



**“ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD DE UN CONJUGADO
CONSTITUIDO POR EL DOMINIO E-DIII DEL VIRUS DEL DENGUE
2 Y EL BACTERIÓFAGO M13 EN RATONES BALB/c”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR
EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN LA ESPECIALIDAD
DE BIOTECNOLOGÍA PRODUCTIVA

PRESENTA

M. en C. Paola Guadalupe Delgado Guzmán

Guadalajara, Jal. Agosto 2018



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología área norte de la dirección de Biotecnología Médica y Farmacéutica del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C, bajo la dirección del Dr. Abel Gutiérrez Ortega. Este trabajo fue financiado por el proyecto fondo mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Nayarit (NAY-2008-C0292049)

El sustentante agradece la beca otorgada por el CONACYT No.52239

AGRADECIMIENTOS

Cuando se da por terminado un trabajo de tesis doctoral, se puede mirar atrás y ver un largo camino recorrido; mientras más tortuoso es este camino, más deudas vamos dejando. Sin duda alguna, el camino de una Bioquímica llevada a Biotecnóloga fue muy complejo, así que he dejado atrás deudas inmensas.

Mi mayor agradecimiento al Dr. Abel Gutiérrez, no solo por la oportunidad de realizar la tesis, sino por su dirección y apoyo incondicional en todos estos años. Gracias por guiarme y aconsejarme, mostrando siempre disposición y entusiasmo a la hora de emprender cosas nuevas.

Un agradecimiento especial a mi tutora y amiga la Dra. Ana Laura Márquez, por la calidad humana y los invaluable aportes a mi formación. Por las tantas veces que quedaron de lado cosas laborales, e incluso personales para poder darme una mano; por el compromiso y la voluntad. Mi mayor gratitud por la tolerancia y la comprensión. Gracias, porque no solo has sido tutora en mi doctorado si no amiga, aconsejando y brindando apoyo en lo personal, lo que demuestra una gran persona, con respeto y cariño hacia mi persona.

A todos mis compañeros de Biotecnología Médica de CIATEJ, por lo mucho que me enseñaron, y en especial a aquellos que me han brindado su amistad y su apoyo Incondicional.

Mi agradecimiento a la gente del CIATEJ en general, porque directa o indirectamente han aportado para que termine este trabajo. A los directivos, los investigadores, profesionales, técnicos y becarios.

A mis grandes amigos Oscar, Eneida, Gerson, Josue, Jorge, Diego e Iván, ustedes hicieron de mi vida gratos momentos de alegría, gracias por todos esos grandes momentos a su lado.

Mi agradecimiento especial a quien hoy es parte de mi vida, a quien me ha dado la oportunidad en algo tan importante como es el espíritu de crecer, de ser amado, de ser todo en esta vida, gracias a ti por estar siempre a mi lado.

A mi Familia, imposible de nombrarlos a todos porque soy parte de cada uno de ellos. Desde mis comienzos apoyándome, esforzándose para que pueda alcanzar mis logros. En especial a mis tíos (Norma, Victor, y Rosario).

Y por último pero no menos importante a mi madre, por estar siempre en los momentos importantes de mi vida, por ser el ejemplo para salir adelante, por tu gran amor, por los consejos que han sido de gran ayuda para mi vida y crecimiento. Esta tesis ha sido el resultado de lo que me has enseñado en la vida , ya que siempre has sido una persona trabajadora, honesta, dedicada a su trabajo, una gran persona que siempre ha salido adelante y triunfante. Es por ello que hoy te dedico este trabajo de tesis.

Gracias Mamá por estar al pendiente en toda esta etapa, te amo con todo mí ser.

A todos por hacer de esta tesis no solo un trabajo, sino una gran experiencia de vida.

MUCHAS GRACIAS

Índice general

Lista de figuras.....	8
Lista de tablas.....	8
Abreviaturas.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. ANTECEDENTES.....	16
2.1 Situación global epidemiológica del virus del dengue.....	16
2.2 Características del virus del dengue	17
2.2.1 Proteína E y el dominio III.....	19
2.2.2 Receptores y entrada a la célula diana.....	21
2.3 Papel de la respuesta inmune contra el dengue en la patogenia de la enfermedad.....	21
2.3.1 Amplificación dependiente de anticuerpos (ADA).....	22
2.4 Vacunas.....	24
2.4.1 Candidatos vacúnales vivos atenuados por vía convencional.....	24
2.4.2 Candidatos vacúnales vivos atenuados por vía recombinante.....	25
2.4.3 Candidatos vacúnales vivos recombinantes.....	26
2.4.4 Vacunas de ADN.....	27
2.4.5 Vacunas de subunidades recombinantes o subunitaria.....	28
2.5 Plataformas de presentación de antígenos.....	30
2.6 Bacteriófagos como acarreadores de péptidos.....	31
III. JUSTIFICACIÓN.....	32
IV. HIPOTESIS.....	33
V. OBJETIVOS.....	34
5. Objetivos.....	34

5.1	Objetivo general.....	34
5.2	Objetivos particulares.....	34
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
6.1	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	35
6.1.1	Tipo de estudio.....	35
6.1.2	Grupos de estudio.....	35
6.1.3	Calendario de inmunización.....	36
6.1.4	Tamaño de la muestra	37
6.1.5	Sede.....	37
6.1.6	Consideraciones éticas.....	37
6.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
6.3	Ratones BALB/c.....	38
6.4	Línea celular C6/36.....	38
6.5	Clonación de la secuencia de ADN del E-DIII en el vector de expresión basado en RNA polimerasa T7.....	38
6.6	Expresión recombinante de E-DIII y su detección por Western blot.....	40
6.7	Purificación de E-DIII recombinante a partir de la fracción insoluble.....	40
6.8	Ensayo de disponibilidad de grupos sulfhidrilos.....	41
6.9	Conjugación del E-DIII recombinante al bacteriófago M13.....	42
6.10	Esquema de inmunización de ratones con el conjugado E-DIII::M13	42
6.11	Título de IgG total E-DIII específica de los sueros de animales inmunizados.....	43
6.12	Reducción del efecto citopático mediado por sueros hiper-inmune en células C6/36.....	43
6.13	Análisis estadístico.....	43
VII.	RESULTADOS.....	44
7.1	Expresión, purificación y disponibilidad de grupos sulfhidrilo en la superficie de E-DIII recombinante.....	44

7.2	Conjugación química del E-DIII al bacteriófago M13.....	47
7.3	Títulos de anti-E-DIII IgG de sueros de ratones inmunizados.....	49
7.4	Títulos neutralizantes del virus del dengue 2 de sueros de ratones inmunizados.....	51
VIII.	DISCUSIÓN.....	52
IX.	CONCLUSIONES.....	57
X.	PERSPECTIVAS.....	58
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	59
XII.	ANEXOS	
	12.1 Presentación en congresos	
	12.2 Artículo original	

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. Número promedio anual de casos de (FHD/SCD) reportado por WHO y promedio anual de número de países reportados con dengue.....	15
2. Distribución potencial de <i>Aedes aegypti</i>	16
3. Genoma del virus de dengue.....	17
4. Ratones hembra de la cepa BALB/c.....	36
5. Diseño del E-DIII del DENV 2.....	43
6. Análisis de la expresión del E-DIII recombinante por SDS-PAGE 14% y tinción con azul de Coomassie.....	44
7. Análisis de la expresión y Purificación del E-DIII por ensayo tipo SDS-PAGE 14% y Western Blot.....	45
8. Disponibilidad para conjugación química de grupos amino (-SH) expuestos en la superficie del E-DIII DENV 2.....	46
9. Conjugación química del E-DIII al M13.....	47
10. Respuesta de IgG al conjugado E-DIII::M13 en ratones BALB/c.....	49

LISTA DE TABLAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. Proteínas del dengue y su función.....	18
2. Anticuerpos neutralizantes contra el virus del dengue de tipo 2.....	50

ABREVIATURAS

Δ30: Delección de 30 nucleótidos en el extremo 3' del genoma viral

Ac(s): Anticuerpo(s)

ADA: Amplificación dependiente de anticuerpos

C: Cápsida

CDC: Centro para el control de enfermedades de los Estados Unidos -del inglés- *Control Disease Center*

Chimerivax DEN: candidato vacunal que contiene los genes PrM/E de los cuatro serotipos del virus DEN sobre la vacuna viva atenuada de fiebre amarilla

C6/36: Línea celular de mosquito provenientes de *Aedes albopictus*

CPA: Células presentadoras de antígeno profesionales

CYD-TDV: Quimera vacunal del virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla

DC-SIGN: Molécula de adhesión intracelular específica de células dendríticas –del inglés- *dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*

DENV: Dengue

E: Envoltura

E-DI: Dominio I de la proteína de envoltura

E-DII: Dominio II de la proteína de envoltura

E-DIII: Dominio III de la proteína de envoltura

EJ: Encefalitis Japonesa

FA: Fiebre amarilla

FC: Factor citotóxico

FD: Fiebre del dengue

FHD: Fiebre hemorrágica por dengue

GRP78 o Bip es una molécula muy importante en la respuesta a estrés celular, sobre todo el relacionado con el retículo endoplásmico.

HS: Heparan sulfato

M: Membrana

MBP: Proteína de unión a maltosa de *Escherichia coli* -del inglés- *maltose binding*

Protein

M13: Bacteriofago filamentoso M13

NCR: Secuencias no codificadoras -del inglés- *non coding region*

NIH: Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos -del inglés- *Nacional Institute of Health*

NS: No estructural

NK: Células asesinas naturales

PBS: Tampón fosfato

PBS-T: Tampón fosfato conteniendo Tween 20 a 0,05%

PC6/36HT: Pases en la línea celular C6/36 HT que proveniente de mosquitos

PD10: Proteína recombinante que contiene al dominio III de la proteína E del virus dengue 1 fusionado a la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*

PD5: Proteína recombinante que contiene al dominio III de la proteína E del virus dengue 2 fusionado a la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*

PDK: Cultivo primario de células de riñón de perro beagle -del inglés- *primary dog kidney*

PGMK: Cultivo primario de células de riñón de mono verde africano -del inglés- *primary green monkey kidney*

PTVs: Partículas tipo virus

SCD: Síndrome de choque por dengue

Th: Respuesta de células T cooperadoras -del inglés- *T helper*

TrpE: Proteína del metabolismo del triptófano de *E. coli*

ufp: unidades formadoras de placas

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

VNO: Virus del nilo occidental

RESUMEN

El dengue es una enfermedad viral transmitida por vector (mosquitos del género *Aedes*). Dentro de la estructura del virus del dengue (DENV), el dominio III de la proteína de envoltura (E-DIII) se encuentra expuesto y es accesible en la superficie del virión y contiene el sitio de unión del virus al receptor celular. Este dominio presenta epítomos para anticuerpos neutralizantes específicos de tipo y subtipo. Los anticuerpos neutralizantes más potentes descritos contra el virus del dengue reconocen este dominio.

Son numerosos los reportes que hablan sobre el uso de plataformas antigénicas como acarreadores de epítomos, péptidos o antígenos completos al sistema inmune para el desarrollo de vacunas contra enfermedades infecciosas, mediante el uso de estrategias de fusión genética o conjugación química. En el presente estudio, se generó un conjugado que contiene monómeros E-DIII de DENV tipo 2 acoplado a partículas de bacteriófago M13. Para esto, al E-DIII se adiciono una secuencia corta que contiene cisteína en su extremo N-terminal para la conjugación química al bacteriófago M13, este se expresó en *E. coli* y purifico a partir de cuerpos de inclusión. El conjugado se administró varias veces por vía subcutánea a ratones BALB / c y se colecto el suero y se analizó en búsqueda de IgG anti-E-DIII mediante ELISA y actividad neutralizante de los anticuerpos en contra de la proteína del E-DIII mediante la observación de efecto citopatico en células de mosquito C6/36, observándose que en contraste con E-DIII solo, fueron inducidos altos títulos de IgG específica-E-DIII después de la administración del conjugado. Además, los sueros de ratones inmunizados con el conjugado fueron capaces de neutralizar una cepa de tipo 2 del virus del DENV in vitro. Estos hallazgos sugieren que el conjugado constituido por el E-DIII/M13 puede ser considerado como un componente para el diseño de vacunas futuras en contra del DENV.

Abstract

Dengue is a viral disease transmitted by vector (*Aedes* mosquitoes). Within the structure of the dengue virus (DENV), the domain III of the envelope protein (E-DIII) is exposed and is accessible to the virion surface and contains the binding site of the virus to the cellular receptor. This domain has epitopes for neutralizing antibodies specific type and subtype. The most potent neutralizing antibodies described against dengue virus recognize this domain.

There are numerous reports that talk about the use of platforms like carriers of antigenic epitopes, the immune peptides or full development of vaccines against infectious diseases by using strategies chemical conjugation or genetic fusion system antigens. In the present study, a conjugate containing monomers E-DIII dengue type 2 coupled to bacteriophage M13 particles generated virus. For this, an engineered E-DIII, added with a short sequence containing cysteine at its N-terminal end for chemical conjugation to M13 bacteriophage, was expressed in *E.coli* and purified from inclusion bodies. The conjugate is administered several times subcutaneously to BALB / c and the serum was collected and scrutinized for E-DIII IgG by ELISA and neutralizing activity of antibodies against the protein of E-DIII by observation of cytopathic effect in C6/36 mosquito cells, showing that in contrast to E-DIII alone, high titers of specific IgG-E-DIII after administration of the conjugate were induced. Furthermore, sera from mice immunized with the conjugate were capable of neutralizing a strain of dengue type 2 virus in vitro. These findings suggest that the conjugate formed by the E-DIII/M13 can be considered as a component for the design of future vaccine against DENV.

I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, existe la necesidad imperante de desarrollar vacunas cuya actividad se base en las respuestas mediadas por anticuerpos en contra de epítopes conservados presentes en patógenos altamente variables, tales como el VIH-1, virus de la hepatitis C, virus de la influenza y el virus del dengue (van Houten et al. 2010).

El virus del dengue es considerado como uno de los patógenos arbovirales emergentes más importantes que afectan a los seres humanos, el cual comprende cuatro serotipos y se transmite por los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Williams, Wahala, Orozco, de Silva, & Harris, 2012).

El dominio III de la proteína de envoltura del virus del dengue se encuentra expuesto y accesible en la superficie del virión (Rodenhuis-Zybert et al., 2010). En este dominio se encuentran tanto los epítopes neutralizantes, como el sitio de unión a los receptores celulares, lo que significa que la producción de anticuerpos producidos contra el dominio III pudiera bloquear la entrada del virus en la célula e iniciar el proceso de infección (Kuhn et al., 2002), (Crill & Roehrig, 2001). Es por ello que en los últimos años el dominio III se ha convertido en un candidato ideal para el desarrollo de vacunas de subunidades recombinantes. Incluso, recientemente se han evaluado algunos candidatos de vacunas basadas en el dominio III en ratones o primates no humanos (Bernardo et al., 2008), (Leng et al., 2009).

El desarrollo de subunidades recombinantes que contienen al dominio III puede proporcionar ventajas importantes respecto a otras alternativas. Por ejemplo, al eliminar la exposición al virus, las hace ser más seguras, además de que se puede manipular las dosis para obtener una respuesta inmune balanceada ante los cuatro serotipos del virus del dengue. Por otra parte, la ausencia de otras proteínas del virus del dengue, como la proteína de la membrana (M), o incluso de otros dominios de la proteína de la envoltura, como el dominio II, contribuirían a evitar el fenómeno conocido como amplificación dependiente de anticuerpos (ADA), un fenómeno que se ha relacionado con las manifestaciones más peligrosas del virus del dengue, tales como la fiebre hemorrágica del dengue y el síndrome de choque por dengue (Williams, Zompi, Beatty,

& Harris, 2009), (Rodenhuis-Zybert et al., 2010), (Ito, Mukai, Takasaki, Kotaki, & Kurane, 2010).

Sin embargo, el dominio III, como la inmensa mayoría de antígenos solubles, es poco inmunogénico, lo que significa que las vacunas basadas en este dominio deben ser formuladas junto con un adyuvante con el fin de inducir una respuesta inmune más robusta (Chiang et al., 2011).

Las vacunas conjugadas pueden llegar a mejorar la respuesta inmune a través de la conjugación química de un antígeno específico (por ejemplo, una proteína microbiana, péptido o polisacárido) a un acarreador proteico inmunogénico proporcionando así epítomos de células T y otros factores estimulantes que mejoran las respuestas de anticuerpos y el desarrollo de memoria inmunológica (van Houten et al. 2010).

Un reto fundamental para el desarrollo de vacunas es diseñar vacunas que induzcan respuestas inmunes protectoras sin comprometer la seguridad y la tolerabilidad. En varios casos, es importante centrar la respuesta inmune a epítomos de células B y epítomos de células T para lograr este objetivo. La inducción de una respuesta inmune eficaz requiere la captación y el procesamiento de antígenos por las células presentadoras de antígeno profesionales (CPA), y la activación de células B y T. El acoplamiento del antígeno puede conferir inmunogenicidad a péptidos cortos que no son inmunogénicos, por sí mismos.

La tecnología de presentación de péptidos en la superficie de fagos ha evolucionado rápidamente para convertirse en una poderosa técnica ampliamente utilizada; existen múltiples beneficios reportados sobre el uso de fagos filamentosos como soportes para péptidos y proteínas expuestas en la superficie del fago (Prisco & De Berardinis 2012). La regularidad de su superficie da al fago algunas ventajas, como vehículo ó como acarreador, incluyendo simplicidad inmunológica y miles de sitios bien definidos para la conjugación química (van Houten et al. 2010); Además de que los péptidos presentados en la superficie de fagos filamentosos son capaces de inducir ambos tipos de respuesta inmune (humoral y celular), lo que hace a las partículas del fago sean un sistema atractivo de entrega de antígenos para el diseño de nuevas vacunas (Prisco & De Berardinis 2012).

Recientemente, se ha sugerido que los fagos filamentosos proporcionan un excelente sistema modelo para el estudio de diversos aspectos de la respuesta de anticuerpos, todo con el objetivo de dirigir la producción de anticuerpos contra péptidos débilmente inmunogénicos (Henry, Murira, Houten, & Scott, 2011).

En el presente estudio, un conjugado inmunogenico conteniendo al dominio III del virus del dengue 2 acoplado a la superficie del bacteriófago filamentosos, M13, se generó y se administró por vía subcutánea en ratones. Encontrándose que los ratones inmunizados con el conjugado producen niveles altos de anti -DIII IgG y anticuerpos neutralizantes en comparación con los ratones inmunizados con solo el dominio III. Los resultados sugieren que este enfoque puede ser explorado como un componente futuro de una vacuna de subunidades recombinantes contra el virus del dengue.

II. ANTECEDENTES

2.1 Situación global epidemiológica del virus del dengue

Actualmente, el virus del dengue (DENV) se ubica como la enfermedad viral transmitida por mosquitos más importante del mundo. En los últimos 50 años, la incidencia se ha incrementado 30 veces. Se estima que unos 2,5 mil millones de personas viven en más de 100 países endémicos y áreas donde los virus del dengue pueden transmitir. Hasta 50 millones de infecciones se producen anualmente con 500 000 casos de dengue hemorrágico y 22.000 muertes, principalmente entre los niños. Antes de 1970, sólo 9 países habían experimentado casos de fiebre hemorrágica del dengue y síndrome de choque por dengue (FHD/SCD), y desde entonces el número ha aumentado a más de 4 veces y sigue aumentando tal como se observa en la Figura 1 (OMS 2014)



VI.

VII.

VIII.

Figura 1. Número promedio anual de casos de (FHD/SCD) reportado por OMS y promedio anual de número de países reportados con dengue.

Dos factores principales son directamente responsables de la emergencia y re emergencia de dengue y dengue hemorrágico: aumentos en la densidad y distribución geográfica del vector, y en la tasa y el rango geográfico de la transmisión del virus. El primer factor es ampliamente influenciado por los grandes cambios demográficos globales, en particular el crecimiento sin precedentes de la población mundial y la urbanización no planificada que resulta en la infravivienda y el suministro inadecuado de agua y sistemas de gestión de residuos. La situación epidemiológica se agrava por el deterioro de los sistemas de salud y de los programas de control de mosquitos en la mayoría países donde el dengue es endémico.

La región de América Latina es quizás el mejor ejemplo: una campaña de erradicación se inició a finales de la década de 1940 y la mayoría de los países se hizo libre del vector, sin embargo, durante los años 1960 y 1970 *Aedes aegypti* re infestó América central y América del sur. Hoy en día, sólo son unos pocos los países son libres del vector. La Figura 2 muestra la distribución actual y potencial de *Aedes aegypti* en el mundo (Guzmán & Kouri, 2002).

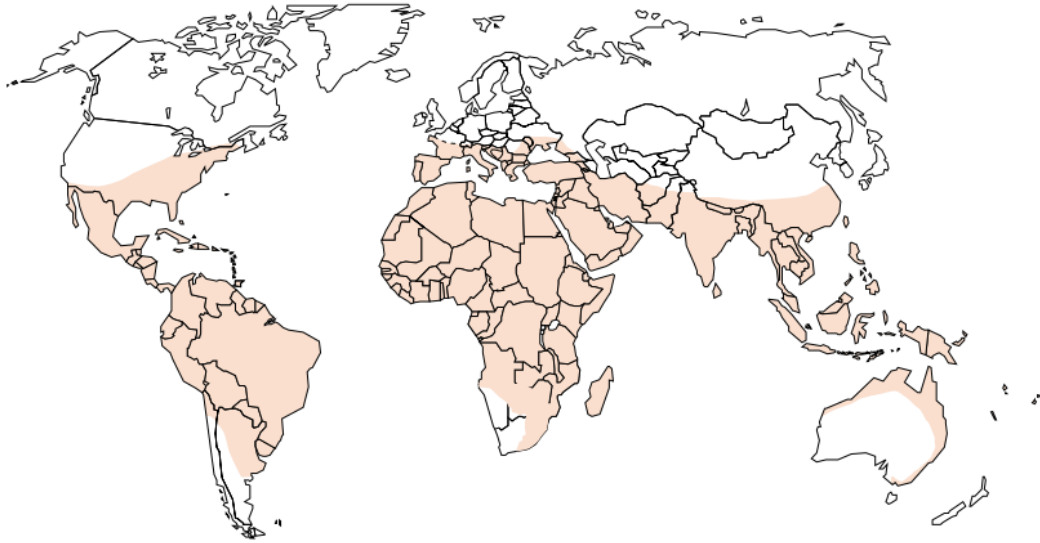


Figura 2. Distribuciónn potencial de *Aedes aegypti*, el sombreado rosa representa las áreas infestadas con *Aedes aegypti* OMS 2007.

Las áreas geográficas en donde la trasmisión del dengue ocurre se han expandido en los últimos años (figura 2) y los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1-4) están ahora circulando en Asia, África y América, observándose un escenario radicalmente diferente de la prevaecía de hace 20 o 30 años. La epidemiología molecular de estos serotipos se ha estudiado para tratar de entender sus relaciones evolutivas.(Rodriguez-Roche et al., 2005)

2.2 Características del virus del dengue

El virus del dengue (DENV) pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. este género agrupa a aproximadamente 70 miembros, entre los que se encuentran el virus de la Fiebre Amarilla (FA) -virus prototipo- y el virus de la Encefalitis Japonesa (EJ) (Gould & Solomon, 2008) . El DENV es transmitido al hombre a través de la picada de la hembra del mosquito *Aedes aegypti* (Gubler & Clark, 1994). Este virus persiste en la naturaleza mediante un ciclo de transmisión humano-mosquito-humano (McBride & Bielefeldt-Ohmann, 2000). Las partículas virales maduras son esféricas con un diámetro de 500 Å con una superficie relativamente lisa (Kuhn et al., 2002), presentan un diámetro entre 40 y 60 nm y contienen una nucleocápsida de 30 nm de diámetro rodeada por una bicapa lipídica de 10 nm de espesor. Esta bicapa proviene de la membrana de la célula hospedera y en ella están insertadas las proteínas de la

envoltura y de la membrana, que forman proyecciones de 7 nm de longitud en la superficie del virión (Kuhn et al., 2002).

El genoma viral consiste de una molécula de ARN de simple cadena positiva, de aproximadamente 11 kb de longitud y 4,2 kDa de peso molecular, que posee en el extremo 5' una caperuza m⁷G5'ppp5'A y no presenta cola poliadenilada en el extremo 3'. Contiene un solo marco de lectura que codifica para las tres proteínas estructurales: cápsida (C), envoltura (E) y membrana (M) (esta última se obtiene durante la maduración de la partícula viral a partir del precursor denominado prM), y para siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 Figura 3. En los extremos 5' y 3' están presentes secuencias no codificadoras (NCR, -del inglés- *non coding region*) que dirigen los procesos de amplificación, de traducción y de empaquetamiento del genoma viral y algunas funciones mencionadas en la tabla 1 (Guzman et al., 2010).

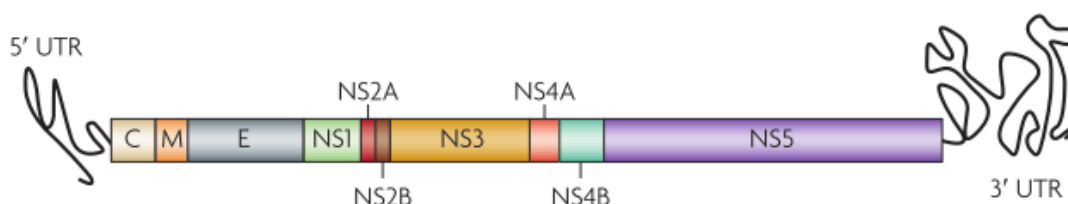


Figura 3. Genoma del virus de dengue. Un solo ORF que codifica a las tres proteínas estructurales (capside (C), membrana (M), envoltura (E)) y siete proteínas estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5).

Tabla 1 Proteínas del dengue y su función.

Proteína	PM(kDa)	Numero de aas	Función
Cápside	13-16	113	Proteína cápside
Pre-Membrana	19-23	166	Proteína chaperona para E, precursor de proteína M

	8-8-5	75	Componente viral de envoltura
Membrana			
	55-60	495	Receptor putativo celular , proteína de envoltura mayor
Envoltura			
NS1	44-49	350-410	Cofactor putativo de replicación de RNA
NS2A	16-21	150-210	Cofactor putativo de replicación de RNA, coordina el cambio entre el empaquetamiento del RNA y replicación del RNA
NS2B	12-15	130	Cofactor de serinproteasas
NS3	67-76	615	Cofactor putativo de replicación de RNA, proteasa viral, NTPasa y helicasa putativa
NS4A	24-32	150-280	Cofactor putativo de replicación de RNA
NS4B	10-11	110-250	No se sabe
NS5	91-98	900	RNA viral dependiente de la RNA polimerasa

(Kuhn et al., 2002)

2.2.1 Proteína E y el dominio III

La proteína de envoltura del virus del dengue es una proteína de fusión “clase 2” la cual inicia la adhesión del virus a los receptores celulares, mediando la fusión con los receptores celulares de membrana, hemaglutinando eritrocitos específicos, induciendo respuesta inmune celular e humoral, donde los anticuerpos dirigidos contra la proteína E son los primeros en ser detectados tras la infección por el virus del dengue y son los responsables de la respuesta inmunitaria de más larga duración (Roehrig, 2003).

La proteína E tiene un peso molecular de 53 a 54 kDa y se encuentra glicosilada en la mayoría de los virus de esta familia. Contiene aproximadamente 500 residuos aminoacídicos (Chambers y cols, 1990) y un dominio N-terminal anclado en la membrana. Presenta en su estructura 12 residuos aminoacídicos de cisteína que forman seis puentes disulfuros intermoleculares. La proteína E es el componente más abundante de la envoltura del virión y en ella residen las características biológicas más importantes del virus, como son la unión al receptor celular y los epítopes que definen el serotipo y el tropismo celular. De acuerdo a la estructura del virión maduro del DENV, definido por

técnicas de microscopia electrónica y reconstrucción de imágenes, esta tiene 180 copias, organizados en un arreglo de homodímeros paralelos que interactúan para formar el revestimiento externo con una simetría icosaédrica (Kuhn et al., 2002).

El dominio III de la proteína de la envoltura (E-DIII) abarca los residuos de aminoácidos 300-400, es altamente estable, se pliega de forma independiente y se encuentra expuesto y accesible en la superficie del virión, este se localiza en la región carboxi terminal de la proteína, con una estructura de barril β tipo inmunoglobulina, una de las hojas β es paralela al dominio I y entra en contacto con el cd loop del E-DII, mientras que la otra hoja β forma la superficie externa del dímero, esto significa que el E-DIII se proyecta ligeramente arriba y por debajo del E-DI y E-DII colocándose de un extremo a otro a lo largo de la membrana como una estructura rígida; una bisagra de 15 residuos y un puente disulfuro conecta al E-DI con el E-DIII contribuyendo esto que el dominio se considere como una estructura flexible y expuesta en la superficie comparado con el resto de la proteína E, puntos característicos en una molécula cuyo papel es la de unión putativo celular (Crill & Roehrig, 2001). Múltiples epítopes de tipo neutralizante se han mapeado en el E-DIII (Hughes, Crill, & Chang, 2012). Esto implica que los anticuerpos producidos contra el E-DIII pueden bloquear la entrada del virus en la célula (Bernardo et al., 2008). Elegir sólo el E-DIII como un antígeno modelo, en lugar de la proteína E completa, tiene la ventaja de reducir la probabilidad de que se presente el fenómeno de potenciación de la infección dependiente de anticuerpo (ADE) por la ausencia de otros epítopes que despiertan una respuesta de anticuerpos no neutralizante (Durbin & Whitehead, 2011).

2.2.2 Receptores y entrada a la célula diana

El primer paso en la infección por dengue requiere la interacción entre la partícula viral y el complejo receptor presente en la superficie de la célula huésped. La glicoproteína E es la proteína viral más expuesta e interacciona con el complejo receptor a través de su dominio III localizado hacia el extremo carboxiterminal de la proteína (Crill & Roehrig, 2001). Respecto al receptor celular, diversos grupos han dirigido sus esfuerzos para su identificación y han descrito moléculas como el glicosaminoglicano heparán sulfato (HS),

al cual se une el virus a través de la interacción con la proteína E (Chen et al., 1997) . Dado que el HS está presente en una gran diversidad de células, su interacción con el virus permite la adsorción viral a la superficie de distintos tipos celulares. Por otro lado, se han identificado al receptor de alta afinidad de laminina de 37/67 kDa y a la proteína GRP78 como moléculas receptoras para dengue 1 y 2, respectivamente, en células hepáticas Hep G2 (Thepparit & Smith, 2004) .GRP78 o Bip es una molécula muy importante en la respuesta a estrés celular, sobre todo el relacionado con el retículo endoplásmico.

2.3 Papel de la respuesta inmune contra el dengue en la patogenia de la enfermedad

La respuesta inmune contra el virus DENV está implicada, además, en la patogenia de la FHD/SCD. En este sentido, existen varias hipótesis que tratan de explicar la participación de los diferentes elementos de la respuesta inmune en el incremento de la carga viral en sangre, descrito en los pacientes que desarrollan las formas severas de la enfermedad (Libraty et al., 2002) (Wang et al., 2003).

La respuesta inmunológica a la infección por el virus del dengue tiene un patrón diferente al común de los producidos por otros virus, dada su variabilidad genotípica la respuesta inmune en el dengue, en lugar de desarrollar una efectiva protección para infecciones futuras puede ser contraproducente para el huésped (Lei et al., 2001). Los mecanismos que permiten la recuperación de un individuo con infección por virus dengue o el consecuente desarrollo de fiebre hemorrágica por dengue/ síndrome de choque por dengue, no se conocen con precisión; sin embargo, la patogénesis del dengue puede estar relacionada con algunos factores siendo el más importante el de tener una segunda infección por un serotipo diferente al que causó la infección primaria en el mismo individuo; igualmente, tener menos de 15 años de edad, ser de raza blanca, así como también, la virulencia del virus, el estado nutricional, genético e inmunológico del hospedero, y la presencia de otras infecciones recurrentes y concomitantes como el asma, diabetes o anemia por células falciformes (McBride & Bielefeldt-Ohmann, 2000).

2.3.1 Amplificación dependiente de anticuerpos (ADA)

Durante la infección primaria, el virus ingresa a la célula diana a través de su unión con un receptor celular produciendo anticuerpos neutralizantes capaces de proteger por largo

tiempo contra la reinfección con ese mismo serotipo. Estos anticuerpos pueden neutralizar a otros serotipos sólo durante dos a tres meses; sin embargo, en una infección secundaria con un serotipo diferente, se forman complejos virus-anticuerpos que ingresan a las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos) a través de la unión del fragmento constante de la inmunoglobulina con los receptores celulares del tipo gamma. Como resultado de este fenómeno se infectan un mayor número de células y por tanto hay una mayor diseminación viral, conocido como amplificación dependiente de anticuerpos (ADA). Observando este fenómeno por primera vez Halstead. Donde a través de estudios seroepidemiológicos realizados en Tailandia mostro qué las infecciones secundarias por un serotipo diferente al que causó la infección primaria presentan un riesgo mayor de desarrollar la FHD. La enfermedad severa ocurrió en niños de 2-8 años de edad, que desarrollaron una infección secundaria, y en niños de 7-8 meses de edad nacidos de madres inmunes al virus del DENV, en los que los anticuerpos maternos estaban ya en concentraciones subneutralizantes (Halstead, 2007). Estas evidencias condujeron a la hipótesis de la amplificación dependiente de anticuerpos (ADA) que postula que durante las infecciones secundarias, los anticuerpos desarrollados durante la infección primaria pueden reconocer de manera heterotípica al segundo serotipo infectante y formar complejos inmunes que faciliten la entrada del virus a las células susceptibles a través de los receptores celulares para Fc presentes en las células B, en las células dendríticas y en los monocitos-macrófagos, dianas de la infección por el virus DENV. El incremento de la replicación viral durante las infecciones secundarias heterotípicas desencadena procesos donde participa activamente el sistema monocito-macrófago, que concluyen en el aumento de la permeabilidad vascular responsable de los síntomas severos de la enfermedad (Halstead, 2013).

El estudio de los eventos que ocurren después de la infección del virus a las células facilitada por los anticuerpos, mostró que esta vía de infección modifica además los mecanismos antivirales intracelulares de la inmunidad innata y adaptativa (Chareonsirisuthigul, Kalayanarooj, & Ubol, 2007). La infección mediada por los anticuerpos (ADA), suprime la producción de IL-12 e INF- γ , lo que conduce a una respuesta de células T cooperadoras tipo 2 (Th2 -del inglés- *T helper 2*), descrita en los pacientes con FHD (Chaturvedi, 2006). Hasta los años recientes el fenómeno de la ADA se había asociado exclusivamente a los anticuerpos inducidos por la proteína E. Sin

embargo, recientemente se demostró que los anticuerpos contra la proteína prM pueden mediar la ADA e incluso se evidenció una vía de amplificación independiente de los receptores para Fc, mediada por la unión específica dual de los anticuerpos anti-prM a antígenos propios (como la proteína de choque térmico 60) y a la superficie del virión (Huang et al., 2003). Además se demostró también la participación de las células dendríticas maduras en la ADA, en las que la amplificación correlacionó directamente con los niveles de expresión de los receptores para Fc e inversamente con la expresión de DC-SIGN (del inglés- *dendritic cell specific intercelular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*) (Boonnak et al., 2008). También se postula que la ADA puede ser inhibida por la acción del factor C1q del complemento de manera dependiente de las subclases de inmunoglobulinas. Particularmente aquellas subclases que se unen con mayor avidez al factor C1q inducen bajos niveles de ADA (Mehlhop et al., 2007).

Pero no solo tan solo es la respuesta de anticuerpos en la patogenia de la enfermedad, existen también otras teorías como, la respuesta inmune celular específica frente al virus dengue que se inicia con la activación de LT CD4+ durante la viremia y posteriormente con la activación de LT CD8+. En individuos con FHD por infecciones secundarias, se ha demostrado la presencia de LT CD4+/CD8+ de memoria y LT CD4+/CD8+ citotóxicos (Berrios, Kurane, & Ennis, 1996)(Zivny et al., 1999), por lo que la activación de los linfocitos T y también la producción de citocinas son factores importantes en la patogenia del FHD. Además de la respuesta inmune celular en los casos de FHD se exagera la activación y liberación de citocinas, lo que se relaciona con la mayor gravedad del cuadro clínico. También en el FHD se ha demostrado la activación del sistema del complemento, pudiéndose detectar en los casos graves concentraciones elevadas de las proteínas C3 y C1q, planteándose como una explicación, que los complejos virus-anticuerpos circulantes serían los que activan la reacción en cascada del complemento (Rothman, 2011).

También se ha encontrado que células asesinas naturales (NK, natural killer) presentes en poblaciones de células mononucleares de sangre periférica de individuos infectados con virus dengue, lisan mayor número de células infectadas que células no infectadas (Seema & Jain, 2005)(Mathew & Rothman, 2008). En infecciones secundarias, la presencia de anticuerpos antidengue aumenta la lisis celular por células NK a través del

mecanismo conocido como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Lei et al., 2001).

2.4 Vacunas

En la actualidad no existe una vacuna disponible contra los virus del DEN. La obtención de una formulación vacunal está limitada por la existencia de cuatro serotipos, el fenómeno de la ADA, la ausencia de un modelo animal que reproduzca adecuadamente la enfermedad, y el poco conocimiento que se tiene de la etiopatogenia de la misma. Los principales retos para el desarrollo de una vacuna son: (1) inducir inmunidad protectora de larga duración contra los cuatro serotipos del virus y (2) no sensibilizar al individuo frente a una infección secundaria por un virus heterólogo (Hombach, Cardosa, Sabchareon, Vaughn, & Barrett, 2007), (Durbin & Whitehead, 2011).

2.4.1 Candidatos vacunales vivos atenuados por vía convencional

Los candidatos vacunales vivos atenuados pueden mimetizar la infección natural por el virus a través de la inducción de una respuesta humoral y celular durable. La replicación de estos candidatos debe ser baja para evitar el desarrollo de la enfermedad, donde los síntomas tales como cefalea, fiebre y artralgia no son aceptados. Asimismo, los cuatro componentes de la formulación deben replicarse lo suficiente como para inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes balanceada contra los cuatro serotipos. Por tanto, estas estrategias tienen el reto de lograr un balance entre inmunogenicidad y reactogenicidad. Es importante, además, que se conozcan las bases genéticas de la atenuación de los virus para monitorear la estabilidad genética de estos durante las fases de evaluación y desarrollo (Whitehead, Blaney, Durbin, & Murphy, 2007).

Hasta el momento existen solo unos cuantos candidatos vivos atenuados obtenidos por la vía convencional mediante pases seriados en cultivos celulares de los cuales mencionaremos algunos, que se formularon como vacunas tetravalentes y se evaluaron en estudios de fase clínica. El primero de ellos lo desarrollan científicos de la Universidad de Mahidol, Tailandia, e incluye cepas de los serotipos 1, 2 y 4 atenuadas en cultivos primarios de células de riñón de perro beagle (PDK, -del inglés- *primary dog kidney*);

mientras que la del virus DEN 3 se obtuvo en cultivo primario de células de riñón de mono verde africano (PGMK –del inglés- *primary green monkey kidney*). Estos candidatos se evaluaron en voluntarios tailandeses como formulaciones mono, bi, tri y tetravalentes, en los que los anticuerpos neutralizantes se detectaron hasta dos años después de la vacunación (Bhamarapavati & Sutee, 2000). A partir de estos estudios y de la reformulación del virus DEN 3, que interfería con el resto de los componentes, se escogió una variante tetravalente para ser estudiada en 105 niños tailandeses no inmunes a DEN en un esquema de tres dosis. Después de la primera dosis la reactogenicidad fue moderada, sin embargo, el 5% de los niños tuvieron reacciones sistémicas considerables. Una vez administrada la tercera dosis del esquema se obtuvo una seroconversión tetravalente entre el 85% y el 100% dependiendo de la formulación (Sabchareon et al., 2004) . No obstante, el virus DEN 3 estaba aún poco atenuado por lo que después de un intento de atenuación mediante purificación por placas se realizó una nueva evaluación para este serotipo en individuos adultos no inmunes a DENV, que reveló una reactogenicidad elevada (Sanchez et al., 2006). Por esta causa se cerraron los estudios con este candidato vacunal. Recientemente se corroboró que los clones infecciosos de la cepa atenuada de DEN 2 (PDK 53) inducen anticuerpos neutralizantes y la expresión de los genes de las citocinas *in vitro* (Rabablert & Yoksan, 2009) .

Estas estrategias atenuadas presentan también la limitante de que no se conocen aún las mutaciones que determinan la atenuación de las cepas (Whitehead et al., 2007).

2.4.2 Candidatos vacúnales vivos atenuados por vía recombinante

Este tipo de candidatos vacúnales atenuado obtenidos por vía molecular o recombinante se desarrollan siguiendo dos estrategias principales: (1) la atenuación mediante la introducción de mutaciones seleccionadas y (2) la inserción de los genes estructurales (prM/E) en el esqueleto de una cepa de DEN atenuada por vía convencional (Murrell, Wu, & Butler, 2011). Las estrategias de atenuación molecular de las cepas de DENV están limitadas por la poca información que se tiene sobre las bases moleculares y sobre los determinantes de virulencia que pueden ser dianas de la atenuación. Por tanto, las atenuaciones moleculares se dirigen principalmente hacia los extremos no codificadores que se postula están implicados en la replicación viral. Con este enfoque, los investigadores del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH –del inglés- *National Institute of Health*) desarrollaron candidatos atenuados de los serotipos 1 y 4

mediante la introducción de una delección de 30 nucleótidos en el extremo 3' del genoma (3' 172-143) (DEN 1 Δ 30 y DEN 4 Δ 30) (Whitehead et al., 2003) .Ambos candidatos (DEN 1 Δ 30 y DEN 4 Δ 30) resultaron seguros e indujeron un balance entre el nivel de atenuación y la inmunogenicidad en monos y humanos (McArthur et al., 2008). Sin embargo, debido a que los candidatos similares de DEN 2 y DEN 3 (DEN 2 Δ 30 y DEN 3 Δ 30) no mostraron tal balance entre inmunogenicidad y atenuación, decidieron realizar virus quiméricos para estos serotipos incluyendo los genes prM/E de los serotipos 1 y 3 sobre el esqueleto atenuado de la cepa DEN 4 Δ 30 (DEN 2/4 Δ 30 y DEN 3/4 Δ 30), los que resultaron altamente atenuados en monos (Whitehead et al., 2003), (Blaney et al., 2004) . Los candidatos DEN 2/4 Δ 30 y DEN 3/4 Δ 30 se combinaron con DEN 1 Δ 30 y DEN 4 Δ 30 en una formulación tetravalente que resultó altamente inmunogénica y protectora en monos (Blaney, Matro, Murphy, & Whitehead, 2005) .

Actualmente el prototipo vacunal que se encuentra en desarrollo más avanzado utilizando esta estrategia pertenece a los investigadores del instituto *Sanofi pasteur* desarrollaron candidato tetravalente vivo atenuado recombinante basada en la vacuna del virus de la fiebre amarilla (CYD-TDV) 17D, evaluados 132 casos de niños de 4 a 11 años de edad no inmunes a DENV en un esquema de tres dosis, inducen una respuesta de anticuerpos neutralizantes balanceada, pero hablando sobre la eficacia curiosamente no protege en contra del DENV 2.

2.4.3 Candidatos vacúnales vivos recombinantes

En este tipo de estrategia vacunal genes estructurales del DENV se insertaron por vía recombinante en diferentes vectores vivos. La vacuna quimérica que se encuentra más avanzada hasta el momento es la que sustituye los genes PrM/E de los cuatro serotipos del DENV sobre la vacuna viva atenuada de FA (Chimerivax DEN), que se desarrolla por la compañía *Acambis* y se licencia por *Sanofi Pasteur*. La evaluación de la formulación tetravalente Chimerivax DEN 1-4 en monos indujo anticuerpos neutralizantes, sin embargo, los animales desarrollaron viremias (generalmente causada por el serotipo 4) superiores a las observadas para otros candidatos vacúnales (Guirakhoo et al., 2002).

Recientemente hace unos años este mismo prototipo se analizó la interferencia de los cuatro componentes de esta formulación tetravalente en monos, donde se corroboró que los serotipos 1 y 4 eran dominantes en la inducción de anticuerpos neutralizantes y se identificaron los parámetros que afectan la interferencia en este modelo. La evaluación en humanos de la formulación monovalente Chimerivax DEN 2 mostró seguridad e inmunogenicidad (Guirakhoo et al., 2004), y de acuerdo a los datos preliminares, la formulación tetravalente también resultó segura en humanos. No obstante, ésta mostró el inconveniente de que debe ser administrada en dosis superiores a 10 ufp. También se demostró ya la seguridad de la respuesta inmune celular inducida por la formulación tetravalente Chimerivax DEN 1-4, tanto en individuos *naive* como inmunes a flavivirus (Guy et al., 2008).

La vacuna viva atenuada contra el sarampión, que es segura para humanos y que induce inmunidad de por vida después de una sola inmunización, se empleó como vector para la expresión de antígenos del DENV con fines vacúnales. En este caso se expresó el dominio E-DIII del DENV junto al ectodominio de la proteína M. Los ratones inmunizados con esta formulación mostraron anticuerpos neutralizantes de larga duración, específicos contra el virus DEN 1 (Brandler et al., 2007). Sin embargo, aún se deben desarrollar los candidatos para el resto de los serotipos así como también queda por demostrar su capacidad protectora.

2.4.4 Vacunas de ADN

Esta estrategia consiste en la inmunización con plásmidos de ADN purificados posibilita el procesamiento del ADN por las células y permite la expresión de los antígenos virales codificados por el plásmido. La expresión de las proteínas virales *in situ* facilita su conformación correcta ya que sufren las mismas modificaciones post-traduccionales a las que son sometidas durante el curso de una infección natural. Sin embargo, las vacunas de ADN tienen la desventaja de inducir títulos moderados de anticuerpos neutralizantes, estos desarrollaron un candidato vacunal de ADN que contiene los genes prM y E del virus DEN 1, cuya inmunogenicidad y capacidad protectora después del reto viral en monos se incrementó mediante la co-inmunización con genes que codifican para citoquinas y para proteínas inmuno estimuladoras humanas (Raviprakash et al., 2006).

Existen también otros reportes como candidato vacunal de ADN basado en las proteínas prM y E del virus DEN, observándose inducción de anticuerpos neutralizantes en ratones cuando se evaluó como formulación monovalente. La formulación tetravalente también indujo anticuerpos neutralizantes contra los cuatro serotipos en este mismo modelo (Konishi & Fujii, 2002). El E-DIII del virus DENV también se emplea en el desarrollo de vacunas de ADN. Sin embargo, los animales inmunizados con las formulaciones mono o tetravalente desarrollaron títulos de anticuerpos neutralizantes bajos para los cuatro serotipos (1/10) y resultaron sólo parcialmente protegidos frente al reto viral (Mota et al., 2005)

Hoy en día, los esfuerzos se han enfocado en el desarrollo de vacunas de baja capacidad de replicación o también llamadas de *nueva generación*, cuyo objetivo principal son aspectos de seguridad, como limitar el riesgo latente de reversión a un fenotipo virulento *in vivo* que puede causar enfermedad (M F Bachmann, Zinkernagel, & Oxenius, 1998). Las principales modalidades de estas vacunas son las vacunas vivas atenuadas, los antígenos purificados y los vectores de capacidad replicativa limitada (virus recombinantes, replicones y secuencias de ADN), basadas principalmente en la inactivación de la virulencia por medios físicos o químicos, o en la producción de proteínas recombinantes de subunidades de patógenos, incluso usando sistemas vectores de expresión (Griffin, 2002; Plotkin, 2005). Esto en conjunto ha llevado al desarrollo de las llamadas vacunas subunitarias.

Siendo los enfoques más acertados cuando se trata de patógenos altamente variables, como es el caso del DENV, a continuación se muestran algunas de estos candidatos vacunales que han tenido como antígeno modelo a la proteína de envoltura o a uno de sus dominios (E-DIII) desde sus inicios hasta el día de hoy.

2.4.5 Vacunas de subunidades recombinantes o subunitarias

Son varias las principales ventajas que esta estrategia vacunal ofrecen dos ventajas fundamentales sobre las vacunas vivas atenuadas o recombinantes: (1) son seguras debido a su naturaleza no replicativa y (2) pueden inducir una respuesta de anticuerpos

balanceada ya que una preparación tetravalente puede ser equitativamente inmunogénica. Entre sus desventajas están: (1) que necesitan de adyuvantes para inducir una respuesta inmune óptima lo que puede incrementar la reactogenicidad, y (2) se requieren múltiples dosis para lograr una inmunidad de larga duración (Durbin & Whitehead, 2011).

Las proteínas del DENV (generalmente la proteína E), expresadas en diferentes sistemas, son evaluadas como candidatos vacunales de subunidad. Uno de los candidatos más avanzados se desarrolla por la compañía americana *Hawaii Biotech* e incluye al fragmento soluble de la proteína E (80% E) junto a la proteína NS1 expresadas en *Drosophila S2*. Dicho candidato indujo títulos de anticuerpos neutralizantes elevados en monos después de tres dosis y protección frente al reto para algunas de las formulaciones ensayadas. Actualmente este candidato está programado para estudios de fase clínica (Hombach et al., 2007). La evaluación del fragmento soluble de la proteína E solo (80%) también indujo una protección significativa en monos *rhesus* cuando se administró en dosis de 20 µg formulado en sales de alúmina (Robert Putnak et al., 2005). Debido a que el dominio III de la proteína E se identificó como una región prometedora para inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes específica de serotipo, diversas estrategias de subunidades recombinantes también están basadas en esta región. Inicialmente el dominio III de la proteína E del virus del DEN se expresó en *E. coli* fusionado a la TrpE (proteína del metabolismo del triptófano de *E. coli*). Las construcciones dominio III-TrpE de los cuatro serotipos reaccionaron con los líquidos ascíticos hiperinmunes contra el serotipo homólogo; sin embargo, tras la inmunización en ratones, no indujeron anticuerpos neutralizantes y tampoco confirieron protección frente al reto viral (Fonseca, Khoshnood, Shope, & Mason, 1991).

Y justo unos años más tarde, fusionaron al dominio III de la proteína E y la proteína NS1 del virus DEN 2 a la proteína A de *Stafilococcus aureus* y lo expresaron en *E. coli*. Esta construcción genética reaccionó con los anticuerpos policlonales y monoclonales contra el serotipo homólogo y los ratones inmunizados con ella desarrollaron anticuerpos neutralizantes y resultaron protegidos frente al reto con el virus salvaje. No obstante, la alta afinidad de la proteína A por la IgG humana limitó el posible uso de esta proteína de fusión como candidato vacunal (Srivastava, Putnak, Warren, & Hoke, 1995). Posteriormente, el E-DIII del virus DENV 2 se expresó en *E. coli* fusionado a la proteína de unión a maltosa de *E. coli* (MBP, -del inglés- *maltose binding protein*). La evaluación

inmunológica en ratones de la proteína recombinante dominio III-MBP desarrolló anticuerpos neutralizantes y protección parcial frente al contra los cuatro serotipos del DENV el virus homólogo (M Simmons, Murphy, Kochel, Raviprakash, & Hayes, 2001). Un estudio años más tarde reciente incluye la evaluación de la formulación dominio III DEN 2-MBP en monos. Sin embargo, a pesar de que los animales inmunizados mostraron títulos de anticuerpos neutralizantes altos, la viremia desarrollada después del reto con el virus salvaje fue muy elevada (Monika Simmons, Burgess, Lynch, & Putnak, 2010a).

En este contexto las iniciativas de vacunas recombinantes buscan el utilizar acarreadores con la capacidad de autoensamblaje en partículas tipo virus (PTVs), situándolas con gran éxito para el desarrollo de candidatos vacúnales, un ejemplo de este tipo de estrategia es una PTV quimérica que contiene al E-DIII de virus del dengue 2 insertado en el loop c/e1 de proteína de la cápside de la hepatitis B expresada en *P. pastoris*, obteniendo moderados niveles de anticuerpos neutralizantes contra el virus del dengue de tipo 2, dejando la explicación que este prototipo de despliegue de antígenos de dengue utilizando al virus de la hepatitis como plataforma, necesitara la optimización del sistema para ser considerado como adecuado (Arora, Tyagi, Swaminathan, & Khanna, 2013).

2.5 Plataformas de presentación de antígenos

Actualmente existe un gran interés en las plataformas de presentación de antígenos, donde los virus y partículas tipo virus han tomado gran importancia debido a que es posible realizar el despliegue de antígenos en su forma nativa en la superficie viral, en un contexto altamente repetitivo y ordenado, lo cual es crucial para estimular correctamente al sistema inmune, Tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa evolucionaron para reconocer tales estructuras altamente repetitivas (M F Bachmann & Zinkernagel, 1997a). Por esta propiedad, los virus pueden ser considerados como patrones geométricos asociados a patógenos, similares a los patrones moleculares asociados a patógenos reconocidos por la respuesta inmune innata a través de los receptores tipo Toll (Martin F Bachmann & Jennings, 2010). Varios trabajos han demostrado que partículas como los virus son ingresadas, procesadas y presentadas de forma eficiente por las células presentadoras de antígeno (Storni & Bachmann, 2004), (Di Bonito et al., 2009) y además pueden interactuar directamente con los linfocitos B e inducir el entrecruzamiento de sus receptores, potenciando de esta forma la respuesta humoral (Jegerlehner et al., 2002).

Estas propiedades hacen que las partículas virales sean potentes inmunógenos, por lo que han sido utilizadas en el desarrollo de vacunas recombinantes subunitarias, ya sea como el componente inmunizante, o bien, como adyuvantes que potenciarán la respuesta contra el componente inmunizante (Jennings & Bachmann, 2008). El empleo de estas plataformas de presentación de antígenos como adyuvantes en vacunas subunitarias se puede llevar a cabo de dos maneras: mediante fusiones traduccionales o conjugación química. La primera consiste en insertar secuencias codificantes de la proteína contra la que se desea generar inmunidad dentro del marco de lectura abierto del gen que codifica para la proteína de la cápside o de envoltura viral, procurando que la partícula viral generada exponga la secuencia de interés en la superficie. La segunda se basa en la conjugación química del antígeno a la partícula viral, a través de un entrecruzador que forma enlaces covalentes con los grupos reactivos de las cadenas laterales de algunos aminoácidos como lisinas y cisteínas permitiendo desplegar antígenos de gran tamaño. (Jegerlehner *et al.*, 2002).

2.6 Bacteriófagos como acarreadores de péptidos

Son múltiples los reportes que hablan sobre el uso de bacteriófagos filamentosos como acarreadores de inmunógenos, para elevar el nivel de anticuerpos contra los péptidos y proteínas presentados en su superficie (Prisco & De Berardinis 2012). La tecnología de presentación de péptidos en la superficie de fagos ha evolucionado rápidamente para convertirse en una poderosa técnica ampliamente utilizada. Son múltiples los beneficios de utilizar fagos filamentosos como acarreadores de péptidos. La regularidad de su superficie da a los fagos otras ventajas como vehículo, incluyendo simplicidad inmunológica y miles de sitios bien definidos para la conjugación química (van Houten *et al.* 2010); asimismo, los péptidos presentados en la superficie de bacteriófagos filamentosos son capaces de inducir respuesta humoral y celular. Estas características hacen que las partículas de fagos se consideren como sistemas atractivos de entrega de antígenos (Henry *et al.*, 2011). Este estudio tiene como objetivo investigar la inmunogenicidad de un conjugado denominado DIII-D2::M13, que está constituido por la proteína E-III recombinante expresada en *E. coli* y el bacteriófago M13, en ratones a través de la producción de IgG.

III. JUSTIFICACIÓN

La eficacia de un prototipo vacunal contra el virus del dengue depende de la intensidad del estímulo que permita obtener un alto nivel de anticuerpos neutralizantes, consiguiendo proteger durante largos períodos de tiempo a las personas vacunadas y no represente un riesgo para la salud. Se ha identificado al E-DIII del DENV como una región prometedora para el desarrollo de vacunas basadas en subunidades recombinantes debido a que contiene epítopes para anticuerpos neutralizantes. En la actualidad, se dispone de diversos enfoques metodológicos para producir vacunas. Específicamente, el uso de bacteriófagos filamentosos como acarreadores inmunogénicos representa una posibilidad para el desarrollo de vacunas contra enfermedades infecciosas.

Debido a su capacidad para desplegar péptidos exógenos en su superficie, diferentes tipos de bacteriófagos filamentosos han sido utilizados como una estrategia en la vacunación, ya que pueden representar un sistema de administración de antígenos de gran alcance, logrando inducir una respuesta de anticuerpos y células T adecuada, usando estrategias como fusiones genéticas o conjugación química en la superficie de dichos bacteriófagos. Por lo tanto, en este trabajo se pretende evaluar la respuesta inmune, en modelo animal, al administrar conjugados proteicos constituidos por péptidos recombinantes del virus del dengue, específicamente el E-DIII y un bacteriófago filamentosos (M13).

IV. HIPÓTESIS

El conjugado de polipéptidos recombinantes del E-DIII del DENV 2 con el bacteriófago filamentoso M13 (E-DIII:::M13) induce una mayor respuesta de IgG anti E-DIII en ratones BALB/c en comparación con los polipéptidos recombinantes no conjugados (E-DIII).

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Determinar si los polipéptidos recombinantes del E-DIII del DENV 2 conjugados a bacteriófagos filamentosos inducen una mayor producción de IgG anti E-DIII en ratones BALB/c.

5.2 Objetivos particulares.

1. Obtener polipéptidos recombinantes del dominio III del antígeno E del virus Dengue tipo 2 (E-DIII).
2. Determinar la disponibilidad de cisteínas incorporadas a los polipéptidos recombinantes (E-DIII) para conjugación química.
3. Obtener un conjugado con los polipéptidos recombinantes E-DIII-2 y el bacteriófago filamentosos M13 (E-DIII-2::M13).
4. Comparar la respuesta de IgG anti E-DIII-2 en ratones Balb/c inmunizados con E-DIII-2, M13 y E-DIII::M13.
5. Determinar la capacidad de neutralización de los polipéptidos recombinantes del dominio III del antígeno E del virus Dengue tipo 2 (E-DIII).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1.1 Tipo de estudio

Experimental.

Universo de estudio: ratones hembra de la cepa BALB/c.

Criterios de inclusión: peso corporal promedio de 16-18 g, aparentemente sanos.

Criterios de exclusión: infecciones o muerte.

Variable independiente: polipéptidos recombinantes de E-DIII conjugados al bacteriófago M13.

Variable dependiente: respuesta inmunitaria (títulos de IgG)

6.1.2 Grupos de estudio

Polipéptido recombinante de E-DIII = Antígeno

Bacteriófago Filamentoso M13 = M13

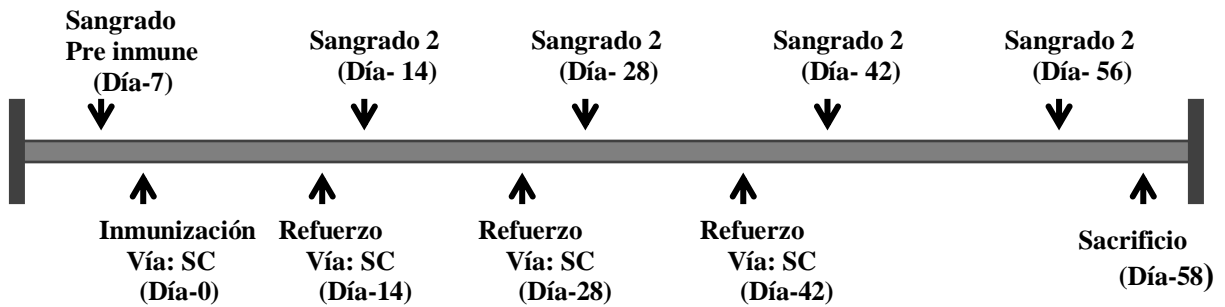
1) Grupo I: M13 (n= 3)

2) Grupo II: Antígeno E-DIII (n=3)

3) Grupo III: Antígeno E-DIII::M13 unión covalente (n=3)

Dosis: Los ratones se inmunizaron vía subcutánea con 10 µg de los péptidos (Halstead & Thomas, 2007) .

6.1.3 Calendario de inmunización



Los sangrados de los distintos grupos se realizaron los días 7, 14, 28, 42,56 días para cuantificar el título de IgG específica contra los antígenos.

6.1.4 Tamaño de la muestra

El número de muestra por grupo se determinó por la fórmula de medias poblaciones con un poder estadístico del 80% y una significancia de 95. De acuerdo a la diferencia en el cambio de expresión génica y suponiendo una diferencia de ± 2 entre las medias poblacionales dada una distribución normal, se calculó:

$$n = \frac{s_1^2 + s_2^2}{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^2} (z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta})^2$$

$$\bar{X}_1=0 \text{ y } \bar{X}_2=0$$

$$S_1=1$$

$$S_2=1$$

$$n = \frac{2}{2^2} (Z_{0.95} + Z_{0.80})^2$$

$$n = \frac{2}{2^2} (1.96 + 0.85)^2$$

$$n = 3.94 = 4$$

Dónde:

X_1 = media muestral de la población 1

X_2 = media muestral de la población 2

S_1 = desviación estándar muestral de la población 1

S_2 = desviación estándar muestral de la población 2

Valores críticos de Z son ± 1.9

6.1.5 Sede: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

6.1.6 Consideraciones éticas: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999.

Dietas: la ingesta de agua y alimento fue *ad libitum*.



Figura 4. Ratones hembra de la cepa BALB/c. Ingesta de agua y alimento

6.2 Ratones BALB/c

Son útiles para la investigación sobre el cáncer y la inmunología. Son "particularmente bien conocidos para la producción de plasmacitomas en la inyección de aceite mineral," un proceso importante para la producción de anticuerpos monoclonales. También se informa de como tener una "incidencia de tumor mamario bajo, pero no desarrollar otros tipos de cáncer en la edad adulta, con mayor frecuencia reticular neoplasias, tumores de pulmón y tumores renales. La mayor parte de las subcepas tienen una " larga vida útil reproductiva ", se caracteriza por mostrar altos niveles de ansiedad y por ser relativamente resistentes a la aterosclerosis inducida por la dieta, por lo que un modelo útil para la investigación cardiovascular, en cuanto a la utilidad en el sistema inmune existen diferencias en las respuestas inmunes macho y hembra tienen ido reconocido durante algún tiempo. Las hembras generalmente montan mejor respuesta humoral que los machos, mientras que los machos suelen dar mejor respuesta inmune celular en comparación con las hembras (Huber & Pfaeffle, 1994).

6.3 Línea celular

C6/36 ATCC CRL1660

Esta línea celular es útil para la replicación de los flavivirus , se puede utilizar para replicar virus del dengue a títulos altos.

6.4 Clonación de la secuencia de ADN del E-DIII en el vector de expresión basado en RNA polimerasa T7

La secuencia que codifica DIII (aminoácidos 295-395) de proteína de la envoltura del dengue serotipo 2 cepa Nueva Guinea C (GenBank: M29095) se clonó previamente en el vector pcDNA3(Mota et al., 2005). Esta construcción se usó como templado para la amplificación del E-DIII con los siguientes iniciadores: río arriba (5-'CACCATGGGTGGTTGTGGTGGTCTACAGCTCAAAGGAATGTCATAC-3') río abajo (5'-CTTAAACCAGTTGAGCTTCAA-3'). Los primeros cuatro nucleótidos del iniciador río arriba sirven para la clonación direccional en el vector bacteriana basada en ARN polimerasa de T7 expresión pET101-D/TOPO (Life Technologies). También, se adiciono un codón de inicio, seguido de una secuencia que codifica para los aminoácidos GGCGG, que puede facilitar la conjugación química, tal como se muestra en la Figura

1A. Para la amplificación se utilizó una ADN polimerasa termoestable de corrección de lectura, Pfx (Invitrogen). Las condiciones de PCR fueron como sigue : una etapa de desnaturalización inicial del ADN a 95°C, 5 min seguido de 35 ciclos de desnaturalización 95°C, 30 seg, hibridación 50-55°C, 30 seg , y extensión de 72°C, 30 seg , y un paso de extensión final a 72°C, durante 5 minutos. El producto de PCR amplificado se purificó con MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La clonación del fragmento amplificado dentro del vector de expresión se realizó de acuerdo con el manual del proveedor, donde colonias bacterianas positivas fueron seleccionadas y analizadas para la presencia de la secuencia de E-DIII mediante análisis restricción con *Hind* III y *Eco*RI (Invitrogen), se confirmó que el marco de lectura abierto fuera correcto mediante secuenciación del ADN.

6.5 Expresión recombinante de E-DIII y su detección por Western blot

Para la expresión E-DIII, el plásmido pET101-D/TOPO-E.DIII se introdujo mediante electroporación en células de *E. coli* BL21 (DE3). Fueron seleccionadas varias clonas positivas inoculándose en 3 ml de cultivo a 37 ° C / 200 rpm. Cultivos en fase logarítmica (en OD₆₀₀ de ~ 0.5-0.6 nm) se indujeron durante 3 horas con 1 mM isopropiltiogalactósido (IPTG), analizándose en paralelo cultivos sin el inductor. Una clona que expresaba los niveles máximos de la proteína recombinante fue elegida para experimentos posteriores. Alícuotas del cultivo inducido se lisaron bajo condiciones desnaturalizantes de la siguiente manera: Para preparar el lisado, una alícuota del cultivo celular inducido se procesó por sonicación al menos 4-6 veces con intervalos de 10s, utilizando tampón de hidrocloreuro de guanidina (GuHCl) (tampón fosfato salino (PBS) de pH 8.0 / 0.5 M de NaCl / 6 M de GuHCl, 1 % de Triton X – 100). Las fracciones soluble y de pellets se obtuvieron a partir del lisado de GuHCl. Alícuotas equivalentes de todas las cuatro fracciones resultantes se analizaron en geles desnaturalizantes al 14 % (SDS-PAGE), junto con los marcadores de peso molecular estándares preteñidos en carriles adyacentes y se transfirieron electroforéticamente una membrana de nitrocelulosa (Hybond™ GE Healthcare, EE.UU). La membrana se bloqueó durante la noche con 5 % de leche desnatada en tampón fosfato salino (PBS) que contenía 0.05 % de Tween - 20 (PBS-T). Después de bloquear durante la toda la noche, la membrana se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal 6xHis dilución 1:1000). Se realizaron lavados por aproximadamente 5 ocasiones con 1 % de

PBS que contiene 0.5 % de Tween 20 (PBS-T) e incubándose durante 3 horas a temperatura ambiente con IgG anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano picante (BioRad, EE.UU) a una dilución 1:2000. La membrana se lavó como se mencionó anteriormente y las bandas de proteínas fueron visualizadas por comparación con estándares preteñidos de proteínas (Protein Plus TM Kaleidoscopio Standar, Bio-Rad Laboratories, Inc). Para la etapa de revelado se incubó con el sustrato 3 - 3'Diaminobenzidine (Sigma - Aldrich) durante 30 minutos a temperatura ambiente, obteniéndose así los pesos moleculares aparentes.

6.6 Purificación de E-DIII recombinante a partir de la fracción insoluble

La proteína recombinante se purificó por cromatografía de afinidad con níquel como metal inmovilizado en una columna His-Trap HP (GE Healthcare, EE.UU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones, utilizando un método isocrático de 30 -70 mM de imidazol, este tampón de lavado contiene (tampón fosfato salino (PBS) con un ajuste de NaCl a 500 mM, imidazol 30 mM, pH 8,0). A partir de aquí se colectaron cinco fracciones de elución; determinándose la concentración de cada fracción eluida por el método de Bradford, finalmente, se analizó por SDS-PAGE para comprobar la pureza de la proteína.

6.7 Ensayo de disponibilidad de grupos sulfhidrilos

Para determinar la disponibilidad de grupos sulfhidrilo en la superficie de E-DIII recombinante, Se llevó a cabo un ensayo semicuantitativo. En primer lugar, la proteína recombinante se incubó durante dos horas a temperatura ambiente con un exceso molar de 240 maleimida PEG2 - biotina (Thermo Scientific Pierce, EE.UU), Inmediatamente después, el producto de reacción fue separado en un gel de poliacrilamida en un gel al 18% SDS -PAGE, donde el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (HybondTM GE Healthcare, EE.UU) y bloqueándose con solución de bloqueo (tampón fosfato salino , 5 % de albúmina de suero bovino , 0.1 % de Tween - 20 , pH 7.4) . Posteriormente, la membrana se incubó con estreptavidina - conjugada a peroxidasa (Sigma - Aldrich) en tampón fosfato salino, 2.5 % de albúmina de suero bovino, 0.05 % de Tween - 20, pH 7.4. Después de 5 lavados con solución de lavado (tampón fosfato

salino, 0.1 % de Tween - 20, pH 7.4), se detectó la actividad de la peroxidasa con solución de 3, 3' - diaminobencidina (Sigma - Aldrich).

6.8 Conjugación del E-DIII recombinante al bacteriófago M13

Bacteriófago M13 se preparó por el protocolo estándar, común para el procedimiento de bacterias y fagos (Sambrook & W Russell, 2001). La célula huésped de *E. coli* cepa TG1 se cultivó en medio LB, 200 ml de células TG1 se cultivaron hasta que alcanzaron una $OD_{600} = 0,6$ nm y se infectaron con 10^9 pfu de fago M1, el cultivo se incubó durante la noche a 37°C. Donde Partículas de fagos se recuperaron a partir del sobrenadante de cultivo, justo después de la eliminación de los desechos células por doble precipitación con una solución de PEG 8000 2.5 M NaCl/20 % w / w, seguido de ultracentrifugación con gradiente de densidad de CsCl y resuspensión en tampón PBS. La concentración del fago se determinó por unidades formadoras de placas después del protocolo estándar (Sambrook & W Russell, 2001).

La conjugación química de la proteína E-DIII al fago M13 se realizó en una reacción de dos etapas utilizando una relación equimolar de E-DIII y M13 con un exceso 10 molar del puente heterobifuncional éster de m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide (sulfato MBS) (Thermo Scientific Pierce), de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En la primera reacción, el Sulfo-MBS se incubó 30 minutos temperatura de cuarto con M13. Después, la reacción se desaló para eliminar exceso de entrecruzador, el Sulfo-MBS libre se desaló por centrifugación utilizando la columna Zeba 0.5 ml (Thermo Scientific Pierce). En la segunda etapa de la reacción, se añadió la proteína E-DIII y llevándose a cabo la reacción en dos momentos diferentes (15 y 30 min) y dos temperaturas de 37°C y 4°C. Ambos pasos se llevaron a cabo en tampón fosfato salino, pH 7.2. Con el fin de comprobar el proceso de conjugación, los productos de reacción se separaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 14 % en condiciones reductoras y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (Hybond™ GE Healthcare, EE.UU). Se empleó como anticuerpo primario, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-His tag (Roche) a una dilución 1:1000, y como anticuerpo secundario, un anticuerpo policlonal de cabra anti- IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (BioRad, EE.UU) a una dilución 1:2000. Por último, la membrana se reveló con una solución de 3'-3 diaminobencidina.

6.9 Esquema de inmunización de ratones con el conjugado E-DIII::M13

Ratones hembra de seis semanas de edad de la cepa BALB/c fueron comprados a Harlan México y se mantenidos en un ambiente controlado (temperatura de 22-25 °C, con un ciclo de 12 h luz /12 h oscuridad con agua y comida *ad libitum*. Los estudios en animales se llevaron a cabo de acuerdo con los principios establecidos en la norma NOM -062 - ZOO- 1999 de México. Después de una semana de aclimatación, los animales fueron divididos en tres grupos (n=3) : M13, E-DIII y E-DIII::M13. El grupo M13 era inmunizado con bacteriófago M13 , grupo E-DIII con la proteína E-DIII recombinante y el grupo E-DIII::M13 con el conjugado. Todos los grupos fueron inmunizados por vía subcutánea con 10 µg de las preparaciones. La primera inmunización fue seguida por tres refuerzos en los días 14, 28 y 42. Los sueros se recogieron a través del sangrado por cola en los días 7, 14, 28, 42 y 56 y almacenados a -80 ° C para su uso posterior.

6.10 Título de IgG total E-DIII específica de los sueros de animales inmunizados

Los niveles de IgG total de los diferentes grupos en anti- E-DIII IgG, se evaluaron por duplicado a través de ensayo inmunoenzimático ELISA. Brevemente, las placas de ELISA para microtitulación Nunc-Immuno Plate MaxiSorp Surface (Nunc, Roskilde, Dinamarca) fueron sensibilizadas con el antígeno recombinante E-DIII (1µg/pozo) en tampón de revestimiento (0.05 M de tampón carbonato-bicarbonato, pH 9.6). El antígeno se obtuvo previamente mediante electroelución durante 5 horas a 10 mA utilizando el modelo 422 (BioRad, EE.UU), incubándose durante la toda noche a 4°C. Las placas se lavaron seis veces con tampón fosfato salino que contiene 0.05 % de Tween 20 (PBS-T) y se bloquearon con 300µl de 5 % de leche descremada en tampón fosfato salino durante 2 horas a 37°C. Los sueros provenientes de los ensayos se diluyeron en serie por un factor de 10 en PBS -T, iniciando a partir de una dilución 1:100, estas diluciones fueron incubadas durante la noche a 4°C (150µl/pozo). La placa se lavó tres veces con PBS -T, para posteriormente añadirse a los pocillos anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante (Sigma, EE.UU) a una dilución 1:1000 en 5 % de BSA en PBS incubándose durante 1 h a 37°C. La reacción se desarrolló a temperatura ambiente

con 100 µl de sustrato TMB (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2N, para finalizar se midió la absorbancia 450 nm (A450) usando un espectrofotómetro de Absorbancia XMark™ de microplacas (BioRad, EE.UU).

6.11 Reducción del efecto citopático mediado por sueros hiper-inmune en células C6/36

Los sueros colectados de los diferentes grupos se evaluaron para la capacidad de neutralización del DENV 2 a través de un ensayo *in vitro*. 500 µl de suero diluido a 1:5, 1:12.5, 1:25 y 01:50 en medio diluyente L15 con L- glutamina Gibco® (Invitrogen, EE.UU). El aislado correspondiente al DENV 2 se ajustó a 100 TCID₅₀ en diluyente de virus y se añadió en un volumen igual (TCID₅₀:50 final) al tubo que contiene el suero diluido, de modo que las diluciones finales de suero eran 1:10, 1:25, 1:50 y 1:100. La mezcla de anticuerpo / virus se incubó a 37°C durante 1h aproximadamente. Las placas de 24 pocillo con monocapas confluentes de células C6/36 se utilizó para la infección con el virus. La monocapa de células se lavó una vez con medio, posteriormente se añadieron 50 µl de la mezcla de anticuerpo / virus a los pocillos apropiados. Las placas se dejaron a 28°C durante 60min, después de este período de incubación, se retiraron las mezclas y la monocapa de células se lavó una vez con diluyente de virus y posteriormente se añadió a cada pocillo 1ml de medio L15 fresco suplementado con L - glutamina. La placa se dejó a 28°C durante 5 días estas se visualizaron bajo un microscopio de contraste de fase de luz NIKON Eclipse TS100 (Nikon, EE.UU). El título neutralizante se definió como la dilución más alta de suero a la que se logró la neutralización del virus.

6.12 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando software estadístico GraphPad Prism versión 5.02 (GraphPad Software, Inc). La significancia estadística de las diferencias entre grupos se evaluó mediante ANOVA de una vía y un post hoc con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias con un valor P inferior a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

VII. RESULTADOS

7.1 Expresión, purificación y disponibilidad de grupos sulfhidrilo en la superficie de E-DIII recombinante

El fragmento que codifica para la proteína E-DIII del DENV 2 cepa de Nueva Guinea se amplificó y se clonó en el vector basado en ARN polimerasa T7. La secuencia fue diseñada para contener la secuencia que codifica para los siguientes aminoácidos en el extremo 5' GGCGG, esto con el fin de hacer más fácil la conjugación química de la proteína recombinante E- DIII a través de su grupo sulfhidrilo presente en cisteínas Figura 5.

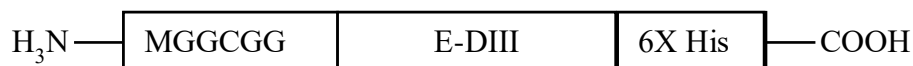


Figura 5. Diseño del E-DIII del DENV 2. Extremo amino contiene a la cisteína con 4 aminoácidos de glicina, extremo carboxiterminal contiene la etiqueta de histidina.

El plásmido construido se introdujo en la cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3), donde la expresión de la proteína recombinante del E-DIII se logró por medio de cultivos inducidos con IPTG. La proteína recombinante del E-DIII acumula predominantemente en la fracción insoluble del lisado bacteriano sonificado como una proteína de aproximadamente 15 kDa lo cual corresponde a su peso teórico Figura 6.

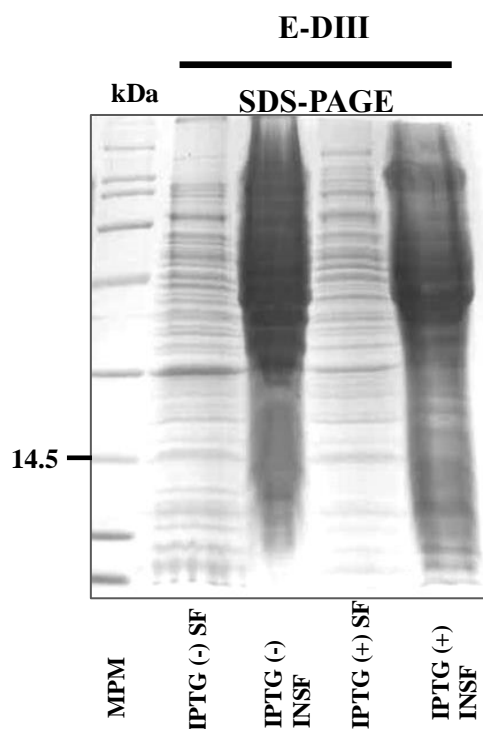


Figura 6. Análisis de la expresión del E-DIII recombinante por SDS-PAGE 14% y tinción con azul de Coomassie; fracciones solubles (SF) e insolubles (insf), sin IPTG [IPTG (-)] y cultivos inducidos [IPTG (+)]; MPM: patrones de proteínas de amplio peso molecular

Esta proteína reacciona de manera específica con el anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce específicamente una etiqueta de seis histidinas Figura 7A. A partir de que la proteína recombinante del E-DIII estaba presente en la fracción insoluble del lisado bacteriano, se realizó su purificación siguiendo un protocolo usando un agente desnaturizante fuerte presente en el tampón de desnaturalización /y tampón de unión. A continuación, la proteína correspondiente al E-DIII fue purificada por medio de cromatografía de afinidad colectándose así las fracciones correspondientes a la elución las cuales se analizaron por medio de SDS-PAGE en geles al 14%. Las dos primeras fracciones de elución (0.5 ml por fracción) presentaron las concentraciones más altas de elución Figura 7B.

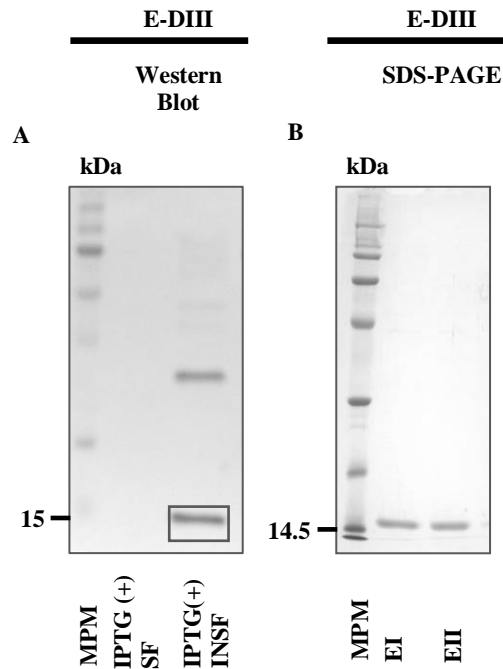


Figura 7. Análisis de la expresión y Purificación del E-DIII por ensayo tipo SDS-PAGE 14% y Western Blot. A) Donde los cultivos de inducidos por IPTG [IPTG (+)] fueron analizados utilizando un anticuerpo monoclonal anti-6His, (SF) es fracción soluble e (insf) fracción insoluble; MPM: Estándar proteico Kaleidoscope Precision Plus. B) La purificación del E-DIII recombinante por cromatografía de afinidad; los carriles muestran las dos primeras fracciones eluidas con imidazol a 500 mM y posteriormente sometidos a SDS-PAGE 14% y tinción con azul de Coomassie.

Estas fracciones se agruparon, desalaron y cuantificaron para llevar a cabo pruebas de biotilación con el fin de demostrar la disponibilidad de grupos sulfhidrilo libres. El reactivo utilizado para este propósito fue Maleimida-PEG2-biotina, que reacciona específicamente con grupos sulfhidrilo reducidos a través de un ataque nucleofílico formando enlaces tioéter estables; la molécula de biotina presente en este reactivo sirve para la detección de proteínas que contienen sulfhidrilo por medio de la avidina o estreptavidina conjugadas, lográndose observar a través de un ensayo tipo Western blot. Después de la incubación de la proteína del E-DIII con maleimida - PEG2 - biotina, el producto de reacción fue analizado por SDS-PAGE en condiciones reductoras, y Western

blot. Los resultados mostraron una banda intensa de 15 kDa correspondiente a la proteína E-DIII, estos resultados demostraron una expresión estable de la proteína del E-DIII y la disponibilidad para la reducción de grupos sulfhidrilo libres susceptibles para conjugación química Figura 8.

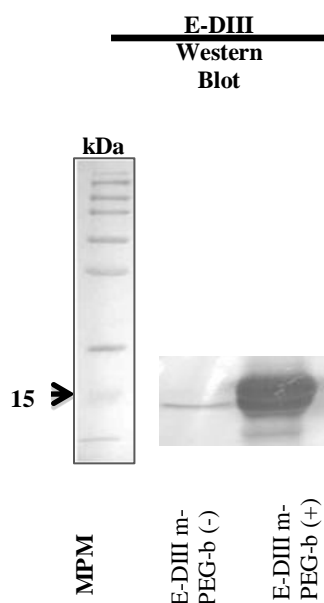


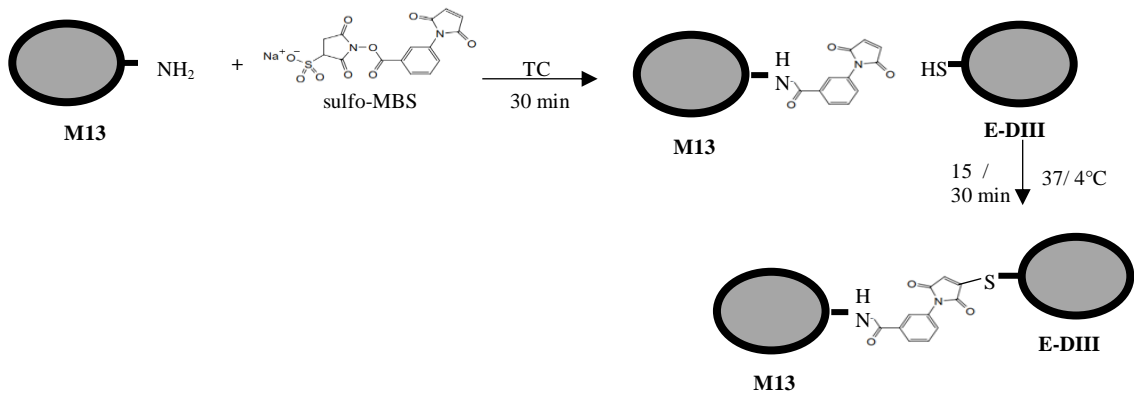
Figura 8. Disponibilidad para conjugación química de grupos amino (-SH) expuestos en la superficie del E-DIII DENV 2. Análisis de disponibilidad grupo sulfhidrilo en DIII recombinante, donde fue utilizado el reactivo (Maleimida-PEG-biotina) y detectado por Western Blot; E-DIII m-PEG-b (-): corresponde al E-DIII purificado incubado sin el reactivo de sulfhidrilos, E-DIII m-PEG-b (+): corresponde al E-DIII purificado e incubaron en la presencia del de reactivo sulfhidrilos.

7.2 Conjugación química del E-DIII al bacteriófago M13

El acoplamiento químico del E-DIII al bacteriófago M13 se llevó a cabo usando el puente heterobifuncional Sulfo-MBS, que permite la unión covalente de moléculas que contienen grupos amino y sulfhidrilo libres para reaccionar Figura 9A. Los productos de conjugación se observaron por ensayo tipo Western blot. Se observó un producto de reacción de alto peso molecular con un patrón de bandeo por encima de los 50 kDa Figura 9B. Este patrón electroforético es similar a lo reportado por (van Houten et al., 2010a) presentándose un ligero gradiente de proteínas probablemente asociadas con la incorporación del reactivo de conjugación y probables proteínas de dimerización que

forman el bacteriófago filamentoso. Este patrón no se observó en el E-DIII sin conjugar. No obstante, el E-DIII no se acopla de manera completa, ya se observaron bandas correspondientes a los monómeros y dímeros E-DIII (15 y 30 kDa, respectivamente). Es remarcable mencionar que se observó una reducción en la forma monomérica en los carriles correspondientes al conjugado E-DIII::M13, lo que refleja que parte de estos monómeros se unen a la bacteriófago. Además, la reacción de conjugación fue mejor a 37°C que a 4°C. También, no se detectaron bandas en el carril del bacteriófago M13 que fue incubado solo con el reactivo de conjugación defendiendo así la idea de que no tuvo lugar un reconocimiento inespecífico del bacteriófago por el anticuerpo anti-His monoclonal. En resumen, estos resultados indican que la incorporación de E-DIII en la superficie del bacteriófago M13 mediante conjugación química se logró parcialmente.

A)



B)

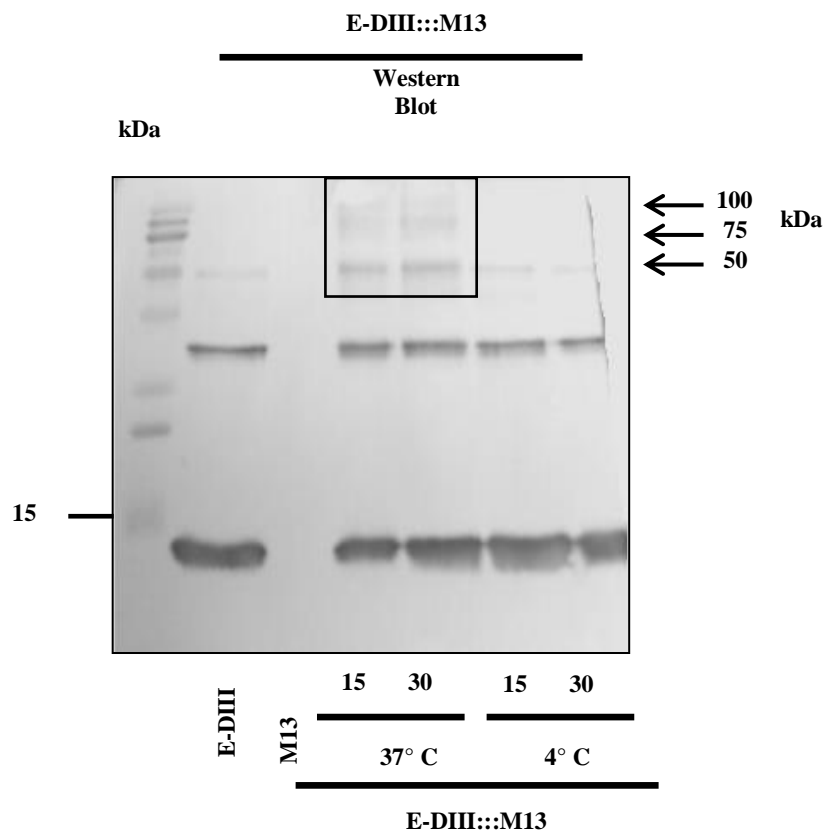


Figura 9. Conjugación química del E-DIII al M13. Esquema de los dos Pasos de Reacción para el acoplamiento químico del E-DIII al bacteriófago M13. En la Primera Etapa, se realiza a temperatura ambiente (TA) durante 30 min, el puente heterobifuncional éster de N-hidroxisuccinimida sulfo-MBS reacciona con los grupos amino presentes en la superficie del bacteriófago M13 (M13); En el Segundo paso, Realizado en dos momentos diferentes (15 y 30 min) y a dos temperaturas distintas (37 y 4°C), maleimida el agente entrecruzador reacciona con los grupos sulfhidrilo expuestos en la superficie presentes en el Dominio III (E-DIII) a través de un enlace tioéter. B) Ensayo tipo Western blot de la conjugación del E-DIII al bacteriófago M13, usando un anticuerpo monoclonal anti-6His tag; E-DIII: E-DIII proteína sola, M13: bacteriófago M13 incubado con sulfo-MBS, E-DIII::M13: productos de conjugación del E-DIII y bacteriófago M13 a 37 o 4 ° C durante 15 o 30 minutos, tal como se indica.

7.3 Títulos de anti-E-DIII IgG de sueros de ratones inmunizados

Con el fin de determinar si los grupos como el E-DIII conjugado al bacteriófago M13 era capaz de inducir una respuesta inmune, los ratones BALB/c fueron inmunizados siguiendo el calendario de inmunización mostrado en la Figura 10A. Las muestras de suero se colectaron 2 semanas después de cada inmunización, y se analizaron para medir anticuerpos anti-EDIII IgG. Se incluyeron dos grupos de ratones, el primero con solo E-DIII, y el segundo solo con fago M13; el primero sirve como referencia para distinguir el efecto de M13 como acarreador de antígeno y el segundo para descartar la posibilidad de que el fago M13 induce por sí mismo la producción de anticuerpos contra E-DIII. Los sueros colectados a diferentes tiempos de cada ratón se analizaron por ensayo tipo ELISA para medir anticuerpos anti-E-DIII IgG. La Figura 10B muestra que la dilución 1:100000 es la mejor dilución para observar diferencias entre los grupos. Como se muestra en la Figura 10C, los niveles de anti-EDIII IgG correspondientes al conjugado eran bajos después de la primera dosis y alcanzó su punto máximo en el día 28 y 56 en comparación con los grupos E-DIII y M13. Este aumento fue estadísticamente significativo en relación con el tratamiento E-DIII. Tal y como se representa en la Figura 10C, el grupo inmunizado con el conjugado mostro ser altamente inmunogénico, produciendo títulos de anti-EDIII IgG que eran más altos que los del grupo inmunizado con solo el E-DIII.

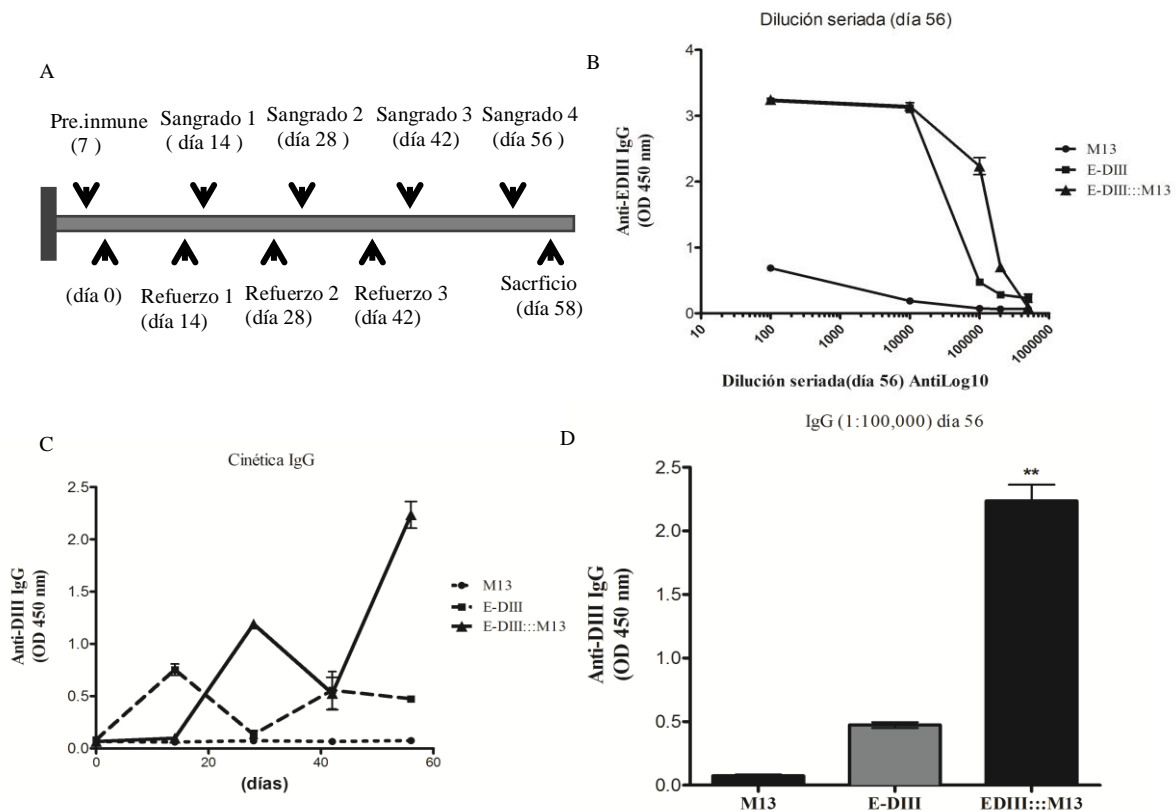


Figura 10. Respuesta de IgG al conjugado E-DIII::M13 en ratones BALB/c. (A) Esquema de Inmunización y sangrado. El suero pre-inmune se obtuvo en el día 0 y recibieron refuerzos en los días 14, 28 y 42, mientras que el suero se colectó en los días 7, 14, 28, 42 y 56; El grupo M13 fue inmunizado con bacteriófago M13, El grupo DIII con proteína E-DIII y el grupo E-DIII::M13 se inmunizó con conjugado. (B) Título de Anti-EDIII IgG por ensayo tipo ELISA del suero de las muestras de los tres grupos en el día 56. (C) Absorbancias de los títulos de Anti-E-DIII IgG de suero de las muestras de los tres grupos en los días 14, 28, 42 y 56 en la dilución 1:100.000. (D) Absorbancias de los títulos de Anti-E-DIII IgG de suero de las muestras de los tres grupos en el día 56 en la dilución 1:100.000, Donde se calculó la significancia estadística de las diferencias por medio de ANOVA de una vía y post hoc con la prueba de comparación múltiple de Tukey utilizando GraphPad Prism (** p <0,05).

7.4 Títulos neutralizantes del virus del dengue 2 de sueros de ratones inmunizados

La actividad neutralizante de los anticuerpos contra la proteína recombinante del E-DIII virus del dengue tipo 2 se evaluó por efecto citopático en células de mosquito C6/36. Las diluciones 1:10 a 1:100, de los sueros de los diferentes grupos se evaluaron para determinar su capacidad para neutralizar 50 TCID₅₀ de un aislado clínico del virus de dengue tipo 2. Los anticuerpos del grupo E-DIII::M13 a la dilución 1:50 fueron capaces de bloquear la entrada del virus (Tabla 1). Por el contrario, los anticuerpos de los grupos del E-DIII y M13 no lograron a neutralización del virus del dengue en cualquier dilución. Este resultado indica que el conjugado E-DIII::M13 induce la producción de anticuerpos neutralizantes contra el virus del dengue tipo 2.

Tabla 2 Anticuerpos neutralizantes contra el virus del dengue de tipo 2.

Inmunogenos			
Den-2	M13	E-DIII	E-DIII::M13
*	<10	< 10	50

* Los valores son la dilución recíproca que produce el 50 % de neutralización del virus.

VIII. DISCUSIÓN

En la búsqueda de un prototipo vacunal contra el dengue, se han realizado diversos esfuerzos para diseñar una vacuna eficaz contra el virus. Los candidatos vacunales que se encuentran actualmente en fases más avanzadas de desarrollo se basan en la obtención de cepas atenuadas o de virus vivos recombinantes. La ventaja principal del empleo de virus vivos es la inducción de una respuesta inmune humoral y celular duradera, que simule a la infección natural del DENV. En la actualidad, existe una vacuna contra el dengue tetravalente recombinante que ha mostrado cierta promesa en la prevención de la infección por el virus del dengue en los ensayos clínicos (Morrison et al., 2010), sin embargo, esta vacuna no ofrece protección contra el virus del dengue tipo 2 (Sabchareon et al., 2012). Se han utilizado diversas estrategias se para el desarrollo de vacunas contra el virus del dengue, tales como atenuación, construcción de subunidades, quiméras o vacunas de ADN (Durbin & Whitehead, 2011). El desarrollo de una vacuna contra el dengue se considera un reto, ya que debe proporcionar inmunidad protectora contra los cuatro serotipos, sin causar efectos secundarios adversos asociados con inmunidad incompleta contra un serotipo específico (Silva et al., 2012). Las evidencias acumuladas en años recientes identificaron al dominio III de la proteína de envoltura del virus del dengue como una región crítica para el desarrollo de subunidades vacunales (Bernardo et al., 2008), (Etemad et al., 2008), ya que este dominio constituye un blanco fundamental de anticuerpos neutralizantes, lo cual concuerda con su participación en la unión al receptor celular de las células diana (Kuhn et al., 2002).

Diversos reportes describen el uso de estructuras virales para el despliegue de secuencias del DENV en su superficie. Partículas virales (PTVs) del virus de la hepatitis B que despliegan en su superficie monómeros de DIII fusionados se expresaron con éxito en *P. pastoris*. También, se fusionó una proteína del ectodominio E y 30 residuos aminoácidos de la proteína prM se expresaron en el mismo modelo de despliegue de antígenos, dando como resultado la formación de VLP (Bisht, Chugh, Rajee, Swaminathan, & Khanna, 2002). Otros son los reportes que hablan de la expresión de prM / E en una línea celular de mamífero transfectada de manera estable y la purificación de las PTVs, las cuales fueron inmunogénicas y confirieron protección en ratones (Konishi & Fujii, 2002). Además, se ha reportado al igual altos rendimientos de PTVs por transfección transitoria de células de insecto (Kuwahara & Konishi, 2010) . Existe un reporte sobre una vacuna PTVs contra el Virus del Nilo Occidental (VNO), que está estrechamente relacionado con el virus del dengue, basada en el acoplamiento químico de

E-DIII recombinante en la superficie del bacteriófago AP205, encontrándose que se potencia la producción de anticuerpos neutralizantes, proporcionando protección parcial ante el reto con una dosis letal de virus del Nilo Occidental (Spohn et al., 2010). En otro trabajo, cuatro serotipos de partículas virales (PTVs) similares al virus de dengue que contienen proteínas prM y E recombinantes se generaron en células de mamíferos y fueron capaces de estimular IgG específicas y anticuerpos neutralizantes contra los cuatro serotipos del virus del dengue en ratones inmunizados (Zhang et al., 2011). Además, una PTV quimérica que contiene al E-DIII de virus del dengue 2 insertado en el loop c/e1 de proteína de la cápside de la hepatitis B expresada en *P. pastoris*, obteniendo buenos niveles de anticuerpos neutralizantes contra el virus del dengue de tipo 2 (Arora et al., 2013). Por último, una plataforma sofisticada que incorpora E-DIII de virus del dengue en PTVs retrovirales, capaz de estimular anticuerpos neutralizantes (Chua et al., 2013). La estrategia utilizada en este trabajo se enfocó en el dominio E-DIII conjugado químicamente al bacteriófago M13 como un potenciador de la respuesta inmune, tomando en cuenta lo siguiente: 1) en la actualidad, es bien conocido que los antígenos presentados en la superficie de bacteriófagos filamentosos son capaces para inducir humoral así como la respuesta inmune mediadas por células, lo que hace a las partículas del bacteriófago un atractivo sistema de presentación de antígenos para el diseño de nuevas vacunas, 2) la respuesta inmune inducida por los antígenos desplegados en la superficie del bacteriófago se puede mejorar mediante la orientación partículas del bacteriófago a las células presentadoras de antígenos profesionales (Prisco & De Berardinis, 2012a) y 3) el dominio E-DIII asemeja estructuralmente a las inmunoglobulinas y sus loops expuestos y flexibles en el exterior de un virion maduro que son los principales determinantes de inmunogenicidad de los flavivirus (Kuhn et al., 2002), (Mukhopadhyay, Kim, Chipman, Rossmann, & Kuhn, 2003). Y finalmente, 4) el E-DIII contiene los epítomos neutralizantes de la glicoproteína de envoltura capaces de inducir una respuesta inmune robusta de anticuerpos neutralizantes (Kuhn et al., 2002), (Crill & Roehrig, 2001). Por lo que la presentación de únicamente el dominio E-DIII, en lugar de la proteína completa, tendrá la ventaja de centrar la respuesta inmune en los epítomos neutralizantes en el E-DIII.

En este trabajo, la proteína que codifica para el E-DIII del virus del dengue tipo 2 se expresó con éxito en *E. coli*. DIII; aunque este no ha sido el único sistema para llevar a cabo su expresión, ya que este dominio ha sido expresado y purificado utilizando

diferentes sistemas heterólogos, incluyendo *E. coli* (Khanam, Etemad, Khanna, & Swaminathan, 2006), (Pattnaik, Babu, Verma, Tak, & Rao, 2007), (Arora et al., 2013), levaduras (Batra, Nemani, Tyagi, Swaminathan, & Khanna, 2011), (Nguyen et al., 2013) y células de insecto (Kuwahara & Konishi, 2010), (Chua et al., 2013). En el diseño de estrategias para la expresión y purificación de la proteína E, diversos investigadores han preferido el uso de proteínas acompañantes de fusión, tales como glutatión S – transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), proteína A y HBsAg (Jaiswal, Khanna, & Swaminathan, 2004). El objetivo principal de estas estrategias de fusión ha sido asegurar la expresión de proteínas en forma soluble y proporcionar una fácil recuperación posterior a la expresión de la proteína recombinante. El E-DIII expresado aquí se encontraba en la fracción insoluble de los lisados celulares formando cuerpos de inclusión, debido a la falta de una chaperona de fusión. A pesar del alto rendimiento en la expresión y facilidad de purificación, el procedimiento introdujo una incertidumbre acerca de la proporción exacta de las moléculas de proteína que tienen el pliegue nativo. En efecto, las fracciones del E-DIII se encontraban como dímeros o incluso trímeros mediante la formación de enlaces disulfuro intermonoméricos, los cuales ya han sido reportados con anterioridad (Jaiswal et al., 2004), (Kelly, Greene, King, & Innis, 2000). Existen otros reportes que informaron de la presencia de agregados debido a la ausencia de interacción del dominio I, lo que hace a la proteína truncada recombinante poco soluble, presumiblemente a causa de la exposición de residuos hidrofóbicos adicionales que están en el contexto del homodímeros nativos (Chu et al., 2005). Los ensayos por cromatografía de exclusión molecular revelaron que casi todas las fracciones del E-DIII estaban presente en la fracción de volumen muerto de columna (datos no mostrados) y por lo tanto aportan pruebas de que E-DIII formó complejos multiméricos. Sin embargo, superando los problemas de solubilidad, se realizó después de la purificación ensayos para lograr un plegamiento apropiado de la proteína recombinante expresada E-DIII.

El diseño racional de una vacuna requiere, en primera instancia, la identificación de inmunogenicidad relacionada a protección, es decir, el mecanismo efector de la inmunidad responsable de la protección contra infecciones, y la subsecuente selección de un antígeno que sea capaz de provocar la respuesta adaptativa deseada. Una vez que ha sido identificado el antígeno apropiado y seleccionado el adyuvante adecuado, es esencial liberarlo efectivamente al sistema inmune del huésped (Perrie, Mohammed, Kirby, McNeil, & Bramwell, 2008). El sistema inmune requiere un estímulo para

inducir una respuesta inmune efectiva, un estímulo proporcionado por ejemplo por adyuvantes pueden dirigir la respuesta inmune hacia humoral ó celular en función de los adyuvantes utilizados y cuando el antígeno es pequeño o poco inmunogénico (Guy, 2007).

Son diversos los estudios que han demostrado el uso del E-DIII de la proteína de envoltura como antígeno modelo en combinación con diferentes adyuvantes induce respuesta robusta de anticuerpos (Kelly et al., 2000), (Batra et al., 2011), (Babu et al., 2008). La investigación aquí realizada, demuestra que un conjugado constituido por el E-DIII y el bacteriófago M13 se generó y muestra inducir altos títulos de anticuerpos específicos anti-E-DIII en ratones BALB/c, estos títulos son comparables con otros trabajos experimentales basados en el E-DIII recombinante a pesar de que este se encuentra mezclados con adyuvantes comerciales y a dosis más alta por inmunización (Babu et al., 2008), (Leng et al., 2009),(Batra et al., 2011). Los títulos de anticuerpos alcanzaron su nivel más alto en el día 56 después de la primera dosis seguido de tres refuerzos los días 14, 28 y 42, estos anticuerpos inducidos fueron capaces de prevenir la entrada del virus del dengue tipo 2 en las células C6/36 *in vitro*, lo que significa que estos bloquearon a los componentes del virus que se unen a los receptores de la célula huésped. Los títulos neutralizantes observados pueden ser considerados como indicativos de inmunidad protectora (Monika Simmons, Burgess, Lynch, & Putnak, 2010b) y son consistentes con los títulos anti-E-DIII, teniendo en cuenta que hay 180 monómeros de proteína E exponiendo al DIII en la superficie de una sola partícula madura del virion (Rothman, 2011). Estos títulos neutralizantes pueden ser atribuidos al bacteriófago como acarreador de antígenos, desde E-DIII solo no fue capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes, incluso a la dilución más baja. En este contexto, se ha demostrado que los sistemas de presentación de antígenos, la dosis y estructura del antígeno son cruciales para la respuesta deseada: donde estructuras ordenadas y repetitivas permiten inducir significativamente una respuesta robusta de células B, debido al entrecruzamiento del antígeno a su receptor de células B (*por sus siglas en ingles*, BCR).consecuentemente, su transporte al citosol permitirá su procesamiento y presentación en el contexto MHC-I (Zinkernagel et al., 1996),(M F Bachmann & Zinkernagel, 1997b) induciendo la activación de células T cooperadoras, permitiendo el desarrollo de células B plasmáticas productoras de anticuerpos y células B de memoria (Kovacsovic-Bankowski, Clark, Benacerraf, & Rock, 1993). De este

modo la estimulación de células B puede llevarse a cabo en ausencia de la cooperación de células T, llevando a la secreción de IgM al menos en las primeras etapas de la estimulación, y en algunas condiciones puede llevar a superar la tolerancia de células B (Kushnir, Streatfield, & Yusibov, 2012). Donde las connotaciones naturales *per se* del bacteriófago como acarreador ayudan a una adecuada estimulación del sistema inmune y conferir inmunidad contra el antígeno acoplado, debido a que el dominio III se presenta al sistema inmune de una manera orientada y densamente empaquetada sobre la superficie del bacteriófago M13, es probable que las células B específicas del E-DIII se activan rápida y eficientemente para producir anticuerpos IgG específicos. La naturaleza particulada del bacteriófago M13 asegura una absorción preferencial de las células presentadoras tales como las células dendríticas por el antígeno, y de ese modo una presentación eficiente de E-DIII, así como la epítomos derivados del bacteriófago sobre MHC de clase II para la activación de células específicas Th (Spohn et al., 2010). Cabe destacar que, hasta ahora, hay muy poca evidencia de acoplamiento químico de péptidos inmunogénicos al bacteriófago M13 y , por otra parte , sería interesante controlar los sitios disponibles de la partícula que conforma el bacteriófago donde antígenos pueden unirse, un aspecto que es crucial para el montaje de una respuesta inmunológica adecuada .

IX. CONCLUSIONES

Se demostró que el conjugado constituido por el antígeno recombinante E-DIII del virus dengue 2 y el bacteriófago filamentoso M13 (E-DIII::M13) fue generado en este trabajo, cuando este es administrado en ratones BALB/c logra la inducción de anticuerpos neutralizantes contra el virus del dengue tipo 2 en células C6/36. La inmunogenicidad mejorada de este conjugado demuestra que debe ser colocado en el nivel de los prototipos vacúnales de dengue basados en subunidades recombinantes que han sido desarrollados en los últimos años. Estudios adicionales mejorando el proceso de conjugación, la dosis y el uso de modelos animales adecuados que asemejen el

cuadro sintomatológico que causa el virus se requerirán para la mejora de este tipo de estrategias.

X. PERSPECTIVAS

1. Evaluar los polipéptidos recombinantes con otros adyuvantes o proteínas inmunomoduladoras de posible uso en humanos.
2. Desarrollar un proceso de conjugación que permita la incorporación completa del antígeno a la plataforma antigénica.
3. Medir la respuesta celular y el perfil de citoquinas tras la inmunización con el conjugado.
4. Mejorar la evaluación de la capacidad neutralizante de los anticuerpos producidos por el conjugado.

5. Evaluar la formulación de una tetravalente que contenga los 4 polipéptidos recombinantes sobre la plataforma antigénica.
6. Desarrollar esquemas de inmunización que combinen la tetravalente de péptidos recombinantes obtenida con un modelo animal mejorado.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Arora, U., Tyagi, P., Swaminathan, S., & Khanna, N. (2013). Virus-like particles displaying envelope domain III of dengue virus type 2 induce virus-specific antibody response in mice. *Vaccine*, *31*(6), 873–8. doi:10.1016/j.vaccine.2012.12.016
- Babu, J. P., Pattnaik, P., Gupta, N., Shrivastava, A., Khan, M., & Rao, P. V. L. (2008). Immunogenicity of a recombinant envelope domain III protein of dengue virus type-4 with various adjuvants in mice. *Vaccine*, *26*(36), 4655–63. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.006
- Bachmann, M. F., & Jennings, G. T. (2010). Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews. Immunology*, *10*(11), 787–96. doi:10.1038/nri2868

- Bachmann, M. F., & Zinkernagel, R. M. (1997a). Neutralizing antiviral B cell responses. *Annual Review of Immunology*, *15*, 235–70. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.235
- Bachmann, M. F., & Zinkernagel, R. M. (1997b). Neutralizing antiviral B cell responses. *Annual Review of Immunology*, *15*, 235–70. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.235
- Bachmann, M. F., Zinkernagel, R. M., & Oxenius, A. (1998). Immune responses in the absence of costimulation: viruses know the trick. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *161*, 5791–5794.
- Batra, G., Nemani, S. K., Tyagi, P., Swaminathan, S., & Khanna, N. (2011). Evaluation of envelope domain III-based single chimeric tetravalent antigen and monovalent antigen mixtures for the detection of anti-dengue antibodies in human sera. *BMC Infectious Diseases*, *11*, 64. doi:10.1186/1471-2334-11-64
- Bernardo, L., Izquierdo, A., Alvarez, M., Rosario, D., Prado, I., López, C., ... Guzmán, M. G. (2008). 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*, *80*(2), 194–9. doi:10.1016/j.antiviral.2008.06.005
- Berrios, V., Kurane, I., & Ennis, F. A. (1996). Immunomodulatory effects of IL-7 on dengue virus-specific cytotoxic CD4+ T cell clones. *Immunological Investigations*, *25*, 231–240.
- Bhamarapravati, N., & Sutee, Y. (2000). *Live attenuated tetravalent dengue vaccine*. *Vaccine* (Vol. 18 Suppl 2, pp. 44–47). doi:10.1016/S0264-410X(00)00040-2
- Bisht, H., Chugh, D. A., Raje, M., Swaminathan, S. S., & Khanna, N. (2002). Recombinant dengue virus type 2 envelope/hepatitis B surface antigen hybrid protein expressed in *Pichia pastoris* can function as a bivalent immunogen. *Journal of Biotechnology*, *99*, 97–110. doi:10.1016/S0168-1656(02)00181-5
- Blaney, J. E., Hanson, C. T., Firestone, C.-Y., Hanley, K. A., Murphy, B. R., & Whitehead, S. S. (2004). Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *71*, 811–821.
- Blaney, J. E., Matro, J. M., Murphy, B. R., & Whitehead, S. S. (2005). Recombinant, live-attenuated tetravalent dengue virus vaccine formulations induce a balanced, broad, and protective neutralizing antibody response against each of the four serotypes in rhesus monkeys. *Journal of Virology*, *79*, 5516–5528. doi:10.1128/JVI.79.9.5516-5528.2005
- Boonnak, K., Slike, B. M., Burgess, T. H., Mason, R. M., Wu, S.-J., Sun, P., ... Marovich, M. A. (2008). Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Journal of Virology*, *82*, 3939–3951. doi:10.1128/JVI.02484-07

- Brandler, S., Lucas-Hourani, M., Moris, A., Frenkiel, M.-P., Combredet, C., Février, M., ... Tangy, F. (2007). Pediatric measles vaccine expressing a dengue antigen induces durable serotype-specific neutralizing antibodies to dengue virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *1*, e96. doi:10.1371/journal.pntd.0000096
- Chareonsirisuthigul, T., Kalayanarooj, S., & Ubol, S. (2007). Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *The Journal of General Virology*, *88*, 365–375. doi:10.1099/vir.0.82537-0
- Chaturvedi, U. C. (2006). Tumour necrosis factor & dengue. *The Indian Journal of Medical Research*, *123*, 11–14.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., & Marks, R. M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Medicine*, *3*, 866–871. doi:10.1038/nm0897-866
- Chiang, C.-Y., Liu, S.-J., Tsai, J.-P., Li, Y.-S., Chen, M.-Y., Liu, H.-H., ... Chen, H.-W. (2011). A novel single-dose dengue subunit vaccine induces memory immune responses. *PloS One*, *6*(8), e23319. doi:10.1371/journal.pone.0023319
- Chu, J. J. H., Rajamanonmani, R., Li, J., Bhuvanakantham, R., Lescar, J., & Ng, M.-L. (2005). Inhibition of West Nile virus entry by using a recombinant domain III from the envelope glycoprotein. *The Journal of General Virology*, *86*(Pt 2), 405–12. doi:10.1099/vir.0.80411-0
- Chua, A. J., Vituret, C., Tan, M. L., Gonzalez, G., Boulanger, P., Ng, M.-L., & Hong, S.-S. (2013). A novel platform for virus-like particle-display of flaviviral envelope domain III: induction of Dengue and West Nile virus neutralizing antibodies. *Virology Journal*, *10*, 129. doi:10.1186/1743-422X-10-129
- Crill, W. D., & Roehrig, J. T. (2001). Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of . doi:10.1128/JVI.75.16.7769
- Di Bonito, P., Grasso, F., Mochi, S., Petrone, L., Fanales-Belasio, E., Mei, A., ... Federico, M. (2009). Anti-tumor CD8+ T cell immunity elicited by HIV-1-based virus-like particles incorporating HPV-16 E7 protein. *Virology*, *395*, 45–55. doi:10.1016/j.virol.2009.09.012
- Durbin, A. P., & Whitehead, S. S. (2011). Next-generation dengue vaccines: novel strategies currently under development. *Viruses*, *3*(10), 1800–14. doi:10.3390/v3101800
- Etemad, B., Batra, G., Raut, R., Dahiya, S., Khanam, S., Swaminathan, S., & Khanna, N. (2008). An envelope domain III-based chimeric antigen produced in *Pichia*

- pastoris elicits neutralizing antibodies against all four dengue virus serotypes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(3), 353–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18784226>
- Fonseca, B. A., Khoshnood, K., Shope, R. E., & Mason, P. W. (1991). Flavivirus type-specific antigens produced from fusions of a portion of the E protein gene with the *Escherichia coli* trpE gene. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44, 500–508.
- Gould, E. A., & Solomon, T. Pathogenic flaviviruses. , 371 *Lancet* 500–509 (2008). doi:10.1016/S0140-6736(08)60238-X
- Gubler, D. J., & Clark, G. G. (1994). COMMUNITY-BASED INTEGRATED CONTROL OF Aedes-Aegypti - A BRIEF OVERVIEW OF CURRENT PROGRAMS. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50, 50–60.
- Guirakhoo, F., Pugachev, K., Arroyo, J., Miller, C., Zhang, Z.-X., Weltzin, R., ... Monath, T. P. (2002). Viremia and immunogenicity in nonhuman primates of a tetravalent yellow fever-dengue chimeric vaccine: genetic reconstructions, dose adjustment, and antibody responses against wild-type dengue virus isolates. *Virology*, 298, 146–159. doi:10.1006/viro.2002.1462
- Guirakhoo, F., Pugachev, K., Zhang, Z., Myers, G., Levenbook, I., Draper, K., ... Monath, T. (2004). Safety and efficacy of chimeric yellow Fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. *Journal of Virology*, 78, 4761–4775. doi:10.1128/JVI.78.9.4761-4775.2004
- Guy, B. (2007). The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(7), 505–17. doi:10.1038/nrmicro1681
- Guy, B., Nougarede, N., Begue, S., Sanchez, V., Souag, N., Carre, M., ... Forrat, R. (2008). Cell-mediated immunity induced by chimeric tetravalent dengue vaccine in naive or flavivirus-primed subjects. *Vaccine* (Vol. 26, pp. 5712–5721). doi:10.1016/j.vaccine.2008.08.019
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., ... Peeling, R. W. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(12 Suppl), S7–16. doi:10.1038/nrmicro2460
- Guzmán, M., & Kouri, G. (2002). Dengue: an update. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(January), 33–42. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309901001712>
- Halstead, S. B. (2007). Dengue. *Lancet*, 370(9599), 1644–52. doi:10.1016/S0140-6736(07)61687-0
- Halstead, S. B. (2013). Dengue: the syndromic basis to pathogenesis research. Inutility of the 2009 WHO case definition. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(2), 212–5. doi:10.4269/ajtmh.12-0197

- Halstead, S. B., & Thomas, S. J. (2007). Dengue vaccines, 44.
- Henry, K. A., Murira, A., Houten, N. E. Van, & Scott, J. K. (2011). using filamentous phage as a model antigen, (October), 275–283.
- Hombach, J., Cardoso, M. J., Sabchareon, A., Vaughn, D. W., & Barrett, A. D. T. (2007). 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*. doi:10.1016/j.vaccine.2007.02.079
- Huang, C. Y.-H., Butrapet, S., Tsuchiya, K. R., Bhamarapavati, N., Gubler, D. J., & Kinney, R. M. (2003). Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. *Journal of Virology*, 77, 11436–11447. doi:10.1128/JVI.77.21.11436-11447.2003
- Huber, S. a, & Pfaeffle, B. (1994). Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus group B type 3. *Journal of Virology*, 68(8), 5126–32. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=236456&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hughes, H. R., Crill, W. D., & Chang, G.-J. J. (2012). Manipulation of immunodominant dengue virus E protein epitopes reduces potential antibody-dependent enhancement. *Virology Journal*, 9, 115. doi:10.1186/1743-422X-9-115
- Ito, M., Mukai, R., Takasaki, T., Kotaki, A., & Kurane, I. (2010). Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in vitro by undiluted sera from monkeys infected with heterotypic dengue virus. *Archives of Virology*, 155(10), 1617–24. doi:10.1007/s00705-010-0741-x
- Jaiswal, S., Khanna, N., & Swaminathan, S. (2004). High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 33(1), 80–91. doi:10.1016/j.pep.2003.09.009
- Jegerlehner, A., Storni, T., Lipowsky, G., Schmid, M., Pumpens, P., & Bachmann, M. F. (2002). Regulation of IgG antibody responses by epitope density and CD21-mediated costimulation. *European Journal of Immunology*, 32, 3305–3314. doi:10.1002/1521-4141(200211)32:11<3305::AID-IMMU3305>3.0.CO;2-J
- Jennings, G. T., & Bachmann, M. F. (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biological Chemistry*, 389(5), 521–536. doi:10.1515/BC.2008.064
- Kelly, E. P., Greene, J. J., King, A. D., & Innis, B. L. (2000). Purified dengue 2 virus envelope glycoprotein aggregates produced by baculovirus are immunogenic in mice, 18, 2549–2559.
- Khanam, S., Etemad, B., Khanna, N., & Swaminathan, S. (2006). Induction of neutralizing antibodies specific to dengue virus serotypes 2 and 4 by a bivalent antigen composed of linked envelope domains III of these two serotypes. *The*

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 74(2), 266–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16474083>

- Konishi, E., & Fujii, A. (2002). Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. *Vaccine*, 20, 1058–1067. doi:10.1016/S0264-410X(01)00446-7
- Kovacsovic-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B., & Rock, K. L. (1993). Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 4942–4946. doi:10.1073/pnas.90.11.4942
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., ... Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108(5), 717–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11893341>
- Kushnir, N., Streatfield, S. J., & Yusibov, V. (2012). Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 31, 58–83. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.083
- Kuwahara, M., & Konishi, E. (2010). Evaluation of extracellular subviral particles of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus produced by *Spodoptera frugiperda* cells for use as vaccine and diagnostic antigens. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 17, 1560–1566. doi:10.1128/CVI.00087-10
- Lei, H. Y., Yeh, T. M., Liu, H. S., Lin, Y. S., Chen, S. H., & Liu, C. C. (2001). Immunopathogenesis of dengue virus infection. *Journal of Biomedical Science*, 8, 377–388. doi:54058
- Leng, C.-H., Liu, S.-J., Tsai, J.-P., Li, Y.-S., Chen, M.-Y., Liu, H.-H., ... Chen, H.-W. (2009). A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 11(2), 288–95. doi:10.1016/j.micinf.2008.12.004
- Libraty, D. H., Endy, T. P., Houng, H.-S. H., Green, S., Kalayanarooj, S., Suntayakorn, S., ... Rothman, A. L. (2002). Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 185, 1213–1221. doi:10.1086/340365
- Mathew, A., & Rothman, A. L. (2008). Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunological Reviews*, 225, 300–13. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00678.x
- McArthur, J. H., Durbin, A. P., Marron, J. A., Wanionek, K. A., Thumar, B., Pierro, D. J., ... Whitehead, S. S. (2008). Phase I clinical evaluation of rDEN4Delta30-200,201: a live attenuated dengue 4 vaccine candidate designed for decreased hepatotoxicity. *The American journal of tropical medicine and hygiene* (Vol. 79, pp. 678–684). doi:79/5/678 [pii]

- McBride, W. J., & Bielefeldt-Ohmann, H. (2000). Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 2, 1041–1050. doi:S1286-4579(00)01258-2 [pii]
- Mehlhop, E., Ansarah-Sobrinho, C., Johnson, S., Engle, M., Fremont, D. H., Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2007). Complement protein C1q inhibits antibody-dependent enhancement of flavivirus infection in an IgG subclass-specific manner. *Cell Host & Microbe*, 2, 417–426. doi:10.1016/j.chom.2007.09.015
- Morrison, D., Legg, T. J., Billings, C. W., Forrat, R., Yoksan, S., & Lang, J. (2010). A novel tetravalent dengue vaccine is well tolerated and immunogenic against all 4 serotypes in flavivirus-naive adults. *The Journal of Infectious Diseases*, 201, 370–377. doi:10.1086/649916
- Mota, J., Acosta, M., Argotte, R., Figueroa, R., Méndez, A., & Ramos, C. (2005). Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. *Vaccine*, 23(26), 3469–76. doi:10.1016/j.vaccine.2004.12.028
- Mukhopadhyay, S., Kim, B. S., Chipman, P. R., Rossmann, M. G., & Kuhn, R. J. (2003). Structure of West Nile virus. *Science*, 302, 248. doi:10.1016/j.jmb.2008.11.026
- Murrell, S., Wu, S.-C., & Butler, M. (2011). Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnology Advances*, 29(2), 239–47. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.11.008
- Nguyen, N.-L., Kim, J.-M., Park, J.-A., Park, S.-M., Jang, Y.-S., Yang, M.-S., & Kim, D.-H. (2013). Expression and purification of an immunogenic dengue virus epitope using a synthetic consensus sequence of envelope domain III and *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification*, 88(2), 235–42. doi:10.1016/j.pep.2013.01.009
- Pattnaik, P., Babu, J. P., Verma, S. K., Tak, V., & Rao, P. V. L. (2007). Bacterially expressed and refolded envelope protein (domain III) of dengue virus type-4 binds heparan sulfate. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 846(1-2), 184–94. doi:10.1016/j.jchromb.2006.08.051
- Perrie, Y., Mohammed, A. R., Kirby, D. J., McNeil, S. E., & Bramwell, V. W. (2008). Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *International Journal of Pharmaceutics*, 364, 272–280. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.04.036
- Prisco, A., & De Berardinis, P. (2012a). Filamentous bacteriophage fd as an antigen delivery system in vaccination. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(4), 5179–94. doi:10.3390/ijms13045179

- Prisco, A., & De Berardinis, P. (2012b). Filamentous bacteriophage fd as an antigen delivery system in vaccination. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(4), 5179–94. doi:10.3390/ijms13045179
- Rabablert, J., & Yoksan, S. (2009). Attenuated D2 16681-PDK53 vaccine: defining humoral and cell-mediated immunity. *Current Pharmaceutical Design*, *15*, 1203–1211. doi:10.2174/138161209787846865
- Raviprakash, K., Apt, D., Brinkman, A., Skinner, C., Yang, S., Dawes, G., ... Porter, K. (2006). A chimeric tetravalent dengue DNA vaccine elicits neutralizing antibody to all four virus serotypes in rhesus macaques. *Virology*, *353*, 166–173. doi:10.1016/j.virol.2006.05.005
- Robert Putnak, J., Collier, B.-A., Voss, G., Vaughn, D. W., Clements, D., Peters, I., ... Innis, B. L. (2005). An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine*, *23*, 4442–4452. doi:10.1016/j.vaccine.2005.03.042
- Rodenhuis-Zybert, I. a, van der Schaar, H. M., da Silva Voorham, J. M., van der Ende-Metselaar, H., Lei, H.-Y., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2010). Immature dengue virus: a veiled pathogen? *PLoS Pathogens*, *6*(1), e1000718. doi:10.1371/journal.ppat.1000718
- Rodriguez-Roche, R., Alvarez, M., Gritsun, T., Halstead, S., Kouri, G., Gould, E. A., & Guzman, M. G. (2005). Virus evolution during a severe dengue epidemic in Cuba, 1997. *Virology*, *334*, 154–159. doi:10.1016/j.virol.2005.01.037
- Roehrig, J. T. (2003). Antigenic structure of flavivirus proteins. *Advances in Virus Research*, *59*, 141–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14696329>
- Rothman, A. L. (2011). Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature Reviews. Immunology*, *11*(8), 532–43. doi:10.1038/nri3014
- Sabchareon, A., Lang, J., Chanthavanich, P., Yoksan, S., Forrat, R., Attanath, P., ... Bhamarapavati, N. (2004). *Safety and immunogenicity of a three dose regimen of two tetravalent live-attenuated dengue vaccines in five- to twelve-year-old Thai children*. *The Pediatric infectious disease journal* (Vol. 23, pp. 99–109). doi:10.1097/01.inf.0000109289.55856.27
- Sabchareon, A., Wallace, D., Sirivichayakul, C., Limkittikul, K., Chanthavanich, P., Suvannadabba, S., ... Lang, J. (2012). Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *The Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(12)61428-7
- Sambrook, J., & W Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 999. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=YTxKwWUiBeUC&printsec=frontcover&npapers2://publication/uuid/BBBF5563-6091-40C6-8B14-06ACC3392EBB>

- Sanchez, V., Gimenez, S., Tomlinson, B., Chan, P. K. S., Thomas, G. N., Forrat, R., ... Guy, B. (2006). *Innate and adaptive cellular immunity in flavivirus-naïve human recipients of a live-attenuated dengue serotype 3 vaccine produced in Vero cells (VDV3)*. *Vaccine* (Vol. 24, pp. 4914–4926). doi:10.1016/j.vaccine.2006.03.066
- Seema, & Jain, S. K. (2005). Molecular mechanism of pathogenesis of dengue virus: Entry and fusion with target cell. *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB*, 20(2), 92–103. doi:10.1007/BF02867407
- Silva, E. F., Orsi, M., Andrade, A. L., Domingues, R. Z., Silva, B. M., de Araújo, H. R. C., ... Coelho, L. F. L. (2012). A tetravalent dengue nanoparticle stimulates antibody production in mice. *Journal of Nanobiotechnology*, 10(1), 13. doi:10.1186/1477-3155-10-13
- Simmons, M., Burgess, T., Lynch, J., & Putnak, R. (2010a). Protection against dengue virus by non-replicating and live attenuated vaccines used together in a prime boost vaccination strategy. *Virology*, 396(2), 280–8. doi:10.1016/j.virol.2009.10.023
- Simmons, M., Burgess, T., Lynch, J., & Putnak, R. (2010b). Protection against dengue virus by non-replicating and live attenuated vaccines used together in a prime boost vaccination strategy. *Virology*, 396(2), 280–8. doi:10.1016/j.virol.2009.10.023
- Simmons, M., Murphy, G. S., Kochel, T., Raviprakash, K., & Hayes, C. G. (2001). Characterization of antibody responses to combinations of a dengue-2 DNA and dengue-2 recombinant subunit vaccine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(5), 420–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11716093>
- Spohn, G., Jennings, G. T., Martina, B. E., Keller, I., Beck, M., Pumpens, P., ... Bachmann, M. F. (2010). A VLP-based vaccine targeting domain III of the West Nile virus E protein protects from lethal infection in mice. *Virology Journal*, 7, 146. doi:10.1186/1743-422X-7-146
- Srivastava, A. K., Putnak, J. R., Warren, R. L., & Hoke, C. H. (1995). Mice immunized with a dengue type 2 virus E and NS1 fusion protein made in *Escherichia coli* are protected against lethal dengue virus infection. *Vaccine*, 13, 1251–1258. doi:10.1016/0264-410X(94)00059-V
- Storni, T., & Bachmann, M. F. (2004). Loading of MHC class I and II presentation pathways by exogenous antigens: a quantitative in vivo comparison. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172, 6129–6135.
- Thepparit, C., & Smith, D. R. (2004). Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *Journal of Virology*, 78, 12647–12656. doi:10.1128/JVI.78.22.12647-12656.2004

- Van Houten, N. E., Henry, K. a, Smith, G. P., & Scott, J. K. (2010a). Engineering filamentous phage carriers to improve focusing of antibody responses against peptides. *Vaccine*, 28(10), 2174–85. doi:10.1016/j.vaccine.2009.12.059
- Van Houten, N. E., Henry, K. a, Smith, G. P., & Scott, J. K. (2010b). Engineering filamentous phage carriers to improve focusing of antibody responses against peptides. *Vaccine*, 28(10), 2174–85. doi:10.1016/j.vaccine.2009.12.059
- Wang, W.-K., Chao, D.-Y., Kao, C.-L., Wu, H.-C., Liu, Y.-C., Li, C.-M., ... King, C.-C. (2003). High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology*, 305, 330–338. doi:10.1006/viro.2002.1704
- Whitehead, S. S., Blaney, J. E., Durbin, A. P., & Murphy, B. R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(7), 518–28. doi:10.1038/nrmicro1690
- Whitehead, S. S., Falgout, B., Hanley, K. A., Blaney Jr, J. E., Markoff, L., & Murphy, B. R. (2003). A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. *Journal of Virology*, 77, 1653–1657. doi:10.1128/JVI.77.2.1653-1657.2003
- Williams, K. L., Wahala, W. M. P. B., Orozco, S., de Silva, A. M., & Harris, E. (2012). Antibodies targeting dengue virus envelope domain III are not required for serotype-specific protection or prevention of enhancement in vivo. *Virology*, 429(1), 12–20. doi:10.1016/j.virol.2012.03.003
- Williams, K. L., Zompi, S., Beatty, P. R., & Harris, E. (2009). A mouse model for studying dengue virus pathogenesis and immune response. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1171 Suppl, E12–23. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05057.x
- Zhang, S., Liang, M., Gu, W., Li, C., Miao, F., Wang, X., ... Li, D. (2011). Vaccination with dengue virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in mice. *Virology Journal*, 8, 333. doi:10.1186/1743-422X-8-333
- Zinkernagel, R. M., Bachmann, M. F., Kündig, T. M., Oehen, S., Pirchet, H., & Hengartner, H. (1996). On immunological memory. *Annual Review of Immunology*, 14, 333–67. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.333
- Zivny, J., DeFronzo, M., Jarry, W., Jameson, J., Cruz, J., Ennis, F. A., & Rothman, A. L. (1999). Partial agonist effect influences the CTL response to a heterologous dengue virus serotype. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163, 2754–2760. doi:ji_v163n5p2754 [pii]