

**Centro de Ingeniería Genética y
Biotecnología División de
Vacunas**

*Obtención, caracterización y evaluación de la
funcionalidad de proteínas quiméricas P64k-Dengue*

**Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias
Biológicas**

Autora: Lic. Lisset Hermida Cruz

Tutores: Dr. Ricardo Silva Rodríguez
Dr. Gerardo Guillén Nieto

Ciudad de La Habana 2004

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido (s)
Ac(s)	Anticuerpos
AcM(s)	Anticuerpo (s) monoclonal (es)
ADA	Amplificación dependiente de anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APL	Ligando peptídico. modificado (del inglés: <i>Altered peptide ligands</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	Colección americana de cultivos (del inglés: <i>American Type Culture Collection</i>)
BCA	Ensayo del ácido bicinconínico (del inglés: <i>Bicinchoninic Acid assay</i>)
C	Proteína de la cápside
CN	Cerebro normal
CTL	Linfocitos T citotóxicos (del inglés: <i>Cytotoxic T-Lymphocytes</i>)
D.O	Densidad óptica
Da	Daltons
DAB	Diaminobenzidina
DEN	Dengue
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
E	Envoltura
EDTA	Ácido etilén-diamino-teti acético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (del inglés: <i>Epidermic Growth Factor</i>)
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (del inglés: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FA-DEN	Fiebre amarilla-dengue
FD	Fiebre del dengue
FDA	Administración de alimentación y drogas (del inglés: <i>Food and Drug Administration</i>)
FHD	Fiebre hemorrágica del dengue
g	Gravedades
h	Horas
HLA	Antígeno de leucocitos humanos (del inglés: <i>Human Leucocyte Antigen</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés: <i>High performance liquid chromatography</i>)
ICAM	Molécula de adhesión intercelular (del inglés: <i>Intercellular adhesión molecule</i>)
igG	Inmunoglobulina G
igM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
IMAC	Cromatografía de afinidad por iones metálicos (del inglés: <i>Ion Metal Affinity Chromatography</i>)
INF-γ	Interferón γ
kb	1000 pares de bases
kDa	1000 Daltons
LAH(s)	Líquido ascítico hiperinmune murino(s)
LAN	Líquido ascítico murino normal
LBA	Medio Luria Bertani suplementado con ampicilina a 50 ng/mL
MBP	Proteína de unión a maltosa (del inglés: <i>Maltose Binding Protein</i>)
MEM	Medio mínimo esencial (del inglés: <i>Minimal Esential Médium</i>)

MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés: <i>Mayor Histocompatibility complex</i>)
min	Minutos
NIH	Instituto nacional de salud (del inglés: <i>National Institute of Health</i>)
NS	Proteínas no estructurales
PAGE	Electroforesis en geles de poNacrilamida (del inglés: <i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés: <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PPM	Patrón de pesos moleculares
PR	Pases en cerebro de ratón
Pre	Porcentaje de reducción
PrM-M	Proteína Premembrana-Membrana
PRNT	Ensayo de neutralización por reducción de placas (del inglés: <i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>)
RER	Retículo endoplásmático rugoso
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SFBI	Suero fetal bovino inactivado
T.A	Temperatura ambiente
TE	Tris EDTA
TGF	Factor de crecimiento tisular (del inglés: <i>Tissue Growth Factor</i>)
TGF-p	Factor de crecimiento humoral (del inglés: <i>Tumour Growth Factor</i>)
Th1	Respuesta T auxiliadora de tipo 1 (del inglés: <i>T-helper 1</i>)
Th2	Respuesta T auxiliadora de tipo 2 ((del inglés: <i>T-helper 2</i>)
TNF-a	Factor de necrosis tumoral a (del inglés: <i>Tumour Necrosis Factor a</i>)
Tris	Tris (hidroximetil)-metilamina
TT	Toxoide tetánico
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular (del inglés: <i>Vascular Celi Adhesion Molecule</i>)

TABLA DE CONTENIDO

1	SÍNTESIS	1
2	INTRODUCCIÓN	2
3	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
3.1	Características de los <i>flavivirus</i>	6
3.2	Proteína de la et voltura del dengue	6
3.3	Replicación viral	7
3.4	Características clínicas del dengue	9
3.5	Situación epidemiológica	10
3.6	Epidemias en Cuba	10
3.7	Factores relacionados con la fiebre hemorrágica del dengue	11
3.7.1	Factores epidemiológicos e inmunológicos	11
3.7.2	Factor viral	12
3.8	Inmunopatogénesis vs protección	13
3.8.1	Amplificación dependiente de anticuerpos	13
3.8.2	Respuesta celular de reactividad cruzada	14
3.8.3	Replicación viral	15
3.8.4	Patogénesis y papel de las citoquinas	16
3.8.5	Protección en dengue	17
3.9	Desarrollo de vacunas	19
3.9.1	Vacunas vivas atenuadas	19
3.9.2	Candidatos vacunales basados en la tecnología del ADN recombinante	21
3.10	P64k como proteína portadora	24
4	MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1	Cepas de <i>Escherichia coli</i> K12	26
4.2	Líneas celulares, cepas y antígenos virales	26
4.3	Anticuerpos monoclonales y policlonales	27
4.4	Obtención de las construcciones quiméricas	27
4.5	Obtención de la biomasa	29
4.6	Procesos de semipurificación de las proteínas quiméricas	30
4.7	Análisis por cromatografía líquida de alta resolución	31
4.8	Determinación de la concentración de proteínas	31
4.9	Electroforesis en geles de poliacrilamida	31
4.10	Western blotting	31
4.11	Dot blotting	32
4.12	Esquemas de inmunización	32
4.13	Determinación de anticuerpos antivirales murinos	32
4.14	Ensayo de neutralización <i>in vitro</i>	33
4.15	Ensayo de protección en ratones	34
4.16	Esquema de inmunización en monos <i>Macaca fascicularis</i>	34
4.17	Ensayo de reto en monos	35
4.18	Aislamiento viral	35
4.19	Detección de viremia por RT-PCR	35
4.20	Análisis estadístico	35
5	RESULTADOS	37

5.1	Diseño, clonación y expresión de las proteínas PD2, PD3 y PD5	37
5.2	Procesos de semipurificación	40
5.3	Caracterización antigénica	42
5.4	Evaluación inmunológica en ratones	44
5.5	Ensayo de protección	45
5.6	Consideraciones generales	47
5.7	Evaluación inmunológica en monos <i>Macaca fascicularis</i>	47
5.8	Consideraciones generales	50
5.9	Clonación y expresión de las variantes de fusión al C-terminal de la P64k correspondientes a los serotipos 1, 3 y 4	50
5.1	Procesos de semipurificación	52
5.11	Caracterización antigénica	53
5.12	Evaluación inmunológica en ratones	54
5.13	Ensayos de protección	55
5.14	Consideraciones generales	59
6	DISCUSIÓN	61
7	CONCLUSIONES	78
8	RECOMENDACIONES	79
9	BIBLIOGRAFÍA	80
10	AUTOBIOGRAFÍA RELACIONADA CON LA TESIS	93

1 SÍNTESIS

Entre 50 y 100 millones de casos de Fiebre del Dengue y de 250 000 a 500 000 de Fiebre Hemorrágica del Dengue son reportados cada año en el mundo y actualmente no existe en el mercado una vacuna disponible contra dicha enfermedad. Con el objetivo de desarrollar un candidato vacunal por subunidades se tomó como objeto de investigación un fragmento de la envoltura del virus del Dengue. Se conoce que dicha proteína es reconocida por anticuerpos neutralizantes generados por la inmunización viral, así como su capacidad de inducir en su forma nativa una respuesta inmune funcional. El fragmento objeto del estudio contiene un dominio estructural involucrado en la interacción con el posible receptor celular.

El fragmento correspondiente al serotipo 2 se obtuvo fusionado al N-terminal de la proteína P64k (PD2), insertado dentro de la P64k completa (PD3) y fusionado al C-terminal de ésta (PD5). La proteína P64k es una lipoamida deshidrogenasa de *Neisseria meningitidis* la cual se obtiene con altos niveles en *Escherichia coli* y es capaz de actuar como portadora de proteínas heterólogas y polisacáridos. Después de la semipurificación de las tres construcciones quiméricas, se evidenció por primera vez el efecto de plegamiento conferido por la proteína P64k sobre el fragmento de la envoltura del virus Dengue. Posteriormente, se demostró la inducción de una respuesta inmune funcional tras la inmunización en ratones con las proteínas PD3 y PD5. Seguidamente, ambas construcciones quiméricas se evaluaron en monos *Macaca fascicularis*. Se pudo demostrar la inducción de una respuesta neutralizante similar y una protección total con la proteína PD5 frente al reto con el virus homólogo medida por aislamiento viral. Estos resultados presentan un alto nivel de novedad ya que por primera vez en el mundo se demuestra que esta región estructural viral, fusionada al C-terminal de una proteína portadora es capaz de generar una inmunidad protectora en primates.

Tomando como base lo antes expuesto, se desarrollaron las construcciones homologas correspondientes al resto de los tres serotipos virales (PD10, PD18, PD19). Dichas proteínas se semipurificaron y después de la evaluación en ratones, se demostró la generación de una respuesta inmune funcional contra los virus homólogos. En general podemos afirmar que en este trabajo se evidencia la capacidad del fragmento de la proteína de la envoltura del virus del Dengue, fusionado a la proteína P64k, de generar una respuesta inmune funcional.

2 INTRODUCCIÓN

La fiebre del dengue (FD) y la fiebre hemorrágica del dengue (FHD) adquieren cada vez mayor importancia como problemas de salud que afectan a numerosos países de las zonas, tropicales y subtropicales de nuestro planeta. El dengue ha sido reconocido en más de 100 países y se estima que 2 500 millones de personas viven en áreas de riesgo. Cada año se reportan entre 50 y 100 millones de casos de FD y 250 000 a 500 000 de FHD (Guzmán y Kourí, 2002).

El agente causal de esta enfermedad es el virus dengue, perteneciente a la familia Flaviviridae, género *Flavivirus*, el cual se transmite por la picada del mosquito *Aedes aegypti* (Leyssen *et al.*, 2000). Hasta el momento se han reportado cuatro serotipos virales los que pueden circular en una misma región. Es un virus envuelto ARN positivo, cuyo genoma contiene un solo marco de lectura que es traducido en forma de una poliproteína que luego es procesada en tres proteínas estructurales y siete no estructurales (Russell *et al.*, 1980).

Se han realizado múltiples estudios epidemiológicos con el objetivo de determinar los factores de riesgo que conllevan a la forma más severa de la enfermedad, la cual se caracteriza por alta fiebre, extravasación de líquidos, hemorragias y finalmente el shock por dengue (Gubler, 1998). Uno de los factores de riesgo más definido lo constituye la infección secundaria por un serotipo heterólogo, lo cual implica que no existe protección cruzada entre las infecciones de los diferentes serotipos (Kourí *et al.*, 1989). Existen varias hipótesis para explicar dicho fenómeno entre las que se destaca la amplificación viral dependiente de anticuerpos (Halstead *et al.*, 1969).

Tomando como base dichas observaciones y las hipótesis planteadas, el desarrollo de vacunas contra el dengue está basado en la obtención de candidatos capaces de proteger contra los cuatro serotipos, de lo contrario se contribuiría a susceptibilizar al individuo frente a una infección heteróloga subsecuente.

Actualmente no existe una vacuna disponible en el mercado y los candidatos más avanzados en el mundo están constituidos por cepas atenuadas del virus, las cuales tienen limitaciones como la posibilidad de reversión y la reactogenicidad detectada en humanos (Bhamarapravati y Sutee, 2000; Kanesa-athan *et al.*, 2001). Consecuentemente, existen también limitaciones desde el punto de vista regulatorio por lo que la variante de una formulación basada en proteínas recombinantes constituye una alternativa superior como candidato vacunal. Dentro de las proteínas estructurales blancas para el desarrollo de vacunas, la proteína de la envoltura (E) ha sido la más estudiada ya que es el principal determinante antigénico del

Introducción

virus, blanco de anticuerpos (Acs) neutralizantes y media la unión a la célula a través de su dominio estructural III (Rey *et al.*, 1995). Se han reportado estudios relacionados con la obtención de la proteína E en varios sistemas de expresión (Deubel *et al.*, 1991; Velzing *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2003). Dentro de las mayores dificultades presentadas en nuestro grupo y lo reportado en la literatura tras la obtención de la proteína E recombinante están los bajos rendimientos en los sistemas eucarióticos, los mecanismos de renaturalización *in vitro* de las formas insolubles de las proteínas y la inducción de respuesta protectora parcial al ser ensayadas en primates no humanos. Como alternativa, se han reportado variantes de fusión de fragmentos de dicha proteína a proteínas portadoras producidas en la bacteria *Escherichia coli* (Srivastava *et al.*, 1995; Simmons *et al.*, 1998). Si bien los resultados en términos de respuesta neutralizante y protectora en ratones han sido satisfactorios, éstas no han sido evaluadas en primates no humanos. Por otra parte, los procesos de purificación de los antígenos no han sido desarrollados con fines productivos y las proteínas portadoras ensayadas no se han evaluado en humanos.

En el CIGB se ha obtenido y caracterizado una proteína proveniente de la membrana externa de la bacteria *Neisseria meningitidis* (Silva *et al.*, 1992). La variante recombinante, P64k, resultó ser altamente inmunogénica en ratones y monos además de ser empleada como portadora de proteínas heterólogas (Guillén *et al.*, 1998; González *et al.*, 2000a). Por último, en el año 1998 se demostró su seguridad en humanos (Pérez *et al.*, 2001).

Tomando como base los datos antes expuestos, en el presente trabajo nos propusimos la siguiente hipótesis:

El fragmento de la proteína de la envoltura del virus dengue (del aminoácido 286 al 426) fusionado a la proteína P64k de *Neisseria meningitidis* y obtenido con altos niveles en *Escherichia coli*, es capaz de generar una respuesta inmune funcional contra el virus del serotipo homólogo en animales.

Para cumplimentar la hipótesis nos trazamos los siguientes objetivos:

1. Definir las posiciones de fusión del fragmento viral de la proteína E del DEN-2 (aminoácidos 286 al 426) a la proteína P64k y demostrar la generación de una respuesta inmune funcional en animales de las proteínas quiméricas resultantes.
2. Desarrollar las construcciones para el resto de los serotipos del dengue y demostrar su funcionalidad en ratones.

Introducción

Para el cumplimiento de los objetivos, se acometieron las siguientes tareas:

- > Clonación y expresión de todas las variantes de genes quiméricos correspondientes a los cuatro serotipos del virus.
- > Semipurificación y caracterización por HPLC de las proteínas de fusión resultantes.
- > Estudio de la reactividad de las formas semipurificadas de las proteínas quiméricas frente a sueros policlonales murinos, humanos y a un anticuerpo monoclonal.
- > Esquemas de inmunización en animales con las proteínas quiméricas. Determinación de Acs antivirales, neutralizantes y protección frente al serotipo homólogo.

Las proteínas quiméricas desarrolladas en este trabajo, basadas en el fragmento de la proteína de la envoltura viral que contiene el dominio III y la proteína P64k, constituyen un aporte científico de gran valor en el desarrollo de formulaciones vacunales contra el virus dengue. Éstas fueron capaces de generar una respuesta inmune funcional tanto en ratones como en primates, resultado de alto impacto y **novedad científica** ya que por primera vez en el mundo se demuestra la capacidad de un fragmento de la proteína de la envoltura de impedir el aislamiento viral en monos inoculados con el virus nativo. Adicionalmente, la fusión a la proteína P64k y la naturaleza recombinante de las proteínas quiméricas tienen la ventaja de evitar, en una formulación futura para humanos, la reactividad frecuentemente detectada en los candidatos de virus atenuados. Por otra parte, la **importancia teórica** de este trabajo radica en que se describe la factibilidad de la renaturalización *in vitro* de las proteínas quiméricas resultantes en el desarrollo de Acs neutralizantes. Paralelamente, del estudio del efecto de las posiciones de la fusión del fragmento viral en la proteína P64k se define que las inserciones en el dominio de unión a ácido lipoico de la P64k provocan la degradación extensiva de la proteína quimérica resultante. Como alternativa se demuestra que cuando la fusión ocurre en el extremo C- terminal de la misma, la degradación no se detecta. Este resultado es de gran **importancia práctica**, considerando que la P64k está siendo empleada actualmente en otros proyectos del Polo Científico, como portadora con fines vacunales.

Adicionalmente, al obtenerse los altos niveles de expresión con estas construcciones en *E. coli*, se podrá disponer de un proceso de producción fácilmente escalable y económico, problema fundamental en las vacunas contra el dengue ya que la formulación debe contener el principio activo correspondiente a los cuatro serotipos virales. El contar en los próximos años con una formulación vacunal cubana contra el virus dengue reviste una gran importancia económica y social.

Introducción

La tesis está estructurada en 98 páginas y contiene los siguientes capítulos: Síntesis, Introducción, Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Recomendaciones, Referencias Bibliográficas y Autobiografía relacionada con la tesis. El trabajo contiene, además, una Lista de Abreviaturas y una Tabla de Contenido. Los resultados obtenidos se reflejan en una patente publicada internacionalmente, cuatro artículos publicados en revistas internacionales y uno enviado bajo revisión. Además, han sido objeto de dos Tesis de Diploma tutoradas por la aspirante y de 13 presentaciones en eventos internacionales. La tesis se pre-defendió ante el Consejo Científico de la Facultad de Biología y está avalada por cuatro logros del CIGB y un premio relevante en el XV Forum de Ciencia y Técnica al nivel provincial en el 2003 que se presentará en la comisión nacional en el presente año.

Esta investigación se desarrolló en el marco del proyecto de desarrollo de una vacuna contra el dengue que forma parte del Programa Nacional de Vacunas del CITMA, el cual se ejecuta en colaboración entre el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”.

Los resultados de neutralización y reto viral en monos presentados en esta tesis, conjuntamente con otros resultados de la respuesta inmune (no reflejados en este trabajo) formarán parte de los objetivos de la propuesta de tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas del Lic. Rayner Rodríguez, investigador del IPK, quien junto con la Lic. Lisset Hermida es autor principal de esta estrategia vacunal.

3 REVISION BIBLIOGRAFICA

3.1 Características de los flavivirus

La familia *Flaviviridae* contiene tres géneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus* y *Pestivirus* (Leyssen *et al.*, 2000). El género *Flavivirus* está compuesto por aproximadamente 70 virus entre los que se encuentra el virus del dengue.

Los viriones maduros tienen una estructura esférica de 40 a 50 nm de diámetro, con densidad de 1,23 g/cm³ y un coeficiente de sedimentación de 210 S (Russell *et al.*, 1980). La envoltura proviene de las membranas de las células hospedadoras y la nucleocápsida tiene una estructura poco ordenada, en la que el ARN tiene suficiente espacio y puede extenderse hasta el radio más externo de la misma (Kuhn *et al.*, 2002).

El genoma consiste de un ARN positivo de simple cadena, de aproximadamente 11 kb (Heinz y Roehrig, 1990; Henschal y Putnak, 1990), que está metilado en su extremo 5' (Wengler y Gross, 1978; Cleaves y Dubin, 1979) y no presenta cola poliadenilada en el extremo 3' (Hahn *et al.*, 1988; Irie *et al.*, 1989). Contiene un solo marco de lectura y las proteínas están codificadas en el siguiente orden: 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B- NS5-3'. El genoma es traducido en forma de una poliproteína que luego es procesada por enzimas virales y celulares en tres proteínas estructurales y siete no estructurales (Zhao *et al.*, 1986; Henschal y Putnak, 1990).

3.2 Proteína de la envoltura del dengue

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 (Guzmán y Kourí, 1996). El monómero contiene aproximadamente 500 residuos aminoacídicos (Chambers *et al.*, 1990). Presenta un extenso dominio N-terminal anclado en la membrana por un fragmento hidrofóbico C-terminal. Doce residuos aminoacídicos de cisteína forman seis puentes disulfuros intramoleculares en su estructura (Nowak y Wengler, 1987; Hahn *et al.*, 1988). Esta proteína desempeña un papel esencial en la unión a los sitios receptores, la fusión a las membranas celulares y el ensamblaje de los viriones. Además, es el principal determinante antigénico (Rey *et al.*, 1995).

La cadena polipeptídica que conforma el fragmento soluble de la proteína E se ensambla en tres dominios distintivos: un dominio central en hoja plegada (dominio I), una región de dimerización elongada (dominio II) y una tercera región tipo inmunoglobulina (dominio III) (Rey *et al.*, 1995; Rey, 2003). Específicamente este último es el dominio carboxilo-terminal

(303-395) del dímero soluble de la proteína E, el cual se ha relacionado con la presencia de epitopos de anticuerpos (Acs) neutralizantes además de constituir la región de unión al receptor celular (Rey *et al.*, 1995). Recientemente, al determinarse la estructura del virión del dengue (DEN) se pudo corroborar la exposición del mismo en la estructura (Kuhn *et al.*, 2003).

3.3 Replicación viral

Una de las incógnitas más importantes sobre la patogénesis del dengue es el mecanismo mediante el cual el virus se une a la célula hospedera. En algunos tipos celulares la entrada del virus se produce mediante la unión de los complejos virus-Acs formados en respuesta a la reinfección, con los receptores para la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulinas sobre la superficie de esas células, potenciando la infectividad dada por el incremento de la entrada del virus a la célula diana (Potterfield, 1986). También se ha descrito para *flavivirus* mecanismos similares en los que los complejos IgM-virus utilizan el receptor del CD3 (Cardosa *et al.*, 1983). Sin embargo, este mecanismo no puede explicar las infecciones primarias en personas que no tienen anticuerpos contra el virus, ni la capacidad de éste para infectar células que no expresan los FcR (He *et al.*, 1995).

Las observaciones sobre la cinética de unión del dengue y otros *flavivirus* a las células diana sugieren que este proceso está mediado por un receptor. La identificación de dicho receptor aún no ha sido posible, aunque parece no haber dudas de que la proteína de la envoltura del virus está involucrada en el proceso de unión al mismo (Anderson *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1996).

En experimentos realizados con el serotipo 2 del virus del dengue, Chen *et al.* (1997) demostraron que éste se une selectivamente a moléculas de sulfato de heparina sobre la superficie de las células diana mediante la proteína de la envoltura viral. Las moléculas de sulfato de heparina son glicosaminoglicanos presentes en todos los tejidos y solo difieren en la complejidad y el grado de sulfatación. Los glicosaminoglicanos son carbohidratos complejos cargados que se encuentran tanto en la superficie de la célula como en la matriz extracelular (Gibbs, 2003). Asociados a las proteínas, conforman una familia de macromoléculas llamadas proteoglicanos los cuales están involucrados en las interacciones célula-célula y en la proliferación celular (Chen *et al.*, 1997). No obstante, se ha planteado que estas moléculas pueden no ser suficientes o incluso necesarias para la ocurrencia de la infección viral (Bielefeldt-Ohmann, 1998). Una hipótesis alternativa es que las moléculas de sulfato de heparina actúan concentrando a las partículas virales sobre la superficie celular, y

posteriormente la proteína de la envoltura del virus se une con gran especificidad y afinidad a un receptor o correceptor que activa la endocitosis (Anderson *et al.*, 1992).

Adicionalmente al rol de las moléculas de sulfato de heparina, recientemente se reportó la molécula DC SIGN como un posible receptor del virus DEN. Dentro de los experimentos más convincentes se encuentra la demostración de la entrada del virus a la línea celular THP, únicamente cuando ésta es transfectada con el gen del DC SIGN (Tassaneetrithep *et al.*, 2003b). Similar a lo de los proteoglicanos, se piensa que no constituye el único receptor para DEN, ya que ésta molécula actúa también en la entrada de otros virus a sus células diana.

Una vez en la vesícula endocítica, la exposición a un pH ligeramente ácido, inferior a 6,5, induce un cambio conformacional irreversible en la proteína E (Nawa, 1996), que incluye una reasociación en trímeros (Allison *et al.*, 1995). Este cambio facilita la fusión posterior de la membrana del virus a la del endosoma, con la que se produce la salida de la nucleocápsida hacia el citosol. Ocurrida la liberación del genoma viral, la región 5' no traducida conduce al ARN hacia los ribosomas, donde ocurre la traducción del único marco de lectura (Leyssen *et al.*, 2000). La poliproteína resultante es procesada *in vivo* y postraduccionalmente para dar lugar a las 10 proteínas virales. Este procesamiento se lleva a cabo por proteasas celulares y virales. La traducción temprana ocurre asociada al retículo endoplasmático rugoso (RER), siendo posible localizar las proteínas del virus en su contexto característico, ya sea luminal, en la membrana del RER o en el citoplasma (Rice, 1996).

Ya formadas varias proteínas no estructurales éstas se asocian para formar un complejo de replicasa viral (ARN polimerasa ARN dependiente). El complejo se une específicamente a la región 3' no traducida del genoma del virus y comienza la formación de un ARN intermediario de sentido negativo. Tomando como molde esta cadena negativa, se genera una nueva cadena de ARN positivo. En los comienzos de la infección la síntesis de las cadenas positiva y negativa de ARN ocurre a velocidades similares, pero posteriormente la proporción se torna a favor de la síntesis de la cadena positiva (Westaway, 1987). Luego de la replicación el genoma viral es cubierto por las proteínas de la nucleocápsida.

En las células infectadas con *flavivirus* y donde se produce la replicación viral efectiva es notable la proliferación de organelos membranosos como el RER y el complejo de Golgi (McBride y Bielefeldt-Ohmann, 2000), lo que indica una estrecha asociación de la replicación viral con las membranas. Durante el paso a través de estos organelos la nucleocápsida se rodea con una envoltura lipídica y la proteína de la envoltura se gllicosila. Las partículas

virales se acumulan en vesículas intracitoplasmáticas hasta su liberación hacia el espacio extracelular (McBride y Bielefeldt-Ohmann, 2000).

3.4 Características clínicas del dengue

La infección por cualquiera de los cuatro serotipos del virus del DEN, el cual se transmite a través del mosquito *Aedes aegypti*, puede conllevar a una enfermedad benigna, la fiebre del dengue (FD), u ocasionar una forma más severa de la misma conocida como la fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque por dengue (FHD/SCD), potencialmente fatal para quien la padece.

La afección se inicia bruscamente, con ascenso de la temperatura acompañado o no de escalofríos, cefalea supraorbitaria intensa, dolor retroocular que se exacerba con los movimientos oculares, quebrantamiento general, náuseas, vómitos, anorexia y sensación de enfriamiento. En los inicios de la enfermedad la fiebre puede alcanzar temperaturas de 39 ó 40°C y durar de 2 a 7 días (Gubler, 1998). Las manifestaciones hemorrágicas en pacientes con FD son frecuentes y varían entre moderadas y severas. Incluyen petequias, sangramiento en las encías, epistaxis, menorragia y hemorragia gastrointestinal.

La FHD se caracteriza por la aparición brusca de fiebre, que puede durar de 2 a 7 días. El comienzo es abrupto, con fiebre, cefalea, náuseas, vómitos y tos seca. Alrededor del segundo o tercer día aparecen las petequias en la cara o partes distales de las extremidades. Las manifestaciones hemorrágicas más comunes son las petequias, lesiones purpúricas y equimosis. Alrededor del cuarto día aparece el choque, que dura de 12 a 24 horas y que no guarda proporción con la pérdida manifiesta de sangre. Puede haber hepatomegalia dolorosa y otras manifestaciones como ascitis, derrame pleural, íctero y síntomas neurológicos. La etapa crítica en la FHD es durante el tiempo de defervescencia, aunque pueden ocurrir signos de alteraciones circulatorias o manifestaciones hemorrágicas desde alrededor de 24 horas antes hasta un día después que las temperaturas alcanzan un valor normal o incluso inferior a éste (Gubler, 1998). En los casos en que se produce el SCD la duración de este es relativamente corta. El paciente puede morir en un plazo de 8 a 24 horas si no recibe el tratamiento apropiado. En aquellas personas que reciben atención médica a tiempo y un reemplazamiento de líquido intravascular y electrolitos, la recuperación se produce rápidamente y sin dejar secuelas, incluso en aquellas con pulso y presión arterial casi indetectables. Los cambios hemostáticos en la FHD y SCD involucran tres factores: cambios vasculares, trombocitopenia y alteraciones en la coagulación. Casi todos los pacientes con FHD tienen un aumento en la fragilidad vascular y en la trombocitopenia.

3.5 Situación epidemiológica

La FD y la FHD adquieren cada vez mayor importancia como problemas de salud que afectan a numerosos países de las zonas tropicales y subtropicales de nuestro planeta. El DEN ha sido reconocido en más de 100 países y se estima que 2 500 millones de personas viven en áreas de riesgo. Entre 50 y 100 millones de casos de FD y 250 000 a 500 000 de FHD son reportados cada año en el mundo (Guzmán y Kourí, 2002). En Asia, los índices de mortalidad varían entre un 0,5 y un 3,5% (Guzmán y Kourí, 2002). La enfermedad es endémica en el continente americano, el sudeste asiático, el Pacífico occidental, África y el Mediterráneo oriental, concentrándose fundamentalmente en las tres primeras regiones.

3.6 Epidemias en Cuba

La primera epidemia de DEN ocurrida en Cuba fue reportada en 1977-79, con 500 000 casos diagnosticados, todos correspondientes a la FD. En esa ocasión el 44,6% de la población cubana fue infectada con DEN-1 (Cantelar *et al.*, 1981). En 1981 tiene lugar una segunda epidemia, provocada esta vez por el serotipo 2 del virus. Un total de 344 203 personas resultaron infectadas, de las cuales 10 312 desarrollaron FHD/SCD. Se produjeron 158 muertes, de ellas 101 niños y 57 adultos (Kourí *et al.*, 1989). Inmediatamente después de la identificación de la epidemia se organizó una campaña intensiva para la erradicación del mosquito *Aedes aegypti* que logró disminuir los niveles de infestación por el vector a niveles lo suficientemente bajos como para romper la cadena de transmisión. Esta campaña, unida al rápido diagnóstico de la enfermedad y a la oportuna hospitalización de los pacientes, permitió controlar la epidemia en un tiempo relativamente corto.

Dieciséis años más tarde, en 1997, vuelven a reportarse casos de dengue en nuestro país, fundamentalmente en la provincia de Santiago de Cuba. Durante esta epidemia fueron considerados inicialmente 17 114 casos febriles como supuestos infectados, pero los análisis serológicos realizados a 10 024 pacientes confirmaron la infección por DEN solo de 2 946 personas. De ellos, 205 fueron diagnosticados con FHD/SCD y 12 fallecieron (Kourí *et al.*, 1998). Las infecciones se produjeron por una cepa de DEN-2. Esta cepa se relacionó, por análisis de la secuencia nucleotídica, con cepas del genotipo Jamaica, las cuales en los últimos años se han transmitido extensivamente por Latinoamérica y el Caribe (Rico-Hesse *et al.*, 1997).

Seguidamente, en el año 2000 se detectan por primera vez en Cuba casos de FD provocados por la circulación de DEN-3 y DEN-4. Esto no constituyó una gran epidemia ya que solamente

se confirmaron 135 casos y ninguno de ellos como FHD. Sin embargo, a finales del año 2001 y principios de 2002 se desató otra gran epidemia de DEN-3 con 14 443 casos en toda Cuba, de los cuales 12 889 ocurrieron en Ciudad de la Habana. De ellos, 81 fueron clasificados como FHD y hubo 3 fallecidos (Guzmán, comunicación personal). La epidemia se eliminó por la rápida acción gubernamental implementando una campaña intensa contra el vector.

3.7 Factores relacionados con la fiebre hemorrágica del dengue

3.7.1 Factores epidemiológicos e inmunológicos

Existen múltiples estudios de caracterización de las epidemias en las diferentes regiones endémicas y epidémicas. En la epidemia de 1980 en Tailandia, la secuencia de infección DEN-1/DEN-2 estuvo asociada con un riesgo de FHD 500 veces mayor en comparación con una infección primaria. Para la secuencia DEN-3/DEN-2 el riesgo fue de 150 veces y en el caso de la secuencia DEN-4/DEN-2, de 50 (McBride y Bielefeldt-Ohmann, 2000). En la epidemia de Cuba de 1981 la infección con DEN-2 siguió a una con DEN-1 en 1977. Se ha reportado una relación positiva entre la emergencia de epidemias asociadas a la FHD y esta última secuencia de infección (Kourí *et al.*, 1989), aunque otras secuencias han estado involucradas en el surgimiento de epidemias importantes en el sudeste asiático. En los países en que la FD es endémica se hace difícil determinar el serotipo del virus causante de la infección primaria.

El primer indicio de un fundamento inmunológico para la FHD fue la observación en los años sesenta, de que más del 85% de los niños con FHD en Bangkok, Tailandia, tenían altos títulos de Acs con reactividad cruzada contra el DEN (Halstead *et al.*, 1970). Lo anterior sugirió que estos niños habían sufrido una infección previa con el virus y llevó a la hipótesis de que la FHD era más común en infecciones secundarias que en las primarias. Varios estudios prospectivos realizados en Tailandia (Sangkawibha *et al.*, 1984, Burke *et al.*, 1988) y Mianmar (Thein *et al.*, 1997) confirman esta hipótesis. Específicamente en Cuba, en la primera epidemia de DEN ocurrida en el año 1977 no se reportaron casos de FHD y muchos de los infectados fueron asintomáticos. En el año 1981 aproximadamente la mitad de la población cubana presentaba anticuerpos anti-DEN-1 en el suero. Cuando ocurre la epidemia de FHD por DEN-2 en este mismo año se pudo determinar que el 98% de los que manifestaron esta forma de la enfermedad presentaron una infección secundaria (Kourí *et al.*, 1989). Es de destacar además que no se reportaron casos de FHD en niños menores de 2 años, excepto dos menores de 1 año cuyas madres habían sido infectadas por DEN-1 y

presentaban Acs en sangre. Diecisiete años más tarde, al ocurrir la epidemia de DEN-2 en Santiago de Cuba, se observó que todos los casos graves de la enfermedad eran individuos mayores de 20 años de edad, contrario a lo que se había detectado en la epidemia anterior y en muchas reportadas en el sudeste asiático donde los niños habían sido los más afectados. Por otra parte y similar a lo ocurrido en 1981, el 98% de los casos de FHD se correspondieron con infecciones secundarias (Kourí *et al.*, 1998). Debido a que en nuestro país se logró erradicar la circulación del vector entre 1981 y 1997, así como las infecciones por DEN, la población que pudiera presentar Acs está formada por aquellos individuos que vivieron las anteriores epidemias, es decir, los mayores de 17 años en 1997. El hecho de que los afectados se correspondieron con los adultos mayores de 20 años sugiere que habían vivido además la epidemia de 1977 de DEN-1.

En general, tomando en cuenta los datos epidemiológicos y los estudios realizados en las diferentes regiones afectadas por DEN, se puede concluir que las infecciones secundarias constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de la FHD.

3.7.2 Factor viral

Además de lo explicado anteriormente sobre la relación de las infecciones secundarias y la FHD esta forma severa de la enfermedad también se ha manifestado, aunque en menor medida, en pacientes con infección primaria por DEN. Por otra parte, las formas más severas de la enfermedad tienen lugar sólo en una fracción relativamente pequeña (2-4%) de individuos con infección secundaria (Guzmán y Kourí, 2002).

Si bien antes de 1981 ya circulaban en nuestro continente varios serotipos del DEN, no fue hasta ese año que ocurrieron los primeros casos de FHD en la región. Este hecho coincidió con la introducción de un nuevo genotipo del serotipo 2 del DEN, proveniente del sudeste asiático. Epidemias posteriores con FHD en Sudamérica también coincidieron con la presencia de cepas virales del sudeste de Asia (Rico-Hesse *et al.*, 1997). Por el contrario, no se encontró evidencia de FHD en una epidemia causada en Perú por el DEN-2, 5 años después de una epidemia de DEN-1. En esa ocasión se reportó la incidencia de una infección secundaria en el 60,5% de los individuos analizados (Watts *et al.*, 1999). Estos y otros resultados sugieren un papel esencial de la virulencia en la patogénesis de la FHD/SCD. Con el objetivo de explicar la relación entre los factores de riesgo antes expuestos con la aparición de la forma más severa de la enfermedad se han formulado varias hipótesis basadas en diferentes experimentos.

3.8 Inmunopatogénesis vs protección

Durante muchos años se trató de encontrar la relación entre la carga viral en sangre y la FHD y no fue hasta el año 2000, cuando Vaugh *et al.* y Murgue *et al.* demostraron por primera vez una correlación directa entre estos dos factores. Posteriormente, Libraty *et al.* (2002 a, b) y Wang *et al.* (2003) también reportaron dicha correlación y en el último reporte se pudo demostrar además la presencia de un aumento de carga viral en individuos con FHD con respecto a los de FD en la etapa de defervescencia.

El aumento de la carga viral en la sangre puede explicarse por diferentes vías que han dado lugar a las hipótesis formuladas acerca de la patogénesis del DEN.

3.8.1 Amplificación dependiente de anticuerpos

A partir de los primeros estudios se planteó que el DEN se replicaba en mayor medida en células mononucleares periféricas de la sangre de pacientes que habían sufrido una infección previa con este virus (Halstead *et al.*, 1980). Más tarde se mostró que los Acs residuales eran los responsables de este efecto (Morens *et al.*, 1987). En condiciones de especificidad o concentración de Acs en las que no ocurre la neutralización, los complejos virus-anticuerpo pueden ser internalizados por las células que expresan receptores Fcy en su superficie como los monocitos y los macrófagos. Este mecanismo, conocido como amplificación dependiente de anticuerpos (ADA) ocurre, según se ha planteado, durante las infecciones secundarias (Morens *et al.*, 1987; Kliks *et al.*, 1989).

Halstead *et al.*, (1969) en un estudio de 3 años en Bangkok, Tailandia, reportaron que los índices de hospitalización por infección con DEN entre los niños alcanzaron un máximo en aquellos con edades entre los 7 y 8 meses de vida. Estos índices fueron de cuatro a ocho veces mayores que los observados entre los niños de 1 a 3 meses y dos veces los de los niños de 3 años. Kliks *et al.*, (1988) determinaron la relación existente entre los títulos de Acs neutralizantes contra DEN-2 maternos y las edades de 13 niños con FHD provocada por infección con el virus homólogo. Los resultados arrojaron que los casos serios de infección con el virus ocurrieron cuando los niveles de Acs maternos habían disminuido considerablemente hasta alcanzar niveles subneutralizantes. Estos datos son consistentes con la hipótesis de que los Acs maternos desempeñan el doble papel de proteger al inicio y aumentar posteriormente el riesgo de desarrollar la FHD.

La hipótesis relacionada con la ADA postula que los Acs generados tras una infección primaria con DEN son capaces de neutralizar al virus homólogo y de facilitar la ADA frente a una infección con el serotipo heterólogo. (Kliks *et al.*, 1990).

3.8.2 Respuesta celular de reactividad cruzada

Que las infecciones secundarias sean un factor de riesgo para contraer la FHD, no implica que únicamente la respuesta immune humoral esté relacionada con este fenómeno. De hecho, Kurane y Ennis (1992) propusieron que la inmunopatología mediada por los linfocitos T también podría ser de relevancia en la inducción de la FHD durante una infección secundaria con el virus. La hipótesis publicada en 1999 presupone que tras la infección secundaria se activan clones de células T memoria generados por la infección primaria con el serotipo heterólogo, y generan una serie de citoquinas implicadas en la patogénesis de la enfermedad que se describirá posteriormente (Rothman y Ennis, 1999).

La hipótesis antes descrita no explica el por qué los linfocitos T memoria activados durante una infección secundaria, los cuales deben presentar reactividad cruzada, no son capaces de lisar al virus infectante por segunda vez. El primer reporte que trata de explicar dicha interrogante fue publicado por Zivny *et al.* (1999) donde mencionan por primera vez el posible papel de los APL en el desarrollo de FHD. Según describen, un individuo infectado por primera vez es capaz de generar respuesta T memoria que puede ser parcialmente activada tras una segunda infección a través de un APL, y no lograr una lisis efectiva del virus liberando citoquinas que faciliten la patogénesis de la enfermedad. Después de este reporte, no se menciona ninguna otra evidencia al respecto hasta el año 2003, donde se realiza un estudio profundo acerca de lo que ocurre en la infección secundaria y el papel de las células T de reactividad cruzada (Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Estos autores demostraron que existe una activación de las células T de reactividad cruzada en los casos de FHD, las que reconocen epitopos con diferencias de pocos aminoácidos (aa) entre los serotipos de DEN y sufren el proceso de apoptosis en el período de enfermedad aguda después de una activación. En dicho período demuestran, además, que estos linfocitos no son capaces de proliferar ni de secretar IFN- γ . El fenómeno de la activación preferencial de los linfocitos T de reactividad cruzada generados por la infección con el primer serotipo, cuyas afinidades por el segundo serotipo es baja, le denominaron *original antigenic sin*. Dicho fenómeno había sido reportado previamente para la respuesta immune humoral en la infección por DEN (Halstead *et al.*, 1983).

Teniendo en cuenta que solamente entre el 2 y el 5% de los individuos con infección secundaria desarrollan la FHD, se ha tratado de encontrar una posible asociación entre la composición genética de los receptores de los linfocitos T y la incidencia de FHD. Con ese objetivo, Okamoto *et al.* (1994) realizaron estudios *in vitro* de un panel de linfocitos T citotóxicos CD4⁺ específicos contra el virus del dengue, provenientes de un individuo inmune a DEN-4. Sus experimentos revelaron que se producía una expansión preferencial de las células T con receptores N/p 17. Estos resultados sugerían que células T con determinados receptores podrían desempeñar un rol importante en la respuesta inmune al virus. Sin embargo, Gagnon *et al.* (2001) analizaron la frecuencia de expresión de los genes Vp en células mononucleares periféricas de niños tailandeses con FD y FHD obtenidas durante y después de la infección. Aunque detectaron la expansión de células T que expresaban genes Vp específicos en algunos individuos durante la infección, no observaron este comportamiento en la población en general, ni diferencias significativas entre los individuos con FHD y FD.

Por otra parte, se ha explorado la posible asociación de la forma aguda de la enfermedad a determinado HLA dentro de las poblaciones susceptibles. Como resultado en este caso sí se han identificado los HLA asociados a FHD y a las formas menos severas de la enfermedad en dos regiones diferentes (Loke *et al.*, 2001; Stephens *et al.*, 2002; Zivna *et al.*, 2002).

3.8.3 Replicación viral

Como se explicó previamente, dentro de los factores relacionados con la aparición de la FD están las cepas virales circulantes. Al menos dos ramas del genotipo asiático se encuentran circulando en nuestro continente, una relacionada con las cepas del serotipo 2 aisladas en Cuba en 1981, Venezuela en 1994 y México en 1995, y la otra aislada en Jamaica en 1981, en Cuba en 1997 y en muchos otros países del hemisferio. Esta segunda rama está relacionada con las cepas de DEN-2 más recientemente aisladas en Tailandia. Ambas pueden causar FHD. (Guzmán y Kourí, 2002)

Leítmeyer *et al.* (1999) reportaron la existencia de diferencias estructurales entre las cepas de origen asiático y americano del DEN-2 que están correlacionadas con la virulencia y la patogenicidad. Según su hipótesis, los determinantes principales de la severidad se encuentran en el aminoácido 390 de la proteína E que puede afectar la unión a la célula hospedera, los nucleótidos del 68 al 80 del lazo de la región 5' no codificadora, que podrían estar involucrados en la iniciación de la traducción y en los primeros 300 nucleótidos de la

región no codificadora 3' que podrían regular la replicación viral mediante la formación de intermediarios.

Relacionado con la cepa de genotipo americano que circuló en Perú y no provocó FHD, Cologna y Rico-Hesse (2003) demostraron recientemente en experimentos *in vitro* que efectivamente esta cepa presentaba una capacidad disminuida de replicación viral con respecto a la del genotipo asiático. No obstante, Kochel *et al.* (2002) también reportaron que dicha cepa es capaz de ser neutralizada por Acs generados tras una infección previa con el serotipo 1. Dicha neutralización cruzada no se observó para la cepa de DEN-2 de origen asiático (Kochel *et al.*, 2002).

3.8.4 Patogénesis y papel de las citoquinas

Las tres hipótesis descritas anteriormente para explicar la ocurrencia de la FHD: el ADA por Acs heterólogos, el papel de las células T de reactividad cruzada y la replicación viral, no son contradictorias ya que responden a la evidencia del aumento de la carga viral en individuos con FHD. Los monocitos, macrófagos y células dendríticas constituyen las principales células diana de la infección por DEN (Halstead *et al.*, 1977; Marovich *et al.*, 2001). Se conoce que en los primeros momentos de la replicación viral los *flavivirus* comienzan a aumentar la expresión de MHC clase I en las células infectadas y así inhiben las NK como mecanismo fundamental de la inmunidad innata. Posteriormente aumentan las células infectadas las cuales comienzan a producir TNF- α , citoquina estrechamente relacionada con la FHD en estudios en humanos (Gagnon *et al.*, 2002). La infección por el virus también induce la activación de las células endoteliales y con ésta un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1 y selectina E en su superficie (Anderson *et al.*, 1997). La activación ocurre esencialmente mediante una vía indirecta que requiere la producción de TNF- α por parte de los monocitos infectados. A su vez, el TNF- α podría ser responsable en parte de un daño vascular transiente. El papel del TNF- α en la patogénesis de la enfermedad es crítico, y probablemente inicia varios procesos relacionados con la filtración de plasma y la hemorragia. Se han relacionado además otras citoquinas con el FHD, entre las que se encuentran el IFN- γ , la IL-10, la IL-4 y el TGF- β (Green *et al.*, 1999; Gagnon *et al.*, 2002). Aún los mecanismos de liberación de IFN- γ e IL-10, dos citoquinas de acción contraria en el sistema inmune, no están dilucidados. Otras citoquinas como la IL-6 y la IL-8 también presentan niveles elevados durante la enfermedad (Green *et al.*, 1999; Juffrie *et al.*, 2000;

Bosch *et al.*, 2002). La IL-8 tiene actividad quimioatrayente sobre los neutrófilos y puede provocar la activación y degranulación de estas células (Juffrie *et al.*, 2000). Por último, se plantea que en el caso de los individuos con FHD existe preferiblemente un patrón TH2 (Chaturvedi *et al.*, 2000).

La activación del complemento también pudiera estar involucrada en la patogénesis de la filtración capilar en la FHD. La cascada del complemento podría activarse por los complejos inmunes formados por los virus circulantes y los Acs específicos contra éstos. Los niveles de Acs aumentan más rápidamente en las infecciones secundarias, alcanzando altos títulos antes de la desaparición de la viremia e incrementando, por tanto, la posibilidad de la formación de los complejos inmunes (Wang *et al.*, 2003).

Los mecanismos que inician la hemorragia no son aún bien conocidos aunque se plantea que la autoinmunidad podría estar relacionada con este fenómeno (Huang *et al.*, 1997). El desbalance entre la coagulación y la fibrinólisis puede revertir la hemostasia y aumentar la probabilidad de hemorragia durante la enfermedad. Por otra parte, el aumento en la destrucción de las plaquetas o la disminución en su producción pudieran causar la trombocitopenia. Se ha detectado la presencia de complejos virus-Acs en la superficie de las plaquetas de pacientes con FHD, lo que sugiere que la respuesta inmune desempeña algún papel en la destrucción de las plaquetas. Wang *et al.*, (1995) reportaron que el DEN-2 se une a las plaquetas mayormente en presencia de Acs específicos contra el virus y que la unión es independiente de los FcR. La liberación de elevados niveles del factor activador de las plaquetas también pudiera aportar una explicación sobre la hemorragia, debido a que el factor de la activación plaquetaria puede inducir la destrucción de las plaquetas y aumentar la adhesividad de las células del endotelio vascular, dando lugar a la trombocitopenia (Yang *et al.*, 1995). Se ha reportado la presencia de Acs IgM de reactividad cruzada contra las plaquetas en los sueros de pacientes con FHD (Lin *et al.*, 2001), específicamente contra la proteína NS1.

3.8.5 Protección en dengue

Uno de los estudios tempranos relacionados con la protección en DEN lo reportó Sabin (1952), donde describe que al retar con DEN-2 a adultos voluntarios previamente infectados con DEN-1, éstos se protegieron completamente. El intervalo entre las dos infecciones fue de dos meses. Paralelamente, también reportó que la infección por segunda vez con el serotipo heterólogo, 9 meses después de la infección primaria, provocaba una enfermedad con manifestaciones clínicas discretas y fiebre ligera. Sin embargo, 18 meses después de

infección primaria cuando éstos individuos se retaron con el virus homólogo, fueron completamente protegidos. No se realizaron estudios mas allá de ese tiempo por lo que no se conoce con certeza hasta que punto una infección primaria puede ser protectora de por vida contra la infección con el serotipo homólogo. Sin embargo, se han encontrado niveles de Acs neutralizantes en muestras de suero provenientes de personas que habían sido inoculadas experimentalmente con el virus 40 años antes (Halstead, 1974; Okuno *et al.*, 1983), así como de individuos que habían vivido las epidemias de DEN-1 y DEN-2 en Atenas, en 1928 (Papaevangelou y Halstead, 1977), o de DEN-1 en Osaka, en 1944 (Tadano *et al.*, 1983).

Una de las evidencias más fuertes sobre el papel de los Acs neutralizantes en la protección se obtiene de los datos epidemiológicos descritos por Halstead *et al.* (1969). En su estudio de

3 años en Bangkok, como se refirió anteriormente, se pudo determinar que los niños en edades muy tempranas no manifestaron la forma más severa de la enfermedad. En este período de protección los Acs maternos neutralizantes presentes en el suero de los niños aún no habían disminuido.

Además de los estudios de Sabin (1952), no se habían realizado estudios adicionales de reto en humanos para conocer con exactitud los mecanismos de protección. En estos últimos años, investigadores del *Walter Reed Army Institute, USA*, han desarrollado cepas virales capaces de replicarse en humanos y exhibir una clínica moderada para estudios de reto en la prueba de candidatos vacunales (Vaughn y Wellington, 2003). En el estudio de protección en humanos realizado a principios del 2003, en individuos vacunados con la formulación tetravalente de los virus atenuados desarrollados por ese mismo grupo, se pudo determinar que no existió una correlación total entre la respuesta neutralizante y la protección (Vaughn y Wellington, 2003).

Aún quedan por definir qué sistemas de neutralización *in vitro* son los adecuados para medir este parámetro y correlacionar con la protección. Por otra parte, se desconoce el posible papel protector de la respuesta celular basado en la eliminación de este virus no citopático. Tomando en cuenta lo descrito anteriormente sobre la inmunopatogénesis y la protección, un candidato vacunal ideal contra el DEN debe ser capaz de proteger contra los cuatro serotipos virales y a su vez, de no sensibilizar al individuo frente a una infección secundaria por un virus heterólogo.

3.9 Desarrollo de vacunas

3.9.1 Vacunas vivas atenuadas

Muchas estrategias están actualmente en investigación con vistas al desarrollo de una vacuna efectiva y segura contra el DEN, objetivo que ha sido designado como una prioridad por la Organización Mundial de la Salud. En este sentido, las estrategias más avanzadas hasta el momento son las basadas en la generación de vacunas vivas atenuadas. Un grupo de la Universidad de Mahidol, en Tailandia, desarrolló varias formulaciones de vacunas atenuadas por pases seriados en cultivos primarios de células. Las correspondientes a los serotipos 1, 2 y 4 fueron desarrolladas en cultivos primarios de células de riñón de perro, mientras que la del serotipo 3 recibió pases seriados en cultivos primarios de células de riñón de mono verde africano. Los candidatos han sido ensayados como vacunas monovalentes, bivalentes, trivalentes y tetravalentes en voluntarios tailandeses (Bhamarapravati y Sutee, 2000; Kanesa-thasan *et al.*, 2001). Las mayores dificultades encontradas son: la generación de niveles diferentes de Acs neutralizantes y los eventos adversos (Kanesa-thasan *et al.*, 2001). En los estudios más recientes se ha definido la inoculación de hasta tres dosis para lograr una respuesta inmune balanceada (Lang *et al.*, 2003).

A su vez, investigadores del Instituto de Investigaciones del Ejército de los Estados Unidos ensayaron dos formulaciones vacunales en 50 voluntarios adultos con niveles aceptablemente bajos de efectos secundarios. Luego de dos dosis se observaron niveles muy variables de seroconversión según el serotipo (Vaungh y Wellington, 2003). También se detectaron diferencias en reactogenicidad e inmunogenicidad y plantean que no parece existir interferencia entre los virus.

Otra estrategia de trabajo es la de la vacuna quimérica fiebre amarilla-dengue (FA-DEN). Básicamente consiste en la preparación de un virus atenuado por vía molecular que incluye los genes que codifican para las proteínas no estructurales del virus de la fiebre amarilla (YFV 17D) y los genes que codifican las proteínas estructurales de cada serotipo del DEN. Estos virus quiméricos retienen las características fenotípicas de la cepa vacunal atenuada 17 D de la Fiebre Amarilla. Estudios realizados en monos *rhesus* mostraron que la vacuna no es neurovirulenta en esos animales y que produce viremia, Acs neutralizantes y confiere protección frente al reto con el virus salvaje (Guirakhoo *et al.*, 2000). En el 2002 se realizó un estudio Fase I en humanos con un candidato contra DEN-2 y se obtuvieron resultados satisfactorios en términos de seroconversión medida por Acs neutralizantes; sin embargo, en

individuos pre-inmunes a *flavivirus*, la cepa vacunal desarrolló una viremia aumentada (Guirakhoo *et al.*, 2003). El hecho de que un nuevo virus creado por el hombre sea capaz de replicarse mayormente en determinados individuos podría conllevar al peligro de reversión y por consiguiente a problemas regulatorios. Actualmente se está trabajando en la obtención de los lotes en condiciones de buenas prácticas productivas, así como en la mezcla de los cuatro serotipos. Con respecto a estos dos últimos aspectos se han presentado dificultades debido a que se corresponden con preparaciones virales que en las mezclas no se pueden controlar los niveles de replicación al inmunizar, y por consiguiente, no se alcanza una respuesta balanceada para los cuatro serotipos (Guirakhoo *et al.*, 2001, 2002).

También se trabaja en otras líneas de vacunas atenuadas. Investigadores del NIH de los Estados Unidos introdujeron en el genoma de un virus de DEN-4, atenuado por vía molecular, los genes estructurales de los restantes tres serotipos. En un estudio con 20 voluntarios adultos estos fueron inmunizados con el candidato de DEN-4. Diez personas tuvieron efectos secundarios ligeros y en 14 se detectó viremia. Todos los individuos desarrollaron Acs neutralizantes (Durbin *et al.*, 2001). Este virus no se transmite a mosquitos (Troyer *et al.*, 2001).

En el Centro para el Control de las Enfermedades de los Estados Unidos se ensaya una variante similar a la anterior. Partiendo del esqueleto del genoma de DEN-2 atenuado de la Universidad de Tailandia, se introdujeron los genes de las proteínas prM y E de los otros serotipos. La atenuación está dada por mutaciones en los genes de NS1 y NS3 y en la región 5' no codificadora (Kinney *et al.*, 2003). Actualmente se están probando las combinaciones DEN-2/DEN-4 y DEN-2/DEN-3 en monos para después pasar a humanos (Kinney *et al.*, 2003).

Científicos de la FDA utilizan igualmente candidatos atenuados molecularmente que han resultado ser altamente inmunogénicos en monos *rhesus*. Las atenuaciones consisten en mutaciones en secuencias genómicas que se ha predicho forman una estructura en forma de horquilla en la región 3' y que es conservada entre los *flavivirus* (Markoff *et al.*, 2002).

Los esfuerzos para la generación de una vacuna atenuada han tenido que enfrentar tres retos fundamentales: 1) el virus no se replica lo suficientemente bien como para formular un candidato económicamente viable, 2) no existe un modelo animal en el cual evaluar si el virus ha sido atenuado para el hombre y 3) una vacuna satisfactoria contra el DEN debe ser tetravalente, por lo que es muy complejo controlar una respuesta equivalente contra los cuatro serotipos basada en niveles de replicación semejantes. A todo esto se le adiciona el

riesgo de que al inmunizar la formulación tetravalente no exista seroconversión por neutralización a uno de los serotipos posibilitando así que los Acs de reactividad cruzada generados contra el resto permitan la ADA tras una infección del serotipo con Acs deficientes. Por otra parte, como son cepas atenuadas, pudieran revertir a formas virulentas luego de múltiples inoculaciones en humanos.

3.9.2 Candidatos vacunales basados en la tecnología del ADN recombinante

Los avances en la tecnología del ADN recombinante, la química de las proteínas y la inmunología, proveen de novedosos métodos potenciales para el desarrollo de vacunas. Estos tienen la ventaja de estar libres de las restricciones impuestas por el uso de virus atenuados o inactivados.

3.9.2.1 Células de insectos como sistemas de expresión

Las células de insectos constituyen un sistema efectivo para la expresión de diversos genes foráneos que requieren procesamiento postraducciona tal como proteólisis, glicosilación o secreción. Estos sistemas utilizan los baculovirus como vectores; en este caso, el virus de la polihedrosis nuclear *Autógrafa californica*. Las proteínas obtenidas en estos sistemas muestran similitud en talla, estado de glicosilación y antigenicidad con respecto a las proteínas auténticas, y los ratones inmunizados con ellas en muchos casos desarrollan Acs neutralizantes (Matswra *et al.*, 1989). Combinaciones de proteínas estructurales y no estructurales del DEN-1, DEN-2 y DEN-4 se han expresado en baculovirus recombinantes, resultando inmunogénicas (Matswra *et al.*, 1989; Deubel *et al.*, 1991; Putnak *et al.*, 1991; Feighny *et al.*, 1994). A pesar de lo antes expuesto, en un ensayo en monos empleando la proteína E truncada en el C-terminal, se demostró solamente una protección parcial. Por otra parte, los niveles de expresión reportados para los baculovirus recombinantes son bajos imposibilitando el establecimiento de procesos de producción económicamente factibles (Velzing *et al.*, 1999).

La proteína de la envoltura del virus del DEN también ha sido obtenida en cultivos de células de *Drosophila melanogaster*. Se han alcanzado altos niveles de expresión para los cuatro serotipos basados en subunidades solubles que representan el 80% de la proteína E (80% E). La inmunización con una formulación tetravalente de esta proteína (80% E) indujo potentes respuestas neutralizantes contra cada uno de los cuatro serotipos, con niveles similares a los obtenidos en las respuestas contra cada una de las subunidades administradas individualmente (Coller *et al.*, 2001). En un estudio realizado en monos se

incluyó un nuevo adyuvante en la formulación y se obtuvieron elevados títulos de Acs neutralizantes. Se definió además que con la inclusión de la proteína NS1 se mejora la respuesta celular generada (Humphreys, 2001). No obstante, no existe reporte de protección en ratones y monos con estas formulaciones desarrolladas por la compañía *Hawai Biotechnology*.

3.9.2.2 Vacunas de ADN

Kochel *et al.*, (1997) obtuvieron Acs neutralizantes en ratones inmunizados con una vacuna de ADN contra DEN-2. Utilizaron vectores plasmídicos de expresión eucariotas donde clonaron los genes de las proteínas prM y E truncada en el extremo C-terminal. Con este candidato también se obtuvo protección en ratones (Porter *et al.*, 1998). En pruebas realizadas en monos con un candidato vacunal similar, pero que expresa las proteínas prM y E del virus de DEN-1, se obtuvieron elevados niveles de Acs neutralizantes (Kochel *et al.*, 2000; Raviprakash *et al.*, 2000). Por su parte, Raviprakash *et al.*, (2001) se propusieron mejorar la inmunogenicidad de las vacunas de ADN dirigiendo los antígenos hacía las vesículas lisosomales, lográndose la inducción de altos niveles de Acs.

A pesar de los resultados obtenidos en ratones, las formulaciones de ADN ensayadas en monos indujeron protección parcial frente al reto viral y en el reporte más reciente se demuestra además, que dicha protección se pierde cuando el reto ocurre 7 meses después de la última inmunización (Putnak *et al.*, 2003).

En general, las vacunas preventivas basadas en formulaciones de ADN tienen como limitación hasta el momento su uso en individuos sanos, especialmente en niños. Todavía deben realizarse estudios más profundos que demuestren la seguridad de su uso de manera preventiva.

3.9.2.3 Levaduras como sistemas de expresión

Otro sistema de expresión utilizado ampliamente ha sido el de las levaduras, debido a su fácil manipulación genética y las características de crecimiento de los organismos procariontes, conjuntamente con la presencia de los mecanismos postraduccionales de los organismos superiores (Cregg *et al.*, 1993). En 1997, Sugrue *et al.*, expresaron los genes estructurales de DEN-1, empleando *Pichia pastoris*, y se obtuvo la proteína E de forma íntegra, la cual generó Acs neutralizantes al inmunizar conejos. Posteriormente, nuestro grupo de trabajo publicó la obtención y evaluación inmunológica en ratones, de la proteína de la envoltura del DEN-4 obtenida en *P. pastoris* (Muné *et al.*, 2003) la cual generó protección parcial. Por último,

recientemente se reportó la secreción de la E del DEN-2 en esta levadura y dicha proteína fue reconocida por anticuerpos funcionales contra el DEN (Wei *et al.*, 2003). No obstante, no se reportó la evaluación de 1^a misma en ningún modelo animal.

El principal problema del empleo de la levadura estriba en los bajos niveles de expresión alcanzados por los genes recombinantes y por consiguiente, la imposibilidad de establecer procesos escalables de producción de las proteínas (Jonh *et al.*, 1996). Por otra parte, en el único reporte sobre estudios en monos, realizado en nuestro grupo de trabajo, no se demostró protección total a pesar de la generación de Acs neutralizantes.

3.9.2 4 *Escherichia coli* como sistema para la obtención de antígenos del dengue

La bacteria *E. coli* constituyó el primer sistema utilizado en la obtención de proteínas recombinantes de *flavivirus*. En dicho sistema se alcanzan altos niveles de expresión, pero tiene el inconveniente de que muchas proteínas recombinantes se acumulan de forma insoluble e inactiva formando cuerpos de inclusión (Carmenate *et al.*, 2001; Niebla *et al.*, 2001). De hecho, Fonseca *et al.*, en 1991, mostraron que el dominio III de la proteína E obtenido como una proteína de fusión con la TrpE de *E. coli*, era antigénico. Estas proteínas TrpE-DEN para cada uno de los cuatro serotipos del virus reaccionaron fuertemente con los líquidos ascíticos hiperinmunes contra el serotipo homólogo; sin embargo, tras la inmunización en ratones, no indujeron Acs neutralizantes ni confirieron protección frente al reto viral. Una de las posibles causas que se le atribuyó a la falta de funcionalidad alcanzada fue el empleo de detergentes durante el proceso de solubilización de los cuerpos de inclusión.

Posteriormente, en el año 1995, se desarrolló una proteína recombinante empleando una porción de 269 aa de la proteína E conteniendo el dominio III del virus DEN-2 y la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Esta proteína fue reconocida por Acs policlonales y monoclonales anti-DEN-2 y los ratones inmunizados desarrollaron Acs neutralizantes además de ser protegidos frente al reto viral con DEN-2 (Srivastava *et al.*, 1995). No obstante, la proteína A tiene alta afinidad por la inmunoglobulina G humana, por lo que no es posible el uso de esta proteína de fusión como candidato vacunal (Kobatake *et al.*, 1993).

El sistema de *E. coli* continuó siendo utilizado para la obtención de fragmentos de la proteína E. Simmons *et al.*, en 1998, reportaron la evaluación inmunológica en ratones de una proteína de fusión formada por la proteína de unión a maltosa (MBP) de *E. coli* y el fragmento correspondiente al dominio III de la proteína E de DEN-2. Esta proteína se obtuvo en forma soluble en la bacteria y fue reconocida por el anticuerpo monoclonal neutralizante 3H5. Se

desarrolló además un proceso de purificación por cromatografía de afinidad y posteriormente, la proteína se extrajo con un alto nivel de pureza a partir de una electroforesis preparativa. Por último, tras la inmunización de ratones se obtuvieron títulos neutralizantes anti-DEN-2 y protección parcial en los mismos ante el reto intracraneal con virus letal. Estos mismos autores reportaron la evaluación de las construcciones correspondientes a los cuatro serotipos virales en una sola formulación y demostraron la generación de una respuesta neutralizante contra los cuatro serotipos (Simmons *et al.*, 2001a). Adicionalmente, se publicó que la inoculación de la proteína de fusión a MBP correspondiente al serotipo 2, conjuntamente con un plasmidio codificante para las proteínas prM-E del mismo serotipo, constituyó la variante más efectiva debido a la generación de Acs neutralizantes de larga duración (Simmons *et al.*, 2001b).

A pesar de la respuesta funcional obtenida en ratones con las proteínas de fusión a MBP, su futuro uso como candidato vacunal puede ser cuestionado. En primer lugar, los procesos de purificación descritos fueron a escala de laboratorio, con un alto costo si se realizara una alternativa escalable. Por otra parte, la seguridad de la utilización de la MBP en humanos no ha sido demostrada, además, la validación de ésta como portadora debe ser primeramente ensayada.

3.10 P64k como proteína portadora

La proteína P64k de *Neisseria meningitidis* serogrupo B es una lipoamida deshidrogenasa, cuyo gen *lpdA* fue expresado en *Escherichia coli* produciendo un antígeno soluble que representó más del 20% del total de las proteínas de la bacteria (Silva *et al.*, 1992). P64k es bien reconocida por el suero de individuos convalecientes de la enfermedad meningocócica y por el suero de los vacunados con la vacuna cubana VA-MENGOC-BC (Silva *et al.*, 1992; Bringas y Fernández, 1995; De la Sierra *et al.*, 1997; Guillen *et al.*, 1998). Debido a su alto peso molecular, su demostrada inmunogenicidad en diferentes especies animales y su disponibilidad (Guillén *et al.*, 1998; Expósito *et al.*, 1999), ésta ha sido empleada como portadora para péptidos pobremente inmunogénicos (González *et al.*, 2000a) y para el polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C (Álvarez *et al.*, 1997) con buenos resultados.

Con este propósito la capacidad de la P64k como proteína portadora ha sido evaluada por un grupo de investigadores del Centro de Inmunología Molecular al conjugarla químicamente con el EGF en una vacuna contra el cáncer (González *et al.*, 1997). Al mismo tiempo, el EGF también se conjugó al toxoide tetánico (TT), el cual está reportado como una proteína portadora clásica. Luego de la evaluación de estos conjugados en animales, se evaluó la

seguridad, la toxicidad y la inmunogenicidad de ambos conjugados en un estudio piloto en pacientes con carcinoma maligno en estado avanzado. En ambos grupos, el 60% de los pacientes desarrollaron títulos de Acs anti-EGF sin ninguna evidencia de toxicidad, y se prolongó el período de sobrevida. Al comparar ambas proteínas se concluyó que no existían diferencias en el efecto portador de éstas para potenciar la respuesta inmune contra el EGF (González *et al.*, 1998). Este resultado es muy importante ya que el TT forma parte del esquema de vacunación normal de la población desde la niñez a la adultez. Una misma persona puede estar sujeta a reiteradas inmunizaciones (reactivaciones) con este antígeno, lo cual puede traer consigo el riesgo inmunológico denominado supresión específica del portador, fenómeno que no debe ocurrir en el caso de la P64k, lo que le confiere ventajas a este antígeno para su empleo posterior como portador. En este momento se desarrolla un estudio clínico Fase I/II en Canadá con la combinación EGF-P64k en pacientes terminales de cáncer (González *et al.*, 2003).

Con estas evidencias, se condujo un estudio clínico Fase I en 26 voluntarios sanos con la P64k adyuvada a hidróxido de aluminio. Se aplicaron tres dosis y una cuarta de refuerzo. Los Acs generados producto de la inmunización fueron específicos contra la proteína recombinante, lo cual se corroboró por *Western blotting*. Como resultado de la dosis de refuerzo pudo detectarse una respuesta de memoria en los voluntarios inmunizados. Se pudo concluir que la proteína P64k es segura, lo cual avala su empleo en humanos en futuras combinaciones bivalentes como proteína portadora de otros antígenos heterólogos (Pérez *et al.*, 2001).

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cepas de *Escherichia coli* K12

Para la multiplicación de plásmidos se empleó la cepa XL-1 blue [F':Tn70 *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q *A* (*lacZ*) *M15*/*recA1 endA1gyrA96* (Nal^r) *thi hsdR17* (*r_K'm_K'*) *supE44 relA1 lac*] (Bullock *et al.*, 1987).

Para los experimentos de expresión se usaron las siguientes cepas:

MM294: F', *endA1, thi, pro, hsdR, supE44* (Hanahan, 1983).

W3110 (SK): F , *mcrA mcrB* in (*rrnD-rrnE*)X (Hill y Harnish, 1982).

HB101: F' *hsdS20* (*r_C m_C*) *supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, rpsL20xy-5mtl-1*. (Lacks y Greenberg, 1977).

4.2 Líneas celulares, cepas y antígenos virales

BHK 21 clono 15. Células provenientes de riñón de hámster recién nacido. Constituye una sublínea donada por el Dr. Halstead (Universidad J. Hopkins, U.S.A). Las células fueron multiplicadas a 37°C en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 1% de una solución de aa no esenciales y suero fetal bovino (SFB) inactivado (SFBI) al 10%.

C6/36 HT. Sublínea de la línea celular de mosquito *Aedes albopictus* C6/36 adaptada al crecimiento a 33°C según Kuno y Oliver (1989). Las células se multiplicaron a 33°C con MEM, aa no esenciales, 1% de 200 mM de glutamina y SFB al 10%.

Vero. Células provenientes de riñón de mono africano. Esta línea celular fue obtenida de la ATCC cuyo crecimiento y mantenimiento se realizó según el proveedor.

Se utilizaron diferentes fuentes virales en dependencia de los experimentos a realizar. Para los esquemas de inmunización, la antigenicidad por *Dot blotting* y la evaluación de la respuesta humoral mediante ELISA se emplearon las cepas: DEN-1 (Hawaii, 27 PR); DEN-2 (NGC, 27 PR); DEN-3 (H87, 27 PR) y DEN-4 (H141, 27 PR).

Para el ensayo de neutralización se utilizaron: DEN-1 (Angola, 5 pases en C6/36 HT, 2 pases en Vero); DEN-2 (A15, 4 PR, 1 pase en C6/36); DEN-3 (116/00, 2 pases en C6/36 HT) y DEN-4 (Dominica, 4 pases en C6/36 HT, 2 pases en Vero, 5 pases en C6/36 HT).

Por último, las cepas DEN-1 (Hawaii, 20 PR), DEN-2 (A-15, 5 PR), DEN-3 (H-87 23 PR) y DEN-4 (H241 18 PR) se emplearon para el ensayo de protección en ratones. Para el ensayo de reto viral en monos *Macaca fascicularis* se empleó la cepa cubana DEN-2 (A15 4 PR, 1 pase en C6/36 HT, 2 pases en Vero).

Los antígenos virales utilizados para la caracterización antigénica y los estudios de detección de anticuerpos se obtuvieron a partir de extractos de cerebros de ratones infectados con virus de los serotipos correspondientes y posteriormente inactivados (Clarke y Casals, 1958). Las cepas empleadas para el ensayo de reto en ratones e inmunogenicidad, se obtuvieron a partir de cerebro de ratón homogenizado en MEM. Para la obtención del control negativo viral se partió de un extracto de cerebro de ratón no infectado (CN). Los virus empleados para el reto en monos, así como para los ensayos de neutralización se obtuvieron por la infección en la línea celular especificada en la descripción de cada cepa, según Morens *et al.* (1985).

4.3 Anticuerpos monoclonales y policlonales

Anticuerpos monoclonales (AcMs): 3H5 (AcM anti-DEN-2, Laboratorio Arbovirus, IPK), 48 (AcM anti-N-terminal de la P64k, Laboratorio Meningo, CIGB); 114 (AcM anti-C-terminal de la P64k, Laboratorio Meningo, CIGB). Todos los AcMs se emplearon a una concentración de 10 ng/mL en el *Western blotting* y *dot blotting*.

Como fuente de Acs policlonales se emplearon Líquidos ascíticos hiperinmunes (LAHs) anti- DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 (Laboratorio Arbovirus, IPK). Como control negativo se empleó un LAH proveniente de ratones no infectados: LAN. Se emplearon a una dilución 1:100.

Los sueros humanos de bajo y alto título a DEN-2 (Laboratorio Arbovirus, IPK) empleados en el *Western blotting* se utilizaron a una dilución 1:100.

4.4 Obtención de las construcciones quiméricas

pD2: Se realizó un PCR para la amplificación de un fragmento que codifica para los aa del 286 al 426 de la proteína E del DEN-2. Para ello se tomó como fuente el plasmidio p30VD2 que contiene los genes estructurales de la cepa de DEN-2 #1803, donada por el Dr. Vincent Deubel (Lyon, Francia) y los cebadores DEN-2 a (5'CTTCTAGACAGGCTGCGCATGGACA 3') y DEN-2 b (5'GTGGATCCTTACCCTCCCAGGCTTCCAAA 3') bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C y 2 min a 72°C. En la reacción se emplearon 10 ng de p30VD2, 50 pmoles de cebadores, 200 fM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs) y tampón de PCR (KCl 50 mM, Tris 10 mM pH 8,5, MgCl₂ 1,5 mM). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100 µL con 2,5 unidades de ADN polimerasa (*Thermus aquaticus*, Boehringer, Alemania). La banda obtenida (426 pb) se purificó y se digirió con las enzimas *Xba* I y *Bam* HI para la reacción de ligamiento con el vector pM-108 que codifica para los primeros 45 aa de la P64k (Laboratorio Meningo, CIGB), previamente

Materiales y Métodos

digerido con las mismas enzimas. Después del proceso de ligamiento, se realizó la transformación de las células competentes XL-1 *blue*. Los clones positivos se determinaron por análisis de restricción y luego se chequearon por secuenciación (Sanger *et al.*, 1977). El plasmidio obtenido se denominó pD2.

pD3 y pD5: A partir del plasmidio p30VD2 se realizaron dos PCR para la amplificación del fragmento del serotipo 2 descrito anteriormente. En una de las reacciones se emplearon los cebadores DEN-2 a y DEN-2 c (5' ATGAATTCACGCCTCCAGAGATCC 3') que permiten obtener la banda con los sitios *Xba* I / *Eco* RI y en la otra, los cebadores DEN-2 d (5' CTT GGAT CCAGGCT GAG AAT G 3') y DEN-2 e (5'GAGGATCCTTAACCAACCA GAGACCCAAAA 3') para obtener la banda con el sitio *Bam* HI en ambos extremos. Las condiciones en ambas reacciones fueron: 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C y 2 min a 72°C, 10 ng de p30VD2, 50 pmoles de cebadores, 200 μ M de cada dNTPs y tampón de PCR. El proceso se realizó en un volumen final de 100 μ L con 2,5 unidades de Taq polimerasa. Las bandas obtenidas se semipurificaron y digirieron con las enzimas correspondientes a los sitios incorporados para el ligamiento en los vectores pD1 (codifica para la P64k y contiene los sitios de restricción *Xba* I y *Eco* RI, Laboratorio Meningo, CIGB) y pD4 (codifica para la P64k y no presenta codón de parada en el gen, Laboratorio Dengue, CIGB), digeridos previamente con las enzimas *Xba* I / *Eco* RI y *Bam* HI, respectivamente. Después de este proceso, se realizó la transformación de las células competentes XL-1 *blue* con el producto del ligamiento. Los clones positivos se determinaron por análisis de restricción y luego se chequearon por secuenciación. Los plasmidios obtenidos se denominaron pD3 y pD5, respectivamente.

pD10, pD18, pD19 A partir de los sobrenadantes de cultivo de las cepas de DEN-1, Jamaica, DEN-3 Venezuela y DEN-4 Dominica (Laboratorio Arbovirus, IPK) se amplificaron tres bandas de 426 pb que codifican para los aa del 286 al 426 de la proteína E de los tres serotipos. Primeramente, el ARN viral se purificó a partir del sobrenadante de cultivo empleando el sistema comercial TRI REAGENT (Promega, U.S.A). Posteriormente se realizó el RT-PCR (PCR con la enzima reversotranscriptasa), empleando los cebadores:

DEN-1 a 5'... CCTGGGATCCCGACTAAAAATG... 3'

DEN-1 b 5'... GTGGATCCTTAGCCGCCTATAGAGCCGAAG... 3'

DEN-3 a 5'... CACTTAGGATCCCGACTCAAGATGG... 3'

DEN-3 b 5'...GAGGATCCTTAACCAACCACTGAGC. .3'

DEN-4 a 5'... GGCCAT CT AGGAT CC AAAGTGCCT AT G... 3'

DEN-4 b 5'...GAGGGATCCTTAGCCACCAACCGAACCAA ...3'

Las condiciones fueron: 42°C por 30 min, 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C y 2 min a 72°C. En cada reacción se emplearon 10 µL de ARN, 100 pmoles de cebadores, 200 µM de cada dNTPs, tampón de PCR, gelatina 0,01% (v:v) y 5 mM dithiotreitol. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100 µL empleando 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq pol (*Boehringer*, Alemania) y 10 unidades de reverso transcriptasa del virus de la mieloblastosis (RT AMV) (*Boehringer*, Alemania).

Las bandas obtenidas se purificaron en agarosa para su posterior clonación en el vector PGEM-T (*Promega*, U.S.A). Después del proceso de ligamiento, se realizó la transformación de las células competentes *XL-1 blue*. Los clones positivos se determinaron por análisis de restricción y luego se chequearon por secuenciación. Los plasmidios obtenidos se denominaron pDT-9, pDT-20 y pDT-21 para DEN-1, DEN-3 y DEN-4, respectivamente. Finalmente, para la generación de los plasmidios de expresión, las construcciones anteriores se digirieron con la enzima *Bam* HI para obtener la banda correspondiente a cada serotipo, las cuales se purificaron y ligaron al vector pD4 previamente digerido con la misma enzima. Después del proceso de ligamiento, se realizó la transformación de las células competentes *XL-1 blue*. Los clones positivos se determinaron por análisis de restricción y luego se chequearon por secuenciación. Los plasmidios obtenidos se denominaron: pD10 (DEN-1), pD18 (DEN-3) y pD19 (DEN-4).

En todos los casos los procedimientos de digestión de ADN con enzimas de restricción, las electroforesis de ADN en geles de agarosa y la recuperación y purificación de ADN fraccionado de geles de agarosa de bajo punto de fusión se realizaron básicamente de acuerdo a los procedimientos descritos por Sambrook *et al.* (1989) y según las recomendaciones de los fabricantes de las diferentes enzimas. Para la transformación de bacterias, se prepararon células competentes por el método de cloruro de calcio también descrito por Sambrook *et al.* (1989).

4.5 Obtención de la biomasa

Para el estudio de expresión, las tres cepas de *E. coli*. MM294, HB101 y W3110 se transformaron con cada uno de los plasmidios obtenidos. Se tomó una colonia correspondiente a cada clon y se creció toda la noche en 5 mL de medio Luria Bertani suplementado con ampicilina a 50 µg/mL (LBA), en *roller*, durante 12 h a 37°C. Posteriormente se midió la densidad óptica (D.O) y se tomó un volumen de cultivo correspondiente a 2/D.O (µL). Se

centrifugó a 3 200 x g durante 15 min a 4°C y la biomasa obtenida se lavó dos veces con tampón PBS (NaCl 100 mM, KOI 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂ PO₄ 1 mM, pH 7,2) para seguidamente resuspenderla en un volumen de 100 µL de tampón de muestra para electroforesis. Después de la corrida en geles de poliacrilamida, los geles se tiñeron con azul coomassie (ver acápite de electroforesis) y el porcentaje de expresión se determinó por densitometría empleando el programa QGEL (Kendrick *et al.*, 1994). Una vez seleccionada la cepa adecuada para la expresión de cada gen recombinante el estudio se repitió tres veces. Para la obtención de mayores cantidades de biomasa las cepas de *E. coli* transformadas con los plasmidios pD2, pD3, pD5 (MM294), pD10 (HB101), pD18 (HB101), pD19 (HB101), pM- 108 (MM294) y pD1 (MM294) se crecieron en medio LBA (300 mL) en zaranda, durante 12 h a 37°C. Se inoculó con el volumen de precultivo necesario para lograr una D O inicial de 0,1. La biomasa se obtuvo a partir de una centrifugación a 3 200 x g durante 20 min a 4°C. Se le realizó un lavado con PBS.

4.6 Procesos de semipurificación de las proteínas quiméricas

Semipurificación de proteínas asociadas al precipitado de ruptura celular. La biomasa correspondiente al crecimiento de los clones de PD2, PD3, PD5, PD10, PD18, PD19 y P64k His (codificada en pD1) se resuspendió en 30 mL de tampón de ruptura PBS EDTA 1 mM (PBSE). Las células se rompieron en Prensa Francesa con dos pases, conservándose las bajas temperaturas. Luego se centrifugó a 10 000 x g durante 30 min a 4°C para obtener el sobrenadante y el precipitado de ruptura. El precipitado obtenido se resuspendió, a una proporción de 10 mg/mL, en soluciones de urea de diferentes molaridades desde 1 hasta 8 M en tampón Tris 10 mM, EDTA 1 mM (TE). Se mantuvo en agitación lenta durante 15 min a 4°C y posteriormente se centrifugó a 10 000 x g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se analizó por electroforesis para la determinación de la concentración adecuada de urea que permitiera la extracción total de cada proteína. El sobrenadante obtenido, correspondiente a la extracción máxima para cada proteína, se aplicó en una columna de Sephadex G-25 (XK-16/20, Pharmacia, U.K), 20% de carga, velocidad de flujo 10 cm/h. La elución se realizó con TE y la fracción obtenida se conservó a -20°C.

Semipurificación de la proteína PD3 soluble: A partir del sobrenadante de ruptura de las células transformadas con el plasmidio PD3 se realizó una precipitación con sulfato de amonio. Para ello, se añadió un volumen de solución saturada de esta sal hasta alcanzar un 35% de saturación. Seguidamente, la mezcla se agitó durante 15 min a 4°C y se centrifugó a

10 000 x g durante 20 min a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió en la mitad del volumen original de tampón TE.

4.7 Análisis por cromatografía líquida de alta resolución

Se aplicaron 100 pL de cada muestra a analizar en una columna de Superdex 200 HR 10/30 (Amersham-Bioscience, U.K). El tampón de equilibrio empleado fue TE. El flujo de trabajo fue de 38,4 cm/h. Las proteínas se detectaron por D O a 226nm en un detector (Uvicord Sil, Amersham-Bioscience, U.K). La columna fue previamente calibrada con muestras de proteína de tallas conocidas en las condiciones de cada corrida.

4.8 Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método BCA (Brown *et al.*, 1989). Se utilizó una curva patrón de seroalbúmina bovina de concentraciones conocidas.

4.9 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las SDS-PAGE se realizaron según el método descrito por Laemmli (1970). Las muestras se resuspendieron en solución tampón (Tris-HCl 60 mM pH 6,9, glicerol al 20% y SDS al 4%), con bromofenol azul como indicador del frente de corrida. Se añadió además p- mercaptoetanol 100 mM en el tampón de la muestra. En todos los casos la corrida se realizó bajo una corriente constante de 25 mA. Los geles fueron teñidos con azul brillante de coomasie CR-250 (Laemmli, 1970). Los porcentajes de pureza se determinaron por densitometría empleando el programa QGEL (Kendrick *et al.*, 1994). Las siguientes proteínas se emplearon como patrones de peso molecular: p-galactosídasa (116 kDa), fosforilasa b (94 kDa), albúmina de suero bovino (67 kDa), albúmina de huevo (45 kDa) anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21 kDa) y a-lactoalbúmina (14,4 kDa).

4.10 Western blotting

Posterior a la corrida electroforética, las proteínas se transfirieron del gel a membranas de nitrocelulosa Hybond-C de 0,45 pin (Amersham-Bioscience, U.K) en un equipo de transferencia submarina Mini Trans-Blot Cell (BIO-RAD, USA) según Towbin *et al.* (1979). Las mismas se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS conteniendo tween-20 al 0,05% (PBS-T), durante 1 h a T.A. Luego de tres lavados con PBS-T durante 10 min cada uno, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los diferentes sueros diluidos en PBS-T conteniendo leche al 5%. Posteriormente se repitieron los lavados de la misma forma

y se incubó 1 h a T.A, con un conjugado anti-IgG murino-peroxidasa (1:1 000) (*Amersham-Bioscience, U.K*). Después de los últimos lavados la detección se realizó empleando 15 mg de diaminobenzidina (DAB) y 12 μ L de H₂O₂ al 30% en 15 ml de PBS hasta la aparición de las bandas. La reacción se detuvo lavando con abundante agua.

4.11 Dot blotting

Se realizó en una cámara del tipo *Miniblotter 25* (*Cambridge, U.K*). Las muestras se aplicaron sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m por 1 h a T.A. y ésta se bloqueó en PBS-T conteniendo leche descremada al 5% y Tween-20 al 0,05%, durante toda la noche a 4°C. Luego de los lavados con PBS-T la membrana se enfrentó a los diferentes sueros diluidos en PBS-T, conteniendo leche al 5% durante 1 h a T.A. Para ello se empleó nuevamente la cámara referida. Posteriormente se repitieron los lavados de igual forma y se incubó con un conjugado anti-IgG ratón-peroxidasa (1:1 000), 1 h a T.A. (*Amersham-Bioscience, U.K*). Después de los últimos lavados la detección se realizó con DAB y H₂O₂ al 30% en PBS hasta la aparición de las bandas.

4.12 Esquemas de inmunización

Los ratones Balb/c hembras, de 6 semanas y con un peso entre 18 y 20 gramos, fueron suministrados por el Centro de Producción de Animales de Laboratorio, Santiago de las Vegas, La Habana, Cuba. Se inmunizaron grupos de 20 ratones cada uno, utilizando como inmunógenos las fracciones semipurificadas de: P64k; PD10; PD2; PD3; PD5; PD10; PD18; PD19 y las preparaciones virales infectivas de DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 según cada esquema.

Se suministraron tres dosis de 20 μ g de cada proteína recombinante por vía intraperitoneal en los días 0, 15 y 30. En la primera dosis se utilizó el adyuvante completo de Freund y en las restantes adyuvante incompleto de Freund. Los grupos controles positivos recibieron una dosis de 0,5 mL de extracto de virus homólogo infectivo. Quince días tras la última dosis se realizó la extracción de sangre a 10 animales de cada grupo y se colectaron los sueros por centrifugación a 1 500 x g. Estos fueron conservados a -20°C.

4.13 Determinación de anticuerpos antivirales murinos

La inducción de anticuerpos anti-DEN en los sueros de los animales inmunizados fue determinada por un ELISA de captura. Las placas de poliestireno de 96 pozos (*Costar, U S A*) se recubrieron con inmunoglobulinas (IgG) provenientes de una mezcla de sueros humanos

con altos títulos de anticuerpos anti-DEN. Se añadieron 100 µL/pozo de solución tampón de recubrimiento (Na_2CO_3 0,16%, NaHCO_3 0,29%, pH 9,5) conteniendo 10 µg/mL de IgG y se incubaron 2 h a 37°C. El bloqueo de las placas se realizó con 150 µL/pozo de BSA al 1% en solución tampón de recubrimiento durante 1 h a 37°C, tras lo cual se lavaron tres veces con PBS-T. Se añadió 100 µL/pozo de cada preparación viral y control (1:80) en las placas correspondientes según el serotipo evaluado y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Luego de tres lavados en las mismas condiciones anteriores se procedió a evaluar diluciones dobles de los sueros en PBS-T añadiendo 100 µL/pozo y partiendo de una dilución inicial 1:200. Se incubó durante 1 h a 37°C. Las placas se lavaron nuevamente con PBS-T y se incubaron 1 h a 37°C con un conjugado anti-IgG ratón-peroxidasa (*Amersham-Bioscience, U.K.*). Se utilizó una dilución 1:5 000 en PBS-T, conteniendo 2,5% de un suero humano negativo en un volumen de 100 µL/pozo. Después de los lavados con PBS-T se añadió o-fenilendiamina (0,04%) y H_2O_2 (0,04%) en solución tampón de sustrato (Na_2HPO_4 2%, ácido cítrico 1%, pH 5.0) y se incubó 30 min a T.A. La reacción se detuvo con 50 µL de H_2SO_4 (12,5%) y se determinó la D.O a 492 nm. Como criterio de positividad se tomaron las D.O correspondientes a diluciones del suero frente al virus con valores mayores o iguales al doble de la D.O obtenida frente al CN.

4.14 Ensayo de neutralización *in vitro*

Se empleó el método de reducción del número de placas (PRNT) y la línea celular BHK-21 clono 15, según Morens *et al.* (1985). Los sueros fueron prediluidos (1:10) en MEM y tratados con 10% de cloroformo. Se evaluaron cinco diluciones seriadas (desde 1:20 hasta 1:320) de los sueros individuales de los ratones o monos correspondientes a cada grupo frente al virus de serotipo homólogo al del inmunógeno empleado. Volúmenes de 100 µL de los sueros diluidos fueron incubados durante 1 h a 37°C con 100 µL de MEM conteniendo una cantidad aproximada de 80 unidades formadoras de placas virales (ufp). Para estimar el número de placas virales (control de virus) se incubaron 100 µL de MEM conteniendo una cantidad aproximada de 80 ufp durante 1 h a 37°C con igual volumen de MEM. Luego se inocularon 50 µL de la mezcla sobre 500 µL de una suspensión de células BHK-21, contenidas en placas de 24 pozos. Las placas se incubaron 4 h a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 4,5%. Posteriormente se añadieron 500 µL de medio de cultivo semisólido conteniendo carboximetil celulosa (30%). Las placas fueron incubadas a 37°C entre 5 y 7 días, de acuerdo con el serotipo viral empleado, en cámaras con una atmósfera de CO_2 al 4,5%. Para la visualización

de las placas virales la monocapa celular fue teñida con solución colorante (*naphtol blue black* 0,1%, acetato de sodio 0,2 M, ácido acético 6%).

Para el análisis de los resultados se calculó el promedio de placas tanto para las mezclas virus-suero (A) como para el control de virus (B). El porcentaje de reducción (PRe) del número de placas para cada uno de los sueros y mezclas de sueros evaluados se calculó por la fórmula:

$$PRe = [1 - (A/B)] \times 100$$
 El título neutralizante se determinó como la dilución máxima donde se reduce el 50% del número de placas virales.

4.15 Ensayo de protección en ratones

Primeramente se determinó la dosis que provocaba la muerte del 50% de los animales, dosis letal media (DL₅₀). Para ello, 6 grupos de 8 ratones cada uno, de 15 semanas y un peso promedio de 20 gramos, se inocularon intracranealmente con varias diluciones de extracto de cerebro correspondiente a cada serotipo viral por vía intracraneal en un volumen de 20 pL. Después de la observación durante 21 días, la DL₅₀ se calculó según el procedimiento de Reed-Muench (Reed y Muench, 1938).

Posteriormente, los ratones que no fueron sangrados de cada grupo de los esquemas de inmunización se retaron con los virus correspondientes al serotipo homólogo 1 mes después de la última dosis. Se tomó como grupo control positivo los ratones inmunizados con una dosis viral del serotipo homólogo y como control negativo el grupo inmunizado con la proteína P64k. Se inocularon 100 DL₅₀ de cada extracto de cerebro correspondiente a cada serotipo por vía intracraneal en un volumen de 20 pL. Después de la inoculación los animales se mantuvieron en observación por 21 días y se llevó el control de la morbilidad y la mortalidad en el tiempo. Hubo casos en que algunos ratones murieron inmediatamente después del reto como consecuencia de la manipulación resultando en grupos menores de 10 animales.

4.16 Esquema de inmunización en monos *Macaca fascicularis*

En el estudio se utilizaron 9 monos *Macaca fascicularis* de 5 años de vida, suministrados por el CENPALAB, previamente chequeados para los diferentes indicadores clínicos y la ausencia de Acs anti-DEN.

Se administraron 100 pg de proteínas recombinantes contenidas en 0,25 mL de inmunógeno. Las preparaciones de cada proteína, en tampón TE, se adyuvaron en igual volumen de adyuvante completo de Freund para la primera dosis y con adyuvante incompleto de Freund

en las restantes tres dosis. El volumen administrado fue de 0,5 ml_ por vía subcutánea en cuatro puntos en la espalda. El esquema realizado fue: 0, 1, 3, 7 meses y 15 días después de la última dosis se realizó una extracción de sangre para la determinación de Acs neutralizantes.

4.17 Ensayo de reto en monos

El reto viral se efectuó 44 días después de la última dosis. Se inoculó 1 mL del sobrenadante de cultivo viral de la cepa A-15 (10^4 ufp) por vía subcutánea en la porción anterior del miembro superior derecho de cada animal. Posteriormente, se realizaron extracciones de sangre diariamente hasta el día 10 y luego el día 18 para el seguimiento de la viremia.

Varias alícuotas de cada suero individual extraído consecutivamente tras el reto se mantuvieron a -70°C y se utilizaron en los experimentos de aislamiento viral, así como para la amplificación de un fragmento del ARN viral por RT-PCR.

4.18 Aislamiento viral

Un volumen de 100 µL de suero correspondiente a cada animal en cada día después del reto se inoculó en monocapas confluentes de las células de línea Vero en placas de 24 pozos por duplicado, y luego se mantuvieron en agitación durante 2 h a 37°C. Posteriormente el inoculo se retiró, añadiéndose MEM fresco suplementado con SFB al 2%. Después de 3 a 4 días de incubación a 37°C, se tomó 100 µL de cada pozo y se volvió a inocular las monocapas celulares, repitiendo el procedimiento anterior. La presencia del virus se determinó por la técnica de inmunofluorescencia indirecta con LAH específicos del DEN-2 (Henchal *et al.*, 1982).

4.19 Detección de viremia por RT-PCR

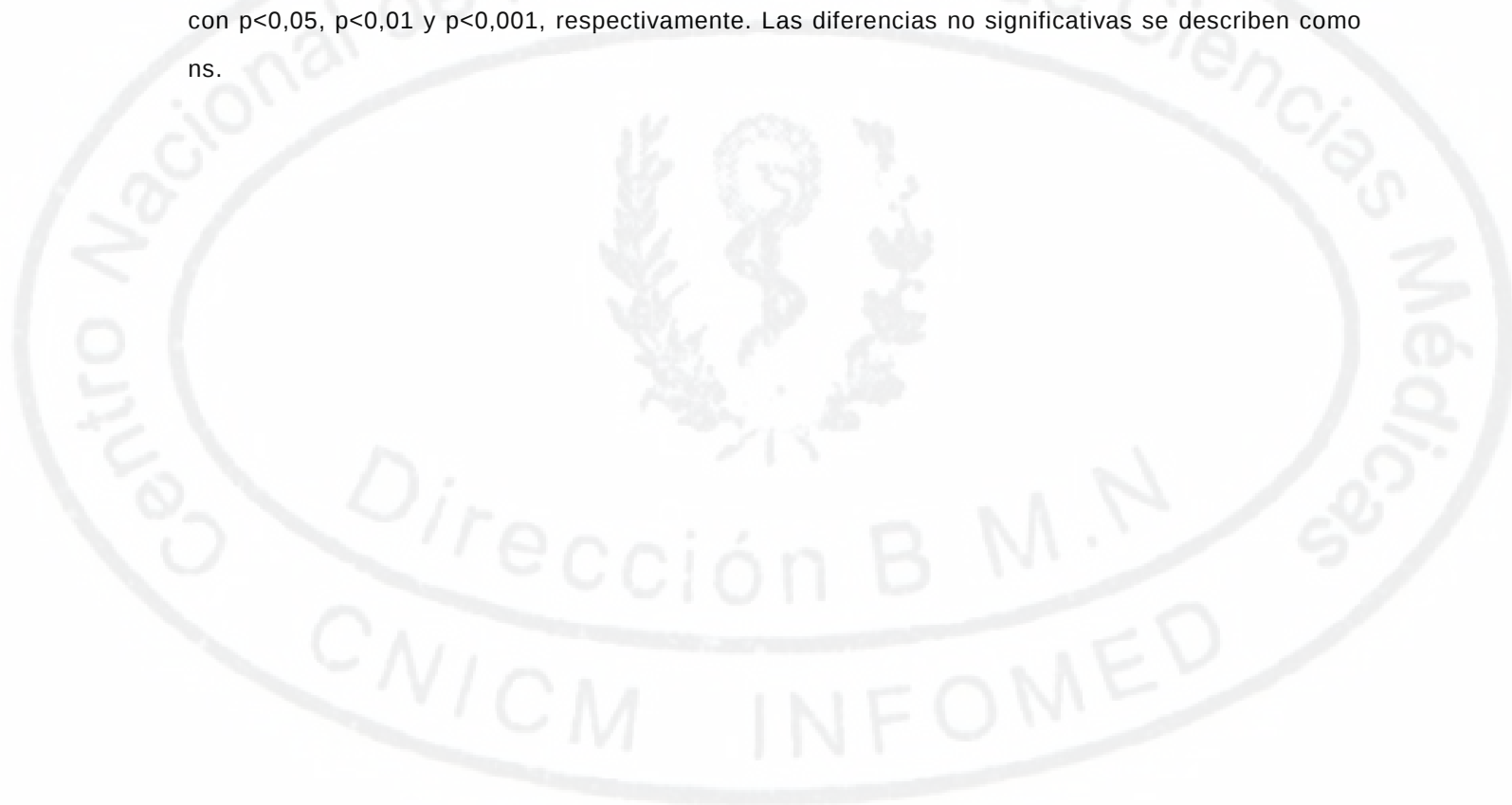
A partir de 200 µL de suero, se realizó la extracción de ARN viral empleando el sistema TRI REAGENT (Promega, U.S. A). Seguidamente, para la amplificación de la región correspondiente a un fragmento del genoma viral se realizó RT-PCR en las condiciones descritas por Lanciotti *et al.* (1992).

4.20 Análisis estadístico

A los datos obtenidos en los ensayos ELISA y PRNT se les comprobó la normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza por la prueba de Bartlett. Una vez demostradas estas dos premisas, se procedió al análisis de varianza (ANOVA), de clasificación simple. Para las comparaciones múltiples *a posteriori* entre los promedios de los

Materiales y Métodos

grupos se empleó la prueba de rangos múltiples de *Student-Newman-Keuls* (SNK) paramétrica. En el caso de los datos que no cumplieron las premisas se realizó una prueba no paramétrica Kruskal Wallis, y luego se empleó la prueba SNK no paramétrica para la comparación múltiple a *posteriori*!. Para medir la correlación entre la generación de Acs neutralizantes y la protección en ratones y monos se realizó la prueba de correlación por rangos de Spearman. En todos los casos se utilizó el programa estadístico *GraphPad Prism* (versión 2.00, 1995). Todas las pruebas se realizaron con $p < 0,05$ y $p < 0,01$. Para el análisis de los datos provenientes de los experimentos de protección en ratones y monos se empleó la prueba t de comparación de porcentajes (Sigarroat, 1985). Se reflejan los valores de ts para cada comparación y los valores con *, ** y *** indican diferencias significativas con $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente. Las diferencias no significativas se describen como ns.

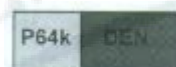


5 RESULTADOS

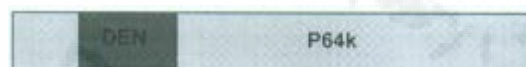
5.1 Diseño, clonación y expresión de las proteínas PD2, PD3 y PD5

Con el objetivo de estudiar la posición de fusión del fragmento viral (aa 286 al 426 de la proteína de la envoltura del virus) a la proteína P64k de *Neisseria meningitidis* se diseñaron tres variantes de proteínas quiméricas:

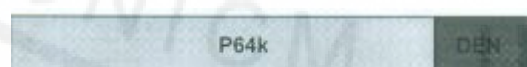
1. Fragmento de la proteína E del DEN-2 fusionado a los primeros 45 aa de la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*. Dicha región de P64k ha sido empleada como sistema de expresión de diferentes genes heterólogos con resultados satisfactorios (Carmenate *et al.*, 2001; Niebla *et al.*, 2001).



2. Fragmento de la proteína E del DEN-2 insertado en el dominio de unión a ácido lipoico de la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*. Esta región de P64k también se empleó para la inserción de fragmentos de 50 aa de proteínas heterólogas con buenos resultados (datos pendientes de publicación). Además es una región expuesta en la estructura de la proteína (Tozawa *et al.*, 2001).



3. Fragmento de la proteína E del DEN-2 fusionado al C-terminal de la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*. La región del C-terminal de P64k resultó inmunogénica en ratones (González *et al.*, 2000b).



Para la obtención de las proteínas antes descritas se realizaron diferentes estrategias de clonación. A partir del plasmidio p30 VD2, el cual contiene los genes estructurales C-PrM-E del DEN-2, se realizó un PCR con el objetivo de amplificar la región codificante para los aa 286 al 426 de la proteína de la envoltura del virus, correspondiente a una banda de 426 pb según se muestra en la figura 1.

Resultados

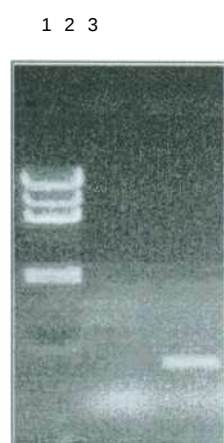


Figura 1 Amplificación por PCR de la banda de 426 pb de la proteína E del DEN-2.

1. Patron de peso molecular *X Hind III* (kb): 9,0; 6,6; 4,3; 2,3; 2,0; 0,5.
2. Control (-).
3. Banda amplificada a partir del p30 VD2.

Las bandas amplificadas con tres pares diferentes de cebadores se purificaron y digirieron según los sitios incorporados en los extremos para ser clonadas en cada vector de expresión. Después del proceso de ligamiento con los vectores pM108, pD1 y pD4 se generaron los plasmidios pD2, pD3 y pD5, respectivamente (Figura 2).

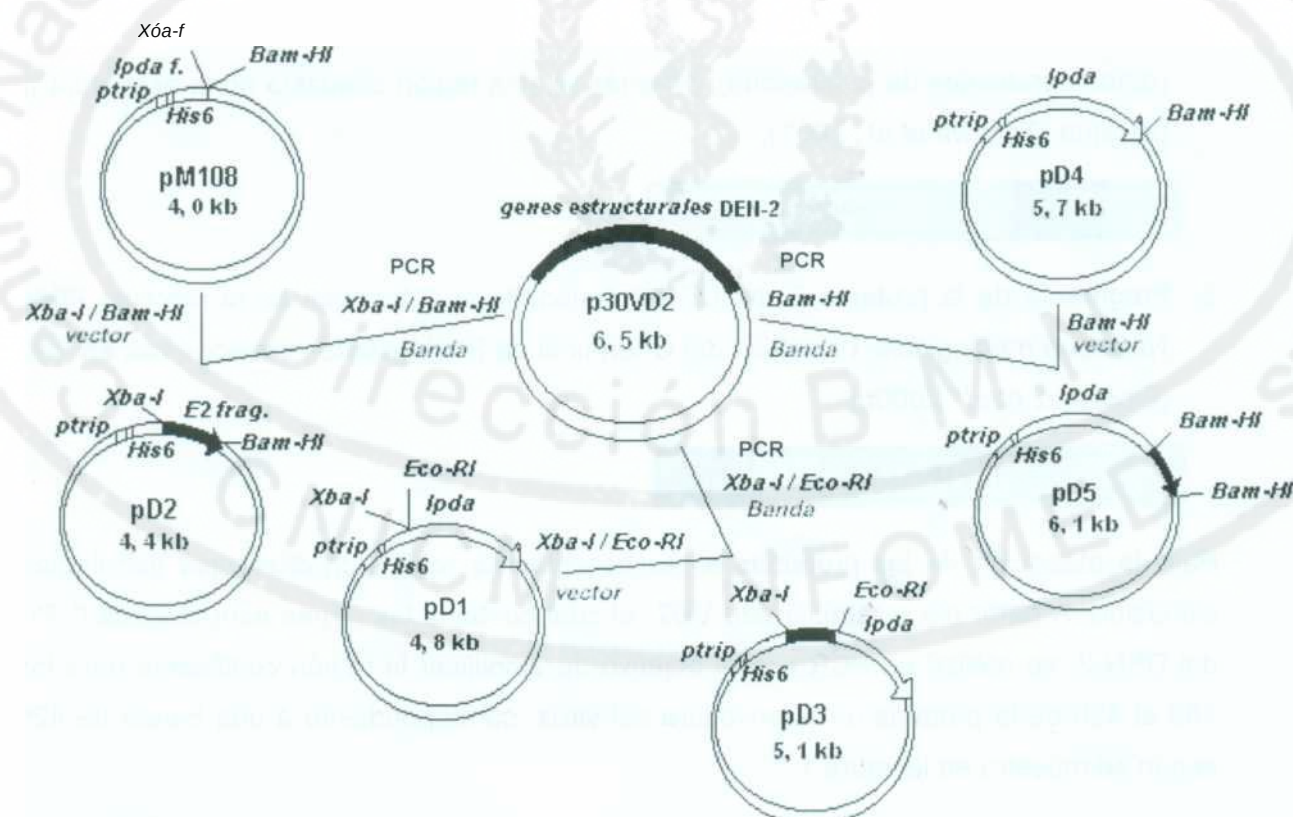


Figura 2. Estrategia de clonación para la obtención de los plasmidios pD2, pD3 y pD5.

Ipda. gen codificante para la proteína P64k; *ptrip*: promotor del operón triptofano; E2 frag: fragmento codificante para los aa 286 al 426 de la E del DEN-2; *Ipda f*: fragmento del gen *Ipda* que codifica para los primeros 45 aa de P64k.

Resultados

pD2: Codifica para el fragmento de la proteína E del DEN-2 fusionado a los primeros 45 aa de la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*.

pD3: Codifica para el fragmento de la proteína E del DEN-2 insertado en el dominio de unión a ácido lipoico de la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*.

pD5: Codifica para el fragmento de la proteína E del DEN-2 fusionado al C-terminal de la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*.

Tres cepas de *E. coli*: MM294, HB101 y W3110 se transformaron con cada uno de los plasmídios generados. Luego del crecimiento de una colonia en medio LBA las células se analizaron por SDS-PAGE. Como resultado, los mayores niveles de expresión para los plasmídios ensayados se obtuvieron en las cepas: W3110 (pD2) y MM294 (pD3 y pD5). Como se observa en la figura 3 se obtienen niveles de expresión variables: 15%, 8% y 20% para PD2, PD3 y PD5, respectivamente. Las tallas obtenidas para cada construcción coincidieron con las esperadas: 25 kDa para PD2 y 80 kDa para PD3 y PD5.

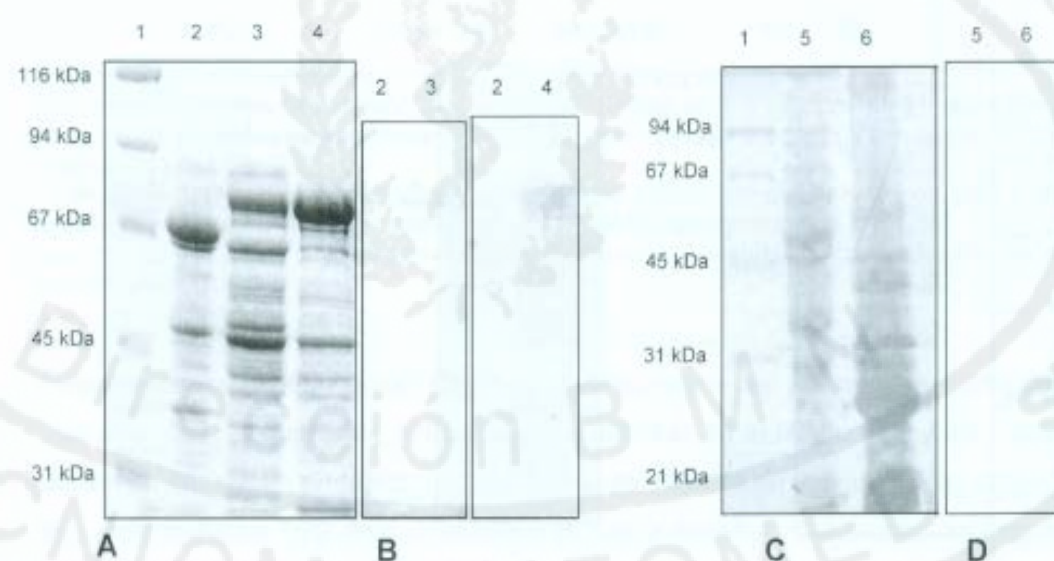


Figura 3. Análisis por SDS-PAGE (A y C) y por *Western blotting* (B y D) de la expresión de pD3, pD5 y pD2. A. Gel al 10%, C. Gel al 12%, B y D. Se empleó el LAH anti-DEN-2.
1. Patrón de peso molecular. 2. MM294 transformada con pD1. 3. MM294 transformada con pD3. 4. MM294 transformada con pD5. 5. W3110 transformada con pD2. 6. W3110 transformada con pD2.

5.2 Procesos de semipurificación

A partir de la biomasa obtenida de las cepas transformadas con los plasmidios pD2, pD3 y pD5, se realizó un proceso de ruptura en Prensa Francesa. Después de la centrifugación del producto de la ruptura, se analizó la cantidad de proteína recombinante presente en cada fracción (precipitado y sobrenadante), con el objetivo de determinar la relación proteína insoluble/proteína soluble (ins/sol). Según se refleja en la tabla 1 y en la figura 4, la mayor relación correspondió a la proteína PD2, la cual sólo contiene el fragmento N-terminal de la P64k, le siguió la variante de fusión PD5 y por último la variante de inserción PD3. La proteína PD2 se asocia mayoritariamente a la fracción insoluble después del proceso de ruptura mientras que las proteínas PD3 y PD5 se distribuyen en ambas fracciones. En el caso de PD3, se obtuvo mayoritariamente asociada al sobrenadante mientras que para PD5 fue a la inversa, la mayor cantidad se obtuvo asociada al precipitado de ruptura.

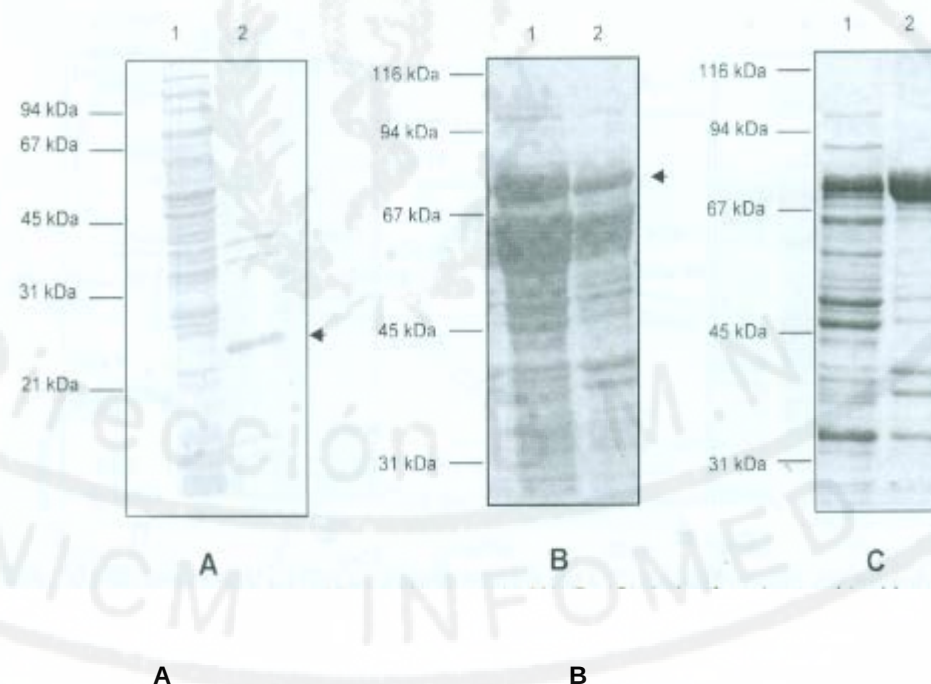


Figura 4. Análisis por SDS-PAGE al 12% (A) y al 10% (B y C) de las fracciones obtenidas después del proceso de ruptura de las cepas transformadas con los plasmidios pD2 (A), pD3 (B) y pD5 (C).

1. Sobrenadante de ruptura.
2. Precipitado de ruptura.

Para conocer el efecto del estado de la solubilidad en la funcionalidad de las proteínas quiméricas se decidió semipurificar las dos variantes de PD3 (PD3ins y PD3sol). Por otra parte, se decidió continuar los procesos de semipurificación con las variantes insolubles de PD2 y PD5.

Resultados

Primeramente, para desarrollar los procesos de extracción de las variantes insolubles se realizó un estudio de solubilización con urea a diferentes molaridades. El proceso de extracción de las muestras se realizó durante 30 min con agitación lenta y luego centrifugación. Como resultado, la extracción de la totalidad de las proteínas que contienen a la P64k completa se logró con urea 5 M (PD3 y PD5); sin embargo para la proteína PD2 fue necesario el empleo de urea 6 M (resultados no mostrados).

Tabla 1 Solubilidad de las proteínas quiméricas después del proceso de ruptura.

Proteínas	Sobrenadante de ruptura (sol) (mg) ^a	Precipitado de ruptura (ins) (mg) ^b	Ins/sol
PD2	0,9+/- 0,1	9,5 +/- 0,2	10,5 +/-1,1
PD3	8,6 +/- 0,2	4,7 +/- 0,3	0,5
PD5	5,6 +/- 0,2	10,2 +/- 0,2	1,8 +/- 0,1

Los valores reflejados se corresponden con el valor medio de tres experimentos independientes. ^a Los mg de proteínas se determinaron: mg = volumen del sobrenadante x concentración de proteínas x porcentaje de pureza. La proteína asociada al precipitado de ruptura se extrajo completamente con urea 8 M, luego se desaló en columnas PD10 y al eluato se le determinó la concentración de proteínas. Los mg de proteínas se determinaron: mg = volumen del eluato x concentración de proteínas x porcentaje de pureza.

Después de la centrifugación de los extractos, éstos se aplicaron en una columna de Sephadex G-25 a flujo lento, previamente equilibrada en el tampón TE y las muestras de la elución se analizaron por electroforesis. Como se muestra en la figura 5, las proteínas PD2 y PD5 alcanzaron un 75% de pureza mientras que la proteína PD3 alcanzó solamente un 35% de pureza.

Paralelamente, a partir del sobrenadante de ruptura correspondiente a la proteína PD3, se realizó una precipitación con sulfato de amonio. Después de añadir una cantidad de esta sal correspondiente al 35% de saturación, el precipitado obtenido se resuspendió en TE donde la proteína PD3 alcanzó aproximadamente un 30% de pureza (Figura 5).

Resultados

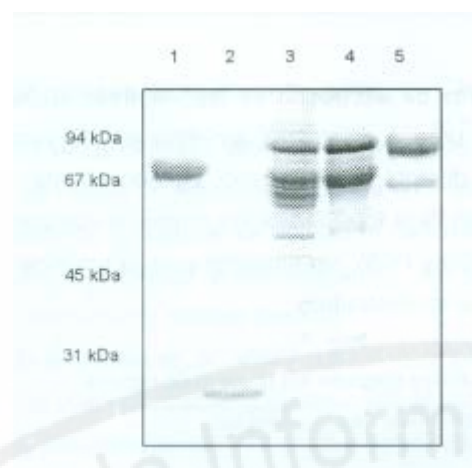


Figura 5. SDS-PAGE al 12,5% de las fracciones semipurificadas de las proteínas quiméricas.
1 P64k. 2. PD2. 3. PD3sol. 4. PD3ins. 5. PD5.

5.3 Caracterización antigénica

De los niveles de pureza alcanzados después de los procesos de purificación, el más bajo correspondió a la proteína PD3. Según se muestra en la figura 6, la mayor banda contaminante en la preparación semipurificada de PD3 se corresponde con la talla de 60 kDa.

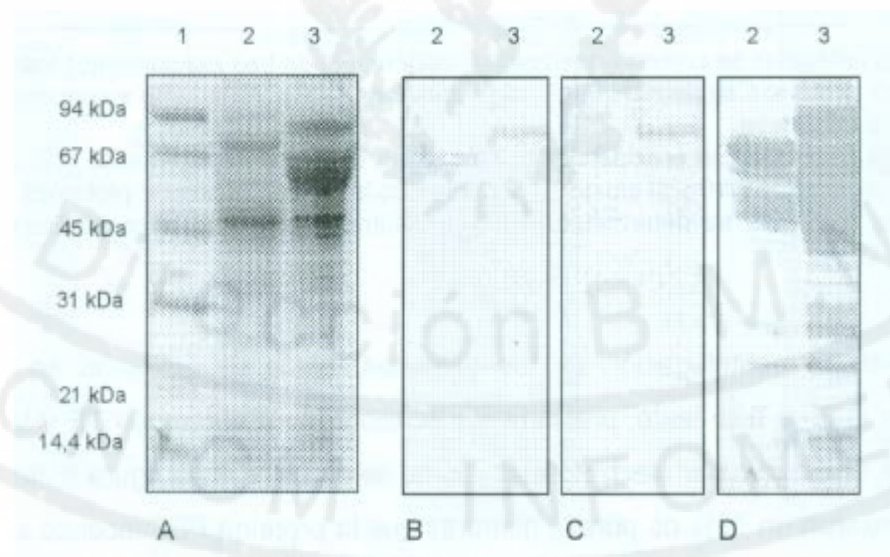


Figura 6. A. Análisis por SDS-PAGE al 10% de la proteína PD3. 1. PPM; 2. Sobrenadante de ruptura (P64k); 3. Sobrenadante de ruptura (PD3).
B. *Western blotting* con el AcM 448.
C. *Western blotting* con el LAH anti-DEN-2.
D. *Western blotting* con el AcM 114.

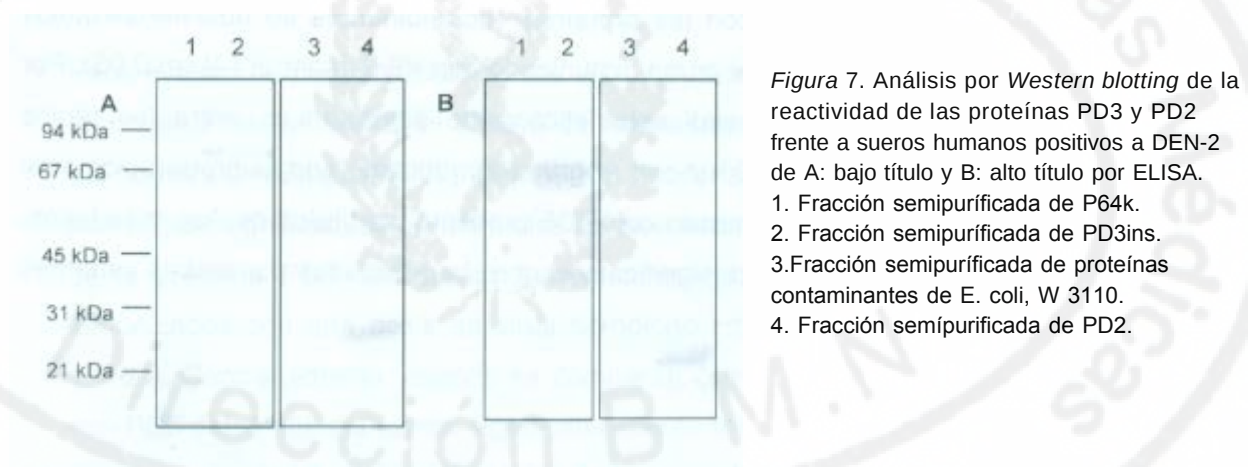
Con el objetivo de caracterizar la misma se realizó un *Western blotting* con un LAH anti-DEN-2, con el AcM 448 que reconoce el N-terminal de la P64k y con el AcM 114, específico a una región del C-terminal de la P64k. Como se observa, la banda correspondiente a PD3 es reconocida por los tres Acs, mientras que la banda de 60 kDa, es reconocida solamente por

Resultados

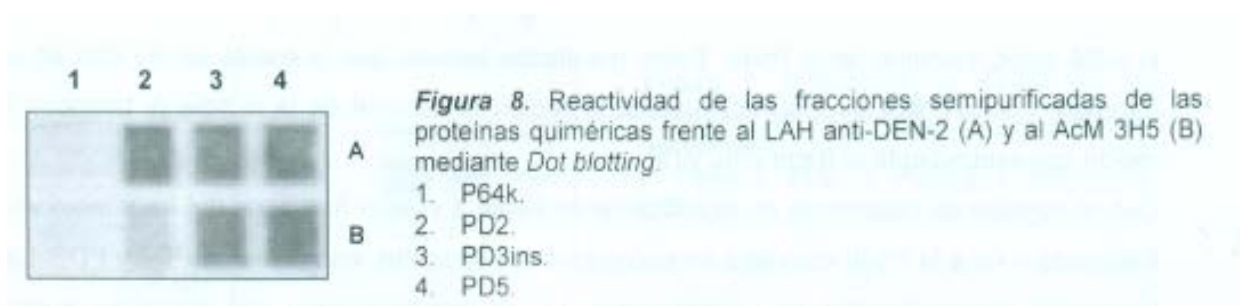
el AcM anti-C-terminal de la P64k. Estos resultados indican que la banda de 60 kDa es un fragmento de la P64k el cual no presenta la región N-terminal de la misma ni tampoco la región correspondiente al fragmento viral.

Con el objetivo de determinar el reconocimiento frente a sueros humanos del fragmento viral fusionado o no a la P64k completa se escogieron las variantes insolubles de PD2 y PD3. Las fracciones semipurificadas se caracterizaron por el reconocimiento con diferentes sueros policlonales humanos de alto (>100 000) y bajo título anti-DEN-2 (<100 000). Como se observa en la figura 7, en un ensayo de *Western blotting*, el fragmento correspondiente a la proteína de la envoltura fue siempre reconocido por los sueros humanos ensayados, independientemente del contexto en la P64k.

Se realizaron además ensayos de *Dot blotting* en condiciones nativas de las muestras, pero la reactividad frente a una preparación semipurificada de P64k fue alta debido a los contaminantes de *E. coli* presentes en las muestras (resultados no mostrados).



Las fracciones semipurificadas de las variantes insolubles de PD2, PD3 y de la proteína PD5 se caracterizaron también por reconocimiento con Acs policlonales y con un AcM murino en un ensayo de *Dot blotting* (Figura 8). Se evidenció que los mayores reconocimientos se obtuvieron con el LAH anti-DEN-2 para todas las variantes proteicas, sin diferencia apreciable entre ellos; sin embargo, sí se observó diferencias en el reconocimiento por el AcM 3H5 entre las muestras. Este AcM es serotipo específico, neutralizante y su reconocimiento frente al epitopo depende de la correcta formación del único puente disulfuro presente en el dominio III. La mayor señal se obtuvo con PD3 y PD5, mientras que la proteína PD2 mostró una reactividad muy baja. La variante soluble de PD3 exhibió el mismo patrón de reconocimiento que su contraparte insoluble (resultados no mostrados).



5.4 Evaluación inmunológica en ratones

Considerando la baja reactividad obtenida con PD2 frente al AcM 3H5 se decidió evaluar únicamente las proteínas quiméricas PD3 y PD5 que contenían la P64k completa. Para ello, se inmunizaron ratones Balb/c con las preparaciones semipurificadas. La aparición de Acs reactivos al DEN-2 se determinó mediante un ELISA de captura a través del cual se determinaron los títulos por dilución a punto final de los sueros 15 días tras la última dosis (Figura 9).

En todos los animales inmunizados con las proteínas recombinantes se obtuvieron títulos antivirales significativos con respecto al grupo inmunizado con P64k [control (-)] ($p < 0,05$). Por otra parte, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los títulos obtenidos con ambas variantes de PD3 y con el grupo inmunizado con la preparación viral ($p > 0,05$); sin embargo, el grupo inmunizado con PD5 presentó los títulos de Acs más bajos, exhibiendo diferencias estadísticamente significativas con los generados por ambas variantes de PD3 y DEN-2 ($p < 0,05$).

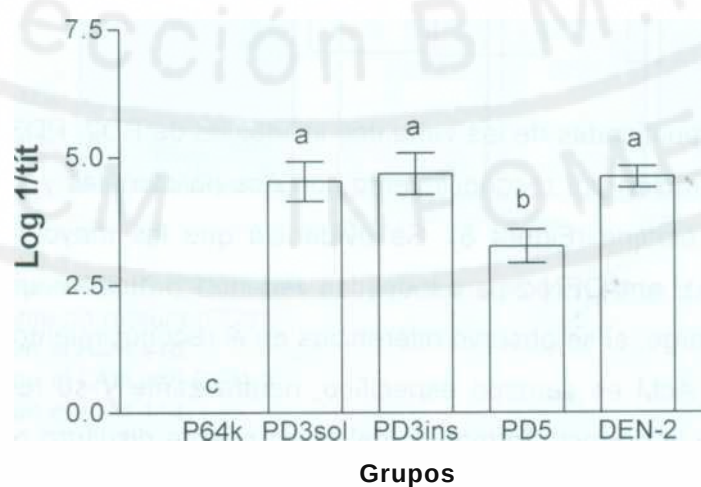


Figura 9. Reactividad frente al virus DEN-2 de los anticuerpos generados por la inmunización de las proteínas quiméricas. Letras desiguales indican diferencias significativas ($p < 0,05$), según la prueba de rangos múltiples paramétrica SNK. N=10.

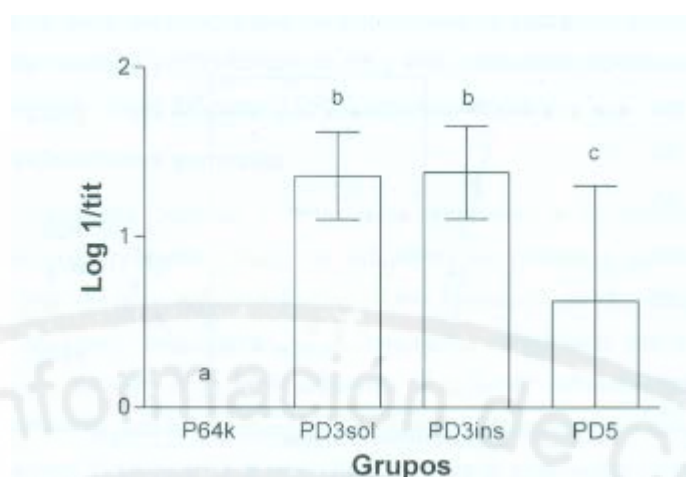


Figura 10. Títulos de anticuerpos neutralizantes anti-DEN-2 generados en ratones inmunizados con las proteínas quiméricas del serotipo 2. Letras desiguales indican diferencias significativas ($p < 0,05$), según la prueba de rangos múltiples paramétrica SNK. N=10.

Para evaluar la funcionalidad de los Acs inducidos por la inmunización con las proteínas recombinantes, se realizó el ensayo de neutralización viral mediante la técnica de reducción del número de placas (PRNT) (Figura 10). Similar a lo obtenido en el ELISA antiviral, no hubo diferencias significativas en los títulos de Acs neutralizantes generados por las dos variantes de la proteína PD3, los cuales fueron comparables a los títulos de Acs en los ratones inmunizados con una dosis de virus homólogo infectivo (título de la mezcla de los sueros: 1: 160). Contrariamente, cuando se comparan con los títulos generados por la inmunización con PD5 estos últimos fueron significativamente menores ($p < 0,05$). Por último, no se detectó ninguna actividad neutralizante en los Acs generados con la preparación semipurificada de la proteína P64k, como control (-).

5.5 Ensayo de protección

Teniendo en cuenta la similitud en cuanto a antigenicidad y capacidad de generar Acs antivirales y neutralizantes con las dos variantes de PD3, se decidió realizar el reto viral únicamente con la variante insoluble y así comparar con PD5 que se obtiene mayoritariamente de esta manera. Para ello, un mes después de la última dosis, los ratones de cada grupo inmunizado se inocularon intracranealmente con 100 DL₅₀ de virus DEN-2. Teniendo en cuenta que dicha preparación contiene un virus altamente neuroadaptado en cerebro de ratón, los animales una vez inoculados desarrollan signos severos de encefalitis que incluyen enramamiento del pelo, pérdida de peso, inmovilidad y por último la muerte.

Resultados

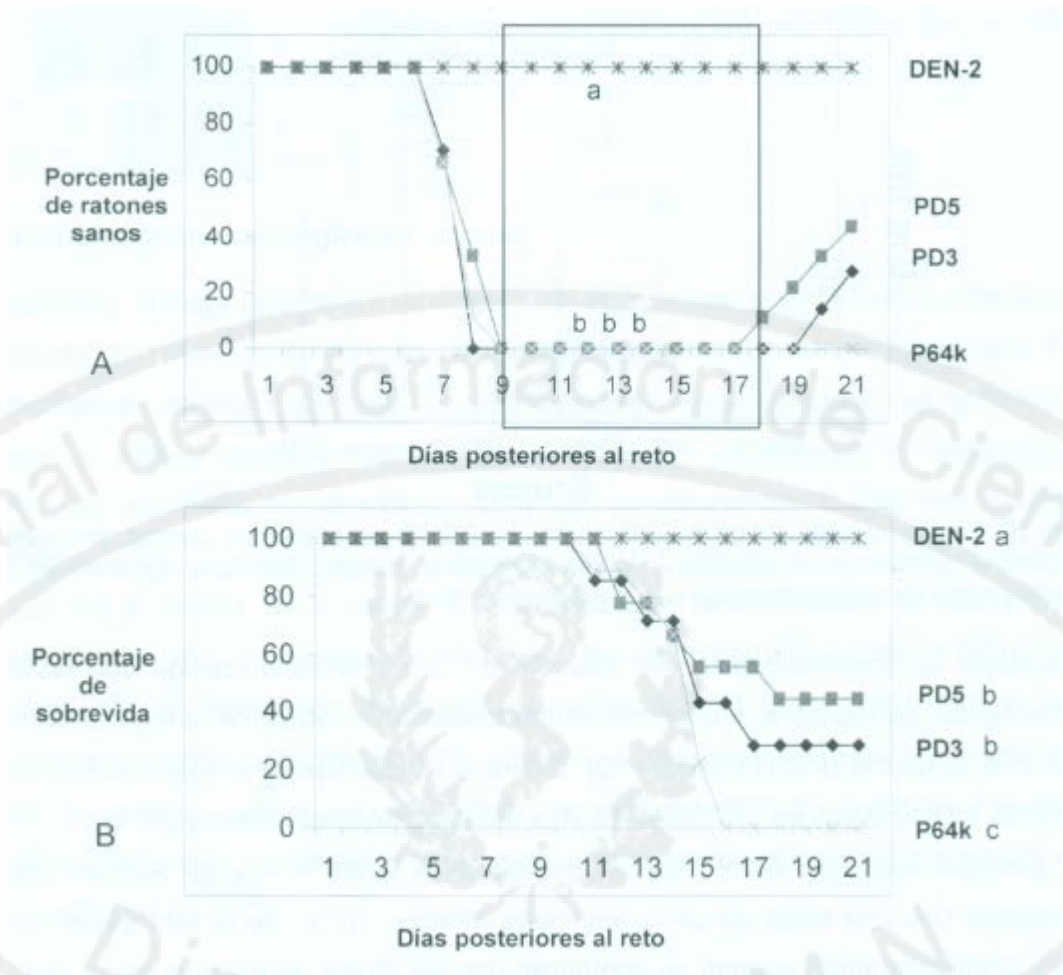


Figura 11 Protección ante el reto con DEN-2 letal (100 DL₅₀) en ratones inmunizados con las proteínas PD3 y PD5. A. Morbilidad; B. Mortalidad. Letras desiguales indican diferencias significativas según la prueba t de comparación de porcentajes. Dentro del recuadro se señala la zona de diferencias estadísticamente significativas en términos de morbilidad. DEN-2, N=10; PD3, N=7; PD5 N=9, P64k N=9.

A partir del día 7 los animales inmunizados con las proteínas recombinantes comenzaron a enfermarse de la misma manera que los del grupo inmunizado con P64k, exhibiendo síntomas ligeros (Figura 11). Ya en el día 9 todos los animales estaban enfermos, excepto aquellos inmunizados con el virus infectivo. A partir del día 11 comenzaron a morir y ya en el día 17 todos los ratones del grupo control (-) (P64k) habían muerto, mientras que el 28 y 44% de los animales de los grupos inmunizados con PD3 y PD5, respectivamente permanecieron vivos, pero enfermos. En los días posteriores dichos ratones comenzaron a recuperarse encontrándose totalmente sanos en el día 21. En el caso del grupo inmunizado con la preparación viral ningún ratón enfermó ni murió durante el período de observación.

Finalmente se pudo determinar que los porcentajes de sobrevida alcanzados para los grupos inmunizados con PD3 y PD5 fueron de 28 y 44%, diferentes significativamente con respecto al grupo control (-) (ts=2,24* y ts=-3,09***, respectivamente).

5.6 Consideraciones generales

Todos los resultados descritos anteriormente responden al cumplimiento de una parte del primer objetivo del presente trabajo. Se obtuvieron tres proteínas quiméricas que contienen el fragmento viral de la envoltura del virus DEN-2 fusionado en dos posiciones de la proteína P64k de *Nelsseria menIngitidis* y al fragmento N-terminal de ésta. Después de la caracterización antigénica de estas proteínas se demostró la necesidad de la presencia de la proteína portadora para la exposición de un epitopo neutralizante y serotipo específico, por lo que se descartó el empleo de la proteína PD2 para la evaluación en ratones. Seguidamente se evidenció la generación de una respuesta neutralizante y protectora tras la inmunización de ratones con las dos variantes quiméricas que contenían la P64k completa Debido a que la mayor respuesta neutralizante se generó con la proteína PD3 y se observó una tendencia a una mayor protección con PD5, se decidió evaluar ambas proteínas en un modelo más cercano al hombre: monos *Macaca fascicularis*.

5.7 Evaluación inmunológica en monos *Macaca fascicularis*

Se formaron tres grupos de monos con un diseño según el peso, sexo, Acs anti-P64k y parámetros clínicos, quedando conformados de la siguiente manera:
Tabla 2 Distribución de los monos para el esquema de inmunización.

Identificación	Acs anti-P64k	Sexo	Peso (kg)	Inmunógeno
I	< 1:50	M	4,87	P64k
II	< 1:50	M	3,54	
III	1:100	M	4,59	
I	< 1 50	M	3,72	PD3
	1 50	M	3,58	
III	< 1 50	M	3,17	
I	1 50	M	5,89	PD5
	< 1 50	H	3,03	
III	1 50	H	3,03	

Las inmunizaciones se realizaron con las proteínas PD3 y PD5 según el esquema 0, 1, 3 y 7 meses. Posteriormente, 44 días tras la última dosis, cada animal se inoculó con una preparación de virus DEN-2 infeccioso. Las extracciones de sangre se realizaron diariamente

Resultados

durante los 10 primeros días posteriores al reto para estudiar el desarrollo de viremia. Este parámetro se midió por RT-PCR y por aislamiento viral en células Vero. La tabla 3 refleja los resultados de viremia por ambos métodos en cada grupo de monos.

Tabla 3. Seguimiento de la viremia después del reto con DEN-2 infectivo en los monos inmunizados con PD3, PD5 y P64k.

Días / Monos	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PD3 I	-/- ^a	-/-		-/+	-/+	-/+					-/-
PD3 II					-/-	-/-			-/-	-/-	
PD3 III		-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-		
PD5 I			-/+		-/-	-/+	-/-	-/-	-/-		-/-
PD5 II				-/-	-/-	-/-	-/-		-/-		-/-
PD5 III				-/+	-/-	-/-	-/-		-/-		-/-
P64k I			-/+	+/+	+/+	-/+	-/+				-/-
P64k II		-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-		-/-
P64k III			-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-		-/-

^a En el numerador se refleja el resultado del aislamiento viral en células Vero y en el denominador el de la amplificación de un fragmento de ARN viral por RT-PCR. En negritas se representan los días positivos por al menos una de las dos técnicas ensayadas. Letras desiguales indican diferencias significativas según la prueba t de comparación de porcentajes con los datos obtenidos por RT-PCR. Números desiguales indican diferencias significativas por la misma prueba estadística con los datos obtenidos por aislamiento viral.

Considerando los datos obtenidos por la técnica de aislamiento viral, la presencia del virus en los tres monos inmunizados con P64k se detectó con un valor medio de 2,6 días. Por otra parte, en el grupo inmunizado con PD3, solamente se obtuvo aislamiento viral en el mono PD3 III en el día 4 después del reto, mientras que en los monos inmunizados con PD5 no se aisló virus en ninguno de los sueros de los días analizados.

Paralelamente, a través de la técnica del RT-PCR se obtuvo amplificación del fragmento de ARN viral en 5,6 días como promedio en el grupo inmunizado con la proteína P64k. Por otra parte, en el grupo inmunizado con PD3, en el mono PD3 III se obtuvo amplificación durante 6 días posteriores al reto mientras que en el mono PD3 I solamente se detectó la banda en tres días posteriores al reto (días 3, 4 y 5). Contrariamente, en el mono PD3 II, no se obtuvo amplificación viral en ninguna de las muestras de sueros de los diferentes días.

Resultados

En el grupo inmunizado con la proteína PD5, en los monos PD5 I y PD5 III se detectó amplificación viral en dos días (día 2 y 5 post-reto) y un día (día 3 post-reto), respectivamente. Adicionalmente y similar al mono PD3 II, no se obtuvo amplificación alguna en ninguna de las muestras de suero del mono PD5 II después del reto.

Teniendo en cuenta la técnica de aislamiento viral, los grupos inmunizados con las proteínas quiméricas se protegieron significativamente con respecto al grupo control [$ts=-2,11^*(PD3)$ y $ts=-4,11^{***}(PD5)$]. De la misma manera, considerando los datos del RT-PCR, se logró protección significativa en los grupos inmunizados con PD3 y PD5, aunque en el caso de PD5 fue significativamente mayor ($ts=1,99^*$).

Quince días tras la cuarta dosis, los sueros de los monos inmunizados con las proteínas recombinantes se analizaron por su capacidad de neutralizar la infectividad viral a través de la técnica PRNT. Adicionalmente, se analizaron por la misma técnica los sueros extraídos 18 días tras el reto de los monos inmunizados con P64k, lo cual equivale a una inmunización viral. Como se muestra en la figura 12, se detectó una gran variabilidad en los títulos de Acs neutralizantes en los grupos inmunizados con las proteínas quiméricas y no hubo diferencias significativas al compararlos con los generados en el grupo control ($p>0,05$). Estos resultados indicaron que la inoculación de cuatro dosis de las proteínas recombinantes generó una respuesta neutralizante similar a la inmunización viral en los monos. Por otra parte, los animales que presentaron mayores títulos neutralizantes no fueron los totalmente protegidos (Tabla 3 y Figura 12), indicando una falta de correlación entre estos dos parámetros ($p<0,05$).

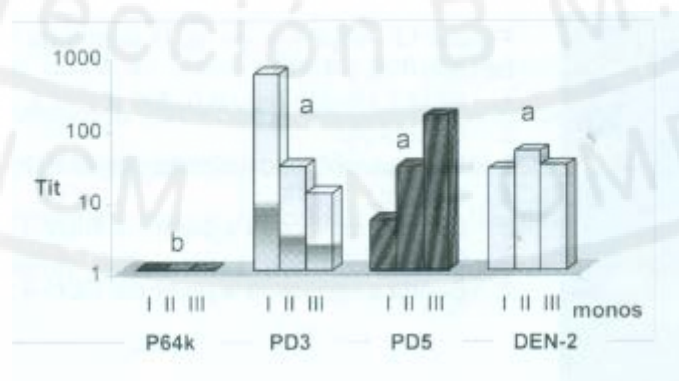


Figura 12. Comparación de los títulos de anticuerpos neutralizantes en los monos inmunizados con PD5, PD3 y P64k antes y después del reto (DEN-2). Letras desiguales indican diferencias significativas ($p<0,05$), según la prueba de Kruskal Wallis y el análisis por SNK no paramétrico.

5.8 Consideraciones generales

Hasta este punto se le da cumplimiento al objetivo 1. Primeramente se evidenció que las dos variantes de proteínas quiméricas (PD3 y PD5) generaron una respuesta inmune humoral similar a la inducida por la infección viral. Se demostró, además, por primera vez con una proteína recombinante del virus dengue, que la inoculación de la variante quimérica de fusión del fragmento viral al C-terminal de la P64k (PD5) impidió el aislamiento viral en el suero de los monos retados con el virus infectivo. Por estas razones se decidió realizar las construcciones genéticas posteriores similares a PD5 empleando el fragmento de la envoltura del resto de los serotipos virales.

5.9 Clonación y expresión de las variantes de fusión al C-terminal de la P64k correspondientes a los serotipos 1, 3 y 4

A partir del sobrenadante de cultivo viral de las cepas correspondientes a DEN-1, DEN-3 y DEN-4 se realizó un RT-PCR con cebadores conteniendo el sitio de restricción *Bam*-*H*I. Las bandas amplificadas de 426 pb, codificantes para los aa 286 al 426 de la proteína E de cada serotipo (figura 13), se purificaron y se digirieron con la enzima *Bam* HI para la clonación en el vector PGEM-T. Posteriormente, después de digeridos los plasmidios resultantes, las bandas se clonaron en el vector pD4. Como resultado se obtuvieron los plasmidios de expresión pD10 (DEN-1), pD18 (DEN-3) y pD19 (DEN-4) (Figura 14).

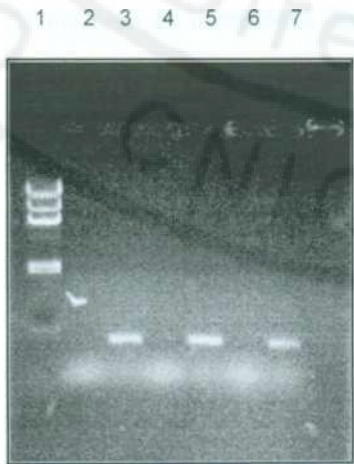


Figura 13. Amplificación de la banda de 426 pb de la proteína E de DEN-1, 3 y 4.

- 1. PPM X *Hind* III (kb): 9,0; 6,6; 4,3; 2,3; 2,0; 0,5.
- 2. Control (-).
- 3. Banda amplificada a partir del DEN-1.
- 4. Control (-).
- 5. Banda amplificada a partir del DEN-3.
- 6. Control (-).
- 7. Banda amplificada a partir del DEN-4.

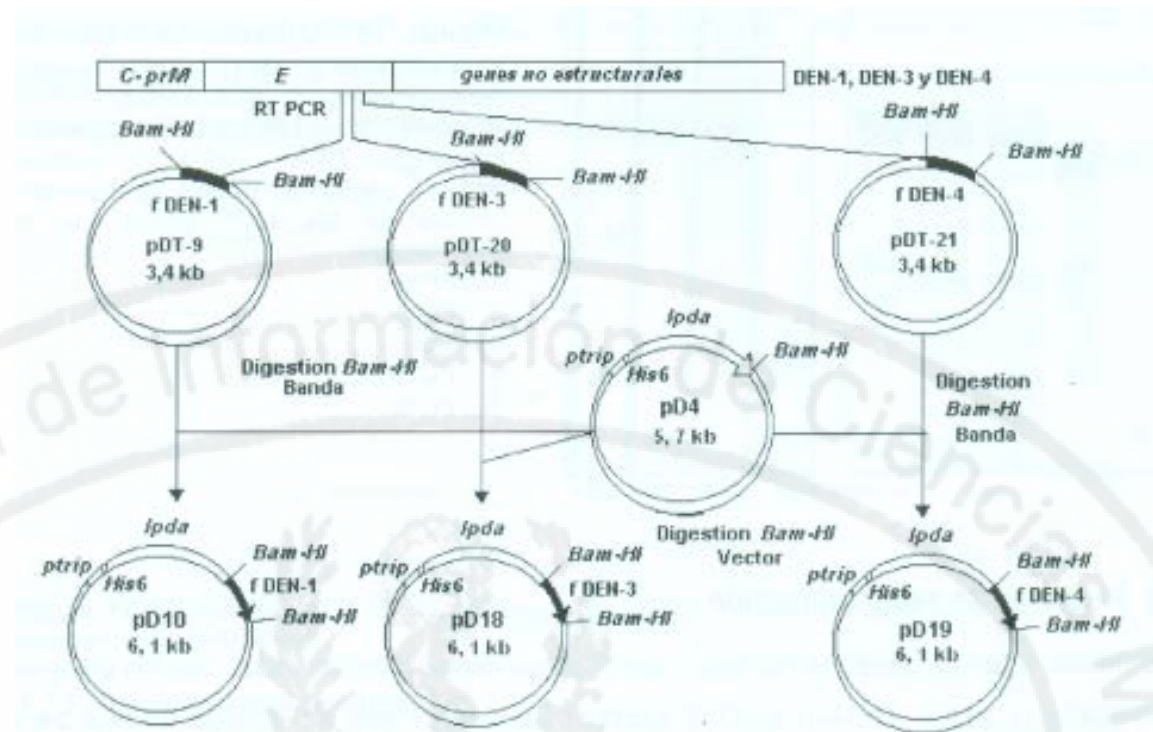
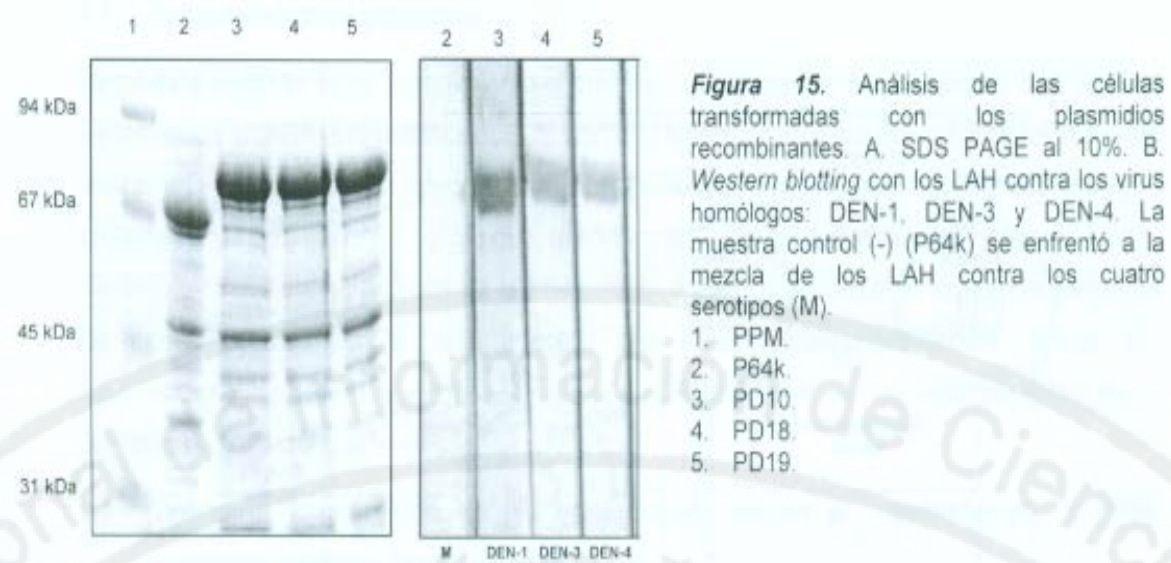


Figura 14 Estrategia de clonación para la obtención de los plásmidos pD10 (DEN-1), pD18 (DEN-3) y pD19 (DEN-4). *ptrip*: promotor del operón triptofano; *lpdA*: gen codificante para la proteína P64k; f DEN-1, f DEN-3 y f DEN-4: fragmento codificante para los aa 286 al 426 de la E de DEN-1, 3 y 4, respectivamente.

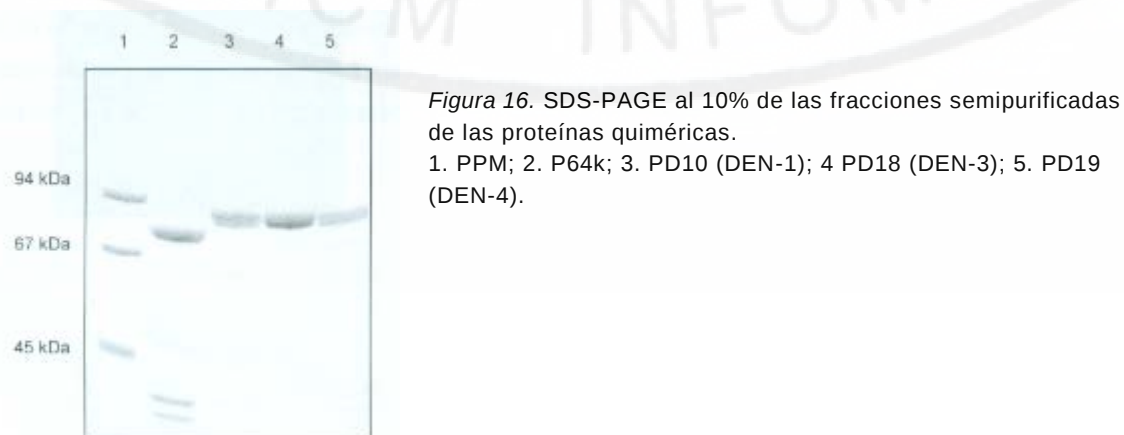
Diferentes cepas de *E.coli* se transformaron con cada uno de los plásmidos generados y contrariamente a lo obtenido con PD5, los mayores niveles de expresión se alcanzaron con la cepa HB101, oscilando entre un 10 y un 15%, según el serotipo. Se detectaron bandas en la talla de 80 kDa aproximadamente, no presentes en las cepas transformadas con el vector pD4, las cuales fueron reconocidas por los LAH generados contra los virus de serotipo homólogo (Figura 15).

Resultados



5.10 Procesos de semipurificación

La biomasa obtenida después del crecimiento de las cepas transformadas con los plasmidios pD10 (DEN-1), pD18 (DEN-3) y pD19 (DEN-4) se resuspendió en tampón de lisis para el proceso de ruptura en Prensa Francesa. Como resultado las proteínas se distribuyeron mayoritariamente en la fracción insoluble después de la centrifugación del producto de la ruptura celular. Teniendo en cuenta que la preparación de PD5 insoluble fue la ensayada en monos, se decidió continuar con las variantes insolubles, que además se obtienen con mayor nivel de pureza que sus contrapartes solubles (resultados no mostrados). Cada una de las proteínas recombinantes se extrajo con urea 5 M y el extracto resultante se aplicó en una columna de G-25. Como resultado se obtuvieron preparaciones con aproximadamente un 75% de pureza según se muestra en la figura 16.



Resultados

Finalmente, con el objetivo de conocer el estado de agregación de las proteínas, cada una de las preparaciones se analizó por HPLC. El perfil obtenido para todas las proteínas coincidió con el mostrado en la figura 17 para PD5 (DEN-2), es decir un patrón heterogéneo con presencia de agregados de alta talla molecular.

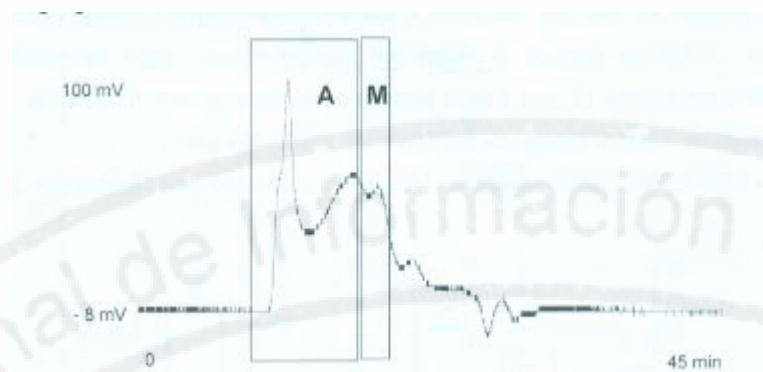


Figura 17. Cromatograma de HPLC en Superdex 200 de fracción semipurificada de PD5. A: formas agregadas. M: monómero.

5.11 Caracterización antigénica

Las fracciones semipurificadas de cada una de las proteínas se enfrentaron a LAH anti-DEN de los serotipos homólogos y se determinó la reactividad mediante *Dot blotting*. Se comparó además la reactividad de PD5 semipurificada con respecto a la preparación viral de DEN-2. Como se observa en la figura 18, en todas las proteínas químicas se detectaron niveles de reactividad comparables a los obtenidos con las preparaciones virales homólogas.

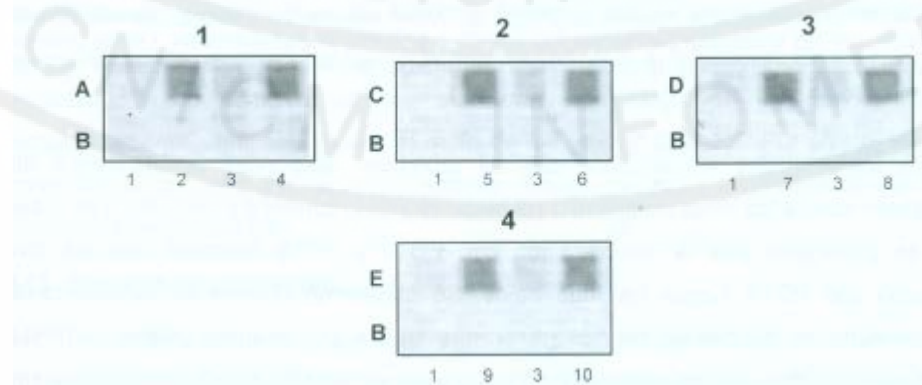


Figura 18. Reactividad de las fracciones semipurificadas de las proteínas químicas frente a LAH anti-DEN.

A. LAH anti-DEN-1; B. LAN; C. LAH anti-DEN-2; D. LAH anti-DEN-3; E. LAH anti-DEN-4.

1. P64k; 2. PD10; 3. CN; 4. DEN-1; 5. PD5; 6. DEN-2; 7. PD18; 8. DEN-3; 9. PD19; 10. DEN-4.

5.12 Evaluación inmunológica en ratones

Con el objetivo de evaluar la inmunogenicidad en ratones, éstos se inocularon con las preparaciones semipurificadas de las proteínas quiméricas correspondientes a los serotipos

1, 3 y 4. La aparición de Acs reactivos a los virus homólogos correspondientes se detectó mediante un ELISA de captura, a través del cual se determinaron los títulos por dilución a punto final de los sueros 15 días tras la tercera dosis. Se inocularon, además, tres grupos con las preparaciones virales infectivas correspondientes a los serotipos 1, 3 y 4, y un grupo con la proteína P64k como control negativo. Los datos obtenidos se muestran en la figura 20.

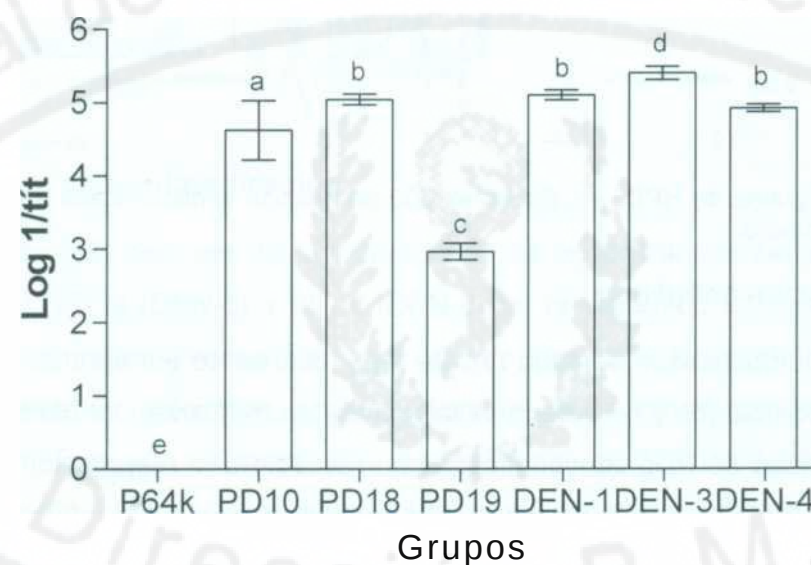


Figura 20 Reactividad frente a DEN-1, DEN-3 y DEN-4 de los anticuerpos generados por la inmunización con las proteínas quiméricas PD10, PD18 y PD19, respectivamente. Letras desiguales indican diferencias significativas ($p < 0,05$), según la prueba de rangos múltiples paramétrica SNK. $N=10$.

En todos los animales inmunizados con las proteínas quiméricas se obtuvieron títulos significativos contra los virus homólogos respecto al grupo control (-) ($p < 0,05$). Los mayores títulos se generaron tras la inmunización con PD10 y PD18 mientras que los niveles alcanzados con PD19 fueron los más bajos. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de Acs generados en los grupos inmunizados con PD10 y PD18 al compararlos con los obtenidos en los grupos inmunizados con los serotipos virales homólogos. No obstante la menor respuesta se obtuvo con PD19, con gran diferencia respecto al grupo inmunizado con DEN-4 ($p < 0,01$).

Resultados

Paralelamente, para evaluar la funcionalidad de los Acs inducidos se realizó el ensayo de PRNT (Figura 21).

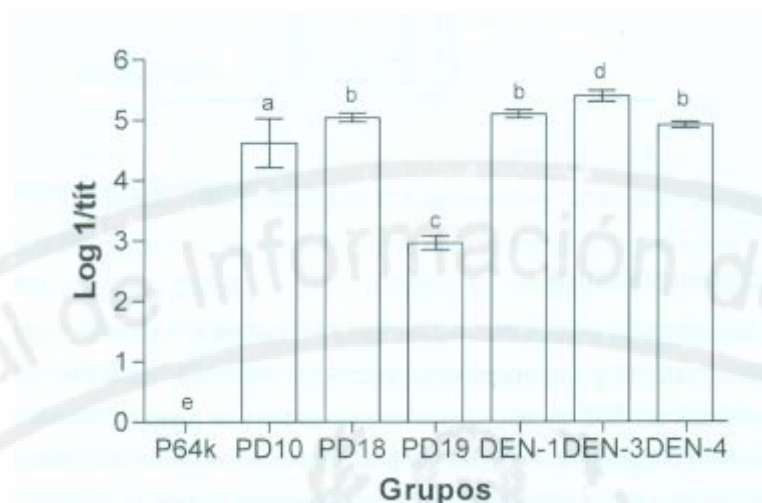


Figura 21. Títulos de anticuerpos neutralizantes frente a los virus homólogos, generados en ratones inmunizados con las proteínas quiméricas PD10, PD18 y PD19. Letras desiguales indican diferencias significativas ($p < 0,05$), según la prueba de rangos múltiples paramétrica SNK. N=10.

En concordancia con lo obtenido por el ensayo ELISA, los niveles de Acs neutralizantes fueron mayores en el caso de los grupos inmunizados con PD10 y PD18, en este caso sin diferencias estadísticas entre ellos ($p > 0,05$), mientras que en el grupo inmunizado con PD19 solo el suero de un ratón neutralizó la infectividad viral a la dilución de 1:10. En el grupo inmunizado con P64k todos los sueros fueron negativos, exhibiendo diferencias estadísticamente significativas con el resto de los grupos ($p < 0,05$). Por último, los animales inmunizados con dos de las preparaciones virales, generaron anticuerpos neutralizantes (resultados no mostrados).

5.13 Ensayos de protección

Los 10 animales de cada grupo a los que no se les extrajo sangre se emplearon para el ensayo de protección. Éstos se inocularon intracranealmente con las cepas virales correspondientes al serotipo homólogo, con la dosis de 100 DL₅₀ y se observaron durante 21 días. En las figuras 22, 23 y 24 se reflejan las cinéticas de morbilidad y mortalidad para los grupos retados con los serotipos 1, 3 y 4, respectivamente.

Resultados

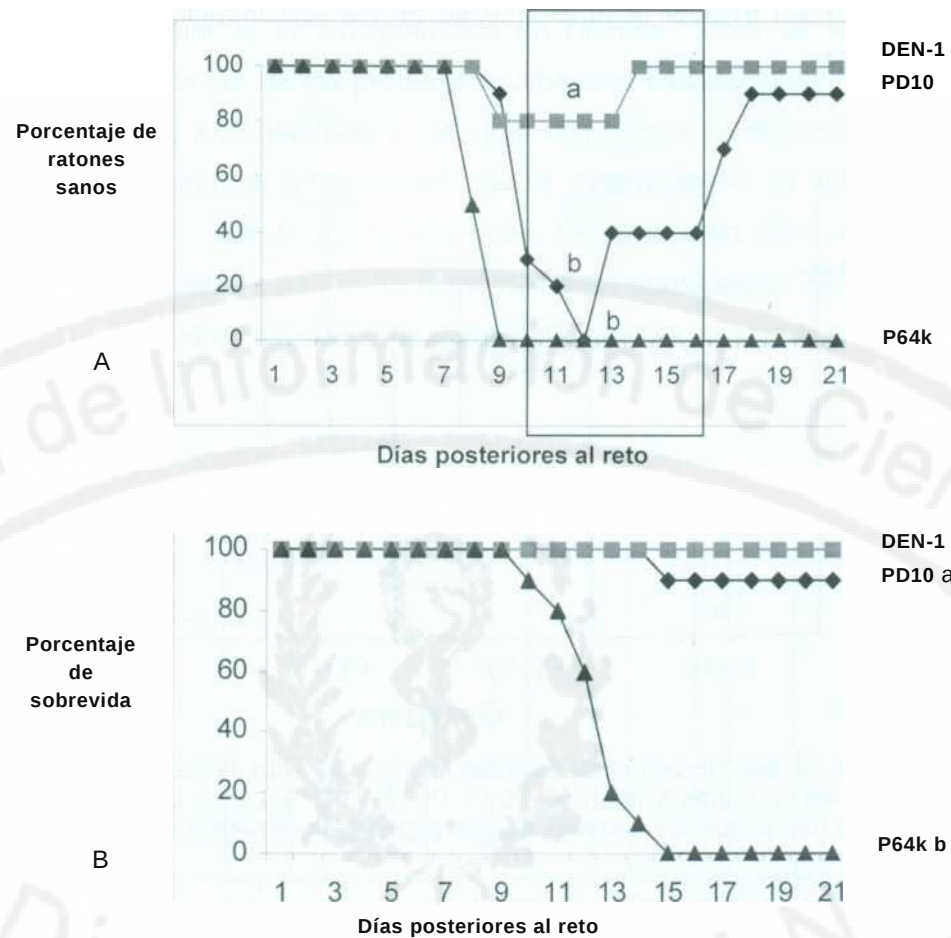


Figura 22. Protección ante el reto con DEN-1 letal (100 DL₅₀) en ratones inmunizados con la proteína PD10. A. Morbilidad; B. Mortalidad. Letras desiguales indican diferencias significativas, según la prueba t de comparación de porcentajes. Dentro del recuadro se señala la zona de diferencias estadísticamente significativas en términos de morbilidad. N=10.

Para el serotipo 1 se observó que los ratones del grupo control (-) (P64k), se comenzaron a enfermar el día 8 alcanzando un 50% de morbilidad, mientras que en los grupos inmunizados con PD10 y DEN-1 los ratones aún no habían comenzado a manifestar ningún signo en este día. A partir del día siguiente se comenzaron a enfermar los animales de los grupos inmunizados con PD10 y DEN-1 mientras que todos los del grupo control (-) estaban enfermos. Ya en el día 12 todos los animales inmunizados con la proteína recombinante se habían enfermado, mientras que en el grupo DEN-1 solamente un 20% manifestó signos leves, porcentaje máximo alcanzado durante todo el período. No obstante, es necesario resaltar que la magnitud de la enfermedad en los animales del grupo control (-) fue superior a la de los ratones del grupo inmunizado con PD10.

Resultados

En términos de mortalidad la diferencia entre el grupo control (-) y el inmunizado con PD10 fue más notable ($t_s = -5,59^{***}$). En este último se murió solamente un ratón en el día 15 mientras que ya todos los animales del grupo inmunizado con P64k habían muerto. Por otra parte, en el grupo inmunizado con DEN-1, todos los animales sobrevivieron. Se detectó un gran nivel de recuperación en los animales del grupo inmunizado con PD10, alcanzando un 90% de ratones sanos, estadísticamente similar al porcentaje alcanzado en el grupo inoculado con la preparación viral ($t_s = -1,45$ n.s.).

La cinética de morbilidad y mortalidad para el serotipo 3 se muestra en la figura 23. Teniendo en cuenta que la cepa viral empleada no produce la muerte en la totalidad de los ratones Balb/c, sino solamente el desarrollo de los signos de la encefalitis viral, el criterio de protección seleccionado fue la ausencia de enfermedad

A partir del octavo día después del reto, los animales del grupo control (-) comenzaron a enfermarse con signos leves, y al próximo día, ya todos fueron considerados enfermos con signos de encefalitis bien definidos. En el día noveno no se observó ningún signo de enfermedad en los ratones del grupo inmunizado con DEN-3 ni en los del grupo inmunizado con PD18, mientras que ya todos los del grupo control (-) estaban enfermos. Posteriormente, en el décimo día, un animal perteneciente al grupo inoculado con DEN-3 presentó signos leves que duraron hasta el siguiente día y se recuperó totalmente en el día 12. Por otra parte, en el día 17, dos ratones del grupo inmunizado con PD18 también se consideraron enfermos leves, recuperándose totalmente el día 21. En general podemos destacar que en el grupo inmunizado con DEN-3 y en el grupo inmunizado con PD18 se alcanzaron porcentajes similares de morbilidad (10 y 20%, respectivamente) sin diferencia significativa entre ellos ($t_s = 0,11$ n.s), mientras que en el grupo control (-) hubo un 100% de ratones enfermos e incluso uno de ellos murió, revelando diferencias significativas con respecto a los dos grupos anteriores [$t_s = 5,03^{***}$ (DEN-3) y $t_s = 4,82^{***}$ (PD18)].

Resultados

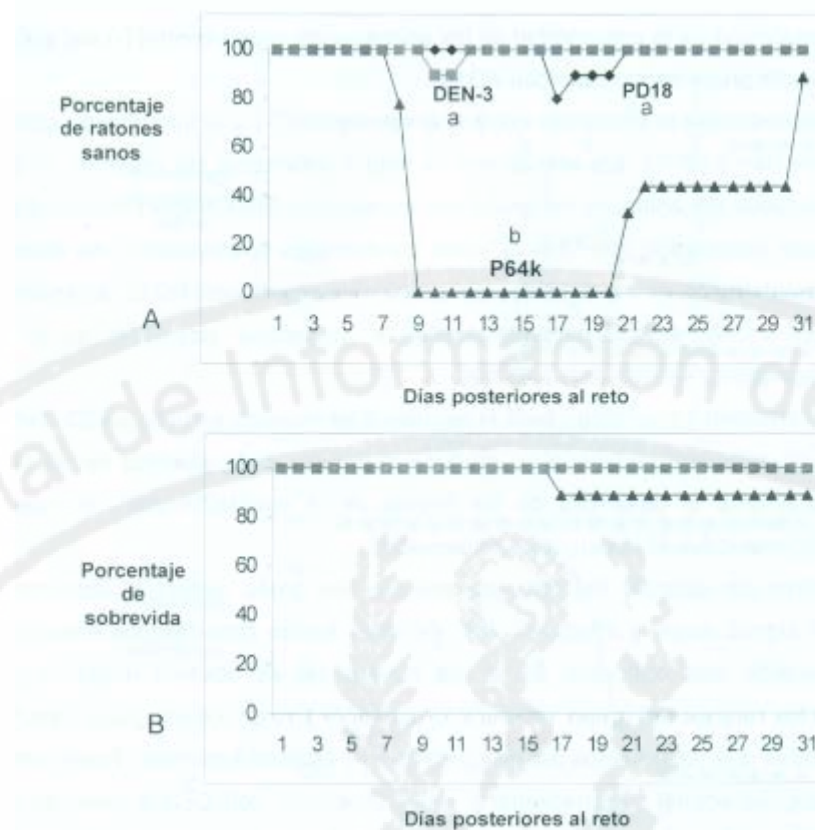


Figura 23. Protección ante el reto con DEN-3 (100 DL₅₀) en ratones inmunizados con la proteína PD18. A. Morbilidad; B Mortalidad. Letras desiguales indican diferencias significativas según la prueba t de comparación de porcentajes. N=10.

En el ensayo de reto con el serotipo 4, al igual que con los serotipos 1 y 2, el criterio de protección se correspondió con el nivel de sobrevivencia.

Como se observa en la figura 24, los ratones del grupo control (-), al igual que los del grupo inmunizado con PD19, comenzaron a enfermarse en los días 6 y 7, respectivamente y ya en el último de estos días el 100% de los animales se consideraron enfermos. Paralelamente, los animales del grupo inmunizado con DEN-4 no se enfermaron durante todo el período de observación posterior al reto. En el día 15 todos los animales del grupo control (-) habían muerto mientras que en el grupo inmunizado con PD19 el 40% de los ratones permanecían vivos, los que a partir de entonces comenzaron a recuperarse paulatinamente, considerándose sanos únicamente al día 20. Como resultado se obtuvo un 40% de sobrevivencia.

Resultados

el grupo inmunizado con PD19 siendo significativamente superior al nivel alcanzado en el grupo control (-), donde todos los ratones murieron ($t_s = -2,98^{**}$).

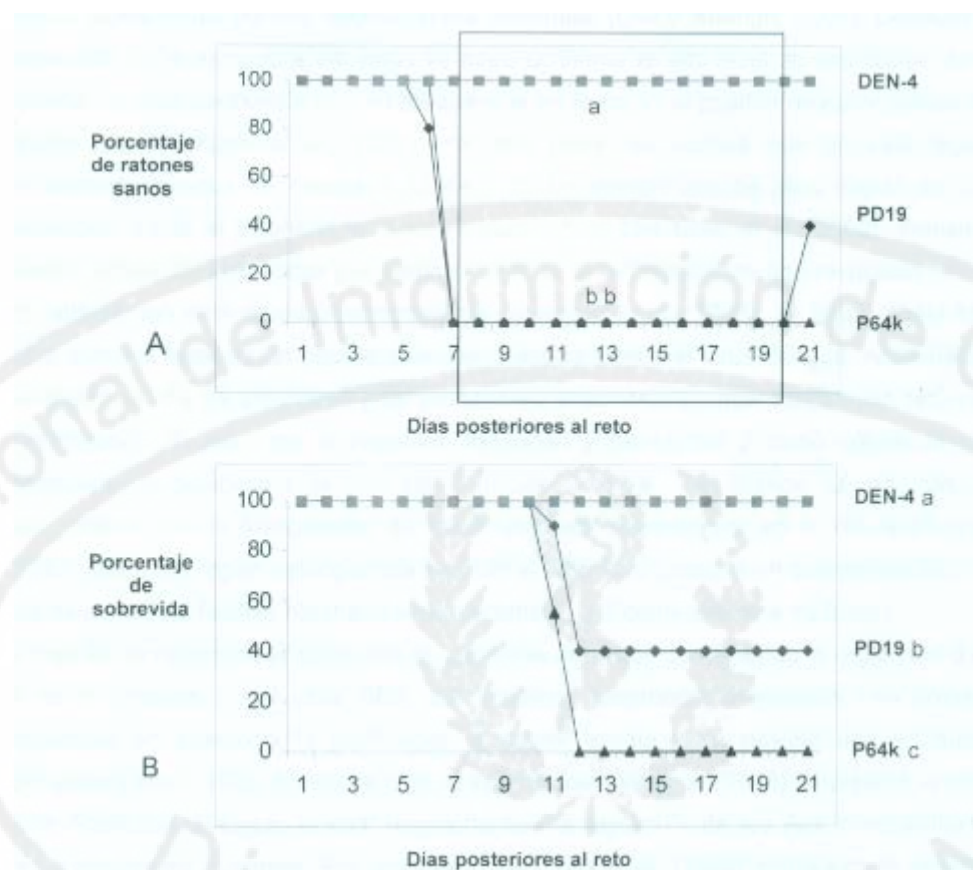


Figura 24. Protección ante el reto con DEN-4 letal (100 DL₅₀) en ratones inmunizados con la proteína PD19. A. Morbilidad; B. Mortalidad. Letras desiguales indican diferencias significativas, según la prueba t de comparación de porcentajes. Dentro del recuadro se señala la zona de diferencias estadísticamente significativas en términos de morbilidad. N=10.

5.14 Consideraciones generales

Los resultados reflejados en el tercer grupo de experimentos dan cumplimiento al segundo objetivo del presente estudio. Se obtuvieron las tres construcciones basadas en la fusión del fragmento de la envoltura de los serotipos 1, 3 y 4 al C-terminal de la P64k. Dichas proteínas se reconocieron por los LAH contra los virus homólogos y generaron una respuesta inmune funcional en ratones de Acs antivirales, neutralizantes y protección frente al reto con virus

Resultados

infectivo homólogo. A pesar de obtenerse niveles variables en la protección con cada serotipo, en todos los casos fue significativa con respecto al grupo control (-).



6 DISCUSIÓN

Dentro de la estructura de la proteína de la envoltura del DEN, el dominio III constituye un blanco fundamental de Acs neutralizantes antivirales (Crill y Roerigh, 2001). Después de la resolución de la estructura del virión se pudo confirmar el alto nivel de exposición de dicho dominio, lo cual concuerda con su rol esencial en la unión al posible receptor celular en las células blanco (Kunh *et al.*, 2002). Por otra parte, se conoce que en esta región se encuentran epitopos de células T CD4+ y CD8+, siendo uno de ellos capaz de conferir protección frente al reto viral en ratones Balb/c (Van Der Most *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta dichas características y la demostración de la generación de una respuesta funcional en ratones con este dominio recombinante (Simmons *et al.*, 1995), en este trabajo éste se tomó como la base de un posible candidato vacunal contra el virus dengue. Adicionalmente, se incluyeron 14 aa anteriores y 26 posteriores al dominio III, que constituyen regiones de conformación al azar que le imprimen movilidad y flexibilidad y como consecuencia, se incrementa la posibilidad de una conformación correcta. Los últimos aa, además, están relacionados con la fusogénesis del virión una vez internalizado en la célula (Harrison y Modis, 2003). La región seleccionada (aa 286 al 426) solo contiene un puente disulfuro por lo que se consideró factible obtenerla en la bacteria *E. coli* como proteína de fusión.

Si bien se ha reportado la obtención de proteínas de fusión conteniendo la región del dominio III de la proteína E del virus DEN, las proteínas portadoras empleadas han presentado problemas en cuanto a la purificación a mayor escala y su posible uso en humanos (Srivastava *et al.*, 1995; Simmons *et al.*, 1998). Srivastava *et al.* (1995) emplearon la proteína A de *Stafilococcus aureus*, la cual reacciona con la región Fe de los Acs imposibilitando su futuro empleo en humanos. Por otra parte, Simmons *et al.* (1998) emplearon la proteína de unión a maltosa (MBP) de *E. coli*, que además de no estar ensayada en humanos, los procesos de purificación reportados de la proteína de fusión resultante se aplican únicamente al nivel de laboratorio. Por último, en ninguno de los casos se ha reportado su capacidad portadora ni protectora en primates no humanos.

En el presente trabajo la proteína seleccionada a fusionar fue la P64k de *Neisseria meningitidis*, cuyas propiedades como proteína portadora (Álvarez *et al.*, 1997; González *et al.*, 2000a) y su demostrada seguridad en humanos (Pérez *et al.*, 2001), la hacen atractiva para incluirla dentro de un candidato vacunal contra el dengue.

Con el objetivo de determinar el efecto de dicha proteína sobre el fragmento viral, se diseñaron tres variantes de fusión. En una de ellas se emplearon solamente los primeros 45

Discusión

aa de la P64k, región que ha funcionado como sistema de expresión con proteínas heterólogas, rindiendo altos niveles de las proteínas recombinantes resultantes (Carmenate *et al.*, 2001; Niebla *et al.*, 2001). Al parecer, la presencia de este fragmento estabiliza el ARNm y no permite una degradación extensiva del mismo (Silva *et al.*, 1998). Por otra parte, considerando la P64k completa, una de las variantes la constituyó la inserción del fragmento de la proteína E en el dominio de unión al ácido lipoico de la P64k. En estudios previos de cristalografía para determinar la estructura 3D de dicha proteína, se pudo determinar el carácter expuesto de este dominio (Tozawa *et al.*, 2001). Adicionalmente, por estudios inmunológicos se demostró la presencia de epítomos inmunodominantes en el extremo N- terminal (González *et al.*, 2000b).

Por último, la tercera variante se formó por la fusión del fragmento viral al C-terminal de la P64k, ya que dicho fragmento en esta posición podría presentar una mayor movilidad así como una separación estructural del dominio catalítico de la P64k. También en estudios de inmunogenicidad se demostró que el extremo C-terminal es altamente inmunogénico (Guillén *et al.*, 1998).

Al realizar los estudios de expresión de los genes quiméricos resultantes, se obtuvo que pD3 (DEN-2), variante de inserción, presentó un menor porcentaje al ser comparado con los dos restantes: pD2 [variante de fusión del fragmento de la E (DEN-2) a los primeros 45 aa de la P64k] y pD5 [fragmento viral (DEN-2) fusionado al C-terminal de la P64k], Uno de los factores que pudo influir es el origen de replicación presente en el plasmidio de cada construcción. En el caso de pD3 el plasmidio contiene el origen de pBR-322, lo cual genera un bajo número de copias en la célula comparado con los plasmidios de origen de PUC (pD2 y pD5), que generan alto número de copias (Sambrook *et al.*, 1989). Los niveles de expresión obtenidos con pD2 y pD5 se correspondieron con los reportados para el gen *lpdA* (codificante para la P64k) en *E. coli*, así como los descritos para otras variantes de fusión obtenidas en este sistema (Musacchio *et al.*, 1997; Niebla *et al.*, 2001). Dichos niveles son superiores a los reportados para otros genes recombinantes basados en la proteína E del virus del DEN obtenidos en levadura y células de insectos con baculovirus como vectores (Staropoli *et al.*, 1997).

Otro de los factores que influyó negativamente en los porcentajes de expresión de pD3 fue la presencia de un grupo de bandas de aproximadamente 60 kDa las cuales no se detectaron en las células transformadas con el plasmidio codificante para la P64k. La falta de reactividad de estas bandas, también presentes en el sobrenadante de ruptura de PD3, con el LAH

murino anti-DEN-2, reveló que no contenían la región del fragmento viral. Por otra parte, la falta de reactividad con el AcM anti-N-terminal de la P64k, corroboró que la región N-terminal de la proteína quimérica no estaba presente en las bandas de baja talla. Adicionalmente, al obtenerse una alta reactividad de las mismas frente al AcM anti-C-terminal de la P64k se reveló su identidad correspondiente a un fragmento de la P64k. Al parecer, desde los inicios de la síntesis de la proteína recombinante, ocurre un fenómeno de degradación alrededor de la zona de fusión del fragmento viral y la proteína P64k probablemente como resultado de la accesibilidad al ataque de proteasas bacterianas.

Este constituye el primer reporte de degradación significativa de una proteína de fusión conteniendo P64k y una región de proteína heteróloga insertada en el LBD. En general, se han obtenido niveles de degradación, pero en todos los casos mucho menores que los aquí reflejados (Espinosa, comunicación personal). Particularmente el fragmento viral constituye la región de mayor talla ensayada en este sistema, ya que los estudios previos se correspondieron con el EGF y el TGF formados por 50 aa, constituyendo sólo una tercera parte del fragmento viral (resultados pendientes de publicación). No obstante, debemos señalar que el mismo fragmento viral fusionado al C-terminal de la P64k (PD5) no generó un nivel de degradación significativa en la proteína quimérica resultante, lo cual indica que la posición de fusión es clave en el nivel de degradación.

Otro de los parámetros estudiados en el presente trabajo fue el patrón de solubilidad. El análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas mostró la presencia de PD2 asociada al precipitado de ruptura y contrariamente a lo ocurrido con las proteínas PD3 y PD5, las cuales se distribuyeron entre el precipitado y el sobrenadante de ruptura en diferentes proporciones. En el caso de PD2, el comportamiento ha sido similar al obtenido con otras proteínas recombinantes expresadas en este mismo sistema (Carmenate *et al.*, 2001; Niebla *et al.*, 2001), que se han obtenido formando cuerpos de inclusión en el citoplasma, probablemente como resultado de un estado de desnaturalización y agregación dentro de la célula. En el caso de PD3 y PD5, debido a que el fragmento de la envoltura está fusionado a la proteína P64k completa, la cual se obtiene mayoritariamente soluble en el citoplasma de la bacteria (Guillén *et al.*, 1998), ésta puede actuar como *foldasa* del fragmento y no afectarse dramáticamente su estructura en la proteína quimérica resultante. A esto se le adiciona el hecho de que la extracción de las formas insolubles se realiza a una molaridad de urea más baja que la empleada para extraer PD2. Por otra parte, la distribución de PD3 favorecida hacia el sobrenadante de ruptura, y contraria a PD5, podría explicarse por la menor expresión

Discusión

de pD3 y como consecuencia, una menor cantidad de esta proteína para ser plegada en la célula, lo cual impediría una saturación en el mecanismo de plegamiento, fenómeno probablemente asociado a PD5.

Seguidamente, con el objetivo de caracterizar antigénicamente las tres proteínas recombinantes, éstas se enfrentaron a varios Acs monoclonales y policlonales murinos y humanos. Primeramente, el hecho de que por *Western blotting* las tres variantes proteicas hayan sido reconocidas por sueros humanos de bajo y alto título a DEN-2, demuestra la inmunogenicidad de esta región tras la infección viral en humanos. Las posibles diferencias estructurales no se pueden definir en este sistema debido a que son electroforesis con agentes desnaturizantes, donde se exhiben sólo epitopos lineales. Se realizaron además ensayos de *Dot blotting* en condiciones nativas de las muestras, pero la reactividad frente a una preparación semipurificada de P64k fue alta. De la misma manera los reconocimientos por LAH anti-DEN-2 no fueron sustancialmente diferentes entre las proteínas.

Contrariamente, los análisis de antigenicidad con el AcM 3H5 sí revelaron diferencia entre PD2 y las variantes que contienen a la P64k completa. El hecho de que PD3 y PD5 $\neq$ presentaran un mayor nivel de reactividad en comparación con PD, demuestra una diferencia en el estado de las cisteínas del fragmento viral en cada variante. La reactividad con el AcM 3H5 también ha sido reportada con la proteína E recombinante expresada en baculovirus (Staropoli *et al.*, 1997). Este AcM posee actividad neutralizante, serotipo específica, cuyo reconocimiento requiere de la formación correcta del único puente disulfuro presente en el dominio III de la proteína E (Megret *et al.*, 1992). Al parecer, la fusión a P64k influye en la formación correcta de dicho puente, corroborando su posible acción positiva en el plegamiento del fragmento viral.

Hasta este nivel, se pudo determinar que la conformación de la región del dominio viral del serotipo 2 fusionada solamente a los primeros 45 aa de la P64k (PD2), adquiriría una conformación diferente y menos favorable que la de esta misma región presentada en la P64k completa en las dos posiciones (PD3 y PD5). Por esta razón se decidió realizar los esquemas de inmunización en ratones Balb/c solamente con las proteínas PD3 y PD5. Debido a que Fonseca *et al.* (1991) habían reportado que las proteínas de fusión formadas por la Trp de *E. coli* y fragmentos de la E no generaron una respuesta inmune funcional debido al proceso de renaturalización de los cuerpos de inclusión, decidimos estudiar el efecto de la renaturalización por G-25 sobre la proteína PD3. La variante soluble de PD3 se semipurificó empleando la precipitación con sulfato de amonio, lo cual permitió obtener una

preparación con un nivel de pureza similar al de su contraparte insoluble renaturalizada y así compararlas en términos de inmunogenicidad.

Primeramente, tanto los títulos de Acs antivirales como los neutralizantes inducidos por las variantes semipurificadas soluble e insolubles de PD3 demostraron la similitud de ambas preparaciones en cuanto a la inmunogenicidad. Al parecer, la extracción con urea 5 M y posterior renaturalización permite la adquisición de una conformación comparable a la de su contraparte soluble, resultados que concuerdan con la similitud en cuanto a la reactividad de ambas preparaciones frente a los sueros policlonales murinos y el 3H5. Al parecer el proceso de cambio de tampón por G-25 a velocidad de flujo lenta es más adecuada que la renaturalización empleando detergentes según lo reportado para las proteínas de fusión a Trp (Fonseca *et al.*, 1991). No obstante vale destacar que son dos proteínas diferentes por lo que el efecto de cualquier tipo de renaturalización sobre ellas también puede ser diferente. Contrariamente a la respuesta inmune humoral donde se evidenciaron diferencias entre PD3 y PD5, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de sobrevida frente al reto viral alcanzados en los grupos inmunizados con estas dos proteínas. Adicionalmente, los niveles de protección sí fueron estadísticamente diferentes al grupo inoculado con la preparación viral. La protección parcial en ratones, similar a la obtenida en este estudio, ha sido reportada con varios candidatos vacunales basados en proteínas recombinantes, formulaciones de ADN y virus quiméricos (Staropoli *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 1998; Simmons *et al.*, 1998; Caufour *et al.*, 2001). Sin embargo, estas mismas construcciones en monos han resultado ser completamente protectoras y el ejemplo más evidente lo constituyó el virus quimérico FA-DEN (Guirakhoo *et al.*, 2000).

En general en la literatura la presencia de Acs capaces de neutralizar la infectividad viral *in vitro* ha sido valorada siempre como un importante marcador de inmunidad y protección contra la infección (Kliks *et al.*, 1989). La proteína recombinante de la envoltura del virus dengue-2 obtenida en baculovirus generó una respuesta neutralizante y parcialmente protectora en ratones (Staropoli *et al.*, 1997). Simmons *et al.* (1998) también reportaron neutralización y protección parcial con las proteínas de fusión formadas por la MBP de *E. coli* y el dominio III del DEN-2. También en estudios en ratones con los candidatos de virus quiméricos de FA-DEN de los serotipos 2 y 4 se demostró la correlación entre la respuesta de memoria neutralizante y la protección.

El análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo reveló que no existió una correlación entre los títulos neutralizantes inducidos y los porcentajes de protección ($p < 0,05$).

Discusión

Estos resultados son contrarios a los antes descritos, sin embargo también existen reportes en la literatura que apuntan a la falta de correlación entre estos parámetros en el modelo ratón. Porter *et al.* (1998) describieron la obtención y la evaluación inmunológica en ratones de una construcción de ADN codificante para PrM-E del DEN-2, la cual indujo protección parcial sin inducción de Acs neutralizantes. En un segundo trabajo Van Der Most *et al.* (2000) también reportaron la inducción de protección parcial en ratones sin la generación de respuesta de Acs neutralizantes tras la inmunización con el candidato de virus quimérico FA- DEN-2. En este reporte se demostró, además, que la protección estaba directamente relacionada con células T CD8+ que reconocían un epitopo ubicado en el dominio III de la proteína de la envoltura del virus, región incluida en las proteínas quiméricas ensayadas en el presente trabajo. Un año más tarde, Caufour *et al.* (2001) reportaron la evaluación de un candidato de virus quimérico similar al anterior FA-DEN-2, pero empleando las cepas DEN-2 NGC y 44-2, el cual indujo protección significativa en ratones sin detectarse respuesta de Acs neutralizantes.

Estas evidencias reflejan que existen, además de la neutralización, otros mecanismos inmunológicos protectores en ratones. De hecho el grupo inmunizado con la preparación viral en el presente trabajo quedó completamente protegido con una respuesta neutralizante similar a la inducida por PD3. Este mismo fenómeno se detectó en los estudios en ratones con la proteína E obtenida en baculovirus (Staropoli *et al.*, 1997). En estos experimentos, el virus infectivo empleado como control positivo indujo una respuesta neutralizante mucho más baja que la generada en el grupo inmunizado con la proteína recombinante; sin embargo, la protección fue total en el primero.

Dentro de los mecanismos protectores involucrados en la inmunización viral podemos mencionar, la respuesta citotóxica mediada por células T CD8+, demostrada por Van der Most *et al.* (2000) y la citotoxicidad celular mediada por Acs (ADCC). Falgout *et al.* (1990) demostraron la protección en ratones conferida por la inmunización con la proteína NS1, a la cual se le atribuye la inducción de ADCC.

Los resultados de este trabajo sugieren que las proteínas PD3 y PD5 son presentadas de forma diferente al sistema inmune, generando otros mecanismos de protección además de la neutralización. Una de las diferencias distintivas entre ambas preparaciones es el nivel de degradación. A pesar de que se inocularon cantidades equivalentes de las proteínas quiméricas, es posible que la presencia del fragmento de P64k producto de la degradación de PD3 influya en los resultados obtenidos. Por otra parte, la fusión del fragmento viral en dos

Discusión

posiciones dentro de la proteína portadora pudiera influir en la generación de respuestas inmunológicas basadas en la exposición diferente de epitopos funcionales. Se han realizado diferentes ensayos para lograr la purificación de PD3, pero el fragmento producto de la degradación presenta características similares a la proteína quimérica completa, impidiendo así una correcta separación entre ellas.

Teniendo en cuenta que la capacidad protectora en ratones se mide contra encefalitis viral provocada con cepas neuroadaptadas a ratón, se decidió ensayar ambas variantes en monos *Macaca fascicularis*. A pesar de que los monos no exhiben la enfermedad, el virus es capaz de replicarse en la sangre posibilitando la medición de los niveles del mismo tanto por amplificación del ARN circulante como por aislamiento viral en líneas celulares. Se ha demostrado, además, que la cinética de replicación en la sangre es similar a la detectada en el humano (Halstead y Palumbo, 1973). Este modelo, además de ser mucho más cercano al hombre que el ratón, permite trabajar con virus no neuroadaptados a ratón y más relacionados con la cepa epidémica. En el presente trabajo se empleó la cepa que circuló en 1981 durante la epidemia cubana de DEN-2, obtenida en células Vero (Kourí *et al.*, 1989). Para la inoculación de las proteínas quiméricas se decidió emplear el adyuvante de Freund debido a su buena capacidad adyuvante y así presentar las proteínas quiméricas en condiciones óptimas para conocer su potencialidad.

Como resultado, se detectó que los títulos de los Acs neutralizantes generados por la inmunización con las proteínas recombinantes fueron comparables con los generados tras la inmunización viral, después de la cuarta dosis. Estos resultados fueron diferentes a los reportados por Guirakhoo *et al.* (2000, 2001 y 2002) al evaluar la variante quimérica de virus atenuado FA-DEN. En dicho reporte, al comparar los virus infectivos y los candidatos vacunales, estos últimos generaron una respuesta neutralizante menor que los virus infectivos. No obstante, los valores absolutos de títulos neutralizantes en algunos de estos reportes fueron mayores que los presentados en este trabajo. Esa diferencia puede estar relacionada con los sistemas de neutralización *in vitro* empleados, así como con la falta de sueros estándares disponibles internacionalmente. De hecho, se han tomado varios sueros humanos y se ha determinado la capacidad neutralizante en varios laboratorios del mundo revelando grandes diferencias en los valores obtenidos (Guzmán, comunicación personal). Después de la última dosis los monos se retaron con virus DEN-2 infectivo. Se tomó como control el grupo inmunizado con P64k y retado con DEN-2 infectivo. Primeramente, se definió un período de viremia con un valor medio de 5,6 días según los resultados de RT-PCR y

Discusión

similar a lo reportado por Velzing *et al.* (1999). Sin embargo, por la técnica de aislamiento viral el valor medio fue solamente de 2,6 días. Este valor fué similar al reportado por Guirakhoo *et al.* (2001) pero en general fué más bajo que varios reportados en la literatura (Kochel *et al.*, 2000; Raviprakash *et al.*, 2000).

La diferencia en la detección entre el aislamiento viral y el RT-PCR puede estar dada por la mayor sensibilidad del RT-PCR al compararla con el aislamiento viral en células Vero (Wang *et al.*, 2003). La diferencia en sensibilidad se puede explicar por la detección en el RT-PCR de pequeñas cantidades de virus, así como por la amplificación de virus no infectivos, neutralizados o fragmentos de éstos que permanezcan circulando en la sangre. No obstante, existió una correlación entre el RT-PCR y el aislamiento, ya que en aquellos monos donde se amplificó el fragmento viral en mayor cantidad de días, se aisló el virus en los días centrales, sugiriendo que la carga viral era alta y permitiendo así su detección.

Cada una de las técnicas posee sus ventajas y desventajas. En el caso del RT-PCR es más sensible pero puede amplificar fragmentos no infectivos circulantes. El aislamiento, por su parte, es menos sensible pero permite detectar únicamente los virus infectivos. Sin embargo, en el caso de la medición de la respuesta protectora tras varias inmunizaciones con candidatos vacunales, la detección por RT-PCR cobra una importancia mayor. Se conoce que en sueros humanos tras infecciones secundarias es más difícil obtener aislamiento viral aún cuando ya se conoce que la carga viral es mayor (Wang *et al.*, 2003). Esto se debe a la pre-existencia de Acs antivirales que forman inmunocomplejos y no permiten la replicación del virus en la línea celular (Wang *et al.*, 2003).

En el presente trabajo se manifiesta este fenómeno en el animal PD3 III, donde se obtuvo amplificación viral durante 6 días posteriores al reto con aislamiento solamente en un día. El número de días con RT-PCR positivo coincide con el obtenido en el mono control P64k II y sin embargo en este último se logró aislar el virus durante tres días. Como se observa en los ensayos de PRNT, en el mono PD3 III se detectaron Acs de contra el virus DEN, los cuales, al parecer, no tuvieron un rol significativo en el aclaramiento viral y, por el contrario podrían formar los inmunocomplejos que evitan el aislamiento en la línea celular Vero.

El primer reporte de carga viral aumentada en pacientes con FHD en el período de defervescencia se describe con el empleo de RT-PCR para detectar el virus circulante (Murgue *et al.*, 2000). A su vez, en el resto de los reportes donde se describe la relación entre carga viral y FHD, se emplea RT-PCR para su demostración (Libraty *et al.*, 2002a, b) excepto en el reporte de Vaughn *et al.* (2000), donde se realizó la inoculación intratraqueal de

Discusión

mosquitos, que constituye el método de aislamiento más sensible reportado. Recientemente, en los ensayos de reto en humanos con cepas que provocan síntomas moderados de la enfermedad, se demostró la diferencia en sensibilidad entre el RT-PCR y aislamiento viral en la detección del virus en sangre de voluntarios inoculados con cepas de DEN medianamente atenuadas (Vaughn *et al.*, 2003). En concordancia con lo obtenido en la respuesta neutralizante, también existió un gran nivel de variabilidad en los niveles de protección alcanzados entre los animales de cada grupo. El ejemplo más claro lo constituyó el grupo inmunizado con PD3, en el cual hubo un mono no protegido, uno parcialmente protegido y uno completamente protegido. En el caso de PD5 hubo dos parcialmente protegidos y uno completamente, pero en el caso de los parciales el nivel de protección fue mayor que en el de PD3. Al realizar los análisis estadísticos correspondientes se pudo determinar que el grupo inmunizado con PD5 fue más protegido según la técnica de RT-PCR que el inmunizado con PD3.

En general, tomando en cuenta los resultados del aislamiento viral, podemos afirmar que existió una protección total en los monos inmunizados con la proteína PD5 y una reducción significativa de la viremia considerando los resultados del RT-PCR.

Similar a lo ocurrido en ratones, una vez más no existió una correlación entre neutralización y protección ($p < 0,05$). De hecho, el mono que generó una respuesta neutralizante mayor no fue el completamente protegido. En el sistema de neutralización *in vitro* empleado, PRNT con la línea celular BHK-21, los títulos de Acs neutralizantes detectados para el grupo inmunizado con PD5 no difirieron significativamente de los obtenidos por la inmunización con PD3, sin embargo, la respuesta protectora fue mejor en el primero.

La respuesta neutralizante se considera como un mecanismo protector importante contra el desarrollo de la enfermedad en humanos. El estudio más convincente lo reportaron Halstead *et al.*, (1969) donde demostraron que los niños recién nacidos de madres positivas a dengue, hasta los 5 meses de edad estaban protegidos de la enfermedad, y que la incidencia de la forma hemorrágica aparecía cuando los Acs neutralizantes alcanzaban valores bajos e indetectables en la sangre. Este fenómeno se volvió a observar en un estudio desarrollado en un mayor número de niños en Tailandia durante la década de los noventa (Halstead, 2003). Adicionalmente, se conoce que no existe protección cruzada entre infecciones de serotipo heterólogos y de hecho los anticuerpos neutralizantes pasados 3 meses después de la enfermedad son específicos de serotipo (Gubler *et al.*, 1998).

Discusión

En numerosos trabajos sobre la evaluación de candidatos vacunales contra el DEN en monos se ha detectado correlación entre la generación de anticuerpos neutralizantes y protección, lo cual evidencia que es un mecanismo eficiente de disminución de la carga viral (Bray *et al.*, 1996; Velzing *et al.*, 1999; Men *et al.*, 2000; Raviprakash *et al.*, 2003). En el estudio donde se evaluó la capacidad protectora de una construcción quimérica DEN-1/DEN-4 en monos *rhesus* se demostró que los monos protegidos se correspondieron con los que habían desarrollado Acs neutralizantes con títulos mayores de 1:640 (Bray *et al.*, 1996). También en la evaluación en monos de la proteína de la envoltura de DEN-2 expresada en el virus de vaccinia modificado (Ankara) se pudo definir que los monos protegidos fueron aquellos que presentaban títulos neutralizantes mayores de 1:70 (Men *et al.*, 2000). Velzing *et al.* (1999) también demostraron que el mono más protegido tras la inmunización con la proteína E recombinante del DEN-2 y después del reto viral fue el que mayor título de Acs neutralizantes presentaba después de la última dosis del inmunógeno y cuyo valor fue de 1:160. La diferencia entre los valores estimados por los grupos de trabajo puede estar dada por el empleo de diferentes sistemas de neutralización *in vitro*. Recientemente, Raviprakash *et al.* (2003) también describieron que se lograba protección en monos *Aotus* inmunizados con diferentes variantes de vacunas de ADN, fundamentalmente cuando éstos presentaban anticuerpos neutralizantes en el suero después de la última dosis y antes del reto.

A pesar de todas las evidencias antes expuestas acerca de la neutralización, su correlación con la protección no es una regla. Un ejemplo de ello lo constituyó la evaluación en monos de un candidato de virus inactivado de DEN-2 donde algunos monos que desarrollaron títulos neutralizantes no fueron completamente protegidos y viceversa: hubo monos protegidos cuyos títulos neutralizantes fueron bajos (Putnak *et al.*, 1996). Adicionalmente, los resultados reportados sobre la evaluación de formulaciones de ADN conteniendo el gen de la envoltura concuerdan con la falta de correlación antes descrita. En el estudio del serotipo 1 en monos *Macacus rhesus* se observaron monos protegidos que desarrollaron títulos neutralizantes similares a los de uno de los monos no protegidos. Por otra parte, en el momento del reto los Acs neutralizantes fueron indetectables en todos los monos (Raviprakash *et al.*, 2000). En otro estudio del serotipo 1 la falta de correlación fue más evidente, puesto que monos *Aotus* inmunizados con la formulación de ADN que generaron niveles de Acs neutralizantes similares después de las inmunizaciones, presentaron niveles de protección diferentes tras el reto viral (Kochel *et al.*, 2000). Asimismo, Guirakhoo *et al.* (2000) también reportaron protección total en monos *Macacus rhesus* inoculados con el virus quimérico FA-DEN con

Discusión

diferencias apreciables en los niveles de Acs neutralizantes generados, siendo en algunos casos bastante bajos.

Recientemente, Libraty (2003) describió un estudio prospectivo realizado en niños de una región endémica de dengue en Tailandia. En dicho estudio se siguió un grupo de niños los cuales contrajeron diferentes grados de la enfermedad. Como resultado se pudo demostrar que los que desarrollaron la forma más ligera e incluso inaparente, no presentaron Acs neutralizantes en el suero previo a la infección viral secundaria por DEN-2.

Uno de los ejemplos más evidentes y recientes acerca de la relación entre protección y neutralización lo constituyó el estudio de reto en humanos para evaluar la capacidad protectora de la formulación tetravalente de la vacuna atenuada desarrollada por el *Walter Reed Army Institute, U.S.A.* En dicho estudio se evaluó la capacidad protectora de una formulación vacunal tetravalente en voluntarios sanos, los cuales una vez vacunados recibieron una inoculación de virus DEN-1 ó DEN-3, capaces de provocar síntomas clínicos y viremia en sangre, detectada por RT-PCR y aislamiento viral. Como resultado se determinó que en el caso de los individuos retados con DEN-3, se protegieron aquellos voluntarios que presentaban Acs neutralizantes en el suero en el momento del reto, sin embargo, cuando se empleó la cepa de DEN-1, la protección se observó en tres de cuatro individuos que habían desarrollado Acs neutralizantes hasta el momento del reto y en uno en que los niveles fueron indetectables. Como conclusión del estudio se planteó examinar bien cuáles son los Acs protectores y medir la respuesta inmune celular para determinar su correlación con la protección en estudios posteriores (Vaughn *et al.*, 2003).

Uno de los factores a explorar en cuanto a los Acs es la medición de su capacidad neutralizante en otros sistemas *in vitro* empleando otras células para la replicación viral. Uno de los estudios más ilustrativos de la importancia del sistema de medición de los Acs neutralizantes y su relación con la protección lo reportaron Klisaks *et al.* (2003). En dichos estudios demostraron que en el suero de los niños que no desarrollaron síntomas de enfermedad, tras una infección secundaria en una epidemia en Bangkok, existían previamente títulos de Acs neutralizantes medidos con monocitos humanos frescos en el ensayo. Si la determinación se realizaba en la línea celular LLC-MK2 por PRNT, no existía la correlación entre la neutralización y la ausencia de síntomas en la infección secundaria. Al parecer, mientras más cercano es el ambiente de medición de la neutralización a las condiciones *in vivo*, más valor predictivo se puede obtener en cuanto a protección.

Otro de los sistemas de neutralización recientemente reportados lo constituyó el ensayo *in vitro* sobre células dendríticas transfectadas con DC-SIGN y con medición por citometría de flujo (Tassaneetrithep *et al.*, 2003a). A pesar de que no se han realizado estudios de correlación entre neutralización y protección en dicho sistema, podría ser una variante atractiva pues simula la entrada en una de las células blanco naturales del DEN tras la infección viral.

Si bien el sistema de neutralización puede estar influyendo en la interpretación de los resultados, la existencia de otros mecanismos efectores del sistema inmune para la protección en el mono no debe ser descartada. Recientemente se describió la evaluación en monos de una construcción quimérica DEN-2/DEN-1 formada por los genes no estructurales de DEN-2 (cepa vacunal atenuada PDK 53) y los genes estructurales de una cepa de DEN-1. Al retar los monos con ambos virus, es decir, cepas salvajes de DEN-1 y DEN-2, se pudo observar niveles de protección significativos similares, a pesar de que los Acs neutralizantes generados contra DEN-2 fueron indetectables (Butrapet *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que la respuesta no neutralizante generada por las proteínas no estructurales es capaz de proteger en el modelo de mono.

En el presente trabajo, si bien se trata de inmunizaciones con proteínas recombinantes solubilizadas e inoculadas por vía sistémica, la presencia de agregados detectados por HPLC podría influir en la generación de una posible respuesta celular. Se conoce que los agregados son capaces de inducir una respuesta CTL en ratones al ser inoculados por vía sistémica (Speidel *et al.*, 1997). Adicionalmente, como se describió con anterioridad, un epitopo de células T ha sido reportado en ratones dentro de la región del dominio III de la proteína de la envoltura (Van der Most *et al.*, 2000).

La protección alcanzada con PD5 es la mayor reportada para formulaciones basadas en proteínas recombinantes. Se han descrito las evaluaciones de la proteína E producida en baculovirus y en *Pichia pastoris*, obteniéndose en ambos casos una protección parcial, donde la parcialidad reportada fue incluso mayor que la obtenida para PD3 en el presente trabajo (Zivna *et al.*, 1999). De hecho las proteínas PD3 y PD5 constituyen las primeras construcciones producidas en *E. coli* basadas en la proteína E del DEN ensayadas en monos. Los niveles de protección alcanzados con PD5 son comparables con los reportados para la formulación de FA-DEN (Guirakhoo *et al.*, 2000). En ese trabajo no se reportó la viremia por RT-PCR, sólo en términos de aislamiento viral donde el valor medio de los días positivos en los monos controles fue mayor que el reportado en el presente estudio. Por último, podemos

afirmar que los niveles de protección alcanzados tanto con PD3 como con PD5 son superiores a los reportados con vacunas de ADN (Kochel *et al.*, 2000, Raviprakash *et al.*, 2000) y con respecto al ensayo de vaccinia recombinante conteniendo los genes estructurales de DEN, en el cual no hubo protección alguna (Men *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta que la proteína PD5 indujo una respuesta protectora mayor que PD3 y una respuesta de Acs antivirales neutralizantes comparable con la generada por el virus homólogo infectivo, se decidió continuar con las construcciones homologas de PD5, pero con el fragmento de la E viral correspondiente a los serotipos 1, 3 y 4. Además, los niveles de expresión y pureza alcanzados con PD5 permitieron procesos relativamente sencillos de semipurificación.

Las proteínas quiméricas resultantes, PD10, PD18 y PD19 (serotipos 1, 3 y 4, respectivamente) se obtuvieron con altos porcentajes en *E. coli* y similares a los obtenidos con PD5 (serotipo 2). De la misma manera, se purificaron parcialmente a partir del precipitado de ruptura, alcanzando niveles de pureza elevados sin un patrón de degradación significativo como el obtenido en PD3. Los reconocimientos con LAH generados por los serotipos homólogos fueron elevados y similares a los obtenidos con las preparaciones virales correspondientes, lo cual indicó que no existían diferencias entre las proteínas recombinantes hasta este nivel.

En cuanto a la respuesta inmune generada por PD10, se obtuvieron títulos de Acs antivirales y neutralizantes elevados. Por otra parte, el nivel de protección alcanzado fue superior al de PD5, no obstante el grupo más protegido se correspondió con el inmunizado con la preparación viral de DEN-1, ya que si bien el nivel de sobrevida alcanzado fue alto y similar al del grupo inoculado con PD10, el porcentaje de ratones enfermos fue menor.

Si bien anteriormente mencionamos la falta de correlación entre neutralización y protección en ambos sistemas, monos y ratones, aquí existieron otros factores que pudieron influir en este resultado. El virus DEN-1 que se empleó como inmunógeno fue exactamente igual al que se utilizó en el reto, y diferente a la cepa que se empleó en el ensayo de neutralización *in vitro*. Es posible que la cepa de reto sea más neutralizada por los Acs generados tras la inmunización con ella misma y se logre el porcentaje de protección obtenido. Contrariamente, en el caso de la proteína recombinante, la región del fragmento viral no proviene de la misma cepa del reto, sino de una cepa muy cercana a un aislamiento primario del humano. Es posible que los Acs generados por esta región no sean capaces de neutralizar a la cepa del reto de la misma manera que lo hacen los generados con la preparación viral.

Discusión

En cuanto a PD18 los resultados fueron similares a PD10 en respuesta humoral. Se generó una respuesta de Acs antivirales y neutralizantes superiores al control (-). En cuanto a la protección, se midió por porcentajes de ratones enfermos, ya que a pesar del alto número de pases en ratones de la cepa estándar de DEN-3 empleada en el reto, ésta no fue capaz de matar a la totalidad de los ratones en ninguna de las dosis ensayadas. Existió una pequeña diferencia entre el grupo inmunizado con PD18 y DEN-3, aunque es posible que como en este sistema se sigue solo la aparición de los primeros signos de la encefalitis, ésta sea más difícil medirla.

Los ensayos de protección con los serotipos 1 y 3 descritos en el presente trabajo constituyen los primeros reportados en la literatura. Al parecer no existe disponibilidad de cepas neurovirulentas capaces de provocar encefalitis y entonces se decide realizar el esquema en monos una vez que se demuestra algún nivel de seroconversión en ratones.

Con la proteína PD19 los resultados en términos de respuesta humoral y protección fueron discretos. En cuanto a los niveles de Acs antivirales y neutralizantes, fueron los más bajos entre los inducidos por todas las proteínas ensayadas, aunque no muy diferentes con respecto a la respuesta generada con PD5 en términos de Acs por ELISA. En cuanto a los resultados de protección, se obtuvo un nivel similar al obtenido con PD5 siendo mucho más bajo que el obtenido tras la inmunización con la preparación viral de DEN-4.

Específicamente en el caso del serotipo 4, la baja inmunogenicidad obtenida se corresponde con la reportada en varios trabajos. En uno de ellos se compararon proteínas de fusión correspondientes a los cuatro serotipos virales y se demostró que la del serotipo 4 fue la menos inmunogénica en términos de neutralización y anticuerpos totales (Simmons *et al.*, 1998). Por otra parte, nuestro grupo de trabajo reportó en estudios basados en la evaluación en ratones de la proteína E recombinante del DEN-4, obtenida en *Pichia pastoris*, la generación de bajos niveles de Acs neutralizantes y protección similares a lo obtenido con PD19 en este trabajo (Muné *et al.*, 2003). Adicionalmente, en los estudios realizados en humanos con la formulación tetravalente basada en cepas atenuadas desarrolladas por la compañía *Glaxo Smith Kline* y el *Walter Peed Army Institute, U.S.A.*, se demostró que tras una primera dosis se obtuvo seroconversión por Acs neutralizantes anti-DEN-4 únicamente en el 23% de los voluntarios vacunados. Seguidamente, al inocular una segunda dosis, la seroconversión aumentó a un 48%, siendo todavía los valores más bajos entre los cuatro serotipos. Por último, resulta interesante destacar que las mayores epidemias de FHD no se relacionan con el serotipo 4. Al parecer, este serotipo viral probablemente se replique menos

eficientemente y pudiera contener menos epitopos de Acs neutralizantes con respecto al resto de los serotipos.

La diferencia en los porcentajes de protección obtenidos con las proteínas recombinantes, según el serotipo, puede estar relacionada con diferentes factores. Primeramente, en el caso de una cepa viral que no sea tan neurovirulenta, se requiere una mayor cantidad de virus para lograr el efecto y por consiguiente la respuesta generada tiene que enfrentar una carga mayor. Por otra parte, a medida que una cepa se hace más neurovirulenta tiene mayores posibilidades de mutar para cambiar el tropismo y precisamente el dominio III de la envoltura está relacionado con la entrada a la célula diana (Holbrook *et al.*, 2003). La respuesta a esta interrogante para cada serotipo se logrará a partir de la secuenciación de la región del dominio III de cada una de las cepas virales empleadas en el reto, para determinar los porcentajes de identidad entre éstas y las regiones de la E clonadas.

En el presente trabajo los niveles de pureza alcanzados aún no son los requeridos para una formulación en humanos, no obstante, son bastante elevados teniendo en cuenta que se realizaron solo procesos de semipurificación de baja resolución. Las proteínas quiméricas presentan una cola de his en el extremo N-terminal lo cual permitirá el uso de la cromatografía de quelatos metálicos como paso de alta resolución y potencialmente escalable.

Srivastava *et al.* (1995) y Simmons *et al.* (1998) obtuvieron también proteínas de fusión que contenían la región del dominio III, sin embargo, para lograr niveles elevados de pureza fue necesario emplear cromatografías de afinidad no escalables e incluso finalmente realizar elución a partir de geles de electroforesis en condiciones nativas. En el caso de la proteína de la envoltura obtenida en baculovirus, ésta se obtuvo con muy bajos rendimientos y se requirió la cromatografía de quelatos metálicos ya que presentaba también una cola de histidinas. No obstante, la purificación únicamente se pudo realizar empleando la matriz TALON, obteniéndose muy pocas cantidades con procesos no reproducibles que impidieron su desarrollo escalable para fines productivos (Staropoli *et al.*, 1997). Por último, en nuestro grupo de trabajo sucedió algo similar con la proteína E del DEN-4 obtenida en *Pichia pastoris*, ya que a pesar de lograr alcanzar un 70% de pureza empleando la IMAC, los rendimientos fueron muy bajos producto de los bajos niveles de expresión del gen recombinante, impidiendo el desarrollo del proceso de purificación a una escala mayor.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son consistentes con los reportados para los candidatos vacunales de virus atenuados actualmente más avanzados en el mundo, con la

Discusión

diferencia de que las proteínas quiméricas se han obtenido a altos niveles en *E. coli*. Por otra parte, tienen la ventaja de que al ser proteínas recombinantes, en una formulación tetravalente evitarían los fenómenos de interferencia viral y reversión a la virulencia. La interferencia viral en un candidato de vacunas atenuadas está estrechamente vinculada a los niveles de replicación no controlados de cada serotipo viral en la mezcla. Varios ensayos en monos y humanos se han realizado para definir las cantidades virales en las formulaciones vacunales (Guirakhoo *et al.*, 2003). En algunos casos no se ha logrado la seroconversión balanceada contra los cuatro serotipos (Vaughn *et al.*, 2003).

Por otra parte, dentro de las posibles ventajas del candidato vacunal de virus atenuado está la aplicación de una única dosis; sin embargo, hasta el momento en DEN se ha demostrado que se requieren al menos dos dosis para lograr seroconversión total (Lang *et al.*, 2003). En un estudio reciente realizado en niños tailandeses se demostró la necesidad de una tercera dosis de refuerzo al año de la segunda inoculación para lograr el 100% de seroconversión con la formulación tetravalente de cepas atenuadas desarrollada por la universidad de Mahidol, actualmente licenciada a Aventis Pasteur (Lang *et al.*, 2003). Recientemente también se demostró, en el caso de la formulación de los virus quiméricos FA-DEN, que en individuos previamente infectados con flavivirus, la cepa vacunal exhibió una replicación aumentada, marcador importante de atenuación en humanos. En dicho estudio también se aplicaron dos dosis (Guirakhoo *et al.*, 2003).

El último punto importante con respecto a las vacunas atenuadas que puede ser superado con la formulación de proteínas recombinantes es la seguridad. Se ha demostrado en varios estudios que existen efectos adversos en adultos y en niños (fiebre, mialgia, petequias y cefalea) después de la inoculación de la primera dosis (Lang *et al.*, 2003). En las proteínas que se describen en este trabajo está presente la P64k, la cual se ha probado en humanos y se ha demostrado su seguridad (Pérez *et al.*, 2001).

Finalmente, una de las propiedades que queda por definir en las proteínas quiméricas obtenidas en el presente trabajo es la serotipo-especificidad, ya que se conoce que el fragmento estudiado es una región dentro de la proteína bastante variable entre los serotipos. La determinación de la generación de una respuesta serotipo-específica por cada una de las proteínas quiméricas en cada modelo animal y su respectiva comparación con sueros humanos primarios a cada uno de los serotipos, convertiría a éstas construcciones en candidatos vacunales aún más atractivos para una formulación futura. Esto evitaría el

Discusión

fenómeno de inmuoamplificación asociado a las infecciones por DEN, el cual no se descarta por la vacunación con las formulaciones de cepas atenuadas actuales.



Conclusiones

7 CONCLUSIONES

1. La fusión del fragmento viral del DEN-2 al extremo N-terminal de la proteína P64k no favorece la formación de un epitopo funcional específico de este serotipo.
2. La inserción del fragmento viral del DEN-2 dentro del dominio de unión al ácido lipoico de la proteína P64k favorece sustancialmente la degradación de la proteína quimérica resultante.
3. Las variantes de inserción y fusión correspondientes al serotipo 2 generan respuestas funcionales diferentes en ratones.
4. El proceso de renaturalización *in vitro* sobre la variante de inserción insoluble (DEN-2) no afecta la generación de una respuesta de Acs funcionales.
5. El fragmento del DEN-2 fusionado al C-terminal de la proteína P64k es protector en monos *Macaca fascicularis* frente a la infección viral homóloga.
6. Las proteínas quiméricas correspondientes a los cuatro serotipos protegen significativamente en ratones frente al reto viral homólogo.

8 RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de la respuesta humoral post-reto en monos para determinar respuesta anamnética.
2. Medir la serotipo-especificidad de la respuesta generada por cada una de las proteínas quiméricas.
3. Evaluar en ratones y monos todas las proteínas purificadas y su mezcla adyuvadas en hidróxido de aluminio.
4. Desarrollar un sistema de neutralización *in vitro* empleando monocitos frescos de monos.
5. Medir la respuesta celular en ratones y el perfil de citoquinas en ratones y monos.



9 BIBLIOGRAFÍA

- > Allison S.L., Schlich K. y Stiasny K. 1995. Oligomeric rearrangement of tick borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. J Virol. 69: 695-700.
- > Alvarez A., Tanizaki M.M. y Fukasawa L.O. 1997. Immune response against the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C conjugated to the P64k protein. En: Medical Applications of Biotechnology. Biotecnología Habana. 4: v6.
- > Anderson R., King A.D. y Innis B.L. 1992. Correlation of E protein binding with cell susceptibility to dengue 4 virus infection. J Gen Virol. 73: 2155-2159.
- > Anderson R., Wang S., Osiowy C. y Issekutz A.C. 1997. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. J Virol. 71: 4226-4232.
- > Bhamarapravati N. y Sutee Y. 2000. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. Vaccine. 18: 44- 47.
- > Bielefeldt-Ohmann H. 1998. Analysis of antibody-independent binding of dengue viruses and dengue envelope protein to human myelomonocytic cells and B lymphocytes. Virus Res. 57: 63-79.
- > Bosch I., Khaja K., Estévez L., Raines G., Melichar H., Warke R.V., Fournier M.V., Ennis F.A. y Rothman A.L. 2002. Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. J Virol. 76: 5588-5597.
- > Bray M., Men R. y Lai C. 1996. Monkeys immunized with intertypic chimeric dengue viruses are protected against wild-type virus challenge. J Virol. 70: 4162-4166.
- > Bringas R y Fernández J. 1995. A lipoamide dehydrogenase from *Neisseria meningitidis* has a lipoyl domain. Proteins. 21: 303-305.
- > Brown R., Jarvis K. y Hyland K. 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. Anal Biochem. 180: 136-139.
- > Bullock W.O., Fernandez J.M. y Short, J.M. 1987. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with Beta-Galactosidase selection. Biotechniques. 4: 376-78.
- > Burke D.S., Nisalak A., Johnson D E. y Scott R.M. 1988. A prospective study of dengue infections in Bangkok. Am J Trop Med Hyg. 38: 172-180.
- > Butrapet S., Rabablt J., Angsubhakorn S., Wiriyarat W., Huang C., Kinney R., Punyim S. y Bhamarapravati N. 2002. Chimeric dengue type 2/type 1 viruses induce immune responses in cynomolgus monkeys. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 33: 589-99.
- > Cantelar N., Fernández A., Albert L. y Pérez E. 1981. Circulación de Dengue en Cuba 1978-1979. Rev Cub Med Trop. 33: 72- 78.
- > Cardosa M.J., Poterfield J.S. y Gordon S. 1983. Complement receptor mediates enhanced flavivirus replication in macrophages. J Exp Med. 158: 258-263.

Bibliografía

- > Carmenate T., Mesa C., Menendez T., Falcón V. y Musacchio A. 2001. Recombinant Opc protein from *Neisseria meningitidis* reconstituted into liposomes elicits opsonic antibodies following immunization. *Biotechnol Appl Biochem.* 34: 63-9.
- > Caufour P.S., Motta M.C., Yamamura A.M., Vazquez S., Ferreira 1.1., Jabor A.V., Bonaldo M.C., Freire M.S. y Galler R. 2001. Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. *Virus Res.* 79: 1-14.
- > Chambers T.J., Chang S., Galler R. y Rice C. 1990. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Ann Rev Microbiol.* 44: 649-688.
- > Chaturvedi U.C., Agarwal R., Elbishbishi E.A. y Mustafa A S. 2000. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 28: 183-8.
- > Chen Y. 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* 3: 866-871.
- > Chen Y., Maguire T. y Marks R.M. 1996. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol.* 70: 8765-8772.
- > Clarke D.H. y Casals J. 1958. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg.* 7: 561-573.
- > Cleaves G.R. y Dubin D.T. 1979. Methylation status of intracellular dengue type 2 40s RNA. *Virology.* 96: 159-165.
- > Collier B.A., Clements D.E., Putnak R., Bignami G.S., Peters I.D., Aslamkhan A., Carlos R., Harada K.E Nakano E.T., Ivy J.M., McDonell M. y Humphreys T. 2001. Expression and immunogenicity of recombinant envelope protein of all four dengue serotypes. *Proceedings of the "Sixth International Symposium on positive strand RNA viruses"*. Paris. France.
- > Cologna R. y Rico-Hesse R. 2003. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *Virology.* 77: 3929-38.
- > Cregg J.M., Vedvick T.S. y Raschke W.C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology.* 11: 905-910.
- > Crill W.D. y 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. *Virol.* 75: 7769-73.
- > De la Sierra I.L., Pernot L. y Prange T. 1997. Molecular structure of the lipoamide dehydrogenase domain of a surface antigen from *Neisseria meningitidis*. *J Mol Biol.* 269: 129-141.
- > Deubel V., Bordier M. y Megret F. 1991. Processing, secretion and immunoreactivity of carboxy terminally truncated dengue-2 envelope proteins expressed in insect cells by recombinant baculoviruses. *Virology.* 180: 440-447.
- > Durbin A.P., Karron R.A., Sun W., Vaughn D.W., Reynolds M.J., Perreault J R., Thumar B., Men R., Lai C.J., Elkins W.R., Chanock R.M., Murphy B.R. y Whitehead S.S. 2001. Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region. *Am J Trop Med Hyg.* 65: 405-413.

Bibliografía

- > Expósito N., Mestre M. y Silva R. 1999. Preformulation study of the vaccine candidate P64k against *Neisseria meningitidis*. Biotechnol Appl Biochem. 29: 113-119.
- > Falgout B., Bray M., Schlesinger J. y Lai C. J. 1990. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. J Virol. 64: 4356-4363.
- > Feighny R., Burrous J. y Putnak R. 1994. Dengue type 2 virus envelope protein made using recombinant baculovirus protects mice against virus challenge Am J Trop Med Hyg. 50: 322-328.
- > Fonseca B.A.L., Khoshnood K. y Shope R E. 1991. Flavivirus type-specific antigens produced from fusions of a portion of the E protein gene with the *E. coli* trp-e gene. Am J Trop Med Hyg. 44: 500- 508.
- > Gagnon S.J., Leporati A., Green S., Kalayanarooj S., Vaughn D.W., Stephens H.A.F., Suntayakorn S., Kurane I., Ennis F.A. y Rothman A.L. 2001. T cell receptor Vp gene usage in Thai children with dengue virus infection. Am J Trop Med Hyg. 64: 41-48
- > Gibbs R.V. 2003. Cytokines and glycosaminoglycans (GAGs). Adv Exp Med Biol. 535: 125-43.
- > González G., Crombet T., Catala M., Mirabal V., Hernandez J.C., Gonzalez Y., Marinello P., Guillen G. y Lage A. 1998. A novel cancer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth factor linked to a carrier protein: report of a pilot clinical trial. Ann Oncol. 9: 431-5.
- > González G., Crombet T., Torres F., Catala M., Alfonso L., Osorio M., Neningen E., Garcia B., Mulet A., Perez R. y Lage A. 2003. Epidermal growth factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy. Ann Oncol. 14: 461-6.
- > González G., Pardo O.L. y Sánchez B, 1997. Induction of immune recognition of self Epidermical Growth Factor-II: Characterization of the antibody response and the use of a fusion protein. Vaccine Res. 6: 91-100.
- > González S., Alvarez A. y Caballero E. 2000 a. P64k meningococcal protein as immunological carrier for weak immunogens. Scand J Immunol. 52: 113-116.
- > González S., Lisel Vina L., Nazábal C., China G., Caballero E. y Musacchio A. 2000 b. B-cell epitope mapping of the *Neisseria meningitidis* P64k protein using overlapping peptides. Biotechnol Appl Biochem. 32: 1-8.
- > Green S., Vaughn D.W., Kalayanarooj S., Nimmannitya S., Suntayakorn S., Nisalak A., Rothman A.L. y Ennis F.A. 1999. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. J Med Virol. 59: 329-334.
- > Gubler D.J. 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Clin Microbiol Rev. 11: 480-496.
- > Guillén G., Álvarez A. y Silva R. 1998. Expression in *Escherichia coli* of the IpdA gene, protein sequence analysis and immunological characterization of the P64k protein from *Neisseria meningitidis*. Biotechnol Appl Biochem. 27: 189-196.
- > Guillén G., Alvarez A., Silva R., Morera V., González S., Musacchio A., Besada V., Coizeau E., Caballero E., Nazábal C., Carmenate T., González L. J , Estrada R., Tambara Y., Padrón G. y

Bibliografía

- Herrera L. 1998. Expression in *Escherichia coli* of the *lpdA* gene; protein sequence analysis and immunological characterization of the P64k protein from *Neisseria meningitidis*. *Biotechnol Appl Biochem*. 27: 189-196.
- > Guirakhoo F., Arroyo J., Pugachev K.V., Miller C., Zhang Z.-X., Weltzin R., Georgakopoulos K., Catalan J., Ocran S., Soike K., Raterree M. y Monath T.P. 2001. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol*. 75: 7290-7304.
 - > Guirakhoo F., Pugachev K., Arroyo J., Miller C., Zhang Z.X., Weltzin R., Georgakopoulos K., Catalan J., Ocran S., Draper K. y 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: 146-59.
 - > Guirakhoo F., Pugachev K., Xi Zhang Z., Me Carthy K., Bedford P., Kitchener S., Draper K., Lang J , Trent D. y Monath T. 2003. Proceedings of the "Dengue virus: molecular basis of cell entry pathogenesis". Viena, Austria.
 - > Guirakhoo F., Weltzin R., Chambers T.J., Zhang Z.X., Soike K., Raterree M., Arroyo J., Georgakopoulos K., Catalan J. y Monath, T.P. 2000, Recombinant chimeric Yellow Fever-Dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. *J Virol*. 74: 5477-5485.
 - > Guzman M.G. y Kouri G. 2002. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*. 2: 33-42.
 - V Guzman M.G. y Kouri G. 1996. Advances in Dengue Diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 3: 621 - 627.
 - > Hahn Y.S., Daller R., Hunkapiller T., Dalrymple J.M., Strauss J.H. y Strauss E.G. 1988. Nucleotide sequence of Dengue 2 RNA and comparison of the encoded proteins with those of other flaviviruses. *Virology*. 162: 167-180.
 - > Halstead S B. 1974. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg*. 23: 974-982.
 - > Halstead S.B. y Palumbo N.E. 1973. Studies on the immunization of monkeys against dengue. *Am J Trop Med Hyg*. 22: 375-81.
 - > Halstead S B., Nimmannitya S. y Cohen S.N. 1970. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med*. 42: 311-328.
 - > Halstead S.B., O'Rourke E.J. y Allison A C. 1977. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting *in vitro* infection. *J Exp Med*. 146: 218-229.
 - > Halstead SB., Porterfield J.S. y O'Rourke E.J. 1980. Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera. *Am J Trop Med Hyg*. 29: 638-42.
 - > Halstead S B., Rojanasuphot S., Sangkawibha N. 1983. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg*. 32: 154-6.

Bibliografía

- > Halstead S B., Scanlon J E., Umpaivit P. y Udomsakdi S. 1969. Dengue and Chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. IV. Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area. Am J Trop Med Hyg. 18: 997-1021.
- > Halstead SB. 2003. Proceedings of the "Dengue virus: molecular basis of cell entry pathogenesis". Viena, Austria.
- > Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol 166: 557- 580.
- > Harrison S.C. y Modis Y. 2003. Proceedings of the "Dengue virus: molecular basis of cell entry pathogenesis". Viena. Austria.
- > He R.T., Innis B.L., Nisalak A., Usawattanakul W., Wang S., Kalayanarooj S. y Anderson R 1995. Antibodies that block virus attachment to Vero cells are a major component of the human neutralizing antibody response against dengue virus type 2. J Med Virol. 45: 451-461.
- > Heinz F.X. y Roehrig J.T. 1990. Flaviviruses. En: Immunochemistry of viruses II: the basis for serodiagnosis and vaccines. Van Regenmortel M.H.V. y Neurath A R. (ed.). 289-305.
- > Henchal E.A. y Putnak J R. 1990. The dengue viruses. Clin Microbiol Rev. 3: 376-396.
- > Henchal E.A., Gentry M.K., McCown J M. y Brandt W.E 1982. Dengue virus-specific and Flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. Am J Trop Med Hyg. 31: 830-6.
- > Hill C.W. y Harnish B W. 1982. Transposition of a chromosomal segment bounded by redundant rRNA genes in *Escherichia coli*. J Bacteriology. 149: 449-457.
- > Holbrook M R., Beasley D.W.C., White M.A., Fox R.O. y Barret A D.T. 2003. Proceedings of the "Dengue virus: molecular basis of cell entry pathogenesis". Viena, Austria.
- > Huang Y.H., Chang B I., Lei H.Y., Liu H.S., Liu C.C., Wu H.L. y Yeh T M 1997. Antibodies against dengue virus E protein peptide bind to human plasminogen and inhibit plasmin activity. Clin Exp Immunol. 110: 35-40.
- > Humphreys T.. 2001, Proceedings of the "Accelerating the development and introduction of a dengue vaccine for poor children". Ho Chi Minh City, Vietnam.
- > Irie K., Mohan P.M. y Sasaguri Y. 1989. Sequence analysis of cloned virus type 2 genome (New Guinea C strain). Gene. 74: 197-211.
- > John M., Nakano E. y Clements D. 1996. Subunit vaccine against flavivirus infection. PCT/US96/07627.
- > Juffrie M., van der Meer G.M., Hack C.E., Haasnoot K., Sutaryo A., Veerman A.J.P. y Thijs L G. 2000. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. Infect Immun. 68: 702-707.
- > Kanesa-thasan N , Sun W., Kim-Ahn G., Van Albert S., Putnak J R., King A , Raengsakulsrach B , Christ-Schmidt H., Gilson K., Zahradnik J M., Vaughn D.W., Innis B.L., Saluzzo J.F. y Hoke C.H.

Bibliografía

2001. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. *Vaccine*. 19: 3179-3188.
- > Kendrick N.C., Johansen J.J., Lee P R., Santek D A. 1994. Optimization of an HP Scanjet for quantification of protein electrophoresis gels. *Anal Biochem Jun*. 219: 297-304.
 - > Kinney R.M, Claire H.Y., Butrapet S., Bhamarapravati N. y Gubler D.J. 2003. Proceedings of the "Dengue virus: molecular basis of cell entry pathogenesis". Viena, Austria.
 - > Kliks S. 1990. Antibody-enhanced infection of monocytes as the pathogenetic mechanism for severe dengue illness. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 6: 993-8.
 - > Kliks S. 2003. Proceedings of the "Dengue virus: molecular basis of cell entry pathogenesis". Viena, Austria.
 - > Kliks S.C., Nimmannitya S., Nisalak A. y Burke D.S. 1988. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg*. 38: 411-419.
 - > Kliks S.C., Nisalak A., Brandt W.E., Wahl L y Burke D.S. 1989. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 40: 444-51.
 - > Kobatake E., Inai T. y Ikariyama Y. 1993. Bioluminescent immunoassay with a protein A-luciferase fusion protein. *Anal Biochem*. 208: 300-305.
 - > Kochel T., Wu S.J., Raviprakash K., Hobart P., Hoffman S., Porter K. y Hayes C, 1997. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*, 15: 547-552.
 - > Kochel T.J., Raviprakash K., Hayes C.G., Watts D.M., Russell K.L., Gozalo A.S., Phillips I.A., Ewing D.F., Murphy G.S. y Porter K.R. 2000. A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces virus neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys. *Vaccine*. 18: 3166-73.
 - > Kochel T.J., Watts D.M, Halstead S.B., Hayes C.G., Espinoza A., Felices V., Caceda R., Bautista C.T., Montoya Y., Douglas S. y Russell K.L. 2002. Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 360: 310-2.
 - > Kourí G., Guzmán M.G., Bravo J. y Trina C. 1989. Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic WHO Bulletin OMS. 67: 375-380.
 - > Kourí G., Guzmán M.G., Valdés L., Carbonel I., del Rosario D., Vázquez S., Laferté J , Delgado J. y Cabrera M.V. 1998. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis*. 4: 89-92.
 - > Kuhn R.J., Zhang W., Rossmann M.G., Pletnev S.V., Corver J., Lenches E., Jones CT., Mukhopadhyay S., Chipman P.R., Strauss E.G., Baker T.S y Strauss J H. 2002. Structure of Dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 108: 717-725.

Bibliografía

- > Kuno G. y Oliver A. 1989. Maintaining mosquito cell lines at high temperatures: effects on the replication of flaviviruses. *In Vitro Cell Dev Biol.* 25: 193-6.
- > Kurane I. y Ennis F.A. 1992. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Sem Immunol.* 4: 121-127.
- > Lacks S. y Greenberg J R. 1977. Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *J Mol Biol.* 114: 153-168.
- > Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-683.
- > Lanciotti R.S., Calisher C.H., Gubler D.J., Chang G.J. y Vorndam A.V. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 30: 545-51.
- > Lang J., Sabchareon A., Forrat R. y Yoksan S. 2003. Proceedings of the "Dengue virus: molecular basis of cell entry pathogenesis". Viena, Austria.
- > Leitmeyer K.C., Vaughn D.W., Watts D M., Salas R , Villalobos I., Ramos C y Rico-Hesse R. 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* 73: 4738-4747.
- > Leyssen P., De Clerco E. y Neyts J. 2000. Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. *Clin Microbiol Rev.* 13: 67-82.
- > Libraty D. 2003. Proceedings of the "Dengue virus: molecular basis of cell entry pathogenesis". Viena, Austria.
- > Libraty D.H, Endy T.P, Houn H.S, Green S., Kalayanarooj S., Suntayakorn S., Chansiriwongs W., Vaughn D.W., Nisalak A., Ennis F.A. y Rothman A.L. 2002 a. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis.* 185: 1213-21.
- > Libraty D.H., Young P.R., Pickering D., Endy T.P., Kalayanarooj S., Green S., Vaughn D.W., Nisalak A., Ennis F.A. y Rothman A.L. 2002 b. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 186: 1165.
- > Lin C.F., Lei H.Y. y Liu C.C. 2001. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J Med Virol.* 63: 143-149.
- > Loke H., Bethell D.B., Phuong C.X., Dung M., Schneider J., White N.J., Day N.P., Farrar J. y Hill A.V. 2001. Strong HLA class I restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double- edged sword? *J Infect Dis.* 184: 1369-73.
- > Mandl C.W., Guirakoo F. y Holzman H. 1989. Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level using tick borne encephalitis virus as a model. *J Virol.* 63: 564-571
- > Markoff L., Pang X., Houn Hs., Falgout B., Olsen R., Jones E. y Polo S. 2002. Derivation and characterization of a dengue type 1 host range-restricted mutant virus that is attenuated and highly immunogenic in monkeys. *J Virol* 76: 3318-3328,

Bibliografía

- > Marovich M., Grouard-Vogel G., Louder M., Eller M., Sun W., Wu S.J., Putvatana R., Murphy G., Tassaneetrithep B., Burgess T., Birx D., Hayes C., Schlesinger-Frankel S. y Mascóla J. 2001, Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 6: 219- 24.
- > Matswra Y., Miyamoto M. y Soto T. 1989. Characterization of japanese encephalitis virus envelope protein expressed by recombinant baculoviruses. *Virology.* 173: 677-682.
- > McBride W.J.H. y Bielefeldt-Oman H. 2000. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes and Infect.* 2: 1041-1050.
- > Megret F., Hugnot J.P., Falconar A., Gentry M.K., Morens D M., Murray J.M., Schlesinger J.J., Wright P.J., Young P. y Van Regenmortel M.H. 1992. Use of recombinant fusion proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on the dengue virus envelope glycoprotein. *Virology.* 187: 480-91.
- > Men R , Wyatt L., Tokimatsu I., Arakaki S., Shameem G., Elkins R., Chanock R., Moss B. y Lai C.J. 2000. Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge. *Vaccine.* 18: 3113-22.
- > Mongkolsapaya J., Dejnirattisai W., Xu X.N., Vasanawathana S., Tangthawornchaikul N., Chairunsri A., Sawasdivorn S., Duangchinda T., Dong T., Rowland-Jones S., Yenchitsomanus P.T., McMichael A., Malasit P. y Screaton G. 2003. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.*9: 921-7.
- > Morens D.M., Halstead S.B. y Marchette N.J. 1987. Profiles of antibody-dependent enhancement of dengue virus type 2 infection. *Microb Pathog.* 3: 231-7.
- > Morens D.M., Halstead S.B. y Repik P.M. 1985. Simplified plaque reduction assay for Dengue viruses by semimicro methods in BHK 21 cells: comparison of the BHK suspension test standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol.* 22: 250-254.
- > Muné M., Rodríguez R., Ramírez R., Soto Y., Sierra B., Rodríguez Roche R., Márquez G., García J., Guillen G., Guzmán M.G. 2003. Carboxy-terminally truncated Dengue 4 virus envelope glycoprotein expressed in *Pichia pastoris* induced neutralizing antibodies and resistance to Dengue 4 virus challenge in mice. *Arch Virol.* 148: 2267-73.
- > Murgue B., Roche C., Chungue E. y Deparis X. 2000. Prospective study of the duration and magnitude of viraemia in children hospitalised during the 1996-1997 dengue-2 outbreak in French Polynesia. *J Med Virol.* 60: 432-8.
- > Musacchio A., Carmenate T., Delgado M y González S. 1997 Recombinant Opc meningococcal protein, folded *in vitro*, elicits bactericidal antibodies after immunization. *Vaccine.* 15: 751-8.
- > Nawa M. 1996. Stability of hemagglutinating activity of extracellular and intracellular form of japanese encephalitis virus exposed to acidic pH. *Microbiol Immunol.* 40: 365-371.

Bibliografía

- > Niebla O., Álvarez A., Martín A., Rodríguez A., Delgado M., Falcón V. y Guillen G. 2001. Immunogenicity of recombinant class 1 protein from *Neisseria meningitidis* refolded into phospholipid vesicles and detergent. *Vaccine*. 19: 3568-74.
- > Nowak T y Wengler G. 1987. Analysis of the disulphides present in the membrane protein of the West Nile flaviviruses. *Virology*. 156: 127-137.
- > Okamoto Y., Gagnon S.J., Kurane I., Leporati A M y Ennis F A. 1994. Preferential usage of T-cell receptor V beta 17 by dengue virus specific human T lymphocytes in a donor with immunity to dengue virus type 4. *J Virol*. 68: 7614-7619.
- > Okuno Y., Fukunaga T., Tadano M., Fuki K., Ikeda T., Sekii K. y Ariyoshi H. 1983. Serological studies on volunteers inoculated experimentally with a dengue virus strain in 1943. *Biken Journal*. 26: 161-163.
- > Papaevangelou G. y Halstead S.B. 1977. Infections with two dengue viruses in Greece in the 20th century. Did dengue dengue hemorrhagic fever occur in the 1928 epidemic? *Am. J. Trop. Med.* 80: 46-51.
- > Pérez A., Dickinson F., Cinza Z., Ruiz A., Serrano T., Sosa J., González S., Gutiérrez Y., Nazábal C., Gutiérrez O., Guzmán D., Díaz M., Delgado M., Caballero E., Sardinias G., Álvarez A , Martín A., Guillén G. y Silva R. 2001. Safety and preliminary immunogenicity of the recombinant outer membrane protein P64k of *Neisseria meningitidis* in human volunteers. *Biotechnol Appl Biochem*. 34: 121-125.
- > Porter K.P., Kochel T.J., Wu S.J., Raviprakash K, Phillips I. y Hayes C.G. 1998. Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immuno-stimulatory motifs on antibody responses. *Arch Virol*. 143: 997-1003.
- > Poterfield J.S. 1986. Antibody dependent enhancement of viral infectivity. En: *Advances in virus Research*. Maramorosh K. y Murphy F A. (ed.). Academic Press, N Y. 31: 335-352.
- > Putnak R., Barvir D A., Burrous J.M., Dubois D R., D'Andrea V.M., Hoke C.H., Sadoff J.C. y Eckels K.H. 1996. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J Infect Dis*. 174: 1176-84.
- > Putnak R., Feighny R. y Burrous J. 1991. Dengue 1 virus envelope glycoprotein gene expressed in recombinant baculovirus elicit virus neutralization antibodies in mice and protects them from virus challenge. *Am J Trop Med Hyg*. 45: 159-167.
- > Putnak R., Fuller J., VanderZanden L., Innis B.L. y Vaughn D.W. 2003. Vaccination of rhesus macaques against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. *Am J Trop Med Hyg*. 68: 469-76.
- > Raviprakash K, Ewing D., Simmons M., Porter K.R., Jones T.R., Hayes C.G., Stout R. y Murphy G.S. 2003. Needle-free Biojector injection of a dengue virus type 1 DNA vaccine with human immunostimulatory sequences and the GM-CSF gene increases imunogenicity and protection from virus challenge in Aotus monkeys. *Virology*. 315: 345-352.

Bibliografía

- > Raviprakash K., Marques E., Ewing D., Lu Y., Phillips I., Porter K.R., Kochel T.J., August T.J., Hayes C G. y Murphy G.S. 2001. Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. *Virology*. 290: 74-82.
- > Raviprakash K., Porter K.R., Kochel T.J., Ewing D., Simmons M., Phillips I., Murphy G.S., Weiss W.R. y Hayes C.G. 2000. Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in *rhesus* macaques. *J Gen Virol*. 81: 1659-1667.
- > Reed L. y Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.* 27: 493-497.
- > Rey F.A, Heinz F.X y Mandl C. 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*. 375: 291-298.
- > Rey F.A. 2003. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 6899-901.
- > Rice C.M. 1996. En: *Fields Virology*. Fields B N. (ed.). Raven Press, N Y. 931-960.
- > Rice C.M., Lenches E M. y Eddy S.R. 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*. 229: 726-735.
- > Rico-Hesse R., Harrison L.M. y Salas R.A. 1997. Origin of Dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 230: 244-251.
- > Rothman A L. y Ennis F.A. 1999. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *Virology*. 257: 1-6.
- > Russell P.K., Brandt W.E. y Dalrymple J.M. 1980. Chemical and antigenic structure of flaviviruses. En: *The togaviruses: biology, structure, replication*. Scheiesinger R.W. (ed.). 503-529.
- > Sabin A.B. 1952. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg.* 1: 30-50.
- > Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. 1989. En: *the Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Irwin N , Ford N., Nolan C., Ferguson M. y Ockler M (ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York Co.
- > Sanger F., Nielen S. y Coulson A.R. 1977. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74: 5463-67.
- > Sangkawibha N., Rojanasuphot S., Ahandrik S., Viriyapongse S., Jatanasen S., Salitul V., Phanthumachinda B. y Halstead S.B. 1984. Risk factors for dengue shock syndrome: A prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol*. 120: 653-669.
- > Sigarroa A. 1985. En: *Biometría y diseño experimental*. Editorial Pueblo y educación. Cuba.
- > Silva R, Menéndez T, Alonso LM, Iglesias E, Musacchio A, Leal MJ, Alvarez A, Coizeau E, Martin A, Herrera L y Guillen G. 1999. Characterisation of the *lpsA* gene from *Neisseria meningitidis* by polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism and sequencing. *FEMS Microbiol Lett*. 199. 174: 191-9.
- > Silva R., Selman M. y Guillen G. 1992. Nucleotide sequence for an outer membrane protein from *N. meningitidis* and use of said protein in vaccine preparations. EPO. Publication number: 0 474 313 A2.

Bibliografía

- > Simmons M., Murphy G.S. y Hayes C.G. 2001 a. Short report: Antibody responses of mice immunized with a tetravalent dengue recombinant protein subunit vaccine. *Am J Trop Med Hyg.* 65: 159-161.
- > Simmons M., Murphy G.S., Kochel T., Raviprakash K. y Hayes C.G. 2001 b. Characterization of antibody responses to combinations of a dengue-2 DNA and dengue-2 recombinant subunit vaccine. *Am J Trop Med Hyg.* 65: 420-426.
- > Simmons M., Nelson W.M., Wu S.J. y Hayes C.G. 1998. Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice. *Am J Trop Med Hyg.* 58: 655-662.
- > Speidel K., Osen W., Faath S., Hilgert I., Obst R., Braspenning J., Momburg F., Hammerling G.J., Rammensee H.G. 1997. Priming of cytotoxic T lymphocytes by five heat-aggregated antigens in vivo: conditions, efficiency, and relation to antibody responses. *Eur J Immunol.* 27: 2391-9.
- > Srivastava A.K., Putnak J.R., Warren R.L. y Hoke C.H.Jr. 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.
- > Staropoli I., Frenkiel M.P., Megret F y Deubel V. 1997. Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. *Vaccine.* 15: 1946-54.
- > Stephens H.A., Klaythong R., Sirikong M., Vaughn D.W., Green S., Kalayanarooj S., Endy T.P., Libraty D.H., Nisalak A., Innis B.L., Rothman A.L., Ennis F A. y Chandanayingyong D, 2002 HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens.* 60: 309-18.
- > Sugrue R.J., Fu H., Howe J. y Chan Y. 1997. Expression of the Dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. *J Virol.* 78: 1861-1866.
- > Tadano M., Okuno Y., Fukunaga T. y Fukai K. 1983. Retrospective serological studies on dengue epidemics in Osaka and Okinawa. *Biken Journal.* 26: 165-167.
- > Tassaneeritthep B., Burgess T., Granelli-Piperno A., Trumpfheller C., Sun W., Eller M, Pattanapanyasat K., Sarasombath S., Bix D., Steinman R., Schlesinger S. y Marovich M. 2003 a. Proceedings of the "Dengue virus: molecular basis of cell entry pathogenesis". Viena, Austria.
- > Tassaneeritthep B., Burgess T.H., Granelli-Piperno A., Trumpfheller C., Finke J., Sun W., Eller M.A., Pattanapanyasat K., Sarasombath S., Bix D L., Steinman R.M., Schlesinger S. y Marovich M.A. 2003 b. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med.* 197: 823-9.
- > Thein S., Aung M.M., Shwe T.N., Aye M., Zaw A., Aye K., Aye K.M. y Aaskov J. 1997. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 56: 566-572.
- > Towbin H., Staehelin T. y Golden J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sei USA.* 76: 4350- 4354.

Bibliografía

- > Tozawa K., Broadhurst R.W., Raine A.R., Fuller C., Alvarez A., Guillen G., Padrón G. y Perham R.N. 2001. Solution structure of the lipoyl domain of the chimeric dihydrolipoyl dehydrogenase P64K from *Neisseria meningitidis*. Eur J Biochem. 8: 4908-17.
- > Troyer J.M., Hanley K.A., Whitehead S.S., Strickman D., Karron R.A., Durbin A.P y Murphy B.R. 2001. A live attenuated recombinant dengue-4 virus vaccine with restricted capacity for dissemination in mosquitoes and lack of transmission from vaccinees to mosquitos. Am J Trop Med Hyg. 65: 414-419.
- > Van der Most R.G., Murali-Krishna K., Ahmed R. y Strauss J.H. 2000. Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T- cell response. J Virol. 74: 8094-101.
- > Vaughn D.W., Green S., Kalayanarooj S., Innis B.L., Nimmannitya S., Suntayakorn S., Endy T.P., Raengsakulrach B., Rothman A.L., Ennis F A. y Nisalak A. 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. J Infect Dis. 181: 2-9.
- > Vaughn D.W. y Wellington S. 2003. Proceedings of the "Dengue virus: molecular basis of cell entry pathogenesis". Viena, Austria.
- > Velzing J., Groen J., Drouet M.T., van Amerongen G., Copra C., Osterhaus A.D. y Deubel V. 1999. Induction of protective immunity against Dengue virus type 2: comparison of candidate live attenuated and recombinant vaccines. Vaccine. 17: 1312-20.
- > Wang S., He R., Patarapotikul J., Innis B.L. y Anderson R. 1995. Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. Virology. 213: 254-257.
- > Wang W.K., Chao D.Y., Kao C.L., Wu H.C., Liu Y.C., Li C M., Lin S.C., Ho S T., Huang J.H. y King C.C. 2003. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. Virology. 305: 330-8.
- > Watts D M., Porter K.R., Putvatana P., Vazquez B., Calampa C., Hayes C.G. y Halstead S.B. 1999. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue hemorrhagic fever. Lancet. 354: 1431-1434
- > Wei H.Y., Jiang L.F., Xue Y.H., Fang D.Y., Guo H.Y. 2003. Secreted expression of dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *Pichia pastoris*. J Virol Methods. 109: 17-23.
- > Wengler G. y Gross H.J. 1978. Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. Virology. 89: 423-437.
- > Westaway E.G. 1987. Flavivirus replication strategy. Adv Virus Res. 33: 45-90.
- > Winkler G., Randolph V.B. y Cleaves G.R. 1988. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. Virology. 162: 187-196.
- > Yang K.D., Wang C.L y Shaio M.F. 1995. Production of cytokines and platelet activating factor in secondary dengue virus infections. J Infect Dis. 172: 640-645.
- > Zhao B., Mackow E. y Buckler-White A. 1986. Cloning full length dengue 4 viral cDNA sequences: Analysis of genes coding for structural proteins. Virology. 155: 77-88.

Bibliografía

- > Zivna I., Green S., Vaughn D.W., Kalayanarooj S., Stephens H.A., Chandanayingyong D., Nisalak A., Ennis F A. y Rothman A.L. 2002. T cell responses to an HLA-B*07-restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity. J Immunol. 168: 5959-65.
- > Zivny J., DeFronzo M., Jarry W., Jameson J., Cruz J., Ennis F A. y Rothman A.L. 1999. Partial agonist effect influences the CTL response to a heterologous dengue virus serotype. J Immunol. 163: 2754-60.



10 AUTOBLOGRAFÍA RELACIONADA CON LA TESIS

Logros

Hermida L., Rodríguez R., Lazo L., Zulueta A., López C., Valdés I., Silva R., China G., Guillén G., Guzmán M.G., Sierra B. y Espinosa R. Obtención de proteínas de fusión inductoras de respuesta funcional contra el virus dengue. Logro institucional CIGB año 2001.

Hermida L., Rodríguez R., Zulueta A., López C., Lazo L., Guillén G., Guzmán G., Valdés I., Martín J., Bernardo L., Sierra B., Silva R., Álvarez M, Martínez R., China G., Rodríguez R., del Rosario D., Prado I., Sánchez J., Castro J., Selman M., Vázquez S., Márquez G., Cosme K., Espinosa R. y Aguirre E. Demostración de eliminación de partículas virales después del reto en monos con el candidato vacunal de dengue-2. Logro institucional CIGB año 2003.

Zulueta A. Martín J., Rodríguez R., **Hermida L.**, Lazo L., López C., Valdés I., Guillén G., Álvarez M, Silva R., Bernardo L., Guzmán G., Prado I., Rosario D., Gil L. y Romero Y. Demostración de funcionalidad en ratones de los antígenos quiméricos de la envoltura de los 4 serotipos del virus dengue. Logro institucional CIGB año 2003.

Sosa A., Cosme K., Martínez R., Martín J., **Hermida L.**, Marín N. y Guillén G. Gestión de riesgo de la bioseguridad con relación a las acciones con el virus dengue en le CIGB. Obtención de licencia del área y de experimento para reto en dengue en ratones y monos. Logro institucional CIGB año 2003.

Patente

Hermida L., Rodríguez R., Lazo L., Zulueta A., López C., Valdés I., Silva R., China G., Guillén G., Guzmán M.G., Sierra B. y Espinosa R. "Chimeric chains coding for proteins inducing effects against viruses. Preparations using chimeric proteins". No. 2001-0172, presentada en PCT, EE UU y varios países de A. Latina en el año 2002. Publicada en febrero, año 2002.

Publicaciones

1. **Hermida L.**, Rodríguez R., Lazo L., López C., Márquez G., Páez R., Guzmán G., Suárez C., Espinosa R., García J. y Guillén G. 2002. A recombinant envelope protein from Dengue virus purified by IMAC is bioequivalent with its immune-affinity chromatography purified counterpart. Journal of Biotechnology. 94 (2) 213 - 216.

2. **Hermida L.**, Rodríguez R., Lazo L., Bernardo L., Silva R., Zulueta A., López C., Martín J., Valdés I., Del Rosario D., Guillén G. y Guzmán M.G. 2004. A fragment of the envelope protein from Dengue-1 virus, fused in two different sites of the meningococcal P64k protein carrier, induces a functional immune response in mice. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 39: 107-114.
3. **Hermida L.**, Rodríguez R., Lazo L., Silva R., Zulueta A., Chinae, G., López, C., Guzmán, M.G. y Guillén, G. 2004. A Dengue-2 Envelope fragment inserted within the structure of the P64k meningococcal protein carrier, enables a functional immune response against the virus in mice. *Journal of Virological Methods*. 115(1): 41-49.
4. Zulueta A., **Hermida L.**, Lazo L., Valdés I., Rodríguez R., López C., Silva R., Rosario D., Martín J., Guzmán M.G. y Guillén G. 2003. The fusion site of envelope fragments from each serotype of dengue virus in the P64k protein, influence some parameters of the resulting chimeric construct. *Biochem Biophys Res Commun*. 308 (3): 619-26.
5. López C., Sánchez J., **Hermida L.**, Zulueta A. y Márquez G. Cysteine mediated multimerization of a recombinant dengue E fragment fused to the P64k protein by Immobilized metal ion affinity chromatography. 2004. Aceptada en: *Protein Expression and Purification*.
6. Guzmán MG, Rodríguez R., Rodríguez R, **Hermida L.**, Álvarez M., Lazo L., Muné M, Rosario D., Valdés K., Vázquez S., Martínez R., Serrano T., Paez R., Espinosa R., Pumariaga T. y Guillén G. Dengue 4 virus envelope glycoprotein expressed in *Pichia pastoris* induces neutralizing antibodies and provides partial protection from viral challenge in *Macaca fascicularis*. 2003. *Am J Trop Med Hyg*. 69 (2): 129-34.

XV Forum de Ciencia y Técnica

Hermida L., Rodríguez R., Zulueta A., López C., Lazo L., Guillén G., Guzmán G., Valdés I., Martín J., Bernardo L., Sierra B., Silva R., Alvarez M, Martínez R., Chinae G., Rodríguez R., del Rosario D., Prado I., Sánchez J., Castro J., Selman M., Vázquez S., Márquez G., Cosme K., Espinosa R. y Aguirre E. Desarrollo de un candidato vacunal contra el Dengue basado en proteínas quiméricas con la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*. Premio relevante al nivel provincial, 2003. Se presentará al nivel nacional en el año 2004.

Eventos científicos

Autobibliografía relacionada con la tesis

1. Rodríguez R. , **Hermida L.** , Lazo L., Márquez M., Alvarez M. , Huerta V., China G., Muné M., Guillén G. y Guzmán M.G. Unprocessed Recombinant Dengue 4 Virus Truncated MF-E Glycoprotein Expressed in *Pichia pastoris* Confers Partial Protection Against Virus Challenge. Congreso internacional "Dengue and Dengue hemorrhagic fever", Tailandia, 2000. Cartel.
2. Sierra B., Rodríguez R., Lazo L., **Hermida L.** , López C., García G., Pérez A.B. y Guzmán M.G. Mice Lymphoproliferative Responses induced by a DEN4 truncated recombinant E glycoprotein. Congreso internacional "Dengue and Dengue Hemorrhagic fever", Tailandia, 2000. Cartel.
3. **Hermida L.** , Rodríguez R., Lazo L., Márquez G., García J., Espinosa R., López C., Álvarez M., Páez R., Guillén G. y Guzmán M.G. Immunological evaluation of the recombinant envelope protein from Dengue-4. Biotecnología Habana' 99. Cartel.
4. **Hermida L.** , Rodríguez R., Lazo L., Márquez G., García J., Espinosa R., López C., Páez R., Guillén G. y Guzmán M.G. Obtention and characterization of a recombinant envelope protein from DEN-4 virus. Congreso internacional "Expression of recombinant proteins" Semmering, Austria, 2000. Cartel.
5. **Hermida L.** , Rodríguez R., Lazo L., Márquez G., López C., García J., Espinosa R., Alvarez M., Páez R., Guillén G. y Guzmán M.G. Comparison of two different steps of affinity chromatography in the purification process of a recombinant envelope protein from Dengue 4 virus. Congreso internacional "Dengue and Dengue Hemorrhagic fever", Tailandia, 2000. Cartel.
6. **Hermida L.**, Rodríguez R., López C, Lazo L, Márquez G., García J, Espinosa R, Paez R., Guzmán M.G. y Guillén G. Evaluation of the recombinant envelope protein from dengue-4 virus formulated in two different adjuvants. Congreso internacional " Workshop of adjuvants" Habana, 2001. Cartel.
7. Lazo L., **Hermida L.** . Rodríguez R., Zulueta A., López C., Silva R., China G., Martín J., Guzmán M.G. y Guillén G. Cloning, semipurification and evaluation of two fusion proteins from Dengue 2 virus. Presentación oral en el Congreso de la asociación latinoamericana de microbiología (ALAM), Habana, 2002.

Autobibliografía relacionada con la tesis

8. Valdés I., **Hermida L** , Rodríguez R., Zulueta A. Silva R., Guzmán M.G. y Guillén G. Cloning, expression and characterization of recombinant E protein truncated in several amino acids in *Pichia pastoris* yeast. Congreso ALAM, Habana, 2002. Cartel.
9. **Hermida L** , Lazo L., Rodríguez R., Zulueta A., López C., Silva R., China G., Martín J., Guzmán M.G. y Guillén G. Chimeric proteins as vaccine candidates against Dengue. Presentación oral en el congreso ALAM, Habana, 2002.
10. Lazo L., **Hermida L** , Rodríguez R., Zulueta A., López C., Silva R., China G., Martín J., Guzmán M.G. y Guillén G. Cloning, semipurification and evaluation of two fusion proteins from Dengue 2 virus. Congreso ALAM, Habana, 2002. Cartel.
11. López C., Sánchez J., **Hermida L.**, Zulueta A, y Márquez G. Cysteine mediated multimerization of fusion proteins from Dengue virus by IMAC. Congreso ALAM, 2002. Cartel.
12. Sierra B., Rodríguez R., Lazo L., **Hermida L.**, Guillén G. y Guzmán M.G. The recombinant DEN-2 envelope B domain elicits a strong serotype specific lymphoproliferative response in mice. Congreso ALAM, 2002. Cartel.
13. Zulueta A., **Hermida L.**, Lazo L., Valdés I., Rodríguez R., López C., Silva R., Martín J., Guzmán, M.G. y Guillén, G. Cloning, expresión and antigenic characterization of different constructions of chimeric proteins P64k-Dengue 1, 2, 3, and 4. Congreso ALAM, 2002. Cartel.
14. Rodríguez R., López C., **Hermida L.**, Bernardo L., Martín J., Lazo, L., Guerra I., Zulueta A., Guillén G. y Guzmán M.G. Evaluation of the fusion recombinant protein containing the B domain of Envelope protein in different adjuvants. Congreso ALAM, 2002. Cartel.
15. Rodríguez R., **Hermida L.**, Martín J., Bernardo L., Zulueta A., Lazo L., Valdés I , López C., Guillén G. y Guzmán M.G. Analysis of the serotype specificity associated to recombinant fusion proteins containing the envelope B domain corresponding to the four serotypes of Dengue. Congreso ALAM, 2002. Cartel.
16. **Hermida L** Rodríguez R., Lazo L., Bernardo L., Silva R., Zulueta A., López C., Martín J., Valdés I., Rosario D., China G., Guzmán M.G. y Guillén G. Immunological evaluation of two different constructs of Dengue-1-P64k chimeric proteins. Congreso de la asociación latinoamericana de inmunología (ALAI), 2002. Cartel.

17. Lazo L., **Hermida L.**, Rodríguez R., Zulueta A., López C., Silva R., Chinae G., Martín J., Guzmán M.G. y Guillén G. Characterization and immunological evaluation of two variants of the envelope Dengue 2 protein. Congreso ALAI, 2002. Cartel.
18. López C., Rodríguez R., **Hermida L.**, Bernardo L., Martín J., Guerra I., Lazo L., Zulueta A., Guillén G. y Guzmán M.G. Influence of different adjuvants in the immunological response against Dengue. Congreso ALAI, 2002. Cartel.
19. **Hermida L.**, Rodríguez R., Lazo L., Martín J., Zulueta A., Bernardo L., Silva R., López C., Chinae G., Guzmán M.G. y Guillén G. Comparison between the insertion and fusion variants of the recombinant proteins formed by P64k and the domain III from DEN-1 and DEN-2. Congreso Biotecnología Habana 2003. Cartel.
20. Zulueta A., Rodríguez R., Martín J., **Hermida L.**, Álvarez M., Valdés I., Prado I., Chinae G., Rosario D., Guillén G. y Guzmán M.G. Aminoacidic changes in the recombinant Dengue 3 envelope domain III increase the immunogenicity in mice. Congreso Biotecnología Habana 2003. Cartel.
21. López C., Rodríguez R., **Hermida L.**, Martín J., Álvarez M., Sánchez J., Márquez G., Lazo L., Guzmán M.G. y Guillén G. Do purification procedures determine the immunogenicity of a recombinant dengue E fragment fused to the P64k protein?. Congreso Biotecnología Habana 2003. Cartel.
22. Rodríguez R., Sierra B., Fernández G., Martín J., **Hermida L.**, Pérez A.B., Guillén G. y Guzmán M.G. T cell priming by recombinant fusion proteins P64k-domain III from dengue E protein. Congreso Biotecnología Habana 2003. Cartel.
23. Sierra B., Rodríguez R., Fernández G., Martín J., **Hermida L.**, Pérez A.B., Guillén G. y Guzmán M.G. Recombinant fusion proteins P64k-domain III from dengue E protein elicit a long lasting immune response in Balb/c mice. Congreso Biotecnología Habana 2003. Cartel.

Tesis de diploma de Licenciatura en Biología y Bioquímica

- > “Evaluación de dos variantes en el proceso de semipurificación de la proteína recombinante de la envoltura del virus Dengue-4” (1999).

Autora: Laura Lazo Vázquez (Biología).

Tutores: Lic. Lisset Hermida Cruz, Rayner Rodríguez Díaz MSc.

- > “Semipurificación y evaluación de diferentes variantes del dominio III de la proteína de la envoltura del virus dengue 2 obtenidas en *Escherichia coli*” (2000).