



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL CONTRA LOS
DOMINIOS DE LA PROTEÍNA DE ENVOLTURA DEL VIRUS
DENGUE EN SUEROS DE PACIENTES DE ÁREAS ENDÉMICAS
DEL SUR DE MÉXICO.”**

**T E S I S
QUE PRESENTA:**

JOSSELIN CAROLINA CORZO GÓMEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR (A) EN CIENCIAS CON LA ESPECIALIDAD EN
BIOMEDICINA MOLECULAR**

**DIRECTORES DE TESIS:
DRA. LETICIA CEDILLO BARRÓN
DRA. MUSSARET ZAIDI JACOBSON**

**CIUDAD DE MÉXICO
FEBRERO, 2019**

TUTORA y CO-TUTORA DE TESIS

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Investigadora titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV

Dra. Mussaret Zaidi Jacobson

Médico Pediatra, Hospital General Dr. Agustín O´Horán, Mérida
Yucatán.

ASESORES

Dr. Vianney Ortiz Navarrete

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Dr. Michael Schnoor

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Investigadores titulares del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por darme la fuerza, salud y sabiduría para continuar el día a día.

A mis padres y hermanos, por siempre apoyarme y brindarme de amor y de palabras de ánimo para continuar con mis sueños.

A la Dra Leticia Cedillo Barrón por abrirme las puertas de su laboratorio, brindarme toda su paciencia y apoyo durante mi formación.

Al Dr Julio Cordero García por su apoyo incondicional durante el desarrollo experimental.

A la Dra. Mussaret Zaidi Jacobson por su cooperación y aportación en el proyecto al darnos acceso a los sueros y clínicas de infección de los pacientes con Dengue.

A mis asesores, Dr Vianney Ortiz, Dr Leopoldo Santos, Dr Michael Schnoor y Dr Nicolás Villegas, por sus certeros comentarios y sugerencias para la mejora del proyecto y mi formación académica.

Al CONACyT por el financiamiento otorgado el período requerido para terminar mi posgrado.

A la licenciada Ma. De Jesús Maqueda Villegas por su cariño, apoyo y apapacho durante los 4 años del posgrado.

A mis amigos que sin su cariño y palabras de ánimo, no hubiera sido lo mismo continuar el camino.

INDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	5
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.2 Epidemiología del dengue.....	12
1.3 Manifestaciones clínicas de la infección	14
1.4 Generalidades del virus dengue.....	15
1.4.1 Proteína de envoltura (E).....	16
1.5 Ciclo de replicación del DENV	17
1.6 Respuesta inmunológica contra el virus dengue	18
1.6.1 Respuesta inmune innata.....	19
1.6.2 Respuesta inmune humoral.....	20
1.6.3 Mecanismos de neutralización	23
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVO GENERAL	26
4.1 Objetivos específicos	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1 Población de estudio y aspectos éticos.....	27
5.1.1 Pruebas diagnósticas.....	28
5.2 Células S2 de <i>Drosophila melanogaster</i>	29
5.3 Bacterias	29
5.4 Plásmidos de expresión	29
5.4.1 pMTBip/V5-His.....	29
5.4.2 pROEX HT-b.....	30
5.4.3 Construcción de los plásmidos.....	31
5.5 Obtención de los fragmentos para cada dominio de la proteína de Envoltura	31
5.5.1 Ligación del plásmido con el inserto	32
Figura 8. Características y elementos de los plásmidos pMT/BiP/V5-His y pCoBlast.	30
Figura 9. Características y elementos que componen al vector de expresión pROEX HT-b.....	31

5.5.2 Transformación de células competentes de <i>E.coli DH5α</i> por choque térmico.	32
5.5.3 Digestión de las construcciones con enzimas de restricción.	33
5.5.4 Obtención a gran escala del DNA plasmídico de las construcciones	33
5.6 Expresión de las proteínas recombinantes EDI-II/DENV3 y EDIII/DENV3	33
5.6.1 Transfección transitoria de las células S2 de <i>Drosophila melanogaster</i>	33
5.6.2 Inmunofluorescencia (IFA) de las células S2 de <i>Drosophila melanogaster</i> . 34	
5.6.3 Western blot de las células S2 de <i>Drosophila melanogaster</i>	34
5.6.4 Transfección estable de las células S2 de <i>Drosophila melanogaster</i>	35
5.6.5 Cinética y producción masiva de proteínas recombinantes EDI-II/DENV3 y EDIII/DENV3	36
5.6.6 Obtención de cuerpos de inclusión de bacterias transformadas con la construcción EDIII/DENV2	36
5.7 Purificación de las proteínas recombinantes	37
5.7.1 Geles preparativos.....	37
5.7.2 Columnas con perlas de agarosa acopladas a níquel.....	37
5.8 Respuesta de anticuerpos hacia los antígenos recombinantes EDI-II/DENV3, EDIII/DENV3 y EDIII/DENV2.....	38
5.9 Análisis estadístico	38
6. RESULTADOS	39
6.1 Clonación de los dominios I-II de DENV3	39
6.2 Clonación del dominio III de DENV3.....	39
6.3 Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes EDI-II/DENV3 y EDIII/DENV3	41
6.4 Clonación del dominio III de DENV2.....	43
6.4.1 Evaluación de la expresión de la proteína EDIII/DENV2	44
6.5 Caracterización de la población de estudio	45
6.6 Evaluación de la respuesta de anticuerpos de sueros de pacientes con dengue en fase aguda contra las proteínas recombinantes EDI-II y EDIII de DENV2.....	47
6.6.1 Evaluación de la respuesta de anticuerpos de clase IgM de sueros de pacientes con dengue en fase aguda	48
6.6.2 Evaluación de la respuesta de anticuerpos de clase IgG de sueros de pacientes con dengue en fase aguda	49
6.3 Comparación de la respuesta de anticuerpos contra las proteínas recombinantes EDI-II/DENV2 y EDIII/DENV2.....	50

6.4 Comparación de la respuesta de anticuerpos contra las proteínas recombinantes EDI-II/DENV2 y EDIII/DENV2 y la clínica de la enfermedad.....	52
6.4.1 Comparación de la respuesta de anticuerpos de clase IgM contra las proteínas recombinantes EDI-II/DENV2 y EDIII/DENV2 y la clínica de la enfermedad	52
6.4.2 Comparación de la respuesta de anticuerpos de clase IgG contra las proteínas recombinantes EDI-II/DENV2 y EDIII/DENV2 y la clínica de la enfermedad	53
7. DISCUSIÓN	55
8. CONCLUSIÓN	61
9. PERSPECTIVAS	61
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS.....	68

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Características de los sueros empleados en el estudio.....	29
Tabla 2. Características de las construcciones y condiciones de PCR.	32
Tabla 3. Condiciones de reacción para la ligación plásmido-amplicón.	32
Tabla 4. Características de los pacientes positivos a DENV.....	46
Tabla 5. Datos clínicos de los pacientes positivos a Dengue.....	46
Figura 1 Distribución mundial del DENV	13
Figura 2. Incidencia y serotipos aislados por entidad federativa, México.	13
Figura 3. Estructura y componentes del DENV	15
Figura 4. Estructura de la glicoproteína E	17
Figura 5. Ciclo de replicación de DENV.	18
Figura 6. Respuesta de anticuerpos hacia DENV.	21
Figura 7. Modelo estequiométrico para la neutralización de flavivirus	25
Figura 8. Características y elementos del plásmido pMT/BiP/V5-His.....	30
Figura 9. Características y elementos del plásmido pPROEX HT-b.....	31

Figura 10. Digestión del DNA plasmídico de las colonias transformadas con EDI-II/DENV3 y EDIII/DENV3.....	40
Figura 11. Análisis de restricción de las construcciones que contienen a los Dominios de la proteína de E.	40
Figura 12. Análisis de las secuencias EDI-II/DENV3 y EDIII/DENV3.....	41
Figura 13. IFA de células S2 transfectadas con EDI-II/DENV3 y EDIII/DENV3	42
Figura 14. Cinética de expresión de EDI-II/DENV3 y EDIII/DENV3	43
Figura 15. Digestión y análisis de restricción para la construcción EDIII/DENV2... ..	44
Figura 16. Cinética de expresión y purificación de EDIII/DENV2	44
Figura 17. Estandarización.....	48
Figura 18. Niveles de IgM contra EDI-II/DENV2 y EDIII/DENV2.....	49
Figura 19. Niveles de IgG contra EDI-II/DENV2 y EDIII/DENV2	50
Figura 20. Comparación de respuesta de anticuerpos hacia EDI-II/DENV2 y EDIII/DENV2	51
Figura 21. Comparación entre el nivel de anticuerpos hacia los dominios I-II/DENV2 y III/DENV2 de la proteína de E y la clínica de la infección	54

ABREVIATURAS.

ADE Facilitamiento mediado por anticuerpos.
ADN Ácido desoxiribonucleico.
ARN Ácido ribonucleico.
Asn Asparagina.
BHK-21 Células de riñón de hamster bebé, cepa 21.
C Proteína de cápside.
CD Célula dendrítica
DC-SIGN DC specific ICAM3 grabbing non-integrin.
DEN Dengue
DENV-1 Virus del dengue serotipo 1.
DENV-2 Virus del dengue serotipo 2.
DENV-3 Virus del dengue serotipo 3.
DENV-4 Virus del dengue serotipo 4.
DI Dominio I.
DII Dominio II.
DIII Dominio III.
dsRNA Acido ribonucleico de doble cadena.
E Proteína de envoltura.
E. coli Eschechia coli.
ELISA Inmunoensayo absorbente ligado a enzima.
FcγR Receptor de cadena constante γ.
GFP Proteína verde fluorescente.
HLA Antígeno leucocitario humano.
IFN-β Interferon β.
IgG Inmunoglobulina G.
IgM Inmunoglobulina M
IL Interleucina.
IPTG Isopropiltiogalactósido
MDA5 Melanoma differentiation associated protein 5.
MT Metaloteioneína.
N2a Proteína no estructural 2a.
NFκβ Factor nuclear κβ.
NGC Nueva Guinea C.
NK Célula asesina natural.
NS1 Proteína no estructural 1.
NS2b Proteína no estructural 2b.
NS3 Proteína no estructural 3.
NS4a Proteína no estructural 4a.
NS4b Proteína no estructural 4b.
NS5 Proteína no estructural 5.
OMS Organización Mundial de la Salud.
OD Densidades ópticas
PAHO Organización Panamericana de la Salud.
PCR Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PBS Buffer de fosfatos salino
pDC Célula dendrítica plasmacitoide.

prM Proteína de pre-Membrana.
RIG-I Retinoic acid inducible gene 1.
S2 Línea celular Schneider 2.
SINAVE Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
SFA Sueros de fase aguda
STAT Activador transcripcional transductor de señales.
TLR Receptor de tipo Toll.
TNF α Factor de necrosis tumoral α .
UFP Unidades formadoras de placa.
WB Western Blot
WNV Virus del oeste del Nilo
ZE Zona endémica
ZNE Zona no endémica

RESUMEN

El dengue (DEN) es una enfermedad causada por cuatro virus relacionados serológicamente y genéticamente; denominados DENV 1–4, pertenecen al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. Esta enfermedad viral es transmitida por mosquitos hembra del género *Aedes* que habitan en áreas tropicales y subtropicales del mundo; actualmente no existe una vacuna con licencia o un tratamiento específico.

DENV es un virus de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, consta de un genoma de aproximadamente 11 kb, que contiene un solo marco de lectura abierto que codifica tres proteínas estructurales: cápside (C), pre-membrana / membrana (prM/M), y la glicoproteína de envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS) (Rice et al., 1985). La glicoproteína de envoltura E, es un determinante importante para el tropismo celular y es el objetivo principal de anticuerpos neutralizantes. Posee tres dominios estructurales y funcionalmente diferentes; el dominio I es un barril β central y tiene un sitio de N glicosilación en la posición 153, el dominio II es una región de dimerización alargada que contiene al altamente conservado péptido de fusión y posee una N glicosilación en la posición 67, específica de los Dengue virus, y el DIII es un módulo similar a inmunoglobulina (Ig) C-terminal (Modis *et al.*, 2003), que es importante para la unión al receptor celular.

En México, el número de casos de dengue en el año 2016 fue de 1.793, de los cuales 477 fueron casos graves (OPS 2017). La mayoría de los pacientes infectados con dengue se recuperan después de una enfermedad clínica autolimitada, pero una pequeña proporción progresa a una enfermedad grave, caracterizada principalmente por fuga de plasma con o sin hemorragia, siendo esta la causa principal de hospitalización y muerte entre niños y adultos (OMS 2009). La recuperación de la infección por un serotipo proporciona inmunidad de por vida contra ese serotipo en particular. Sin embargo, la inmunidad cruzada a los otros serotipos después de la recuperación es solo parcial y temporal, pero las infecciones posteriores por otros serotipos podrían aumentar el riesgo de desarrollar dengue grave.

Es por ello que en este trabajo hemos presentado por primera vez un análisis epidemiológico descriptivo en donde se evaluaron los niveles de los anticuerpos dirigidos contra los diferentes dominios de la proteína de Envoltura del virus dengue, para determinar si existía alguna asociación con la clínica de la enfermedad. Observando que los pacientes que cursaban por una infección aguda tienen mayores niveles de anticuerpos de clase IgM e IgG dirigidos contra los dominios I-II en comparación que contra el dominio III. Además la diferencia significativa entre la respuesta de clase IgG y la clínica presentada, se vio claramente más elevada contra los dominios I-II en los pacientes que presentaron dengue sin signos de alarma en comparación con los pacientes con dengue severo, sugiriendo que la pre existencia y los niveles elevados de esta clase de anticuerpos podrían evitar que un paciente evolucione a una enfermedad más severa.

ABSTRACT

Dengue fever (DEN) is a disease caused by four serologically and genetically related viruses; denominated DENV 1-4, belong to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. The viral disease is transmitted by female mosquitoes of the genus *Aedes* that inhabit tropical and subtropical areas of the world; currently, there is no licensed vaccine or specific treatment.

DENV is a virus of single-stranded RNA and positive polarity, consists of a genome of approximately 11 kb, containing a single open reading frame that encodes three structural proteins: capsid (C), pre-membrane / membrane (prM/M), and the envelope glycoprotein (E) and seven non-structural proteins (NS) (Rice et al., 1985). The envelope glycoprotein E is an important determinant for cell tropism and is the main target of neutralizing antibodies. It has three structural and functionally different domains; domain I is a central β -barrel and has an N-glycosylation site at position 153, domain II is an elongated dimerization region that contains the highly conserved fusion peptide and possesses an N-glycosylation at position 67, specific for Dengue virus, and DIII is a module similar to C-terminal immunoglobulin (Ig) (Modis *et al.*, 2003), which is important for binding to the cellular receptor.

In Mexico, the number of cases of dengue in 2016 was 1,793, of which 477 were serious cases (OPS 2017). Most patients infected with dengue recover after a self-limiting clinical illness, but a small proportion progresses to a serious disease, characterized mainly by plasma leakage with or without hemorrhage, this being the main cause of hospitalization and death among children and adults (WHO 2009). Recovery from infection by a serotype provides lifelong immunity against that particular serotype. However, cross-immunity to the other serotypes after recovery is only partial and temporary, but subsequent infections by other serotypes may increase the risk of developing severe dengue.

That is why in this work we have presented for the first time a descriptive epidemiological analysis where the levels of the antibodies directed against the different domains of the dengue virus envelope protein were evaluated, to determine if there was any association with the clinic of the disease. Noting that patients with acute infection have higher levels of IgM and IgG class antibodies directed against I-II domains. In addition, the significant difference between the IgG class response and the clinic presented was clearly higher in patients who presented dengue without warning signs compared to patients with severe dengue, suggesting that the high presence of this class of antibody could prevent a patient from evolving to a more severe disease.

1. INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad infecciosa sistémica, de etiología viral, transmitida por mosquitos del género *Aedes*. Sus manifestaciones clínicas son variables, desde infección asintomática, cuadro febril indiferenciado o hasta las formas graves, clasificadas como dengue no grave con signos de alarma y dengue grave con choque y daño orgánico que comprometen la vida del paciente (OMS 2009).

En el continente americano, el dengue se considera la enfermedad reemergente transmitida por vector más importante. Las formas severas de la enfermedad son cada vez más frecuentes, especialmente debido al aumento progresivo en el número de defunciones (OPS 2015). Los primeros brotes de la enfermedad por dengue en la región de las Américas datan de 1635. A partir de su presentación hemorrágica en 1962, el dengue ha sido considerado un problema de salud pública, ya que la mitad de la población mundial vive en áreas endémicas.

1.2 Epidemiología del dengue

El dengue es una infección febril causada por la picadura de mosquitos del género *Aedes* infectados con el virus del Dengue; existen 4 serotipos relacionados antigénicamente (DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4), cuya distribución geográfica entre las regiones tropicales y subtropicales del mundo es variada. Hoy en día las infecciones por dengue virus son una causa seria de morbilidad, debido al aumento en la urbanización, la diseminación global del mosquito vector y la co-circulación de los 4 serotipos (Messina et al, 2014).

El virus Dengue se distribuye en por lo menos 100 países (**Figura 1**) dentro de Asia, África, Caribe y las Américas (OMS 2014), donde anualmente se ha reportado que ocurren de entre 50-100 millones de infecciones; de los cuales 500,000 casos corresponden a dengue grave y 22,000 a defunciones (OMS, 2015). Durante el año 2017 en la Región de las Américas, se registró una reducción del número de casos comparado con años previos, con solo 50,172 casos de dengue, siendo los serotipos 1 y 2 los predominantes (OMS 2017). Se estima que el 40% de la población mundial vive en áreas de riesgo, ya que la prevalencia del virus está determinada por la presencia del mosquito vector y este se distribuye cada vez en

más regiones del mundo. Para México el dengue continúa siendo un problema de salud pública muy importante; su diseminación va de sur a norte, donde la región sureste es la más afectada debido a que sus características geográficas, demográficas y sociales propician la presencia del vector, y por lo tanto de la enfermedad (OPS 2015). Actualmente los cuatro serotipos circulan en algunos estados de la república (SINAVE, 2015), mientras que en otros estados se ha detectado la circulación simultánea de dos o tres serotipos (**Figura 2**).

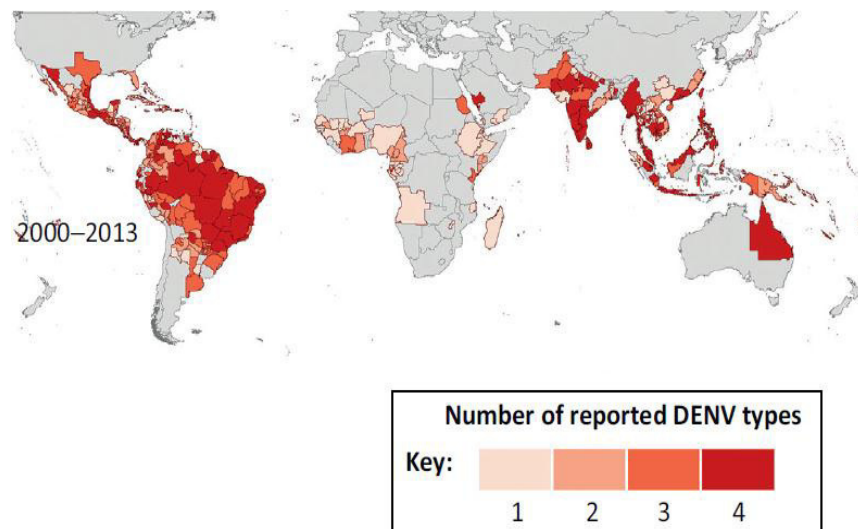


Figura 1. Distribución mundial del virus Dengue, OMS 2014.
Co-circulación de los 4 serotipos del virus Dengue en países localizados en las regiones tropicales y subtropicales.

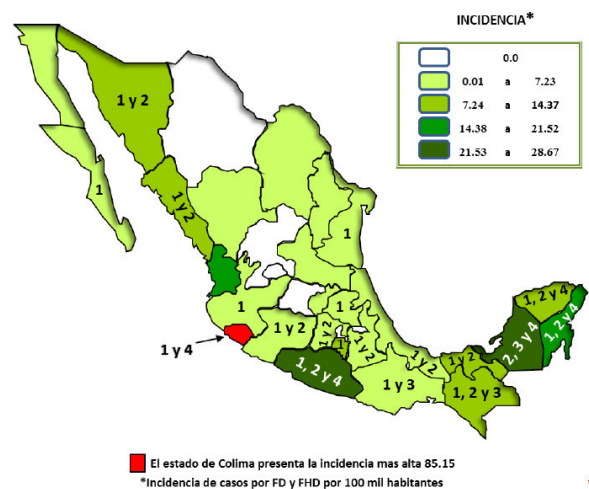


Figura 2. Incidencia y serotipos aislados por entidad federativa, México 2015.
Co-circulación de los cuatro serotipos de dengue y regiones más afectada por ésta infección (SINAVE, 2015).

1.3 Manifestaciones clínicas de la infección

El dengue es una infección aguda y sistémica; la fase aguda de la infección dura aproximadamente una semana y los síntomas suelen ser más leves en niños que en adultos. La enfermedad se manifiesta con un espectro clínico amplio que puede presentarse como una infección asintomática o como una infección con un cuadro febril que puede ir acompañado de exantema, dolor de cabeza, dolor retro-ocular, mialgia, artralgia y en los casos más severos aparecen síntomas como hemorragias, vómitos persistentes, dolor abdominal o torácico, leucopenia, trombocitopenia y niveles elevados de transaminasas hepáticas; éstos últimos son considerados como signos o síntomas de alarma, por lo que el paciente debe ser atendido a la brevedad, ya que su detección y tratamiento oportuno puede prevenir el síndrome de choque por dengue que lo conduzca a la muerte (OMS 2009, CDC 2014).

El dengue grave o fiebre hemorrágica por dengue se distingue por fiebre seguida de trombocitopenia, es decir menos de 100,000 plaquetas/mm³ y puede haber hemorragia cutánea, gingivorragia, epistaxis, sangrado del tubo digestivo, hematuria, sangrado pulmonar, así como sangrado oculto (hemorragia intracraneal, torácica o abdominal) (OMS 2011).

El síndrome de choque por dengue se define por fiebre seguido de datos de fuga capilar, como ascitis, derrame pleural, derrame pericárdico y edema peri-orbitario o de miembros. Debido a la fuga de líquidos al espacio extracelular el paciente puede caer en choque presentando: alteración del estado de conciencia, palidez, diaforesis, piel fría, taquicardia, pulso débil, cianosis y oliguria. Estas manifestaciones pueden ser precedidas por dolor abdominal intenso, datos de irritación peritoneal, vómito persistente y descenso brusco de la temperatura. El choque se manifiesta por lo general en ausencia de viremia, y es detonado fundamentalmente por la respuesta inflamatoria excesiva del huésped (OMS 2011; Murphy y Whitehead 2011).

En México la recurrencia de casos de fiebre por dengue es muy común, por lo tanto para el mejor diagnóstico clínico y manejo de los pacientes con dengue que presenten o no signos de alarma, se utiliza la guía de práctica clínica de la

Secretaría de Salud (SSA, 2008), con la finalidad de establecer un referente nacional para orientar la toma de decisiones clínicas y estandarizar las acciones sobre detección temprana, diagnóstico y tratamiento oportuno.

1.4 Generalidades del virus dengue

El virus Dengue (DENV) pertenece a la familia de *Flavivirus*, característicos por ser virus envueltos con un diámetro de 50 nm. Su genoma consta de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, con un tamaño de aproximadamente 10.7-11 Kb, posee un solo marco de lectura abierto, que codifica para una poliproteína que es procesada por la proteasa del virus codificado y por proteasas de la célula huésped, dando origen a tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (**Figura 3**) (Lidenbach y Rice, 2001).

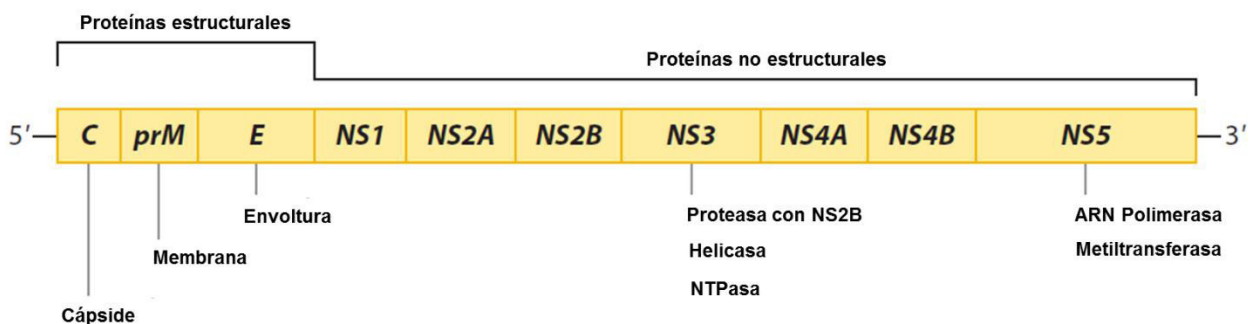


Figura 3. Estructura y componentes del virus Dengue.

El genoma de DENV es de una hebra de RNA con polaridad positiva, con un marco único de lectura de 5' y 3', regiones no traducidas (UTR). Codifica para tres proteínas estructurales; las proteínas de envoltura (E) y membrana (M) y la proteína de la cápside (C) que cubre el genoma viral; y siete no estructurales (NS), que participan en la replicación viral.

La superficie del virus contiene dos proteínas; la glicoproteína E (Envoltura) y la proteína M (Membrana) (Lindenbach y Rice, 2001). El virus ingresa a la célula blanco por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor, siendo la glicoproteína E, quien medía el ingreso a la célula blanco y posteriormente la fusión de la membrana en el endosoma. El proceso de fusión de la membrana se lleva a cabo por el cambio de pH ácido en los endosomas tardíos que promueve un cambio conformacional de la proteína E que conducen a la formación de un trímero que favorece la fusión de la membrana viral con la de su célula huésped para la subsecuente liberación del RNA viral al citoplasma celular, para que el proceso de

replicación, traducción, ensamblado y maduración comience en el lumen del retículo endoplásmico.

Durante la maduración del virus, en los compartimentos ligeramente ácidos de la vía secretora, la partícula inmadura del virus se cubre con estructuras triméricas compuestas por tres heterodímeros prM-E, el precursor de la proteína de membrana (prM) es utilizada como una chaperona para evitar la fusión prematura de membranas; este complejo es escindido por la furina en la red trans-Golgi, que rompe el trímero y permite el reordenamiento de las proteínas E en su conformación dimérica, característica de la partícula madura. (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). Por lo tanto, son las propiedades y características de la estructura de la proteína E, lo que permite estos cambios conformacionales requeridos durante la maduración e infección del virus.

1.4.1 Proteína de envoltura (E)

La proteína de Envoltura está formada por 495 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 53-55 kDa. Ésta proteína contiene 12 cisteínas distribuidas a lo largo de su secuencia, siendo altamente conservadas entre los cuatro serotipos, forman puentes disulfuros y poseen N-glicosilación. La proteína E se distribuye en la superficie de la membrana del virus formando dímeros antiparalelos, cada monómero de la proteína E está organizada por tres dominios (**Figura 4**) estructural y funcionalmente diferentes: el Dominio I (DI); es un dominio discontinuo, se localiza en la parte central de la proteína, se forma en un barril β de ocho cadenas, tiene un sitio de N glicosilación en la posición Asn153 altamente conservado entre los miembros de la familia de flavivirus; el Dominio II (DII); también es un dominio discontinuo. Es el sitio de dimerización que contiene al altamente conservado péptido de fusión. Participa activamente en los reordenamientos estructurales que ocurren a pH ácido, el cual permite un cambio conformacional y exposición del péptido fusogénico y realizar la fusión con membranas endósomales ácidas. Contiene una N glicosilación en la posición Asn67, específica de los Dengue virus. Finalmente, el Dominio III (DIII) se encuentra ubicado en la secuencia C terminal formando una estructura de tipo barril β compuesta por seis cadenas β paralelas, posee una estructura de tipo inmunoglobulina que es expuesta sobre la

superficie del virión, las estructuras semejantes a inmunoglobulinas en las proteínas se asocian comúnmente con las estructuras que tienen una función adhesiva (Bork *et al.*, 1994), por eso se le considera que posee a la región que interacciona con el receptor celular (Modis *et al.*, 2003).

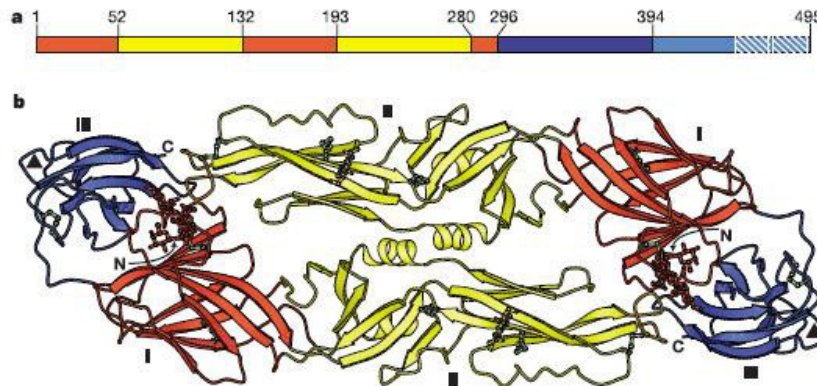


Figura 4. Estructura de la glicoproteína E.

Dominios de la proteína de envoltura, Dominio I está representado en rojo, Dominio II está en amarillo y el dominio III en azul. A) estructura lineal, compuesta de 495 aminoácidos. B) Estructura terciaria del dímero (Modis *et al.*, 2003).

1.5 Ciclo de replicación del DENV

El ciclo del virus dengue inicia cuando ingresa a sus células blanco a través de endocitosis mediada por receptor, ya dentro de las vesículas endosomales, el pH ácido (5.5) induce un cambio conformacional de la proteína de Envoltura, la cual pasa de estructura dimérica a trimérica, permitiendo la exposición del péptido de fusión en la punta del dominio II el cual es insertado en la membrana endosomal; simultáneamente, el dominio DIII se dobla sobre sí mismo, forzando el acercamiento entre la membrana del virus y del endósoma en el mismo extremo, catalizando así la fusión de la membrana, permitiendo la liberación del genoma viral hacia el citoplasma celular para dar inicio a la traducción de la poliproteína y la replicación viral en vesículas de la membrana del retículo endoplásmico, y finalmente generar partículas inmaduras, que a través de su paso en trans-golgi serán procesadas por furin proteasas de las células del huésped para producir las partículas maduras infectivas (**Figura 5**) (Rice *et al.*, 1996; Modis *et al.*, 2003, 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

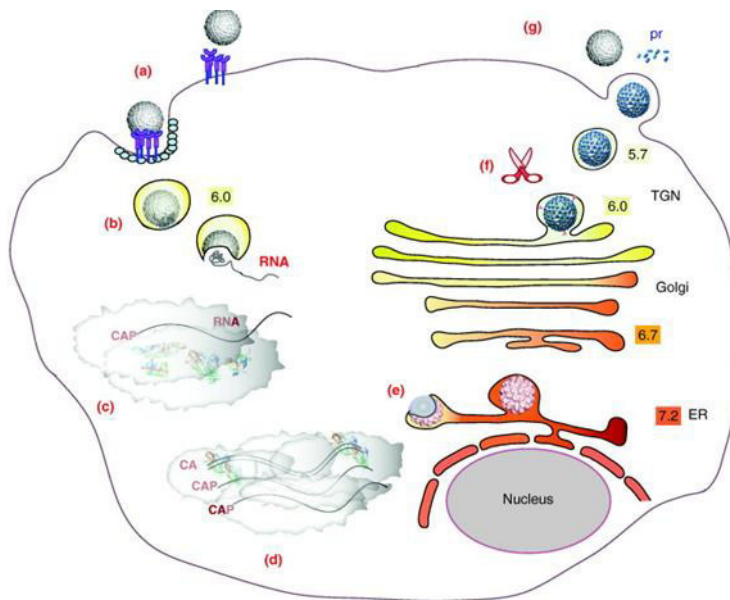


Figura 5. Ciclo de replicación del virus del Dengue.

Representación esquemática del procesamiento viral. La replicación del genoma viral ocurre en el citoplasma de células infectadas, el RNA es traducido para dar origen a una poliproteína que es procesada para generar a tres proteínas estructurales (C, M y E) que forman la estructura del virus y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) que participan en diferentes procesos de la biología del virus, generando nuevas partículas virales que serán liberadas para infectar nuevas células (Mukhopadhyay et al, 2005: <https://www.nature.com/scitable/content/dengue-virus-replication-22401525>).

1.6 Respuesta inmunológica contra el virus dengue

El sistema inmune está dividido en dos grandes grupos; el sistema inmune innato que funciona como una barrera no específica de los epitelios mediante el reconocimiento altamente selectivo de patógenos a través del uso de receptores, y el sistema inmune adaptativo que utiliza a los genes del receptor de antígeno, cuya reorganización crea receptores específicos de antígeno (Rachael Clark y Thomas Kupper, 2005) que durante la sinapsis inmunológica con la célula presentadora de antígeno, generará una serie de señales para la activación y proliferación de las células B (Pavel *et al.*, 2014). Tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa participan en el control de la enfermedad del dengue. Por un lado, la piel participa en el inicio rápido de las defensas innatas del huésped para la infección por DENV, proporcionando al organismo una protección inmediata, mientras que la respuesta inmune adaptativa proporcionará una inmunidad a largo plazo que participará en

resolver la infección y prevenir la reinfección (Cedillo-Barrón *et al.* 2014; Yan-Puc *et al.*, 2018).

La transmisión de DENV se da a través de la picadura de un mosquito infectado con el virus, quien deposita partículas virales en la piel mientras se está alimentando con la sangre del huésped. Se sabe que este virus, tiene gran afinidad por las células del sistema fagocítico mononuclear, como son los macrófagos y las células de Langerhans, ahí el virus se replica para posteriormente diseminarse a ganglios linfáticos regionales y dar lugar a la viremia primaria y más tarde, el virus se propaga a nivel sistémico (Guzmán *et al.*, 2001 y 2008). Aunque estudios recientes han demostrado que células no hematopoyéticas, como las células endoteliales de microvasculatura, los fibroblastos y queratinocitos también son permisivas a la infección por DENV (Bustos-Arriaga *et al.*, 2015).

1.6.1 Respuesta inmune innata

Dentro de la respuesta inmune innata, las células dendríticas (CD) desempeñan un papel crucial contra los organismos infecciosos. Estas células se distribuyen en todos los tejidos corporales, en los sitios estratégicos donde puede ingresar un patógeno. Entre las subpoblaciones de CD, las CD Plasmacitoides (CDP) son las células productoras de IFN- α más potentes para los patógenos virales. La liberación de IFN- α puede mejorar la activación de CD de forma paracrina. Así también las células Natural Killer (NK), participan en la respuesta inmune innata al secretar IFN- γ que activa los macrófagos y a las DC y da forma a la respuesta inmune adaptativa hacia la inmunidad de tipo Th1, siendo también las células NK una fuente importante de citocinas inflamatorias con actividad antiviral (Hilleman 2004; Degli-Esposti *et al.*, 2005).

Las CD mieloides pueden reconocer el DENV a través de CLR y TLR. Dentro de los receptores tipo toll; los TLR's 3 y 7 juegan un papel importante en la detección de infecciones virales. El DENV es detectado por TLR7 que reconoce RNA viral de cadena sencilla, permitiendo activar la vía de señalización de IFN, iniciándose un estado antiviral temprano. Además de los receptores TLR, las helicasas citoplásmicas, también detectan RNA en el citoplasma y son capaces de distinguir

entre RNA viral y él de la propia célula. Éstas helicasas son la proteína 5 asociada a la diferenciación de melanoma (MDA5) y gen 1 inductor de ácido retinoico (RIG-1) que también inducen la producción de IFN- β en respuesta a la infección por el virus del dengue. Los interferones α/β secretados por células infectadas con el virus son señales de alarma para células vecinas, que indican que la infección se está llevando a cabo (Diamond *et al.*, 2000; Hubert *et al.*, 2004).

1.6.2 Respuesta inmune humoral

A medida que la respuesta inmune adaptativa comienza a combatir la infección por dengue, las células plasmáticas producen anticuerpos de tipo IgM e IgG que se liberan en la sangre y en el líquido linfático, donde reconocen y neutralizan específicamente las partículas virales del dengue. Esta respuesta de anticuerpos, va a diferir de acuerdo al estatus inmune de los pacientes, es decir, si se habla de una infección primaria donde no existe una exposición previa hacia el virus, los anticuerpos específicos de clase IgM son el primer isotipo en aparecer y son detectados en mayor cantidad a partir del quinto día de la infección y posteriormente los anticuerpos de clase IgG van incrementando lentamente y son detectados hasta varios meses después de la infección; mientras que en una infección secundaria, los anticuerpos de clase IgG es el isotipo dominante, ya que hay un rápido incremento de anticuerpos de ésta clase y por lo tanto una rápida respuesta hacia la infección (OMS 2009). La respuesta de tipo IgG se observa varias semanas después de la infección y declinan a bajos niveles que persisten por décadas (Koraka *et al.*, 2001). Si el paciente sufre una infección secundaria con el mismo serotipo, la respuesta de anticuerpos será más rápida e intensa, debido a la estimulación de células B de memoria de la infección primaria, mientras que los niveles de anticuerpos de clase IgM son significativamente bajos o incluso indetectables (**Figura 6**) (OMS 2009).

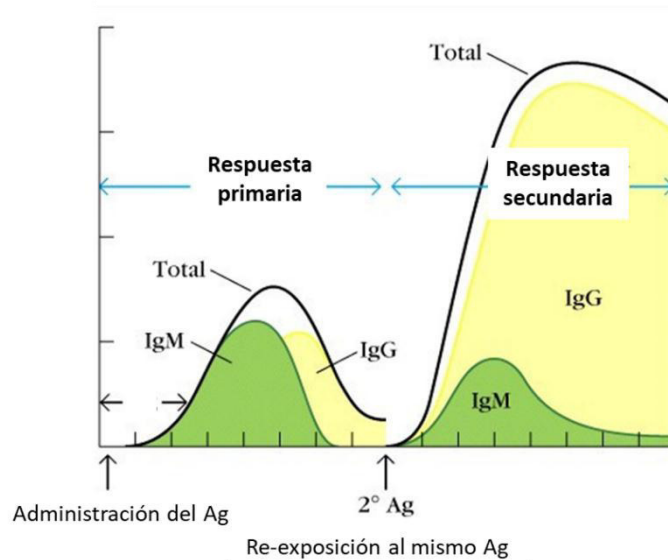


Figura 6. Respuesta de anticuerpos hacia el virus Dengue.

Dependiendo si se trata de una infección primaria o secundaria, será la respuesta y detección de anticuerpos de clase IgM e IgG.

La respuesta de anticuerpos contra el virus Dengue es muy compleja, puesto que la infección con un serotipo en particular no protege contra los demás serotipos, lo que podría condicionar a una forma severa del dengue, debido a la asociación de los anticuerpos pre-existentes generados durante la infección primaria y la reactividad cruzada con el virus heterólogo de la infección secundaria. Pudiendo potenciar la infección; aunado a otros factores de riesgo como son la edad, enfermedades crónicas, sexo y composición genética (Libraty *et al.*, 2009; Anders *et al.*, 2013; Cedillo-Barrón *et al.*, 2014).

Durante el proceso de maduración de la partícula viral se forman complejos heterodiméricos de la glicoproteína de Envoltura con la proteína pre-membrana (Wengler, 1989; Li *et al.*, 2008; Yun Lai *et al.*, 2008). Esta reorganización estructural conduce a la exposición de epítomos sobre las partículas virales que genera una inducción fuerte de anticuerpos, pero debido a la composición y conformación variada de la envoltura del virus, el reconocimiento de los anticuerpos contra las partículas de DENV se hace más complicado. Sin embargo, el análisis de sueros de un grupo de pacientes con dengue, mediante la técnica de Western Blot, ha

identificado a las proteínas blanco para la respuesta de anticuerpos hacia el DENV, permitiendo observar que los sueros policlonales reconocen a las proteínas; NS1, el precursor de Membrana y la proteína de Envoltura (Yun Lai *et al.*, 2008; Rothman *et al.*, 2011), siendo la proteína de Envoltura el principal antígeno responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes tipo específicos y de reacción cruzada.

El ocupar lisados virales para la detección de antígenos por medio de sueros policlonales, hace a los estudios costosos y complicados, por lo que una alternativa útil, es el uso de proteínas recombinantes. Esto ha permitido corroborar que la proteína de Envoltura es reconocida por sueros de fase aguda de pacientes infectados por Dengue virus (Lázaro Olán *et al.*, 2008), lo que facilita evaluar la respuesta específica de anticuerpos hacia diferentes proteínas evitando utilizar el virus completo.

Estudios realizados con anticuerpos monoclonales de ratón han permitido observar que esta respuesta de anticuerpos va dirigida contra los tres dominios que conforman a la proteína de Envoltura (Modis *et. al.*, 2003, 2005), determinando que los anticuerpos contra el EDIII se caracterizan por tener alta capacidad neutralizante y ser serotipo específicos (Wahala *et al.*, 2011), mientras que la respuesta dirigida contra los dominios EDI-EDII es de baja capacidad neutralizante y de reactividad cruzada.

El análisis de sueros inmunes provenientes de individuos con diferentes tiempos de infección a dengue y la obtención de anticuerpos monoclonales de humanos, reveló que proporciones elevadas de anticuerpos débilmente neutralizantes son de reactividad cruzada y capaces de formar grandes agregados de virus-anticuerpos (Beltramello *et al.*, 2010). La protección de esta clase de anticuerpos es probablemente transitoria debido a que los niveles de anticuerpos de reacción cruzada declinan con el tiempo. En contraste, observaron que los anticuerpos potentemente neutralizantes y tipo-específicos, no se generan en gran cantidad pero pueden ser detectados hasta 60 años después de la infección primaria (Halstead *et al.*, 1983; Midgley *et al.*, 2011).

Mediante la caracterización de la respuesta de anticuerpos humanos hacia los diferentes dominios de la proteína de Envoltura, se ha demostrado que la mayoría de los anticuerpos reconocen a la región conservada entre flavivirus que contiene al péptido fusogénico en el Dominio II y por lo tanto éstos anticuerpos pueden neutralizar de manera cruzada a los cuatro serotipos del virus del dengue (Dejnirattisai *et al.*, 2015). Por otro lado, los anticuerpos anti-DIII se unen a epítomos que no son tan accesibles en la estructura del virus, lo que sugiere que se requieren reordenamientos moleculares para exponerlos (Cockburn *et al.*, 2012; Midgley *et al.*, 2012). Hasta el momento los resultados de estudios con anticuerpos humanos, sugieren fuertemente que los anticuerpos que son específicos y neutralizantes del virus representan una pequeña fracción del total de la respuesta de anticuerpos. Esto apoya otros estudios que muestran que los dominios DI y DII constituyen un blanco muy importante de los anticuerpos mientras que solo una pequeña fracción es dirigida de manera específica contra el EDIII.

Como antecedente directo, nuestro grupo de investigación, evaluó la respuesta de anticuerpos de sueros de personas con Dengue Clásico y Hemorrágico provenientes del estado de Veracruz contra la proteína recombinante que incluye a los Dominios I y II. Observándose que los pacientes con dengue clásico tuvieron niveles elevados de anticuerpos en comparación con los pacientes con dengue hemorrágico; lo que sugiere que los Dominios I y II confieren una respuesta de anticuerpos más elevada que podría estar evitando que los pacientes pasen a una forma clínica severa (Montes-Gómez *et al.*, 2017).

1.6.3 Mecanismos de neutralización

Para comprender cómo los anticuerpos contribuyen a la protección, cómo es su actividad neutralizante y qué cantidad de anticuerpos está involucrada en la neutralización, es importante conocer las características estructurales del virión. Se sabe que DENV como otros flavivirus, incorporan 180 copias de la proteína E dispuestas como dímeros antiparalelos (Modis *et al.*, 2003; 2005); esta disposición de las proteínas E, aumenta considerablemente la complejidad de la superficie antigénica del virión ya que los epítomos pueden ser accesibles diferencialmente

para la unión de anticuerpos dependiendo de su posición en la partícula del virus (Kaufmann *et al.*, 2006; 2010; Nybakken *et al.*, 2005).

Estudios de anticuerpos contra otros tipos de virus, como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, el Virus Sincicial respiratorio y el Virus del Ébola, permitieron observar una correlación positiva entre la unión de los anticuerpos al virus y su neutralización (Parren *et al.*, 1998; Flamand *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1993 Parren y Burton 2001). Al determinar la concentración máxima de anticuerpo requerido para lograr el 50% de la neutralización, se observó que este fenómeno está directamente relacionado con la ocupancia de los sitios sobre el virión. Estos resultados, demostraron que el número de anticuerpos necesarios para la neutralización varía considerablemente entre virus, es por ello que para explicar el mecanismo de los anticuerpos neutralizantes se propusieron dos modelos de neutralización, llamadas; golpe único y golpe múltiple.

El modelo de neutralización de "golpe único" postula que la neutralización ocurre cuando el virión está unido por un anticuerpo en un "sitio crítico" que es funcionalmente importante en el virión y es suficiente para interrumpir los pasos necesarios del proceso de entrada del virus (Dulbecco, Vogt y Strickland, 1956; Klasse y Sattentau 2002). Sin embargo no todos los resultados fueron explicados por este modelo de neutralización, debido a que existen diferentes números de sitios críticos. El modelo de "golpe múltiple" postula que la neutralización ocurre cuando el número de anticuerpos unidos a un virión exceden un umbral requerido (**figura 7**). Lo anterior lleva a considerar que la neutralización del DENV como un fenómeno centrado en el número de anticuerpos unidos al virión durante los pasos críticos del proceso de entrada del virus.

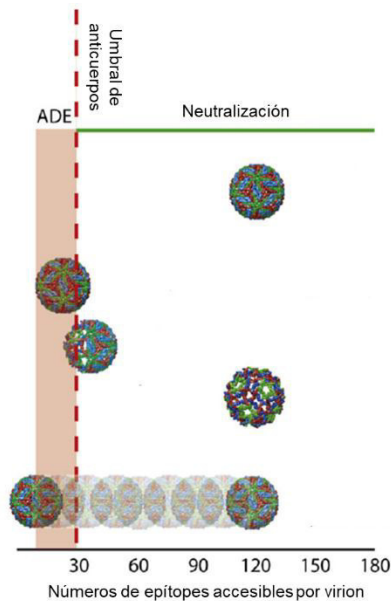


Figura 7. Modelo estequiométrico para la neutralización de flavivirus.

La neutralización de la infección por *flavivirus* es un fenómeno de golpe múltiple que se da cuando un virión está unido por anticuerpos que exceden un umbral estequiométrico requerido y es dependiente de la accesibilidad de epítomos (tomado de Pierson *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que la respuesta inmune protectora contra DENV es mediada por anticuerpos que están dirigidos principalmente contra la proteína de Envoltura. Ésta respuesta se ha caracterizado por ser de reacción cruzada entre los cuatro serotipos del virus.

Se ha considerado que el Dominio III es capaz de inducir la producción de anticuerpos altamente neutralizantes y serotipo-específicos; aunque recientemente, el análisis de anticuerpos monoclonales derivados de humanos, ha demostrado que estos se generan en menor proporción en comparación a los anticuerpos inducidos contra los Dominios I y II. Sugiriendo que estos dos dominios, poseen epítomos inmunodominantes responsables de generar una gran cantidad de anticuerpos que neutralizan al virus.

En las zonas endémicas, hay una exposición frecuente a los diferentes serotipos de DENV, lo que podría aumentar el riesgo de desarrollar las formas graves de la fiebre por dengue.

La caracterización de la respuesta inmune humoral contra los diferentes dominios de la proteína de Envoltura durante infecciones por dengue con diferentes grados de severidad, nos permitirá elucidar la participación de los diferentes anticuerpos en la patogénesis de las formas severas del dengue, lo que podría llevar a mejorar el desarrollo de vacunas.

En este estudio se pretende utilizar proteínas recombinantes en vez del virus completo, lo cual permitirá hacer asociaciones más precisas sobre los epítomos específicos y las formas de la enfermedad.

Es por ello que surge la necesidad de caracterizar la respuesta inmune humoral contra los diferentes dominios de la proteína de Envoltura durante infecciones por dengue con diferentes grados de severidad y tratar de elucidar la participación de los anticuerpos durante la infección. .

3. HIPÓTESIS

Los pacientes con dengue sin signos de alarma poseen una proporción mayor de anticuerpos específicos contra los dominios EDI-DII en comparación al dominio EDIII.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la respuesta inmune humoral contra los Dominios I-II y III de la proteína de Envoltura del virus dengue en sueros de fase aguda de pacientes con dengue severo y no severo; sueros de individuos sanos de zonas endémicas del estado de Yucatán y en sueros de individuos sanos provenientes de zonas no endémicas.

4.1 Objetivos específicos

1. Caracterización clínica de los pacientes con dengue que asistieron a consulta médica en el Hospital General Dr. Agustín O´horan de Mérida, Yucatán.
2. Clonar y expresar como proteína recombinante a los dominios I-II y III de la proteína de Envoltura del Virus Dengue serotipos 2 y 3.

3. Desarrollar una prueba de ELISA con los Antígenos recombinantes para evaluar la respuesta específica de anticuerpos dirigidos contra la proteína E completa y sus dominios I-II y III.

4. Analizar la asociación entre el nivel de anticuerpos hacia cada dominio de la proteína de Envoltura y la forma clínica de la enfermedad.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Población de estudio y aspectos éticos

Este estudio fue aprobado por el Comité del Hospital Dr. Agustín O´Horán de la ciudad de Mérida Yucatán, con el número de registro CEI-0 070-1-14. Todas las muestras de los participantes en este estudio fueron recolectadas en el hospital con previa firma de una carta de consentimiento informado.

Se analizaron sueros de pacientes en estado febril que buscaron atención médica durante los meses de agosto a octubre del año 2015, y que proporcionaron su consentimiento y asentimiento informado. Con esta muestra, se realizó el diagnóstico serológico para dengue. Para ello los pacientes cumplieron los siguientes criterios de inclusión:

- Ser residentes de Yucatán, de cualquier edad.
- Haber presentado en los últimos 7 días, fiebre de inicio agudo ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) durante al menos 2 días continuos acompañado de uno o más de los siguientes síntomas; dolor de cabeza, mialgia, artralgia, exantema, dolor retro orbital.

A los pacientes que cumplieron con los criterios anteriores, se les realizó una historia clínica y un examen físico, así como la recolección de muestras de sangre para realización de biometría hemática y diagnóstico serológico mediante un kit comercial de ELISA (IBL Internacional). A los pacientes con enfermedad grave también se les realizaron pruebas de electrolitos séricos, pruebas de funcionamiento hepático y química sanguínea, según las disposiciones del médico tratante. En la medida de lo posible, se recolectaron también muestras de suero convaleciente (21 y 28 días después de la primera toma de muestra).

Para este estudio, se incluyeron a aquellos pacientes que cumplieron la definición de caso de **dengue confirmado**: pacientes que tenía pruebas confirmatorias de infección por dengue, como PCR positivo y seroconversión. Los demás pacientes que solo seroconvirtieron, se tomaron como **casos probables** y fueron considerados como **casos secundarios probables** a aquellos pacientes con enfermedad febril aguda y una relación IgG/IgM <1.14 en el índice de lecturas del suero agudo. A cada paciente con dengue confirmado o dengue probable, se le clasificó en una de tres categorías de acuerdo a sus signos, síntomas en Dengue sin signos de alarma, Dengue con signos de alarma, o Dengue grave según la Guía de Práctica Clínica de la Secretaría de Salud y los criterios de la Organización Mundial de la Salud.

5.1.1 Pruebas diagnósticas

El número de plaquetas, leucocitos, linfocitos y el hematocrito fueron determinados en el hospital general Dr. Agustín O'Horán, utilizando el analizador Dyn Emerald (ABBOTT).

La presencia de los anticuerpos de clase IgM e IgG específicos contra DENV en los sueros de los individuos participantes en el estudio, se determinaron utilizando kits comerciales de ELISA (IBL Internacional, Hamburgo, Alemania) con número de catálogo RE58681 para IgM y RE58671 para IgG.

Adicionalmente y con previa firma de consentimiento informado se obtuvieron sueros de personas no enfermas del Banco Estatal de la Transfusión Sanguínea, ubicado en el Hospital Dr. Agustín O'Horán y fueron utilizados como controles de zona endémica. Además sueros de personas no expuestas al virus, originarias del estado de Zacatecas fueron obtenidos y utilizados como controles de zona no endémica (**Tabla 1**). Estos dos grupos de sueros controles se analizaron para determinar su reactividad contra las proteínas recombinantes y establecer las diferencias estadísticamente significativas en comparación con los sueros de pacientes con dengue.

Tabla 1. Características de los sueros empleados en el estudio.

ORIGEN	AÑO DE OBTENCIÓN DEL SUERO	CARACTERÍSTICAS DEL SUERO	N ANALIZADA
Mérida (SFA)	2015	Fase aguda	66
Mérida (ZE)	2016	Sanos de banco de sangre/atendidos por fracturas	100
Zacatecas (ZNE)	2016	Sanos de zona no endémica	113

5.2 Células S2 de *Drosophila melanogaster*

Las células S2, son una línea celular semiadherente, derivada de cultivos primarios de embriones de *Drosophila melanogaster* (Schneider, 1972). Estas células fueron crecidas a 28 °C sin CO₂, con medio S2 Schneider suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, cat 16000-044), y 1X de antibiótico-antimicótico (Gibco, cat 15240-062) y L-glutamina (Gibco, cat 25030-081). Estas células se transfectaron a una confluencia del 80%. La transfección fue de forma transitoria y estable para los dominios; EDI-II-DENV3 y EDIII/DENV3. Para ello las células, se suspendieron y se centrifugaron a 700 rpm por 15 minutos, el medio fue decantado y las células fueron suspendidas en medio fresco suplementado, para plaquear 6x10⁶ células/pozo, en placas de 6 pozos (Corning, cat 3526).

5.3 Bacterias

Se utilizó la cepa *DH5α* de *E. coli*, para propagar al vector con las diferentes construcciones. Esta cepa se caracteriza por carecer de las enzimas endonucleasa A (endA) y recA, que evitan que el ADN plasmídico sea degradado. Estas características le proporcionan una alta eficiencia de transformación.

También se usó la cepa *BL-21* para la transformación y expresión de la proteína recombinante del Dominio III del serotipo 2.

5.4 Plásmidos de expresión

5.4.1 pMTBip/V5-His

El vector de expresión pMTBip/V5-His está diseñado para ser utilizado en células S2 de *Drosophila melanogaster*. Es un sistema inducible y gracias a la secuencia señal BiP, la proteína de interés es secretada al sobrenadante celular. La **figura 8** muestra los diferentes elementos que conforman al vector de expresión, como son:

el promotor de metalotionina, que es metal-inducible y sirve para iniciar la expresión de la proteína recombinante en las células S2; la secuencia señal de secreción BiP de *Drosophila*; el sitio múltiple de clonación; el gen de resistencia a ampicilina, para la selección de las bacterias transformadas, y en la parte C-terminal, se encuentran el epítipo V5 y la bandera de poli-histidinas para la detección y purificación de la proteína de interés.

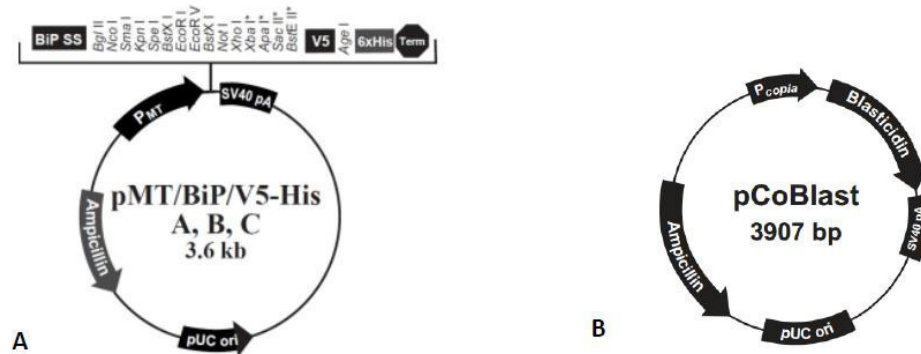


Figura 8. Características y elementos de los plásmidos pMT/BiP/V5-His y pCoBlast.

A) Vector de expresión pMTBiP/V5-His. B) Plásmido de resistencia a la blasticidina.

5.4.2 pROEX HT-b

Es un sistema de expresión procarionte, diseñado para ser utilizado en células *Escherichia coli*. El plásmido consta de un sitio de múltiple clonación, del promotor *lac1^q* que es inducible para la expresión de la secuencia clonada mediante la adición de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Sigma, cat I6758) a concentración de 1mM y del gen de β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina (**Figura 9**). La proteína a expresar, es fusionada a una secuencia de seis histidinas útil para la purificación por afinidad.

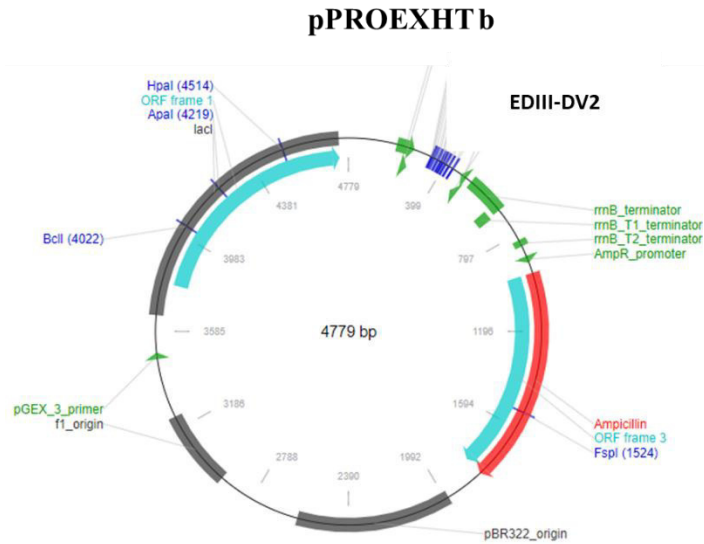


Figura 9. Características y elementos que componen al vector de expresión pROEX HT-b.

5.4.3 Construcción de los plásmidos

Para las construcciones de los plásmidos que codifican para las proteínas EDI-IIDENV3, EDIII/DENV3 y EDIII/DENV2; se realizó una triple digestión con las enzimas *EcoRI-XbaI*, *KpnI-XhoI* para el plásmido pMTBip/V5-His y las enzimas *XbaI-XhoI* para el plásmido PROEX HT-B. Una vez comprobada su digestión fueron ligados a los fragmentos de cada dominio de la proteína E.

5.5 Obtención de los fragmentos para cada dominio de la proteína de Envoltura

Las secuencias codificantes para los dominios I-II y III de la proteína de Envoltura, fueron amplificadas a partir de la secuencia de la proteína de Envoltura del virus dengue serotipo 2 (cepa Nueva Guinea) y serotipo 3 (cepa SLEMAN-73). Estas secuencias fueron clonadas en dos sistemas de expresión; uno eucarionte (*S2 Drosophila melanogaster*) para los dominios I/II y III del serotipo 3 y otro procarionte (pPROEX HT-b) para el dominio III del serotipo 2.

Las secuencias fueron amplificadas por RT-PCR a partir de células de *Aedes albopictus* C6/36 infectadas con DENV2 y DENV3, utilizando oligonucleótidos y condiciones apropiadas para cada construcción (**Tabla 2**). Los productos de PCR

se digirieron con las enzimas de restricción (Biolabs Cat R014); *EcoRI-XbaI* para EDI-IIDENV3; *KpnI-Xho I* para EDIII/DENV3 y *XbaI-XhoI* para EDIII/DENV2 y posteriormente se insertaron en el plásmido correspondiente.

Tabla 2. Características de las construcciones y condiciones de reacción de la PCR para la obtención de los amplicones.

Construcción	Vector de expresión	Primers	Enzimas de restricción	Condiciones	
EDI-DII/DENV3	pMTBip/V5-His	Fw:atgagatgcgt Rw:tcaaggggatgagc	EcoRI-XbaI	94°C	2mins
				94°C	30seg
				50°C	30seg
				68°C	1:30seg
				68°C	7mins
4°C	∞				
EDIII/DENV3	pMTBip/V5-His	Fw:tatgcaatg Rw:gtgggtgcaagct	KpnI-XhoI	94°C	2mins
				94°C	30seg
				55°C	30seg
				68°C	1:30seg
				68°C	7mins
4°C	∞				
EDIII/DENV2	pPROEX HT-B	Fw:tgctctagaatgtactctatgtgcacagga Rw:aagctcgagttattaggcctgcacat	XhoI-XbaI	94°C	2mins
				94°C	30seg
				50°C	30seg
				68°C	1:30seg
				68°C	7mins
4°C	∞				

5.5.1 Ligación del plásmido con el inserto

La ligación se realizó utilizando el ADN purificado del plásmido y del inserto. La reacción de ligación se llevó a un volumen final de 20µL con agua inyectable y se incubó a 22°C durante toda la noche (**Tabla 3**).

Tabla 3. Condiciones de reacción para la ligación del plásmido-amplicón.

Reactivo	Ligasa (+)	Ligasa (-)	A	B	C
Plásmido	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Inserto	-	-	1 µL	1 µL	3 µL
Buffer T4	2 µL	-	2 µL	2 µL	2 µL
Ligasa T4	0.5 µL	-	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Agua	17 µL	19.5 µL	16 µL	15 µL	14 µL
Total	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

5.5.2 Transformación de células competentes de *E.coli DH5α* por choque térmico.

Las bacterias *E.coli DH5α* fueron crecidas en caldo LB (Sigma, cat L3022-1Kg) a 37°C toda la noche. Al día siguiente se hizo un subcultivo para tener a las bacterias en su fase log (densidad óptica de 0.4-0.6). Doscientos cincuenta µL de cultivo fueron centrifugados a 3600 rpm por 15 minutos, se desechó el sobrenadante y la

pastilla fue suspendida en una solución de transformación y almacenaje 2X (TSS; que contiene caldo LB, polietilenglicol, MgCl₂ 40 mM) a un pH de 6.5.

Posteriormente, 10 µLs de las ligaciones mencionadas en la tabla de arriba, fueron mezcladas con las bacterias suspendidas en TSS 2X, y se incubaron por 30 minutos a 4°C, pasado este tiempo, los tubos fueron incubados a 42°C por 45 segundos y se dejaron en hielo por un minuto, luego se adicionaron 500µL de caldo LB a cada tubo y se incubaron por una hora a 37°C en agitación suave. Finalmente, cada tubo fue cultivado en placas con agar LB con ampicilina y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

5.5.3 Digestión de las construcciones con enzimas de restricción.

Una vez que se identificaron a colonias de bacterias con las construcciones, se purificaron 10 mililitros de cada colonia, mediante la técnica de miniprep, y una vez obtenido el DNA, se incubó con las enzimas de restricción; *EcoRI-XbaI*, *KpnI-Xho* y *XbaI-XhoI*, utilizadas para la clonación de EDI-IIDENV3, EDIII/DENV3 y EDIII/DENV2 respectivamente; para garantizar que estas colonias, contenían el fragmento interés. Finalmente las construcciones fueron secuenciadas en ambas direcciones para corroborar que se encontraran en marco de lectura.

5.5.4 Obtención a gran escala del DNA plasmídico de las construcciones

Una vez transformadas las bacterias y confirmado que contenían al fragmento de interés, fueron ocupadas para producir grandes cantidades del ADN plasmídico. Para ello el cultivo de bacterias se llevó a un volumen de 300mL con caldo LB con ampicilina a concentración final de 120µg/mL. Se incubó por 12 horas y posteriormente se extrajo el ADN plasmídico, utilizando el kit para purificación de plásmidos, QIAGEN Plasmid Maxi Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se determinó la concentración del plásmido con cada una de las diferentes construcciones.

5.6 Expresión de las proteínas recombinantes EDI-II/DENV3 y EDIII/DENV3

5.6.1 Transfección transitoria de las células S2 de *Drosophila melanogaster*

Una vez clonado el gen de interés y preparado y purificado el ADN, las células de *Drosophila melanogaster* fueron transfectadas solo con el vector de expresión recombinante para evaluar la expresión transitoria de las proteínas de interés (EDI/II

y EDIII del serotipo 3). Para ello las células S2 fueron crecidas en cultivo, y 3×10^6 células fueron plaqueadas en placas de 6 pozos (Corning, cat 3526). Posteriormente, se les agregó una mezcla de 19 μg del ADN recombinante en combinación con cloruro de calcio 2M (CaCl_2), agua estéril de cultivo de tejidos y HEPES-Buffer de solución salina 2x (50 mM de HEPES, 1.5 mM de Na_2HPO_4 , 280 mM de NaCl, pH 7.1). Veinticuatro horas post-transfección, la solución de fosfato de calcio fue removida y se les agregó medio fresco y fueron incubadas a 28°C durante 48 hrs. Una vez realizada la transfección de las células S2, se les agregó sulfato de cobre (CuSO_4) a una concentración final de 500 μM , para llevar a cabo la inducción de las proteínas recombinantes, y se hizo un seguimiento a los 2, 3, 4 y 5 días post-inducción.

Como controles de la transfección, se utilizó al mismo plásmido pero fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) como control positivo y como control negativo a células S2 sin el vector.

5.6.2 Inmunofluorescencia (IFA) de las células S2 de *Drosophila melanogaster*

Para identificar a las células, que expresaban a los dominios recombinantes I/II y III de DENV-3; las células S2 fueron tratadas con brefeldina 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 6 horas para evitar la secreción de las proteínas al sobrenadante. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS 1x y fijadas con paraformaldehído 4% por 30 minutos, y luego se les adicionó la solución permeabilizadora y se dejó incubar por 60 minutos, para luego adicionarles la solución de bloqueo (suero de chivo en PBS 1x) durante 60 minutos, pasado el tiempo se les agregó el anticuerpo anti-Histidinas a dilución 1:200, por una hora y finalmente se agregó el anticuerpo secundario, anti mouse-cy3 a dilución 1:500, también por 60 mins. Después de ocupar cada reactivo, se hicieron tres lavados con PBS-Triton y todas las incubaciones fueron a temperatura ambiente. El detectar la fluorescencia, nos corroboró, la expresión de las proteínas de interés en las células S2 transfectadas.

5.6.3 Western blot de las células S2 de *Drosophila melanogaster*.

A la par de las inmunofluorescencias, también se determinó la expresión de las proteínas mediante la técnica de western blot. Previamente, se transfirieron células transfectadas a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y se centrifugaron a 700 rpm

por 10 mins, la pastilla fue resuspendida en 50 μ ls de buffer de muestra SDS-PAGE 3x (Tris-HCl M, Ph 6.8; glicerol; β -mercaptoetanol; SDS; azul de bromofenol y agua), y posteriormente, el tubo con la mezcla, fue hervido por 10 minutos y finalmente se cargaron los 50 μ ls de la mezcla a un gel de acrilamida al 15%. Para facilitar la separación y visualización de las proteínas de interés, se utilizó un marcador de peso molecular de proteínas de la marca Thermofisher con número de catálogo 26616. Una vez corrido el gel de acrilamida 15%, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, car 162-0115), para posteriormente, bloquearla con PBS-Tween-20 leche al 5% una hora a temperatura ambiente, se le dieron 3 lavados con PBS-Tween-20 y se le agregó el anticuerpo anti Histidinas a dilución 1:1000 una hora a temperatura ambiente, después de 3 lavados con PBS-Tween-20, se le agregó el anticuerpo secundario anti mouse-HRP a dilución 1:3000 una hora a temperatura ambiente. Para determinar la presencia de la banda correspondiente a la proteína de interés, la membrana de nitrocelulosa fue incubada con la solución reveladora (Thermoscientific, cat 34095) y observada en el equipo de quimioluminiscencia, ChemiDoc.

5.6.4 Transfección estable de las células S2 de *Drosophila melanogaster*

Una vez comprobada la expresión de las proteínas recombinantes EDI-II/DENV3 y EDIII/DENV3; se crearon líneas de células S2 estables, bajo la presión de selección con el antibiótico blasticidina (Invivogen, cat ant-bl-1). Para ello, las células de *Drosophila* fueron transfectadas con el vector de expresión en combinación con el vector de selección, pCoBlast, para generar líneas celulares resistentes a blasticidina. De igual manera se ocupó la técnica de fosfato de calcio, anteriormente descrita, la variante fue que las células también fueron transfectadas con el vector pCoBlast que utiliza el promotor del gen de resistencia a blasticindina (Kimura *et al.*, 1994). La transfección fue realizada en una proporción 2:1 (20 μ g/ml del ADN recombinante y 0.5 μ g/ml del vector de selección pCoBlast). Posteriormente, las células fueron mantenidas en medio selectivo que contiene; blasticidina a 25 μ g/ml, suero fetal bovino 10%, antibiótico-antimicótico y L-glutamina 1X. La blasticidina fue agregada cada 5 días, durante dos semanas; tiempo en el cual, se empezaron a observar las células resistentes.

5.6.5 Cinética y producción masiva de proteínas recombinantes EDI-II/DENV3 y EDIII/DENV3

Una vez observada la expresión de las proteínas recombinantes EDI-II/DENV3 y EDIII/DENV3, y obtenidas las líneas celulares transfectadas establemente; las células fueron crecidas para congelarlas y para obtener un abasto de células para la producción masiva de las proteínas recombinantes.

De manera inicial, se realizó una cinética de expresión para detectar el día de producción máxima de las proteínas de interés. Esto se realizó obteniendo los sobrenadantes de diferentes días post-inducción de las células transfectadas establemente, y posteriormente analizarlos como indica la técnica de western blot, anteriormente mencionada.

Una vez observado el día óptimo para la producción de proteínas; se crecieron 300×10^6 células S2 transfectadas establemente, y fueron agregadas en botellas de cultivo celular (Corning, cat 430699) y mantenidas en suspensión con 300 mL de medio selectivo, al cual se le agregó el sulfato de cobre para inducir la producción de proteína. Una vez llegado el día de expresión máxima, los sobrenadantes de las botellas con las células fueron concentrados utilizando columnas de 10 KDa (Amicon, cat UFC501024) para posteriormente correr los geles preparativos al 15%, cortar la banda en el peso correspondiente a cada proteína y finalmente cuantificar la concentración de las proteínas EDI-II/DENV3 y EDIII/DENV3 para poder realizar los ensayos posteriores.

5.6.6 Obtención de cuerpos de inclusión de bacterias transformadas con la construcción EDIII/DENV2

Para la obtención de la proteína recombinante EDIII del serotipo 2, las bacterias *BL-21* transformadas con la construcción, fueron inducidas con IPTG 1mM, para realizar la cinética de expresión, con la finalidad de ver el día óptimo de obtención de la proteína.

Una vez determinada su expresión mediante la técnica de coomassie y western blot, se llevó a cabo la obtención masiva de proteína. Para esto; un litro de cultivo de bacterias fue crecido hasta llegar a una densidad óptica de 0.6, posteriormente se agregó el IPTG para generar la inducción. Llegado el tiempo post-inducción, para la

máxima obtención de la proteína, el cultivo fue centrifugado a 8000 rpm por 30 minutos a 4°C y la pastilla fue suspendida para incubarla con el buffer de lisis, que contiene; urea 8M, tris HCl 10mM y fosfato ácido de sodio 100mM, a pH 8 durante una hora en agitación a temperatura ambiente, posteriormente el lisado fue centrifugado a 8000 rpm por 30 minutos a 25°C y el sobrenadante se incubo con perlas de agarosa acopladas a níquel durante una hora a temperatura ambiente para finalmente hacer una serie de lavados con el buffer que contiene urea pero a pH de 4.5 y recuperar la proteína recombinante EDIII/DENV2.

5.7 Purificación de las proteínas recombinantes

5.7.1 Geles preparativos

Para facilitar la separación y visualización de las proteínas recombinantes EDI/DII y EDIII del serotipo 3, se utilizó la técnica de electroforesis con geles de poliacrilamida al 15%, para detectar a las proteínas con base a su peso molecular correspondiente a 43 y 26 KDa, respectivamente y posteriormente cortar la banda en el gel, para macerarlo y dejarlo eluir en PBS 1x. Cuarenta y ocho horas después, la proteína fue recuperada del PBS 1x y cuantificada mediante la técnica Bradford (Biorad, cat 500-01).

5.7.2 Columnas con perlas de agarosa acopladas a níquel

Para la purificación de la proteína recombinante DIII/DENV2, el cultivo de bacterias fue centrifugado a 8000 rpm por 30 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y la pastilla fue suspendida para incubarla con el buffer de lisis, que contiene; urea 8M, tris HCl 10mM y fosfato ácido de sodio 100mM, a pH 8 durante una hora en agitación a temperatura ambiente, posteriormente el lisado fue centrifugado a 8000 rpm por 30 minutos a 25°C. Después de la lisis, se utilizó la técnica de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC), que se basa en las interacciones entre un metal inmovilizado en una matriz y las cadenas laterales de aminoácidos específicos. Con este principio, se ocupó a una resina de matriz de afinidad empaquetada en una columna que tiene Ni²⁺ (ion metálico) inmovilizado en una matriz que exhibe la interacción más fuerte con histidina.

El sobrenadante del lisado de bacterias fue incubado con las perlas de agarosa acopladas a níquel (100µl por cada 100 mL de cultivo) (QIAGEN, cat 1018244) y

puesto en agitación por una hora a temperatura ambiente. Finalmente esta mezcla se pasó a la columna de poli-prep para cromatografía (BioRad, cat 731-1550) que por gravedad dejó pasar todo lo no unido a las perlas, mientras que la proteína EDIII/DENV2 quedó inmovilizada en la columna y mediante los lavados con el buffer de elusión a diferentes pH's (6.3; 5.9 y 4.5) se permitió la liberación de los complejos níquel-EDIII. Para corroborar la purificación de la proteína, se tomó una alícuota de 20 μ l y se hirvió durante 10 minutos con buffer Laemmli y se cargó en geles de acrilamida al 15%.

5.8 Respuesta de anticuerpos hacia los antígenos recombinantes EDI-II/DENV3, EDIII/DENV3 y EDIII/DENV2.

Los antígenos fueron diluidos en buffer de carbonatos a concentración de 3 μ g/mL y con esta mezcla placas de 96 pozos fueron sensibilizadas e incubadas toda la noche a 4°C. Las placas fueron lavadas tres veces con buffer de lavado (Tween 20 en PBS), posteriormente fueron bloqueadas con solución de bloqueo (BSA 3% en PBS) por 1 hora a 37°C y 50 μ l de los sueros en dilución 1:100, 1:200 y 1:400 en BSA 2% fueron agregados por triplicado e incubados a 37°C por 1 hora. Los pozos fueron lavados 4 veces. Posteriormente los anticuerpos IgM e IgG anti humano acoplados a HRP (INVITROGEN Cat 627520 y cat abcam ab97225, respectivamente) diluidos en BSA 2% a dilución 1:10,000 y 1:20,000 respectivamente, fueron agregados a cada pozo por 1 hora a 37°C. Las placas fueron lavadas 4 veces antes de agregar el sustrato revelador, O-fenilenediamina dihidroclorido (SIGMA, Cat P9029-50G). La reacción fue detenida al agregar H₂SO₄ 2N (50 μ L /pozo) y la absorbancia fue leída a 450 nm.

5.9 Análisis estadístico

Los valores fueron expresados como densidades ópticas (OD's) para cada grupo de sueros analizados. La significancia estadística fue evaluada por la prueba de Kolmogorov-Smirnov, las pruebas de ANOVA o Kruskal Wallis y t de student fueron utilizadas para determinar asociación entre los diferentes grupos de sueros analizados (ZNE, ZE y SFA) y entre los niveles de anticuerpos contra cada proteína recombinante y la clínica de la infección. Para estos análisis estadísticos, se

utilizaron los programas GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) y SPSS versión 24.

6. RESULTADOS

6.1 Clonación de los dominios I-II de DENV3

El vector de expresión utilizado para ésta construcción (pMTBiP/V5-His) está diseñado para usarse con células S2 de *Drosophila melanogaster*. Consta de un tamaño de 4.3 kb; contiene al promotor inducible de metalotionina que controla a la secuencia de secreción BiP; contiene al epítipo V5 y a la región de polihistidinas útiles para el rastreo y la purificación de la proteína.

La secuencia codificante para el dominio I/II se amplificó por RT-PCR a partir de células infectadas con DENV3. Posteriormente, tanto el amplicón de 888 pb y el plásmido fueron digeridos con las enzimas *EcoRI-XbaI* y ligados para después realizar la transformación de bacterias *Escherichia coli DH5α* con esta construcción. Se verificó que las bacterias incorporaran al vector recombinante; para ello las bacterias fueron sembradas en placas con agar LB y ampicilina, y de seis colonias crecidas, se realizó la extracción del ADN plasmídico para digerirlo con las enzimas *EcoRI-XbaI*, esta digestión permitió observar que solo las colonias tres, cuatro y seis liberaron a un inserto de tamaño de 888 pb (**figura 10A**). Posteriormente, se realizó un análisis de restricción únicamente de la colonia seis, y en la **figura 11A** se observa la liberación del inserto de interés que consta de una secuencia de 888 pb.

6.2 Clonación del dominio III de DENV3

El vector de expresión utilizado para esta construcción también fue el plásmido pMTBiP/V5-His. La secuencia codificante para el dominio III se amplificó por RT-PCR a partir de células infectadas con DENV3. Posteriormente, tanto el amplicón de 592 pb y el plásmido fueron digeridos con las enzimas *KpnI-XhoI* y ligados para después realizar la transformación de bacterias *Escherichia coli DH5α* con esta construcción. Se verificó que las bacterias incorporaran al vector recombinante, para ello las bacterias fueron sembradas en placas con agar LB y ampicilina, y de seis colonias crecidas, se realizó la extracción del ADN plasmídico para digerirlo con las enzimas *KpnI-XhoI*, esta digestión permitió observar que solo las colonias uno, dos,

cuatro y cinco liberaron a un inserto de tamaño de 592 pb (**figura 10B**). Posteriormente, se realizó un análisis de restricción únicamente de la colonia cuatro, y en la **figura 11B** se observa la liberación del inserto de interés que consta de una secuencia de 592 pb.

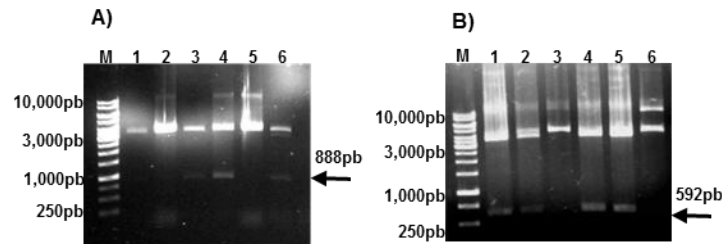


Figura 10. La digestión del DNA plasmídico de las colonias transformadas liberaron los insertos correspondientes a los dominios I-II y III de DENV3.

Los productos de digestión se analizaron en gel de agarosa al 1%. A) El fragmento de tamaño de 888 pb corresponde al EDI-II/DENV3. B) El fragmento de tamaño de 592 pb corresponde a EDIII/DENV3. De izquierda a derecha; el carril 1 marcador de peso molecular, carriles 2 al 6, digestiones del DNA plasmídico de las colonias transformadas.

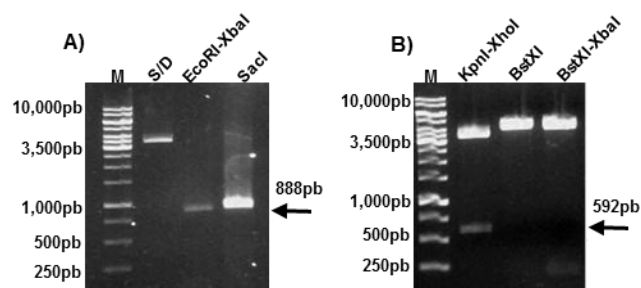


Figura 11. El análisis de restricción de las construcciones liberó a los fragmentos correspondientes a los Dominios I-II y III de la proteína de Envoltura de DENV3.

A) Análisis de restricción para EDI- II/DENV3, en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en el carril 2 el plásmido sin digerir y los carriles 3 y 4 muestran a los productos de digestión DE 888 pb. B) Análisis de restricción para el DIII/DENV3, en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, los carriles 2, 3 y 4 muestran a los productos de digestión de 592 pb.

Una vez realizado el análisis de restricción, para verificar que las secuencias se encontraban en marco de lectura abierto, las construcciones EDI-II/DENV3 y EDIII/DENV3, se mandaron a secuenciar en ambas direcciones (**figura 12**). El resultado de la secuenciación permitió observar a los diferentes elementos que contiene el plásmido pMTBiP/V5-His; como la secuencia de secreción BiP, el epítipo V5, la región de polihistidinas y la secuencia de los dominios (**figuras 12A y 12B**). Con este resultado se permitió continuar con la transfección de las células S2 de *Drosophila melanogaster*.

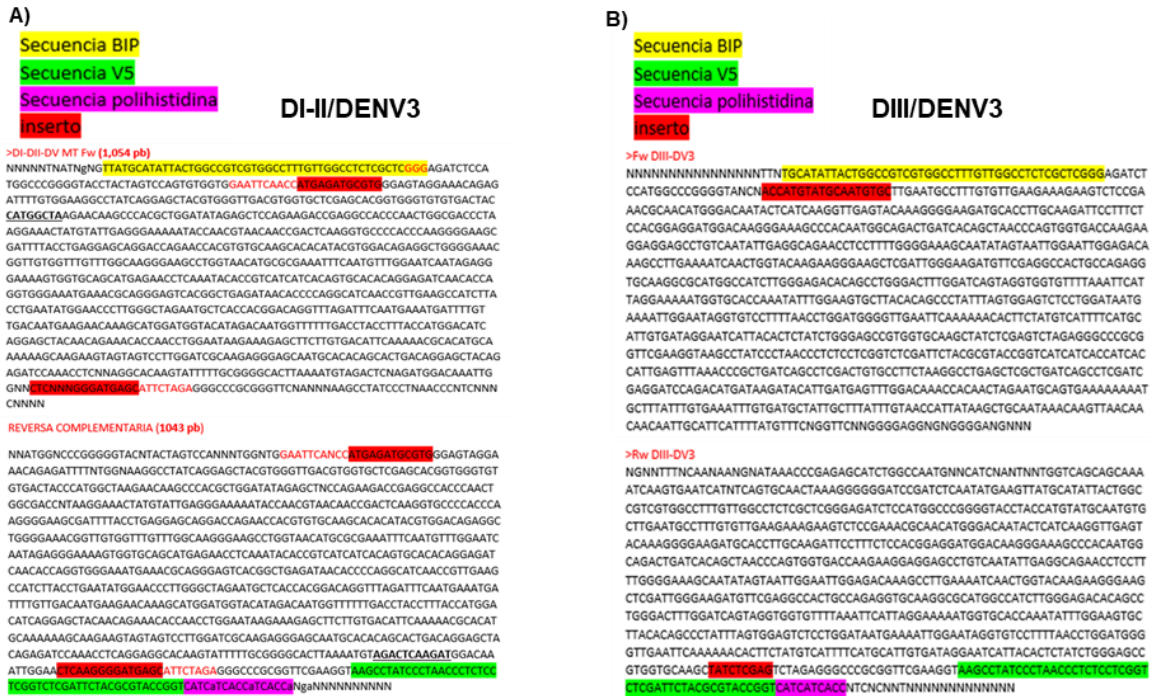


Figura 12. Los fragmentos clonados en el sistema pMT/BIP/V5-His se encuentran en el marco de lectura abierto y corresponden a los Dominios I-II y III de la proteína de Envoltura del DENV3. A) Resultado de la secuenciación para la construcción EDI-II/DENV3. B) Resultado de la secuenciación para la construcción EDIII/DENV3. En amarillo la secuencia de secreción BIP, en verde la secuencia V5, en rosa la secuencia de poli histidinas y en rojo los sitios de restricción que se adicionaron al inserto. Las letras resaltadas en color rojo indican el sitio de inicio de la traducción.

6.3 Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes EDI-II/DENV3 y EDIII/DENV3

La expresión de las proteínas recombinantes se evaluó al transfectar a las células S2 de *Drosophila melanogaster* e inducir las con sulfato de cobre 100 µM y de manera inicial, la expresión fue corroborada por ensayos de inmunofluorescencia (IFA). Debido a que las proteínas recombinantes son secretadas al sobrenadante de las células, se detuvo el tráfico vesicular con un inhibidor del transporte de proteínas (brefeldina 10 µM/mL). Se utilizaron los anticuerpos anti-histidina y anti-mouse CY3. En la **figura 13** se observa en rojo la expresión de las proteínas recombinantes EDI-II/DENV3 (**figura 13A**) y EDIII/DENV3 (**figura 13B**). Este primer acercamiento sobre la expresión, permitió notar la baja expresión para la proteína recombinante EDIII/DENV3 en comparación a la proteína recombinante EDI-II/DENV3.

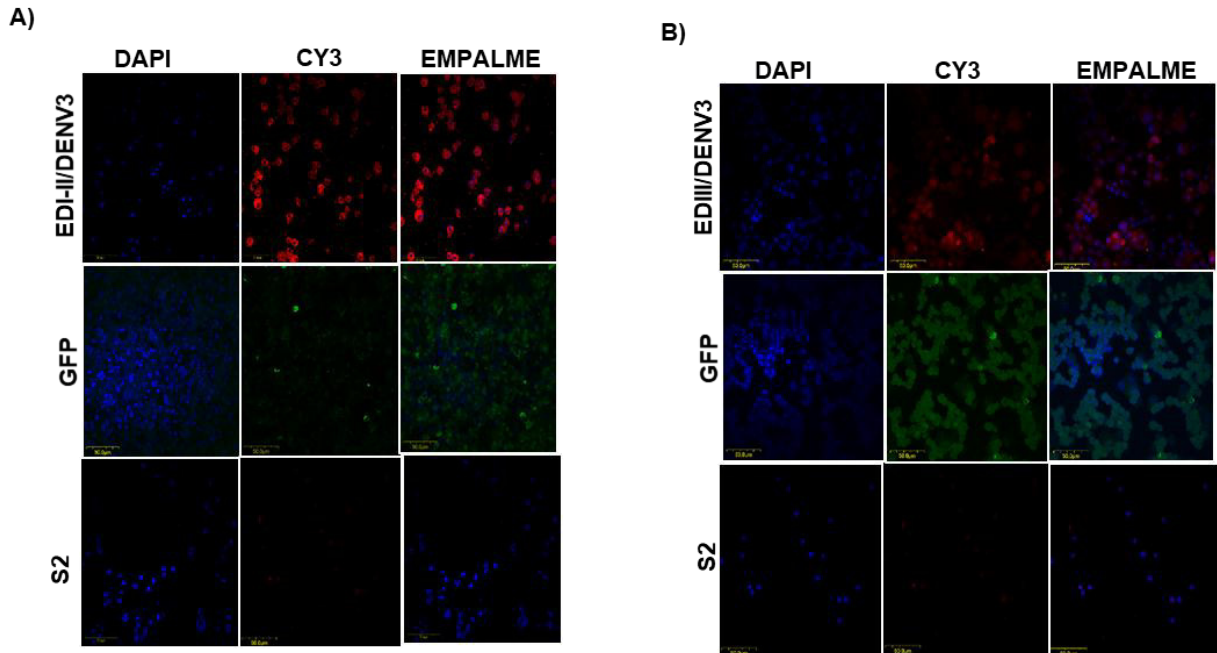


Figura 13. Expresión de los Dominios EDI-II y EDIII/DENV3 en células S2 de *Drosophila*.

A) Expresión de la proteína recombinante EDI-II en el citoplasma de las células S2 transfectadas. B) Expresión de la proteína recombinante EDIII en el citoplasma de las células S2 transfectadas. Las inmunofluorescencias fueron reveladas con los anticuerpos anti-Histidinas y anti-mouse CY3. En rojo se observa a las células que expresan a las proteínas recombinantes, en verde a las células transfectadas con el control de GFP, en azul se observan a los núcleos de las células teñidos con DAPI y de células S2 sin transfectar, como control negativo.

Una vez observada por IFA que si se expresaban las proteínas recombinantes aunque en menor proporción la proteína del EDIII; se optimizó la producción de la proteína a diferentes tiempos y se analizó por ensayos de western blot. Al realizar la cinética de expresión a partir del día cinco hasta el día once post-inducción, se observó que el noveno día pos-transfección fue el óptimo donde se recolectó la mayor cantidad de proteína recombinante EDI-II/DENV3 (**Figura 14A**), mientras que el día once fue el de mayor cantidad de proteína EDIII/DENV3 (**Figura 14B**).

El primer resultado importante que se observó, fue la baja eficiencia de transfección del EDIII/DENV3 de las células S2 de *Drosophila melanogaster*, y con ello el bajo rendimiento de la proteína. Con este resultado se decidió clonar y expresar al Dominio III del serotipo 2 en un sistema bacteriano (pPROEX HTb); considerando que este dominio no presenta de manera natural ninguna glicosilación.

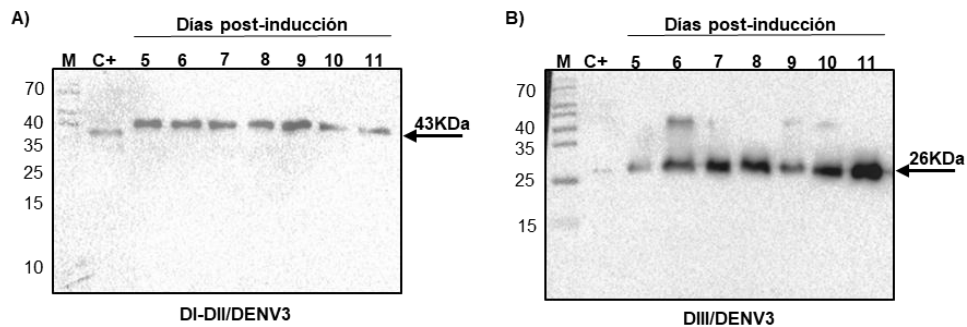


Figura 14. Los días 9 y 11 post-inducción fueron en los que se obtuvieron mayores cantidades de proteínas recombinantes EDI-II y EDIII.

Los sobrenadantes de las células establemente transfectadas se recolectaron del día cinco al once post-inducción, y se analizaron para evaluar la expresión de la proteína, por WB. A) Expresión de la proteína EDI-II/DENV3, correspondiente a un tamaño de 43 kDa. B) Expresión de la proteína EDIII/DENV3, correspondiente a un tamaño de 26 kDa. Como control positivo se empleó a la proteína EDI-II/DENV2 de 37 kDa (Montes-Gómez *et al.*, 2015).

6.4 Clonación del dominio III de DENV2

Para expresar el dominio III se usó un vector de expresión procarionte (pPROEX HTb). Este vector tiene un tamaño de 4750 pb, contiene al promotor inducible de Lac₁; contiene al gen de resistencia a β-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina, y una región de polihistidinas útil para el rastreo y la purificación de la proteína recombinante.

La secuencia codificante para el dominio III se amplificó por RT-PCR a partir de células infectadas con DENV2. Posteriormente, tanto el amplicón de 592 pb y el plásmido fueron digeridos con las enzimas *XbaI-XhoI* y ligados para después realizar la transformación de bacterias *Escherichia coli DH5α* con esta construcción. Se verificó que las bacterias incorporaran al vector recombinante, para ello las bacterias fueron sembradas en placas con agar LB y ampicilina, y de seis colonias crecidas, se realizó la extracción del ADN plasmídico para digerirlo con las enzimas *XbaI-XhoI*, esta digestión permitió observar que solo las colonias dos y cinco liberaron a un inserto de tamaño de 592 pb (**figura 15A**). Posteriormente, se realizó un análisis de restricción únicamente de la colonia cuatro, y en la **figura 15B** se observa la liberación del inserto de interés que consta de una secuencia de 592 pb.

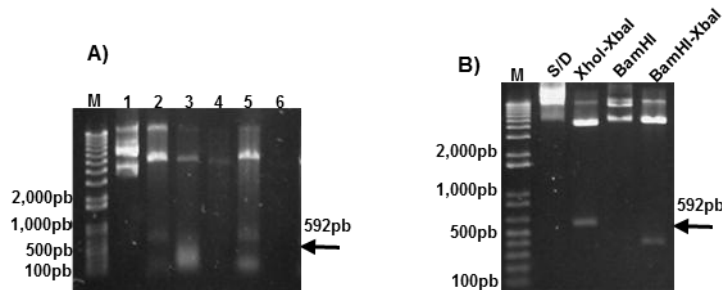


Figura 15. La digestión y el análisis de restricción liberaron el inserto correspondiente al dominio III de DENV2.

Los productos de digestión del DNA plasmídico se analizaron en gel de agarosa al 1%. A) El fragmento de tamaño de 592 pb corresponde al EDIII/DENV2. De izquierda a derecha; el carril 1 marcador de peso molecular, carriles de 2 al 6, digestiones del DNA plasmídico de las 6 colonias transformadas. B) Análisis de restricción para EDIII/DENV2, en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en el carril 2 el plásmido sin digerir y los carriles 3, 4 y 5 muestran a los productos de digestión.

6.4.1 Evaluación de la expresión de la proteína EDIII/DENV2

Para evaluar la expresión de la proteína recombinante EDIII/DENV2, bacterias transformadas con la construcción EDIII/DENV2 fueron lisadas y los lisados fueron analizados en geles de poliacrilamida al 15% mediante ensayos de Western Blot. Los cultivos de estas bacterias fueron inducidos con IPTG. La **figura 16A** muestra la cinética de expresión; observando que a las 3 horas post-inducción se obtuvo la mayor cantidad de proteína. La **figura 16B** muestra a la proteína pura y en el peso molecular esperado, de 26 kDa, tanto en el gel de coomassie al 15% (**Figura 16B panel izquierdo**), como en el Western Blot (**Figura 16B panel derecho**).

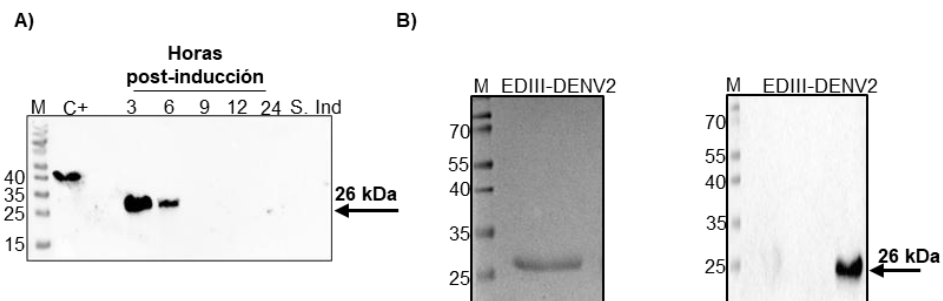


Figura 16. Cinética de expresión y purificación de la proteína EDIII/DENV2.

A) De un total de 300 mL de cultivo de bacterias inducidas con IPTG 1mM, se obtuvieron alícuotas a diferentes tiempos post-inducción; 3, 6, 9, 12 y 24 horas. Posteriormente, los cuerpos de inclusión fueron obtenidos para recuperar a la proteína de interés. B) Purificación de la proteína recombinante EDIII/DENV2, mediante la técnica IMAC. Gel de coomassie al 15% panel izquierdo, y western blot, panel derecho.

6.5 Caracterización de la población de estudio

Para evaluar la respuesta de anticuerpos hacia las proteínas recombinantes obtenidas; se usaron sueros humanos con infección reciente a dengue. Los datos del diagnóstico de dengue y de la población bajo estudio para el año 2015 se obtuvieron de las bases de datos clínicos del Hospital General Dr. Agustín O´Horán, de Mérida Yucatán, en colaboración con la Dra Mussaret Zaidi Jacobson.

De agosto a octubre de 2015, de los pacientes febriles que buscaron atención médica en el hospital, se obtuvieron muestras sanguíneas de fase aguda y convaleciente para la detección de anticuerpos de clase IgM e IgG específicas contra dengue (kits IBL International). Identificándose 14 pacientes con dengue confirmado y 52 pacientes con dengue probable dando un total de 66 casos. La información de la población de estudio fue agrupada de acuerdo al género, edad y días de fiebre; observando que no hubo diferencia entre el número de casos entre hombres y mujeres. El grupo de pacientes de adultos jóvenes fue el que más predominó con la infección, además de observar que la mayoría de pacientes llegó al hospital dentro de los primeros cuatro días de fiebre (**Tabla 4**). Los datos clínicos por paciente, permitieron observar que el 100% presentó fiebre, generalmente acompañada de mialgia, artralgia, cefalea y exantema y de estos pacientes una menor proporción presentaron signos y síntomas de alarma sin ningún deceso (**Tabla 5**).

Tabla 4. Características de los pacientes positivos a Dengue.

VARIABLE	CATEGORÍA	TOTAL (%)
GÉNERO	Masculino	35 (53)
	Femenino	31 (46.9)
EDAD	Niños-Adolescentes (0-19 años)	29 (43.9)
	Adultos jóvenes (20-59 años)	33 (50)
	Adultos mayores (60 y más)	4 (6)
DÍAS DE FIEBRE	1-4 días	47 (71.2)
	5-9 días	19 (28.78)

Tabla 5. Datos clínicos de los pacientes positivos a Dengue. Los signos y síntomas de alarma están resaltados en negritas.

SIGNOS Y SÍNTOMAS	TOTAL (%)
Fiebre	66 (100)
Exantema	45 (68.1)
Cefalea	47 (71.2)
Mialgia	53 (80.3)
Artralgia	50 (75.7)
Petequias	2 (3)
Hemorragia	27 (40.9)
Vómito	3 (4.54)
Dolor abdominal	17 (25.75)
Choque	6 (9)
Alteración orgánica	5 (7.57)
Plaquetas <150,000	22 (33.3)
Defunciones	0 (0)

Por otro lado, para comparar la respuesta de anticuerpos de pacientes con diferente forma clínica de la enfermedad contra las proteínas recombinantes; también se utilizaron sueros de personas no enfermas de la misma región endémica (ZE) y sueros de personas no expuestas al virus (ZNE). Los sueros ZE, son sueros de

adultos del banco de sangre y de niños que acudieron a consulta por caídas y/o fracturas, por lo tanto son sueros de personas sanas en edad adulta e infantil pertenecientes a la misma región de estudio. En cambio los sueros ZNE, son sueros de personas en edad adulta e infantil originarias del estado de Zacatecas, región no endémica a dengue.

6.6 Evaluación de la respuesta de anticuerpos de sueros de pacientes con dengue en fase aguda contra las proteínas recombinantes EDI-II y EDIII de DENV2.

Estudios epidemiológicos de años previos al 2015 en el estado de Yucatán, reportaron una alta prevalencia del serotipo 2 pero no del serotipo 3. Por lo tanto los grupos de sueros arriba descritos fueron utilizados para evaluar la respuesta de anticuerpos hacia las proteínas recombinantes EDIII/DENV2, obtenida en este trabajo; EDI-II/DENV2, obtenida en un estudio previo por Montes-Gómez en el 2015 y la proteína E completa (Depress *et al.*, 2000). La finalidad de utilizar a la proteína E completa fue para hacer una comparación de la respuesta de anticuerpos contra la proteína completa y los dominios que la forman.

Como primer paso, se estandarizó el ensayo de ELISA, empleándose tres diluciones seriadas de los sueros en fase aguda (1:100, 1:200 y 1:400) y diferentes concentraciones de los antígenos (1; 2; 3 y 6 $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 17**). Observándose lecturas de densidades ópticas bajas (**Figura 17A y 17B**), mientras que con 3 y 6 $\mu\text{g/mL}$ las lecturas incrementaron (**Figura 17C y 17D**), es por ello que se decidió utilizar una concentración de 3 $\mu\text{g/mL}$ para los ensayos posteriores. En cuanto a los sueros, se decidió trabajar con las tres diluciones; aunque en los gráficos presentados más adelante, los datos representados son a dilución 1:100, debido a que las lecturas de densidades ópticas en las demás diluciones fueron muy bajas para esta población de estudio.

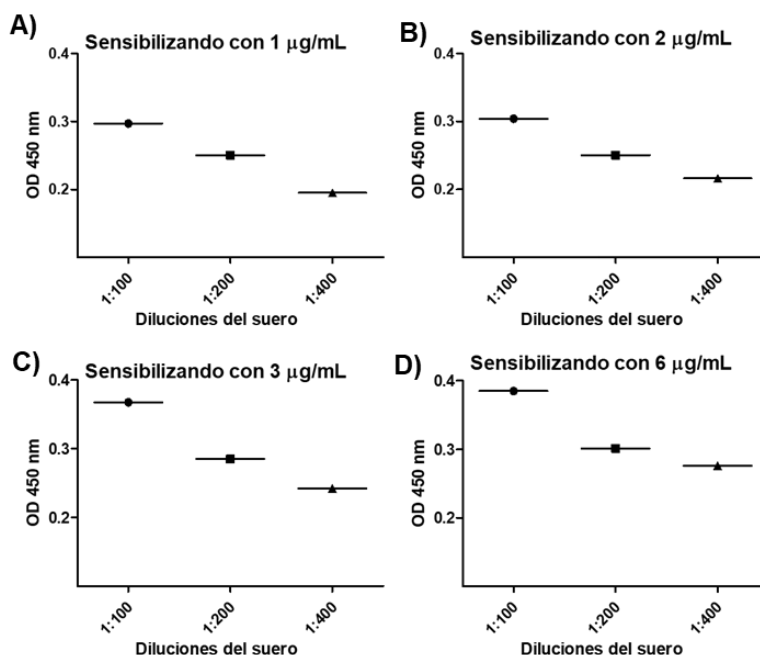


Figura 17. La concentración de 3 µg/mL fue la óptima para analizar la respuesta de anticuerpos en los SFA.

Para evaluar los niveles de anticuerpos de clase IgM e IgG de pacientes con dengue en fase aguda, se probaron tres diluciones seriadas de los sueros y cuatro diferentes concentraciones de los antígenos. A) Diluciones 1:100; 1:200 y 1:400 de los sueros en fase aguda utilizando 1 µg/mL del antígeno. B) Diluciones 1:100; 1:200 y 1:400 de los sueros en fase aguda utilizando 2 µg/mL del antígeno. C) Diluciones 1:100; 1:200 y 1:400 de los sueros en fase aguda utilizando 3 µg/mL del antígeno. D) Diluciones 1:100; 1:200 y 1:400 de los sueros en fase aguda utilizando 6 µg/mL del antígeno. El gráfico es representativo para los anticuerpos de clase IgG durante la estandarización contra la proteína de Envoltura completa del DENV2.

Además de sueros de pacientes con dengue en fase aguda (SFA), también se evaluó la respuesta de sueros de personas residentes de la misma región de estudio, pero que no presentaban la infección (sueros de zona endémica (ZE)), y la respuesta de sueros de personas originarias del estado de Zacatecas, que no tienen la misma exposición hacia el DENV (sueros de zona no endémica (ZNE)).

6.6.1 Evaluación de la respuesta de anticuerpos de clase IgM de sueros de pacientes con dengue en fase aguda

En la **figura 18** se muestran los resultados de la evaluación de la respuesta de anticuerpos de clase IgM contra las proteínas; E completa, EDI-II/DENV2 y EDIII/DENV2. La **figura 18A** muestra una respuesta variable de anticuerpos de clase IgM contra la proteína E completa, siendo mayor para el grupo de SFA en comparación con los sueros de los grupos de ZE y ZNE; la diferencia observada

entre estos 3 grupos fue estadísticamente significativa ($P=0.000$) teniendo una media de 0.55 para el grupo de SFA mayor que la media de los sueros ZNE (0.20). Además dentro del grupo de SFA, puede observarse que hay pacientes con diferentes grados de respuesta hacia este antígeno.

Con respecto a las proteínas recombinantes EDI-II/DENV2 y EDIII/DENV2, también se observó una diferencia significativa entre los 3 grupos de sueros analizados ($P=0.000$ para EDI-II y $P=.042$ para EDIII). Además se puede observar que también existe una respuesta variada entre pacientes (SFA), pero interesantemente existen mayores niveles de anticuerpos dirigidos contra la proteína recombinante EDI-II/DENV2 que contra EDIII/DENV2 (**Figura 18B y 18C**).

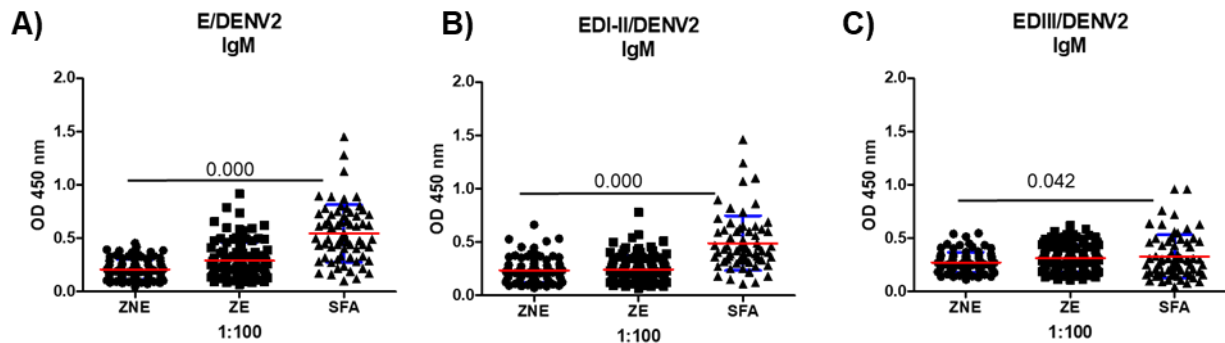


Figura 18. Los niveles de anticuerpos de clase IgM están dirigidos principalmente contra los Dominios I-II/DENV2 en comparación que contra el EDIII/DENV2.

Los niveles de IgM de los sueros en dilución 1:100 fueron comparados entre los grupos SFA, ZE y ZNE, contra la proteína E completa (A); contra los EDI-II (B) y contra el EDIII (C). Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada proteína recombinante; se utilizó IgM anti humana hecho en cabra y acoplada a peroxidasa de rábano picante, como anticuerpo secundario. La prueba estadística utilizada para la comparación de medias entre los grupos fue la ANOVA. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los grupos con valores $p < 0.05$ y un 95% de intervalo de confianza. SFA= Sueros de fase aguda; ZE= Sueros de zona endémica; ZNE= Sueros de zona no endémica.

6.6.2 Evaluación de la respuesta de anticuerpos de clase IgG de sueros de pacientes con dengue en fase aguda

Por otro lado la respuesta de anticuerpos de memoria hacia las tres proteínas recombinantes nos indica que la mayoría de pacientes ha cursado previamente por una infección con el DENV, al observar una diferencia significativa entre las respuestas de los sueros ZE en comparación con los SFA. Sin embargo esta diferencia estadísticamente significativa fue más para los niveles de anticuerpos de

clase IgG en SFA contra las proteínas E completa ($P=0.000$) y EDI-II ($P=0.000$) (**Figura 19A y 19B**) pero no contra EDIII ($P=0.039$) (**Figura 19C**), sugiriendo que los Dominios I-II contiene epítomos inmunodominantes que generan una gran cantidad de anticuerpos de memoria, similar a lo observado con la proteína completa (**Figura 19A**).

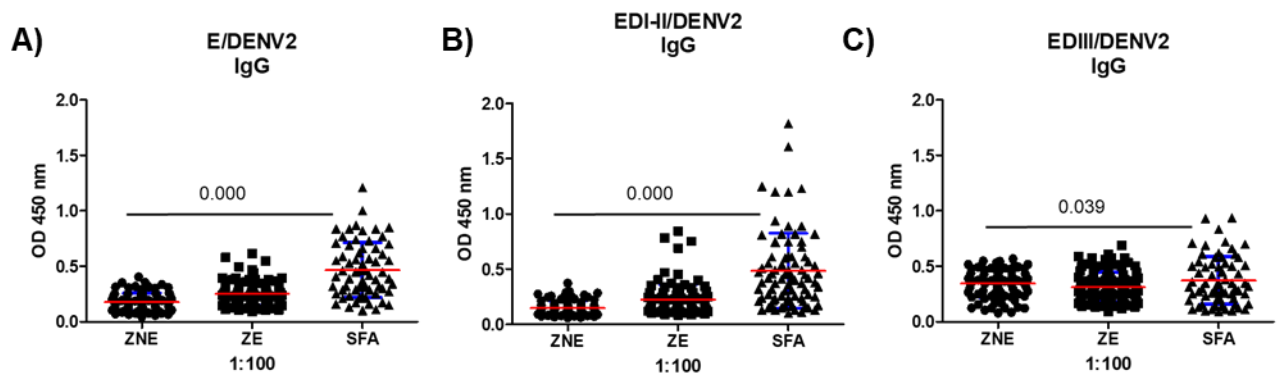


Figura 19. Los niveles de anticuerpos de clase IgG están dirigidos principalmente contra los Dominios I-II/DENV2 en comparación que contra el EDIII/DENV2.

Los niveles de IgG de los sueros en dilución 1:100 fueron comparados entre los grupos SFA, ZE y ZNE, contra la proteína E completa (A); contra los EDI-II (B) y contra el EDIII (C). Las placas de ELISA fueron recubiertas con 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada proteína recombinante; se usó IgG anti humana hecho en cabra y acoplada a peroxidasa de rábano picante, como anticuerpo secundario. La prueba estadística utilizada para la comparación de medias entre los grupos fue la ANOVA, los asteriscos representan datos significativos con valores $p < 0.05$ y un 95% de intervalo de confianza. SFA= Sueros de fase aguda; ZE= Sueros de zona endémica; ZNE= Sueros de zona no endémica.

Estos resultados muestran que un mayor número de sueros de pacientes con dengue en fase aguda reconocen con mayor intensidad a los dominios I-II en comparación a los sueros controles; además de observar que esta respuesta es muy heterogénea en el grupo de individuos que cursan con la infección.

6.3 Comparación de la respuesta de anticuerpos contra las proteínas recombinantes EDI-II/DENV2 y EDIII/DENV2.

Debido a las diferencias observadas entre los niveles de anticuerpos de clase IgM e IgG de los sueros de pacientes en fase aguda contra los Dominios EDI-DII/DENV2 y EDIII/DENV2, se realizó un análisis comparativo para determinar si esta diferencia era estadísticamente significativa.

Las **figuras 20A y 20B** muestran la respuesta de anticuerpos de clase IgM entre los dominios I-II/DENV2 y III/DENV2, observando una diferencia significativa ($P=0.000$) siendo esta mayor contra EDI-II/DENV2, lo que sugiere que la IgM de pacientes con dengue es inducida principalmente contra los Dominios I-II de la proteína de Envoltura.

Adicionalmente, el análisis comparativo de los anticuerpos de clase IgG (**Figura 20C y 20D**), corroboró que la diferencia observada contra los dominios I-II fue significativa ($P=0.017$), lo que sugiere que los EDI-II/DENV2 inducen una fuerte respuesta de anticuerpos de memoria cuando una persona es picada por un mosquito infectado con DENV.

Las **figuras 20B y 20D** permiten observar el comportamiento de cada suero hacia cada uno de los antígeno analizados, respaldando que los anticuerpos de memoria en la mayoría de pacientes reconocen preferentemente a los Dominios I-II (**Figura 20D**).

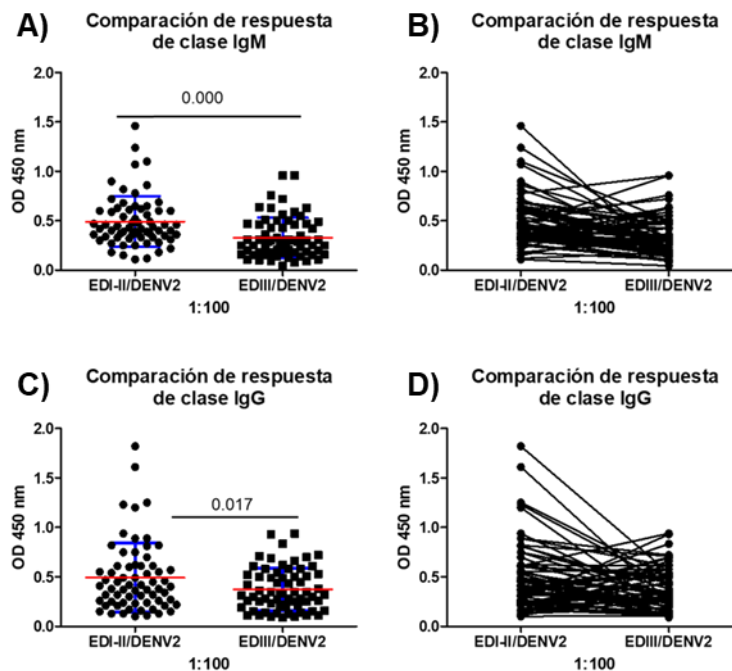


Figura 20. Los niveles de anticuerpos tanto de clase IgM como IgG están dirigidos principalmente contra los Dominios I-II/DENV2 en comparación que contra el EDIII/DENV2. Las gráficas A y C, muestran la comparación de la respuesta de anticuerpos de clase IgM e IgG de los sueros como grupo, contra las proteínas recombinantes EDI-II/DENV2 y EDIII/DENV2.

Las gráficas B y D, muestran la comparación entre las respuestas de anticuerpos de clase IgM e IgG de los sueros de manera individual, contra las proteínas recombinantes EDI-II/DENV2 y EDIII/DENV2. La prueba estadística utilizada para las comparaciones de medias fue la t pareada, los asteriscos representan datos significativos con valores $p < 0.05$ y un 95% de intervalo de confianza.

6.4 Comparación de la respuesta de anticuerpos contra las proteínas recombinantes EDI-II/DENV2 y EDIII/DENV2 y la clínica de la enfermedad.

El dengue severo es un importante problema de salud pública para la región de las Américas; se piensa que existen factores de riesgo que predisponen al paciente para presentarlo. Los factores de riesgo dependen de la cepa y el serotipo del virus infectante, la edad, la predisposición genética y el estado inmunológico del paciente.

Como un esfuerzo para entender un poco más la fisiopatología de la enfermedad, en este estudio se analizó la participación de los anticuerpos en las diferentes formas clínicas del dengue.

Para determinar si existía una diferencia significativa entre el nivel de anticuerpos y la clínica de la enfermedad, los pacientes fueron agrupados de acuerdo al diagnóstico clínico basado en la guía de la OMS 2009 y la guía de la práctica clínica de secretaría de salud de México 2008, es decir, fueron clasificados con base a si estos presentaron dengue con o sin signos de alarma o un dengue severo.

Los cuadros clínicos se diagnosticaron de acuerdo a los signos y síntomas que presentaban los pacientes durante los primeros tres a siete días de la infección. De los 66 pacientes positivos a dengue: 43 presentaron dengue sin signos de alarma; 14 tuvieron signos de alarma y 9 presentaron dengue severo.

6.4.1 Comparación de la respuesta de anticuerpos de clase IgM contra las proteínas recombinantes EDI-II/DENV2 y EDIII/DENV2 y la clínica de la enfermedad

Este análisis permitió observar los diferentes niveles de anticuerpos de clase IgM entre los distintos grupos de pacientes en comparación con los sueros de los grupos de no enfermos (ZNE y ZE). Para la proteína recombinante EDI-II/DENV2 se encontró diferencia estadísticamente significativa únicamente entre los grupos de sueros controles y los distintos grupos de pacientes ($P=0.000$), pero no entre los pacientes con diferente clínica de la enfermedad. Lo que sugiere que esta clase de anticuerpo no estaría participando en evitar la severidad clínica (**Figura 21A**). El

análisis de esta misma clase de anticuerpo pero para la proteína recombinante EDIII/DENV2 también mostró una diferencia significativa de $P=0.046$, pero únicamente en el grupo de los pacientes con dengue severo, sin embargo, debido al bajo número de pacientes en este grupo y que únicamente los anticuerpos del suero de tres pacientes se desplazan más que la media de este grupo, no podemos tener datos conclusivos de que esta clase de anticuerpos dirigidos contra el EDIII estaría participando en la severidad (**Figura 21B**).

6.4.2 Comparación de la respuesta de anticuerpos de clase IgG contra las proteínas recombinantes EDI-II/DENV2 y EDIII/DENV2 y la clínica de la enfermedad

Por otro lado, el análisis de comparación de la respuesta de anticuerpos de memoria contra la proteína recombinante EDI-II/DENV2, encontró diferencia significativa entre los grupos de sueros controles negativos y los sueros con diferente clínica de la enfermedad; así también esta diferencia significativa está entre los sueros de pacientes sin signos de alarma, con signos de alarma y casos severos ($P=0.000$). El valor de la media para los niveles de anticuerpos en los casos de dengue sin signos de alarma fue de 0.55 en comparación de la media de los casos severos que fue de 0.37, sugiriendo que los anticuerpos de memoria dirigidos contra los dominios I-II están presentes en mayores niveles en los pacientes sin signos de alarma (**Figura 21C**). Para el caso del análisis de comparación de la respuesta de esta clase de anticuerpos contra la proteína recombinante EDIII/DENV2, únicamente se detectó diferencia significativa entre el grupo de sueros sin signos de alarma y los sueros de los pacientes con signos de alarma ($P= 0.004$), pero no entre los demás grupos de sueros (**Figura 21D**), por lo tanto podría sugerirse que los anticuerpos dirigidos contra este dominio no estarían implicados en la severidad de la infección.

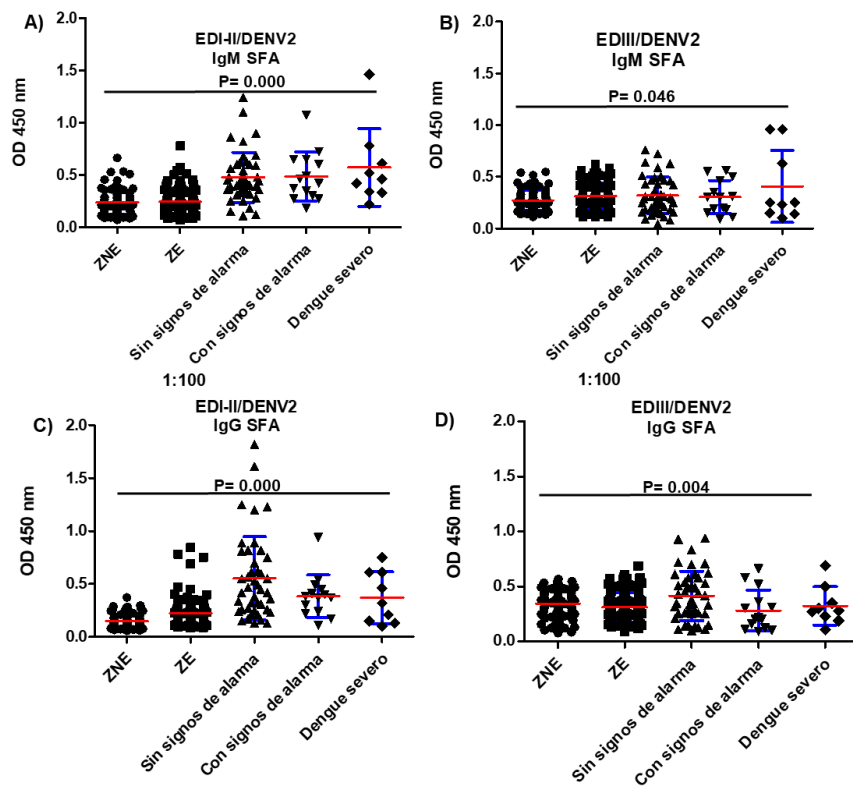


Figura 21. Comparación entre el nivel de anticuerpos contra los dominios I-II/DENV2 y III/DENV2 de la proteína de Envoltura y la clínica de la infección.

Los sueros de los pacientes en fase aguda fueron agrupados con base a la clínica presentada de acuerdo a la clasificación de la OMS 2009. A) Nivel de anticuerpos de clase IgM contra la proteína recombinante EDI-II/DENV2. B) Nivel de anticuerpos de clase IgM contra la proteína recombinante EDIII/DENV2. C) Nivel de anticuerpos de clase IgG contra la proteína recombinante EDI-II/DENV2. D) Nivel de anticuerpos de clase IgG contra la proteína recombinante EDIII/DENV2. La prueba estadística utilizada para las comparaciones de medias fue la ANOVA, los asteriscos representan datos significativos con valores $p < 0.05$ y un 95% de intervalo de confianza.

7. DISCUSIÓN

En diversos trabajos se ha demostrado que la proteína de Envoltura del virus dengue tiene una participación importante durante los eventos de entrada y fusión con la célula blanco, además de ser la proteína estructural más expuesta e inmunogénica del virus, siendo el blanco principal de anticuerpos neutralizantes (Lidenbach *et al.*, 2001; Modis *et al.*, 2003 y 2004). Debido a su posición sobre el virión los tres dominios que la conforman contienen epítomos con diferente accesibilidad para la unión a anticuerpos. Se sabe que el dominio III contienen predominantemente epítomos que evocan anticuerpos específicos (Gromowski *et al.*, 2008, 2010; Matsui *et al.*, 2009), mientras que el Dominio II contiene epítomos que evocan una respuesta de anticuerpos de reactividad cruzada (Roehrig *et al.*, 1998; Wayne y Chang 2004; Chih-Yun *et al.*, 2008). En general, la respuesta inmune generada por una infección primaria es esencial para la resolución de una infección por dengue, sin embargo estudios epidemiológicos han asociado a casos de dengue severo con infecciones secundarias (Green y Rothman 2006) lo que llevo a sugerir a la teoría del facilitamiento mediado por anticuerpos como una explicación a esta fisiopatología. Esta teoría sugiere que el facilitamiento ocurre en una infección secundaria con un serotipo heterólogo a la infección primaria, donde los anticuerpos específicos a dengue generados por la infección primaria no neutralizan al virus de la infección secundaria ocasionada por un serotipo diferente al primero, por lo que el complejo virus-anticuerpo se une a receptores Fc γ ayudando al virus a infectar a más células generando un aumento en la replicación del virus y un mayor riesgo de dengue severo (Haslthead *et al.*, 2002 y 2003). Sin embargo se ha observado para otros *flavivirus* que el mecanismo de neutralización depende de la cantidad de anticuerpos con alta y baja afinidad, permitiéndoles alcanzar un umbral de neutralización y por lo tanto evitar la infección (Klasse y Sattentau 2002; Olkowski *et al.*, 2013; Corbett *et al.*, 2014; Katzelnick *et al.*, 2016).

Actualmente la relación entre la respuesta inmune humoral y la patogénesis de la infección no ha sido bien establecida; se sabe que la concentración de anticuerpos es un factor importante para combatir al virus (Parren y Burton 2001; Klasse y Sattentau 2002; Wayne y Chang 2004; Dowd y Pierson 2011), pero también se ha

encontrado que ésta juega un papel importante en la patogénesis con dengue severo y se ha propuesto que algunos anticuerpos de memoria con baja afinidad podrían facilitar la infección. La mayor parte de los estudios de facilitamiento están basados en modelos *in vitro*, por ejemplo, en líneas celulares de monocitos, pero al utilizar suero de individuos inmunes a dengue no se observa correlación entre los títulos de facilitamiento y la severidad clínica, sugiriendo que otros factores son los importantes en la patogénesis de una infección por dengue (Laoprasopwattana *et al.*, 2005).

Gran parte de la información obtenida ha sido a través del análisis de anticuerpos monoclonales de ratón, éstos grupos han demostrado que el Dominio III de la proteína de Envoltura, es el responsable de inducir grandes cantidades de anticuerpos con alta capacidad neutralizante (Crill *et al.*, 2001; 2009; Wahala *et al.*, 2011). En contraste a lo observado en humanos, donde los anticuerpos predominantes son los dirigidos hacia los Dominios I y II. Estos anticuerpos se caracterizan por tener una pobre actividad neutralizante y ser de reactividad cruzada entre los cuatro serotipos (Wahala *et al.*, 2009; Crill *et al.*, 2009; Beltramello *et al.*, 2010; De Alwis *et al.*, 2012; Sukupolvi-Petty *et al.*, 2010).

Sin embargo, en la actualidad no existen estudios que establezcan la relación entre las diferentes formas clínicas de pacientes con dengue y la respuesta de anticuerpos contra los diferentes dominios de la proteína de Envoltura. Por ello en este trabajo se propuso elucidar si los pacientes con Dengue sin signos de alarma y los habitantes sanos de una zona endémica poseen una cantidad mayor de anticuerpos dirigidos contra los EDI-DII en comparación con el EDIII. Para ello se clonaron dos regiones de la proteína de Envoltura utilizando un sistema de expresión eucarionte. El sistema de expresión de *Drosophila melanogaster* (S2) ha sido ampliamente utilizado para la expresión de otras glicoproteínas virales ya que favorece la producción de proteínas con modificaciones postraduccionales (Schneider 1972; Zhang *et al.*, 2007; Clements *et al.*, 2010), esto era importante a considerar debido a que los dominios I y II son regiones que poseen a los sitios de N-glicosilación en las posiciones Asn67 y Asn153 importantes para el ensamblaje y

propiedades funcionales como la interacción entre el virus y su receptor (Roehrig 2003), sin embargo al observar la baja producción de proteínas recombinantes en particular para el Dominio III que no posee glicosilaciones, se propuso cambiar al sistema de expresión eucariota a un sistema de expresión procariota. Con este sistema se obtuvieron mayores rendimientos de la proteína en un menor lapso de tiempo y con una elaboración más simple y menos costosa en comparación al sistema de *Drosophila melanogaster* (S2) (Chen 2012).

Las proteínas recombinantes EDI-II y EDIII fueron utilizadas para evaluar la respuesta de anticuerpos de sueros de pacientes de Yucatán; estado que se encuentra ubicado en el sureste mexicano y que es considerado una área hiperendémica para la enfermedad del dengue. Datos epidemiológicos del año 2015, indicaron que los serotipos de Dengue (DENV) que circularon predominantemente en el estado de Yucatán fueron los serotipos 1 y 2 (SINAVE 2015). En contraste, el número de casos reportados con DENV-4 fue muy bajo y nulo para el DENV-3, ya que no existen reportes oficiales de la circulación de este serotipo en la región. Debido a este panorama epidemiológico observado en el estado, en este estudio se evaluó la existencia de una asociación entre el nivel de anticuerpos contra los diferentes Dominios de la proteína de Envoltura del DENV2 y las diferentes formas clínicas de la enfermedad. Para ello se recopiló la información demográfica, clínica y de laboratorio de pacientes pediátricos y en edad adulta con infección por dengue que buscaron y recibieron atención médica en el hospital general Dr. Agustín O´horán de Mérida Yucatán; detectando que la mayoría de pacientes tuvieron una infección leve sin presentar signos de alarma (n=43/66) mientras que una proporción menor presentó dengue con signos de alarma (n=14/66) y dengue severo (n=9/66), corroborando los datos obtenidos por otros grupos, donde indican la baja proporción de casos severos en comparación con los casos no severos en regiones endémicas a dengue (Olkowski *et al.*, 2013; Katzelnick *et al.*, 2016).

Aquí se ha presentado por primera vez un análisis epidemiológico descriptivo en donde se evaluaron semicuantitativamente los niveles de los anticuerpos dirigidos

contra los diferentes dominios de la proteína de Envoltura del virus dengue; con la finalidad de tratar de establecer una asociación con la clínica de la enfermedad.

En este trabajo se utilizaron sueros de pacientes con infección aguda que presentaron diferentes formas clínicas de la enfermedad y se evaluó la respuesta de anticuerpos contra las proteínas recombinantes EDI-II y EDIII de DENV-2; observándose que la respuesta de clase IgM es inducida contra los tres Dominios de la proteína de Envoltura únicamente en el grupo de sueros de pacientes con dengue en fase aguda, dato que corrobora a la infección reciente por dengue (OMS 2009). De igual manera a IgM, la respuesta de IgG contra las proteínas recombinantes fue mayor en los sueros de personas que cursaban con una infección aguda. Esta clase de anticuerpos de memoria también fue observada aunque en niveles bajos para algunos sueros de personas sanas de la misma región endémica, dato que podría sugerir la exposición previa al virus. Así que la pre-existencia de esta clase de anticuerpos en esos dos grupos de sueros (sueros de pacientes y sueros de personas sanas de la misma región) sugiere que la continua exposición al virus dengue propicia una producción constante de anticuerpos de clase IgG. Por lo tanto esta observación podría estar representando el posible panorama de la respuesta de memoria hacia el virus en una región endémica. Interesantemente, esta respuesta incrementada de anticuerpos en la mayoría de pacientes se vio dirigida claramente contra los Dominios I y II y en menor proporción contra el Dominio III, lo que indica que esta región es altamente inmunogénica e induce una respuesta de memoria eficiente, dado que se trata de una región altamente conservada entre los cuatro serotipos de dengue (Midgley *et al.*, 2012; Olkowski *et al.*, 2013; Buddhari *et al.*, 2014; Corbett *et al.*, 2015; Katzelnick *et al.*, 2016; Phu Ly *et al.*, 2018).

Sin embargo se observa una variabilidad tanto en la respuesta de anticuerpos de clase IgM como de clase IgG en las muestras de sueros de pacientes con dengue contra las proteínas EDI-II y EDIII. Esta variabilidad posiblemente sea explicada por la diferencia entre los días en que los sueros fueron obtenidos de los pacientes una vez iniciado los síntomas, esto a su vez conlleva a una respuesta heterogénea de

los anticuerpos; así también estas variaciones pudieran ser debidas a la gran variabilidad del grupo etario ya que se analizaron sueros desde los 0 años de edad hasta los 60 o más, por lo tanto en los pacientes de edad avanzada, las exposiciones a los diferentes *flavirus* podrían ser mayores, en contraste con la población en edad infantil, cuya exposición a Dengue podría ser menor.

Al realizar el análisis comparativo entre la respuesta de anticuerpos de sueros de pacientes con diferente clínica de la infección contra los Dominios recombinantes I-II y III, se detectó que la respuesta de anticuerpos de clase IgM como IgG de los sueros de pacientes con dengue sin signos de alarma fue dirigida principalmente contra los dominios I-II, por lo tanto con estos datos se respalda la idea propuesta por Montes-Gómez en el 2015, quien sugiere que los niveles elevados de anticuerpos dirigidos contra los Dominio I-II de la proteína de Envoltura del DENV2 se unen a esta región y por lo tanto podrían tener una implicación en la protección y evitar que los pacientes progresen a un dengue severo. Estudios con otros virus, como el de la rabia (Flammand *et al.*, 1993), papiloma (Booy *et al.*, 1998), influenza (Taylor *et al.*, 1987) y el virus del oeste del Nilo (Pierson *et al.*, 2007; Mehlhop *et al.*, 2009) han establecido que un número elevado de anticuerpos es requerido para llevar a cabo la neutralización, es decir, que un golpe múltiple con anticuerpos sobre el virión logra un umbral requerido para evitar la infección de la célula blanco (Parren y Burton 2001; Klasse y Sattentau 2002; Dowd y Pierson 2011). Extrapolada esta información a una infección por dengue, el golpe múltiple con anticuerpos sería una probable explicación de que en una región endémica predominen los casos no graves de dengue en comparación con los casos severos.

Adicionalmente se realizó un análisis de asociación para determinar si la respuesta de anticuerpos está o no implicada con la severidad de la enfermedad. Al detectarse diferencia significativa únicamente entre los niveles de anticuerpos de memoria en los pacientes de dengue sin signos de alarma, se sugiere que estos anticuerpos podrían estar implicados en evitar que una infección evolucione a una enfermedad severa. En este trabajo se buscó aportar más información para esclarecer el papel de la inmunidad humoral y entender lo que podría estar sucediendo en regiones

endémicas, donde la población está expuesta continuamente al virus y la cantidad de casos severos es mínima (OPS 2014). En años recientes, diversos estudios realizados con niños y adultos han tratado de explicar la participación de los anticuerpos durante una infección por dengue, pero éstos no han sido conclusivos (Endy *et al.*, 2004; Simmons *et al.* 2007; Reich *et al.*, 2013). En el 2014 Anderson y colaboradores analizaron una cohorte longitudinal de pacientes en Tailandia, encontrando que los niveles de anticuerpos en una infección previa con el DENV, redujeron el riesgo de enfermedad severa, mientras que estudios en Sri Lanka y Perú, encontraron que los anticuerpos heterotípicos preexistentes reducían pero no eliminaban el riesgo de enfermarse (Olkowski *et al.*, 2013; Corbett *et al.*, 2015). No obstante, en esos estudios no determinan la región de la proteína de Envoltura responsable de inducir a estos anticuerpos, es por ello la importancia de este trabajo, donde se han incluido a los diferentes dominios, además de poseer datos clínicos detallados por paciente. Nuestro análisis sugiere que los anticuerpos de reactividad cruzada tienen un papel en reducir el riesgo de pasar a una enfermedad severa, proporcionando puntos de vista de las características de la inmunidad mediada por anticuerpos contra DENV en un área endémica.

Es importante, recalcar que al tratarse de una región endémica, la re exposición al DENV podría ser importante para tener niveles de anticuerpos elevados y que estos permanezcan por un largo tiempo en los individuos, permitiéndoles tener una gran cantidad de anticuerpos que rápidamente puedan controlar la infección (OMS 2009) tal como lo sugiere un estudio de seguimiento de niños con dengue en Nicaragua, donde demuestran que los niveles de anticuerpos neutralizantes declinaron entre las dos semanas o seis meses después de la infección, pero incrementaron a los seis y dieciocho meses, sugiriendo una exposición subsecuente al virus (Puschnik *et al.*, 2013). Esta observación es consistente con la epidemiología de Dengue en Yucatán, donde el serotipo 1 de dengue, ha predominado por muchos años. Por lo tanto, se sugiere que los niveles elevados y la prevalencia de los anticuerpos de clase IgG contra los dominios I y II de DENV2 en los pacientes con dengue sin signos de alarma, favorecen que la infección sea limitada y no se evolucione a una enfermedad severa. Cabe señalar que, en este estudio no se evaluó la respuesta

de anticuerpos contra el virus completo, ya que al ser el DENV un virus de ARN, su estructura puede alterarse con facilidad por los cambios de temperatura (Jetlin *et al.*, 2017), entonces el ocupar a proteínas recombinantes con los dominios de la proteína E por separado, permitió que éstas mantuvieran su estabilidad y fueran útiles para comparar la respuesta de anticuerpos por dominio en los ensayos de ELISA. Aunque la comparación entre la respuesta de anticuerpos contra el virus versus los dominios sería interesante realizar, debido a que pensamos que nuestras proteínas probablemente tienen una estructura diferente a como se encuentran presentes en el virión. Sin embargo, lo interesante es, que pese a la diferencia que pudiera existir, la respuesta de anticuerpos fue mayor contra los dominios I y II, comprobando esta misma observación con otros grupos de investigación (Beltramello *et al.*, 2010; Sukupolvi-Petty *et al.*, 2010; De Alwis *et al.*, 2012; Montes-Gómez *et al.*, 2015).

8. CONCLUSIÓN

Con los resultados obtenidos en este trabajo se proporciona información sobre el papel que podría estar jugando la inmunidad mediada por anticuerpos contra DENV en una población abierta y heterogénea perteneciente a una región endémica. Sugiriéndose que la pre existencia y niveles elevados de anticuerpos de reactividad cruzada en sueros de pacientes con dengue sin signos de alarma está dirigida principalmente contra los Dominios I y II, por lo tanto estos niveles elevados de anticuerpos podrían estar evitando que la infección pase a un dengue severo.

9. PERSPECTIVAS

- Evaluar la capacidad neutralizante de sueros depletados de anticuerpos específicos contra los dominios I/II y dominio III.
- Evaluar la respuesta de anticuerpos contra DENV2
- Evaluar la respuesta de anticuerpos contra los dominios I/II y dominio III de los serotipos 1 y 4.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anders, Katherine L., Nguyet Minh Nguyen, Nguyen Thi Van Thuy, Nguyen Trong Hieu, Hoa L. Nguyen, Nguyen Thi Hong Tham, Phan Thi Thanh Ha, Le Bich Lien, Nguyen Van Vinh Chau, and Cameron P. Simmons. 2013. "A Birth Cohort Study of Viral Infections in Vietnamese Infants and Children: Study Design, Methods and Characteristics of the Cohort." *BMC Public Health* 13 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-937>.
- Anderson, Kathryn B., Robert V. Gibbons, Derek A T Cummings, Ananda Nisalak, Sharone Green, Daniel H. Libraty, Richard G. Jarman, et al. 2014. "A Shorter Time Interval between First and Second Dengue Infections Is Associated with Protection from Clinical Illness in a School-Based Cohort in Thailand." *Journal of Infectious Diseases* 209 (3): 360–68. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit436>.
- Bustos-Arriaga, José, Neida K. Mita-Mendoza, Moises Lopez-Gonzalez, Julio García-Cordero, Francisco J. Juárez-Delgado, Gregory D. Gromowski, René A. Méndez-Cruz, Rick M. Fairhurst, Stephen S. Whitehead, and Leticia Cedillo-Barrón. 2016. "Soluble Mediators Produced by the Crosstalk between Microvascular Endothelial Cells and Dengue-Infected Primary Dermal Fibroblasts Inhibit Dengue Virus Replication and Increase Leukocyte Transmigration." *Immunologic Research* 64 (2): 392–403. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8675-8>.
- Cedillo-Barrón, Leticia, Julio García-Cordero, José Bustos-Arriaga, Moisés León-Juárez, and Benito Gutiérrez-Castañeda. 2014. "Antibody Response to Dengue Virus." *Microbes and Infection* 16 (9): 711–20. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.07.011>.
- Chen, Rachel. 2012. "Bacterial Expression Systems for Recombinant Protein Production: E. Coli and Beyond." *Biotechnology Advances* 30 (5): 1102–7. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.013>.
- Clark, Rachael, and Thomas Kupper. 2005. "Old Meets New: The Interaction between Innate and Adaptive Immunity." *Journal of Investigative Dermatology* 125 (4): 629–37. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23856.x>.
- Corbett, Kizzmekia S., Leah Katzelnick, Hasitha Tissera, Ananda Amerasinghe, Aruna Dharshan De Silva, and Aravinda M. De Silva. 2015. "Preexisting Neutralizing Antibody Responses Distinguish Clinically Inapparent and Apparent Dengue Virus Infections in a Sri Lankan Pediatric Cohort." *Journal of Infectious Diseases* 211 (4): 590–99. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu481>.
- Alwis, R. de, S. A. Smith, N. P. Olivarez, W. B. Messer, J. P. Huynh, W. M. P. B. Wahala, L. J. White, et al. 2012. "Identification of Human Neutralizing Antibodies That Bind to Complex Epitopes on Dengue Virions." *Proceedings of the National*

Academy of Sciences 109 (19): 7439–44.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1200566109>.

Degli-Esposti, Mariapia A., and Mark J. Smyth. 2005. “Close Encounters of Different Kinds: Dendritic Cells and NK Cells Take Centre Stage.” *Nature Reviews Immunology* 5 (2): 112–24. <https://doi.org/10.1038/nri1549>.

Dejnirattisai, Wanwisa, Wiyada Wongwiwat, Sunpetchuda Supasa, Xiaokang Zhang, Xinghong Dai, Alexander Rouvinsky, Amonrat Jumnainsong, et al. 2015. “A New Class of Highly Potent, Broadly Neutralizing Antibodies Isolated from Viremic Patients Infected with Dengue Virus.” *Nature Immunology* 16 (2): 170–77. <https://doi.org/10.1038/ni.3058>.

Diamond, M. S., T. G. Roberts, D. Edgil, B. Lu, J. Ernst, and E. Harris. 2000. “Modulation of Dengue Virus Infection in Human Cells by Alpha, Beta, and Gamma Interferons.” *Journal of Virology* 74 (11): 4957–66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-246X.1971.tb02184.x>.

Diamond, Michael S., and Eva Harris. 2001. “Interferon Inhibits Dengue Virus Infection by Preventing Translation of Viral RNA through a PKR-Independent Mechanism.” *Virology* 289 (2): 297–311. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1114>.

Dirección General de Epidemiología, and Secretaría de Salud. 2015. “Casos de Fiebre Por Dengue y Fiebre Hemorrágica Por Dengue. México 2014-2015 **” 38.

Dowd, Kimberly A, and Theodore C Pierson. 2012. “View” 411 (2): 306–15. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.020.Antibody-mediated>.

Endy, Timothy P., Ananda Nisalak, Supamit Chunsuttitwat, David W. Vaughn, Sharone Green, Francis A. Ennis, Alan L. Rothman, and Daniel H. Libraty. 2004. “Relationship of Preexisting Dengue Virus (DV) Neutralizing Antibody Levels to Viremia and Severity of Disease in a Prospective Cohort Study of DV Infection in Thailand.” *The Journal of Infectious Diseases* 189 (6): 990–1000. <https://doi.org/10.1086/382280>.

Epitopes, Cross-reactive, Wayne D Crill, and Gwong-jen J Chang. 2004. “Localization and Characterization of Flavivirus Envelope Glycoprotein.” *Cell* 78 (24): 13975–86. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.24.13975>.

Gromowski, G. D., N. D. Barrett, and A. D. T. Barrett. 2008. “Characterization of Dengue Virus Complex-Specific Neutralizing Epitopes on Envelope Protein Domain III of Dengue 2 Virus.” *Journal of Virology* 82 (17): 8828–37. <https://doi.org/10.1128/JVI.00606-08>.

- Gromowski, Gregory D., and Alan D T Barrett. 2007. "Characterization of an Antigenic Site That Contains a Dominant, Type-Specific Neutralization Determinant on the Envelope Protein Domain III (ED3) of Dengue 2 Virus." *Virology* 366 (2): 349–60. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.042>.
- Guzman, María G., and Gustavo Kouri. 2003. "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Lessons and Challenges." *Journal of Clinical Virology* 27 (1): 1–13. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(03\)00010-6](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(03)00010-6).
- Guzmán, María G, and Gustavo Kourí. 2002. "Dengue : An Update" 2 (January): 33–42.
- Hilleman, Maurice R. 2004. "Strategies and Mechanisms for Host and Pathogen Survival in Acute and Persistent Viral Infections." *Pnas* 101 (Suppl: 14560–66). <https://doi.org/10.1073/pnas.0404758101>.
- Jetlin, C. P., L. Jani Anbarasi, R. Neeraja, and Modigari Narendra. 2017. "Tries Based RNA Structure Prediction." 2016 IEEE International Conference on Computational Intelligence and Computing Research, ICCIC 2016 1 (1): 2–13. <https://doi.org/10.1109/ICCIC.2016.7919610>.
- Katzelnick, Leah C., Magelda Montoya, Lionel Gresh, Angel Balmaseda, and Eva Harris. 2016. "Neutralizing Antibody Titers against Dengue Virus Correlate with Protection from Symptomatic Infection in a Longitudinal Cohort." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (3): 728–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522136113>.
- Klasse, P. J., and Q. J. Sattentau. 2002. "Occupancy and Mechanism in Antibody-Mediated Neutralization of Animal Viruses." *Journal of General Virology* 83 (9): 2091–2108. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-9-2091>.
- Lai, C.-Y., W.-Y. Tsai, S.-R. Lin, C.-L. Kao, H.-P. Hu, C.-C. King, H.-C. Wu, G.-J. Chang, and W.-K. Wang. 2008. "Antibodies to Envelope Glycoprotein of Dengue Virus during the Natural Course of Infection Are Predominantly Cross-Reactive and Recognize Epitopes Containing Highly Conserved Residues at the Fusion Loop of Domain II." *Journal of Virology* 82 (13): 6631–43. <https://doi.org/10.1128/JVI.00316-08>.
- Lazaro-Olán, L., G. Mellado-Sánchez, J. García-Cordero, A. Escobar-Gutiérrez, L. Santos-Argumedo, B. Gutiérrez-Castañeda, and L. Cedillo-Barrón. 2008. "Analysis of Antibody Response in Human Dengue Patients from the Mexican Coast Using Recombinant Antigens." *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8 (1): 69–80. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0117>.
- Li, Xiao Quan, Li Wen Qiu, Yue Chen, Kun Wen, Jian Piao Cai, Jing Chen, Yu Xian Pan, et al. 2013. "Dengue Virus Envelope Domain III Immunization Elicits

Predominantly Cross-Reactive, Poorly Neutralizing Antibodies Localized to the AB Loop: Implications for Dengue Vaccine Design.” *Journal of General Virology* 94 (PART10): 2191–2201. <https://doi.org/10.1099/vir.0.055178-0>.

Libraty, Daniel H., Luz P. Acosta, Veronica Tallo, Edelwisa Segubre-Mercado, Analisa Bautista, James A. Potts, Richard G. Jarman, et al. 2009. “A Prospective Nested Case-Control Study of Dengue in Infants: Rethinking and Refining the Antibody-Dependent Enhancement Dengue Hemorrhagic Fever Model.” *PLoS Medicine* 6 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000171>.

Ling, Lorraine, and Peter Ling. 2017. “Methods and Paradigms in Education Research,” 397. <https://doi.org/10.1073/pnas.0832193100>.

María G. Guzmán, Gissel García, and Gustavo Kourí. 2008. “Dengue y Fiebre Hemorrágica Del Dengue: Un Problema de Salud Mundial.” *Rev Cubana Med Trop* 60 (1): 5–16. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.

Messina, Jane P., Oliver J. Brady, Thomas W. Scott, Chenting Zou, David M. Pigott, Kirsten A. Duda, Samir Bhatt, et al. 2014. “Global Spread of Dengue Virus Types: Mapping the 70 Year History.” *Trends in Microbiology* 22 (3): 138–46. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.011>.

Modis, Y., S. Ogata, D. Clements, and S. C. Harrison. 2005. “Variable Surface Epitopes in the Crystal Structure of Dengue Virus Type 3 Envelope Glycoprotein.” *Journal of Virology* 79 (2): 1223–31. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.1223-1231.2005>.

Modis, Yorgo, Steven Ogata, David Clements, and Stephen C. Harrison. 2004. “Structure of the Dengue Virus Envelope Protein after Membrane Fusion.” *Nature* 427 (6972): 313–19. <https://doi.org/10.1038/nature02165>.

Modis, Yorgo, Steven Ogata, David Clements, and Stephen C. Harrison. 2004. “Structure of the Dengue Virus Envelope Protein after Membrane Fusion.” *Nature* 427 (6972): 313–19. <https://doi.org/10.1038/nature02165>.

Montes-Gómez, Alfredo Eduardo, Hector Vivanco-Cid, José Bustos-Arriaga, Mussaret Bano Zaidi, Jazmin Garcia-Machorro, Benito Gutierrez-Castañeda, and Leticia Cedillo-Barron. 2017. “Construct and Expression of Recombinant Domains I/II of Dengue Virus- 2 and Its Efficacy to Evaluate Immune Response in Endemic Area: Possible Use in Prognosis.” *Acta Tropica* 171 (December 2016): 233–38. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.006>.

Mukhopadhyay, Suchetana, Richard J. Kuhn, and Michael G. Rossmann. 2005. “A Structural Perspective of the Flavivirus Life Cycle.” *Nature Reviews Microbiology* 3 (1): 13–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>.

- Murphy, Brian R., and Stephen S. Whitehead. 2011. "Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine." *Annual Review of Immunology* 29 (1): 587–619. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101315>.
- Olkowski, Sandra, Brett M. Forshey, Amy C. Morrison, Claudio Rocha, Stalin Vilcarrromero, Eric S. Halsey, Tadeusz J. Kochel, Thomas W. Scott, and Steven T. Stoddard. 2013. "Reduced Risk of Disease during Postsecondary Dengue Virus Infections." *Journal of Infectious Diseases* 208 (6): 1026–33. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit273>.
- Organização Pan-Americana da Saúde. 2015. "Dengue: Guías Para La Atención de Enfermos En La Región de Las Américas." *Organização Pan-Americana Da Saúde* 1: 144. <https://doi.org/NLM:WC680>.
- Pierson, Theodore C., Daved H. Fremont, Richard J. Kuhn, and Michael S. Diamond. 2008. "Structural Insights into the Mechanisms of Antibody-Mediated Neutralization of Flavivirus Infection: Implications for Vaccine Development." *Cell Host and Microbe* 4 (3): 229–38. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.08.004>.
- Pierson, Theodore C., Qing Xu, Steevenson Nelson, Theodore Oliphant, Grant E. Nybakken, Daved H. H. Fremont, and Michael S. Diamond. 2007. "The Stoichiometry of Antibody-Mediated Neutralization and Enhancement of West Nile Virus Infection." *Cell Host and Microbe* 1 (2): 135–45. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.03.002>.
- Reich, Nicholas G., Sourya Shrestha, Aaron A. King, Pejman Rohani, Justin Lessler, Siripen Kalayanarooj, In Kyu Yoon, Robert V. Gibbons, Donald S. Burke, and Derek A.T. Cummings. 2013. "Interactions between Serotypes of Dengue Highlight Epidemiological Impact of Cross-Immunity." *Journal of the Royal Society Interface* 10 (86). <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0414>.
- Roehrig, John T, Katharine E Volpe, Jennifer Squires, Ann R Hunt, Brent S Davis, and Gwong-Jen J Chang. 2004. "Contribution of Disulfide Bridging to Epitope Expression of the Dengue Type 2 Virus Envelope Glycoprotein." *Journal of Virology* 78 (5): 2648–52. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.5.2648>.
- Rothman, Alan L. 2011. "Immunity to Dengue Virus: A Tale of Original Antigenic Sin and Tropical Cytokine Storms." *Nature Reviews Immunology* 11 (8): 532–43. <https://doi.org/10.1038/nri3014>.
- Rothman, Alan L, and Francis A Ennis. 1999. "MINIREVIEW Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever" 6: 1–6.
- Simmons, Cameron P., Tran Nguyen Bich Chau, Tran Thi Thuy, Nguyen Minh Tuan, Dang Minh Hoang, Nguyen Thanh Thien, Le Bich Lien, et al. 2007.

“Maternal Antibody and Viral Factors in the Pathogenesis of Dengue Virus in Infants.” *The Journal of Infectious Diseases* 196 (3): 416–24. <https://doi.org/10.1086/519170>.

Sukupolvi-Petty, S., S. K. Austin, M. Engle, J. D. Brien, K. A. Dowd, K. L. Williams, S. Johnson, et al. 2010. “Structure and Function Analysis of Therapeutic Monoclonal Antibodies against Dengue Virus Type 2.” *Journal of Virology* 84 (18): 9227–39. <https://doi.org/10.1128/JVI.01087-10>.

Sun, Peifang, and Tadeusz J. Kochel. 2013. “The Battle between Infection and Host Immune Responses of Dengue Virus and Its Implication in Dengue Disease Pathogenesis.” *The Scientific World Journal* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/843469>.

Wahala, Wahala M P B, and Aravinda M. de Silva. 2011. “The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection.” *Viruses* 3 (12): 2374–95. <https://doi.org/10.3390/v3122374>.

WHO. 2009. “New Edition 2009.” *Dengue Guidelines* 409 (3): 160. <https://doi.org/WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1>.

Yam-Puc, Juan Carlos, Leticia Cedillo-Barrón, Elsa Maribel Aguilar-Medina, Rosalío Ramos-Payán, Alejandro Escobar-Gutiérrez, and Leopoldo Flores-Romo. 2016. “The Cellular Bases of Antibody Responses during Dengue Virus Infection.” *Frontiers in Immunology* 7 (JUN): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00218>.

11. ANEXOS

Anexo 1. Comparación de los valores de las medias por clase de anticuerpo y por grupo de sueros analizados contra cada proteína recombinante.

GRUPOS	N	Respuesta de clase IgM contra E/DENV2		Respuesta de clase IgM contra EDI-II/DENV2		Respuesta de clase IgM contra EDIII/DENV2	
ZNE	113	.2088437		.2399764		.2730198	
ZE	100		.2891500	.2429467		.3140567	.3140567
SFA	66		.5452980		.4903257		.3290253

GRUPOS	N	Respuesta de clase IgG contra E/DENV2		Respuesta de clase IgG contra EDI-II/DENV2		Respuesta de clase IgG contra EDIII/DENV2	
ZNE	113	.1695442		.1453687		.3100800	
ZE	100		.2509784	.2223567		.3448949	.3448949
SFA	66		.4656667		.4925606		.3730808

La prueba estadística utilizada para la comparación de medias entre los grupos fue la ANOVA, los datos considerados como significativos fueron tomados de acuerdo a $p < 0.05$ y un 95% de intervalo de confianza. SFA= Sueros de fase aguda; ZE= Sueros de zona endémica; ZNE= Sueros de zona no endémica.

Anexo 2. Comparación de los valores de las medias por clase de anticuerpo presente en los sueros de pacientes con dengue en fase aguda.

		Media	N
Par 1	EDI-II IgM	.4909	66
	EDIII IgM	.3291	66

		Media	N
Par 1	EDI-II IgG	.4924	66
	EDIII IgG	.3731	66

La prueba estadística utilizada para las comparaciones de medias fue la t pareada, los datos considerados como significativos fueron tomados de acuerdo a $p < 0.05$ y un 95% de intervalo de confianza.

Anexo 3. Comparación de los valores de las medias por clase de anticuerpo y la presentación clínica de la enfermedad.

GRUPOS (5)	N	Respuesta de clase IgM contra EDI-II/DENV2	
ZE	100	.24294666	
ZNE	113	.23997643	
Sin signos	43		.47538758
Con signos	14		.48434507
Severos	9		.57100000

GRUPOS (5)	N	Respuesta de clase IgM contra EDIII/DENV2	
ZE	100	.31405669	.31405669
ZNE	113	.27301985	
Sin signos	43	.32072872	.32072872
Con signos	14	.30358329	.30358329
Severos	9		.40824078

GRUPOS (5)	N	Respuesta de clase IgG contra EDI-II/DENV2		
ZE	100	.22235671		
ZNE	113	.14536873		
Sin signos	43			.55327902
Con signos	14		.38464279	
Severos	9		.37033333	

GRUPOS (5)	N	Respuesta de clase IgG contra EDIII/DENV2	
ZE	100	.31008004	.31008004
ZNE	113	.34489486	.34489486
Sin signos	43		.41362014
Con signos	14	.28028564	
Severos	9	.32374078	.32374078

La prueba estadística utilizada para la comparación de medias entre los grupos fue la ANOVA, los datos considerados como significativos fueron tomados de acuerdo a $p < 0.05$ y un 95% de intervalo de confianza. ZE= Sueros de zona endémica; ZNE= Sueros de zona no endémica.