones de células T de memoria, estimulados en respuesta a la infección primaria, que generan la producción de una serie de citoquinas inflamatorias que participan en el desarrollo de la FHD/SCD (144). Más tarde se demuestra que, efectivamente las células T de memoria y con reactividad cruzada, activadas durante la infección secundaria, reconocen epítomos peptídicos alterados con diferencias de pocos aas entre los cuatro serotipos del dengue, y que después de la activación estas 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 IFN γ , por lo que se retarda la eliminación del virus y se incrementan los títulos virales (146). La exposición de epítomos virales en la superficie de las células infectadas conlleva a la activación de las células T y de las citoquinas proinflamatorias, que tienen un efecto directo en las células del endotelio vascular que resulta en la extravasación de plasma (147). La participación de las citoquinas inflamatorias secretadas por las células T de memoria tras la infección heterotípica se demuestra con el incremento de la permeabilidad vascular y en la extravasación de plasma.

La virulencia de las cepas (148) es un factor que puede aumentar cuando cepas de los VDEN pasan repetidamente por el hospedero humano (149). De esta forma, las cepas más virulentas son las responsables de los síntomas graves que se observan en la FHD/SCD. En 1999, Leitmeyer y colaboradores reportan la existencia de diferencias estructurales entre las cepas de origen asiático y las de origen americano del VDEN2, que están correlacionadas con la

virulencia y la patogenicidad (150). Durante las infecciones secundarias, las cepas del VDEN 2 pertenecientes al genotipo asiático se asocian al desarrollo de las formas severas, mientras que las cepas de genotipo americano al desarrollo de las formas leves de la enfermedad (151).

Por otra parte, las secuencias de infección se correlacionan con el desarrollo de las formas severas de la enfermedad. La infección secuencial VDEN 1/VDEN 2 o VDEN 1/VDEN 3 se asocian con epidemias de dengue grave (152-154). Bhattacharya y colaboradores, en el año 2013, señalan que la secuencia de infección VDEN 3/VDEN 2 también se asocia con el desarrollo de las formas severas de la enfermedad (154). En la epidemia de 1980 en Tailandia, la secuencia de infección VDEN 1/VDEN 2 muestra un riesgo de desarrollo de FHD 500 veces mayor que la infección primaria por el serotipo 2. En esta misma epidemia, para la secuencia de infección VDEN 3/VDEN 2 el riesgo de desarrollo de la FHD es 150 veces mayor, y en el caso de la secuencia VDEN 4/VDEN 2 de 50 veces (155).

En la segunda epidemia cubana de FHD ocurrida en el año 1997 causada por una cepa del serotipo 2 de genotipo asiático se comprueba la secuencia de infección VDEN 1/VDEN 2 en el 98% de los casos graves y en el 92% de los fallecidos (156).

La hipótesis integral planteada por el Prof. Kourí, es la hipótesis más completa, pues plantea al dengue como un fenómeno inmunopatológico multifactorial donde deben ser integrados múltiples factores para su comprensión: los factores de riesgos individuales (la presencia de Acs anti-dengue, la edad, el sexo, la raza, el ser portador de enfermedades crónicas), los factores epidemiológicos (el vector y el intervalo entre infecciones) y los factores relacionados con el virus (el serotipo y la virulencia de la cepa), los que, como consecuencia de su interacción, conllevan al desarrollo de la forma grave de esta enfermedad (58).

I.4.4 Papel de la proteína NS3

La proteína NS3 se identifica como la diana principal de la respuesta de células T, debido a que epítomos presentes en su estructura se reconocen por linfocitos de células T CD8⁺ de humanos y de ratón (157, 158). Un estudio que emplea péptidos sobrelapados y que cubren toda la poliproteína del VDEN demuestra que la respuesta mayor de células T *ex vivo* se dirige a la región de la proteína NS3 y principalmente al dominio helicasa (57). Rivino y colaboradores (41) exponen que durante una infección por el VDEN, las dianas principales de las células T

CD8⁺ son las proteínas NS como NS3 y NS5; mientras que para las células T CD4⁺ las dianas preferenciales son las proteínas reconocidas por las células B (E, C y NS1). En un análisis general de la respuesta de células T (CD4⁺ y CD8⁺) en adultos vietnamitas con infección secundaria por VDEN, más de la mitad reconocen epítomos de la NS3 del VDEN 2. Este estudio identifica 34 epítomos de células T en la proteína NS3 (159). Estudios realizados en *Macacuss rhesus*, permiten determinar que los péptidos virales capaces de activar células T CD4⁺ y CD8⁺ provienen primordialmente de las proteínas NS1, NS3 y NS5 (36). En un estudio sobre el reconocimiento de proteínas de VDEN por las células T citotóxicas de ratón, los autores encuentran un predominio de epítomos reconocidos por estas células en las proteínas NS principalmente la NS3 (42). Además, se ha demostrado que las células T citotóxicas de reactividad cruzada y específicas del VDEN reconocen péptidos de NS3 (160).

La proteína NS3 participa en la regulación de la respuesta inmune del hospedero. Estudios realizados con el empleo del sistema doble híbrido de levadura y el análisis de los revertantes virales revelan el interactoma de las proteínas NS de los flavivirus (161-163), el cual contiene más de 100 proteínas celulares que interactúan con la proteína NS3. Muchas de estas proteínas se encuentran involucradas en la modulación de la transcripción o de la respuesta inmune del hospedero. Así, la producción de IFN tipo I en las células dendríticas derivadas de monocitos humanos se inhibe cuando la proteasa NS2BNS3 del VDEN escinde y de esta manera, inactiva la proteína adaptadora y estimuladora de genes de IFN (STING) (164, 165).

La proteína NS3 se localiza exclusivamente en las células infectadas por el VDEN, pero debido a la lisis por un efecto citopático viral o por la lisis mediadas por células puede estar accesible para la unión al receptor de la células B (166).

Se reporta que Acs específicos contra la proteína NS3 del VDEN 1 son capaces de incrementar el tiempo de supervivencia de ratones retados con dosis letales del serotipo homólogo, aunque el mecanismo involucrado aún no se encuentra definido (44). Algunos autores plantean que en infecciones con el VDEN, están presentes Acs anti-NS3 en muestras de fase aguda de casos primarios y secundarios (167-169). Valdés y colaboradores demuestran que una respuesta específica de Acs anti-NS3 se detecta principalmente en casos secundarios de dengue, la cual es significativo según el serotipo infectante (170). Esto abre la posibilidad de implementar un

ensayo diagnóstico con una sensibilidad elevada para la detección del antígeno NS3 en algunos casos de dengue y dengue grave (171).

La proteína NS3, con importantes funciones catalíticas, es la fuente principal de epítomos de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas del VDEN y para células T de reactividad cruzada específicas para los VDEN (37, 172). Por otra parte, se plantea un papel importante de la NS3 en la inducción de apoptosis en las células infectadas. En un estudio realizado en células Vero transfectadas con el serotipo 2 del VDEN se observa que la proteína NS3 unida a su cofactor es capaz de inducir apoptosis. Asimismo, se demuestra que mutaciones en el sitio catalítico responsable de la proteólisis, disminuye la capacidad de esta proteína de inducir apoptosis (173). Duarte dos Santos y colaboradores identifican sustituciones aminoacídicas en las proteínas E y NS3, principalmente en la región helicasa, que pueden influir en la inducción de apoptosis en respuesta a la infección con el VDEN 1 (174). Además, en otra investigación se demuestra la importancia de esta región helicasa como factor de virulencia para el desarrollo de la patogenia del VDEN.

Estudios realizados *ex vivo*, muestran que en los días de la defervescencia, durante el curso de una infección aguda, la apoptosis puede ser un potencial inmunomodulador de la respuesta inmune adaptativa al VDEN (175). Evidencias sugieren que la apoptosis de las células T CD8⁺ durante la infección aguda por el VDEN podría asociarse a niveles bajos intracelulares de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (-en inglés- *B cell lymphoma*) (176), mientras que otras sustentan la asociación de los mecanismos apoptóticos al desarrollo de la patogenia de la enfermedad por dengue (177). Se plantea que, para el caso del VDEN, la producción intracelular de las proteínas virales es esencial en la producción de apoptosis. Las proteínas M y NS3 han mostrado actividad pro-apoptótica (173, 178).

Otros estudios *ex vivo* realizados durante una infección secundaria, que muestran la apoptosis de linfocitos T CD8⁺ específicos a péptidos de la NS3 sugieren que la misma podría estar involucrada en la explicación del fenómeno del pecado original antigénico. De esta forma, podría ocurrir apoptosis de las células T de alta afinidad y expansión de células T de reactividad cruzada de baja afinidad, lo cual disminuiría el aclaramiento viral, llevando a un incremento de la carga viral y a las formas más severas de la enfermedad (146).

I.5. Desarrollo de vacunas contra el VDEN

El desarrollo de vacunas eficaces contra el dengue es una prioridad, especialmente en las regiones infestadas por los mosquitos vectores de la enfermedad (179). Teniendo en cuenta las complejidades de la enfermedad del dengue, las vacunas contra el VDEN deberán proveer una protección duradera contra los cuatro serotipos virales, de forma tal que se evite el fenómeno de ADA. En este sentido, varias estrategias se desarrollan en la actualidad con el empleo de virus vivos atenuados, virus completos inactivados o subunidades virales, vectores virales recombinantes, péptidos, proteínas recombinantes y vacunas de ADN para producir vacunas contra el dengue (180, 181). Sin embargo, no se dispone de una vacuna eficaz aún cuando la primera vacuna contra el VDEN, CYD-TDV (Dengvaxia®) desarrollada por la compañía Sanofi-Pasteur, se licenció recientemente en veinte países endémicos de Asia y América Latina. Esta vacuna tetravalente quimérica se generó a partir de la cepa atenuada 17D del VFA, a la cual se le sustituye los genes que codifican para las proteínas prM y E por los que expresan estas mismas proteínas en los cuatro serotipos del VDEN, de ahí que se obtiene una vacuna compuesta de cuatro virus quiméricos VFA-17D/VDEN (182). A pesar de que la cepa vacunal del VFA es altamente inmunogénica, la formulación tetravalente quimérica contra el dengue resultó ser poco eficaz contra el VDEN 2 (183, 184). Además los vacunados no expuestos previamente al dengue o que tenían una inmunidad contra el dengue limitada manifiestan un mayor riesgo de dengue grave tras la vacunación con Dengvaxia®, aspecto principalmente crítico en niños menores de 9 años (185, 186). Por otra parte, estudios clínicos demuestran una mayor eficacia de la vacuna entre individuos con una inmunidad previa a los flavivirus, lo cual sugiere que la infección natural puede contribuir al establecimiento de una inmunidad adaptativa a largo plazo contra la fiebre del dengue (187).

A pesar de todas las limitaciones de la vacuna Dengvaxia®, sus productores consideran que aún así esta es beneficiosa (188). Sin embargo, el Grupo de Expertos en Asesoramiento Estratégico sobre Inmunización (SAGE) de la OMS, solo recomiendan su empleo en regiones endémicas, con una seroprevalencia del dengue superior al 70%, lo cual también recientemente se cuestiona por la comunidad científica internacional a la luz de los dramáticos resultados de la vacunación en Filipinas, que conllevó a la suspensión de la vacuna (189, 190).

Los resultados de la vacuna Dengvaxia® imponen que las nuevas vacunas contra el dengue deban garantizar una eficacia indiscutible en la protección contra todos los serotipos de dengue y las cepas virales circulantes, independientemente de la edad y el estado inmunológico de las personas con riesgo de infección. Actualmente los candidatos vacunales tetravalentes contra el dengue desarrollados por Takeda (TDV) y el Instituto Nacional de Salud (NIH, *National Institute of Health*) de los Estados Unidos de América (EUA), LAV Delta 30, son las dos alternativas de vacunas más avanzadas, aún ambas en fase clínica 3.

Para la obtención del candidato vacunal TDV se construyeron tres virus quiméricos TDV-1, TDV-3 y TDV-4 sustituyendo los genes prM y E de los VDEN 1, VDEN 3 y VDEN 4 en el genoma de la cepa vacunal del VDEN 2- PDK-53 (TDV-2), atenuada por la introducción de una mutación adicional en el gen que codifica para la proteína NS3 (191, 192). Los estudios clínicos realizados durante las fases 1 y 2, muestran que la administración de 2 dosis de TDV hacen de este un candidato vacunal seguro y bien tolerado, que induce una respuesta de Acs Nts y células T citotóxica CD8+ contra los cuatro serotipos (193, 194). En la actualidad el TDV se encuentra en los ensayos clínicos de fase 3, la cual se espera que concluya a finales del 2021.

El candidato vacunal LAV Delta 30 se compone de los cuatro VDEN 1, 2, 3 y 4, los cuales contienen una delección de 30 nucleótidos en el dominio II de la región UTR 3' del ARN genómico. Particularmente, el VDEN 2 es un virus quimérico que se obtiene a partir de sustituir en el esqueleto genómico del VDEN 4 mutante los genes que codifican para las proteínas prM y E del VDEN 2 (VDEN 2/VDEN 4) (195).

LAV Delta 30 recibió la licencia del Instituto Butantan en Brasil para producir este candidato vacunal conocido como TV003.

Los estudios realizados en las fases 1 y 2 demuestran la seguridad y la inmunogenicidad de TV003, con tasas de seroconversión que van desde un 50% (VDEN 2) hasta un 100% (VDEN 1, 3 y 4) después de una dosis única de administración. Sin embargo, la viremia todavía era detectable en individuos vacunados con TV003 (196). La inmunización con este candidato vacunal le proporciona a cerca del 90% de los vacunados Acs Nts y le confiere protección frente al reto con el VDEN 2 un año después de la inmunización (197). Este candidato vacunal se encuentra actualmente en los ensayos clínicos de fase 3 que culminarán en el 2022.

El Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed (WRAIR), FIOCRUZ y Glaxo Smith Kline (GSK) recientemente unieron fuerzas para potenciar un candidato vacunal tetravalente contra el dengue basado en virus inactivado purificado (DPIV). Los resultados del estudio clínico de fase 1 muestran que la administración de dos dosis del DPIV adyuvado es bien tolerado e inmunogénico, lo que justifica el inicio de un ensayo de fase 2 en un futuro próximo (198).

Otros candidatos vacunales se desarrollan con el empleo de la tecnología del ADN recombinante. Entre ellos se encuentran los de subunidades recombinantes que requieren sistemas de expresión tales como ADN plasmídico, vectores heterólogos, partículas similares a virus basadas en la coexpresión de las proteínas prM y E o solo de su dominio III y antígenos virales recombinantes purificados de los cuatro serotipos (199) [34,43, 47–50,75–77]. En este sentido la estrategia cubana para el desarrollo de un candidato vacunal contra el VDEN, se basa actualmente en la obtención de subunidades recombinantes altamente inmunogénicas y protectoras contra la infección por VDEN. La fusión del DIII de la proteína E y la proteína C (DIII-C) constituye una variante atractiva para eliminar el riesgo de la ADA después de la inmunización (135). Esta proteína DIII-C expresada en *E. coli* y semipurificada se combina con oligonucleótidos, lo que resulta en la obtención de agregados de partículas. La evaluación inmunogénica de las formas agregadas y no agregadas de los cuatro serotipos en el modelo de encefalitis viral en ratón, muestra la inducción de una respuesta humoral equivalente, mientras que la secreción de IFN γ *in vitro* y la protección es mayor para las formas agregadas. Esto demuestra la contribución de la agregación a la inducción de células T CD4⁺ y CD8⁺ (200) y la importancia de la respuesta inmune mediada por células en la protección; además refuerza la idea de que el diseño de un candidato vacunal debe estar encaminado a inducir una respuesta humoral y celular (201).

I.6. *Escherichia coli* como sistema de expresión para las proteínas del VDEN

En la actualidad existen varios sistemas de expresión de proteínas recombinantes basados en cultivos celulares de mamíferos, insectos, levaduras, bacterias, así como en plantas, sistemas libre de células y también en animales y plantas transgénicas (202, 203). De estos sistemas, las bacterias demuestran ser muy eficientes para la síntesis de las proteínas recombinantes. La *E. coli* es la especie más utilizada para la expresión de las proteínas del VDEN, aunque algunas

cepas de *Salmonella* se emplean satisfactoriamente para expresar en su superficie las proteínas E, NS1y NS3 del VDEN (204-206).

Las bacterias tienen como ventaja el ser fácilmente cultivable lo cual permite obtener cantidades elevadas de biomasa celular en un tiempo corto con el empleo de medios de cultivo relativamente baratos. Esto posibilita un manejo adecuado de las fermentaciones de densidad elevada, así como un escalado fácil (207). Además, es un microorganismo que se puede modificar genéticamente para obtener rápidamente una progenie modificada. Algunas cepas de *E. coli* se han modificado en su genotipo con el fin de incrementar la producción y la estabilidad de las proteínas recombinantes expresadas (208, 209).

Para la producción exitosa de las proteínas recombinantes en esta bacteria se deben tener en cuenta una serie de factores genéticos y fisiológicos entre los que se encuentran: la eficiencia transcripcional y traduccional, la estabilidad del vector de expresión y de los ARN transcriptos, la estabilidad de las moléculas ante el ambiente proteolítico del hospedero, la localización y plegamiento de la proteína, así como la capacidad de expresión de la cepa del organismo hospedero, lo cual siempre requerirá hacer un estudio con cepas diferentes, con vistas a seleccionar la más adecuada para la expresión de la proteína recombinante deseada (210, 211).

Entre las desventajas descritas para la bacteria *E. coli* se encuentran su incapacidad de realizar las modificaciones post-traduccionales, necesarias para la mayoría de las proteínas eucarióticas y la producción de concentraciones elevadas de la proteína heteróloga, en forma insoluble formando cuerpos de inclusión (CIs) (212).

En los CIs, las proteínas recombinantes carecen de actividad biológica por encontrarse incorrectamente renaturalizadas y las mismas pueden observarse por microscopía de fase como partículas intracelulares oscuras (213). Sin embargo, los CIs pueden constituir un modelo asequible para estudiar la agregación de proteínas (214) y además para estudiar las bases moleculares de las enfermedades conformacionales como la enfermedad de Huntington y el Alzheimer (215).

La cepa de *E. coli* más utilizada en los sistemas de expresión es la BL21, debido a que es defectiva en las proteasas OmpT y Lon, involucradas en la degradación de las proteínas (216). En función del sistema de expresión empleado, la cepa puede contener el módulo regulador de

la expresión integrado en el cromosoma. En los sistemas de expresión pET y pRSET, la cepa bacteriana contiene el ADN del bacteriófago DE3 integrado en el cromosoma. Este bacteriófago contiene a su vez el gen codificante de la T7 RNA polimerasa regulado por el promotor lacUV5 cuya actividad se induce por medio de la adición del inductor tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG, *Isopropyl Thiogalactopyranoside*) (217). En los sistemas pGEX, pQE, pTrc y pBAD la expresión de las proteínas recombinantes no está supeditada a la presencia de un módulo regulador integrado en el cromosoma de la bacteria. En estos sistemas, los elementos reguladores del promotor para la expresión de proteínas recombinantes están incluidos en el vector, por lo que el mismo vector puede emplearse en combinación con las diferentes cepas (218).

I.7. Modelos experimentales para la evaluación de vacunas contra el VDEN

I.7.1 El hombre como modelo de infección del VDEN

Los hospederos naturales conocidos del VDEN son los mosquitos y los humanos. Evidencias serológicas en PNH apoyan la existencia de un ciclo selvático (219, 220). Sin embargo, estos no reproducen la enfermedad observada en humanos. Por lo tanto, el modelo ideal para estudiar la enfermedad del dengue es el propio hombre. Los primeros modelos humanos documentados de infección por dengue datan de inicios del siglo XX, 1902. Sin embargo, el primer modelo de reto humano para evaluar la capacidad protectora inducida por vacunas contra el dengue lo desarrollaron investigadores del WRAIR.

Ellos demuestran la eficacia de una vacuna tetravalente viva atenuada frente al reto con el VDEN en un grupo de individuos sanos vacunados (221). Además, evidencian la posibilidad de emplear estas vacunas como virus del reto en los ensayos de protección (222). Este modelo de reto humano permite determinar el papel de la inmunidad mediada por células y Acs en individuos previamente vacunados (223) así como evaluar la aparición de signos de alarma indicativos de extravasación de líquidos inducida por el VDEN en individuos sanos, no inmunes a dengue (224). Similarmente, el NIH de los EUA desarrolló un modelo de infección en humanos que les permite evaluar la eficacia protectora de una vacuna tetravalente viva atenuada frente al reto con el VDEN 2 (225, 226). A pesar de las indiscutibles potencialidades de este modelo para las investigaciones en dengue, su uso es aún limitado por varias razones. Entre

ellas podemos mencionar que no existe un compuesto antiviral efectivo que permita combatir el riesgo de desarrollar un cuadro de dengue severo tras el reto viral en individuos inmunizados donde la vacuna tuvo una pobre o ninguna protección (227).

I.7.2 Modelos animales para la evaluación de vacunas contra el VDEN

La búsqueda de modelos animales adecuados para la evaluación de candidatos vacunales tetraivalentes constituye un reto para los grupos de investigación que desarrollan vacunas contra el dengue (228). Estos modelos deberán tener, como característica fundamental, la capacidad de replicar el VDEN, inducir una respuesta inmune medible y reproducir la enfermedad. Además, deberán ser accesibles y fáciles de utilizar en la evaluación de docenas de diferentes candidatos vacunales.

El empleo de animales de experimentación en los ensayos preclínicos para los potenciales candidatos vacunales contra el dengue tiene como objetivo evaluar la seguridad, la infectividad (para vacunas vivas atenuadas), la inmunogenicidad y la posible eficacia protectora de estos candidatos. Entre los animales más empleados en la evaluación de los candidatos vacunales contra el dengue se encuentran los PNH, los ratones y los cerdos.

Los PNH son hospederos naturales del VDEN y se utilizan ampliamente como modelo porque pueden desarrollar viremia y una respuesta de Acs consistente tras la infección con el VDEN (229). Sin embargo, estos no reproducen las manifestaciones clínicas de la enfermedad observada en humanos.

Los monos rhesus (*Macaca*) y los chimpancés son los modelos de PNH más empleados en la última etapa de la evaluación preclínica para determinar la inmunogenicidad de los candidatos vacunales contra el VDEN (230-232). Especialmente los monos rhesus muestran una respuesta inmune de Acs anti-dengue, así como una cinética de la viremia muy similar a la desarrollada por el hombre (233-235).

Por otra parte, un estudio de reto viral desarrollado por Gil y colaboradores revela una plataforma alternativa en monos macacos rhesus para evaluar la inmunogenicidad y eficacia de una vacuna mediante la protección inducida por la inmunidad mediada por células T acoplada a la reducción de la viremia (236). Este modelo se utiliza además para determinar cómo la respuesta inmune contra una cepa viral puede interferir con la respuesta inmune de las cepas de

los otros serotipos o de un mismo serotipo en una vacuna tetravalente, un fenómeno llamado interferencia inter-serotipo (237-239). Los monos verdes (*Cercopithecus aethiops sabaeus*) se emplean satisfactoriamente en la evaluación preclínica de los candidatos vacunales contra el VDEN (240, 241). Sin embargo, el alto costo asociado al mantenimiento de los PNH limita su uso extensivo en los diferentes ensayos de evaluación de candidatos vacunales.

Los ratones son el modelo animal más utilizado, por razones prácticas de disponibilidad y costo. Estos son, generalmente, los primeros en utilizarse en la fase preclínica para el desarrollo y evaluación de candidatos vacunales contra el dengue. Sin embargo, su uso presenta varias limitaciones que ponen en duda la relevancia para humanos de la respuesta inmune inducida por los VDEN en este modelo. Las rutas de infección empleadas son fisiológicamente diferentes a las de la infección natural y la replicación del virus es extremadamente baja, aun cuando grandes cantidades de virus les sean inoculadas. No obstante, la respuesta de Acs inducida por el VDEN en este modelo es similar a la observada en humanos (242). Asimismo, la respuesta de células T presenta el mismo patrón observado en la infección natural en humanos (243).

El desarrollo de un modelo adecuado de ratón para la infección es un gran desafío; sin embargo modelos de ratones genéticamente modificados hacen posible reproducir algunos síntomas clínicos de la enfermedad (244, 245). Además, el uso de cepas de dengue adaptadas en ratón y de diferentes vías de inoculación permite superar la resistencia natural de los ratones a la infección por el VDEN.

La capacidad protectora de la respuesta inmune inducida por el VDEN en ratones se evalúa a través de un modelo de encefalitis viral. Este modelo no reproduce las condiciones naturales puesto que la encefalitis por dengue en humanos es muy rara y, además, necesita de cepas neuroadaptadas que no son patogénicas para humanos (246). Estudios demuestran que la protección frente a la encefalitis en este modelo se asocia a la respuesta de células T y no a la respuesta de Acs Nt (247, 248).

El ratón lactante fue el primer modelo empleado en las investigaciones de dengue, particularmente se utiliza para lograr la adaptabilidad de las cepas del VDEN aisladas de humanos en el cerebro de estos ratones a través de pases seriados (249). Como resultado los ratones muestran parálisis y encefalitis, síntomas neurológicos poco frecuentes en la infección

por el VDEN (250, 251). Este modelo lo adoptan algunos grupos de investigación para evaluar la posible eficacia de anti-virales y candidatos vacunales teniendo en cuenta la severidad clínica, el índice de supervivencia y la reducción de la carga viral en el tejido cerebral (252, 253). Sin embargo la relevancia biológica y fisiológica de este modelo es ampliamente cuestionada.

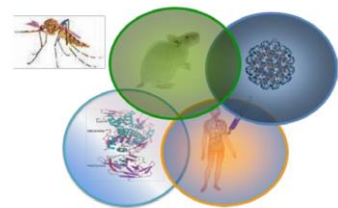
Si bien se plantea que el modelo animal de ratón es un paso necesario, para las evaluaciones de candidatos vacunales contra el dengue, ya que no se dispone de un modelo que reproduzca la enfermedad, los resultados de la respuesta inmune, que de estos ensayos se deriven, debe ser analizada en profundidad. Teniendo en cuenta que los epítomos inmunodominantes de ratón para las células T pueden diferir de los del humano, los resultados pueden no ser concluyentes en el estudio de la respuesta de células T, principalmente, en estudios que involucren la enfermedad grave por dengue (254).

Otro de los modelos empleados, pero poco común en la evaluación de candidatos vacunales contra el VDEN son los cerdos (255). Entre las características que hacen a esta animal un modelo a considerar se encuentra que los cerdos son fisiológicamente similares a los humanos, son menos costosos de obtener y mantener, y además, un gran número de ensayos inmunológicos están disponibles para modelos de cerdos. Uno de estos modelos es el modelo de cerdo en miniatura Yucatán (256). Este modelo tiene la ventaja de poseer una respuesta inmunológica y fisiológica muy similar a la de humanos.

Además presenta propiedades físicas de la piel, metabólicas, inmunológicas y cardiovasculares muy similares a las del hombre, las cuales son aspectos importantes para el estudio de la FHD, teniendo en cuenta que el VDEN afecta estos sistemas. En un estudio que emplea este modelo porcino la primoinfección de 10^7 unidades formadoras de placa (ufp) del VDEN 1 por vía subcutánea induce viremia, así como Acs anti-dengue IgM, IgG y Acs Nt en todos los cerdos (256). Por su parte, la infección secundaria con el mismo título viral del VDEN 1 induce igualmente viremia; pero los títulos de Ac IgM son más bajos que los alcanzados en la infección primaria, mientras que los títulos de Acs IgG y Nt son más elevados (257). Aunque todos estos resultados parecen prometedores, este modelo tiene algunas limitaciones por lo que estudios futuros deberán desarrollarse con otros serotipos del VDEN, para constatar la utilidad de este modelo en la evaluación de candidatos vacunales contra el VDEN.



Capítulo II
MATERIALES Y MÉTODOS



II. MATERIALES Y MÉTODOS

Las investigaciones que forman parte de este trabajo se desarrollaron en el período comprendido entre enero de 2008 y diciembre 2016, en el Departamento de Virología del IPK. Las mismas formaron parte del proyecto de investigación asociado a programa del MINSAP “Estudios moleculares y estructurales de las proteínas del virus del dengue: identificación de proteínas celulares dianas para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad”. Además, este estudio recibió financiamiento de la Coordinación para el Perfeccionamiento de Graduados de Nivel Superior, CAPES, de Brasil, 2010.

II.1. Cepas bacterianas y virales

La tabla II.1 muestra las diferentes cepas bacterianas empleadas así como la finalidad a cumplir en cada uno de los experimentos.

Tabla II.1. Cepas de *E.coli* empleadas en la obtención de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2.

Cepa bacteriana	Ensayos	Procedencia
XL1-Blue [(supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46thi relA1 lac ⁻ F'[proAB ⁻ lacI ^q lacZΔM15 Tn10(tet ^r))] (258)	- Propagación de los plásmidos - Expresión de la proteína NS3	Donada por el Laboratorio Vacuna Dengue del CIGB, Habana, Cuba
M15[pREP4] derivada de la cepa K12 de <i>Escherichia coli</i> (NaI ^s , Str ^s , Rif ^s , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺)	- Expresión de la proteína NS3	No. Catálogo: 1000920 (Qiagen, Alemania)
BL21(DE3) [F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])] (259)	- Expresión de la proteína NS3	Donada por el Laboratorio de Genómica Estructural del Instituto de Biofísica de la Universidad Federal de Rio de Janeiro (UFRJ), Brasil.

La tabla II.2 muestra las diferentes cepas virales empleadas en cada uno de los experimentos.

Tabla II.2. Cepas virales empleadas en la obtención y evaluación de la respuesta inmune de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2.

Ensayo	Cepa viral	Historial de pases	Lugar de aislamiento	Año de aislamiento	Genotipo	No. Acceso GenBank
Ensayos inmuno-enzimáticos sobre fase sólida (ELISA)	VDEN 1 Hawaii (260)	24PR	Hawaii	1944	I	KM204119
	VDEN 2 Nueva Guinea C (260)	24PR	Papua Nueva Guinea	1944	Asiático 2	KM204118
	VDEN 3 H87 (260)	26PR	Filipinas	1956	IV	KU050695
	VDEN 4 H241 (260)	25PR	Filipinas	1956	I	KR011349
Estimulación <i>in vitro</i> de células de bazo de ratón	VDEN 2 SB8553* (261)	7PC6/36H T, 2PV	Malasia	2002	Cosmopolita	FM986658
Esquema de inmunización Ensayo de protección	VDEN 2 A15 (262, 263)	4PR, 2PVero	Cuba	1981	Asiático 2	AJ012547
Clonación del gen ns3 Inmuno-fluorescencia indirecta (IFI) Western Blotting (WB)	VDEN 2 58/97 (264)	2PC6/36	Cuba	1997	Americano/Asiático	AY702035

*cepa donada gentilmente por la Dr. Jane Cardosa de la Universidad de Sarawak, Malasia.

PC6/36HT: Pases en la línea celular C6/36 HT

PV: Pases en la línea celular Vero

PR: Pases en cerebro de ratón

HT: (-en inglés- High Temperature)

Las cepas virales empleadas en los ELISAs se obtuvieron a partir de la inoculación del cerebro de ratón lactante y se concentraron por el método sacarosa-acetona (265). Para la obtención del control negativo viral se partió de un extracto de cerebro de ratón no infectado con el VDEN.

La preparación viral empleada para la inmunización del grupo control positivo en el esquema de inmunización y para el ensayo de protección en ratones, se obtuvo a partir de cerebro de

ratón infectado con el VDEN 2, homogenizado en el medio de cultivo celular líquido RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium)-1640, (Sigma, Reino Unido).

Los antígenos virales utilizados para las estimulaciones *in vitro* en los experimentos de medición de la respuesta celular, la IFI y el WB se prepararon a partir del sobrenadante de cultivo de células Vero y C6/36HT infectadas con los diferentes virus (Tabla II.2). Para ello el sobrenadante se concentró por ultracentrifugación (Beckman Coulter, Bélgica) a 50 000 x g durante 4 h a 4°C. El precipitado viral se resuspendió en tampón fosfato salino (NaCl 100 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, pH 7,2) (PBS). La titulación viral se realizó en células BHK-21 (266). El control negativo se preparó a partir del sobrenadante de células no infectadas.

Las cepas virales y bacterianas empleadas en este estudio se manipularon en cabinas de seguridad biológica clase II (BSC II, *Biosafety Cabinet class II*).

II.2. Cebadores, plásmidos y enzimas de restricción

La tabla II.3 muestra los cebadores empleados en las reacciones de amplificación del fragmento que codifica para la proteína NS3 del VDEN 2.

Tabla II.3. Cebadores utilizados en las reacciones de amplificación del gen ns3 del VDEN 2.

Reacción	*Cebadores	Secuencia 5'-3'
Amplificación del gen ns3 para la clonación en pGEMT y la selección de los plásmidos recombinantes	pGEMTNS3 (+)	CGGGCTGGAGTATTGTGGGAC
	pGEMTNS3 (-)	TTTTCTCCAGCTGCAAATTC
Amplificación del gen ns3 para la clonación en pQE30 y la selección de los plásmidos recombinantes	pQE30NS3 (+)	ctgcag CGGGCTGGAGTA <i>Pst</i> I
	pQE30NS3 (-)	aagctt TTATTTTCTTCCAGCTGCAAATTC <i>Hind</i> III
Amplificación del gen ns3 para la clonación en pE21d y la selección de los plásmidos recombinantes	pET21dNS3 (+)	ggatcc TTATGCGGGCTGGAGTATTGT <i>Bam</i> HI
	pET21dNS3 (-)	aagctt TTTTCTTCCAGCTGCAA <i>Hind</i> III

*Todos los cebadores se sintetizaron en el CIGB

Para la obtención de la molécula recombinante que contiene el gen que codifica para la proteína NS3 del VDEN 2 se emplearon los plásmidos pGEMT (Promega, EUA), pQE30 (Qiagen,

Alemania) y pET21d (Novagen, EUA). Las características y mapas genéticos de estos plásmidos se ilustran en el Anexo I.

Las enzimas de restricción empleadas en las diferentes estrategias de clonación fueron *HindIII*, *PstI* y *BamHI*. Todas las enzimas procedían de la casa comercial Promega, EUA.

II.3. Anticuerpos monoclonales, policlonales y proteína recombinante

Para los ensayos de WB se empleó un AcM anti-6xHis (Qiagen, EUA) y un Ac policlonal anti-NS3 proteasa donado gentilmente por el Prof. Ronaldo Mohana-Borges (Laboratorio de Genómica Estructural, Instituto de Biofísica, UFRJ, Brasil).

Para los ensayos de caracterización antigénica por ELISA se emplearon como fuente de Acs policlonales los líquidos ascíticos hiperinmunes de ratón (LAH) anti-VDEN 1, anti-VDEN 2, anti-VDEN 3 y anti-VDEN 4, producidos por el laboratorio de Arbovirus, IPK.

Para la IFI se utilizó el AcM anti-VDEN 2, 3H5-1-21 donado por la OMS al Laboratorio de Arbovirus, IPK.

La proteína DIII-C-2 se empleó en la evaluación de la capacidad inmunopotenciadora de la proteína NS3 del VDEN 2. Esta proteína quimérica se obtuvo por vía recombinante en forma soluble y contiene los aas del 286 al 426 correspondiente al dominio III (DIII) de la proteína E del VDEN 2 (cepa Jamaica 1339TVP965, 2PC6/36HT) fusionado a la proteína C del mismo serotipo viral (200).

II.4. Animales de experimentación

En el estudio se emplearon ratones BALB/c, hembras, de 7 semanas de vida, con un peso entre 18 y 20 g, suministrados por el Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba. Los animales se manipularon de acuerdo a las normas cubanas para el cuidado y uso de animales de laboratorio incluidas en las Guías para el Trabajo con Animales de Laboratorio del IPK. Los animales se alojaron en jaulas con suelo sólido y lecho grueso y recibieron alimentos y agua *ad libitum*, temperatura de 25°C, humedad del 60%, parámetros que se chequearon durante todo el período de experimentación.

II.5. Consideraciones éticas en el uso de animales de laboratorio

En el diseño de los experimentos con animales se siguió el principio de las 3 Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) enunciado por Russell & Burch (1959) (267). El protocolo experimental estuvo en concordancia con las regulaciones internacionales para el manejo y cuidado de los animales de experimentación y las buenas prácticas de Laboratorio para estudios preclínicos (268). Obtuvo la aprobación del Comité de Ética del IPK (Anexo II).

Principio del reemplazo: Se realizó una extensa revisión bibliográfica en las principales bases de datos internacionales para revistas biomédicas. Esto permitió seleccionar el modelo animal a emplear, así como las dosis de inmunización, lo que evitó la repetición innecesaria de experimentos.

Principio de reducción: Se emplearon animales con un estado genético BALB/c y la interpretación de los resultados experimentales se avaló con la introducción de grupos controles.

Principio de refinamiento: Se tuvieron en cuenta las principales necesidades biológicas de los animales: encamado, confinamiento social, alimentación y suministro de agua (269). Los procedimientos quirúrgicos y la toma de la muestra del seno orbital se realizaron con los animales anestesiados.

En la inmunización intraperitoneal se emplearon técnicas adecuadas para la restricción del animal y en el estudio de la capacidad protectora, los animales se retaron por vía intracraneal previa inducción de anestesia en cámaras con dietileter (270).

Para evaluar la severidad, se registraron diariamente en una hoja de observación los aspectos clínicos individuales (peso corporal, acicalamiento, respiración, locomoción y erizamiento) junto con una evaluación neurológica específica del procedimiento. Se aplicó el punto final humanitario a los animales que experimentaron problemas de salud o malestares como pérdida de peso superior al 20%, inmovilidad durante más de 24 h, falta de acicalamiento, disnea y erizamiento. El método de eutanasia empleado fue la exanguinación (271).

Se emplearon todos los medios de protección disponibles, entre los que se encontraron los uniformes quirúrgicos, guantes y mascarillas de protección. Una vez concluidos los

experimentos las carcazas de los animales sacrificados se colocaron en bolsas para desechos biológicos, debidamente rotuladas y se procedió a su eliminación según el procedimiento establecido por el Departamento de Salud, Seguridad y Epidemiología Hospitalaria del IPK.

II.6. Obtención de los plásmidos recombinantes pGEMT-NS3, pQE30-NS3 y pET21d-NS3

II.6.1 Extracción del ARN del VDEN 2

El ARN viral se extrajo a partir de 140 μ L del sobrenadante de cultivo de células C6/36 HT inoculado con la cepa del VDEN 2 58/97. Para la extracción se empleó el estuche comercial *QIAmp viral RNA Extraction Kit* (Qiagen, EUA) y se siguió el protocolo sugerido por el fabricante para la obtención del ARN viral en un volumen final de 60 μ L.

II.6.2 Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para la amplificación de la región correspondiente al gen ns3 del VDEN 2.

Para la amplificación de la región comprendida entre la posición 4520b y 6375b del genoma viral, correspondiente al gen que codifica para la proteína NS3 del VDEN 2, se empleó el estuche comercial *OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen, EUA) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

La mezcla de reacción contenía los cebadores pGEMTNS3 (+) y pGEMTNS3 (-) para la amplificación del gen ns3, descritos en la tabla III.3, a una concentración final de 1 μ M en 50 μ L de volumen final. A esta mezcla de reacción se le adicionó 5 μ L del ARN viral extraído y la reacción se realizó en un equipo de PCR (Eppendorf, Alemania) bajo las condiciones siguientes: 45 min a 42°C; 10 min a 95°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 2 min a 68°C; y 10 min a 68°C.

El producto de PCR obtenido se purificó empleando el estuche comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EUA) según las indicaciones del fabricante. Al producto amplificado y purificado se le determinó la concentración de ADN por espectrofotometría y se visualizó en un gel de agarosa al 1%. Ambas metodologías se describen en los acápites que a continuación se relacionan.

II.6.3 Determinación de la concentración de ADN mediante espectrofotometría

La cuantificación de la concentración de ADN se realizó mediante espectrofotometría. Para ello, se utilizó un espectrofotómetro V-700 UV-VIS-NIR (Jasco, Japón) y una cubeta de cuarzo de 50 µL de volumen final. Como blanco para la medición se utilizó H₂O bidestilada, estéril. La lectura de absorbancia (A) se realizó a las longitudes de onda 260 y 280 nm. Para la determinación de la concentración se tuvo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg de ADN por mL, para ADN doble cadena. Además la relación establecida A₂₆₀/A₂₈₀ permitió estimar la pureza de las muestras de ADN evaluadas.

II.6.4 Electroforesis de ADN

Las moléculas de ADN se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa, de acuerdo a los procedimientos descritos por Sambrook y colaboradores, 1989 (272). Las muestras de ADN a analizar se mezclaron con el tampón estabilizador de muestra (TEM) 6X (EDTA 500 mM, glicerol al 10%, azul de bromofenol al 0.01%) (Promega, EUA) en una proporción (v/v), 6:1 (ADN: TME 1X). La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1% en tampón de corrida TBE1X (Tris 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 M) teñido con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) (Sigma, EUA). Concluida la electroforesis que se realizó durante 45 min a 120 V en una cámara de electroforesis horizontal (BIO-RAD, EUA), el producto de ADN se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline® Bi-O-Vision™, Alemania). Además, en cada una de las corridas electroforéticas se utilizó como marcador de peso molecular de ADN 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific, EUA) para comprobar la longitud esperada del producto.

II.6.5 Inserción del gen ns3 del VDEN 2 en el vector pGEM-T

Una vez obtenido el gen ns3, este se insertó en el plásmido pGEM-T siguiendo el protocolo descrito en el manual técnico *pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega, EUA). La reacción de ligación se llevó a cabo teniendo en cuenta una relación molar inserto/vector de 3:1 y según la ecuación siguiente:

$$\frac{\text{ng del vector} \times \text{talla del inserto (Kb)}}{\text{talla del del vector (Kb)}} \times \text{Relación molar } \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{ng del inserto}$$

Los componentes de la mezcla de reacción se muestran en la tabla II.4. La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a 4°C.

Tabla II.4. Componentes de la mezcla de reacción para la ligación del vector pGEM-T y el gen que codifica para la proteína NS3.

Componentes de la reacción de ligación	Reacción NS3H:pGEM-T	Control Positivo	Control negativo (fondo)
Tampón de ligación 2X, T4 ADN Ligasa	10 µl	10 µl	10 µl
Vector pGEM-T (50ng)	1 µl	1 µl	1 µl
Producto PCR(NS3H)	1 µl	–	–
ADN del control positivo	–	2 µl	–
T4 ADN Ligasa (3Weiss Unit/µL)	1 µl	1 µl	1 µl
H ₂ O libre de nucleasa	7 µl	7 µl	8 µl
Volumen Final	20 µl	20 µl	20 µl

II.6.6 Transformación de las bacterias y selección de los plásmidos recombinantes

Para la transformación se tomaron 10 µL de los productos de las reacciones de ligación descritas en la tabla II.4 y se mezclaron cada uno con 40 µL de células electrocompetentes XL1-Blue. Las mezclas se incubaron en hielo durante 5 min y posteriormente se electroporaron siguiendo el protocolo descrito en el manual de electroporación para células de *Escherichia coli* (BIO-RAD, USA). El resultado de la transformación se sembró en un medio sólido Luria Bertani (LB: triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L), el cual contenía 50 µg/mL del antibiótico ampicilina (Amp), 1mM de IPTG (isopropiltiogalactósido) 1 mM y 80 µg/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido).

Las colonias de coloración blanca se sembraron en medio sólido LBamp y una vez crecidas, se les realizó el método de PCR de colonia para la selección de los plásmidos recombinantes. Para ello se tomó una colonia aislada y se resuspendió en 20 µL de H₂O bidestilada estéril contenida en un tubo de 0,5 mL. Posteriormente, se colocó el tubo en un recipiente con agua hirviendo durante 2 min; transcurrido este tiempo se retiró inmediatamente el tubo, el cual se centrifugó 15 s a 10 000 x g (Eppendorf Centrifuge 5417R, Alemania). Luego, 1 µL del sobrenadante obtenido se adicionó a la mezcla de reacción cuyos componentes se describen en la tabla II.5.

Tabla II.5. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR del gen que codifica para la proteína NS3.

*Componentes de la mezcla de reacción de PCR	Concentración Final	Volumen empleado
Tampón de la reacción 5x GoTaq	1X	10 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	8 µL
dNTPs (10 mM cada uno)	0.2 mM cada uno	1 µL
Cebadores para ns3 (+) (10 µM)	1 µM	1 µL
Cebador para ns3 (-) (10 µM)	1 µM	1 µL
GoTaq polimerasa	0,5 U	1 µL
H ₂ O a completar 50µL		28 µL

*Todos los componentes de la reacción con excepción de los cebadores son de la casa comercial Promega, EUA.

La reacción de PCR se realizó con el empleo del programa siguiente: 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 2 min a 72°C, y, por último, 10 min a 72°C.

Los productos del PCR de colonias se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% según la metodología descrita en el acápite II.6.4.

Las colonias que contenían los plásmidos identificados como recombinantes se inocularon en 5 mL de medio LBamp y se crecieron durante 16 h a 37°C en una zaranda con agitación a 250 rpm (N-Biotek, Alemania). A las células crecidas se les realizó la extracción del ADN plasmídico siguiendo las instrucciones descritas en el estuche comercial *Pure Link HiPure Plasmid Miniprep* (Invitrogen, Alemania). Los ADN plasmídicos recombinantes obtenidos se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se les determinó la concentración por espectrofotometría según los protocolos descritos en los acápites II.6.4 y II.6.3, respectivamente. Por último, los plásmidos recombinantes se confirmaron a través del método de secuenciación nucleotídica (273) descrito en el acápite siguiente.

II.6.7 Secuenciación nucleotídica del fragmento de ADN del gen ns3 del VDEN 2

De los plásmidos confirmados como positivos por digestión enzimática y PCR de colonias se seleccionaron dos en cada estrategia de clonación para realizar la confirmación por secuenciación nucleotídica. Para ello se empleó el estuche comercial *CEQ DTCS quick start kit* (Beckman Coulter, Bélgica). Este estuche incluye una mezcla que contiene la enzima, dNTPs, dideoxinucleótidos marcados y el tampón de reacción para 96 reacciones de secuencia. Se

utilizaron además seis cebadores que permitieron obtener la secuencia completa del gen ns3 clonado, así como de las regiones de unión al vector correspondiente. En cada reacción de secuencia se adicionó 1 μ L del cebador a emplear (5 mM), 1 μ g del plásmido recombinante, 9 μ L de agua estéril y 8 μ L de la mezcla descrita anteriormente, para obtener 20 μ L de volumen final. Posteriormente, se utilizó un termociclador QCyler II (Quanta Biotech, Reino Unido) para realizar 30 ciclos de 96°C por 20 s, 55°C por 20 s y 60°C por 4 min.

La purificación de los productos de la reacción de secuencia se realizó mediante el método de precipitación con etanol. Para ello se preparó una mezcla de reacción para cada muestra, conteniendo 5 μ L de solución terminadora (2 μ L de Acetato de Sodio 3 M, 2 μ L EDTA 100 mM, 1 μ L de glucógeno 20 mg/mL). La solución anterior se mezcló con los 20 μ L resultantes de la reacción de secuencia y se adicionaron 60 μ L de etanol absoluto. Posteriormente, se mezcló y centrifugó a 10 000 x g a 4°C durante 25 min, utilizando una microcentrífuga refrigerada (Eppendorff, Alemania).

Luego se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado 2 veces con 200 μ L de etanol al 70% (v/v), en cada lavado se centrifugó inmediatamente a 10 000 x g a 4°C durante 2 min. Después de centrifugar, se retiró con cuidado todo el sobrenadante y se dejó secar el precipitado por un tiempo breve. Luego se resuspendió el precipitado en 40 μ L de formamida.

Posteriormente, las muestras se transfirieron a las placas del secuenciador automático de electroforesis capilar CEQ 8800 (BeckmanCoulter, EUA). La secuencia y los cromatogramas correspondientes para cada muestra se procesaron utilizando el programa Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation, EUA).

Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia del aislamiento 58/97 publicada en el Genbank utilizando el programa Bioedit (274).

II.6.8 Subclonación del gen ns3 del VDEN 2 en el vector de expresión pQE30

Para obtener los plásmidos recombinantes del vector pQE30 con el gen ns3 insertado se realizó la amplificación por PCR de este gen, a partir de 50 ng de uno de los plásmidos recombinantes pGEMT-NS3 obtenido. La mezcla de reacción se realizó con los mismos componentes referidos en la tabla II.5 con excepción de los cebadores, los cuales fueron aquellos diseñados con los sitios para las enzimas de restricción *Pst*I y *Hind*III, correspondientes a la clonación en el vector

pQE30. Igualmente, el programa empleado de PCR fue el descrito en el acápite II.6.6. El fragmento obtenido se purificó empleando el estuche comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* y se digirió con las enzimas de restricción *PstI* y *HindIII*.

Por otra parte, el vector pQE30 se digirió con las mismas enzimas de restricción, se defosforiló con la enzima fosfatasa alcalina (Promega, EUA) y se purificó con el mismo estuche comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, previo a la reacción de ligación.

La inserción del gen ns3 en el vector pQE30 se llevó a cabo de igual forma a la descrita en el acápite II.6.5, con una relación molar [inserto (gen ns3): vector (pQE30)] (3:1). Después del proceso de ligación, se realizó la transformación de las células competentes XL1-Blue con el producto ligado y la selección de los plásmidos recombinantes siguiendo la metodología descrita en el acápite II.6.6. Los cebadores empleados en el PCR fueron los diseñados para la clonación en el vector pQE30 referidos en la tabla II.3. Los plásmidos recombinantes identificados se confirmaron igualmente por secuenciación nucleotídica (273).

II.6.9 Clonación del gen ns3 del VDEN 2 en el vector de expresión pET21d

Para obtener los plásmidos recombinantes del vector pET21d con el gen ns3 insertado, se realizó exactamente el mismo proceso descrito en el acápite anterior para la clonación en el vector pQE30, con la modificación de las enzimas de restricción las cuales fueron *BamHI/HindIII* y los cebadores específicos para esta clonación relacionados en la tabla II.3.

De igual forma, las células XL1-Blue electrocompetentes se transformaron con el producto ligado y la selección de los plásmidos recombinantes se realizó igualmente por PCR, confirmándose por secuenciación nucleotídica (273).

II.7. Obtención de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2

II.7.1 Miniexpresión de los clones recombinantes

Para determinar la expresión de la proteína NS3, se realizó la transformación por separado con el plásmido recombinante pQE30-NS3 y con el plásmido pQE30, como control negativo, en las células electrocompetentes XL1-Blue y M15[pREP4]. Igualmente, se realizó la transformación en las células electrocompetentes BL21(DE3) del plásmido recombinante pET21d-NS3 y el plásmido pET21d. De las colonias crecidas se seleccionaron tres de cada una de las

transformaciones y se inocularon en 10 mL de medio LB más el antibiótico correspondiente (LBA), Amp para las células XL1-Blue y las células BL21(DE3) mientras que para las células M15[pREP4], los antibióticos Amp y kanamicina. Las células se crecieron de 12 a 16 h a 37°C en una zaranda con agitación a 250 rpm (N-Biotek, Corea). Posteriormente, se inoculó una dilución 1:100 de este precultivo en 5 mL de medio fresco de LBA, el cual se creció a 37°C con agitación a 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm entre 0,5-0,7 para iniciar posteriormente la inducción de la expresión de la proteína NS3 durante 4 h, por adición de IPTG al cultivo a una concentración final de 1 mM. Transcurrido este tiempo, se colectó y centrifugó a 10 000 x g (Eppendorff, Alemania) 1 mL del cultivo para su análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y WB con un Ac policlonal anti-NS3 proteasa.

II.7.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La técnica de SDS-PAGE se realizó según el método descrito por Laemmli, 1970 (275) con el empleo del sistema de electroforesis Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD, EUA). Las muestras se resuspendieron en solución tampón (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, Glicerol 20% y SDS 4%), con bromofenol azul como indicador del frente de corrida. Se añadió además β -mercaptoetanol (β MeOH) 100 mM en el tampón de la muestra. En todos los casos la corrida electroforética se realizó bajo una corriente constante de 25 mA y en presencia del tampón de corrida (Glicina 1,44%, Tris base 0,3%, SDS 0,1%). Los geles se tiñeron con una solución de azul brillante de Coomassie R-250. Los patrones de peso molecular para determinar la talla aproximada de las proteínas se describen en cada uno de los resultados.

II.7.3 Inmunodetección por Western Blot

Posterior a la corrida electroforética, las proteínas se transfirieron del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa Protran de 0,45 μ m (Amersham-Bioscience, Reino Unido) en un equipo de transferencia submarina Mini Trans-Blot Cell (BIO-RAD, EUA) según lo reportado por Towbin y colaboradores, 1979 (276). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 4% en solución salina fosfatada (PBS) conteniendo Tween-20 al 0,05% (PBS-T), durante 1 h, a 4°C con agitación. Luego de tres lavados sucesivos con PBS-T durante 10 min cada uno, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el Ac primario correspondiente diluido en

PBS-T conteniendo leche descremada al 4%. El AcM anti-6xHis se empleó a una dilución de 1:2 500 mientras que el Ac anti-NS3 a una dilución de 1:1 500. Posteriormente se repitieron los lavados de la misma forma y la membrana se incubó 1 h a 25°C, con un conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa a una dilución 1:1 000 (GE Biosciences, Reino Unido). Después de los últimos lavados, la detección se realizó a 25°C con una solución sustrato conteniendo Diaminobenzidina al 0,1%, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0,03% en PBS. La membrana se incubó hasta la aparición de las bandas, tras lo cual se detuvo la reacción lavando con abundante agua.

II.7.4 Determinación de las condiciones óptimas de expresión de la proteína NS3

Tras la selección de los clones recombinantes que expresaron la proteína NS3, se procedió a determinar las condiciones óptimas para obtener el mayor rendimiento y solubilidad de la proteína recombinante. Se evaluaron factores físico-químico tales como concentración de IPTG: 0,1 mM, 0,5 mM y 1 mM; temperatura de inducción: 18°C, 30°C y 37°C y tiempo de inducción: 4 h, 10 h y hasta 22 h. Para ello, se colectaron 5 µL del precultivo inicial de la miniexpresión (10 mL) y se inocularon en 5 mL de LBA fresco, los que se incubaron durante toda la noche a 37°C en una zaranda con agitación a 250 rpm. De este último cultivo se inocularon 500 µL en 50 mL de LBA y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ nm entre 0,5-0,7. Posteriormente, se realizó la inducción de la expresión de la proteína NS3 con IPTG. Transcurrido el tiempo de inducción bajo cada condición establecida se colectó 1mL del cultivo inducido, el cual se centrifugó a 10 000 x g durante 10 min. Todas las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE y WB con un AcM anti-6xHis. El nivel de expresión de la proteína recombinante NS3, teniendo en cuenta la variación de los parámetros mencionados anteriormente, se estableció por determinación de la concentración final de proteínas totales en cada cultivo inducido.

Como controles negativos del estudio se expresaron las cepas XL1-Blue y M15[pREP4] transformadas con el vector pQE30 y la cepa BL21(DE3) transformada con el vector de expresión pET21d.

II.7.5 Determinación de la concentración de proteínas

Para eliminar las interacciones de los tampones con los reactivos empleados en la cuantificación proteica, las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético. La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método del BCA (277), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Como variante, en este estudio se utilizó el procedimiento descrito para el microensayo, cuyas lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 560 nm se realizaron en placas de 96 pozos con un lector para placa de ELISA (MRX Revelation, Dinex Technologies, Alemania).

II.7.6 Proceso de purificación de la proteína recombinante NS3

Una vez determinadas las condiciones óptimas de expresión se realizó el escalado del cultivo en 300 mL de medio LBA. Para ello las cepas de *E. coli* transformadas con sus respectivos plásmidos recombinantes se inocularon en 5 mL de medio LBA fresco y se crecieron a 37°C durante 16 h en una zaranda con agitación a 250 rpm. Posteriormente, cada precultivo crecido se inoculó en 300 mL de LBA y se incubó en iguales condiciones, hasta alcanzar una DO_{600} nm entre 0,5-0,7. La inducción de la expresión de la proteína NS3 se realizó añadiendo IPTG a la concentración final determinada como óptima y se continuó el crecimiento del cultivo con igual agitación en zaranda a la temperatura y tiempo de inducción establecidos como óptimos para la eficiente expresión de la proteína NS3.

La biomasa celular obtenida por centrifugación a 3 000 x g durante 20 min a 4°C, se sometió a un proceso de ruptura en 20 mL de tampón lisis [Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, β MeOH 5 mM, cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma, Reino Unido)]. El método de ruptura empleado fue el de ultrasonido a través de un sonicador con una potencia entre 200-300 W, una frecuencia de 6 ciclos de 1 min de ruptura con intervalos de 1 min de reposo y seis repeticiones (Soniprep 150, Reino Unido). Posterior a la ruptura celular, se procedió a la centrifugación a 4°C y 10 000 x g durante 30 min para obtener dos fracciones, una soluble y otra insoluble. Ambas fracciones se analizaron por SDS-PAGE y WB con un AcM anti-6xHis y Ac policlonal anti-NS3 proteasa. De acuerdo a la localización de la proteína recombinante NS3 en las fracciones obtenidas, se procedió a diseñar y ejecutar una estrategia de purificación para la obtención de la proteína recombinante.

Si la proteína recombinante se encontró en la fracción soluble, esta se purificó bajo condiciones nativas mediante una cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC, *immobilized metal ion adsorption chromatography*), empleando la columna HisTrapTM (5 mL de matriz) (GE Healthcare Life Sciences, EUA) acoplada al equipo de purificación FPLC-AKTA (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia). Esta columna previamente se equilibró con el mismo tampón de lisis. Una vez aplicado el sobrenadante a la columna, la misma se lavó con 10 volúmenes de columna con el tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, β MeOH 5 mM, Imidazol 20 mM pH 8). La proteína NS3 se eluyó con un gradiente de Imidazol hasta 250 mM. Las fracciones asociadas a los picos de absorbancia a 280 nm correspondiente a las proteínas eluidas se colectaron y analizaron por SDS-PAGE y WB.

Las fracciones identificadas en la electroforesis como relevantes se mezclaron y se dializaron a 4°C contra un tampón de diálisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, glicerol 10%, pH 8) en una relación 1:100 con tres recambios del tampón cada 2 h. Posteriormente, se concentraron hasta un volumen final de 4 mL, con el empleo de Amicon Ultra-4 10K (Millipore, USA). La concentración de proteínas se realizó por el método de ácido bicinónico, BCA, (BCATM Protein Assay Kit, Pierce, EUA) descrito en el acápite (II.7.5).

Por su parte, si la proteína recombinante se encontró en la fracción insoluble, esta se sometió a un proceso de extracción con el empleo del tampón urea 8 M (Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, β MeOH 5 mM, urea 8 M, pH 8) a 4°C, con agitación constante hasta lograr la completa solubilización de la fracción insoluble. Posteriormente, la solución con urea 8 M se centrifugó a 30 000 x g durante 45 min a 4°C y el sobrenadante obtenido se sometió a una purificación por IMAC bajo condiciones desnaturalizantes. Para ello, el sobrenadante se aplicó a la columna HisTrap previamente equilibrada con el tampón urea 8 M. Después, se pasaron 10 volúmenes de columna del tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, β MeOH 5 mM, urea 8 M, Imidazol 20 mM pH 8). Por último, la proteína NS3 se eluyó con un gradiente de Imidazol hasta 250 mM. Las fracciones asociadas a los picos de absorbancia correspondiente a las proteínas eluidas se colectaron y analizaron por SDS-PAGE y WB. Posteriormente, las fracciones en las que se detectó la proteína recombinante se mezclaron y se les determinó la concentración de proteínas por el método de BCA. Esta mezcla proteica se dializó a 4°C contra un tampón de diálisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, glicerol 10%, CHAPS 0,05%, pH 8) en una relación

1:100. Se realizaron gradualmente recambios cada 2 h del tampón de diálisis conteniendo concentraciones decrecientes de urea 4 M, 2 M, 1 M, 0,01 M, hasta dializar toda la noche con el tampón de diálisis sin urea. La solución proteica dializada se concentró por centrifugación a 1 500 x g empleando centriprep YM-30 (Millipore, EUA) hasta obtener un volumen final de 4 mL.

Las proteínas recombinantes obtenidas posterior a la purificación por IMAC se sometieron a una segunda cromatografía, en este caso se aplicaron a una columna de gel filtración (GF) HiPrep 26/60, Sephacryl S-100HR. Esta columna se equilibró previamente con el tampón de diálisis correspondiente y las fracciones eluidas se analizaron por SDS-PAGE, WB y se les determinó la concentración de proteínas por BCA.

Todos los pasos del proceso de purificación de la proteína recombinante NS3 se realizaron a 4°C.

II.7.7 Determinación de los parámetros de control del proceso

La determinación del porcentaje de pureza de la proteína recombinante NS3 se realizó por análisis densitométrico de los geles teñidos con solución de Coomassie R-250. Para ello se analizaron los perfiles de la electroforesis en geles de poliacrilamida en el programa ScanJet Iip (Hewlett Packard, EUA). Las imágenes obtenidas se analizaron con el paquete de programas QGEL (278).

$$\text{mg totales de proteína recombinante} = \frac{\text{Concentración (proteína) x volumen x porcentaje de pureza}}{100\%}$$

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{mg totales de proteína recombinante (etapa n)}}{\text{mg totales de proteína recombinante (etapa 1)}} \times 100\%$$

II.8. Caracterización biológica de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2

II.8.1 Ensayo enzimático para la detección de la actividad proteasa

Para determinar la actividad proteasa de la proteína recombinante NS3 se desarrolló un ensayo espectrofotométrico según el protocolo descrito por Leung y colaboradores, 2001 (113). La

proteína recombinante NS3 a una concentración final de 0,5 μM y el péptido cromogénico Ac-RTSKKR-pNA (AnaSpec EGT, EUA) a una concentración 500 μM , se adicionaron a 200 μL de tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 10 mM; glicerol 10%; CHAPS 0,05%) en placas de poliestireno de 96 pozos. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 2 h. La liberación del fragmento paranitrilado (pNA) producto de la actividad proteasa de la proteína NS3 se monitoreó teniendo en cuenta el incremento en el tiempo de la absorbancia a 405 nm medida en un lector Biomériux 250, versión 2.0.5. Por otra parte, se llevó a cabo un ensayo de actividad proteasa bajo las mismas condiciones descritas anteriormente adicionando la proteína NS2B obtenida de forma recombinante, la cual fue donada gentilmente por el laboratorio de genómica estructural de la UFRJ, Brasil.

Para excluir la posibilidad de la presencia de proteasas celulares, no eliminadas durante el proceso de purificación y con similar especificidad por el sustrato que pudiera ser responsable de la proteólisis observada en el péptido cromogénico, se utilizaron como controles del ensayo, un extracto proteínico de los controles negativos de la expresión en las células de *E. coli* y la proteína NS2B en el tampón de reacción.

II.8.2 ELISA para la evaluación de la antigenicidad de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 con Acs anti-VDEN de ratón

Para la caracterización antigénica de la proteína recombinante NS3 se realizó un ELISA indirecto en el cual se emplearon mezclas de los LAHs obtenidos a partir de las cepas virales de referencia de los cuatro serotipos. Las placas de poliestireno de 96 pozos (MICROLON, Greiner bio-one, Alemania) se recubrieron con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la proteína recombinante NS3 en solución tampón de recubrimiento (Na_2CO_3 0,16%; NaHCO_3 0,29%; pH 9,5) y se incubaron a 37°C por 2 h. Como control negativo se utilizó un extracto proteínico de la cepa [pREP4] transformada con el vector pQE30, el cual se obtuvo bajo las mismas condiciones de expresión y purificación que para la proteína NS3. El bloqueo de las placas se realizó con 150 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de albúmina sérica bovina (ASB) al 1% en solución tampón de recubrimiento durante 1 h a 37°C, tras lo cual se lavaron tres veces con PBS-T. Posteriormente se procedió a evaluar diluciones dobles de los LAH en PBS-T comenzando por 1:100. Para ello, se añadieron 100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ y se incubó a 37°C durante 1 h. Las placas se lavaron nuevamente con PBS-T y se

incubaron a 37°C por 1 h con un conjugado anti-IgG ratón-peroxidasa (Amersham-Bioscience, Reino Unido) a una dilución 1:2 500 en PBS-T en un volumen de 100 µL/pozo. Después de los lavados con PBS-T se añadió o-fenilendiamina 0,04% y H₂O₂ 0,04% (OPD-H₂O₂) en solución tampón de sustrato (Na₂HPO₄ 2%, ácido cítrico 1%, pH 5) y se incubó a 25°C por 30 min. La reacción se detuvo con 50 µL de H₂SO₄ (12,5%) y se determinó la DO₄₉₂ nm. El criterio de positividad del título del LAH se definió como el recíproco de la máxima dilución en que las DO₄₉₂ nm correspondientes a diluciones del LAH frente a la proteína recombinante fueron valores mayores o iguales al doble de las DO₄₉₂ nm obtenidas frente al control negativo del experimento.

II.8.3 Ensayo para evaluar la antigenicidad de la proteína recombinante NS3 para células del bazo de ratones inmunizados con el VDEN

II.8.3.1 Cultivo de las células del bazo y estimulación con la proteína recombinante NS3

Las células del bazo de los ratones previamente inmunizados con el VDEN 2 se obtuvieron en condiciones asépticas y los eritrocitos se lisaron por incubación con una solución de NH₄Cl 0,83%. Luego las células se lavaron dos veces con PBS y suero fetal de ternera (SFT) al 2% y se resuspendieron en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, Reino Unido) suplementado con penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL (Gibco, Reino Unido), glutamina 2 mM (Gibco, Reino Unido), βMeOH 5 x 10⁵ M (Sigma, EUA) y SFT 5%, a una concentración de 2 x 10⁶ células/mL. Posteriormente las células se cultivaron en placas de 96 pozos de fondo en U, (Costar, EUA) a razón de 2 x 10⁵ células/poro y se estimularon con la proteína recombinante NS3 a una concentración de 10 µg/mL o con 10³ ufp del VDEN 2. La Concanavalina A (ConA) (Sigma, EUA) se empleó como control de estimulación del ensayo a una concentración de 5µg/mL. Como controles negativos se emplearon células del bazo de ratones inmunizados con el VDEN 2 sin estimular y células del bazo de ratón normal (no inmunizado con VDEN 2). En todos los experimentos se realizaron tres réplicas por cada antígeno para la estimulación. Después de 120 h de cultivo a 37°C y CO₂ 5%, el sobrenadante de cultivo se colectó para realizar la determinación de las citoquinas.

II.8.3.2 ELISA para la determinación de citoquinas

A los sobrenadantes de cultivo de las células del bazo estimulados con la proteína recombinante NS3 y el VDEN 2 se les determinó la concentración de IFN γ , IL-10 y TNF α presentes en los mismos mediante un ELISA de captura empleando AcMs (Mabtech; Nacía, Sweden). Placas de poliestireno de 96 pozos (Costar, EUA) se recubrieron con 1 μ g/mL de AcMs específicos para IFN γ , IL-10 y TNF α (Mabtech, Suecia) y se incubaron a 4°C durante 16 h. A continuación, las placas se lavaron dos veces con 200 μ L/pozo de PBS y se bloquearon con 200 μ L/pozo de una solución de PBS-T, ASB 0,1% a 25°C durante 1 h, tras lo cual se lavaron cuatro veces con PBS-T. Luego se añadieron 50 μ L/pozo de los sobrenadantes de cultivo, por duplicado, y se incubaron a 25°C durante 2 h.

Posterior a cuatro lavados en las mismas condiciones anteriores, las placas se incubaron con 100 μ L/pozo de PBS-T, ASB 0,1% conteniendo 0,5 μ g/mL de los AcMs biotinilados específicos para IFN γ , IL-10 y TNF α (Mabtech, Suecia) a 25°C durante 1 h y a continuación se lavaron cuatro veces con PBS-T. Finalmente las placas se incubaron a 25°C durante 1 h con estreptavidina-peroxidasa (Mabtech, Suecia) diluida 1:1 000 en PBS-T, ASB 0,1%. Después de cuatro lavados con PBS-T se añadieron 100 μ L/pozo de tampón OPD-H $_2$ O $_2$ y se incubaron a 25°C durante 15 min. La reacción se detuvo al añadir 50 μ L/pozo de H $_2$ SO $_4$ al 12,5% y se determinó la DO $_{492}$ nm. Para determinar la concentración de las distintas citoquinas en el sobrenadante se emplearon curvas correspondientes a las citoquinas recombinantes IFN γ , IL-10, TNF α , de concentraciones conocidas. El límite de detección de la citoquina fue de 10 pg/mL.

II.9. Evaluación inmunológica de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 en ratones

II.9.1 Esquema de inmunización

Para evaluar la respuesta inmune inducida por la proteína recombinante NS3 y la capacidad protectora, se emplearon ratones BALB/c, hembras, de 7 semanas de edad con 16 gramos de peso provenientes del CENPALAB. Para ello, se desarrolló el siguiente esquema de inmunización consistente de cuatro grupos de 12 ratones cada uno. Cada grupo recibió tres dosis, espaciadas 15 días entre ellas, de:

Grupo 1 (Placebo): 20 µg de proteínas totales provenientes de la expresión en las células XL1-Blue del plásmido pQE30 (control negativo de la expresión).

Grupo 2: 10 µg de la proteína recombinante NS3.

Grupo 3: 20 µg de la proteína recombinante NS3.

Grupo 4: una dosis única (0,5 mL) de una preparación de VDEN 2 infectiva a una concentración 10^5 ufp/mL.

La primera dosis se emulsionó con Adyuvante Completo de Freund y el resto de las dosis con Adyuvante Incompleto de Freund para un volumen final de 100 µL. Siete animales por grupo se sangraron 15 días tras la última dosis, para determinar por ELISA la respuesta inmune humoral inducida por la proteína recombinante NS3 y el reconocimiento antigénico de la proteína NS3 nativa por IFI y WB.

Un mes tras la última dosis, se utilizaron 5 ratones por grupo para los estudios de la respuesta celular inducida por la proteína recombinante NS3. El resto de los ratones, se retaron con el virus salvaje para realizar el estudio de protección.

II.9.2 ELISA para la evaluación de la respuesta de anticuerpos anti-NS3 recombinante

Para la detección de los Acs anti-NS3 recombinante, 15 días tras la última dosis se sangraron los ratones inmunizados con la proteína recombinante NS3 y se les determinó el título de Acs anti-NS3 por ELISA. Para ello se realizó un protocolo similar al descrito en el acápite II.8.2 con la diferencia que en este ELISA indirecto se evaluaron las diluciones dobles de los sueros de los ratones inmunizados con la proteína recombinante NS3. Como control negativo se empleó una mezcla de los sueros de los ratones pertenecientes al grupo placebo.

II.9.3 Reconocimiento antigénico de la proteína NS3 nativa del VDEN2 por anticuerpos anti-NS3 recombinante

II.9.3.1 Inmunofluorescencia Indirecta

Las células C6/36HT se infectaron con el VDEN 2. A las 48 h de infección, las células se colectaron y se realizó la IFI según el método descrito por Henchal y colaboradores (279). Los sueros de los ratones inmunizados con 20 µg de la proteína recombinante NS3 se emplearon para detectar la presencia del antígeno viral en las células inoculadas. Como controles de este

ensayo se emplearon células C6/36HT no infectadas (control negativo) y células inoculadas con el VDEN 2, las cuales se evaluaron con el AcM específico para el VDEN 2, 3H5-1-21 (control positivo).

II.9.3.2 Western Blot

Para realizar la identificación y reconocimiento de la proteína NS3 nativa por Acs anti-NS3 recombinantes, el sobrenadante colectado de las células C6/36HT infectadas con el VDEN 2 se aplicó a un gel de poliacrilamida y luego de la corrida se transfirió a una membrana de nitrocelulosa siguiendo el protocolo descrito previamente en el acápite II.7.3.

Como primer Ac se emplearon los sueros de los ratones inmunizados con 20 µg de la proteína recombinante a una dilución de 1:500, los sueros de los ratones del grupo placebo como control negativo a la misma dilución y el LAH anti-VDEN 2 como control positivo, el cual se utilizó a una dilución de 1:100. Luego la reacción se reveló con un conjugado anti-IgG de ratón peroxidasa y su sustrato.

II.9.4 Ensayo para la determinación de la frecuencia de células específicas a la proteína NS3 productoras de IFN γ por la técnica de ELISPOT

Las células del bazo de cinco ratones por grupo se obtuvieron treinta días tras la última dosis de inmunización, bajo las mismas condiciones descritas en el acápite II.8.3. Del total de células obtenidas, 2×10^5 células/pozo se cultivaron en placas de 96 pozos fondo U (Costar, EUA) y se estimularon con 10^3 ufp del VDEN 2, 10 µg/mL de la proteína recombinante NS3 y de la preparación proteínica, control negativo (proteínas totales obtenidas de la expresión del plásmido pQE30 en la cepa XL1-Blue). La ConA se usó como control de estimulación. Después de 4 días de cultivo a 37°C y CO₂ 5%, las células se colectaron y se transfirieron a placas de 96 pozos específicas de ELISPOT. Previamente las placas de ELISPOT se recubrieron con 10 µg/mL del Ac anti-IFN γ y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Posteriormente las placas se lavaron tres veces con PBS y se adicionaron 100 µL por pozo de una solución bloqueadora con leche descremada al 2% en PBS. Las placas se incubaron 2 h a 25°C. Tras tres lavados con PBS, a las placas se les adicionaron las células colectadas luego del ensayo de estimulación y se incubó toda la noche a 37°C en CO₂ al 5%. Las placas se lavaron tres veces con PBS y se les adicionó 100 µL por pozo de PBS con ASB 0,1% y 0,5µg/mL de un AcM biotinilado

específico para el IFN γ . Seguidamente las placas se incubaron 1 h a 25°C, se lavaron tres veces con PBS y se les adicionó 100 μ L por pozo de una solución enzimática de estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina a una dilución de 1:5 000. Posterior a la incubación de las placas 1 h a 37°C, estas se lavaron con PBS y se les adicionó 100 μ L por pozo del sustrato AEC (BD, Bioscience, EUA), incubándolas 10 min a 25°C. Por último las placas se lavaron con agua destilada para detener la formación de las manchas y se secaron completamente. Cada mancha en la placa representa la célula del bazo secretora de la citoquina IFN γ tras la estimulación con los antígenos virales. Las manchas obtenidas se contaron con un sistema lector de ELISPOT, Immunospot (Cellular Technology Ltd, EUA) empleando el software Immunospot versión 3.

El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como el promedio del número de células formadoras de manchas por cada 10⁵ células, restándole el valor detectado en las células del bazo incubadas solamente con el medio.

II.9.5 Ensayo de protección

Los animales previamente inmunizados con las distintas concentraciones de la proteína recombinante se retaron por vía intracraneal al mes de la última dosis con 50LD₅₀ de una preparación de VDEN 2 infectivo en un volumen de 20 μ L. Después de la inoculación, se mantuvieron en observación diaria por un período de 21 días y se llevó el control de la mortalidad en el tiempo.

II.10. Evaluación en ratones de la capacidad inmunopotenciadora de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 sobre la respuesta inmune generada por la formulación vacunal DIII-C-2

Para demostrar la capacidad potenciadora de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 en la inmunogenicidad de la proteína recombinante DIII-C-2 se desarrolló un esquema de inmunización similar al descrito en el acápite II.9.1. Ratones agrupados en cinco grupos de 12 animales cada uno, se inmunizaron con 20 μ g de las proteínas recombinantes DIII-C-2, NS3 y DIII-C-2/NS3 adyuvadas en hidróxido de aluminio (alúmina) a una concentración de 1,44 mg/mL. El grupo placebo recibió solamente alúmina como inmunógeno y el grupo control positivo (VDEN 2) recibió 10⁴ ufp. Diez animales por grupo se sangraron a los 15 y 30 días tras la última dosis para el estudio de la respuesta de Acs anti-virales y Acs Nt inducidos por cada

una de las formulaciones. Del mismo modo, un mes tras la última dosis, el resto de los animales se retaron con el VDEN 2. A los 7 días a un grupo de ratones (n=7) se les practicó la eutanasia y se les realizó la extracción del cerebro en condiciones asépticas para determinar, en el sobrenadante del lisado tisular, la presencia de la proteína NS1. Para ello se empleó, un ELISA tipo sándwich y la expresión de genes de citoquinas en el tejido cerebral.

II.10.1 ELISA para la determinación de la respuesta de anticuerpos anti-VDEN 2

Para la evaluación de la respuesta de Acs anti-VDEN 2 inducida por las proteínas recombinantes en ratones BALB/c, se utilizó la metodología descrita por Izquierdo y colaboradores (280). Para ello, se recubrieron las placas de poliestireno de 96 pozos (MICROLON, Greiner bio-one) con 0,1 mL/pozo de inmunoglobulina anti-VDEN humana (purificada a partir de sueros de individuos con una infección secundaria a VDEN) a una concentración de 5 µg/mL en tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 0,16%, NaHCO₃ 0,29%, pH 9,5) y se incubaron 2 h a 37°C. Posteriormente, las placas se bloquearon con 0,15 mL/pozo de ASB al 2% en tampón de recubrimiento y nuevamente se incubaron por 1 h a 37°C. Luego se adicionó el antígeno del VDEN 2 y como control negativo una suspensión celular del cerebro de ratón lactante (CN), ambos a razón de 0,1 mL/pozo a una dilución 1:100. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo, se realizaron diluciones dobles de los sueros de los ratones pertenecientes a cada grupo de inmunización comenzando por 1:100, en diluyente de muestra [PBS-T, 2% de ASB, 2% de CN y 2% de suero humano normal (SHN)] y se añadió 0,1 mL/pozo para incubar posteriormente las placas 1 h a 37°C. Al concluir el tiempo de incubación se añadió 0,1 mL/pozo de conjugado anti-IgG ratón-peroxidasa (GE Biosciences, EUA) diluido 1:2500 en diluyente de muestra y las placas se incubaron 1 h a 37°C. Después se añadieron 0,1 mL/pozo de OPD-H₂O₂ diluida en tampón sustrato y las placas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 0,05 mL/pozo de H₂SO₄ 12,5% y se realizó la lectura a una DO₄₉₂ nm en un lector de microplacas (Biomeriëux, Francia). A partir del paso de bloqueo con ASB y después de añadir el conjugado, se realizaron tres lavados con PBS-T después de cada etapa de reacción. Como criterio de positividad se consideró una relación de DO de la dilución de suero/DO del control negativo del suero, mayor o igual a dos. El título de Ac de un suero en particular se expresa como el recíproco de la máxima dilución que muestra un valor positivo.

Similar procedimiento al recién descrito, se realizó para la determinación de las subclases de Acs IgG, pero con el empleo de los conjugados específicos para las subclases de tipo IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3.

II.10.2 Ensayo de neutralización por reducción del número de placas (NRNP)

Con el fin de evaluar la funcionalidad de la respuesta de Acs inducida por las proteínas recombinantes en ratones BALB/c inmunizados, se determinó la respuesta de Acs Nt como se describe a continuación. Primeramente se prepararon diluciones seriadas del VDEN 2 en base 10 desde 10^{-1} hasta 10^{-3} en medio MEM-E y de los sueros, control positivo (LAH del VDEN 2) y negativo (SHN). La primera dilución de los sueros controles se trató con cloroformo para su descontaminación y posteriormente se prepararon diluciones de trabajo de la cepa viral A15 del VDEN 2 en medio de cultivo, para obtener 30 ufp/0,05 mL. Las diluciones de los sueros de los ratones inmunizados se mezclaron con igual volumen de las diluciones virales de trabajo (0,1 mL de cada una) en placas de 96 pozos, de forma tal que 0,05 mL de estas mezclas contienen 15 ufp. Para cada cepa viral se preparó un control viral que consistió en mezclas de la dilución de trabajo de estas con igual volumen de medio de cultivo. Las mezclas se incubaron durante 1 h a 37°C en atmósfera de CO₂ a 5%. Posteriormente, 0,05 mL de cada una de las mezclas virus-suero y de los controles virales se inocularon en 0,5 mL de la suspensión de células BHK-21 clono 15 crecidas previamente en placas de 24 pozos. Las células inoculadas se incubaron durante 4 h a 37°C en atmósfera de CO₂ a 5%. El medio de recubrimiento (MEM-E 2X, Glutamina 1%, SFBI 10%, Carboximetilcelulosa 50% y antibióticos 100X) se añadió a razón de 0,5 mL por pozo. Por último, las células se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ a 5% durante 120 h. Luego de la incubación, se descartó el medio y se lavaron las monocapas celulares con agua corriente. A cada pozo de las placas se le añadió 0,5 mL de colorante Naphtol Blue Black (Ácido acético, Naphtol Blue Black y acetato de sodio). Después de 30 min en reposo se realizó un segundo lavado y las placas se dejaron secar a temperatura ambiente. El valor porcentual de reducción del número de placas con respecto al control viral se calculó según la relación (266, 281):

$$\% \text{ de reducción} = [1 - (X_s/X_m)] \times 100\%$$

En la cual:

X_s -- promedio del número de placas obtenido para cada dilución de suero.

Xm -- promedio del número de placas obtenido para el control viral.

A cada dilución de suero se le determinó su valor porcentual de reducción del número de placas virales. Estos datos se analizaron en un papel semilogarítmico para determinar la dilución de suero que reduce un 50% el número de placas virales con respecto al control viral, lo que representa el título de Acs Nt del suero en cuestión.

II.10.3 Ensayo de protección en ratones inmunizados tras el reto con el VDEN 2

II.10.3.1 Detección de la proteína NS1 en el tejido cerebral

Los sobrenadantes del macerado de cerebro, se colectaron y analizaron para la detección de la proteína NS1 del VDEN 2 por el método inmunoenzimático “Platelia TM Dengue NS1 Ag Detection”, (BIO-RAD, EUA). Este método se basa en un ELISA tipo sandwich, en formato microplaca, para la detección semicuantitativa de la proteína NS1 del VDEN. A continuación se describe el protocolo empleado. Primeramente se estableció cuidadosamente el plan de distribución e identificación del calibrador R4 (tampón Tris-NaCl, pH 8, NS1 virus DEN, ASB, glicerol E102, E122 y conservante < 1,5% ProClin TM 300), el control negativo R3 (SHN para el antígeno NS1 del VDEN y conservante < 1,5% ProClin TM 300), el control positivo R5 (tampón Tris-NaCl, pH 8, antígeno NS1 del VDEN, ASB, glicerol E102, E122 y conservante < 1,5% ProClin TM 300) y los sobrenadantes a evaluar. Además se acopló el soporte y las barras R1 (barras sensibilizadas con AcM anti-NS1). Posteriormente se adicionó 0,05 mL/pozo de diluyente R7 (tampón fosfato, Tween 20, SFT y conservante < 1,5% ProClinTM300), 0,05 mL de muestras (calibrador, controles y sobrenadantes), 0,1 mL/pozo de conjugado diluido R6 (AcM anti-NS1 conjugado con peroxidasa y conservante < 1,5% ProClinTM300) (0,24 mL de R6 + 12 mL de R7). Luego se selló la superficie completa de la microplaca con una película adhesiva y se incubó la misma 1 h a 37°C en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo se realizaron 6 lavados con la solución de lavado (500 mL de agua destilada + 25 mL de R2 (TRIS-NaCl, pH 7,4; 2% Tween-20 y conservante < 1,5% ProClinTM300). Seguidamente se añadieron 0,16 mL/pozo del cromógeno R9 (3,3', 5,5' tetrametilbencidina (<0,1%), H₂O₂ (<0,1%)) y la placa se incubó 30 min a temperatura ambiente. Por último la reacción se detuvo con 0,1 mL/pozo de la solución de parada R10 (ácido sulfúrico 1N) y se realizó la lectura a una longitud de onda de 450/620 nm en un lector de microplacas (Biomeriéux, Francia).

Como criterio de positividad en relación a los niveles de NS1 detectados se tomó como valor positivo, dos veces la media de la DO del grupo placebo.

II.10.3.2 Cuantificación de la expresión de genes de citoquinas en el tejido cerebral

El cerebro de los ratones previamente inmunizados y retados con el VDEN 2 se extrajo a los 7 días del reto viral bajo condiciones asépticas. El mismo se maceró en PBS con antibiótico/antimicótico 100X. El homogenizado se centrifugó a 2 000 x g durante 10 min y el sobrenadante se colectó y almacenó a -70°C.

La obtención del ARNm se realizó a partir de 140 µL del sobrenadante del lisado tisular y se empleó el estuche comercial *QIAamp RNA Blood Mini Handbook* (Qiagen, Alemania), siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante. Una vez obtenido el ARN viral, se procedió a realizar la síntesis del ADNc, la cual se ejecutó con el empleo de la enzima SuperScript™ III (Invitrogen, Alemania) en las siguientes reacciones enzimáticas (Tabla II.6).

Tabla II.6. Componentes de la mezcla de reacción para la síntesis del ADNc a partir del ARNm.

Componentes de la mezcla de reacción 1	Volumen empleado
Cebadores	1 µL
dNTP Mix (10 mM c/dNTP)	1 µL
H ₂ O libre de ARNasas	3 µL
Volumen final de reacción	5 µL
Componentes de la mezcla de reacción 2	Volumen empleado
Tampón 5x (5x First Strand Buffer)	4 µL
DTT	1 µL
RNAsin (RNase out™)	1 µL
Enzima Super script™ III	1 µL
Volumen final de reacción	7 µL

A las mezclas de reacción 1 se les añadió 8 µl del ARN obtenido y se colocaron en el termociclador por 5 min a 65°C. Posteriormente, los viales se colocaron en hielo durante 1 min y se centrifugó brevemente para proceder a realizar la segunda reacción enzimática.

A estas mezclas iniciales se les adicionó 7 µl de la mezcla de reacción 2, se incubaron durante 5 min a 25°C, se colocaron en el termociclador durante 60 min a 50°C y se incubaron por 15 min a 20°C.

La expresión de los genes de las citoquinas se determinó en las células de cerebro de los ratones por PCR en tiempo real utilizando el sistema de detección Light Cycler 1.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Para ello se emplearon cebadores específicos para IFN γ , TNF α , IL-10 e hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa-1 (HPRT-1), este último empleado como gen constitutivo de referencia. Las secuencias de los cebadores para las citoquinas IFN γ , TNF α , IL-10 y HPRT-1 se muestran en la tabla II.7.

Tabla II.7. Cebadores empleados en el PCR en tiempo real para la expresión de citoquinas.

Citoquinas	Cebadores (+) / (-)
IFN γ	5'- GGA TGC ATT CAT GAG TAT TG-3' / 5'- CTT TTC CGC TTC CTG AGG-3'
TNF α	5'-CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A-3' / 5'-TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC-3'
IL-10	5'-GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA-3' / 5'-ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT-3'
HPRT-1	5'- GTT GGA TAT GCC CTT GAC-3' / 5'- AGG ACT AGA ACA CCT GCT-3'

La reacción de PCR se desarrolló como se describe a continuación en la tabla II.8. Como control negativo se utilizó una mezcla para cada citoquina a la cual no se le adicionó ADNc sino agua. La expresión específica se calculó con relación a la expresión de HPRT-1 por el método delta Ct, recomendado.

Tabla II.8. Componentes de la mezcla de reacción del PCR en tiempo real ejecutado para determinar la expresión de los genes de citoquinas.

Componentes de la mezcla de reacción	Volumen empleado
ADNc	1 μ L
Mezcla de cebadores	2 μ L
Agua libre de ARNasa	14 μ L
MgCl (25mM)	1 μ L
Enzima Master SYBR Green I (Roche)	2 μ L
Volumen final de reacción	20 μL

La mezcla de reacción se colocó en el termociclador y se ejecutó el siguiente programa:

Tabla II.9. Programa diseñado para el PCR en tiempo real ejecutado para determinar la expresión de los genes de citoquinas.

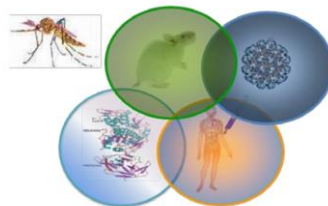
Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización	95	30
Cuantificación (45 ciclos)		
• Desnaturalización	95	5
• Hibridación	62	10
• Extensión	72	30
Curva de Fusión		
• Desnaturalización	95	0
• Hibridación	65	15
• Fusión	95	0
Enfriamiento	4	30

II.11. Análisis Estadístico

Los resultados se presentan en tablas y gráficos confeccionados en Excel. El análisis estadístico de los resultados se realizó empleando el programa GraphPad Prism versión 5.00 [GraphPad Software, USA, (<http://www.graphpad.com>)]. A los datos obtenidos durante la experimentación se les comprobó la normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov (corrección Dallal-Wilkinson-Liliefors) y la homogeneidad de varianza por la prueba de Bartlett. Cuando los datos directos o transformados siguieron una distribución normal se aplicó un análisis paramétrico y en caso contrario se aplicó un análisis no paramétrico. Todos los valores con *, ** y *** indican diferencias significativas con p.

II.12. Limitaciones del estudio

En el presente estudio se previó realizar la cuantificación de citoquinas por ELISPOT en los ensayos *in vivo*. Sin embargo, por limitaciones logísticas (escasez de estuches comerciales y placas de ELISPOT), así como las repeticiones intraensayos, se empleó el experimento de expresión relativa de genes de citoquinas como ensayo alternativo para determinar la capacidad inmunopotenciadora de la proteína recombinante NS3 en la formulación vacunal DIII-C-2.



III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Obtención de los plásmidos recombinantes pQE30-NS3 y pET21d-NS3

A partir de la extracción del ARN del VDEN 2 y la RT-PCR se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 1,85 Kb, que codifica para la proteína NS3 del VDEN 2. Este fragmento se insertó inicialmente en el vector pGEMT para luego clonarse en los vectores de expresión, pQE30 y pET21d.

En la figura III.1 se muestran los resultados de la selección por PCR, de los plásmidos recombinantes obtenidos en las tres clonaciones realizadas. Como resultado de la clonación en el vector pGEMT, los tres plásmidos evaluados mostraron una banda intensa a la talla esperada de aproximadamente 1,85 Kb (Figura III.1.A). Similar resultado se observó para la clonación en el vector pET21d, en el cual todos los plásmidos chequeados resultaron ser recombinantes al amplificar el fragmento que codifica para la proteína NS3 (Figura III.1.C). Por su parte, de los ocho plásmidos seleccionados de la clonación en el vector pQE30, siete presentaron el fragmento de 1,85 Kb que codifica para la proteína NS3 (Figura III.1.B).

La secuenciación nucleotídica del gen ns3 insertado en los plásmidos recombinantes reveló un 99,7% de similitud con la secuencia de la cepa cubana 58/97 genotipo asiático/americano. Además se corroboró la correcta orientación del gen ns3, la correcta posición del marco abierto de lectura y la presencia de la secuencia nucleotídica que codifica para 6 aas consecutivos de histidina en el extremo 5' de los plásmidos recombinantes pQE30-NS3 y en el extremo 3' de los plásmidos recombinantes pET21d-NS3.

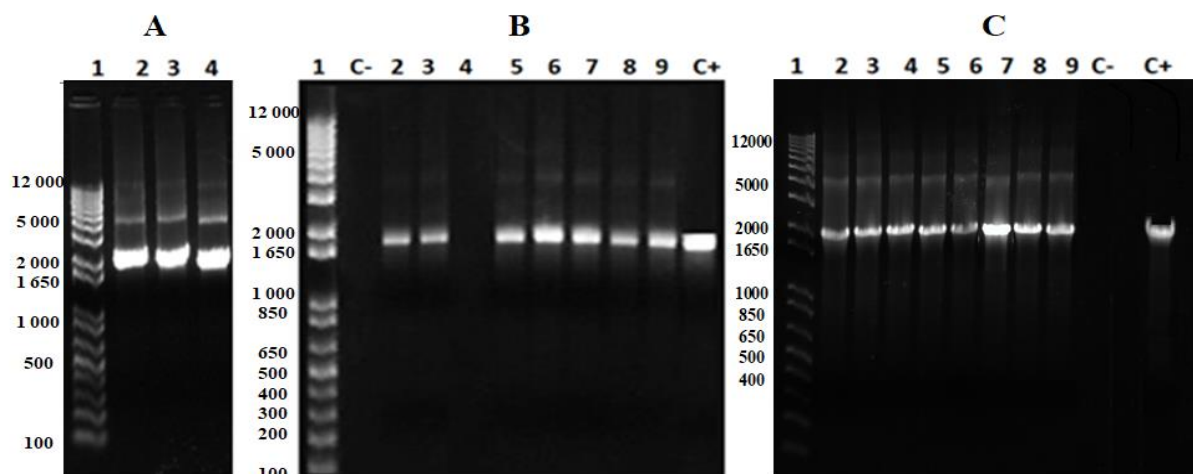


Figura III.1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la selección, por PCR, de los plásmidos recombinantes pGEMT-NS3 (A), pQE30-NS3 (B), pET21d-NS3 (C). el primer carril de cada imagen corresponde al patrón de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo, EUA). (A) carriles 2-4: plásmidos recombinantes pGEMT-NS3; (B) carril C-: plásmido pQE30 (control negativo), carriles 2-9: plásmidos recombinantes pQE30-NS3, carril C+: control positivo (fragmento de 1,85 Kb que codifica para la proteína NS3). (C) carriles 2-9: plásmidos recombinantes pET21d-NS3, carril C-: plásmido pET21d (control negativo) y carril C+: control positivo (fragmento de 1,85 Kb que codifica para la proteína NS3).

III.2. Obtención de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2

III.2.1 Expresión de la proteína NS3 del VDEN 2 en tres cepas de *Escherichia coli*

En la figura III.2 se muestra el resultado de la expresión tras 4 h de inducción con 1 mM de IPTG y a 37°C, de tres colonias seleccionadas de las transformaciones realizadas en las células XL1-Blue y M15[pREP4] con el plásmido recombinante pQE30-NS3 clon 5. Además se muestra el resultado de la transformación de las células BL21(DE3) con los plásmidos recombinantes pET21d-NS3 (clones 6 y 7). Como se puede apreciar en el WB de la figura III.2, aproximadamente a la talla de 70 kDa, todas las colonias mostraron una banda intensa que se identificó como la proteína NS3 por el reconocimiento realizado con un Ac policlonal anti-NS3 proteasa. Al comparar los niveles de expresión en las células BL21(DE3) de los plásmidos recombinantes 6 y 7, no se observaron diferencias en la expresión de las colonias evaluadas (Figura III.2B). Sin embargo, si se observaron diferencias en los niveles de expresión de las células transformadas con el plásmido recombinante pQE30-NS3 clon 5 (Figura III.2 A). Las células M15[pREP4] mostraron mayor expresión de la proteína NS3 teniendo en cuenta que la

banda reconocida por el AcM anti-NS3 proteasa fue más intensa en la colonias de M15[pREP4] que en las células XL1-Blue.

Este resultado se puede explicar por la presencia del vector pREP4, que le confiere una velocidad de transcripción superior a la ARN polimerasa y asegura la producción de niveles altos de la proteína represora lac, la cual una vez añadido el IPTG se separa del operador y favorece la expresión continua de la proteína recombinante (282).

A pesar de la optimización de los parámetros físico-químicos evaluados, no se logró obtener la proteína recombinante NS3 soluble en ninguna de las cepas bacterianas transformadas con el plásmido recombinante pQE30-NS3.

Esto sugiere que la proteína NS3 se expresa en una conformación que propicia la agregación de esta proteína y que se encuentre formando parte de los CIs. Estos resultados son coincidentes con los publicados por Kuo y colaboradores, quienes obtuvieron niveles elevados de expresión de la proteína NS3 del VEJ formando CIs en la fracción insoluble, con el empleo del vector pQE30 y la cepa M15 [pREP4] (283).

Las proteínas en los CIs se encuentran en forma de agregados moleculares funcionalmente y además suelen mostrar alteraciones estructurales, como puentes disulfuro no nativos intra e intermoleculares y cisteínas libres no habituales. Esto es un impedimento para la expresión de las proteínas de interés con la finalidad de caracterizar su estructura, función biológica, actividad enzimática, unión a ligando, interacciones con otras proteínas, entre otras (284, 285).

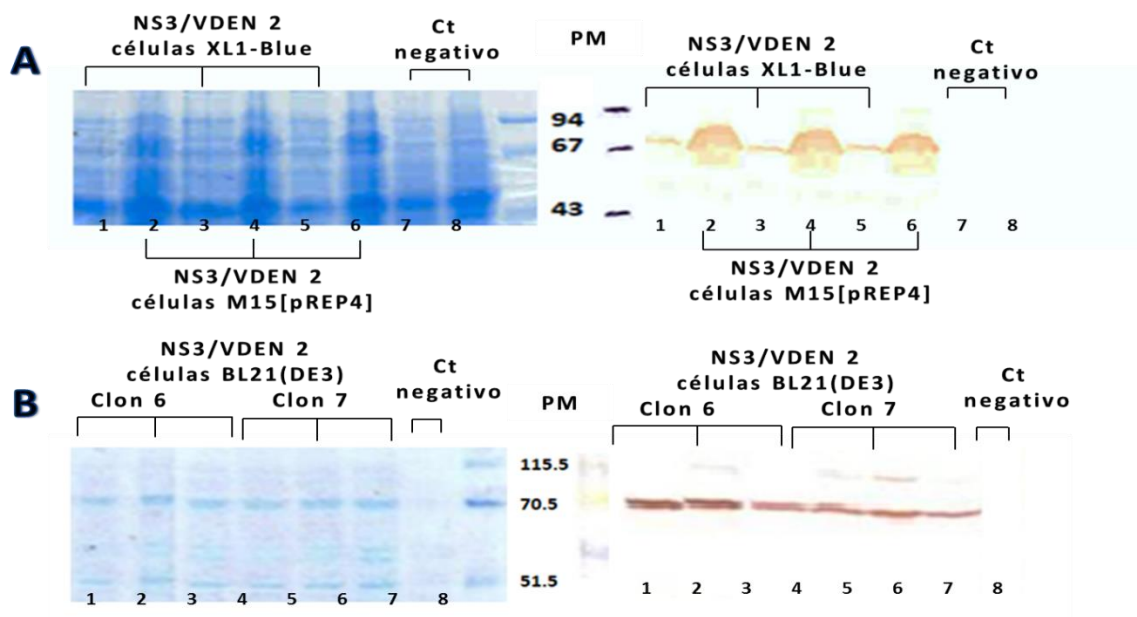


Figura III.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes e inmunodetección con el AcM anti-NS3 proteasa. Expresión de la proteína NS3 del VDEN 2 en las cepas de *Escherichia coli* tras 4 h de inducción con 1 mM de IPTG y a 37°C. **(A)** carriles 1, 3 y 5: expresión del plásmido recombinante pQE30-NS3 clon 5, en tres colonias de las células XL1-Blue; carriles 2, 4 y 6: expresión del plásmido recombinante pQE30-NS3 clon 5, en tres colonias de las células M15[pREP4]; carriles 7 y 8: expresión del plásmido pQE30 en las células XL1-Blue y M15[pREP4], respectivamente (controles negativos). **(B)** carriles 1-3: expresión del plásmido recombinante pET21d-NS3 clon 6, en tres colonias de las células BL21(DE3); carril 4-6: expresión del plásmido recombinante pET21d-NS3 clon 7, en tres colonias de las células BL21(DE3); carril 7: expresión del plásmido pET21d en las células BL21(DE3) (control negativo).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, la determinación de las condiciones óptimas de expresión de la proteína NS3 se realizó en las células M15[pREP4] transformadas con el plásmido recombinante pQE30-NS3 clon 5 y las células BL21(DE3) transformadas con el plásmido recombinante pET21d-NS3 clon 6.

En la figura III.3 se muestran los niveles de expresión de la proteína NS3 en ambas células a temperaturas y concentraciones de IPTG diferentes.

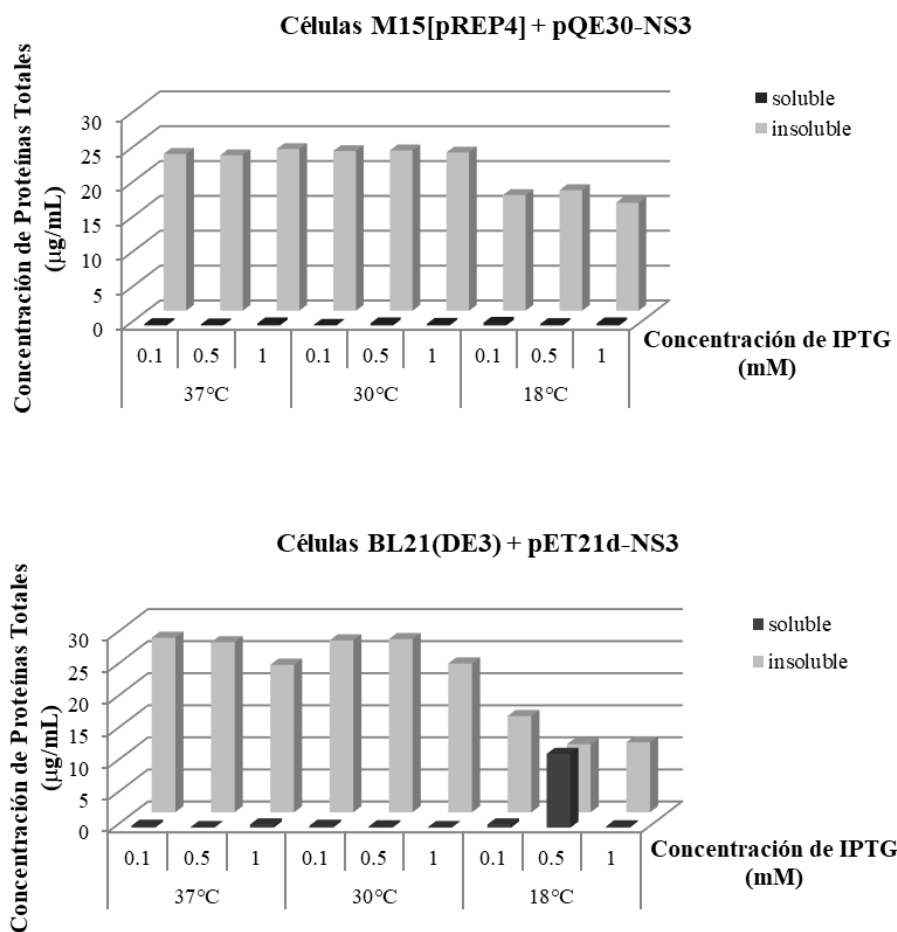


Figura III.3. Niveles de expresión de la proteína recombinante NS3 ($\mu\text{g/mL}$). Concentración de proteínas totales de los cultivos celulares tras 4 h de inducción a las temperaturas de 30°C y 37°C, y 20 h para la temperatura de 18°C.

Los resultados indican que no hubo diferencias en la expresión de la proteína NS3 para una misma temperatura y entre las temperaturas de 30°C y 37°C a las distintas concentraciones de IPTG empleadas en las células M15[pREP4]. Sin embargo, en la expresión de la proteína NS3 en las células BL21(DE3) se observó una disminución en la cantidad de proteína recombinante expresada a la concentración de IPTG de 1 mM para las temperaturas de 30°C y 37°C. Los niveles de expresión de la proteína NS3 a la temperatura de 18°C en ambas células de *E. coli* disminuyeron con respecto a la expresión de la proteína a las temperaturas de 30°C y 37°C para las tres concentraciones de IPTG evaluadas. Particularmente, en las células BL21(DE3) a la temperatura de 18°C se observó la mayor expresión de NS3 a 0,1 mM de IPTG. Por otra parte,

en las dos cepas de *E. coli* se expresó la proteína NS3 de forma insoluble, excepto en la condición de expresión de 18°C y 0,5 mM de IPTG para las células BL21(DE3), en la cual la proteína NS3 se obtuvo en forma soluble.

La disminución de la temperatura durante la expresión de proteínas recombinantes es una de las estrategias empleadas para reducir o evitar la producción de CIs y lograr la solubilidad de la proteína recombinante. Otros factores tales como, el direccionamiento de la proteína hacia el espacio periplasmático, el empleo de cepas deficientes de proteasas celulares, y la optimización de los factores físicos-genéticos (377, 378), se utilizan con éxito para obtener altos niveles de expresión de la proteína recombinante en forma soluble, lo cual puede representar entre el 50-95% del total de proteínas celulares (286, 379).

Diversos autores plantean que la disminución de la temperatura favorece de forma directa la eliminación de las proteasas de choque térmico que se inducen durante la expresión de las proteínas recombinantes (286, 287). Otra consecuencia de las temperaturas bajas es que se favorece la expresión y la actividad de las proteínas chaperonas de *E. coli*, las cuales contribuyen a la estabilidad y el plegamiento apropiado de la proteína (213, 288).

Si bien con el empleo del vector pET21d y las células BL21(DE3) se logró expresar la proteína NS3 soluble en las condiciones descritas anteriormente, una parte de la proteína recombinante también se encontró en forma insoluble, bajo esas mismas condiciones.

Esto demuestra que las condiciones evaluadas no fueron las óptimas para expresar toda la proteína en forma soluble, lo cual pudiera deberse a alteraciones en la estructura de la proteína o en el ambiente de expresión que causan la formación de intermediarios específicos parcialmente plegados, los cuales forman agregados insolubles (289).

En la figura III.4 se muestra el efecto del tiempo de inducción en la expresión de la proteína NS3 a las temperaturas de 37°C y 18°C. A la temperatura de 37°C después de la inducción del cultivo con 0,5 mM de IPTG y a las 10 h de inducción se detectan bandas de menor peso molecular en ambas cepas de *E. coli*, las cuales no se observan a la temperatura de 18°C aun cuando se prolonga la inducción del cultivo a 22 h.

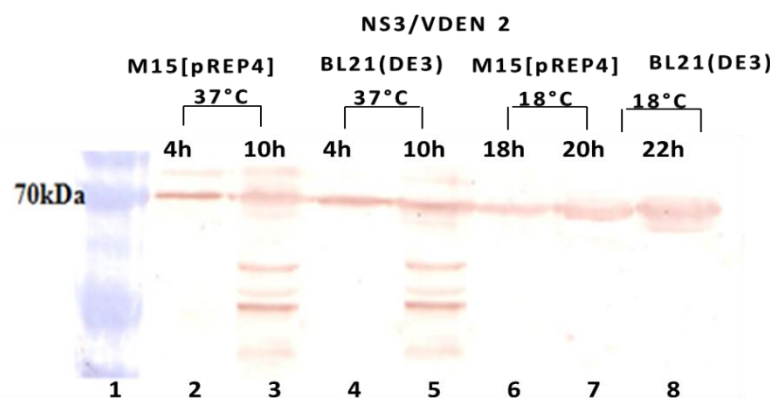


Figura III.4. Inmunodetección con el AcM anti-6xHis de la expresión de la proteína NS3. Inducción de las células M15[pREP4] y BL21(DE3) a una concentración de IPTG de 0,5 mM a las temperaturas de 37°C y 18°C a diferentes tiempos de inducción.

En la tabla III.1 se resumen las condiciones óptimas determinadas para la expresión de la proteína NS3 del VDEN 2 en las cepas M15[pREP4] y BL21(DE3).

Tabla III.1. Condiciones óptimas para la expresión de la proteína NS3 en diferentes cepas transformadas de *Escherichia coli*.

Cepa de <i>Escherichia coli</i>	Temperatura (°C)	Concentración de IPTG (mM)	Tiempo de inducción (h)	Localización de la proteína NS3
M15[pREP4]	37	0,5	4	Fracción insoluble
BL21(DE3)	18	0,5	20	Fracción soluble

III.2.2 Purificación de la proteína NS3 del VDEN 2

Al realizar la purificación de la proteína NS3 expresada por las células BL21(DE3) en forma soluble, se evidenció que este proceso no fue exitoso, a pesar de poseer dicha proteína una cola de 6xHis aas en su extremo C-terminal. Una vez concluida la purificación por IMAC en condiciones nativas, se observó que la proteína NS3 no se adsorbió a la matriz de la columna HisTrap utilizada para la purificación. Esto pudo deberse a que la proteína NS3 soluble adoptó una estructura conformacional en la cual la cola de 6xHis aas ubicada en la posición C-terminal no se encuentra expuesta para interactuar con los ligandos de unión a la columna de afinidad. Algunos autores afirman que la localización de la cola de histidinas en los extremos de la proteína puede influir en la solubilidad de las proteínas recombinantes (290, 291). Ellos demuestran que factores como el tamaño de la proteína y la naturaleza de la proteína a expresar,

y el tamaño y la ubicación de la secuencia de aas de His, pueden ser determinantes en la solubilidad de las proteínas recombinantes que contienen la secuencia de aas His.

Aunque en el presente trabajo se observó un comportamiento diferente en la solubilidad de la proteína NS3 expresada con la cola de 6xHis aas tanto en el extremo C-terminal como N-terminal, también destaca el hecho, bien conocido, de que las proteínas se comportan como individuos y responden pobremente a la generalización. La individualidad de las proteínas, las pequeñas diferencias, como las que se encuentran en las secuencias alrededor del codón de inicio en las secuencias de fusión disponibles y las diferencias en el mapa genético del vector, hacen que sea difícil comparar la idoneidad de las secuencias de fusión para la sobreexpresión de proteínas.

Consecuentemente, al determinarle la actividad proteasa a la proteína NS3 soluble se pudo constatar que no hubo reacción enzimática en presencia del sustrato paranitrilado. Entre las causas que pudieran provocar este resultado puede encontrarse una posible afectación del sitio activo proteasa de la proteína NS3 soluble, ya sea porque presente una mutación que impide la unión del sustrato o por ocupación del sitio activo con otra molécula. Esto pudiera explicarse por la interacción de la cola de 6xHis aas presente en el extremo C-terminal de la proteína recombinante NS3 con los aas presentes en el sitio de unión del péptido cromogénico en la estructura de la proteína NS3, lo que impidió la actividad proteasa de la proteína NS3 soluble (292).

Luo y colaboradores, demuestran que la fusión de 18 aas de la región central del dominio hidrofílico de la proteína NS2B, con la proteína NS3 a través de una secuencia conectora, le confiere flexibilidad a la molécula obtenida. Sin embargo, obtienen una actividad proteolítica limitada de la proteína soluble en tres posiciones estables de la estructura molecular de dicha proteína. El estudio de Luo y colaboradores enfatiza que la funcionabilidad de la proteína NS3 soluble depende de la conformación estructural adoptada por la región de unión de las proteínas, lo que permite la interacción entre NS2B-NS3 con el sustrato (293).

Teniendo en cuenta el resultado anterior en el que se evidencia que la proteína NS3 obtenida en forma soluble fue funcionalmente inactiva, se decidió desarrollar el proceso de purificación y el resto de los experimentos con la proteína NS3 obtenida inicialmente en forma insoluble como

CI_s en las células M15[pREP4]. Esta proteína presenta la cola de 6xHis aas en la posición N-terminal.

Si bien se discute anteriormente las desventajas de obtener la proteína recombinante NS3 en la fracción insoluble formando CI_s, estudios actuales describen favorablemente la obtención de estos CI_s para producir a gran escala y a bajo costo proteínas recombinantes (215). En este estado las proteínas se protegen de la acción de las proteasas celulares, por lo que los CI_s se convierten en una fuente de proteína íntegra y pura (213, 214). Sin embargo, el gran desafío es la solubilización y posterior renaturalización de la proteína recombinante (288, 294).

La figura III.5 muestra el resultado de la doble etapa cromatográfica empleada para la purificación de la proteína NS3 obtenida en forma insoluble y desnaturalizada en urea 8M. En este estudio se demostró que el empleo de la urea a una concentración elevada, permitió la desnaturalización eficiente de la proteína NS3. Existen numerosas estrategias que emplean detergentes, tampones no reductores, diferentes concentraciones de urea, poliésteres, resinas y algunos métodos físicos para extraer completamente la proteína de interés de los CI_s (282, 386).

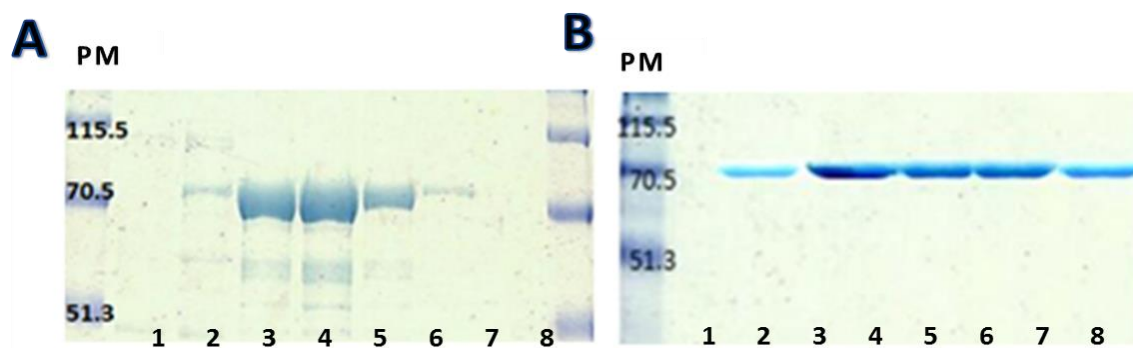


Figura III.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de las etapas del proceso de purificación de la proteína recombinante NS3 desnaturalizada en urea 8 M. (A) purificación por IMAC, carriles 2-6: fracciones colectadas durante el gradiente correspondiente entre los 300 mM y 350 mM de imidazol. (B) purificación por gel filtración, carriles 2-8: fracciones colectadas del gradiente isocrático con el tampón diálisis sin urea.

Como se puede apreciar en la figura III.5A, una banda a la altura de 70 kDa sugiere la presencia de la proteína NS3, la cual se eluyó con dos volúmenes de columna, entre los 300 mM y 350 mM de imidazol. Igualmente se observa en esta misma figura que proteínas de bajo peso molecular coeluyeron con la proteína NS3. La elusión de estas impurezas se reporta para las proteínas recombinantes que tienen fusionada la cola de His en uno de sus extremos (295), pues

péptidos no consecutivos con presencia de His en su secuencia aminoacídica son capaces de la quelación de iones metálicos divalentes inmovilizados. Muchas proteínas de *E.coli* contienen residuos de His no consecutivos que se exponen en la superficie de su estructura y pueden unirse a los iones metálicos acoplados a las resinas, por lo que constituyen contaminantes potenciales en el proceso de purificación (296). Además, se conoce en el estado del arte de la purificación de la proteína NS3 de los flavivirus que la presencia de estos contaminantes de bajo peso molecular también pueden originarse a partir de la degradación proteolítica por proteasas hospederas, autoproteólisis, o terminación prematura del proceso de traducción de la proteína (297).

En la figura III.5B se muestra la corrida electroforética resultante de la purificación por gel filtración de la proteína NS3. Previo a esta segunda etapa de purificación se realizó una estrategia de diálisis con resultado satisfactorio.

El recambio de tampones, que contienen concentraciones decrecientes de urea, y detergentes aminoacídicos como el CHAPS posibilitó la renaturalización eficiente de la proteína recombinante NS3, evitando el plegamiento erróneo y la agregación que puede ocurrir durante el proceso de conformación de la estructura proteínica (284, 387). Se puede observar en dicha figura que la proteína NS3 se obtiene íntegra y con una pureza elevada.

El empleo de dos etapas cromatográficas en un proceso de purificación se describe como una estrategia eficiente para la obtención de proteínas recombinantes con un alto porcentaje de pureza (298). Sin embargo, estos enfoques generalmente requieren procedimientos de optimización que consumen mucho tiempo y dependen de las propiedades de la proteína diana. En nuestro estudio, como se puede apreciar en la figura III.5B, al utilizar la alternativa de cromatografía de gel filtración los contaminantes de bajo peso molecular son eliminados favoreciendo el grado de pureza de la proteína y justificando la estrategia de doble etapa de cromatografía para la purificación de la proteína NS3.

Un resumen de los resultados de las estrategias de extracción y purificación de la proteína recombinante NS3 expresada por las células M15[pREP4] en forma insoluble, se muestra en la figura III.6A. El AcM anti-6xHis (Figura III.6B) y el Ac policlonal anti-NS3 proteasa (Figura III.6C) reconocieron la proteína recombinante NS3 en cada etapa del proceso de purificación.

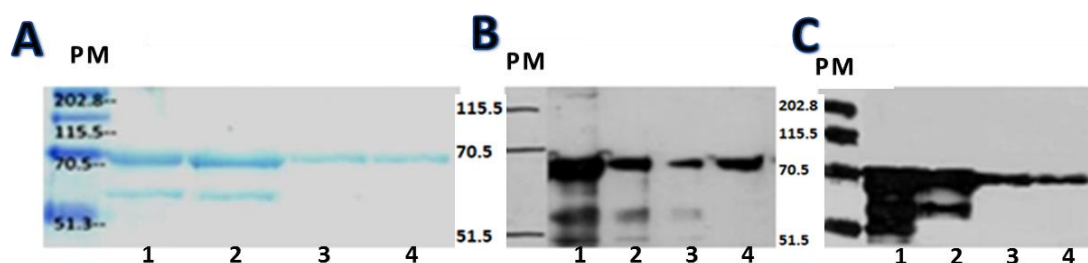


Figura III.6. Representación del seguimiento por electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección de las principales etapas de la purificación de la proteína NS3 obtenida en la fracción insoluble tras la ruptura de las células M15[pREP4]. **A:** SDS-PAGE al 12%. **B y C** inmunodetección con el AcM anti-6xHis y con el Ac policlonal anti-NS3 proteasa, respectivamente. PM: Patrón de Peso Molecular 19-202 kDa (GE Healthcare Biosciences, EUA), carril 1: solubilización con urea 8M, carril 2: proteína eluída por IMAC; carril 3: proteína dializada y concentrada, carril 4: proteína NS3 después de la columna Sephacryl S-100 HR y concentradas por centriprep YM-30 (Millipore, EUA).

En la tabla III.2 se recoge el comportamiento de los parámetros de control del proceso en las etapas de extracción y purificación de la proteína NS3 expresada por las células M15[pREP4].

Tabla III.2. Parámetros del proceso de extracción y purificación de la proteína NS3.

Etapas de purificación	mg de proteínas totales ^a	mg de proteína NS3 ^b	Pureza (%)	Rendimiento ^c (%)
Fracción insoluble ^d	107	8	7.47	100
IMAC	8.5	5.1	60	64
Gel Filtración	3.8	3.5	92	44

^aLos miligramos de proteínas totales se calcularon por el método de BCA para la determinación de la concentración de proteínas.

^bLa cantidad de proteína recombinante NS3 presente en la fracción insoluble de la ruptura celular se determinó por densitometría a partir del análisis de los geles teñidos con solución de Coomassie.

^cLa cantidad de proteína NS3 en la fracción insoluble se designó como el 100% para el rendimiento.

^dLa purificación se realizó a partir de 300mL de cultivo celular inducido.

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede concluir que la proteína recombinante se obtuvo soluble, íntegra y con un 92% de pureza con el empleo de la doble cromatografía como una estrategia de purificación para obtener la proteína NS3 del VDEN 2.

III.3. Caracterización biológica de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2

III.3.1 Actividad enzimática mediante ensayo de proteasa

En la figura III.7 se muestra la actividad proteasa de la proteína recombinante NS3 expresada por las células M15[pREP4], en función de la liberación del cromógeno pNA medida a 405 nm.

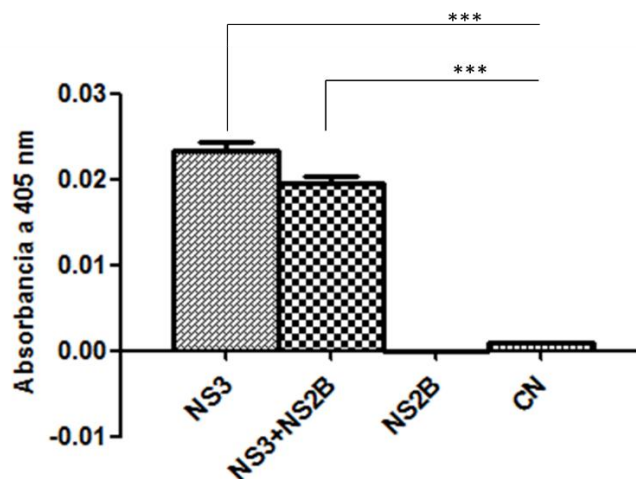


Figura III.7. Actividad proteasa de la proteína NS3 recombinante del VDEN 2 expresada en función de la hidrólisis del péptido cromogénico Ac-RTSKKR-pNA. Representada como Absorbancia (405 nm). NS3 purificada y renaturalizada (en azul), NS3 +cofactor NS2B (en verde), cofactor NS2B (carmelita) y control de cepa de *E. coli* (amarillo). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple *a posteriori* mediante la prueba de Dunn. (***) $p < 0,001$.

Al comparar los niveles de actividad en cada uno de los ensayos se pudo apreciar que aunque la actividad enzimática en ausencia del cofactor NS2B fue mayor que cuando este está presente, no se detectaron diferencias significativas entre ambos ensayos. Sin embargo se constataron diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de la NS3 y la NS3/NS2B con respecto al control de *E. coli* y al cofactor. Los valores de absorbancia obtenidos para el cofactor NS2B solo fueron comparables a los del control, lo cual es indicativo de una actividad proteasa mínima.

Estudios previos de caracterización enzimática de la proteína NS3 demuestran que la actividad serino proteasa de esta proteína frente a péptidos cromogénicos y fluorogénicos depende críticamente de la proteína NS2B y específicamente de una región central hidrofílica de aproximadamente 40 aas (113, 299, 300). Los resultados del presente trabajo no fueron similares a los descritos por estos autores; sin embargo si fueron coincidentes con los obtenidos por Yusof y colaboradores, quienes demuestran que aunque el complejo proteasa del VDEN exhibe actividad proteolítica frente a sustratos peptídicos pequeños, la actividad mostrada por el dominio proteasa de la proteína NS3 fue mayor y más específica frente a los mismos (301). Esta preferencia observada de la proteína NS3 sin el cofactor por este tipo de sustrato puede

deberse, en primer lugar, a diferencias conformacionales en la especificidad de unión del sustrato peptídico al bolsillo catalítico del dominio proteasa.

En particular, la naturaleza de los sustratos peptídicos de corta talla molecular tiene diferencias en su constante catalítica y de disociación, lo que influye en la afinidad por la enzima proteasa (302). Por otra parte, la orientación de los dominios helicasa y proteasa en la estructura de la proteína NS3, es altamente variable y se determina por la región de unión o interdominio. Esta flexibilidad conformacional tiene implicaciones en la actividad *cis*-, *trans*-proteasa de la proteína NS3 (303).

III.3.2 Reconocimiento de la proteína recombinante NS3 por anticuerpos anti-dengue

La antigenicidad de la proteína recombinante NS3 purificada se evaluó a través de un ELISA empleando Acs policlonales anti-dengue obtenidos en ratones.

En la figura III.8, se muestran los títulos de los Acs IgG correspondientes al reconocimiento de la proteína recombinante NS3 por los LAHs de los cuatro serotipos del VDEN.

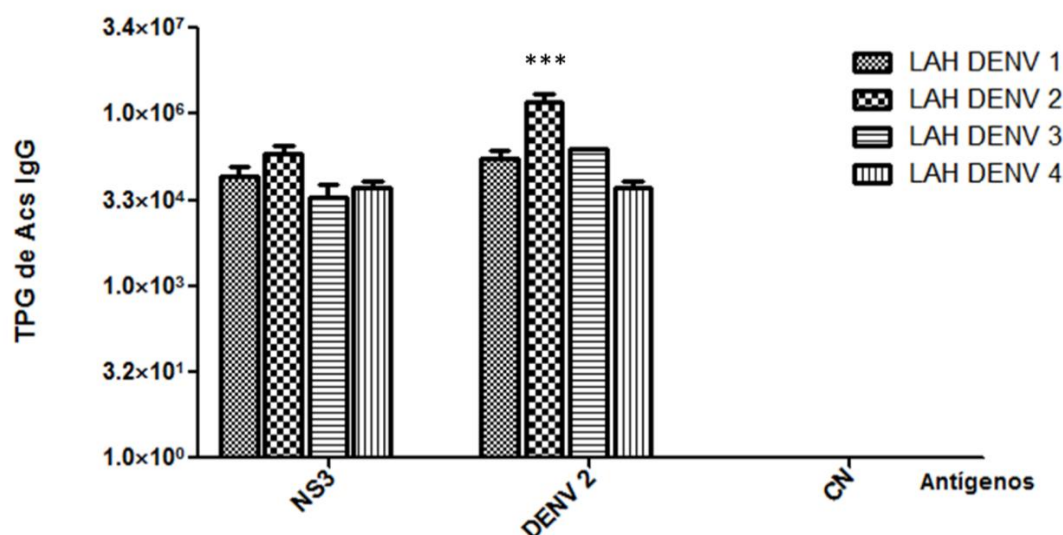


Figura III.8. Reconocimiento de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 por LAHs de ratón correspondientes a los cuatro serotipos del VDEN. Resultado expresado en título de Acs según diluciones de los LAH en el ELISA indirecto. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA de clasificación doble y la comparación múltiple *a posteriori* mediante la prueba de Bonferroni (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). Los datos se representan como la media \pm desviación estándar. Este ensayo se repitió tres veces.

Los resultados muestran que la proteína recombinante NS3 se reconoció por los LAHs de los cuatro serotipos con títulos de Acs IgG superiores a 10 000. Al comparar los resultados para cada antígeno no se constataron diferencias significativas en el reconocimiento de la proteína recombinante NS3 por los LAHs. Sin embargo, si se detectaron diferencias significativas en el reconocimiento del VDEN 2, el cual fue mayor con el LAH homólogo, como esperado ya que confirma las diferencias antigénicas entre los cuatro serotipos del VDEN. La reactividad cruzada de la proteína NS3 por los LAHs demuestra, en primer lugar que la proteína obtenida por vía recombinante presenta una conformación que expone regiones antigénicas reconocidas por Acs policlonales con títulos a los cuatro serotipos del VDEN, superiores a 10 000. En segundo lugar corrobora que la proteína NS3 es altamente conservada entre los VDEN con un 70% de homología descrito entre los serotipos. En estudios previos, Matsui y colaboradores observaron que la existencia de ciertos residuos aminoacídicos, ubicados en el sitio del complejo antigénico de los VDEN, resultan cruciales para la manifestación de propiedades bioquímicas compartidas y conservadas entre los cuatro serotipos, lo que puede explicar el reconocimiento cruzado observado entre los distintos serotipos del VDEN (304).

III.3.3 Antigenicidad de la proteína recombinante NS3 para células T de ratón

La antigenicidad de la proteína recombinante NS3 en células del bazo de ratones previamente inoculados con el VDEN 2, se muestra en la figura III.9.

La relación entre los niveles de secreción de IL-10 y TNF α fue similar frente a ambos estímulos. Los mayores niveles de citoquinas detectados fueron los correspondientes al IFN γ tanto en el sobrenadante de las células del bazo estimuladas con la proteína NS3 (10137 \pm 4781) como con el VDEN 2 (4806 \pm 1432). Se obtuvo diferencias significativas al comparar la respuesta de IFN γ de NS3 frente a VDEN 2 ($p < 0,01$) y frente al control celular ($p < 0,001$), lo que corrobora su potencial antigénico. La detección de las citoquinas IL-10 y TNF α fueron 71 y 32 veces menor que la de IFN γ ante la estimulación con la proteína NS3, respectivamente. Por otra parte, en el sobrenadante de las células del bazo estimuladas con el VDEN 2, la secreción de TNF α e IL-10 disminuyó 10 y 27 veces con respecto a la detectada para el IFN γ , respectivamente.

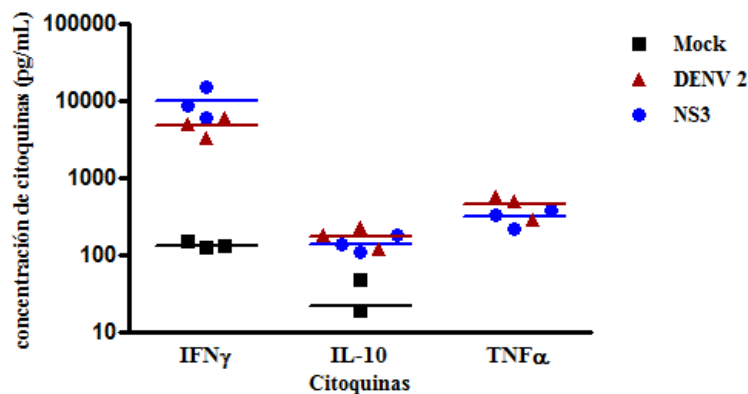


Figura III.9. Antigenicidad de la proteína recombinante NS3 del VDENV 2 para células T de ratón. Niveles de IFN γ , IL-10 y TNF α secretados por las células del bazo de los ratones inoculados con el VDENV 2, tras la estimulación con la proteína recombinante NS3 y el virus homólogo. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA de clasificación doble y la comparación múltiple *a posteriori* mediante la prueba de Bonferroni (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$).

En el presente trabajo se demuestra que tras la estimulación *in vitro* con la proteína recombinante NS3, de las células del bazo obtenidas a partir de los ratones inoculados con el VDENV 2, clones de células T reconocen a la proteína recombinante NS3 y producen niveles altos de IFN γ .

Yauch y colaboradores demuestran que las células T CD8⁺ específicas para las proteínas del VDENV responden a la activación produciendo IFN γ y TNF α , además de expresar el marcador de desgranulación CD107a en la superficie celular y exhibir actividad citotóxica *in vivo* (133). Por su parte, se sugiere que el TNF α puede asociarse directamente con los síntomas específicos de la enfermedad producida por el VDENV si se tiene en cuenta la correlación existente entre las concentraciones del receptor soluble de TNF α y la trombocitopenia (305), así como la extravasación vascular (306, 307). Esta citoquina es la reguladora principal de la inmunidad innata y media la inflamación aguda.

El reconocimiento antigénico específico por clones de células T de la proteína recombinante NS3 obtenida en este estudio fue similar al descrito por Malavige y colaboradores (308),

quienes encuentran niveles altos de IFN γ producidos por clones de células T humanas específicos a la proteína NS3 del VDEN, e igualmente niveles bajos de IL-10 y TNF α .

Las concentraciones similares de TNF α e IL-10 inducidas tras la estimulación con la proteína recombinante disminuyen la posibilidad de la inducción de una respuesta patogénica mediada por esta proteína, en primer lugar por los niveles bajos de TNF α , en relación a la secreción de IFN γ y en segundo lugar por la evidencia del lazo de retroalimentación negativa mediada por la IL-10. Sin embargo estos resultados no son suficientes para concluir si la respuesta de células T inducida por la proteína recombinante NS3 pudiera determinar el resultado de la enfermedad durante una infección natural.

Teniendo en cuenta estos resultados en relación a la caracterización antigénica de la proteína recombinante NS3, podemos resumir que la proteína obtenida se reconoce por clones de células secretoras de IFN γ , favoreciendo como antígeno la activación de una respuesta Th1 con una relación IFN γ /TNF α a favor del IFN γ . Además, se detectaron niveles bajos de IL-10 y TNF α .

Las concentraciones similares de TNF α e IL-10 inducidas tras la estimulación con la proteína, reducen la posibilidad de la inducción de una respuesta patogénica mediada por esta proteína, en primer lugar por los bajos niveles de TNF α , en relación a la secreción de IFN γ y en segundo lugar por la evidencia del lazo de retroalimentación negativa mediada por la IL-10, en el cual el TNF α es un inductor potente de IL-10, y la IL-10 es una reguladora represora del TNF α (410).

III.4. Respuesta inmune inducida por la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 en ratones

III.4.1 Títulos de anticuerpos anti-NS3 inducidos

Como se aprecia en la figura III.10 se obtuvieron niveles elevados de Acs IgG anti-NS3 recombinantes en los grupos inmunizados con 10 y 20 μ g de la proteína recombinante NS3, siendo la respuesta en este último grupo significativamente mayor ($p < 0,001$), incluso con respecto a la respuesta detectada en los ratones inmunizados con el virus VDEN 2 que fueron los controles positivos del esquema de inmunización ($p < 0,01$). En el presente trabajo la proteína

recombinante mostró ser una buena inductora de Acs IgG, lo cual se corroboró por los títulos mayores a 40 000 inducidos por esta proteína.

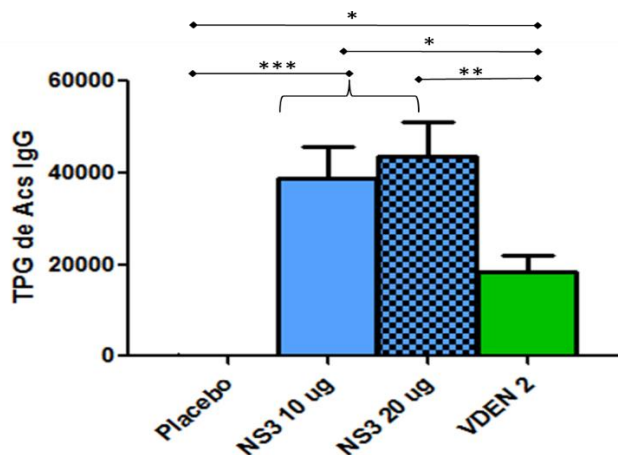


Figura III.10. Respuesta de Acs anti-NS3 en los ratones inmunizados. En el gráfico se muestra los títulos promedio geométrico (TPG) de los Acs IgG obtenidos por ELISA de los grupos de animales inmunizados: placebo, grupo NS3 (concentración 10 μ g) y (concentración 20 μ g), y el grupo VDEN 2. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Newman-Keuls (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Existen pocos estudios que reporten la caracterización desde el punto de vista antigénico e inmunogénico de la proteína NS3 de los flavivirus. En un trabajo donde analizan la inmunogenicidad y la antigenicidad de la proteína NS3 del virus de la hepatitis C (VHC), los autores detectan una elevada prevalencia de Acs anti-NS3 en los ratones inmunizados, lo cual pudiera estar dado por la talla de la proteína y por la presencia de múltiples motivos de unión a MHC clase II. Además sugieren que esto pudiera explicar la alta frecuencia de Acs específicos a esta proteína encontrada, en pacientes infectados con este virus (309).

Teniendo en cuenta que el VHC es un flavivirus, al igual que el VDEN, pudiéramos explicar de esta misma forma los altos títulos de Acs anti-VDEN detectados con la proteína recombinante NS3 obtenida. En un estudio realizado por Álvarez-Rodríguez y colaboradores se muestra el potencial del dominio proteasa de la proteína NS3 fusionado a la proteína GST para la inducción de Acs capaces de reconocerla como antígeno a una dilución de 1:3 200, por lo que plantean la utilidad de la proteína recombinante obtenida para un sistema de detección casero con fines diagnósticos (310). Sin embargo, los títulos de Acs anti-recombinantes detectados en los sueros de los ratones inmunizados con la proteína NS3 completa descritos en

el presente trabajo son superiores y superan la inmunogenicidad demostrada por el dominio proteasa de la proteína NS3 en el estudio anteriormente mencionado. Esto puede explicarse por la talla molecular elevada de la proteína NS3, así como, por la presencia de múltiples motivos de unión al MHC II, lo cual asegura la cooperación entre las células T y B.

Algunos autores detectan una respuesta significativa de Acs anti-NS3 en pacientes con infección primaria y secundaria al VDEN (170, 311). En un estudio realizado por Valdes y colaboradores individuos con una infección secundaria al VDEN 2 muestran una elevada respuesta de Acs anti-NS3, la cual no se detecta en pacientes con infección primaria (170). Sin embargo, se desconoce la función de estos Acs anti-NS3 en la respuesta inmune contra el VDEN.

III.4.2 Reconocimiento de la proteína NS3 nativa por los anticuerpos anti-NS3 recombinantes de ratón

Los sueros de los ratones inmunizados con la proteína recombinante NS3 reconocieron a la proteína NS3 nativa. En el WB (Figura III.11A) se observa una banda específica correspondiente a la reactividad de los sueros de los ratones inmunizados con la proteína recombinante NS3 frente a la proteína NS3 nativa del VDEN 2, lo cual demostró la especificidad de la respuesta. Los sueros del grupo placebo no reaccionaron frente a la proteína NS3 nativa. Se detectaron bandas características correspondientes a las proteínas NS1, NS3 y E del VDEN 2 en la tira del control positivo con el LAH anti-VDEN 2.

Los sueros de los ratones inmunizados con la proteína recombinante NS3 reconocieron a la proteína NS3 nativa también por IFI, en las células C6/36HT infectadas con el VDEN 2 (Figura III.11B).

Similar resultado se observó para las células infectadas empleando como control positivo un AcM específico para el VDEN 2. Los sueros de los ratones pertenecientes al grupo placebo no mostraron reactividad frente a las células inoculadas con el VDEN 2.

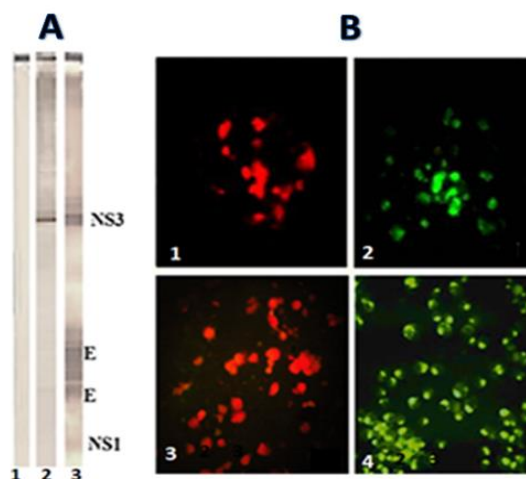


Figura III.11. Reconocimiento de la proteína NS3 nativa del VDEN 2 por Acs anti-NS3 recombinante. (A) WB en las tres tiras de las membranas se fijaron las proteínas del VDEN 2 y se enfrentaron a los sueros de los ratones: 1 grupo placebo, 2 grupo inmunizado con 20 μ g de la proteína recombinante NS3, 3 LAH VDEN 2 (control positivo). (B) IFI. 1 control negativo: células no infectadas frente a AcM anti-VDEN 2, 2 control positivo: células infectadas con el VDEN 2 frente a AcM anti-VDEN 2, 3 células infectadas con el VDEN 2 frente a sueros de ratones del grupo placebo, 4 células infectadas con el VDEN 2 frente a sueros de ratones del grupo inmunizado con 20 μ g de la proteína recombinante NS3.

Los resultados del presente trabajo confirman que la proteína recombinante NS3 adoptó una conformación en la cual se conservaron los determinantes antigénicos de la proteína nativa que inducen una respuesta de Acs.

La proteína NS3 es una proteína intracelular que se localiza en el citoplasma y en sistemas membranosos derivados del RE, de los hepatocitos, esplenocitos, células mieloide, células del pulmón y mioglias (117, 312). Esto significa que los Acs anti-NS3 inducidos tras una infección primaria por el VDEN tienen poco acceso a esta proteína que no se encuentra expuesta en la superficie y, por lo tanto, no tienen la función neutralizante ni la de citotoxicidad celular dependiente de Acs. Sin embargo, los Acs anti-NS3 detectados en este trabajo pudieran tener la función de opsonización y de esta forma contribuir a la lisis de las células infectadas por el VDEN.

Durante la infección heterotípica secundaria, la unión de anticuerpos IgG anti-NS3 circulantes a epitopes específicos de la proteína NS3 liberada tras la lisis de la célula infectada puede activar el complemento por la vía clásica iniciando la cascada C1, C4, C2 lo que contribuye a un nivel reducido de C3 y a la liberación de C3a y C5a. Los niveles incrementados de estas dos anafilotoxinas se consideran que median la permeabilidad vascular (313). Esto significa que en

la infección secundaria los Acs anti-NS3 pueden estar involucrados en la patogenia de la infección por VDEN, a través de la función de opsonización mediando activación del complemento.

III.4.3 Respuesta inmune celular inducida por la proteína recombinante NS3

Se conoce que la generación de Acs Nt es uno de los requisitos para una adecuada protección contra el VDEN (314, 315). Sin embargo, el papel de la respuesta inmune celular en la protección contra el VDEN se demuestra por varios autores (316, 317).

La respuesta de células T inducida por la proteína recombinante NS3 en ratones BALB/c se evaluó empleando un ensayo de ELISPOT para determinar la frecuencia de células productoras de $IFN\gamma$. Como resultado, todos los animales inmunizados con cualquiera de las dos formulaciones de la proteína recombinante NS3 se comportaron similar al grupo de animales inmunizados con el control positivo y mostraron un aumento en el porcentaje de células T secretoras de $IFN\gamma$ al compararse con los controles con $p < 0,001$ (Figura III.12).

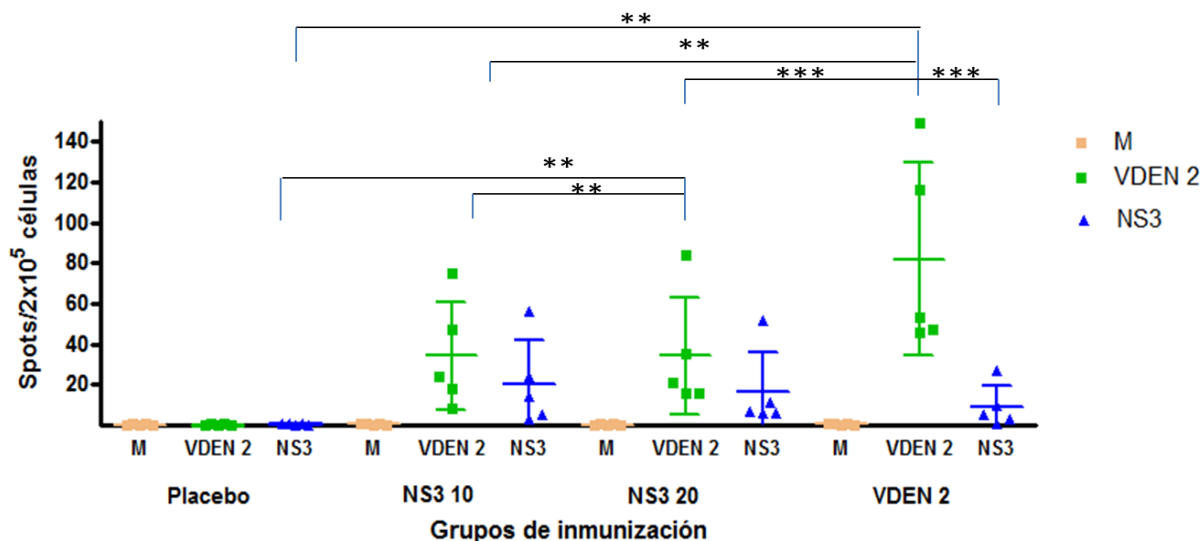


Figura III.12. Frecuencia de las células del bazo de ratones inmunizados, productoras de $IFN\gamma$ frente al estímulo antigénico en un ensayo de ELISPOT. En el gráfico se muestra el comportamiento de los grupos de animales: placebo, grupo NS3 (concentración 10 μg) y (concentración 20 μg), y grupo VDEN 2 frente a la estimulación con diferentes antígenos: M (mock), VDEN 2, cn (control negativo) y NS3. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA de clasificación doble y la comparación múltiple a posteriori mediante la prueba de Bonferroni (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). Este ensayo se repitió tres veces ($n=5$).

En general, aunque en el 100% de los animales inmunizados con 20 μg de la proteína recombinante se detectaron células secretoras de $\text{IFN}\gamma$ específicas a NS3 este dato no fue estadísticamente significativo al compararse con el grupo de animales inmunizados con 10 μg de la proteína recombinante, donde respondieron 4 (80%) ratones. En los grupos inmunizados con la NS3 10 μg y NS3 20 μg se encontraron diferencias significativas entre los ratones estimulados con VDEN 2 y con el antígeno NS3 ($p < 0,01$). En el grupo inmunizado con el VDEN 2 los porcentos de células secretoras de $\text{IFN}\gamma$ fueron superiores, siendo estadísticamente significativo con respecto a los grupos inmunizados con la proteína NS3 ($p < 0,001$).

Escasos estudios evalúan la respuesta celular inducida por la proteína NS3 en un modelo de ratón. Costa y colaboradores demuestran que las vacunas de ADN que expresan la proteína NS3 y el dominio helicasa de esta proteína inducen una elevada respuesta inmune celular determinada por la alta frecuencia de células productoras de $\text{IFN}\gamma$ medida por ELISPOT (318); mientras que la vacuna de ADN que expresa el dominio proteasa no induce dicha respuesta.

Este estudio identifica al dominio helicasa la región de la proteína NS3 con el mayor número de epítopes inductores de una respuesta de células T. Similar resultado pero con los dominios proteasa y helicasa obtenidos por vía recombinante en *E. coli* obtuvo Simmons y colaboradores, quienes al evaluar la respuesta inmune celular inducida por estos dominios observan que únicamente la proteína helicasa induce una respuesta de células T efectiva detectada por cuantificación de $\text{IFN}\gamma$ con el empleo de ELISPOT (319). Ambos estudios sugieren que el dominio helicasa es la región principal de epítopes inductores de células T $\text{CD8}^+ \text{CD4}^+$.

En el presente trabajo se constató que independientemente de la dosis de proteína recombinante empleada en la inmunización, la proteína NS3 induce una elevada respuesta de células T secretoras de $\text{IFN}\gamma$, la cual puede ser protectora contra la infección por VDEN.

III.5. Respuesta inmune protectora inducida por la proteína recombinante NS3 del VDEN 2

Treinta días después de la última dosis, se realizó el reto intracraneal a los ratones inmunizados con el VDEN 2 infeccioso.

Tras un período de observación de 21 días, solo uno de los animales inmunizados con la proteína recombinante NS3 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobrevivió al reto viral, pero este resultado no fue

estadísticamente significativo cuando se comparó con el grupo placebo, en el cual todos los animales murieron tras el reto con el VDEN 2 (Figura III.13).

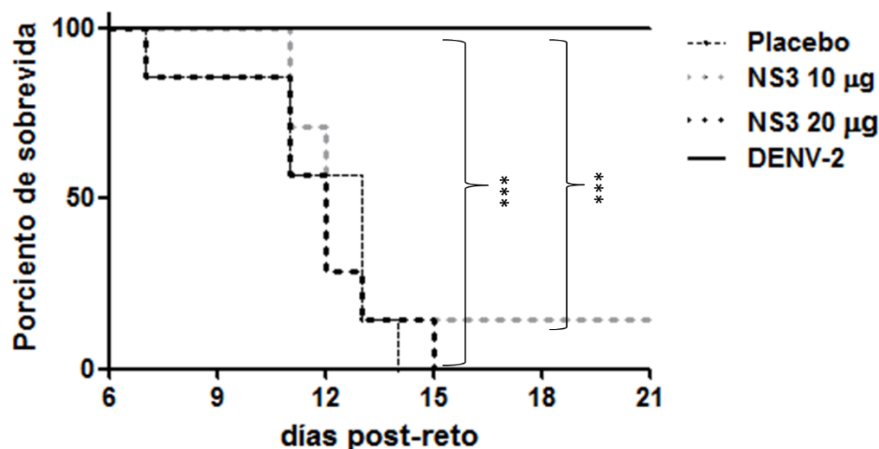


Figura III.13. Porcentaje de supervivencia tras la inoculación intracraneal del VDEN 2 en ratones inmunizados con la proteína recombinante NS3. Se representa el comportamiento durante 21 días de los grupos de animales placebo, los inmunizados con 10 y 20 µg de la proteína NS3 y el VDEN 2. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de log-rank (***) $p < 0,001$). Este ensayo se repitió tres veces (n=7).

Un comportamiento similar al observado en el grupo placebo lo tuvieron los animales inmunizados con 20 µg de la proteína NS3. El 100% de los animales del grupo control positivo se protegieron después del reto viral.

La dualidad de la participación de las células T en la respuesta inmune del hospedero contra la infección por dengue y en la inmunopatogenia para el desarrollo de las formas severas de la enfermedad es muy controversial en las últimas décadas (320). Varios autores plantean un papel relevante de las células T, específicamente de la contribución de las CD8+ en limitar o eliminar la infección por el VDEN. Yauch y colaboradores demuestran, con el empleo de un modelo novedoso de ratón, que la depleción de las células T CD8+ provoca la pérdida de la función de aclaramiento de la infección por el VDEN y un aumento significativo de la carga viral en el suero, el bazo y el cerebro (133). Por otro lado, Williams y colaboradores exponen el papel relevante de la respuesta de las células T en la protección contra la infección heterotípica secundaria del VDEN, en el modelo de ratón AG129 (414). Por su parte, otros autores plantean que la respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8+ generada por el VDEN contribuye al daño de células no infectadas por este virus, tales como los hepatocitos (136). Igualmente, An y

colaboradores sugirieron un papel patogénico para las células T CD8⁺ específicas a VDEN en ratones inmunizados HepG2-SCID (321).

Los resultados del presente trabajo muestran que a pesar de obtenerse una respuesta inmune celular medida por el elevado número de células productoras de IFN γ , no hubo protección tras el reto con el VDEN2 en los grupos inmunizados con la proteína recombinante NS3.

Pocos estudios evalúan la capacidad protectora de la respuesta inmune inducida en ratones por la proteína NS3 del VDEN. El trabajo de Costa y colaboradores mencionado anteriormente, el cual se basa en la evaluación de vacunas de ADN que expresan la proteína NS3 y sus dominios demuestra que la respuesta inmune celular inducida por estas vacunas de ADN es protectora en el modelo de encefalitis del VDEN (318). Sin embargo, no se encontró ningún trabajo en el cual se evalúe la capacidad protectora de la respuesta inmune celular inducida por una proteína NS3 recombinante del VDEN tras el reto viral en ratones.

Los resultados del presente trabajo sugieren la asociación de la respuesta de células T inducida por la proteína recombinante NS3 con la inmunopatogenia del VDEN (41, 322).

La combinación de factores como la vía de inoculación y el modelo animal empleado para evaluar la protección pudieran influir en que la respuesta inmune generada por la proteína recombinante NS3 tras el reto viral sea de tipo inmunopatogénica.

El ensayo de protección empleado en nuestro estudio, el cual se basa en evitar la encefalitis viral provocada por el VDEN inoculado intracranalmente en ratones inmunocompetentes tiene como limitación principal el requerir la administración de altas dosis de cepas virales neuroadaptadas a través de la vía intracraneal. Esto significa que los animales desarrollan una encefalitis viral que no es usual encontrar dentro de las manifestaciones clínicas más observadas en individuos con infección por VDEN (228, 323).

En un estudio reciente se demuestra que el reto intracraneal de ratones inmunocompetentes con el VDEN 2 provoca el reclutamiento de células inmunes que contribuyen a la reducción de la carga viral, pero no al aumento de la tasa de supervivencia. Por el contrario, los animales tratados con ciclofosfamida, un fármaco inmunosupresor que afecta la proliferación de los linfocitos, tienen una carga viral más alta, pero con una mayor tasa de supervivencia con respecto a los animales no tratados (324). Estos resultados sugieren que el sistema inmune

desempeña un papel inmunopatogénico en este modelo por lo que la tasa de supervivencia no puede ser un punto final adecuado en la evaluación de los candidatos vacunales basados en antígenos que inducen una fuerte respuesta inmune celular.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se evaluó la capacidad inmunopotenciadora inducida por la proteína recombinante en la formulación DIII-C-2/NS3, mediante la determinación de la carga viral y la expresión de determinados genes de citoquinas, en el cerebro de los animales inmunizados y retados con el VDEN 2.

III.6. Capacidad inmunopotenciadora de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2

III.6.1 Respuesta inmune humoral inducida por la formulación vacunal DIII-C-2/NS3

Para evaluar la inmunogenicidad de la formulación DIII-C-2/NS3, se comparó el título de Acs IgG inducidos por esta formulación con respecto al título de Acs generados tras la inmunización solo con la proteína recombinante DIII-C-2. Como se muestra en la figura III.14A, se obtuvieron elevados títulos de Acs IgG tras la inmunización con ambas formulaciones.

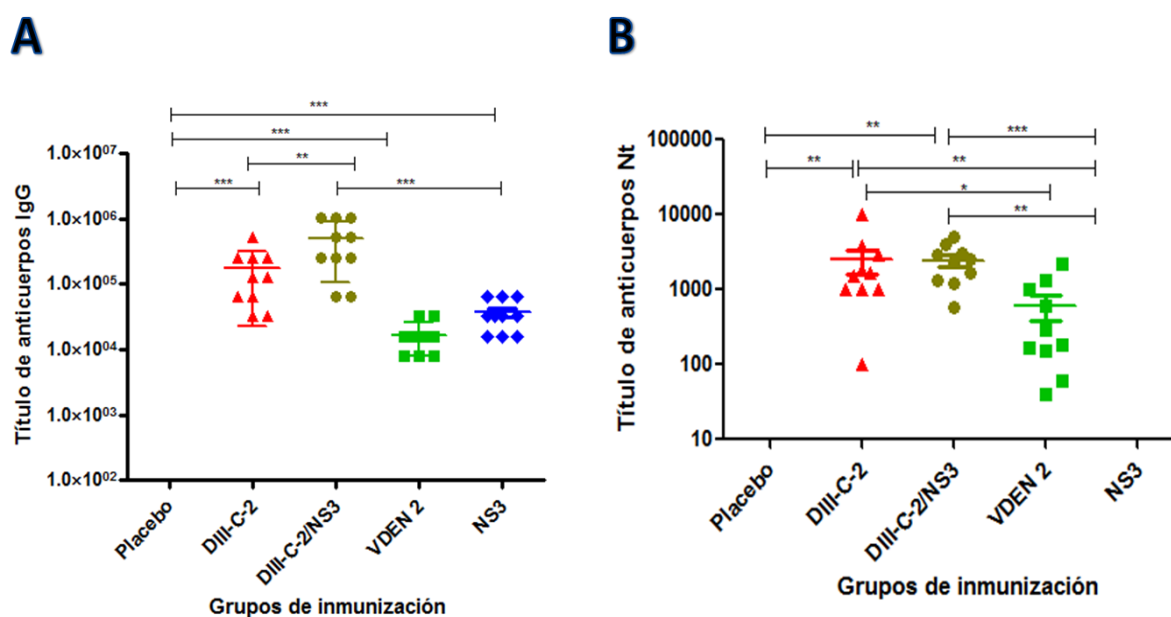


Figura III.14. Respuesta de Acs en ratones inmunizados con la proteína recombinante DIII-C-2 y la formulación DIII-C-2/NS3. (A) Los títulos de Acs anti-virales contra VDEN 2 se midieron mediante un ELISA de captura. (B) Los títulos de Acs Nt se midieron mediante NRNP. Los datos se muestran en el gráfico como el TPG \pm 2DE. Los grupos VDEN 2 y placebo fueron los controles positivo y negativo, respectivamente. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Newman-Keuls (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).

El TPG de la respuesta de Acs fue 172 000 para el grupo DIII-C-2 y 512 000 para el grupo DIII-C-2/NS3. La respuesta de Acs inducidos por la formulación combinada fue significativamente mayor, en comparación con la respuesta detectada en los ratones inoculados con DIII-C-2 ($p < 0,01$), NS3 y VDEN 2 ($p < 0,001$), este último empleado como control positivo del esquema de inmunización. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta de Acs inducida por la proteína recombinante NS3 y el VDEN 2.

La respuesta de Acs Nt detectada en los grupos de inmunización DIII-C-2 y DIII-C-2/NS3 fue elevada con un TPG de 2 500 y 2 300 respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas (Figura III.14B). En ambos casos la respuesta de Acs Nt fue significativamente superior con respecto a los grupos placebo y NS3 ($p < 0,01$), e incluso a la respuesta detectada en el grupo control positivo del estudio (ratones inoculados con el VDEN 2) ($p < 0,05$), lo cual coincide con los resultados de los niveles de Acs anti-virales.

Previamente se reporta que la proteína recombinante DIII-C-2 induce una respuesta inmune funcional con capacidad protectora frente al VDEN 2 en el modelo de encefalitis de ratón (47). En dicho estudio todos los ratones inmunizados con la proteína DIII-C-2 desarrollan elevados títulos de Acs anti-virales (7 030 y 7 790 respectivamente).

En relación a la proteína NS3, Simmons y colaboradores reportan que la inmunización de ratones con una vacuna de VDEN 2 inactivado conjuntamente con el dominio helicasa de la proteína NS3 del mismo serotipo viral, obtenido por vía recombinante, genera un marcado aumento de la respuesta de Acs IgG contra el VDEN 2 por ELISA (319). Estos autores plantean que la inclusión de epítopes adicionales presentes en la región helicasa de la proteína NS3 puede haber modulado la respuesta inmune lo que proporciona señales de diferenciación y activación adicionales para monocitos y células dendríticas. Esto puede explicar también en nuestro caso el incremento significativo de la respuesta de Acs anti-virales específica observada en el grupo de ratones inmunizados con la formulación combinada DIII-C-2/NS3.

Además estos autores definen que son las células CD4+ la subpoblación de células T responsable de la producción de $IFN\gamma$ en los animales inmunizados con la formulación combinada. Recientemente un papel antiviral protector de las células T CD4+ se reporta frente a la infección por algunos flavivirus. Uno de estos estudios muestra que las células T CD4+

favorecen la respuesta de Acs generada contra la infección por el VNO, siendo los niveles de Acs IgG en ratones deficientes de células T CD4+ aproximadamente de 100 a 1000 veces más bajos que en ratones inmunocompetentes. Esto sugiere que el papel de esta subpoblación celular se relaciona con la cooperación en la inducción de la respuesta de Acs y en el mantenimiento de la respuesta de células T CD8+ (325). En otro estudio realizado por Gonçalves y colaboradores se demuestra que la respuesta inmune inducida por una vacuna de ADN basada en la proteína NS1 del VDEN 2 requiere de la cooperación entre las células T CD4+ y la respuesta de Acs para la protección contra el VDEN (326). Sin embargo, en el estudio no se esclarece el mecanismo a través del cual puede ocurrir esta protección, teniendo en cuenta que los autores excluyen la hipótesis de la función T cooperadora de las células CD4+ sobre las células CD8+ el principal mecanismo de protección inducido por la vacuna de ADN.

Considerando todo lo antes expuesto, la adición de la proteína recombinante NS3 a la formulación de DIII-C-2 pudiera potenciar la respuesta de células T CD4+ por proporcionar nuevos epítopes para estas células, que contribuyen a reforzar la cooperación T-B y, consecuentemente, incrementar la inducción de la respuesta de Acs, incluso más que la inducida por el propio virus.

Diferencias en las vías de procesamiento y presentación antigénica de la formulación con respecto a la que resulta de la replicación viral, pudieran explicar este resultado.

Previamente en este trabajo y en otros a los cuales se hace referencia se reporta que la proteína NS3 del VDEN 2 obtenida por vía recombinante induce una elevada respuesta de Acs anti-NS3 en ratones, pero sin mostrar capacidad Nt (170, 276, 310). En un estudio realizado por Tan y colaboradores en 1990 se demuestra que la inmunización pasiva con AcMs contra NS3 prolonga el tiempo medio de supervivencia en ratones retados con una dosis letal de VDEN 1 (44).

Aunque en el presente trabajo se sugirió una posible función de la Acs anti-NS3, esta función aún debe ser demostrada. Sin embargo si se pudo demostrar que los Acs anti-NS3 obtenidos en este estudio no son Nt. Esto significa que los Acs anti-NS3 no aportan a la actividad Nt de la formulación combinada DIII-C-2/NS3.

Para caracterizar la respuesta de Acs se determinaron las subclases de inmunoglobulinas inducidas en los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes DIII-C-2 y NS3, la formulación DIII-C-2/NS3, y se compararon con los inducidos por el virus. En la figura III.15 se pueden apreciar las diferentes subclases de inmunoglobulinas generadas tras la inmunización en cada grupo evaluado. La proteína DIII-C-2 indujo Acs de las cuatro subclases de inmunoglobulinas medidas en el suero de los ratones inmunizados, siendo la respuesta de tipo IgG1 la predominante. Un patrón de distribución similar al grupo DIII-C-2, tuvo la formulación DIII-C-2/NS3 donde la respuesta de tipo IgG1 también fue superior al resto de las respuestas. Por otra parte, los Acs generados por la proteína NS3 correspondieron a las cuatro subclases de inmunoglobulinas, destacándose entre todas, la IgG2b. En el caso del grupo control positivo (VDEN 2), la subclase predominante fue la IgG2a y no se obtuvieron Acs de la subclase IgG1.

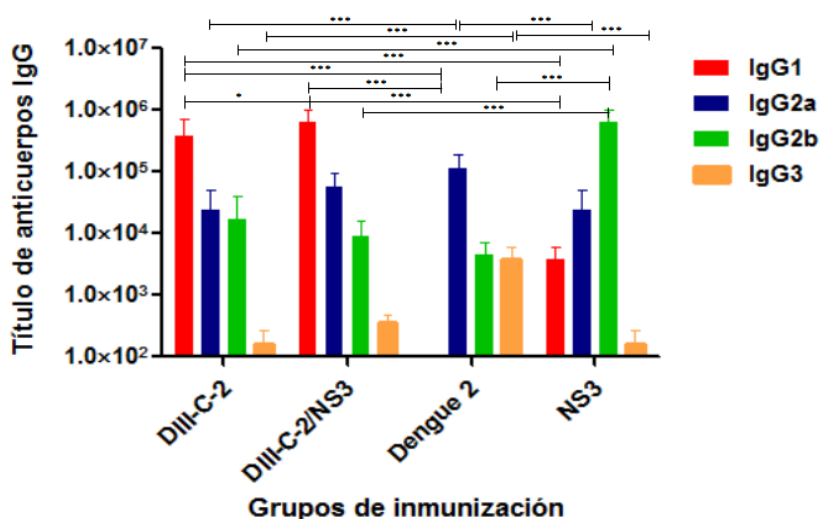


Figura III.15. Patrón de subclases de inmunoglobulinas generadas en ratones inmunizados con las proteínas recombinantes DIII-C-2 y NS3, y la formulación DIII-C-2/NS3. Los datos obtenidos se muestran en el gráfico como el TPG \pm 2DE. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Comparación Múltiple de Newman-Keuls (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

El análisis de las subclases de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2b individualmente entre cada grupo, mostró que la respuesta de tipo IgG1 fue estadísticamente significativa al compararla entre los animales inmunizados con las proteínas recombinantes y la formulación DIII-C-2/NS3 (DIII-C-2 vs DIII-C-2/NS3, $p < 0,05$; NS3 vs DIII-C-2/NS3, $p < 0,001$; DIII-C-2 vs NS3, $p < 0,001$). Asimismo, esta respuesta de tipo IgG1 fue significativamente superior, $p < 0,001$, a la respuesta de IgG1 no detectada en el grupo control positivo.

En relación a la IgG2b los mayores niveles se obtuvieron en el grupo de ratones inmunizados con la proteína NS3, siendo este tipo de respuesta estadísticamente significativa $p < 0,001$ con respecto al resto de los grupos inmunizados, los cuales no mostraron entre ellos diferencias significativas para este tipo de respuesta.

Los niveles mayores de IgG2a e IgG3 se obtuvieron en el grupo control positivo que fueron similares a los encontrados en el grupo inmunizado con la formulación DIII-C-2/NS3. Sin embargo se detectaron diferencias significativas con respecto a los grupos de ratones que recibieron las proteínas recombinantes DIII-C-2 y NS3, $p < 0,01$ para la respuesta IgG2a; mientras que para la respuesta IgG3 fue con una significación de $p < 0,001$.

Estos resultados concuerdan con los reportados con anterioridad por Marcos y colaboradores, donde el título de Acs Nt inducido por la proteína recombinante DIII-C-2 es de 1 000 aproximadamente (47).

A diferencia de los resultados de la respuesta de Acs anti-virales, no se detectó actividad Nt en los ratones inmunizados con la proteína NS3. Sin embargo, se observa un incremento en el título de Acs Nt en los animales inmunizados con la formulación DIII-C-2/NS3 con respecto a los que recibieron solo la proteína recombinante DIII-C-2. Esto sugiere que los Acs que aporta la proteína NS3 no son Nt, aunque no se puede descartar la participación de estos Acs anti-NS3 en la eliminación viral a través de otras funciones como la opsonofagocitosis por activación del complemento.

Además de la neutralización, los Acs pueden mediar otros mecanismos de la inmunidad contra el VDEN como la ADCC (120) y la activación del complemento (327, 328). Yamanaka y colaboradores demuestran que la capacidad amplificadora de los AcMs contra los serotipos 2 y 4, en concentraciones subneutralizantes, se elimina por la adición de los factores del complemento C1q y C3. La actividad amplificadora de estos AcMs se redujo significativamente cuando la actividad hemolítica del complemento se encontraba en los niveles normales (327). La formación de inmunocomplejos entre la proteína E del VDEN y los AcMs puede activar el complemento, seguido por la formación del complejo de ataque a membrana C5b-C9 que puede actuar directamente sobre las partículas virales (327). Similar mecanismo puede explicar la función de los Acs anti-NS3, al formar inmunocomplejos con la proteína NS3. Si bien esta

proteína es intracelular se plantea por varios autores que la misma induce apoptosis durante la infección viral (173, 174) y su liberación al espacio extracelular puede facilitar la formación de inmunocomplejos.

En ratones, de manera similar a los humanos existen cuatro clases diferentes de IgGs, denominadas IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, las cuales se corresponden funcionalmente con la IgG1, IgG2, IgG4 e IgG3 en humanos, respectivamente. Sin embargo, se reportan diferencias entre las subclases de IgG entre estas especies en relación a la unión al FcR, la unión al complemento y el cambio de isotipo inducido por el perfil de citoquinas (329). Sin embargo, de manera general, la IgG1 en ratones y humanos se asocia regularmente con un patrón Th2 y el resto de las subclases a un patrón Th1 (329). La región Fc de los Acs de ratón de un patrón Th1 y principalmente de tipo IgG2a interactúa con los componentes del complemento o con los receptores Fc expresados en la superficie celular con una elevada afinidad, esta interacción puede activar eficientemente las funciones efectoras mediadas por el receptor Fc, como la opsonización y la fagocitosis mediada por macrófagos (410).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores podemos deducir que a diferencia del control positivo y la NS3 que inducen, según el patrón de inmunoglobulinas generado (IgG2a e IgG2b, respectivamente), una respuesta de tipo Th1, las formulaciones recombinantes DIII-C-2 y DIII-C-2/NS3 inducen una respuesta con predominio Th2. Estas diferencias pueden deberse en primer lugar, a la propia presencia de la proteína DIII-C-2 o a la presencia de la alúmina como adyuvante en esas formulaciones. Este adyuvante promueve fundamentalmente la inducción de un patrón de inmunoglobulinas de tipo Th2 (330, 331).

En varios estudios se demuestra que la combinación de subclases de inmunoglobulinas de ambos patrones ejerce un control eficiente de la infección viral. En un estudio previo donde se determina la contribución de las inmunoglobulinas IgG1 e IgG2a en la inmunidad generada tras la vacunación contra el virus de la influenza se demuestra el papel de los Acs de tipo IgG1 en la neutralización tanto *in vitro* como *in vivo*, mientras que la expresión de Acs de tipo IgG2a se correlaciona con el aclaramiento de la infección viral y el incremento de la protección frente al reto letal en el hospedero infectado (332). En ese estudio el incremento en la inducción de ambos isotipos de inmunoglobulinas se correlaciona mucho más con la eficacia de la vacunación que la respuesta de Acs Nt únicamente (332).

Experimentos llevados a cabo con AcMs contra antígenos de la proteína E del virus del ébola mostraron que los Acs de tipo IgG2a fueron más efectivos en la eliminación de la infección viral que los Acs del isotipo IgG1, incluso cuando son específicos para el mismo epítotope. La protección contra el virus del ébola se logra con bajas concentraciones de Acs IgG2a, lo que hace posible que, además de la neutralización de la partícula viral, este isotipo de inmunoglobulina estimule mecanismos efectores en el hospedero que ayuden al aclaramiento de la infección viral (333). Estos estudios muestran que elevados niveles de Acs son necesarios para neutralizar una sola partícula viral (aproximadamente 70 moléculas por virus) (332) sin embargo, la presencia de Acs que son más activos en la inducción de mecanismos efectores en el hospedero e incluso más eficientes a menor concentración (333) pudieran contribuir a la resolución de la infección cuando los niveles de Acs Nt son insignificantes.

En un estudio desarrollado por Konishi y colaboradores se demuestra que la coinmunización con un candidato vacunal de ADN y con uno basado en proteínas virales recombinantes incrementa los títulos Acs Nt contra los VEJ y VDEN por encima de los inducidos por la inmunización con cualquiera de los candidatos vacunales evaluados (334).

Además, la combinación de ambos candidatos induce títulos de Acs IgG1 e IgG2a, siendo los primeros ligeramente superiores a los de IgG2a. Los autores sugieren que una respuesta inmune balanceada de tipo Th1/Th2 puede ser inducida por la inmunización simultánea de una vacuna de ADN con una vacuna de proteínas virales recombinantes.

Por otra parte, un estudio previo realizado por Simmons y colaboradores, donde evalúan la respuesta humoral inducida por la coinmunización de un candidato vacunal recombinante con un candidato vacunal de ADN contra el VDEN obtienen una distribución regular de la respuesta de las subclases, lo que sugiere una inducción balanceada de la respuesta inmune celular y humoral contra el VDEN. Igualmente, obtienen Acs IgG1, IgG2a e IgG2b, siendo predominante los Acs IgG1, los que también al igual que los IgG2a tienen la capacidad de neutralizar el VDEN 2.

Un modelo de ratones transgénicos donde la expansión de células T específicas a un antígeno puede ser monitoreada, Getahun y colaboradores demuestran por primera vez que el isotipo de inmunoglobulina IgG2a media la amplificación de la respuesta de Acs *in vivo* a través del

incremento en la captura del antígeno por el FcR de las APCs favoreciéndose de esta forma la amplificación de la presentación del antígeno a las células Th, lo cual proporciona ayuda en la cooperación a las células B específicas al antígeno (335).

III.7. Capacidad protectora de la formulación DIII-C-2/NS3

III.7.1 Determinación de la proteína viral NS1 del VDEN 2 en el cerebro de los ratones inmunizados y tras el reto con el VDEN 2

Para evaluar la carga viral de cualquier muestra en un ensayo *in vitro*, se emplean diferentes metodologías, tales como la determinación del título viral infeccioso (336), citometría de flujo (337), inmunofluorescencia (338) y la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) para detectar el genoma viral (339). Todas estas metodologías en general requieren tiempo y son complejas en su ejecución. En este sentido, un grupo de investigadores desarrollaron una alternativa para determinar la carga viral con un método más simple basado en un ensayo tipo ELISA, específicamente, de captura de la proteína NS1 del VDEN (340).

La proteína NS1 se considera un marcador diagnóstico de la infección por VDEN (341) y los niveles secretados de esta proteína se relacionan directamente con el título viral infeccioso (342). Teniendo en cuenta lo planteado anteriormente, la carga viral puede ser determinada a través de la detección de la proteína NS1 en el lisado de tejido de cerebro infectado con VDEN mediante un ELISA de captura. Estos autores demuestran que la mayor carga viral se detecta entre los días 7 y 8 tras el reto ($10^{4.43}$ – $10^{4.75}$ pfu/mL), por lo que en el presente estudio se decidió determinar la capacidad protectora de las formulaciones a través de la cuantificación de los niveles de la proteína NS1 en el cerebro de los ratones siete días después del reto viral.

Los resultados mostraron que en el grupo placebo se detectaron los mayores niveles de la proteína NS1 del VDEN 2 siendo estadísticamente significativa esta detección con respecto a los bajos niveles de esta proteína detectados en el cerebro de los animales que fueron inmunizados con las proteínas recombinantes DIII-C-2 y NS3, la formulación DIII-C-2/NS3 y el grupo control positivo (Figura III.16). Esto es indicativo de una disminución de la replicación viral y además sugiere que hubo protección en los grupos inmunizados con las proteínas recombinantes DIII-C-2 y NS3 y con la formulación combinada DIII-C-2/NS3.

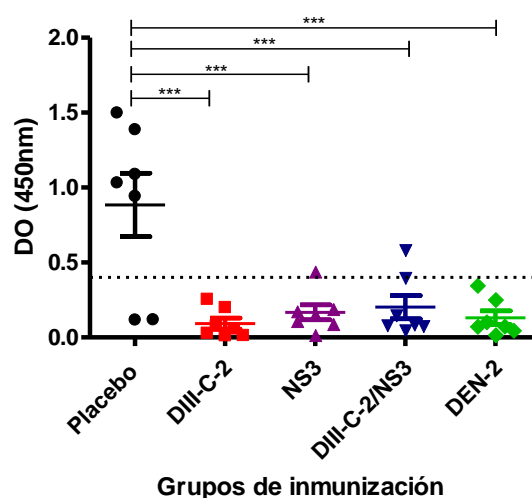


Figura III.16. Niveles detectados tras el reto viral de la proteína NS1 en el cerebro de los ratones previamente inmunizados. La línea discontinua indica el valor de corte (dos veces la media de la DO del grupo placebo). Los datos se representan como la media de la DO \pm DE. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Comparación Múltiple de Newman-Keuls (***) $p < 0,001$.

En un estudio reportado por Gil y cols., 2015, en el cual se evalúa la capacidad inmunogénica y protectora de la proteína recombinante DIII-C-2 en ratones, se observa que en el 40% de los animales inmunizados con esta proteína recombinante (40%) se detecta replicación viral tras el reto, mientras que en el resto de los ratones se constata una carga viral significativamente baja ($10^{2.8}$ y 10^2 pfu/mL). En general, se obtuvo una disminución significativa de la carga viral con respecto al grupo placebo, lo que indica la inducción de una sólida protección en este modelo murino (343).

III.7.2 Expresión de genes de citoquinas en tejido cerebral de ratones inmunizados tras el reto con el VDEN 2

En la figura III.17 se muestra la expresión relativa de los genes de citoquinas evaluados con respecto a un gen de expresión constitutiva (HPRT) tras el reto intracerebral con el VDEN 2 de los ratones previamente inmunizados con las proteínas recombinantes DIII-C-2, NS3 y la formulación DIII-C-2/NS3, así como en los grupos controles negativo y positivo del estudio.

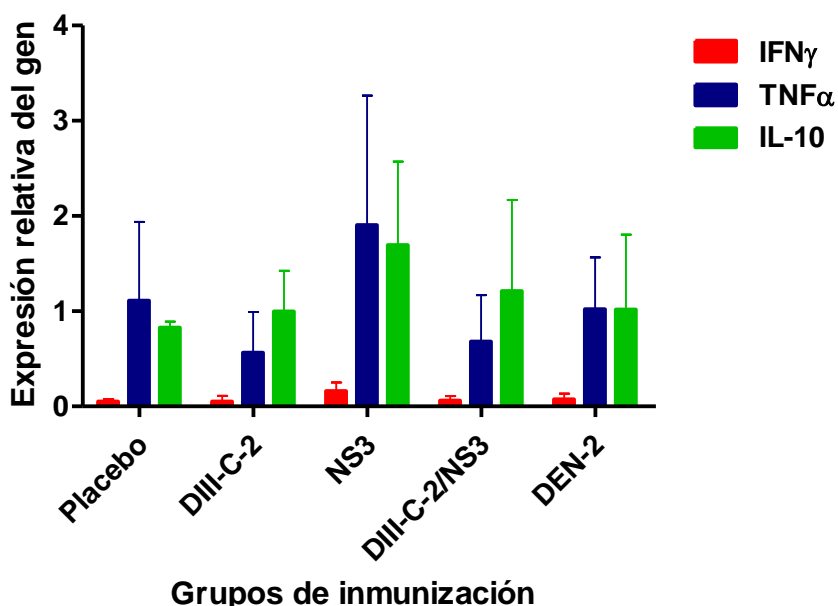


Figura III.17. Expresión de genes de las citoquinas IFN γ (rojo), TNF α (azul), e IL-10 (verde) en el cerebro de ratones inmunizados con las proteínas recombinantes y retados con una cepa neuroadaptada del VDEN 2. Los datos se representan como la media de la expresión relativa del gen \pm DE.

Los resultados mostraron niveles más bajos de expresión de IFN γ , con respecto a las otras 2 citoquinas, en el cerebro de todos los ratones evaluados independientemente del grupo al que pertenecían. Sin embargo, el grupo inmunizado con la proteína recombinante NS3 mostró los mayores niveles de expresión de esta citoquina.

En relación a la expresión relativa del gen que codifica para el TNF α , se obtuvieron los mayores niveles de expresión en el grupo de ratones que habían sido inmunizados con la proteína recombinante NS3, superiores incluso a los obtenidos en el grupo placebo. Sin embargo, en los ratones que recibieron como inmunógeno la formulación DIII-C-2/NS3 no se observó un incremento en la expresión de esta citoquina con respecto al grupo que fue inmunizado con la proteína DIII-C-2, cuyos niveles estuvieron por debajo de los detectados en el grupo control positivo.

Por su parte la expresión relativa del ARNm de la IL-10, mostró un comportamiento similar al observado para la expresión del ARNm del TNF α .

En los grupos de animales inmunizados con las variantes de proteínas recombinantes DIII-C-2 y DIII-C-2/NS3 se observó un cambio en el patrón de expresión del TNF α y la IL-10, con respecto al resto de los grupos incluidos en el estudio.

En estos dos grupos se obtuvo una menor expresión de TNF α con respecto a la expresión de la IL-10, lo cual sugiere la inducción de una respuesta de tipo reguladora más eficiente en estos animales. No obstante, en el grupo placebo y en los inmunizados con la proteína recombinante NS3 se obtuvo un predominio en la expresión del TNF α , por lo que en este caso fundamentalmente se generó una respuesta de tipo inflamatoria. En el caso del grupo control, hubo un balance entre la respuesta inflamatoria y reguladora dado por un equilibrio en la expresión de los genes de ambas citoquinas.

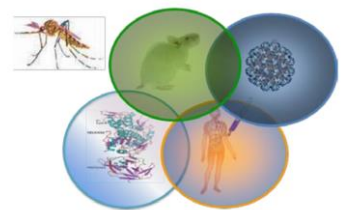
En condiciones fisiológicas las citoquinas se relacionan no sólo en el control de la activación, y regulación de la respuesta inmune antiviral, sino también con la proliferación, la supervivencia de las neuronas y las células gliales, así como con la protección contra la infección viral en el SNC (344). Sin embargo, la sobreproducción de citoquinas en el SNC también se asocia con la neuropatología. Varios estudios demuestran que el VDEN se replica en las neuronas, independientemente de la cepa de virus o serotipos, pero sólo algunos ratones infectados muestran alteraciones neuropatológicas (345-347).

De hecho, se demuestra en ratones transgénicos que la sobreproducción de TNF α e IL-6 en el cerebro induce la inflamación, la gliosis y la neurodegeneración (344).

En un estudio previo descrito por de Souza y cols., 2013 se demuestra que la inoculación intracraneal con una cepa del VDEN 3 induce en ratones inmunocompetentes C57BL/6 la expresión de elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias como IFN γ y TNF α . Las citoquinas y la transcripción del gen muestran un patrón similar y se asocian al incremento de la replicación viral, parálisis y daño en el tejido neuronal, lo que culmina con la muerte y demuestra así, la participación de la respuesta inmune en la patogénesis de la infección por dengue. Además, cuando la producción de Óxido Nítrico se asocia con la expresión de TNF α e IFN γ en el cerebro, se observa daño cerebral en los ratones, lo que a su vez provoca un incremento en la expresión de los genes que codifican para las citoquinas pro-inflamatorias (348).



Capítulo IV
DISCUSIÓN INTEGRADA



IV. DISCUSIÓN INTEGRADA

Durante décadas, la eficacia de una vacuna contra la enfermedad del dengue se asocia a la inducción de una respuesta inmune balanceada de Acs Nt contra los cuatro serotipos del VDEN (225, 349). Por consiguiente, en la evaluación de nuevos candidatos vacunales se espera que exista una correlación entre el título de Acs Nt y la protección frente a los serotipos del VDEN (60). Sin embargo, la vacuna Dengvaxia, actualmente disponible en el mercado, muestra resultados poco alentadores en los ensayos de las fases clínicas 2b y 3. Su eficacia moderada (56,5–60,8%) en presencia de títulos elevados de Acs Nt, la eficacia baja detectada entre los individuos seronegativos al VDEN comparados con los individuos inmunes a este virus (35,5–43,2 vs. 74,3–83,7%), así como, el riesgo incrementado de hospitalización y de desarrollo de FHD/SCD en niños menores de 9 años, marca una necesidad imperiosa de conocer a profundidad cómo se comportan las respuestas inmune humoral y celular tras la infección natural por el VDEN y explorar alternativas de nuevas formulaciones vacunales (350, 351).

En los últimos años, el papel de las células T se considera relevante en la protección contra la infección por el VDEN (316, 352). Estudios recientes realizados en ratones y humanos sugieren que las células T, particularmente las células CD8⁺, pueden ser mediadoras importantes en la acción protectora contra la infección por el VDEN (45, 247, 353).

La incorporación de biomoléculas inmunoestimuladoras de la respuesta de células T en formulaciones basadas en subunidades recombinantes es actualmente una de las tendencias en el desarrollo de vacunas contra el dengue (26, 47, 354). A pesar de que la proteína NS3 del VDEN es la diana principal de la respuesta de células T CD8⁺ citotóxica, pocos estudios evalúan la capacidad inmunogénica y protectora de esta proteína en estrategias de inmunización.

El presente estudio realiza un abordaje de la respuesta inmune inducida por la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 en ratones y su papel en la protección contra la infección por VDEN.

En primer lugar, las estrategias de clonaje empleadas en *E. coli*, condujeron a la expresión de la proteína NS3 del VDEN 2 mayoritariamente en forma insoluble formando CIs. Esta proteína renaturalizada y altamente purificada mantuvo los determinantes antigénicos de la proteína nativa y mostró actividad proteasa tanto en presencia como en ausencia de su cofactor NS2B. La estrategia desarrollada para obtener la NS3 recombinante en forma soluble generó una proteína inactiva en el ensayo de proteasa, y que no pudo purificarse empleando cromatografía de afinidad IMAC lo que sugiere la ocurrencia de fallas durante el plegamiento y estabilidad de la proteína recombinante.

Por tales razones, las evaluaciones *in vitro* e *in vivo* se llevaron a cabo con la proteína NS3 conformacionalmente activa purificada a partir de los CIs. Dichos CIs se consideran una fuente de proteína pura y pueden ser un buen modelo para producir proteínas a gran escala ya que en ese estado se protegen de la acción de las proteasas celulares (215). No obstante, la solubilización y renaturalización de estas proteínas recombinantes a partir de los CIs consume tiempo y recursos (294). Es por ello, que futuros estudios deben explorar la elección del sistema de expresión recombinante y la influencia de factores como: fuerza del promotor, optimización de codones raros; así como la co-expresión de chaperonas, en función de la naturaleza de la proteína de interés para asegurar la obtención de proteínas heterólogas funcionales, correctamente plegadas y en cantidades significativas.

Por otro lado, el hecho de que la proteína recombinante NS3 sea reconocida por los LAH de los cuatro serotipos del VDEN y que los Acs anti-NS3 recombinante generados reconozcan a la proteína NS3 nativa del VDEN 2, apunta a que esta proteína es altamente conservada entre todos los serotipos, y que mantiene una conformación estable.

En el presente trabajo, también se demuestra que la proteína recombinante NS3, favorece como antígeno la activación de una respuesta Th1 con una relación $IFN\gamma/TNF\alpha$ a favor del $IFN\gamma$. El $IFN\gamma$ se describe como una citoquina mediadora de la respuesta celular a través de su actividad antiviral contra el VDEN (355) e incluso se reporta una relación directamente proporcional entre la actividad $CD4^+$ y $CD8^+$ citotóxica y la secreción de esta citoquina (131, 356, 357). Esto habla a favor de la potencialidad de la proteína recombinante NS3 para su inclusión en una formulación vacunal tetravalente como inductora de una inmunidad celular contra los VDEN.

Otros ensayos se realizaron para determinar si la respuesta celular inducida por la proteína recombinante NS3 era capaz de controlar la infección viral, ya que inicialmente, se le atribuyó a la activación de las células T un papel eminentemente patogénico (127, 243, 322). Esta hipótesis se fundamenta en la producción exacerbada de citoquinas pro-inflamatorias por las células T de memoria, la magnitud de la respuesta inducida (146) y la reactividad cruzada mostrada por péptidos virales (172, 358).

En la actualidad, se reconoce que las células T (específicamente las CD8⁺) juegan un papel relevante en la disminución de la carga viral, en el aclaramiento de la infección por el VDEN y en la protección contra la infección primaria y secundaria del VDEN (133, 316, 317).

El presente trabajo demostró que la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 indujo una respuesta inmune de células T secretoras de IFN γ en ratones inmunizados con diferentes concentraciones de dicha proteína. No obstante, tras el reto viral, esta respuesta no fue protectora en el modelo de ratón evaluado.

Existe una gran variedad de modelos en ratón para la evaluación de potenciales candidatos vacunales contra el VDEN. A pesar de esto, la mayoría no son ideales para investigar los mecanismos protectores que se generan tras la inmunización. Por ejemplo, los ratones inmunocompetentes son los más empleados para evaluar la capacidad protectora de una formulación vacunal contra el VDEN, ya que estos son resistentes a la infección, sin embargo la inoculación intracraneal con el virus neuroadaptado provoca encefalitis viral. Pese a que la encefalitis viral no es una de las manifestaciones clínicas más observadas en individuos con infección por el VDEN (228, 359), varios estudios documentan su aparición causada por el VDEN en alrededor del 10% de los individuos con la enfermedad del dengue (69, 360). Este síntoma se asocia a la replicación viral en el tejido, a la respuesta inmunológica local, a la disfunción endotelial y a la presencia de signos hemorrágicos (361).

Teniendo en cuenta lo anterior, futuros estudios deberán explorar modelos de experimentación y vías de inoculación diferentes. En este sentido, modelos de ratón que permitan la inoculación del virus por vía periférica y no en el SNC pudieran ser una alternativa útil. Aunque se desarrollan modelos de ratón inmunocomprometido, la carencia de componentes de la respuesta inmune hospedera limita el empleo de estos en la evaluación de candidatos vacunales contra

este patógeno (323), por lo que, los modelos de primates no humanos continúan siendo una de las opciones principales para la evaluación de candidatos vacunales contra el VDEN.

La combinación de la NS3 con la proteína de fusión DIII-C-2 resultó ser una variante conveniente para lograr los resultados esperados en el modelo de encefalitis viral. La formulación DIII-C-2/NS3 mostró ser buena inductora de Acs antivirales con capacidad neutralizante, indujo una respuesta de Acs con predominio de Th2.

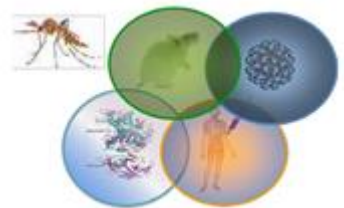
La cuantificación de los niveles de NS1 empleando el ensayo tipo ELISA de captura de la proteína NS1 del VDEN, anteriormente empleada en estudios de ADA (340), permitió demostrar la reducción de la carga viral en el sobrenadante del lisado de tejido cerebral de ratones. Este resultado avala la aplicación de este método para la detección del virus tras el reto viral, lo cual permitiría inferir indirectamente la capacidad protectora de formulaciones vacunales contra el VDEN.

El patrón de expresión de genes de citoquina demostró que la formulación combinada DIII-C-2/NS3 indujo una respuesta de tipo reguladora. Esto sugiere que la respuesta inmune inducida por la formulación DIII-C-2/NS3 es lo suficientemente eficiente como para controlar la infección tras el reto viral. Estudios futuros deberán determinar de forma cinética la carga viral en el cerebro de los animales retados, así como, la respuesta inmune celular inducida después de la inmunización y el reto en los diferentes grupos evaluados.

Esta investigación constituye el primer reporte de la respuesta inmune celular inducida contra el VDEN y de la capacidad protectora frente a la infección por dengue, de la proteína recombinante NS3. Además en este estudio se demuestra por primera vez el efecto inmunopotenciador de la proteína recombinante NS3, sobre la respuesta inmune generada por la formulación DIII-C-2, como parte del candidato vacunal cubano más avanzado contra el VDEN. Los resultados de este estudio contribuyen a profundizar en el conocimiento sobre la caracterización de la proteína NS3 del VDEN como un inmunógeno vacunal, teniendo en cuenta que existen muy pocos estudios que evalúan la antigenicidad, inmunogenicidad y capacidad protectora de esta proteína. Este estudio aporta a la evaluación de los candidatos vacunales de dengue en el modelo de encefalitis viral en ratón descifrando algunas de sus limitaciones para evaluar formulaciones no generadoras de Acs Nt.



CONCLUSIONES

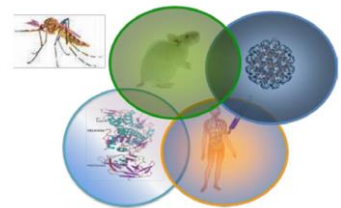


CONCLUSIONES

- La construcción genética que emplea el sistema de expresión pQE30 en *Escherichia coli*, y la estrategia de purificación desarrollada proporcionan la obtención de la proteína NS3 recombinante del VDEN 2 de forma íntegra, con una adecuada conformación y actividad proteasa.
- La proteína recombinante NS3 de VDEN 2 conserva los determinantes antigénicos de la proteína NS3 viral lo que favorece el reconocimiento por Acs anti-VDEN y por células T específicas de dengue.
- La proteína recombinante NS3 es inmunogénica y estimula una respuesta humoral y una potente respuesta celular, lo cual sugiere el empleo de esta proteína en formulaciones vacunales contra el VDEN.
- La inmunización con la proteína recombinante NS3 no confiere protección frente a la infección con el virus homólogo en el modelo de encefalitis viral en ratón, pero al combinarse con la proteína DIII-C-2 aporta epítomos que favorecen un incremento en la inducción de la respuesta de Acs anti-VDEN.
- La formulación DIII-C-2/NS3 induce una respuesta inmune que es eficiente en el control de la infección viral y reduce el efecto inmunopatogénico de la respuesta pro-inflamatoria antiviral, lo que recomienda su evaluación en otros modelos animales.
- La presente investigación apoya el empleo de la proteína NS3 del VDEN en formulaciones combinadas con proteínas del VDEN inductoras de Acs Nt.

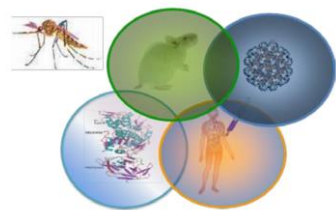


RECOMENDACIONES



RECOMENDACIONES

- Comprobar la antigenicidad de la proteína recombinante NS3 del VDEN 2 frente Acs y células T humanas.
- Evaluar la respuesta inmune y capacidad protectora inducida por la proteína recombinante NS3 del VDEN 2, coinmunizados con la proteína de fusión DIII-C de los serotipos 1, 3, y 4 del VDEN.
- Evaluar la eficacia de la formulación DIII-C-2/NS3 en primates no humanos.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-7.
2. Halstead SB, Russell PK. Protective and immunological behavior of chimeric yellow fever dengue vaccine. *Vaccine*. 2016;34:1643-7.
3. Halstead SB. Which Dengue Vaccine Approach Is the Most Promising, and Should We Be Concerned about Enhanced Disease after Vaccination? There Is Only One True Winner. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017.
4. Halstead SB. Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age. *Vaccine*. 2017;35(47):6355-8.
5. Halstead SB. Critique of World Health Organization Recommendation of a Dengue Vaccine. *The Journal of infectious diseases*. 2016;214(12):1793-179.
6. Screaton G, Mongkolsapaya J. Which Dengue Vaccine Approach Is the Most Promising, and Should We Be Concerned about Enhanced Disease after Vaccination? The Challenges of a Dengue Vaccine. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;Jul 17.
7. Whitehead SS, Subbarao K. Which Dengue Vaccine Approach Is the Most Promising, and Should We Be Concerned about Enhanced Disease after Vaccination? The Risks of Incomplete Immunity to Dengue Virus Revealed by Vaccination. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017.
8. Vannice KS, Durbin A, Hombach J. Status of vaccine research and development of vaccines for dengue. *Vaccine*. 2016;34(1):2934-8.
9. Weiskopf D, Angelo MA, Bangs DJ, Sidney J, Paul S, Peters B, et al. The human CD8+ T cell responses induced by a live attenuated tetravalent dengue vaccine are directed against highly conserved epitopes. *Journal of virology*. 2015;89(1):120-8.
10. Low JGH, Ooi EE, Vasudevan SG. Current Status of Dengue Therapeutics Research and Development. *The Journal of infectious diseases*. 2017;215(S2):S96-102.
11. Idris F, Muharram SH, Diah S. Glycosylation of dengue virus glycoproteins and their interactions with carbohydrate receptors: possible targets for antiviral therapy. *Archives of virology*. 2016;161(7):1751-60.
12. Conde JN, da Silva EM, Allonso D, Coelho DR, Andrade ID, de Medeiros LN, et al. Inhibition of the membrane attack complex by dengue NS1 through interaction with vitronectin and terminal complement proteins. *J Virol*. 2016;90:9570-81.
13. Luo D, Vasudevan SG, Lescar J. The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral research*. 2015;118:148-58.
14. Xie X, Zou J, Wanga Q, Shi P. Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery. *Antiviral research*. 2015;118:39-45.

15. Chu JJ, Lee RC, Ang MJ, Wang WL, Lim HA, Wee JL, et al. Antiviral activities of 15 dengue NS2B-NS3 protease inhibitors using a human cell-based viral quantification assay. *Antiviral research*. 2015;118:68-74.
16. Lim SP, Noble CG, Shi PY. The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral research*. 2015 119 57-67.
17. Rathore AP, Paradkar PN, Watanabe S, Tan KH, Sung C, Connolly JE, et al. Celgosivir treatment misfolds dengue virus NS1 protein, induces cellular pro-survival genes and protects against lethal challenge mouse model. *Antiviral research*. 2011;92(3):453-60.
18. Chen S, Wu Z, Wang M, Cheng A. Innate Immune Evasion Mediated by Flaviviridae Non-Structural Proteins. *Viruses*. 2017;9(10):E291.
19. Chan YK, Gack MU. Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing. *Nature reviews Microbiology*. 2016;14:360-73.
20. Yu CY, Chang TH, Liang JJ, Chiang RL, Lee YL, Liao CL, et al. Dengue virus targets the adaptor protein MITA to subvert host innate immunity. *PLoS pathogens*. 2012;8(6):e1002780.
21. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2003;3(1):19-28.
22. Kawaguchi I, Sasaki A, Boots M. Why are dengue virus serotypes so distantly related? Enhancement and limiting serotype similarity between dengue virus strains. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society*. 2003;270(1530):2241-7.
23. Zeidler JD, Fernandes-Siqueira LO, M.; BG, Da Poian AT. Non-Canonical Roles of Dengue Virus Non-Structural Proteins. *Viruses*. 2017;9(3).
24. Apte-Sengupta S, Sirohi D, Kuhn RJ. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Current opinion in virology*. 2014;9:134-42.
25. Lescar J, Luo D, Xu T, Sampath A, Lim SP, Canard B, et al. Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. *Antiviral research*. 2008;80(2):94-101.
26. Hurtado-Melgoza ML, Ramos-Ligonio A, Álvarez-Rodríguez LM, Meza-Menchaca T, López-Monteon A. Differential humoral and cellular immunity induced by vaccination using plasmid DNA and protein recombinant expressing the NS3 protein of dengue virus type 3. *Journal of biomedical science*. 2016;23(1):85.
27. Gebhard LG, Iglesias NG, Byk LA, Filomatori CV, De Maio FA, Gamarnik AV. A Proline-Rich N-Terminal Region of the Dengue Virus NS3 Is Crucial for Infectious Particle Production. *Journal of virology*. 2016;90(11):5451-61.
28. Benarroch D, Selisko B, Locatelli GA, Maga G, Romette JL, Canard B. The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg²⁺-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology*. 2004;328(2):208-18.
29. Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol*. 1991;65(5):2467-75.
30. Li J, Lim SP, Beer D, Patel V, Wen D, Tumanut C, et al. Functional profiling of recombinant NS3 proteases from all four serotypes of dengue virus using tetrapeptide and octapeptide substrate libraries. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(31):28766-74.

31. Sampath A, Xu T, Chao A, Luo D, Lescar J, Vasudevan SG. Structure-based mutational analysis of the NS3 helicase from dengue virus. *Journal of virology*. 2006;80(13):6686-90.
32. Teo KF, Wright PJ. Internal proteolysis of the NS3 protein specified by dengue virus 2. *The Journal of general virology*. 1997;78(2):337-41.
33. Incicco JJ, Gebhard LG, Gonzalez-Lebrero RM, Gamarnik AV, Kaufman SB. Steady-state NTPase activity of Dengue virus NS3: number of catalytic sites, nucleotide specificity and activation by ssRNA. *PloS one*. 2013;8(3):e58508.
34. Gebhard LG, Kaufman SB, Gamarnik AV. Novel ATP-independent RNA annealing activity of the dengue virus NS3 helicase. *PloS one*. 2012;7(4):e36244.
35. Cui T, Sugrue RJ, Xu Q, Lee AK, Chan YC, Fu J. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology*. 1998;246(2):409-17.
36. Mladinich KM, Piaskowski SM, Rudersdorf R, Eernisse CM, Weisgrau KL, Martins MA, et al. Dengue virus-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes target NS1, NS3 and NS5 in infected Indian rhesus macaques. *Immunogenetics*. 2012;64(2):111-21.
37. Mathew A, Kurane I, Rothman AL, Zeng LL, Brinton MA, Ennis FA. Dominant recognition by human CD8+ cytotoxic T lymphocytes of dengue virus nonstructural proteins NS3 and NS1.2a. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(7):1684-91.
38. Kurane I, Brinton MA, Samson AL, Ennis FA. Dengue virus-specific, human CD4+ CD8- cytotoxic T-cell clones: multiple patterns of virus cross-reactivity recognized by NS3-specific T-cell clones. *Journal of virology*. 1991;65(4):1823-8.
39. Rivino L, Kumaran EA, Jovanovic V, Nadua K, Teo EW, Pang SW, et al. Differential targeting of viral components by CD4+ versus CD8+ T lymphocytes in dengue virus infection. *Journal of virology*. 2013;87(5):2693-706.
40. Weiskopf D, Angelo MA, de Azeredo EL, Sidney J, Greenbaum JA, Fernando AN, et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(22):E2046-53.
41. Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P, et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(39):16922-7.
42. Rothman AL, Kurane I, Lai CJ, Bray M, Falgout B, Men R, et al. Dengue virus protein recognition by virus-specific murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Journal of virology*. 1993;67(2):801-6.
43. 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. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013;97(4):1553-60.
44. 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. *The Journal of general virology*. 1990;71 (Pt 3):745-9.
45. Yauch LE, Prestwood TR, May MM, Morar MM, Zellweger RM, Peters B, et al. CD4+ T cells are not required for the induction of dengue virus-specific CD8+ T cell or antibody responses but contribute to protection after vaccination. *Journal of immunology*. 2010;185(9):5405-16.

46. Valdes I, Gil L, Romero Y, Castro J, Puente P, Lazo L, et al. The chimeric protein domain III-capsid of dengue virus serotype 2 (DEN-2) successfully boosts neutralizing antibodies generated in monkeys upon infection with DEN-2. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2011;18(3):455-9.
47. Marcos E, Gil L, Lazo L, Izquierdo A, Brown E, Suzarte E, et al. Purified and highly aggregated chimeric protein DIIIc-2 induces a functional immune response in mice against dengue 2 virus. *Archives of virology*. 2013;158(1):225-30.
48. Gil L, Cobas K, Lazo L, Marcos E, Hernández L, Suzarte E, et al. A Tetravalent Formulation Based on Recombinant Nucleocapsid-like Particles from Dengue Viruses Induces a Functional Immune Response in Mice and Monkeys. *Journal of immunology*. 2016;197(9):3597-606.
49. Gil L, Lazo L, Valdés I, Suzarte E, Yen P, Ramírez R, et al. The tetravalent formulation of domain III-capsid proteins recalls memory B- and T-cell responses induced in monkeys by an experimental dengue virus infection. *Clinical & Translational Immunology*. 2017;6:e148.
50. WHO/TDR. *Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control-new edition.*: World Health Organization Press, Geneva, Switzerland; 2009.
51. San Martin JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solorzano JO, Bouckennooghe A, Dayan GH, et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2010;82(1):128-35.
52. van de Weg CA, van Gorp EC, Supriatna M, Soemantri A, Osterhaus AD, Martina BE. Evaluation of the 2009 WHO dengue case classification in an Indonesian pediatric cohort. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012;86(1):166-70.
53. Jayaratne SD, Atukorale V, Gomes L, Chang T, Wijesinghe T, Fernando S, et al. Evaluation of the WHO revised criteria for classification of clinical disease severity in acute adult dengue infection. *BMC research notes*. 2012;5:645.
54. Narvaez F, Gutierrez G, Perez MA, Elizondo D, Nunez A, Balmaseda A, et al. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of Dengue disease severity. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(11):e1397.
55. Monteiro SP, Brasil PE, Cabello GM, Souza RV, Brasil P, Georg I, et al. HLA-A*01 allele: a risk factor for dengue haemorrhagic fever in Brazil's population. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107(2):224-30.
56. Tuiskunen A, Monteil V, Plumet S, Boubis L, Wahlstrom M, Duong V, et al. Phenotypic and genotypic characterization of dengue virus isolates differentiates dengue fever and dengue hemorrhagic fever from dengue shock syndrome. *Archives of virology*. 2011;156(11):2023-32.
57. Rodriguez-Roche R, Sanchez L, Burgher Y, Rosario D, Alvarez M, Kouri G, et al. Virus role during intraepidemic increase in dengue disease severity. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2011;11(6):675-81.
58. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1987;81(5):821-3.
59. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015;385:453-65.
60. Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Kuan G, Gordon A, et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*. 2017.
61. 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. *Archives of virology*. 2013;158(7):1445-59.

62. Pang J, Salim A, Lee VJ, Hibberd ML, Chia KS, Leo YS, et al. Diabetes with hypertension as risk factors for adult dengue hemorrhagic fever in a predominantly dengue serotype 2 epidemic: a case control study. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(5):e1641.
63. Limonta D, Gonzalez D, Capo V, Torres G, Perez AB, Rosario D, et al. Fatal severe dengue and cell death in sickle cell disease during the 2001-2002 Havana dengue epidemic. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2009;13(2):e77-8.
64. de la CSB, Kouri G, Guzman MG. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Archives of virology*. 2007;152(3):533-42.
65. Horstick O, Martinez E, Guzman MG, San Martin JL, Runge Ranzinger S. WHO Dengue Case Classification 2009 and its usefulness in practice: an expert consensus in the Americas. *Pathogens and global health*. 2015 109 (1).
66. 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. *Bulletin of the Pan American Health Organization*. 1988;22(2):133-44.
67. Guzman MG, Kouri G, Martinez E, Bravo J, Riveron R, Soler M, et al. Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Bulletin of the Pan American Health Organization*. 1987;21(3):270-9.
68. Martinez-Torres E. [Dengue and hemorrhagic dengue: the clinical aspects]. *Salud publica de Mexico*. 1995;37 Suppl:S29-44.
69. Li GH, Ning ZJ, Liu YM, Li XH. Neurological Manifestations of Dengue Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 7:449.
70. Khongphatthanayothin A, Mahayosnond A, Poovorawan Y. Possible cause of liver failure in patient with dengue shock syndrome. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(7):1161-3.
71. Seppelt IM, Orde SR. Why guess when you can see? Heart function and fluid management in dengue shock. *Critical care medicine*. 2012;40(2):675-6.
72. Mehra N, Patel A, Abraham G, Reddy YN, Reddy YN. Acute kidney injury in dengue fever using Acute Kidney Injury Network criteria: incidence and risk factors. *Tropical doctor*. 2012;42(3):160-2.
73. Puccioni-Sohler M, Orsini M, Soares CN. Dengue: a new challenge for neurology. *Neurology international*. 2012;4(3):e15.
74. Matlani M, Chakravarti A, Rawal A, Kashyap B, Gurtoo A. Dengue encephalitis: an entity now common in dengue-prone regions. *Tropical doctor*. 2009;39(2):115-6.
75. Wasay M, Channa R, Jumani M, Shabbir G, Azeemuddin M, Zafar A. Encephalitis and myelitis associated with dengue viral infection clinical and neuroimaging features. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2008;110(6):635-40.
76. Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, Kneen R, Thao LT, Raengsakulrach B, et al. Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet*. 2000;355(9209):1053-9.
77. Soares CN, Cabral-Castro MJ, Peralta JM, Freitas MR, Puccioni-Sohler M. Meningitis determined by oligosymptomatic dengue virus type 3 infection: report of a case. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2010;14(2):e150-2.
78. Puccioni-Sohler M, Soares CN, Papaiz-Alvarenga R, Castro MJ, Faria LC, Peralta JM. Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response. *Neurology*. 2009;73(17):1413-7.

79. Miagostovich MP, dos Santos FB, Fumian TM, Guimaraes FR, da Costa EV, Tavares FN, et al. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006;101(3):307-13.
80. Kouri G, Pelegrino JL, Munster BM, Guzman MG. [Society, economy, inequities and dengue]. *Revista cubana de medicina tropical*. 2007;59(3):177-85.
81. Thammapalo S, Chongsuwiatwong V, McNeil D, Geater A. The climatic factors influencing the occurrence of dengue hemorrhagic fever in Thailand. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2005;36(1):191-6.
82. Tapia-Conyer R, Betancourt-Cravioto M, Mendez-Galvan J. Dengue: an escalating public health problem in Latin America. *Paediatrics and international child health*. 2012;32 Suppl 1:14-7.
83. Alva-Urcia C, Aguilar-Luis MA, Palomares-Reyes C, Silva-Caso W, Suarez-Ognio L, Weigl P, et al. Emerging and reemerging arboviruses: A new threat in Eastern Peru. *PloS one*. 2017;12(11).
84. Cantelar de Francisco N, Fernandez A, Albert Molina L, Perez Balbis E. [Survey of dengue in Cuba. 1978-1979]. *Revista cubana de medicina tropical*. 1981;33(1):72-8.
85. Kouri G, Guzman MG, Bravo J. Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. *Bulletin of the Pan American Health Organization*. 1986;20(1):24-30.
86. 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. *Emerging infectious diseases*. 1998;4(1):89-92.
87. Guzman MG, Alvarez A, Vazquez S, Alvarez M, Rosario D, Pelaez O, et al. Epidemiological studies on dengue virus type 3 in Playa municipality, Havana, Cuba, 2001-2002. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2012;16(3):e198-203.
88. Guzman MG, Pelaez O, Kouri G, Quintana I, Vazquez S, Penton M, et al. [Final characterization of and lessons learned from the dengue 3 epidemic in Cuba, 2001-2002]. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2006;19(4):282-9.
89. Alvarez M. Cinética y capacidad neutralizante de los anticuerpos homólogos y heterólogos contra serotipos de virus dengue en relación con el intervalo entre las infecciones, la secuencia de infección, duración de la viremia y la amplificación dependiente de anticuerpos en infecciones primarias y secundarias 2008.
90. Brelsfoard CL, Dobson SL. Population genetic structure of *Aedes polynesiensis* in the Society Islands of French Polynesia: implications for control using a *Wolbachia*-based autocidal strategy. *Parasites & vectors*. 2012;5:80.
91. Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1982;31(4):830-6.
92. Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus, editor. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 991-104
93. 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;108(5):717-25.

94. Kostyuchenko VA, Zhang Q, Tan JL, Ng TS, Lok SM. Immature and mature dengue serotype 1 virus structures provide insight into the maturation process. *Journal of virology*. 2013;87(13):7700-7.
95. Zhang Q, Hunke C, Yau YH, Seow V, Lee S, Tanner LB, et al. The stem region of premembrane protein plays an important role in the virus surface protein rearrangement during dengue maturation. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(48):40525-34.
96. Junjhon J, Edwards TJ, Utaipat U, Bowman VD, Holdaway HA, Zhang W, et al. Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. *Journal of virology*. 2010;84(16):8353-8.
97. Zybert IA, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Smit JM. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 12):3047-51.
98. Lai CY, Tsai WY, Lin SR, Kao CL, Hu HP, King CC, et al. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. *Journal of virology*. 2008;82(13):6631-43.
99. Rodenhuis-Zybert IA, van der Schaar HM, da Silva Voorham JM, van der Ende-Metselaar H, Lei HY, Wilschut J, et al. Immature dengue virus: a veiled pathogen? *PLoS pathogens*. 2010;6(1):e1000718.
100. Rey FA. Dengue virus: two hosts, two structures. *Nature*. 2013;497(7450):443-4.
101. Zhang X, Ge P, Yu X, Brannan JM, Bi G, Zhang Q, et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nature structural & molecular biology*. 2013;20(1):105-10.
102. Rey FA. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(12):6899-901.
103. Yábar C. Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del ARN del virus dengue: propuesta de un modelo de replicación del ARN. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*. 2003;20:51-7.
104. Tumban E, Maes NE, Schirtzinger EE, Young KI, Hanson CT, Whitehead SS, et al. Replacement of conserved or variable sequences of the mosquito-borne dengue virus 3' UTR with homologous sequences from Modoc virus does not change infectivity for mosquitoes. *The Journal of general virology*. 2013;94(Pt 4):783-8.
105. Alvarez DE, De Lella Ezcurra AL, Fucito S, Gamarnik AV. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*. 2005;339(2):200-12.
106. Blaney JE, Jr., Durbin AP, Murphy BR, Whitehead SS. Targeted mutagenesis as a rational approach to dengue virus vaccine development. *Current topics in microbiology and immunology*. 2010;338:145-58.
107. Hanley KA, Manlucu LR, Manipon GG, Hanson CT, Whitehead SS, Murphy BR, et al. Introduction of mutations into the non-structural genes or 3' untranslated region of an attenuated dengue virus type 4 vaccine candidate further decreases replication in rhesus monkeys while retaining protective immunity. *Vaccine*. 2004;22(25-26):3440-8.
108. Holmes EC, Burch SS. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends in microbiology*. 2000;8(2):74-7.

109. Yu IM, Holdaway HA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *Journal of virology*. 2009;83(23):12101-7.
110. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of virology*. 2006;80(23):11418-31.
111. Bartholomeusz AI, Wright PJ. Synthesis of dengue virus RNA in vitro: initiation and the involvement of proteins NS3 and NS5. *Archives of virology*. 1993;128(1-2):111-21.
112. Luo D, Wei N, Doan DN, Paradkar PN, Chong Y, Davidson AD, et al. Flexibility between the protease and helicase domains of the dengue virus NS3 protein conferred by the linker region and its functional implications. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(24):18817-27.
113. Leung D, Schroder K, White H, Fang NX, Stoermer MJ, Abbenante G, et al. Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(49):45762-71.
114. Phong WY, Moreland NJ, Lim SP, Wen D, Paradkar PN, Vasudevan SG. Dengue protease activity: the structural integrity and interaction of NS2B with NS3 protease and its potential as a drug target. *Bioscience reports*. 2011;31(5):399-409.
115. Luo D, Xu T, Watson RP, Scherer-Becker D, Sampath A, Jahnke W, et al. Insights into RNA unwinding and ATP hydrolysis by the flavivirus NS3 protein. *The EMBO journal*. 2008;27(23):3209-19.
116. Swarbrick CMD, Basavannacharya C, Chan KWK, Chan S, Singh D, Wei N, et al. NS3 helicase from dengue virus specifically recognizes viral RNA sequence to ensure optimal replication. *Nucleic acids research*. 2017;45(22):12904-20.
117. Balsitis SJ, Coloma J, Castro G, Alava A, Flores D, McKerrow JH, et al. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009;80(3):416-24.
118. Nunes PC, Viana-Paes M, Basilio-de Oliveira CA, Gomes-Soares AC, Bispo-de Filippis AM, da Rocha Queiroz -Lima M, et al. Detection of Dengue NS1 and NS3 Proteins in Placenta and Umbilical Cord in Fetal and Maternal Death. *Journal of medical virology*. 2016.
119. Castro-Mussot; ME, Machain-Williams; C, Loroño-Pino; MA, Salazar MI. Respuesta inmune e inmunopatogénesis en las infecciones con el virus del dengue. *Gaceta Médica de México*. 2013;149:531-40.
120. Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Ennis FA, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: potential involvement in early control of viral replication. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(8):1108-16.
121. Sun P, Kochel TJ. The battle between infection and host immune responses of dengue virus and its implication in dengue disease pathogenesis. *TheScientificWorldJournal*. 2013;2013:843469.
122. Hombach J, Cardoso MJ, Sabchareon A, Vaughn DW, Barrett AD. Scientific consultation on immunological correlates of protection induced by dengue vaccines report from a meeting held at the World Health Organization 17-18 November 2005. *Vaccine*. 2007;25(21):4130-9.
123. Hombach J, Barrett AD, Cardoso MJ, Deubel V, Guzman M, Kurane I, et al. Review on flavivirus vaccine development. *Proceedings of a meeting jointly organised by the World Health*

- Organization and the Thai Ministry of Public Health, 26-27 April 2004, Bangkok, Thailand. *Vaccine*. 2005;23(21):2689-95.
124. Kuberski TT, Rosen L. Identification of dengue viruses using complement fixing antigen produced in mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1977;26(3):538-43.
125. Davis AC, Shulman MJ. IgM -molecular requirement for its assembly and function. *Imunology Today*. 1989;10:118-28.
126. Jefferis R, Kumararatne DS. Selective IgG subclass deficiency. *Clinical and Experimental Immunology*. 1990;81:357-67.
127. Rothman AL. T lymphocyte responses to heterologous secondary dengue virus infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1171 Suppl 1:E36-41.
128. Guy B, Nougarede N, Begue S, Sanchez V, Souag N, Carre M, et al. Cell-mediated immunity induced by chimeric tetravalent dengue vaccine in naive or flavivirus-primed subjects. *Vaccine*. 2008;26(45):5712-21.
129. Wu SF, Liao CL, Lin YL, Yeh CT, Chen LK, Huang YF, et al. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. *Vaccine*. 2003;21(25-26):3919-29.
130. Green S, Kurane I, Edelman R, Tacket CO, Eckels KH, Vaughn DW, et al. Dengue virus-specific human CD4+ T-lymphocyte responses in a recipient of an experimental live-attenuated dengue virus type 1 vaccine: bulk culture proliferation, clonal analysis, and precursor frequency determination. *Journal of virology*. 1993;67(10):5962-7.
131. van der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R. Prolonged presence of effector-memory CD8 T cells in the central nervous system after dengue virus encephalitis. *International immunology*. 2003;15(1):119-25.
132. van Der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R, Strauss JH. Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *Journal of virology*. 2000;74(17):8094-101.
133. Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, Qutubuddin A, Sidney J, Peters B, et al. A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *Journal of immunology*. 2009;182(8):4865-73.
134. Weiskopf D, Sette A. T-cell immunity to infection with dengue virus in humans. *Frontiers in immunology*. 2014;5(93).
135. 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 immunology*. 2009;22(1):23-30.
136. Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunological reviews*. 2008;225:300-13.
137. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179(4):755-62.
138. Kurane I, Matsutani T, Suzuki R, Takasaki T, Kalayanarooj S, Green S, et al. T-cell responses to dengue virus in humans. *Tropical medicine and health*. 2011;39(4 Suppl):45-51.
139. Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunology and cell biology*. 2007;85(1):43-5.

140. Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *The Yale journal of biology and medicine*. 1970;42(5):350-62.
141. Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*. 2010;328(5979):745-8.
142. Halstead SB, Simasthien P. Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. II. Antigenic and biologic properties of dengue viruses and their association with disease response in the host. *The Yale journal of biology and medicine*. 1970;42(5):276-92.
143. Chaturvedi UC, Elbishbishi EA, Agarwal R, Raghupathy R, Nagar R, Tandon R, et al. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. *Journal of medical virology*. 1999;59(3):335-40.
144. Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology*. 1999;257(1):1-6.
145. Rothman AL. Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis. *Current topics in microbiology and immunology*. 2010;338:83-98.
146. 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. *Nature medicine*. 2003;9(7):921-7.
147. 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? *Journal of immunology*. 2006;176(6):3821-9.
148. Rosen L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1977;26(3):337-43.
149. Rodriguez-Roche R, Blanc H, Bordería AV, Díaz G, Henningsson R, Gonzalez D, et al. Increasing Clinical Severity during a Dengue Virus Type 3 Cuban Epidemic: Deep Sequencing of Evolving Viral Populations. *Journal of virology*. 2016;90:4320–33.
150. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of virology*. 1999;73(6):4738-47.
151. Rodriguez-Roche R, Hinojosa Y, M.G. G. First dengue haemorrhagic fever epidemic in the Americas, 1981: insights into the causative agent. *Archives of virology*. 2014;159(12):3239-47.
152. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, et al. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;75(6):1113-7.
153. Kouri G. [Dengue, a growing problem of health in the Americas]. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2006;19(3):143-5.
154. Bhattacharya MK, Maitra S, Ganguly A, Bhattacharya A, Sinha A. Dengue: a growing menace -- a snapshot of recent facts, figures & remedies. *International journal of biomedical science : IJBS*. 2013;9(2):61-7.
155. McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2000;2(9):1041-50.

156. Valdes L, Guzman MG, Kouri G, Delgado J, Carbonell I, Cabrera MV, et al. [Epidemiology of dengue and hemorrhagic dengue in Santiago, Cuba 1997]. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 1999;6(1):16-25.
157. Livingston PG, Kurane I, Dai LC, Okamoto Y, Lai CJ, Men R, et al. Dengue virus-specific, HLA-B35-restricted, human CD8+ cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones. Recognition of NS3 amino acids 500 to 508 by CTL clones of two different serotype specificities. *Journal of immunology*. 1995;154(3):1287-95.
158. Spaulding AC, Kurane I, Ennis FA, Rothman AL. Analysis of murine CD8(+) T-cell clones specific for the Dengue virus NS3 protein: flavivirus cross-reactivity and influence of infecting serotype. *Journal of virology*. 1999;73(1):398-403.
159. Simmons CP, Dong T, Chau NV, Dung NT, Chau TN, Thao le TT, et al. Early T-cell responses to dengue virus epitopes in Vietnamese adults with secondary dengue virus infections. *Journal of virology*. 2005;79(9):5665-75.
160. Masaki H, Fujii Y, Wakasa-Morimoto C, Toyosaki-Maeda T, Irimajiri K, Tomura TT, et al. Induction of specific and flavivirus--Cross-reactive CTLs by immunization with a single dengue virus-derived CTL epitope peptide. *Virus research*. 2009;144(1-2):188-94.
161. Khadka S, Vangeloff AD, Zhang C, Siddavatam P, Heaton NS, Wang L, et al. A physical interaction network of dengue virus and human proteins. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2011;10(12):M111 012187.
162. Le Breton M, Meyniel-Schicklin L, Deloire A, Coutard B, Canard B, de Lamballerie X, et al. Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. *BMC microbiology*. 2011;11:234.
163. Zou J, Lee LT, Wang QY, Xie X, Lu S, Yau YH, et al. Mapping the interactions between the NS4B and NS3 proteins of dengue virus. *J Virol* 2015;89:3471-83.
164. Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*. 2008;455:674-8.
165. Aguirre S, Maestre AM, Pagni S, Patel JR, Savage T, Gutman D, et al. DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. *PLoS pathogens*. 2012;8(10):e1002934.
166. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(8):532-43.
167. Cortes LM, Barth OM, Pantoja JR, Alves CR. Comparative immunological recognition of proteins from New Guinea "C" dengue virus type 2 prototype and from a dengue virus type 2 strain isolated in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98(3):331-4.
168. 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1997;56(4):466-70.
169. Churdboonchart V, Bhamarapavati N, Peampramprecha S, Sirinavin S. Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1991;44(5):481-93.
170. Valdes K, Alvarez M, Pupo M, Vazquez S, Rodriguez R, Guzman MG. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2000;7(5):856-7.
171. 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*. 2008;27(6):467-71.

172. Appanna R, Huat TL, See LL, Tan PL, Vadivelu J, Devi S. Cross-reactive T-cell responses to the nonstructural regions of dengue viruses among dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in Malaysia. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2007;14(8):969-77.
173. Shafee N, AbuBakar S. Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 8):2191-5.
174. Duarte dos Santos CN, Frenkiel MP, Courageot MP, Rocha CF, Vazeille-Falcoz MC, Wien MW, et al. Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. *Virology*. 2000;274(2):292-308.
175. Myint KS, Endy TP, Mongkolsirichaikul D, Manomuth C, Kalayanarooj S, Vaughn DW, et al. Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. *The Journal of infectious diseases*. 2006;194(5):600-7.
176. Suksanpaisan L, Cabrera-Hernandez A, Smith DR. Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2. *Journal of medical virology*. 2007;79(3):300-7.
177. Courageot MP, Catteau A, Despres P. Mechanisms of dengue virus-induced cell death. *Advances in virus research*. 2003;60:157-86.
178. Catteau A, Roue G, Yuste VJ, Susin SA, Despres P. Expression of dengue ApoptoM sequence results in disruption of mitochondrial potential and caspase activation. *Biochimie*. 2003;85(8):789-93.
179. Khetarpal N, Khanna I. Dengue fever: causes, complications, and vaccine strategies. *J Immunol Res*. 2016;2016:6803098.
180. Tripathi NK, Shrivastava A. Recent Developments in Recombinant Protein-Based Dengue Vaccines. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1919.
181. Torresi J, Ebert G, Pellegrini M. Vaccines licensed and in clinical trials for the prevention of dengue. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2017;13:1059-72.
182. Guy B, Lang J, Saville M. Vaccination against dengue: challenges and current developments. *Annu Rev Med*. 2016;67:387-404.
183. Vannice KS, Edge C, Dunleavy U. Clinical development and regulatory points for consideration for second-generation live attenuated dengue vaccines. *Vaccine*. 2018;36:3411-7.
184. Arredondo-García JL, Hadinegoro SR, Reynales H. Four-year safety follow-up of the tetravalent dengue vaccine efficacy randomized controlled trials in Asia and Latin America. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;24:755-63.
185. Halstead SB, Russell PK, Sun G. Protective and immunological behavior of chimeric yellow fever dengue vaccine. *Vaccine*. 2016;34:1643-7.
186. Sridhar S, Luedtke A, Langevin E. Effect of dengue serostatus on dengue vaccine safety and efficacy. *The New England journal of medicine*. 2018.
187. Guy B, Jackson N. Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection. *Nature reviews Microbiology*. 2015;14(nrmicro.2015.2):45.
188. Guy B, Noriega F, Ochiai RL. A recombinant live attenuated tetravalent vaccine for the prevention of dengue. *Expert review of vaccines*. 2017;16:1-13.
189. Arkin F. Dengue researcher faces charges in vaccine fiasco. *Science*. 2019;364(6438):320.
190. Dyer O. Philippines to charge Sanofi staff and government officials over dengue vaccine. *BMJ case reports*. 2019;364:11088.

191. Butrapet S, Huang CY, Pierro DJ, Bhamarapravati N, Gubler DJ, Kinney RM. Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3. *Journal of virology*. 2000;74(7):3011-9.
192. Osorio JE, Huang CY, Kinney RM, Stinchcomb DT. Development of DENVax: a chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. *Vaccine*. 2011;29(42):7251-60.
193. Rupp R, Luckasen GJ, Kristein JL. Safety and immunogenicity of different doses and schedules of a live attenuated tetravalent dengue vaccine (TDV) in healthy adults: a phase 1b randomized study. *Vaccine*. 2015;33:6351-9.
194. Sirivichayakul C, Barranco-Santana EA, Esquilin-Rivera I. Safety and immunogenicity of a tetravalent dengue vaccine candidate in healthy children and adults in dengue-endemic regions: a randomized, placebo-controlled phase 2 study. *The Journal of infectious diseases*. 2016;213:1562-72.
195. Whitehead SS, Hanley KA, Blaney JE, Jr., Gilmore LE, Elkins WR, Murphy BR. Substitution of the structural genes of dengue virus type 4 with those of type 2 results in chimeric vaccine candidates which are attenuated for mosquitoes, mice, and rhesus monkeys. *Vaccine*. 2003;21(27-30):4307-16.
196. Durbin AP, McArthur J, Marron JA, Blaney JE, Jr., Thumar B, Wanionek K, et al. The live attenuated dengue serotype 1 vaccine rDEN1Delta30 is safe and highly immunogenic in healthy adult volunteers. *Human vaccines*. 2006;2(4):167-73.
197. Kirkpatrick BD, Whitehead SS, Pierce KK, Tibery CM, Grier PL, Hynes NA, et al. The live attenuated dengue vaccine TV003 elicits complete protection against dengue in a human challenge model. *Science translational medicine*. 2016;8(330):330ra36-ra36.
198. Diaz C, Jarman RG, Febo I. Phase I randomized study of a tetravalent dengue purified inactivated vaccine in healthy adults from Puerto Rico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2018;98:1435-43.
199. Coller BA, Clements DE, Bett AJ, Sagar SL, Ter Meulen JH. The development of recombinant subunit envelope-based vaccines to protect against dengue virus induced disease. *Vaccine*. 2011;29(42):7267-75.
200. Valdes I, Bernardo L, Gil L, Pavon A, Lazo L, Lopez C, et al. A novel fusion protein domain III-capsid from dengue-2, in a highly aggregated form, induces a functional immune response and protection in mice. *Virology*. 2009;394(2):249-58.
201. Suzarte E, Marcos E, Gil L, Valdés I, Lazo L, Ramos Y, et al. Generation and characterization of potential dengue vaccine candidates based on domain III of the envelope protein and the capsid protein of the four serotypes of dengue virus. *Archives of virology*. 2014;159(7):1629-40.
202. Farrokhi N, Hrmova M, Burton RA, Fincher GB. Heterologous and Cell Free Protein Expression Systems. *Methods in Molecular Biology*. 2009;513:175-98.
203. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*. 2009;27:297-306.
204. Luria-Perez R, Cedillo-Barron L, Santos-Argumedo L, Ortiz-Navarrete VF, Ocana-Mondragon A, Gonzalez-Bonilla CR. A fusogenic peptide expressed on the surface of *Salmonella enterica* elicits CTL responses to a dengue virus epitope. *Vaccine*. 2007;25(27):5071-85.

205. Liu WT, Lin WT, Tsai CC, Chuang CC, Liao CL, Lin HC, et al. Enhanced immune response by amphotericin B following NS1 protein prime-oral recombinant Salmonella vaccine boost vaccination protects mice from dengue virus challenge. *Vaccine*. 2006;24(31-32):5852-61.
206. Cohen S, Powell CJ, Dubois DR, Hartman A, Summers PL, Eckels KH. Expression of the envelope antigen of dengue virus in vaccine strains of Salmonella. *Research in microbiology*. 1990;141(7-8):855-8.
207. Choi JH, Keum KC, Lee SY. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem Eng Sci*. 2006;61:876-85.
208. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006;72:211–22.
209. Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Stahl S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2002;35:91-105.
210. Chi-Ling T, Chih-Hsiang L. Influence of medium components on the expression of recombinant lipoproteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93:1539–52.
211. Weikert C, Sauer U, Bailer J. An *E. coli* Host strain useful for efficient overproduction of secreted recombinant protein. *Biotech Bioeng* 1997;59(3):386-91.
212. Basu A, Li X, Leong SS. Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;92:241–51.
213. Vera A, González-Montalbán N, Arís A, Villaverde A. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnol Bioeng* 2007;96:1101–6.
214. Carrio MM, Villaverde A. Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible *FEBS Letters*. 2001;489:29-33.
215. Ramón A, Señorale-Pose M, Marín M. Inclusion bodies: not that bad. . . *Front Microbiol*. 2014;5:56.
216. Ratelade J, Miot MC, Johnson E, Betton JM, Mazodier P, Benaroudj N. Production of Recombinant Proteins in the lon-Deficient BL21(DE3) Strain of *Escherichia coli* in the Absence of the DnaK Chaperone. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(11):3803-7.
217. Guevara-Hernández E, López-Zavala AA, Jiménez-Gutiérrez LR, Sotelo-Mundo RR. Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *Biotécnica*. 2013;XV(3):8-17.
218. Lan PC, Tseng CF, Lin MC, Chang CA. Expression and purification of human placenta lactogen in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 2006;46:285-93.
219. Martin J, Hermida L, Castro J, Romero Y, Cardosa J, Guillen G. Viremia and the magnitude of the immune response upon infection of green monkeys with dengue virus type 2 are strain-dependent. *Current microbiology*. 2009;59(6):579-83.
220. Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *Journal of virology*. 2000;74(7):3227-34.
221. Sun W, Eckels KH, Putnak JR, Lyons AG, Thomas SJ, Vaughn DW, et al. Experimental dengue virus challenge of human subjects previously vaccinated with live attenuated tetravalent dengue vaccines. *The Journal of infectious diseases*. 2013;207(5):700-8.

222. Mammen MP, Lyons A, Innis BL, Sun W, McKinney D, Chung RC, et al. Evaluation of dengue virus strains for human challenge studies. *Vaccine*. 2014;32:1488-94.
223. Gunther VJ, Putnak R, Eckels KH, Mammen MP, Scherer JM, Lyons A, et al. A human challenge model for dengue infection reveals a possible protective role for sustained interferon gamma levels during the acute phase of illness. *Vaccine*. 2011;29(22):3895-904.
224. Statler J, Mammen M, Lyons A, Sun W. Sonographic findings of healthy volunteers infected with dengue virus. *Journal of clinical ultrasound : JCU*. 2008;36(7):413-7.
225. Kirkpatrick BD, Durbin AP, Pierce KK, Carmolli MP, Tibery CM, Grier PL, et al. Robust and balanced immune responses to all 4 dengue virus serotypes following administration of a single dose of a live attenuated tetravalent dengue vaccine to healthy, flavivirus-naive adults. *The Journal of infectious diseases*. 2015;212(5):702-10.
226. Durbin AP, Kirkpatrick BD, Pierce KK, Elwood D, Larsson CJ, Lindow JC, et al. A single dose of any of four different live attenuated tetravalent dengue vaccines is safe and immunogenic in flavivirus-naive adults: a randomized, double-blind clinical trial. *The Journal of infectious diseases*. 2013;207(6):957-65.
227. Durbin AP, Whitehead SS. The dengue human challenge model: has the time come to accept this challenge? *The Journal of infectious diseases*. 2013;207(5):697-9.
228. Chan KW, Watanabe S, Kavishna R, Alonso S, Vasudevan S. Animal models for studying dengue pathogenesis and therapy. *Antiviral research*. 2015;123:5-14.
229. Sariol CA, White LJ. Utility, limitations, and future of non-human primates for dengue research and vaccine development. *Frontiers in immunology*. 2014;5:452.
230. Bernardo L, Izquierdo A, Alvarez M, Rosario D, Prado I, Lopez C, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue 1 envelope protein in non-human primates. *Antiviral research*. 2008;80(2):194-9.
231. Scherer WF, Russell PK, Rosen L, Casals J, Dickerman RW. Experimental infection of chimpanzees with dengue viruses. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1978;27(3):590-9.
232. Rosen L. Experimental infection of New World monkeys with dengue and yellow fever viruses. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1958;7(4):406-10.
233. Sun W, Nisalak A, Gettayacamin M, Eckels KH, Putnak JR, Vaughn DW, et al. Protection of Rhesus monkeys against dengue virus challenge after tetravalent live attenuated dengue virus vaccination. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(12):1658-65.
234. Marchette NJ, Halstead SB, Falkler WA, Jr., Stenhouse A, Nash D. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. 3. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. *The Journal of infectious diseases*. 1973;128(1):23-30.
235. Fujita N, Izaki S, Oda K, Kimura E, Hotta S. Research on dengue in tissue culture. V. Production of anti-dengue antibodies in tissue cultures from monkeys inoculated with an attenuated type I dengue virus strain. *The Kobe journal of medical sciences*. 1972;18(3):143-52.
236. Gil L, Izquierdo A, Lazo L, Valdes I, Ambala P, Ochola L, et al. Capsid protein: evidences about the partial protective role of neutralizing antibody independent immunity against dengue in monkeys. *Virology*. 2014;456-457:70-6.
237. Bernardo L, Fleitas O, Pavon A, Hermida L, Guillen G, Guzman MG. Antibodies induced by dengue virus type 1 and 2 envelope domain III recombinant proteins in monkeys neutralize strains with different genotypes. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2009;16(12):1829-31.

238. Guy B, Barban V, Mantel N, Aguirre M, Gulia S, Pontvianne J, et al. Evaluation of interferences between dengue vaccine serotypes in a monkey model. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009;80(2):302-11.
239. Bernardo L, Izquierdo A, Prado I, Rosario D, Alvarez M, Santana E, et al. Primary and secondary infections of *Macaca fascicularis* monkeys with Asian and American genotypes of dengue virus 2. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2008;15(3):439-46.
240. Smith KM, Nanda K, Spears CJ, Piper A, Ribeiro M, Quiles M, et al. Testing of novel dengue virus 2 vaccines in African green monkeys: safety, immunogenicity, and efficacy. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012;87(4):743-53.
241. Martin J, Hermida L, Castro J, Lazo L, Martinez R, Gil L, et al. Viremia and antibody response in green monkeys (*Chlorocebus aethiops sabaeus*) infected with dengue virus type 2: a potential model for vaccine testing. *Microbiology and immunology*. 2009;53(4):216-23.
242. Halstead SB. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1974;23(5):974-82.
243. Beaumier CM, Mathew A, Bashyam HS, Rothman AL. Cross-reactive memory CD8(+) T cells alter the immune response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner. *The Journal of infectious diseases*. 2008;197(4):608-17.
244. Akkina R. New generation humanized mice for virus research: comparative aspects and future prospects. *Virology*. 2013;435(1):14-28.
245. Mota J, Rico-Hesse R. Humanized mice show clinical signs of dengue fever according to infecting virus genotype. *Journal of virology*. 2009;83(17):8638-45.
246. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1952;1(1):30-50.
247. Zellweger RM, Tang WW, Eddy WE, King K, Sanchez MC, Shresta S. CD8+ T cells can mediate short-term protection against heterotypic dengue virus reinfection in mice. *Journal of virology*. 2015;89(12):6494-505.
248. Gil L, Bernardo L, Pavon A, Izquierdo A, Valdes I, Lazo L, et al. Recombinant nucleocapsid-like particles from dengue-2 induce functional serotype-specific cell-mediated immunity in mice. *The Journal of general virology*. 2012;93(Pt 6):1204-14.
249. Sabin AB, Schlesinger RW. Production of Immunity to Dengue with Virus Modified by Propagation in Mice. *Science*. 1945;101(2634):640-2.
250. Lee YR, Hu HY, Kuo SH, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, et al. Dengue virus infection induces autophagy: an in vivo study. *J Biomed Sci* 2013;20:65.
251. Lee YR, Huang KJ, Lei HY, Chen SH, Lin YS, Yeh TM, et al. Suckling mice were used to detect infectious dengue-2 viruses by intracerebral injection of the full-length RNA transcript. *Intervirology*. 2005;48(2-3):161-6.
252. Lee JC, Tseng CK, Wu YH, Kaushik-Basu N, Lin CK, Chen WC, et al. Characterization of the activity of 20-C-methylcytidine against dengue virus replication. *Antiviral research*. 2015;116C:1-9.
253. Zhao H, Jiang T, Zhou X-Z, Deng Y-Q, Li X-F, Chen S-P, et al. Induction of neutralizing antibodies against four serotypes of dengue viruses by MixBiEDIII, a tetravalent dengue vaccine. *PloS one*. 2014;9:e8657.
254. Weiskopf D, Yauch LE, Angelo MA, John DV, Greenbaum JA, Sidney J, et al. Insights into HLA-restricted T cell responses in a novel mouse model of dengue virus infection point toward new implications for vaccine design. *Journal of immunology*. 2011;187(8):4268-79.

255. Na W, Yeom M, Choi I, Yook H, Song D. Animal models for dengue vaccine development and testing. *Clinical and experimental vaccine research*. 2017;6:104-10.
256. Robinson JS. Yucatan miniature swine as an animal model for dengue-1 disease. Bethesda, MD: Uniformed Services University of The Health Sciences. 2005.
257. Cassetti MC, Durbin A, Harris E, Rico-Hesse R, Roehrig J, Rothman A, et al. Report of an NIAID workshop on dengue animal models. *Vaccine*. 2010;28(26):4229-34.
258. Bullock WO, Fernández, J.M., Short, J.M. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with Beta-Galactosidase selection. *Biotechniques*. 1987;4:376-8.
259. Studier FW, Moffatt, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal Molecular Biology*. 1986;189(1):113-30.
260. Añez G, Heisey DA, Volkova E, Rios M. Complete Genome Sequences of Dengue Virus Type 1 to 4 Strains Used for the Development of CBER/FDA RNA Reference Reagents and WHO International Standard Candidates for Nucleic Acid Testing. *Genome announcements*. 2016;4(1):e01583-15.
261. Holmes EC, Tio PH, Perera D, Muhi J, Cardoso J. Importation and co-circulation of multiple serotypes of dengue virus in Sarawak, Malaysia. *Virus research*. 2009;143(1):1-5.
262. Guzman MG, Deubel V, Pelegrino JL, Rosario D, Marrero M, Sariol C, et al. Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1995;52(3):241-6.
263. Rodriguez-Roche R, Hinojosa Y, Guzman MG. First dengue haemorrhagic fever epidemic in the Americas, 1981: insights into the causative agent. *Archives of virology*. 2014;159:3239-47.
264. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Rosario D, Halstead S, Kouri G, et al. Dengue virus type 2 in Cuba, 1997: conservation of E gene sequence in isolates obtained at different times during the epidemic. *Archives of virology*. 2005;150(3):415-25.
265. Clarke D, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1958;7:561-73.
266. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *Journal of clinical microbiology*. 1985;22(2):250-4.
267. Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. Methuen & Co Ltd, London, England. 1959.
268. WHO/TDR. *Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development*. 2nd ed ed2009.
269. Guittin P, Decelle T. Future improvements and implementation of animal care practices within the animal testing regulatory environment. *ILAR Journal*. 2002;43(1):S80-4.
270. Morton DB. *Removal of blood from laboratory mammals and birds*. Laboratory Animal Ltd Royal Society of Medicine Press. 2001.
271. Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Laboratory animals*. 1996;30:293-316.

272. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.1989.
273. Sanger F, Niclen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci Usa*. 1977;74:5463-7.
274. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 1999:4195-98.
275. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.
276. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76:4350-4.
277. Brown R, Jarvis, K., Hyland, K. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem*. 1989;180:136-9.
278. Kendrick NC, Johansen JJ, Lee PR. Optimization of an HP Scanjet for quantification of protein electrophoresis gels. *Anal Biochem* 1994;219:297-304.
279. Henchal EA, McCown JM, Seguin MC, Gentry MK, Brandt WE. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1983;32(1):164-9.
280. Izquierdo A, Valdes I, Gil L, Hermida L, Gutierrez S, Garcia A, et al. Serotype specificity of recombinant fusion protein containing domain III and capsid protein of dengue virus 2. *Antiviral research*. 2012;95(1):1-8.
281. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Morier L, Guzman G. Improved Dengue Virus Plaque Formation on BHK21 and LLCMK2 Cells: Evaluation of Some Factors. *Dengue Bulletin*. 2005;29.
282. Park WJ, You SH, Choi HA, Chu YJ, Kim GJ. Over-expression of recombinant proteins with N-terminal His-tag via subcellular uneven distribution in *Escherichia coli*. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2015;47(7):488-95.
283. Kuo MD, Chin C, Hsu SL, Shiao JY, Wang TM, Lin JH. Characterisation of the NTPase activity of Japanese encephalitis virus NS3 protein. *J Gen Virol*. 1996;77:2077-84.
284. Labeikyte D, Sereikaite J. Influence of Osmotic Shock on *Escherichia coli* Insoluble Protein Fraction in the Presence of Exogenous Osmolytes. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2013;23:219–26.
285. Petsev DN, Thomas BR, Yau S, Vekilov PG. Interactions and aggregation of apoferritin molecules in solution: effects of added electrolytes. *Biophysical journal*. 2000;78(4):2060-9.
286. Vernet E, Kotzsch A, Voldborg B, Sundström M. Screening of genetic parameters for soluble protein expression in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 2011;77:104-11.
287. Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *Protein J*. 2013.
288. Mogk A, Mayer MP, Deuerling E. Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology. *Chem-biochem*. 2002;3:807–14.
289. Fink AL. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and Design*. 1998;3(1):R9-R23.
290. Busso D, Kimb R, Kima SH. Expression of soluble recombinant proteins in a cell-free system using a 96-well format. *J Biochem Biophys Methods* 2003;55:233-40.

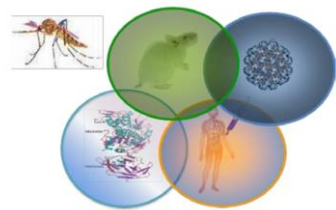
291. Woestenenk EA, Hammarström M, van den Berg S, Härd T, Berglund H. His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors. *Journal of Structural and Functional Genomics*. 2004;5:217-29.
292. Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol*. 2000;326:245-54.
293. Luo D, Xu T, Hunke C, Gruber G, Vasudevan SG, Lescar J. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *Journal of virology*. 2008;82(1):173-83.
294. De Bernadez Clark E. Protein refolding for industrial processes. *Curr Op Biotechnol*. 2001;12:202-7.
295. Robichon C, Luo J, Thomas BC, Jack SB. Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) Derivative Strains To Minimize *E. coli* Protein Contamination after Purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(13):4634-46.
296. Bolanos-Garcia VM, Davies OR. Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochim Biophys*. 2006;1760:1304-13.
297. Arakaki TL, Fang NX, Fairlie DP, Young PR, Martin JL. Catalytically active Dengue virus NS3 protease forms aggregates that are separable by size exclusion chromatography. Protein expression and purification. 2002;25(2):241-7.
298. Parsy CB, Chapman CJ, Barnes AC, Robertson JF, Murray A. Two-step method to isolate target recombinant protein from co-purified bacterial contaminant SlyD after immobilised metal affinity chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;853314-319.
299. Khumthong R, Angsuthanasombat C, Panyim S, Katzenmeier G. In vitro determination of dengue virus type 2 NS2B-NS3 protease activity with fluorescent peptide substrates. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 2002;35(2):206-12.
300. Natarajan S. NS3 protease from flavivirus as a target for designing antiviral inhibitors against dengue virus. *Genetics and molecular biology*. 2010;33(2):214-9.
301. Yusof R, Clum S, Wetzel M, Murthy HM, Padmanabhan R. Purified NS2B/NS3 serine protease of dengue virus type 2 exhibits cofactor NS2B dependence for cleavage of substrates with dibasic amino acids in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(14):9963-9.
302. Gouvea IE, Izidoro MA, Judice WA, Cezari MH, Caliendo G, Santagada V, et al. Substrate specificity of recombinant dengue 2 virus NS2B-NS3 protease: influence of natural and unnatural basic amino acids on hydrolysis of synthetic fluorescent substrates. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;457(2):187-96.
303. Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, Owens RJ, et al. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *Journal of virology*. 2009;83(24):12895-906.
304. Matsui K, Gromowski GD, Li L, Schuh AJ, Lee JC, Barrett AD. Characterization of dengue complex-reactive epitopes on dengue 3 virus envelope protein domain III. *Virology*. 2009;384(1):16-20.
305. 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. *The Journal of infectious diseases*. 2002;185(9):1213-21.
306. Cardier JE, Marino E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, et al. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis

- of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine*. 2005;30(6):359-65.
307. Levy A, Valero N, Espina LM, Anez G, Arias J, Mosquera J. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010;104(1):16-23.
308. Malavige GN, Huang LC, Salimi M, Gomes L, Jayaratne SD, Ogg GS. Cellular and cytokine correlates of severe dengue infection. *PloS one*. 2012;7(11):e50387.
309. Sallberg M, Z. Zhang, M., Chen, L., Jin, A., Birkett, D. L., Peterson, D. R. Milich. Immunogenicity and antigenicity of the ATPase/Helicase domain of the hepatitis C virus non-structural 3 protein. *J Gen Virol*. 1996;77:2721-2728.
310. Alvarez-Rodriguez LM, Ramos-Ligonio A, Rosales-Encina JL, Martinez-Cazares MT, Parissi-Crivelli A, Lopez-Monteon A. Expression, purification, and evaluation of diagnostic potential and immunogenicity of a recombinant NS3 protein from all serotypes of dengue virus. *Journal of tropical medicine*. 2012;2012:956875.
311. Churdboochart V, Bhamarapavati N, Peampramprecha S, Sirinavin S. Antibodies against viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;44:481-93.
312. Chua JJ, Ng MM, Chow VT. The non-structural 3 (NS3) protein of dengue virus type 2 interacts with human nuclear receptor binding protein and is associated with alterations in membrane structure. *Virus research*. 2004;102(2):151-63.
313. Bokisch VA, Top FH, Jr., Russell PK, Dixon FJ, Muller-Eberhard HJ. The potential pathogenic role of complement in dengue hemorrhagic shock syndrome. *The New England journal of medicine*. 1973;289(19):996-1000.
314. Murphy BR, Whitehead SS. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annual review of immunology*. 2011;29:587-619.
315. Kyle JL, Balsitis SJ, Zhang L, Beatty PR, Harris E. Antibodies play a greater role than immune cells in heterologous protection against secondary dengue virus infection in a mouse model. *Virology*. 2008;380(2):296-303.
316. Lam JH, Chua YL, Lee PX, Martínez Gómez JM, Ooi EE, Alonso S. Dengue vaccine-induced CD8+ T cell immunity confers protection in the context of enhancing, interfering maternal antibodies. *JCI Insight*. 2017;2(24):e94500.
317. Huang X, Karabudak A, Comber JD, Philip M, Morcol T, Philip R. A novel immunization approach for dengue infection based on conserved T cell epitopes formulated in calcium phosphate nanoparticles. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2017;13(11):2612-25.
318. Costa SM, Yorrio AP, Goncalves AJ, Vidale MM, Costa EC, Mohana-Borges R, et al. Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines. *PloS one*. 2011;6(10):e25685.
319. Simmons M, Sun P, Putnak R. Recombinant Dengue 2 Virus NS3 Helicase Protein Enhances Antibody and T-Cell Response of Purified Inactivated Vaccine. *PloS one*. 2016;11(4).
320. Mathew A, Townsley E, Ennis FA. Elucidating the role of T cells in protection against and pathogenesis of dengue virus infections. *Future microbiology*. 2014;9(3):411-25.
321. An J, Zhou DS, Zhang JL, Morida H, Wang JL, Yasui K. Dengue-specific CD8+ T cells have both protective and pathogenic roles in dengue virus infection. *Immunology letters*. 2004;95(2):167-74.

322. Zivna I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Stephens HA, Chandanayingyong D, et al. T cell responses to an HLA-B*07-restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity. *Journal of immunology*. 2002;168(11):5959-65.
323. Yauch LE, Shresta S. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral research*. 2008;80(2):87-93.
324. Marcos E, Lazo L, Gil L, Izquierdo A, Suzarte E, Valdés I, et al. Dengue encephalitis-associated immunopathology in the mouse model: Implications for vaccine developers and antigens inducer of cellular immune response. *Immunology letters*. 2016;176:51-6.
325. Sitati EM, Diamond MS. CD4+ T-cell responses are required for clearance of West Nile virus from the central nervous system. *Journal of virology*. 2006;80(24):12060-9.
326. Gonçalves AJS, Oliveira ERA, Costa SM, Paes MV, Silva JFA, Azevedo AS, et al. Cooperation between CD4+ T Cells and Humoral Immunity Is Critical for Protection against Dengue Using a DNA Vaccine Based on the NS1 Antigen. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(12):e0004277.
327. Yamanaka A, Kosugi S, Konishi E. Infection-enhancing and -neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels. *Journal of virology*. 2008;82(2):927-37.
328. Shresta S. Role of complement in dengue virus infection: protection or pathogenesis? *mBio*. 2012;3(1).
329. Viscia ML, Tagliamonte M, Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L. Effects of adjuvants on IgG subclasses elicited by virus-like Particles. *Journal of Translational Medicine*. 2012;10(4):1-8.
330. Wuorimaa T, Dagan R, Vakevainen M, Bailleux F, Haikala R, Yaich M, et al. Avidity and subclasses of IgG after immunization of infants with an 11-valent pneumococcal conjugate vaccine with or without aluminum adjuvant. *The Journal of infectious diseases*. 2001;184:1211-5.
331. Lefeber DJ, Aissa-Trouw B, Vliegenthart JF, Kamerling JP, Jansen WT, Kraaijeveld K, et al. Th1-directing adjuvants increase the immunogenicity of oligosaccharide-protein conjugate vaccines related to *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Infection and immunity*. 2003;71:6915-20.
332. Huber VC, McKeon RM, Brackin MN, Miller LA, Keating R, Brown SA, et al. Distinct Contributions of Vaccine-Induced Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a Antibodies to Protective Immunity against Influenza. *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY*. 2006;13(9):981-90.
333. Wilson JA, Hevey M, Bakken R, Guest S, Bray M, Schmaljohn AL, et al. Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus. *Science*. 2000;287:1664-6.
334. Konishi E, Terazawa A, Imoto J. Simultaneous immunization with DNA and protein vaccines against Japanese encephalitis or dengue synergistically increases their own abilities to induce neutralizing antibody in mice. *Vaccine*. 2003;21(17-18):1826-32.
335. Getahun A, Dahlstrom J, Wernersson S, Heyman B. IgG2a-Mediated Enhancement of Antibody and T Cell Responses and Its Relation to Inhibitory and Activating Fc Receptors. *Journal of immunology*. 2004;172:5269-76.
336. Morens DM, Halstead SB. Measurement of antibody-dependent infection enhancement of four dengue virus serotypes by monoclonal and polyclonal antibodies. *The Journal of general virology*. 1990;71 (Pt 12):2909-14.

337. Guy B, Chanthavanich P, Gimenez S, Sirivichayakul C, Sabchareon A, Begue S, et al. Evaluation by flow cytometry of antibody-dependent enhancement (ADE) of dengue infection by sera from Thai children immunized with a live-attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine*. 2004;22(27-28):3563-74.
338. Ito M, Mukai RZ, Takasaki T, Kotaki A, Kurane I. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in vitro by undiluted sera from monkeys infected with heterotypic dengue virus. *Archives of virology*. 2010;155(10):1617-24.
339. Moi ML, Lim CK, Tajima S, Kotaki A, Saijo M, Takasaki T, et al. Dengue virus isolation relying on antibody-dependent enhancement mechanism using FcγR-expressing BHK cells and a monoclonal antibody with infection-enhancing capacity. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011;52(3):225-30.
340. Li XQ, Chen J, Huang YF, Ding XX, Liu LD, Qiu LW, et al. Evaluation and analysis of dengue virus enhancing and neutralizing activities using simple high-throughput assays. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013;97(14):6503-11.
341. Huang JL, Huang JH, Shyu RH, Teng CW, Lin YL, Kuo MD, et al. High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. *Journal of medical virology*. 2001;65(3):553-60.
342. 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. *Journal of immunology*. 2006;176(5):2825-32.
343. Gil L, Marcos E, Izquierdo A, Lazo L, Valdés I, Ambala P. The protein DIIC-2, aggregated with a specific oligodeoxynucleotide and adjuvanted in alum, protects mice and monkeys against DENV-2. *Immunology and cell biology*. 2015;93(1):57-66.
344. Sanchez-Burgos G, Hernandez-Pando R, Campbell IL, Ramos-Castaneda J, Ramos C. Cytokine production in brain of mice experimentally infected with dengue virus. *Neuroreport*. 2004;15(1):37-42.
345. Lin YL, Liao CL, Chen LK, Yeh CT, Liu CI, Ma SH, et al. Study of Dengue virus infection in SCID mice engrafted with human K562 cells. *Journal of virology*. 1998;72(12):9729-37.
346. Ramos-Castaneda J, Imbert JL, Barron BL, Ramos C. A 65-kDa trypsin-sensible membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells. *Journal of neurovirology*. 1997;3(6):435-40.
347. An J, Kimura-Kuroda J, Hirabayashi Y, Yasui K. Development of a novel mouse model for dengue virus infection. *Virology*. 1999;263(1):70-7.
348. de Souza KP, Silva EG, Rocha ESO, Figueiredo LB, de Almeida-Leite CM, Arantes RME, et al. Nitric oxide synthase expression correlates with death in an experimental mouse model of dengue with CNS involvement. *Virology journal*. 2013;10:267.
349. Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2012;380(9853):1559-67.
350. Pang T. SAGE committee advice on dengue vaccine. *The Lancet infectious diseases*. 2016;16:880-2.
351. Hadinegoro SR, Arredondo-Garcia JL, Capeding MR, Deseda C, Chotpitayasunondh T, Dietze R, et al. Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease. *The New England journal of medicine*. 2015;373:1195-206.

352. Zellweger RM, Eddy WE, Tang WW, Miller R, Shresta S. CD8+ T cells prevent antigen induced antibody-dependent enhancement of dengue disease in mice. *Journal of immunology*. 2014;193:4117-24.
353. Weiskopf D, Bangs DJ, Sidney J, Kolla RV, De Silva AD, de Silva AM, et al. Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1+ cytotoxic CD4+ T cells associated with protective immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:E4256-63.
354. Chiang CY, Huang MH, Pan CH, Hsieh CH, Chen MY, Liu HH, et al. Induction of robust immunity by the emulsification of recombinant lipidated dengue-1 envelope protein domain III. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2013;15(10-11):719-28.
355. Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *Journal of virology*. 2004;78(6):2701-10.
356. Srikiatkachorn A, Mathew A, Rothman AL. Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. *Semin Immunopathol*. 2017;39:563-75.
357. Gagnon SJ, Ennis FA, Rothman AL. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *Journal of virology*. 1999;73(5):3623-9.
358. Friberg H, Burns L, Woda M, Kalayanarooj S, Endy TP, Stephens HA, et al. Memory CD8+ T cells from naturally acquired primary dengue virus infection are highly cross-reactive. *Immunology and cell biology*. 2011;89(1):122-9.
359. Kumar J, Kumar A, Gupta S, Jain D. Neurological picture. Dengue haemorrhagic fever: an unusual cause of intracranial haemorrhage. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2007;78(3):253.
360. Jugpal TS, Dixit R, Garg A, Gupta S, Jain V, Patel R, et al. Spectrum of findings on magnetic resonance imaging of the brain in patients with neurological manifestations of dengue fever. *Radiol Bras*. 2017 50(5):285-90.
361. Witayathawornwong P. Fatal dengue encephalitis. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2005;36(1):200-2.



ANEXOS

Anexo I.

Tabla I. Plásmidos empleados en la estrategia recombinante para la obtención de la proteína NS3 del VDEN 2.

Plásmido	Procedencia	Características principales	Tarea
pGEMT	Promega, EUA	Linearizado, con una base timina libre en los extremos 3', lo cual impide la recircularización del plásmido y facilita la inserción de los productos de PCR generados por algunas polimerasas.	Mantenimiento y propagación del gen ns3 del VDEN 2.
pQE30	Qiagen, Alemania	<ul style="list-style-type: none"> - Promotor de la T5 ARN polimerasa inducible por IPTG. - Dos secuencias operadoras <i>lac</i> que aumentan la unión del represor y aseguran una represión eficiente del promotor. - Secuencia nucleotídica que codifica para 6 aas histidina (6xHis) que se adicionan al extremo N-terminal de la proteína recombinante. 	Expresión de la proteína NS3 del VDEN 2 en las células XL1-Blue y M15[pREP4].
pET21d	Novagen, EUA	<ul style="list-style-type: none"> - Promotor de la T7 ARN polimerasa - Secuencia nucleotídica que codifica para la cola de 6xHis que se adiciona al extremo C-terminal de la proteína recombinante. 	Expresión de la proteína NS3 del VDEN 2 en las células BL21(DE3).

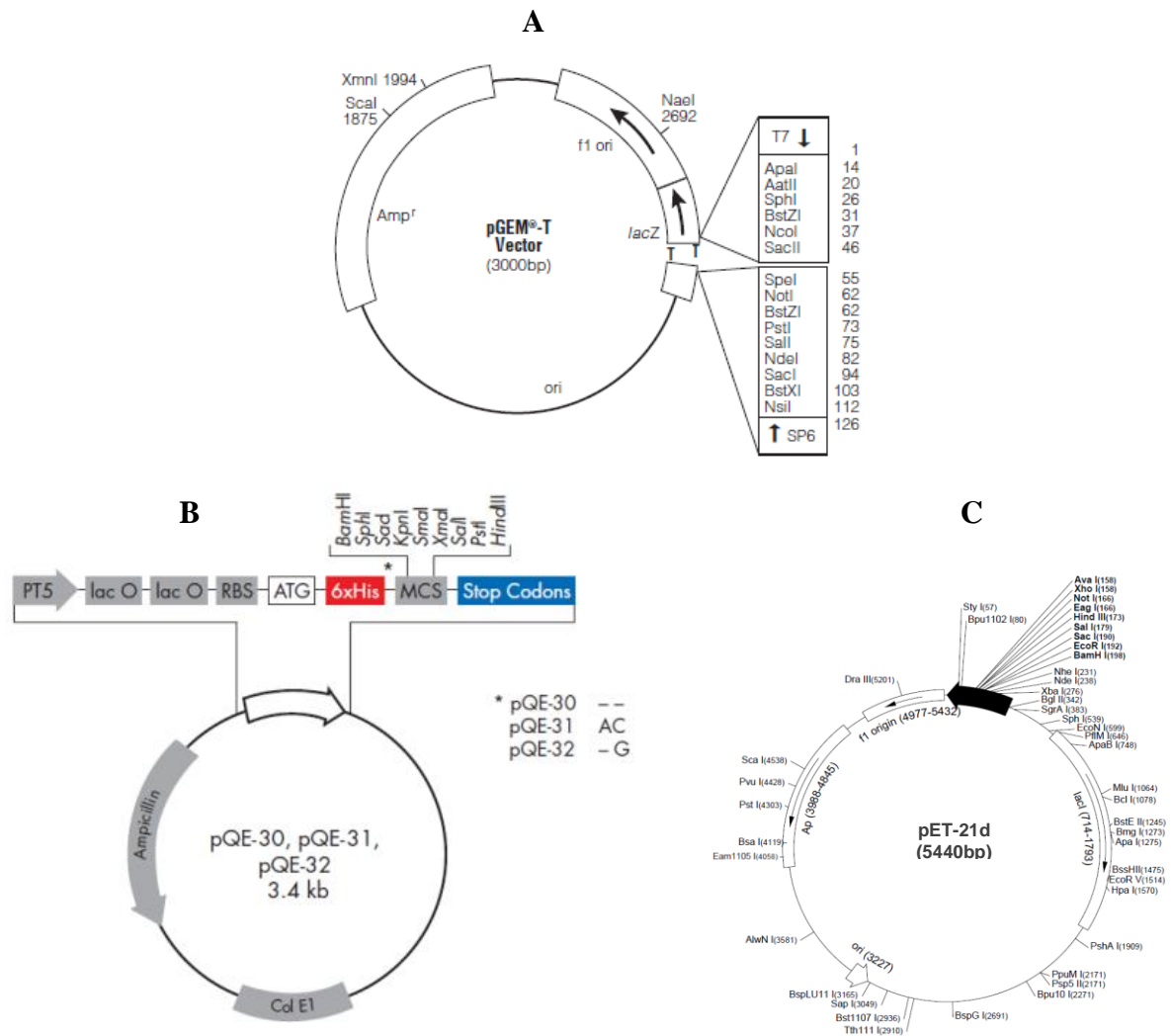


Figura I. Mapas genéticos de los plámidos empleados en las estrategias de clonación del gen ns3 del VDEN 2. (A) pGEMT, (B) pQE30 y (C) pET21d.