



Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Estudio de los anticuerpos de reacción cruzada de
pacientes con Dengue contra ZIKV”**

TESIS

Que presenta
Mayra Remedios Montecillo Aguado

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR

Directora de la Tesis:
Dra. Leticia Cedillo Barrón

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Investigadora Titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV

ASESORES

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Investigador Titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV

Dra. Teresa Estrada García

Investigador Titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV

Dra. Gabriela Mellado Sánchez

Investigador

IPN

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Leticia Cedillo Barrón, por confiar en mí y brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. Agradezco mucho todo el apoyo, consejo y oportunidades que me ha brindado.

Al Dr. Julio García Cordero, muchas gracias por sus consejos, instrucción y apoyo, sin el cual no hubiera podido realizar este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio: Josselin, Paola, Sofía, Alfredo, Giovani, Gourav, Luz, Karen y Verónica, por brindarme su apoyo siempre, no saben cuánto se los agradezco, por las pláticas, por su invaluable compañía y amistad, pero más aún por enseñarme mucho más que ciencia.

A mis amigos de generación gracias por estos años de Maestría donde vivimos momentos buenos y malos dignos de recordar, un placer haber vivido esta etapa a su lado.

La agradezco a CONACYT por otorgarme la beca con el no. 592671 que permitió realizar mis estudios de Maestría en el departamento de Biomedicina Molecular en el CINVESTAV.

DEDICATORIAS

A mis padres, gracias por su incondicional apoyo en cada paso que doy, por guiarme a lo largo de mi educación tanto académica como de vida, por confiar en mí y dejarme trazar mi camino, por enseñarme a no rendirme nunca y que nada es imposible si realmente lo deseas.

A mi hermana Carmen por estar conmigo y apoyarme siempre.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Epidemiología	1
1.2 Transmisión	2
1.3 Manifestaciones clínicas de la infección	2
1.4 Microcefalia y síndrome congénito	3
1.5 Síndrome de Guillain-Barré	5
1.6 Virus Zika	6
1.7 Infección y ciclo de replicación	7
1.8 La glicoproteína de envoltura (E)	9
1.9 Respuesta inmune contra el virus Zika	11
1.9.1 Inmunidad innata	11
1.9.2 Inmunidad celular	12
1.9.3 Inmunidad humoral	14
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos particulares	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1 Muestras de suero y criterios de inclusión y exclusión	22
5.2 Material Biológico	23
5.2.1 ZIKV	23
5.2.2 Bacterias	24
5.2.3 Células C6/36 y Vero	24

5.2.4 Células Schneider's <i>Drosophila</i> (S2)	24
5.2.5 Células K562	25
5.3 Obtención del abasto viral y purificación del virus Zika	25
5.4 Método de titulación del virus dengue por ensayo en placa	26
5.5 Plásmidos	27
5.5.1 pJET1.2	27
5.5.2 pMTBiP/V5-His	28
5.5.3 Plásmido de resistencia a blasticidina pCoBlast	29
5.6 Obtención del plásmido para generar la construcción	29
5.6.1 Obtención de la secuencia de la proteína E2	29
5.6.2 Digestión del plásmido	30
5.6.3 Ligación del plásmido con el inserto	30
5.6.4 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> por choque térmico	31
5.7 Análisis de las bacterias transformadas	31
5.7.1 Extracción de ADN plasmídico	31
5.7.2 Mapeo de restricción de la construcción	32
5.8 Obtención de la construcción a gran escala	32
5.9 Expresión de las proteínas recombinantes en el sistema S2	32
5.9.1 Transfección transitoria de las células S2	32
5.9.2 Obtención de células establemente transfectadas	33
5.9.3 Preparación de las proteínas	34
5.10 Determinación de anticuerpos IgM e IgG contra la proteína rE-ZIKV	34
5.11 Ensayo de ADE	35
5.12 Análisis estadístico	36
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
7. RESULTADOS	37
7.1 Clonación de la secuencia de la proteína E de ZIKV	37
7.2 Expresión de las proteínas recombinantes en el sistema S2	40
7.2.1 Transfección transitoria de las células S2	40
7.2.2 Transfección estable de células S2	41

7.3 Concentración de la proteína recombinante	42
7.4 Evaluación de sueros de pacientes con Dengue y Zika con las proteínas rE-ZIKV y rPrM-E-DENV2, mediante ensayos de ELISA	42
7.5 Ensayo de ADE	46
8. DISCUSIÓN	52
9. CONCLUSIÓN	57
10. PERSPECTIVAS	57
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Países y territorios que muestran la distribución histórica del ZIKV 1947-2017	2
Figura 2	Ciclo de replicación	9
Figura 3	Estructura general de la proteína de envoltura del virus Zika	10
Figura 4	Respuesta de anticuerpos en la infección primaria y secundaria por el virus Zika	15
Figura 5	Infección con Dengue y el facilitamiento dependiente de anticuerpos	17
Figura 6	Características y elementos que componen al vector de clonación pJET1.2	28
Figura 7	Características y elementos de los plásmidos pMT/BiP/V5-His y pCoBlast	28
Figura 8	Digestión de los plásmidos pJET2.1 y pMTBiP/V5-His	38
Figura 9	Digestión del plásmido pMTE-ZV	39
Figura 10	Análisis de la secuencia de la proteína E clonada en el vector de expresión pMT/BiP/V5-His	39
Figura 11	Inmunofluorescencia de células S2 transfectadas con pMTE-ZV	40
Figura 12	Cinética de expresión de la proteína rE-ZIKV	41
Figura 13	Purificación de las proteínas recombinantes	42
Figura 14	Evaluación de la respuesta de reacción cruzada de tipo IgM en sueros de pacientes con Dengue y Zika	44
Figura 15	Evaluación de la respuesta de reacción cruzada de tipo IgG en sueros de pacientes con Dengue y Zika	46
Figura 16	Resultados representativos del ensayo de citometría de flujo para medir el facilitamiento de la infección de ZIKV en células K562	47
Figura 17	Evaluación del facilitamiento de la infección de ZIKV	48
Figura 18	Evaluación del facilitamiento de la infección de DENV	50

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Muestras de sueros	23
Tabla 2 Condiciones para las digestiones con enzimas de restricción	29
Tabla 3 Condiciones para la reacción de ligación	30
Tabla 4 Soluciones para la transfección de las células S2	33
Tabla 5 Análisis de homología de la secuencia de la proteína E	37
Tabla 6 Resultados del facilitamiento de la infección con ZIKV	49
Tabla 7 Resultados del facilitamiento de la infección con DENV	51

ABREVIATURAS

ADE	Facilitamiento mediado por anticuerpos (del inglés antibody-dependent enhancement)
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina de suero bovino
ATCC	Del inglés American Type Culture Collection
CaCl₂	Cloruro de calcio
CuSO₄	Sulfato de cobre
CLEC5A	C-type lectin domain family 5 member a
CMC	Carboximetilcelulosa
DC-SING	DC specific ICAM3 grabbing non-integrin
DI	Dominio I
DII	Dominio II
DIII	Dominio III
DC	Dengue Clásico
DENV	Virus Dengue
DH	Dengue Hemorrágico
E	Proteína de envoltura
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>E. Coli</i>	<i>Eschechia coli.</i>
ELISA	Inmunoensayo absorbente ligado a enzima
FcR	Receptor del fragmento Fc
GFP	Proteína verde fluorescente.
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
IFNβ	Interferon β
IFNγ	Interferon γ
HLA	Antígeno leucocitario humano
HRP	Del inglés Horseradish peroxidase

LB	Medio Luria Bertani
MDA5	Melanoma differentiation associated protein 5
MEM	Medio mínimo esencial
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MgSO₄	Sulfato de magnesio
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MOI	Multiplicidad de infección
NK	Célula asesina natural
NS1	Proteína no estructural 1
NS2A	Proteína no estructural 2a
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
OPD	<i>Ortofenilendiamina</i>
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Buffer de fosfato salino
prM	Proteína de pre-Membrana
pMT	Promotor demetalotioneína
rE-ZIKV	Proteína recombinante de Envoltura del virus Zika
rPrM-E-	Proteína recombinante de pre-membrana/envoltura del virus Dengue
DENV2	serotipo 2
RT-PCR	Del inglés reverse transcription polymerase chain reaction
TIM1	T-cell immunoglobulin an mucin domain 1
TLR	Receptor de tipo Toll.
TNFα	Factor de necrosis tumoral α .
RIG-I	Retinoic acid inducible gene 1
RPMI	Medio Roswell Perk Memorial Institute
S2	Línea celular Schneider 2

SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SGB	Síndrome Guillain-Barré
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
STAT	Activador transcripcional transductor de señales
WNV	Virus del oeste del Nilo
ZE	Zona endémica
ZNE	Zona no endémica
ZIKV	Virus Zika

RESUMEN

El virus Zika (ZIKV) rápidamente se ha dispersado en regiones alrededor del mundo (incluido nuestro país) donde otros Flavivirus, como el virus Dengue (DENV) son endémicos. Esto representa un gran problema dado el alto grado de homología que comparten ambos virus, resultando en reactividad cruzada.

El objetivo de este trabajo fue determinar los títulos de anticuerpos de reacción cruzada de tipo IgM e IgG para las proteínas de envoltura de Zika (rE-ZIKV) y pre-membrana/envoltura de Dengue serotipo 2 (rPrM-E-DENV2) en sueros de pacientes con diferentes grados de la enfermedad de Dengue, así como Zika y su implicación en el facilitamiento de la infección.

La determinación de los títulos de anticuerpos muestra niveles muy similares de IgM en los sueros de pacientes con Dengue tanto para la proteína rPrM-E-DENV2 como para rE-ZIKV, mientras que los sueros de individuos con Zika presentan títulos muy bajos contra la proteína rPrM-E-DENV2 en comparación con rE-ZIKV. Con respecto a los anticuerpos de la clase IgG, en los sueros con DENV se observaron títulos mayores para la proteína rPrM-E-DENV2 y a su vez son similares a los títulos de personas de zona endémica, mientras que con la proteína rE-ZIKV estos títulos descienden casi a la mitad. Estos datos sugieren que la respuesta de reacción cruzada es mayor para los anticuerpos de clase IgM, mientras que los IgG presentan tanto una población inmunodominante para DENV como una subpoblación de reacción cruzada para ZIKV. Por su parte pareciera que el ZIKV evoca una respuesta diferente a la de DENV, pues la mayoría de anticuerpos no reconoce al virus heterólogo.

En cuanto al facilitamiento dependiente de anticuerpos (ADE) se encontró que la mayoría de sueros de Dengue Hemorrágico facilitan la infección de ZIKV, aunque también existen sueros de Dengue Clásico que pueden hacerlo, lo cual sugiere que la cantidad de anticuerpos presentes en el suero repercutirá en el facilitamiento.

ABSTRACT

Zika virus has quickly spread in many regions around the world (including our country), where other Flavivirus, such as Dengue (DENV) are endemic. This represents a big issue given the high homology that is shared among these two viruses, resulting in cross reactivity.

The aim of this study was to determine the cross reacting antibody titers of the classes IgM and IgG for the envelope protein of Zika virus (rE-ZIKV) and premembrane/envelope of Dengue serotype 2 (rPrM-E-DENV2) in sera of infected patients with different forms of Dengue virus, Zika virus and their implication in enhancing the infection.

The determination of the antibody titers shows very similar levels of IgM in the sera from dengue infected patients, for both rPrM-E-DENV2 as well as for rE-ZIKV, meanwhile the sera from Zika virus infected patients show very low titers for rPrM-E-DENV2 in comparison to rE-ZIKV. With respect to the IgG antibodies, DENV2 sera showed higher titers for rPrM-E-DENV2, likewise, they are similar to the healthy controls from the same endemic area, meanwhile, with rE-ZIKV, this titers decreased almost half of the value. This data suggests that the cross reactivity antibody response is higher for IgM antibodies, meanwhile the IgG antibodies represent an immunodominant population for DENV2 sera as well as a subpopulation of cross reactivity for ZIKV. For its part, it seems that ZIKV evokes a different response to DENV, since most of the antibodies do not bind the heterologous virus.

With regard to the antibody dependent enhancement (ADE), we found that most of the sera from Dengue Hemorrhagic Fever patients enhance ZIKV infection, although there are also some Dengue Fever sera that can do it too, which suggests that the amount of antibodies present in the sera will impact in enhancement.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología

El virus Zika (ZIKV) fue aislado por primera vez de un mono *Rhesus* centinela en el bosque de Zika cerca de Entebbe, Uganda en 1947, durante un estudio de transmisión de la fiebre amarilla. El segundo aislamiento se realizó en un grupo de mosquitos *Aedes africanus* en el mismo bosque en 1948 (Dick & Haddock, 1952). Posteriormente la primera caracterización de infección por ZIKV en humanos ocurrió en Nigeria en 1954 (Macnamara, 1954). Y por un largo periodo el ZIKV circuló sin que fuera detectado en las regiones tropicales y subtropicales de países asiáticos y africanos (Althouse et al., 2015). En 2007, se documentó el primer brote de ZIKV fuera de África y Asia en la Isla de Yap, Micronesia con 108 casos confirmados, y posteriormente entre 2013 y 2014, se reportó otro brote en la Polinesia Francesa (8,510 casos clínicos) (Cao-Lormeau et al., 2016), seguido por la dispersión hacia otras islas en Oceanía incluidas Nueva Caledonia y las Islas Cook con 40 casos reportados en cada una (Foy et al., 2011; Iosifidis et al., 2014). En el brote epidémico del ZIKV en Brasil en 2015 se sospecha de entre 440,000 a 1.3 millones de casos de acuerdo al ministro de salud brasileño y rápidamente se dispersó al sur y centro de América, así como el Caribe y otros países (Cugola et al., 2016). En México, el primer caso importado del ZIKV se reportó en octubre de 2015 en el estado de Querétaro (Díaz-Quirón et al., 2016), un mes después los primeros dos casos autóctonos del mismo virus fueron confirmados, uno en el estado de Nuevo León y el otro en Chiapas (Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, 2015). Hasta mayo de 2017 se tenía un reporte de alrededor de 8,174 casos en el país (Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, 2016).

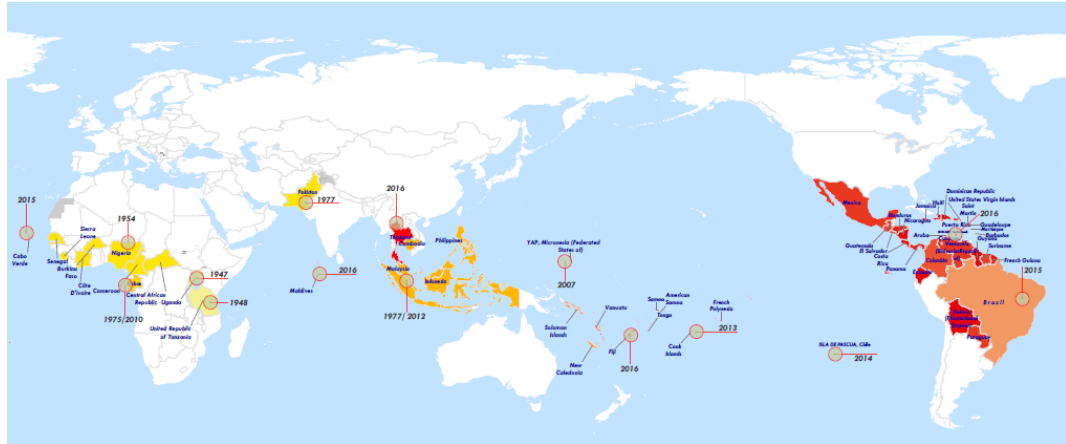


Figura 1. Países y territorios que muestran la distribución histórica del ZIKV 1947-2017.
 (Tomado de OMS, <http://www.who.int/emergencias/zika-virus/timeline/en/>)

1.2 Transmisión

El ZIKV puede transmitirse por diferentes especies de mosquitos hembra del género *Aedes* (*Ae. africanus*, *Ae. furcifer*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. vittatus*, *Ae. dalzielii*, *Ae. hirsutus*, *Ae. metallicus*, *Ae. taylori*, *Ae. aegypti*, *Ae. Unilineatus*), así como las especies *Anopheles coustani*, *Culex perfuscus*, y *Mansonia uniformis*, de los cuales el *Ae. aegypti* transmite también los virus Dengue, Chikungunya y Fiebre amarilla (Dick & Haddow, 1952). Además, existen casos de transmisión perinatal reportados por autoridades brasileñas quienes reportan más de 6,000 casos de microcefalia en recién nacidos y 120 muertes debido a malformaciones congénitas (Besnard et al., 2016; PAHO, WHO). Se han reportado casos de transmisión sexual, el primero en 2008 en Colorado, EEUU (Foy et al., 2011). Adicionalmente se ha detectado ARN viral en leche materna, orina, saliva, semen, líquido amniótico y tejidos placentarios, lo que puede contribuir a su diseminación (Besnard et al., 2016; Gourinat, O'Connor, Calvez, Goarant, & Dupont-Rouzeyrol, 2015; Martines et al., 2016; Musso, 2015).

1.3 Manifestaciones clínicas de la infección

Afortunadamente el 81% de las infecciones por el ZIKV son subclínicas. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son similares a las de otras

infecciones causadas por arbovirus como Dengue y Chikungunya (Duffy et al., 2009; Heang et al., 2012). El periodo de incubación del virus es de 3 a 12 días, los síntomas más comúnmente reportados son erupción macular o papular (90%), fiebre (65%), artritis o artralgia (65%), conjuntivitis (55%), mialgia (48%), dolor de cabeza (45%) y dolor retro orbital (39%) (Buathong et al., 2015). Hematuria y hematospermia también han sido reportadas (Besnard et al., 2016; Olson, Ksiazek, Suhandiman, & Triwibowo, 1981). Hasta hace relativamente poco tiempo, el ZIKV no representaba un problema de salud pública debido a su evolución clínica leve. Sin embargo, recientemente hay reportes de casos por ZIKV muy severos que incluyen complicaciones neurológicas como el síndrome de Guillain-Barré (SGB) en la Polinesia Francesa (Cao-Lormeau et al., 2016; Oehler et al., 2014) así como complicaciones autoinmunes (púrpura trombocitopénica y leucopenia) y microcefalia, lesiones ópticas (Ventura CV, 2016) y malformaciones severas en fetos y recién nacidos (Calvet G et al., 2016; Mlakar et al., 2016a; Sarno et al., 2016), motivo por el cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo declaró un problema de salud pública en febrero de 2016.

1.4 Microcefalia y síndrome congénito

Gran cantidad de evidencias indican que la infección con ZIKV de las madres en gestación temprana puede conducir a aborto espontáneo del producto, muerte fetal, restricción en el crecimiento uterino y microcefalia, una condición caracterizada por una reducción en la circunferencia de la cabeza donde la organización del cerebro no se ve afectada, pero asociada frecuentemente con pérdida o arresto del desarrollo cerebral (Brasil et al., 2016; Mlakar et al., 2016); así mismo la infección de la madre en el segundo o tercer trimestre y la prolongada viremia podrían contribuir también con las anomalías fetales (Brasil et al., 2016; Driggers et al., 2016). Además, se presentan lesiones oftalmológicas que se observan con frecuencia en recién nacidos afectados con ZIKV, las cuales incluyen manchas de pigmento focal en la retina y atrofia coriorretiniana (64.7%) seguido de alteraciones del nervio óptico (47.1%) (de Paula Freitas et al., 2016). El ZIKV ha sido detectado

en células de la glía, neuronas, placenta y fluido amniótico de bebés con microcefalia, relacionando además la infección durante el embarazo con el síndrome congénito (Mlakar et al., 2016a; Rasmussen, Jamieson, Honein, & Petersen, 2016).

Algunos reportes han demostrado la vulnerabilidad de las células progenitoras y troncales neurales al ZIKV usando cultivos *in vitro* derivados de células troncales pluripotentes (Benazzato et al., 2016; Tang, Hammack, Ogden, & Jin, 2016). Un estudio en piel mostró que el virus infecta fibroblastos dermales humanos, queratinocitos epidermales, y células dendríticas inmaduras a través de los receptores DC-SIGN (del inglés Dendritic cell-specific adhesion receptor), Axl, Tyro3 y TIM1 (del inglés T-cell immunoglobulin an mucin domain 1), siendo Axl el más importante (Hamel et al., 2015). Con este antecedente Nowakowski y col. analizaron la expresión de candidatos de proteínas de entrada al ZIKV sugiriendo que la alta expresión de Axl en células troncales neurales hace a esta población selectivamente vulnerable a la infección (Nowakowski et al., 2016).

Por otro lado, Tabata y col. demostraron que el ZIKV infecta numerosos tipos de células primarias y explantes de placenta humana que expresan los receptores Axl, Tyro3 y TIM1 sugiriendo las rutas placental y paraplacental para el ingreso del virus al compartimiento fetal. La expresión de estos receptores varía con el tipo celular, donador, estado de diferenciación y edad gestacional. Notablemente TIM1 fue consistente y altamente expresada en la decidua basal y parietal, villi coriónico y membranas amniocoriónicas alrededor del feto que fueron productivamente infectadas y liberaron altos títulos virales. Al bloquear este receptor potencialmente se inhibe la infección con ZIKV, indicando que TIM1 juega un papel crítico (Tabata et al., 2016).

Los mecanismos moleculares involucradas en la microcefalia asociada con el ZIKV aún no son del todo conocidas. A este respecto Liang y col. demostraron que las proteínas NS4A y NS4B del ZIKV inhiben la vía de señalización Akt-mTOR bloqueando la neurogénesis e induciendo autofagia en células troncales neuronales fetales humanas (Liang et al., 2016), mientras que Dang y col. mostraron que el

ZIKV infecta células progenitoras neurales activando la respuesta inmune innata mediada por TLR3 (del inglés Toll like receptor 3), disparando la apoptosis y afectando la neurogénesis en un modelo de organoides cerebrales derivados de células troncales embrionarias (Dang et al., 2016).

1.5 Síndrome de Guillain-Barré

El SGB incluye un grupo de neuropatías agudas autoinmunes, generalmente reportadas después de infecciones virales o bacterianas (Savino, Messias, & Mendes-da-cruz, 2017). El síndrome puede afectar los nervios que controlan los movimientos musculares, así como los que transmiten sensaciones de dolor, térmicas y táctiles. Produciendo debilidad, hormigueo o pérdida de la sensibilidad que empieza en piernas y pueden extenderse a brazos y cara. En algunos casos pueden producir parálisis en piernas, brazos y músculos faciales, en el 20-30% de los casos se ven afectados los músculos torácicos lo que dificulta la respiración, en casos graves puede verse afectada el habla y la deglución. La mayoría de los casos incluso los más graves se recuperan totalmente, aunque cabe mencionar que del 3-5% de los pacientes muere por complicaciones como parálisis de músculos respiratorios, septicemia, trombosis pulmonar o paro cardíaco (OMS, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/guillain-barre-syndrome/es/>).

No es claro el mecanismo que origina la autoinmunidad contra antígenos expresados en células de Schwann, mielina o axones. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar el SGB que incluyen el mimetismo molecular y la producción de superantígenos (Anaya et al., 2016).

Una vez generados los auto-anticuerpos estos se unen a los axones conduciendo a la activación del complemento que es seguida por la formación del complejo de ataque a la membrana, provocando la desaparición del voltaje controlado en los canales de sodio, así como desprendimiento de la mielina paranodal, conduciendo a la falla de la conducción nerviosa y debilidad muscular. Este daño provoca la llegada de los macrófagos en los espacios periaxiales, a partir de los nodos,

limpiando los axones dañados (McGonigal et al., 2010; Susuki et al., 2007; van den Berg et al., 2016; Yuki & Hartung, 2012). La regeneración axonal es un proceso lento, natural y efectivo, pero puede ser irreversible si la fibra del nervio de entrada está afectada (Willison, Jacobs, & van Doorn, 2016).

La relación espacio-temporal entre los brotes de ZIKV y el incremento en los casos de SGB fue un fuerte indicador de una asociación entre ellos, pero la evidencia definitiva para esta asociación provino de un estudio caso-control realizado en la Polinesia Francesa. Durante esta investigación se analizaron 42 casos de SGB, 98% de estos presentó anticuerpos anti-ZIKV IgM o IgG, 100% mostró anticuerpos neutralizantes contra ZIKV, el 88% de los pacientes experimento infección con virus Zika en una media de seis días antes del cuadro de síntomas neurológicos y menos del 50% presentó anticuerpos anti-glicolípidos, lo que sugiere que el SGB relacionado a ZIKV tal vez involucra otros mecanismos en adición a la respuesta autoinmune (Cao-Lormeau et al., 2016). Más recientemente casos de SGB relacionados a ZIKV también fueron reportados en Brasil, Puerto Rico, El Salvador, Venezuela, Haití y Colombia (Dirlikov et al., 2017; Kassavetis, Joseph, Francois, Perloff, & Berkowitz, 2016; Parra et al., 2016; OMS, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/guillain-barre-syndrome/es/>).

1.6 Virus Zika

El ZIKV es un virus del genero *Flavivirus*, miembro de la familia *Flaviridae*, pertenece al serocomplejo Spondweni y basándose en análisis filogenéticos se conocen hasta el momento dos linajes el asiático y el africano, ambos linajes comparten arriba del 95% de identidad de aminoácidos (Haddow et al., 2012). Dowd y col. a través de estudios de neutralización con suero inmune de pacientes con ZIKV identificaron un único serotipo (Dowd et al., 2016).

El ZIKV está constituido de una cadena sencilla de ARN de sentido positivo con un genoma de 10.7 Kb que codifica para una poliproteína que posteriormente es escindida por la proteasa viral y proteasas del hospedero dando lugar a tres

proteínas estructurales (C, prM/M y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Lindenbach & Rice, 2003).

1.7 Infección y ciclo de replicación

El mecanismo de infección del ZIKV no ha sido estudiado completamente a detalle, sin embargo, al pertenecer a la familia *Flaviridae*, se supondría que el ciclo de replicación es quizá similar al de otros Flavivirus. Sin embargo, es necesaria más investigación para poder aseverarlo.

El ZIKV puede infectar un amplio rango de células de diferentes tejidos y especies, el virus se replica en intestino y glándulas salivales de diversas especies del mosquito *Aedes* (Rocklov J et al., 2016) así como en neuronas, células gliales, fibroblastos dermales, queratinocitos epidermales y células dendríticas inmaduras de mamíferos (Bell, Field, & Narang, 1971; Hamel et al., 2015; Wenbren & Williams, 1958).

Se ha descrito que el ZIKV entra a la célula usando receptores de adhesión como DC-SIGN y diversos miembros de la familia del receptor de la fosfatidilserina (Axl, Tyro3 y TIM-1) (Hamel et al., 2015). La entrada del ZIKV depende de endocitosis mediada por clatrina (Krishnan et al., 2007; van der Schaar et al., 2008). Subsecuentemente, los viriones ingresan a endosomas tempranos (Krishnan et al., 2007; van der Schaar et al., 2008). La fusión de la membranas viral y celular es facilitada por la glicoproteína E y es disparada por el pH bajo del endosoma. Liberado el ARN viral al citoplasma de la célula huésped, este ARN de sentido positivo codifica para una poliproteína, la cual es subsecuentemente procesada por la proteasa viral y proteasas celulares que dan lugar a siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4A, NS5) y tres proteínas estructurales C, prM (precursor de la proteína de membrana) y E (Gubler, 2007). Las proteínas no estructurales se ensamblan de manera secuencial para iniciar la replicación del ARN (Mackenzie, 2005).

En la célula infectada ocurren grandes cambios en la reorganización y redistribución de las membranas, incluyendo la formación de vesículas por la invaginación del retículo endoplásmico (Welsch S et al., 2009). Los flavivirus inducen tanto la relocalización de colesterol celular como un incremento de la producción de lípidos en el retículo endoplásmico. En las etapas tardías de la infección los flavivirus inducen autofagia para liberar ácidos grasos adicionales para continuar con la replicación (Peña & Harris, 2012).

Las partículas ensambladas son transportadas al aparato de Golgi, ahí la proteína prM es escindida por la furina para dar lugar a un pr-péptido soluble y la proteína M. El pr-péptido permanece asociado con la proteína E de la partícula viral ensamblada, durante la exocitosis con la finalidad de prevenir la fusión prematura del virión dentro del compartimiento ácido en la red del Golgi (Rodenhuis-Zybert et al., 2011; I-Mei Yu et al., 2008). Por último, las partículas son secretadas al espacio extracelular (Figura 2).

Una vez en el espacio extracelular a pH neutro, el pr-péptido se disocia y el virión madura para dar lugar a una partícula completamente infecciosa (Gu, Ding, Xiong, Gao, & Zheng, 2014; I-M Yu et al., 2009; I-Mei Yu et al., 2008).

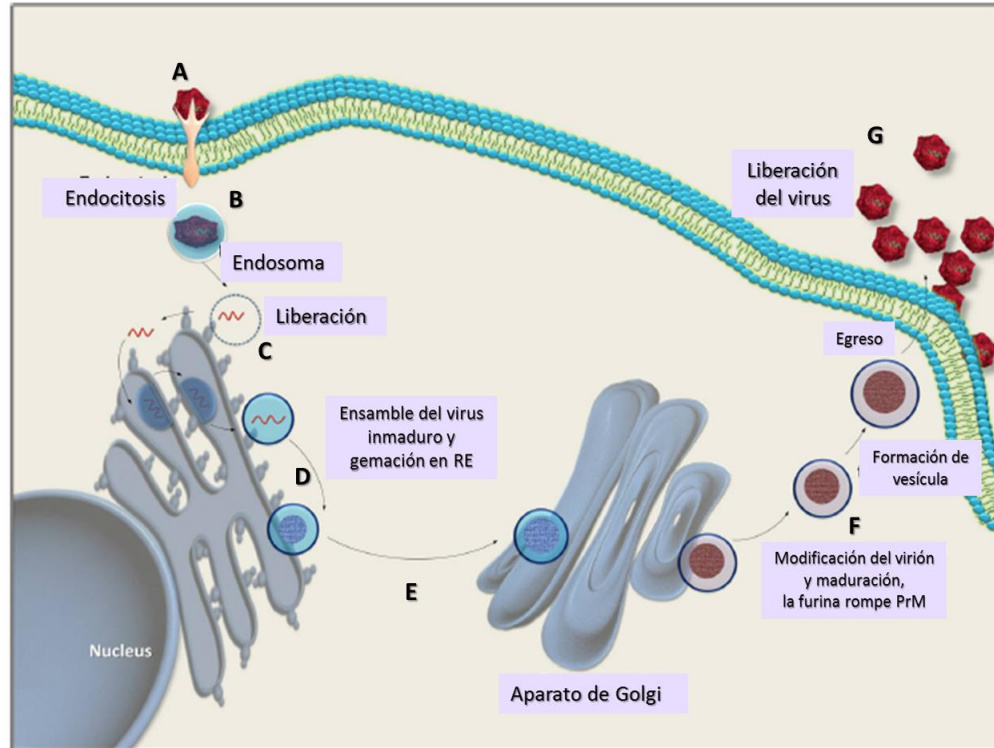


Figura 2. Ciclo de replicación. **A** El virus se une a su receptor celular. **B**. El virus es endocitado y llevado a un endosoma. **C**. El pH ácido del endosoma ocasiona que se libere el genoma viral al citoplasma. **D**. Traducción de la poliproteína y encapsidación del genoma ocurre la fusión de la nucleocápside con la membrana del retículo endoplásmico. **E**. Tránsito desde el retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi. **F**. Escisión de PrM por la furina. **G**. Liberación de las partículas virales maduras. (Tomado y modificado de Shailendra K. Saxena *et al.*, 2016)

1.8 La glicoproteína de envoltura (E)

La proteína E está compuesta de 504 aminoácidos y tiene un peso de 55.4 kDa, esta proteína se encuentra en la superficie del virión y se organiza en tres formas distintas, dependiendo del estado de madurez.

Las partículas maduras de los Flavivirus contienen 180 copias de la proteína de Envoltura y la proteína M en la superficie y presentan un arreglo icosaédrico en el cual los 90 dímeros cubren completamente la superficie viral (Kuhn *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2013). Después de que el virus entra a la célula hospedera por un mecanismo de endocitosis mediado por receptor, el ambiente endosomal ácido dispara un cambio conformacional irreversible en la proteína E y ocurre una

transición de dímero a trímero que conduce a la fusión de la membrana viral con la endosomal (Modis, Ogata, Clements, & Harrison, 2004). En el retículo endoplásmico, nuevamente se ensambla la progenie viral en viriones inmaduros que exhiben una superficie puntiaguda con 60 protrusiones heterotrimericas de la proteína E y la precursora de membrana (PrM) (Plevka et al., 2011). Durante la maduración del virus, un ambiente de pH ácido en la vía del trans-Golgi induce la reorganización de los heterotrimeros E-PrM en homodímeros de la proteína E (I-Mei Yu et al., 2008). Este rearrreglo estructural expone el sitio de corte de PrM para la digestión por la proteasa del hospedero, furina. Después de que PrM es cortada, la proteína se disocia de las partículas al liberarse en el espacio extracelular con pH neutro. Durante el proceso de maduración, no todos los heterotrimeros pueden ser cortados por la furina, y el heterotrímero no cortado PrM-E se mantiene como una partícula viral inmadura (I-Mei Yu et al., 2008).

La proteína de Envoltura está formada por tres dominios estructurales y funcionales: EDI, el cual está involucrado en los cambios conformacionales requeridos para la entrada viral; EDII, que contiene el asa de fusión necesaria para la unión de la membrana viral con la endosomal; y EDIII, que está involucrado en la unión a los receptores celulares de las células hospederas (Figura 3) (Roehrig et al., 2004).

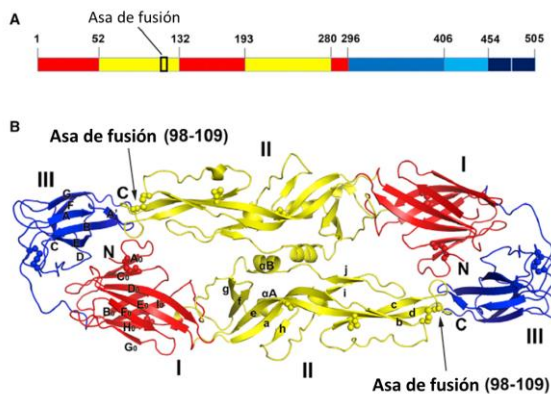


Figura 3. Estructura general de la proteína de envoltura del ZIKV. A. Diagrama esquemático e la organización de los dominios. Dominio I (rojo), dominio II (amarillo), y dominio III (azul). **B.** Estructura del homodímero de la proteína de envoltura. (Tomado de L. Dai et al., 2016)

La proteína de envoltura del ZIKV presenta una homología con otros flavivirus que va del 40 al 62%. Específicamente con los cuatro serotipos de DENV, el ZIKV presenta una homología del 57 al 62%. El ZIKV presenta un único sitio de glicosilación en Asn154 (el cual es sugestivo a ser un determinante de neurovirulencia en WNV), mientras DENV presenta dos, Asn67 (que es crucial para la unión al receptor DC-SIGN en células dendríticas) y Asn153. Los dominios DI, DII y DIII del ZIKV comparten con el DENV un 35, 51 y 29% de identidad, respectivamente, cabe destacar que la mayoría de residuos conservados están localizados en EDII, particularmente en el asa de fusión y la región vecina (K Stettler et al., 2016).

1.9 Respuesta inmune contra ZIKV

1.9.1 Inmunidad innata

Se han presentado estudios que subrayan la importancia de la inmunidad innata en la modulación de la infección del ZIKV y el desarrollo de la enfermedad. La infección *in vitro* de fibroblastos causa un incremento de receptores de reconocimiento de patrones antivirales, como TLR3 en una etapa temprana y de RIG-1 (del inglés Retinoic acid inducible gene 1) y MDA-5 (del inglés Melanoma differentiation associated protein 5) en una etapa tardía, conduciendo a la inducción de interferón alfa y beta ($IFN\alpha$ y β) (Hamel et al., 2015). También se han empleado modelos de ratón para confirmar la importancia de los tipos de células inmunes que participan en la defensa contra el ZIKV. Mientras que los ratones inmunocompetentes C57/BL6 y CD1 no presentan enfermedad cuando se les infecta con ZIKV, los ratones A129 y AG129 (*knockout* del receptor del IFN tipo I y II) desarrollan síntomas de enfermedad como postura encorvada y pelo rizado, además los fetos de madres infectadas presentan microcefalia (Rossi & Vasilakis, 2016). Lazear y col. reportaron que ratones $Irfar1^{-/-}$ (carentes del receptor de IFN $\alpha\beta$) y ratones triple *knockout* $Irf3^{-/-}$ $Irf5^{-/-}$ $Irf7^{-/-}$ (que pierden los factores de transcripción involucrados en la inducción de IFN) desarrollan enfermedad neurológica y sucumben ante la infección de ZIKV,

mientras que ratones silvestres y solamente con *Irf3*^{-/-}, *Irf7*^{-/-} y *Mavs*^{-/-} no manifiestan los síntomas. Cabe destacar que el modelo de ratón *Irfar1*^{-/-} presenta niveles altos del ZIKV en cerebro, médula espinal y testículos persistiendo hasta 28 días post-infección (Lazear et al., 2016). Otro estudio donde emplearon ratones SJL (Swiss Jim Lambert, son una cepa de ratones inmunocompetentes con elevados niveles de células T circulantes), estos exhiben una respuesta normal de IFN pero presentan un retraso en la respuesta de células B y pérdida de células NK (del inglés Natural Killers) (Hutchings, Varey, & Cooke, 1986). Incluso aunque los fetos de los ratones SJL infectados con ZIKV no desarrollaron microcefalia, presentaron malformaciones corticales (Cugola et al., 2016). Esto sugiere la importancia del requerimiento de la inmunidad mediada por células NK y la respuesta de anticuerpos neutralizantes para combatir el ZIKV.

Por otro lado, Bayer y col. encontraron que los trofoblastos placentarios primarios humanos constitutivamente producen IFN tipo III ($IFN\lambda$), que restringe la infección por ZIKV de una manera autócrina y parácrina (Bayer et al., 2016).

1.9.2 Inmunidad celular

Se conoce que una infección con DENV provoca una amplia respuesta de células T específicas y tiene un pico alrededor de los días 8-10 después del cuadro de fiebre. Las células T CD8⁺ están mayormente representadas comparadas con su contraparte CD4⁺ y preferencialmente tienen como blancos las proteínas no estructurales NS3, NS4B y NS5, mientras que las células T CD4⁺ están principalmente dirigidas hacia las proteínas estructurales de la cápside y E, así como a la proteína no estructural NS1 (Rivino & Lim, 2016).

En cambio, poco se conoce con respecto a la respuesta de células T en una infección con ZIKV. Existen reportes recientes que mediante análisis *in silico* han identificado algunas secuencias de péptidos que pudieran unirse a las moléculas de MHC de clase I y II. En modelos murinos se ha encontrado que, aunque se han identificado epitopos de células T CD8⁺ en las diez proteínas virales predominan

los epitopos derivados de la proteína E seguidos de la NS5 y prM (Chahal et al., 2017; Ngono et al., 2017; Pardy et al., 2017; Wen et al., 2017). En cuanto a la respuesta de células T en humano Jahani y col. han identificado epitopos en la proteína E tanto para linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Janahi et al., 2017), mientras que Wen y col. encontraron que la mayoría de epitopos HLA-B*0702 están localizados en las proteínas no estructurales en contraste con los epitopos HLA-A*0101 que residen en la proteína E (Wen et al., 2017).

El papel protector que presentan las células T durante la infección con ZIKV es controversial, Larocca y col. al evaluar candidatos vacunales contra ZIKV determinaron que la presencia de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ no era indispensable (Larocca et al., 2016), en contraste Ngono y col. encontraron que las células T CD8⁺ juegan un rol protector contra la infección de ZIKV en un modelo animal donde depletaron las células T CD8⁺ observando cargas virales altas mientras que la transferencia adoptiva de estas mismas células reduce la infección, este dato se refuerza al emplear ratones Cd8a^{-/-} que sucumben a la infección (Ngono et al., 2017). Por su parte Wen y col también mostraron que la eliminación de células T CD8⁺ conduce a carga viral alta (Wen et al., 2017).

También han evaluado los epítomos de reacción cruzada que pudieran provocar respuestas de células T CD8⁺, Wen y col. identificaron cinco péptidos HLA-B*0702 de ZIKV que reaccionaron con células T CD8⁺ de ratones infectados con DENV. El reto con ZIKV seguido de la inmunización de los ratones con epitopos específicos de ZIKV o de reacción cruzada ZIKV/DENV provoca respuestas de células T que reducen los niveles de infección con el ZIKV (Wen et al., 2017). Por otro lado, Stettler y col. encontraron que la gran mayoría de células T CD4⁺ de memoria fueron específicas para las proteínas NS1 y E de DENV o ZIKV, consistente con un bajo nivel de reactividad cruzada de células T, incluso en sujetos que son inmunes a ambos virus. Lo anterior sugiere que en la infección con ZIKV la teoría del pecado original antigénico quizá no juega un rol patogénico, del mismo modo sugieren que el riesgo de la tormenta de citocinas y consecuente severidad de la enfermedad después del facilitamiento de una infección heteróloga con DENV por anticuerpos

contra ZIKV quizá es mitigada por la pobre reacción cruzada de células T (Stettler et al., 2016).

1.9.3 Inmunidad humoral

Las proteínas E, prM y NS1 son los principales blancos de los anticuerpos generados durante la infección con ZIKV (Beltramello, Williams, Simmons, Macagno, et al., 2010; Dejnirattisai et al., 2010b; Vaughan, Weiskopf, & Diamond, 2017), siendo la proteína E el principal blanco de anticuerpos neutralizantes (Messer et al., 2014). La neutralización ocurre a dos niveles: a nivel de la unión celular, a través de la inhibición de la interacción del virus con los receptores de la superficie celular; y a nivel de la fusión viral, al unirse los anticuerpos al asa de fusión de la proteína E o mediante el bloqueo de los cambios conformacionales de la glicoproteína E que son requeridos para la fusión de la membrana (Burton, Saphire, & Parren, 2001; Cockburn et al., 2012; Lok et al., 2008).

La progresión de la respuesta de anticuerpos observada en infecciones virales como DENV (el cual está altamente emparentado con ZIKV), en una infección primaria es dominada por anticuerpos IgM, los cuales aparecen después de 4-5 días del inicio de los síntomas y se mantienen hasta por tres meses. Posteriormente aparecen anticuerpos de tipo IgG a partir del día 7 y alcanzan sus niveles más altos aproximadamente en el día 15 predominando las subclases IgG1 e IgG3 (Koraka et al., 2001; Koraka et al., 2003). Durante infecciones secundarias, ya sea por un serotipo homólogo o heterólogo, es posible encontrar anticuerpos IgG desde el día del inicio de los síntomas, ya que hay expansión clonal de células B de memoria específicas para el serotipo de la infección previa, además hay de nueva cuenta activación de células B naïve, por lo tanto, en una infección secundaria los niveles de IgG son mayores que los de IgM (Chanama et al., 2004) (Figura 4).

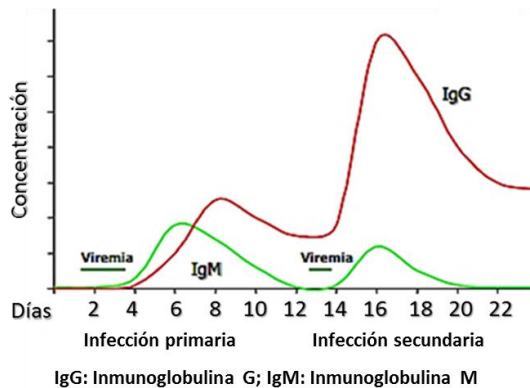


Figura 4. Respuesta de anticuerpos en la infección primaria y secundaria por el ZIKV.

Varios estudios han abordado el tema de la inmunidad humoral de reacción cruzada entre el DENV y ZIKV, probando tanto suero como anticuerpos monoclonales de individuos infectados con DENV contra ZIKV y viceversa. Priyamvada y col. empleando el suero de nueve pacientes en fase aguda de Dengue encontraron una alta unión y neutralización de ZIKV (Priyamvada, Quicke, Hudson, Onlamoon, & Sewatanon, 2016). De la misma forma otros estudios empleando el suero convaleciente de Dengue colectado varios años después de la infección primaria de Dengue a partir de viajeros presenta una limitada neutralización cruzada contra ZIKV (Collins et al., 2017; Swanstrom et al., 2016). En adición, a pesar de la abundancia de los anticuerpos de reacción cruzada seguidas las infecciones secundarias de Dengue, el suero convaleciente de Dengue de individuos que habían experimentado repetidas infecciones de Dengue neutraliza pobremente el ZIKV comparado a la neutralización cruzada de los serotipos de Dengue (Collins et al., 2017; Swanstrom et al., 2016).

También se han empleado ensayos de depleción para determinar las subpoblaciones que neutralizan DENV y ZIKV en muestras de sueros convalecientes (> 6 meses post-infección) de individuos que habían sido expuestos a DENV previo a la infección con ZIKV. Se encontró que en una infección primaria de ZIKV, la depleción de los anticuerpos de reacción cruzada de DENV no afecta en la neutralización del ZIKV. Mientras que en infecciones secundarias de Dengue interesantemente encontraron que la depleción de anticuerpos de reacción cruzada de DENV no afectan los títulos de anticuerpos neutralizantes de ZIKV. Todos estos

datos sugieren que una población de anticuerpos neutralizantes específicos de ZIKV se desarrolla independientemente de la inmunidad previa de DENV (Collins et al., 2017).

Para identificar los epítopos que reconocen estos anticuerpos de reacción cruzada se han empleado anticuerpos monoclonales generados a partir de plasmablastos obtenidos de pacientes con Dengue y se han probado en ensayos para demostrar la unión y neutralización de reacción cruzada con ZIKV (Barba-Spaeth et al., 2016; Dejnirattisai et al., 2016; Priyamvada et al., 2016; K Stettler et al., 2016; Swanstrom et al., 2016). Los anticuerpos dirigidos hacia la región altamente conservada del asa de fusión son pobremente neutralizantes contra ZIKV *in vitro* (Barba-Spaeth et al., 2016). En contraste, se encontró que los anticuerpos monoclonales específicos para el epítipo conformacional dímero de envoltura, así como para el EDIII fuertemente neutralizan al ZIKV (Barba-Spaeth et al., 2016; Dejnirattisai et al., 2016; Swanstrom et al., 2016). Por otro lado, Stettler y col. identificaron que los anticuerpos monoclonales contra la proteína NS1 son altamente específicos. En adición, los anticuerpos monoclonales que reconocen EDIII o todo el virus presentan una alta especificidad y potente neutralización *in vitro*. Por el contrario, los anticuerpos monoclonales específicos de EDI/EDII, muestran reacción cruzada y pobre capacidad neutralizante (Stettler et al., 2016), a pesar de esta desventaja en pacientes que cursan infecciones con Dengue se ha reportado que se encuentran representados en muy altas concentraciones lo cual pudiera ayudar en la protección (Montes-Gómez et al., 2017).

Una vez demostrado que los anticuerpos podían generar reacción cruzada entre ambos flavivirus, la siguiente pregunta era analizar si podían generar facilitamiento de la infección dependiente de anticuerpos (ADE, antibody-dependent enhancement), esta hipótesis sugiere que durante una infección primaria se generan anticuerpos específicos para el virus infectante, promoviendo la neutralización de las partículas virales, las células inmunes como macrófagos o monocitos eliminan los complejos inmunes, los cuales no pueden escapar de las vacuolas endocíticas y terminan por destruir el virus. Cuando una persona es

infectada por un serotipo diferente, las células B de memoria inducidas durante la primera infección son reactivadas y los anticuerpos producidos por estas células son específicos para el serotipo de la infección primaria. Estos anticuerpos se unen con baja afinidad al serotipo heterotípico. Como resultado estos complejos inmunes de baja afinidad son capturados por macrófagos o monocitos a través del receptor Fc (FcR) promoviendo el escape del virus en el endosoma, facilitando la infección viral y la replicación dentro de estas células. En el caso del DENV, para los cuatro serotipos conocidos hay evidencia epidemiológica que una infección primaria protege de una reinfección con el mismo serotipo, pero representa un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad severa bajo una reinfección con un serotipo diferente (Fagbami, Halstead, Marchette, & Larsen, 1987; Halstead, Rourke, & Allison, 1977) (Figura 5).

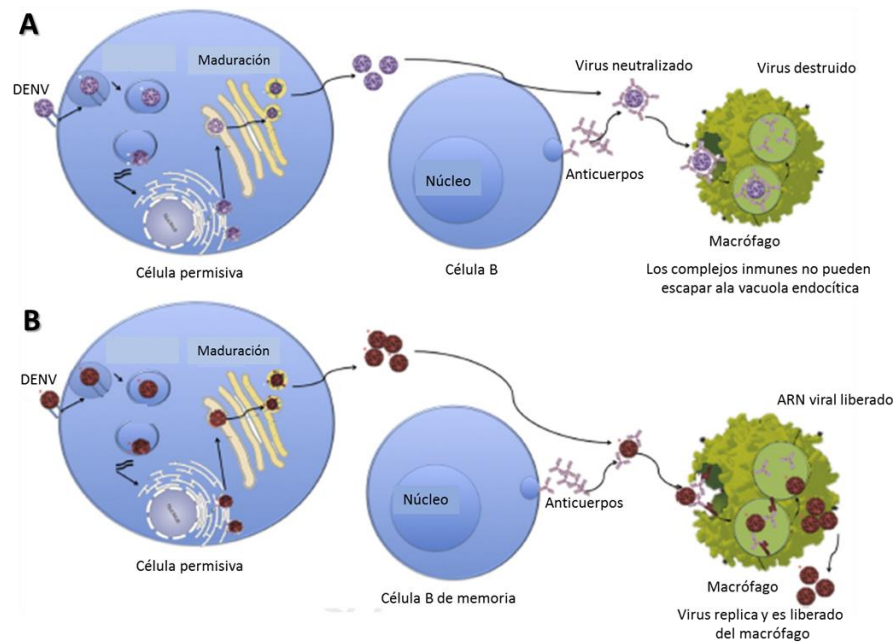


Figura 5. Infección con Dengue y fenómeno de ADE. A. Infección de una célula hospedera normal **B.** Infección mediada por los anticuerpos facilitadores (Tomado de Cedillo-Barrón, 2014)

El facilitamiento dependiente de anticuerpos ha sido demostrado ampliamente para el DENV por múltiples grupos empleando suero y anticuerpos monoclonales de pacientes con Dengue de infecciones primarias y secundarias (Beltramello, Williams, Simmons, MacAgno, et al., 2010; Dejnirattisai et al., 2010a; Priyamvada

et al., 2016; Smith et al., 2012). Recientemente también se ha demostrado la capacidad de facilitamiento inducida por anticuerpos específicos de DENV en la infección del ZIKV (Dejnirattisai et al., 2016; Priyamvada et al., 2016). Dejnirattisai y col. presentaron que la preincubación de ZIKV con suero inmune de pacientes con dengue o anticuerpos monoclonales que reconocen epitopos conformacionales conducen a incrementar la infección de células U937 (línea celular monocítica a la cual se le ha eliminado el receptor DC-SIGN) con ZIKV (Dejnirattisai et al., 2016). Resultados similares reportaron Priyamvada y col. que probaron suero de pacientes con dengue en fase aguda y convaleciente y mostraron que mientras algunos presentaron neutralización, muchos de ellos causaban facilitamiento de la infección (Priyamvada et al., 2016). En otro estudio Stettler y col. encontraron que los anticuerpos monoclonales de reacción cruzada obtenidos de cualquiera de los virus dirigidos principalmente hacia los dominios DI/DII podían mediar el facilitamiento heterólogo (Stettler et al., 2016).

Existen diversos estudios que han abordado el fenómeno de ADE *in vivo*, en uno de ellos emplean dos anticuerpos de reacción cruzada DI/DII aislados de un individuo infectado con DENV (DV82) y otro infectado con ZIKV (ZKA78), estos anticuerpos fueron administrados a ratones AG129 previo a la infección con DENV. Se encontró que ambos anticuerpos monoclonales facilitaron la infección ocasionando pérdida vascular y Finalmente la muerte de los ratones (Stettler et al., 2016). Al evaluar el escenario contrario, es decir, el ADE con Zika por anticuerpos que reconocen originalmente DENV y de otros flavivirus, empleando la cepa de ratones Stat2^{-/-} C57BL/6 (esta presenta una alta morbilidad y mortalidad a la infección) (Tripathi et al., 2017), a la cual se le administraron suero de pacientes con Dengue o virus del Oeste del Nilo (WNV, del inglés West Nile virus) y subsecuentemente infectaron con ZIKV, resultando en la pérdida de peso y síntomas neurológicos, además de encontrar cargas virales altas en cerebro, médula espinal y testículos, cabe mencionar que se hallaron síntomas más severos en los ratones tratados con el suero de dengue que con los de WNV (Bardina et al., 2017).

Toda esta evidencia apunta a que los anticuerpos de DENV pueden facilitar la infección con el ZIKV y viceversa, esto ocurre tanto *in vitro* como en modelos de ratón. Sin embargo, se desconoce si esto ocurre a nivel de la población humana, puesto que no se ve reflejado en los reportes de salud de algunos países incluido el nuestro, por lo que son urgentes estudios epidemiológicos que ayuden a resolver esta cuestión.

2. JUSTIFICACIÓN

La alta homología en la secuencia de bases e identidad de la proteína E que presentan el DENV con el ZIKV genera como consecuencia anticuerpos de reacción cruzada, que representan un gran problema en países que cuentan con regiones endémicas para Dengue y que presentaron una reciente introducción de ZIKV, como es el caso de México.

A pesar de que recientemente se ha analizado la respuesta inmunológica de reacción cruzada que existe entre ambos Flavivirus y que está dirigida principalmente hacia la proteína E, así como el facilitamiento de la infección que estos anticuerpos pudieran **generar**, hacen falta XXX estudios que valores XX o que correlacionen las formas clínicas de la enfermedad del Dengue.

Por lo anterior en este estudio sistemático se analizó la reacción cruzada contra el ZIKV de pacientes con diferentes grados de severidad de la enfermedad de Dengue en zonas endémicas (nunca expuestas al ZIKV) y su asociación con el ADE. Los isotipos contra la proteína E del ZIKV, también es un tema no explorado, esto podría ser particularmente importante por sus implicaciones en la patogénesis de la enfermedad.

3. HIPÓTESIS

Los anticuerpos de pacientes con formas más severas de Dengue mostrarán mayor reacción cruzada con la proteína E de ZIKV, la cual será proporcional al fenómeno de ADE.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la reacción cruzada contra el ZIKV de sueros provenientes de pacientes sin antecedentes de Zika con diferentes formas clínicas de la enfermedad del Dengue y su capacidad de facilitar la infección con el ZIKV.

4.2 Objetivos particulares

1. Diseñar y clonar la secuencia codificante de la proteína E recombinante de ZIKV (basada en el aislado reportado por el InDRE).
2. Expresar y purificar la proteína E recombinante del ZIKV en células de *Drosophila* (S2).
3. Analizar la reacción cruzada de los anticuerpos de tipo IgM e IgG presentes en los sueros de individuos seropositivos al DENV con la proteína E del ZIKV.
4. Determinar la capacidad facilitadora de los sueros de pacientes con Dengue en la entrada del ZIKV usando un modelo de células K562.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestras de suero y criterios de inclusión y exclusión

Las muestras de sueros se obtuvieron de donadores humanos con Dengue. Estas muestras fueron colectadas durante el periodo Enero-Junio del 2010 en colaboración con el Instituto de Investigaciones Médico Biológicas de la Universidad Veracruzana región Veracruz, Ver.

En tanto que las muestras de sueros de donadores humanos con Zika se colectaron durante el periodo Junio-Agosto del 2016 en colaboración con el Instituto de Investigaciones Médico Biológicas de la Universidad Veracruzana Ver, Veracruz, así como en el periodo Julio-Noviembre del 2016 en colaboración con el Centro Médico Nacional La Raza, Ciudad de México.

Todas estas muestras se colectaron bajo los lineamientos bioéticos establecidos para la investigación en seres humanos, todos los individuos que aceptaron participar firmaron su carta de consentimiento informado para la obtención de muestras sanguíneas. Para ello los pacientes cumplieron los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes residentes de zona endémica, de cualquier edad que acudieron a consulta.
- Presentaron 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 retroorbital.

A los pacientes que cumplieron con dichos criterios se les realizó un examen médico para la elaboración de su historial clínico. El diagnóstico se estableció con un kit de ELISA (IBL Internacional) y RT-PCR tiempo final.

Del mismo modo se incluyeron sueros de donadores humanos de Veracruz (Zona endémica) como controles negativos de infección, estas muestras fueron colectadas durante Octubre de 2011 en colaboración con el Instituto de Investigaciones Médico Biológicas de la Universidad Veracruzana Ver, Veracruz. Así como sueros de

donadores humanos de Zacatecas (zona no endémica) como controles negativos de infección, estas muestras fueron colectadas durante el periodo Octubre- Noviembre del 2016 en colaboración con el Hospital de la Secretaria de Salud del municipio de Trancoso, Zacatecas así como con la Clínica Hospital Fresnillo No. 34 ISSSTE, Zacatecas.

La Tabla 1. presenta la cantidad de muestras de cada grupo empleadas en este estudio.

Tabla 1. Muestras de sueros

Procedencia	Fase	Año	Diagnóstico	N
Veracruz	Aguda	2010	Dengue Clásico¹	150
			Dengue Hemorrágico^{1,2}	45
		2016	Zika¹	88
	---	2011	Sin infección (Zona endémica)	100
Zacatecas	---	2016	Sin infección (Zona no endémica)	150

1. Estas muestras se tomaron en la fase aguda de la enfermedad

2. Debido a que la incidencia de Dengue hemorrágico es de 2-3%, es difícil conseguir muestras de esta forma grave de la enfermedad

5.2 Material Biológico

5.2.1 ZIKV

El virus empleado en este estudio fue aislado a partir de un caso de Zika en Oaxaca y fue donado por el grupo del Dr. César González Bonilla (Jefe de la División de la Coordinación de Vigilancia Epidemiológica, Instituto Mexicano del Seguro Social).

5.2.2 Bacterias

Se empleó la cepa de *E. coli* DH5 α , que carece de la enzima *recA1*, responsable de la recombinación heteróloga, por lo tanto, su genoma es genéticamente más estable; carece además de algunas endonucleasas como *endA1*, que evita que el DNA plasmídico sea digerido y proporciona alta eficiencia de transformación de DNA no metilado derivado de PCR, cDNA u otras fuentes.

5.2.3 Células C6/36 y Vero

Para producir el abasto viral se empleó a la línea celular C6/36 del vector *Aedes albopictus* en estado larvario, las cuales son permisivas a la infección por el virus, para titular al virus se emplearon las células Vero, la cual es una línea celular de epitelio de riñón del mono verde susceptibles a la infección por el virus dengue. Ambas líneas celulares crecen en monocapa en medio mínimo esencial Eagle's (MEM) suplementado con suero fetal bovino descomplementado al 10%, aminoácidos no esenciales al 1%, vitaminas al 1%, antibiótico-antimicótico al 1% (penicilina sódica 10,000U/mL, sulfato de estreptomicina 10,000 μ g/mL, anfotericina B 25 μ g/mL y tilosina al 0.1%), piruvato de sodio al 1% y glutamina al 1%.

5.2.4 Células Schneider's *Drosophila* (S2)

Es una línea celular derivada del cultivo primario en estado tardío de embriones de *Drosophila melanogaster*, son células semiadherentes y se crecieron en el medio de cultivo Schneider con SFB descomplementado al 10% y una solución de penicilina-estreptomicina al 1% (5,000U/mL y 5,000 μ g/mL, respectivamente) y glutamina al 1% a 28°C. Una vez que las células fueron cotransfectadas con el plásmido de selección, fue necesario adicionar blastidina para realizar la selección de las células transfectadas cada cuatro días y para inducir la expresión de las proteínas recombinantes se empleó sulfato de cobre (CuSO₄) y medio base suplementado únicamente con antibiótico y glutamina.

5.2.5 Células K562

Para realizar los ensayos de facilitamiento se empleó la línea celular K562, estas células no son permisivas a la infección de DENV y ZIKV, pero poseen receptores Fc γ a través de los cuales pueden ingresar los complejos virus-anticuerpos. Dicha línea celular fue adquirida del American Type Culture Collection (ATCC) con número de catálogo CCL-243. Estas células son linfoblastos derivados de una persona con leucemia mieloide crónica. Se crecieron en suspensión en medio RPMI suplementado con Suero fetal bovino (SFB) descomplementado al 10%, antibiótico-antimicótico al 1% (penicilina sódica 10,000U/mL, sulfato de estreptomicina 10,000 μ g/mL, anfotericina B 25 μ g/mL y tilosina al 0.1%), y L-Glutamina al 1%.

5.3 Obtención del abasto viral y purificación del ZIKV

Se prepararon abastos virales del ZIKV. Los virus se propagaron en la línea celular C6/36 proveniente de la larva de *Aedes albopictus*. Se sembraron 6 botellas con células C6/36. Las cuales se incubaron a 36°C sin ambiente de CO $_2$. Se utilizó medio mínimo esencial (MEM, GIBCO), suplementado con SFB (GIBCO) al 10%, vitaminas, antibiótico, aminoácidos, L-glutamina y piruvato (todos de GIBCO), 100 unidades/ml de cada uno y 10 unidades/ml de tylosina. Una vez que el efecto citopático es evidenciado por la formación de sincisios en el 70% de la monocapa, se recuperaron los sobrenadantes de las botellas (las células fueron desechadas) y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min a 4°C. Las células fueron recuperadas en un tubo de centrifuga de 50 mL y se concentraron aproximadamente 10 veces con una columna de 100 kDa de corte molecular Amicon Ultra 15 (UFC910024) Merck Millipore. Posteriormente, se filtraron con un filtro de pirinola de 0.22 μ m. Se adicionó 1/10 del volumen de SPG (criopreservador que contiene sucrosa, Polietilenglicol y Glicerol) y finalmente se alicuotaron y de inmediato se colocaron en hielo seco. Las alícuotas se almacenaron a -70°.

5.4 Método de titulación del ZIKV por ensayo en placa

Para la titulación de ZIKV se utilizaron células Vero. Estas células fueron crecidas en medio RMPI suplementado con SFB al 10%, antibiótico, vitaminas, aminoácidos, L-glutamina y piruvato, 100 unidades/ml de cada uno a 37°C en un ambiente al 5% de CO₂. Se prepararon tubos de microcentrífuga estériles; se marcaron desde 10⁻¹ a 10⁻⁶ y se colocaron en hielo. En condiciones de esterilidad se adicionaron 225 µl de medio Hanks (GIBCO) a cada tubo y se mantuvo en hielo. El virus se descongeló directamente de -70°C a 4°C y se colocó en hielo. Fueron transferidos 25 µl del inóculo al primer tubo y se mezclaron vigorosamente en el agitador. Posteriormente, con una punta nueva se añadieron 25 µl de esta dilución al siguiente tubo y así sucesivamente hasta completar 6 diluciones. El ensayo se realizó por triplicado. Se sembraron 100,000 células por pozo en placas de 24 pozos, donde cada pozo fue inoculado con 100 µl de las diferentes diluciones del virus; como controles se utilizaron células no infectadas y células a las que se les adicionó el virus sin diluir. Se incubaron por 1 h a 37°C en una atmósfera de humedad al 5% de CO₂ y después de este tiempo se añadieron 500 µl/pozo de medio Overlay (medio MEM 2X (GIBCO) suplementado con L-glutamina a 2 mM, suero fetal bovino al 10%, 100 unidades/ml de antibiótico, carboximetilcelulosa (CMC de SIGMA) al 3% estéril. Finalmente, las células fueron incubadas a 37°C durante 5 días.

Al término de la incubación se decantó el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS 1X. Posteriormente, se adicionaron 500 µl de metanol al 80% y se dejaron incubando 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas una vez más con PBS 1X, se adicionó 1 ml de PBS-Leche (SIN Tween) al 5% para y se dejó incubando 20 min a temperatura ambiente sin agitación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se decantó la solución bloqueadora y las células se lavaron con PBS 1X. Se adicionaron 200 µl de anticuerpo primario (4G2 1:2000) disuelto en PBS-Leche (sin Tween) al 5% y se incubó 1 hora a 37°C en agitación. Después se lavaron 1 vez con 1 ml de PBS-leche y adicionaron 200 µl por pozo de anticuerpo secundario y se incubó 1 hora en agitación a 37°C. Se realizaron 2 lavados con PBS 1X, se decantó la placa y dejó secando 5 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente se adicionaron 180 μ l de True Blue por pozo y se incubaron 10 min a temperatura ambiente sin agitación y se procedió a contar las placas. El cálculo se realizó de la siguiente manera:

(Log) (Promedio de placas x 10^{x+1})

5.5 Plásmidos

5.5.1 pJET1.2

Es un vector de clonación de 2974 pb, contiene un gen de resistencia a ampicilina para seleccionar las células transformantes, un sitio múltiple de clonación para insertar el gen de interés, el gen letal Eco471R cuya disrupción por el fragmento introducido conduce a la supervivencia de las células transformantes y el promotor T7 para la transcripción *in vitro* del fragmento clonado.

Debido a que al inicio del proyecto no contábamos con ningún aislado de ZIKV, la secuencia codificante de la proteína de envoltura (1512 pb) del ZIKV (reportada por el InDRE, con número de código de genbank KU922960.1) que se usó en este trabajo se sintetizó por métodos químicos y se clonó dentro del vector pJET1.2 (Figura 6). Posteriormente se analizó la comparación de las secuencias de la proteína de envoltura del ZIKV y los cuatro serotipos de DENV mediante un análisis de alineamiento con ayuda del software ClustalW2 (todas reportadas por el InDRE). En los extremos 5' y 3' se adicionaron los sitios de restricción de las enzimas *KpnI* y *XbaI* (con los cuales se clonó la secuencia en el vector de expresión), además se realizó un análisis de la secuencia y digestión con las enzimas antes mencionadas para confirmar que no existían sitios de corte internos en el inserto que interfirieran al liberar la secuencia.

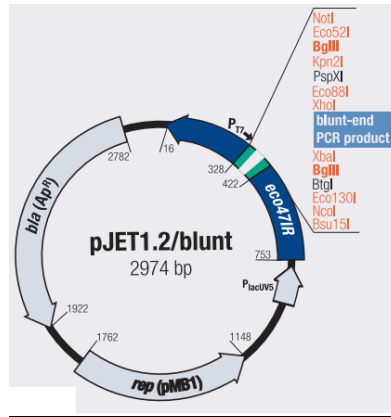


Figura 6. Características y elementos que componen al vector de clonación pJET1.2

5.5.2 pMTBiP/V5-His

La clonación de las proteínas recombinantes se llevó a cabo en el plásmido pMTBiP/V5-His, el cual es un vector de expresión diseñado para las células S2 de *Drosophila*. Este sistema proporciona un rendimiento óptimo de la proteína expresada. La secuencia del inserto se encuentra bajo el control del promotor de la metalotioneína de *Drosophila* (pMT) y el cual es inducible por cobre. Se empleó CuSO_4 como inductor. Río arriba del sitio múltiple de clonación se encuentra la secuencia señal de secreción BiP, para la secreción de la proteína con la cual esta fusionada. Río abajo se encuentra el epítipo V5 y una secuencia de seis histidinas que permiten la identificación de la proteína recombinante por medio de un anticuerpo específico para cada uno. Por último, el vector tiene un gen de resistencia a ampicilina para su expansión en bacterias (Figura 7A).



Figura 7. 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

5.5.3 Plásmido de resistencia a blasticidina pCoBlast

Este plásmido contiene un gen de resistencia a blasticidina, el cual se encuentra bajo el control del promotor *copía* de *Drosophila* para su expresión constitutiva y la selección de las células transfectadas establemente. Además, contiene un origen de replicación pUC, una señal de poliadenilación para el transcrito y un gen de resistencia a ampicilina para la selección de las colonias transformadas (Figura 7B).

5.6 Obtención del plásmido para generar la construcción

5.6.1 Obtención de la secuencia de la proteína E

El plásmido pJET1.2 que contiene el fragmento codificante de la proteína E del virus Zika fue digerido secuencialmente con las enzimas de restricción KpnI y XbaI utilizando el buffer de reacción NEbuffer 2 (New England Biolabs), albumina sérica bovina (BSA), las enzimas de restricción y el ADN plasmídico en un volumen final de 20 μ L. La reacción de digestión se incubó por dos horas a 37°C. Las concentraciones finales de cada reactivo para la digestión se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones para las digestiones con enzimas de restricción

Reactivo	[Inicial]	[Final]
Buffer	10X	1X
BSA	100X	1X
dNTPs	10mM	2mM
ADN	-	-
KpnI	20,000 U/mL	20 U/mL
XbaI	20,000 U/mL	20 U/mL
Agua	-	-
Total		20 μ L

Posteriormente se corrió en un gel de agarosa al 1X, este se observó en un trasiluminador con luz ultravioleta y se cortó la banda que correspondía al peso molecular esperado con ayuda de una navaja para después purificarlo con ayuda de una columna con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.6.2 Digestión del plásmido

El plásmido pMTBiP/V5-His fue digerido secuencialmente con las enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI* como ya se describió para el plásmido pJET1.2. Posteriormente se corrió en un gel de agarosa al 1X para corroborar que el plásmido fue linealizado.

5.6.3 Ligación del plásmido con el inserto

La ligación se realizó utilizando el ADN plasmídico y el inserto que se purificaron en columna y la T4 ligasa. La reacción de ligación se llevó a un volumen total de 20µL con agua inyectable y se incubó a 22°C durante toda la noche. Los volúmenes de cada reactivo se muestran en la tabla 3:

Tabla 3. Condiciones para la reacción de ligación

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

5.6.4 Transformación de células competentes de *E. coli* por choque térmico

Se creció una colonia de bacterias DH5 α toda la noche a 37°C, a partir de dicho cultivo se realizó una dilución 1:20 en un matraz de 250 mL con medio Luria Bertani (LB) sin antibiótico, cultivando durante aproximadamente un hora con quince minutos o hasta haber alcanzado una densidad óptica de 0.4-0.6 (fase exponencial), se centrifugaron las bacterias a 3600 rpm por 15 minutos con el fin de obtener una pastilla, la cual fue resuspendida en TSS (del inglés Transformation and Storage Solution) 2X estéril frío (para 50 mL, 1g de LB, 10g de PEG, 40mM de MgSO₄ o MgCl₂) a un pH de 6.5, posteriormente se colocaron 250 μ L en tubos fríos para microcentrífuga de 1.5 mL. Posteriormente a cinco tubos etiquetados como A, B, C, ligasa (+) y ligasa (-) se agregaron 10 μ L de los productos de ligación (pMTBiP/V5-His/E), A, B, C, ligasa (+) y ligasa (-), al sexto tubo etiquetado como 50 ng como control positivo de transformación se agregaron 2 μ L del plásmido sin digerir a una concentración de 50ng/mL y el séptimo tubo se utilizó como control negativo. Estos se incubaron por 30 minutos a 4°C, se aplicó un choque térmico por 45 segundos a 42°C y se incubó por un minuto a 4°C. Posteriormente se adicionaron 500 μ L de caldo LB a cada tubo y se incubaron por una hora a 37°C en agitación suave. Finalmente, cada tubo fue plaqueado en placas de agar LB con ampicilina y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

5.7 Análisis de las bacterias transformadas

5.7.1 Extracción de ADN plasmídico

Posterior a la transformación de las células DH5 α se seleccionaron seis colonias de las placas etiquetadas como A, B. y C para su crecimiento en 10 mL de medio LB con 120 μ g/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C en agitación durante toda la noche.

Al siguiente día, se concentró el cultivo anterior en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL, centrifugando a 13,000 rpm por un minuto y decantando el medio después de cada centrifugación. Posteriormente se agregaron 300 μ L de TENS (10mM de

Tris HCl pH 8.0, 1mM de EDTA pH 8.0, 0.1M de NaOH y 0.5% de SDS) y se homogenizó en vórtex por 5 segundos. Posteriormente se neutralizó el TENS con 150 μ L de acetato de sodio 3M, se centrifugó por 15 minutos a 13,000 rpm y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo. Enseguida se agregaron 900 μ L de etanol absoluto frío para precipitar durante una hora a -70°C , se centrifugó por 15 minutos a 13,000 rpm y finalmente se lavó dos veces con etanol frío al 70% centrifugando por 5 minutos a 13,000 rpm entre cada lavado. Al final se decantó el etanol y se dejó secar para resuspender en 20 μ L de agua inyectable.

5.7.2 Mapeo de restricción de la construcción

Se tomaron 10 μ L de los diferentes plásmidos extraídos y fueron digeridos con las enzimas de restricción *KpnRI* y *XbaI* utilizando las condiciones antes mencionadas para digestión con el fin de liberar el inserto de un peso molecular de ~ 1500 pb; la reacción de digestión se resolvió en un gel de agarosa al 1%.

5.8 Obtención de la construcción a gran escala

Una vez analizado y seleccionado la colonia que contenga el plásmido con el inserto se escaló el cultivo a un volumen de 300 mL de caldo LB con ampicilina a una concentración 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ adicionando 150 μ L del cultivo de DH5 α transformado, se incubó durante 12 horas, para la extracción del DNA se utilizó el kit para purificación de plásmidos Plasmid Maxi Kit QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se determinó la concentración del plásmido por espectrofotometría. Los plásmidos recombinantes se secuenciaron para corroborar que todos los elementos se mantuvieran en marco de lectura y sin mutaciones.

5.9 Expresión de las proteínas recombinantes en el sistema S2

5.9.1 Transfección transitoria de las células S2

Las células S2 se cultivaron en placas de seis pozos a una densidad de 1×10^6 células/mL en un volumen final de 3 mL/pozo y se incubaron a 28°C por 24 horas. Pasado este tiempo se prepararon las soluciones A y B (Tabla 4) para la transfección con cloruro de calcio (CaCl_2) incluyendo un control de transfección con

el plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) y un control con el vector parental. El tubo B se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente el contenido del tubo A se adicionó por goteo en el tubo B; esta mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se retiró el medio de las células S2, se adicionó la mezcla de transfección para incubarla durante 24 horas a 28°C. Posteriormente se lavaron las células una vez y se resuspendieron en medio S2 suplementado, se incubaron a 28°C por 48 horas, se realizó la inducción de las células transfectadas con CuSO₄ a una concentración final de 500 µM y se evaluó la expresión de las proteínas por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-V5-FITC y en el sobrenadante por Western blot con un anticuerpo anti-His-HRP y el anticuerpo Clona 21 (generado en nuestro laboratorio) que reconoce la proteína de envoltura de los cuatro serotipos del DENV y ZIKV (León-Juárez, et al., 2013).

Tabla 4. Soluciones para la transfección de las células S2

Solución A	Solución B
19 µg de DNA recombinante	30 µg de HBS (Buffer Salino HEPES)
36 µL de CaCl ₂ 2M	
Llevar a 300 µL con agua para cultivo celular	

5.9.2 Obtención de células establemente transfectadas

Una vez que se comprobó que las proteínas se expresaban en el sistema S2, se procedió a realizar la transfección estable. Las células S2 se cotransfectaron con el plásmido pCoBlast (que contiene un gen de resistencia a blasticidina) y la construcción que codifica para la proteína recombinante E-ZIKV siguiendo el método de transfección mencionado anteriormente en una proporción 29:1. La transfección se lavó a las 24 horas para eliminar el exceso de calcio y se incubó durante 48 horas más con medio suplementado. Pasado este tiempo, se inició la selección de las transfectantes estables con blasticidina a una concentración final de 25µg/mL agregándola cada cuatro días durante tres semanas y se hicieron lavados para eliminar los restos de células muertas hasta observar colonias de células resistentes. Pasadas las tres semanas se realizó un pase 1:2, las células de

un pozo se mantuvieron en selección y se expandieron, mientras que las células del otro pozo se indujeron con CuSO_4 para evaluar la expresión de las proteínas recombinantes.

5.9.3 Preparación de las proteínas

Las proteínas se concentraron a partir del sobrenadante de las células S2 estables. Se recolectó todo el sobrenadante del módulo rotatorio y se centrifugó a 2000 rpm por 20 minutos para separar a las células y recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo. El sobrenadante se concentró con columnas de 30 KDa y se evaluó la presencia de la proteína recombinante E de ZIKV mediante Western blot con un anticuerpo anti-proteína E Clona 21.

5.10 Determinación de anticuerpos IgM e IgG contra la proteína rE-ZIKV

Se sensibilizaron placas de 96 pozos con la proteína recombinante E-ZIKV o PrME-DV2 (Despres et al., 2000, Instituto Pasteur) ambas a una concentración de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en buffer de carbonatos y se incubaron a 4°C toda la noche. Los pozos se lavaron tres veces con buffer de fosfatos salino (PBS) 1X con 0.1% (v/v) de Tween 20 (PBST) y se bloquearon con 100 μL de albúmina de suero bovino (BSA) al 5% en PBS 1X por 1 h a 37°C, posteriormente se realizaron tres lavados con PBST. Se realizaron diluciones seriadas 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 en BSA al 2% en PBS 1X de los sueros de los pacientes (Tabla 1) y se colocaron 50 μL de cada dilución de los sueros por triplicado en las placas y se incubaron por una hora a 37°C. Después de tres lavados con PBST, se adicionaron 50 μL de los anticuerpos secundarios correspondientes: anti humano IgG-HRP y anti humano IgM-HRP (del inglés Horseradish peroxidase), diluidos 1:10000 en BSA al 2% en PBS 1X y se incubaron por 1 h a 37°C y se realizaron tres lavados con PBST. Posteriormente se procedió a revelarlas con *ortofenilendiamina* (OPD) a una concentración de 0.03 mM solubilizado en regulador de citratos 1X pH:5.6, se adicionaron 50 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ del sustrato H_2O_2 en proporción 60:1 y las placas se incubaron por 20 minutos a 37°C en oscuridad. La reacción fue detenida con 30 μL por pozo con una solución de

H₂SO₄ 2N. Finalmente las placas se analizaron en un lector de ELISA a una longitud de onda de 450nm. Los controles negativos incluyeron sensibilizar con la solución de carbonatos más los anticuerpos primario y secundario (control sin antígeno), sensibilizar con la proteína rE-ZIKV más el anticuerpo primario sin el anticuerpo secundario (control de anticuerpo secundario) y sensibilizar con la proteína rE-ZIKV más el anticuerpo secundario sin el anticuerpo primario (control de anticuerpo primario).

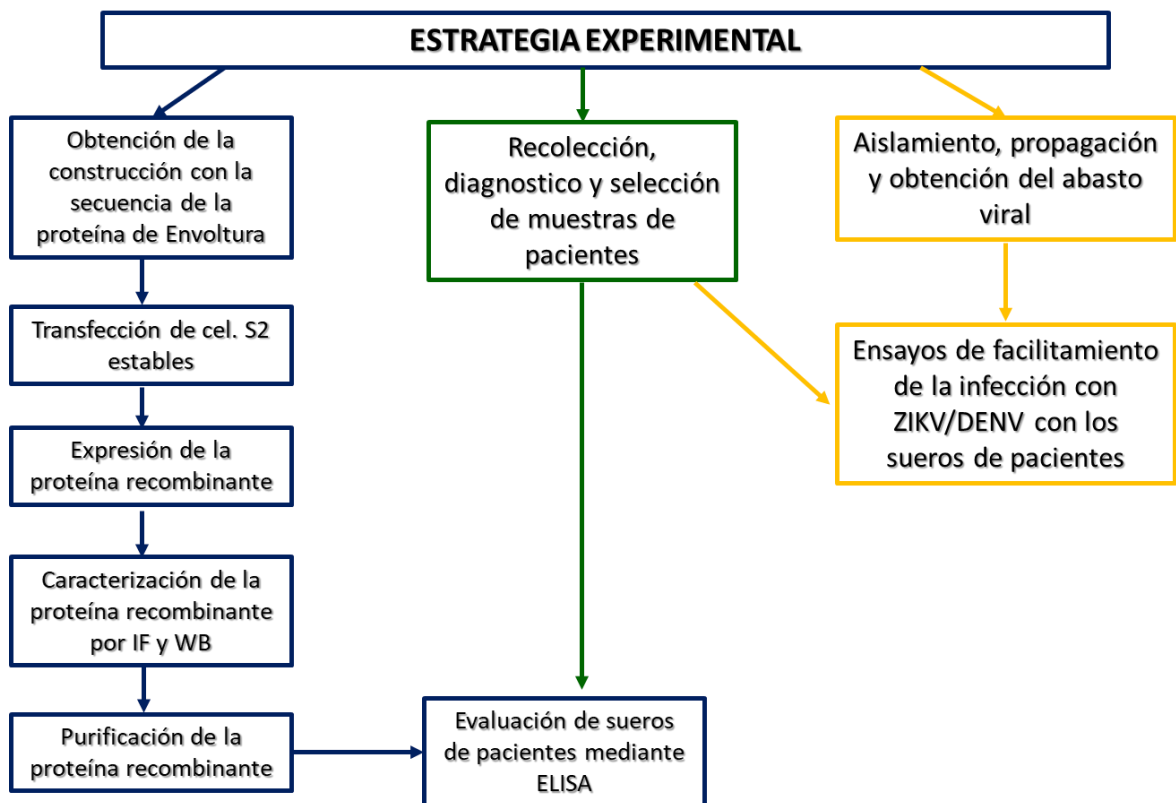
5.11 Ensayo de ADE

Se diluyeron en forma seriada (1:10²-1:10⁶) 15 sueros de pacientes de cada grupo analizado anteriormente en el ensayo de ELISA (Dengue clásico, Dengue hemorrágico, Zika y zona no endémica) y fueron incubados con 2.5 MOI de ZIKV ó DENV por 2 hr a 37°C. Como control positivo de facilitamiento se empleó el anticuerpo monoclonal 4G2 que reconoce la región del asa de fusión en el DII de la proteína E. Las mezclas de virus y suero/anticuerpo monoclonal fueron adicionadas en una placa de 96 pozos que contenía 50,000 células K562/pozo en 200 µL de medio RPMI suplementado con SFB descomplementado al 2%, antibiótico-antimicótico al 1% (penicilina sódica 10,000U/mL, sulfato de estreptomina 10,000µg/mL, anfotericina B 25µg/mL y tilosina al 0.1%), y L-Glutamina al 1%. Las células fueron infectadas por 24 horas a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂. Las células se colectaron por centrifugación, posteriormente se lavaron con PSB-EDTA al 0.2% y se fijaron/permeabilizaron empleando la solución permeabilizante Cytifix/Cytoperm (BD; 554722) por 20 min en hielo. Las células se tiñeron usando el anticuerpo 4G2 en una dilución 1:200 por 30 min en agitación en hielo seguido del anticuerpo anti-ratón Alexa Fluor 488 (Life Technologies; A11029) en una dilución 1:700 por 30 min en agitación en hielo cubierto de la luz. Realizando lavados con 100 µL de la solución Perm/Wash (BD; 554723) diluida 1:10 en agua MQ en cada paso de la tinción. La cantidad de células infectadas fue determinada usando citometría de flujo, considerando el porcentaje de células 4G2+.

5.12 Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como datos individuales o como la media \pm desviación estándar. Las comparaciones estadísticas se hicieron con la prueba de *t* de Student para la determinación de las diferencias entre dos medias muestrales y en el caso de más de dos se empleó la prueba de ANOVA no paramétrico. $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Los experimentos se analizaron con el software GraphPad Prism v.5.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. RESULTADOS

Debido a que los cuatro serotipos de DENV cocirculan en nuestro país y a la reciente introducción de ZIKV, se realizó un alineamiento de la secuencia de la proteína E de los cuatro serotipos de DENV y ZIKV de aislados de nuestro país reportados por el InDRE (el número de acceso de genbank se indica en la Tabla 5). Se puede observar que estas comparten de un 57-62% de secuencia (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de homología de la secuencia de la proteína E

	DENV-1 (KM279419.1)	DENV-2 (HM171541.1)	DENV-3 (HM171540.1)	DENV-4 (HM171540.1)	ZIKV (KU922960.1)
DENV-1 (KM279419.1)	100%	65.58%	69.37%	64.21%	57.44%
DENV-2 (HM171541.1)		100%	64.67%	66.34%	58.57%
DENV-3 (HM171540.1)			100%	64.33%	61.05%
DENV-4 (HM171571.1)				100%	62.56%
ZIKV (KU922960.1)					100%

Nos basamos en la secuencia reportada por el InDRE (KU922960.1) para poder diseñar nuestra proteína E recombinante.

7.1 Clonación de la secuencia de la proteína E de ZIKV

El plásmido pJET2.1 que se diseñó y contiene la secuencia codificante de la proteína E fue digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI*, el fragmento correspondiente a la proteína E se purificó a partir del gel de agarosa con el kit QIAquick Gel Extraction Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 8A).

Por otro lado, se digirió el plásmido pMTBiP/V5-His B con las enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI* de manera secuencial y se corrió en un gel de agarosa al 1% utilizando como control de digestión al plásmido sin digerir, se puede observar la linealización total del plásmido de un tamaño aproximadamente 3.6Kb (Figura 8B).

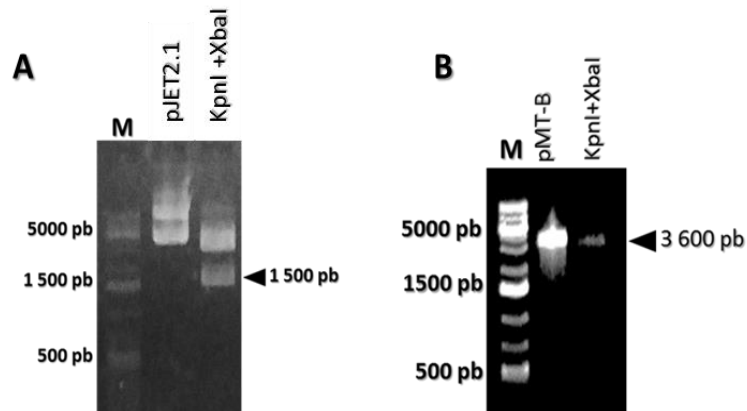


Figura 8. Digestión de los plásmidos pJET2.1 y pMTBiP/V5-His. **A.** Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 plásmido sin digerir, carril 3 producto de digestión con *KpnI* y *XbaI* con un tamaño aproximado de 1.5 Kb. **B.** Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 plásmido sin digerir, carril 3 plásmido linealizado producto de digestión con *KpnI* y *XbaI* con un tamaño aproximado de 3.6 Kb

Una vez digeridos tanto el fragmento como el plásmido se sometieron a una reacción de ligación empleando la ligasa T4. Posteriormente estos productos de ligación se usaron para transformar bacterias competentes *E. coli* DH5 α y se plaquearon en medio LB con ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C.

Posterior a la incubación se tomaron cinco colonias de cada placa y se inocularon en medio LB con ampicilina a 37°C en agitación durante 12 horas. Como ya se mencionó en materiales y métodos se extrajo el DNA plasmídico, se purificó y se digirió con las enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI* para determinar qué colonias contenían el inserto.

De los cultivos de las colonias que liberaron el inserto de interés, se tomaron 150 μ L y se colocaron en 300 mL de caldo LB con ampicilina para extraer el ADN plasmídico con el kit QIAGEN Plasmid Maxi kit. Posteriormente el plásmido obtenido del Maxiprep se volvió a digerir con las enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI* para confirmar que se liberaría el fragmento correspondiente a la proteína E (~1500 pb) (Figura 9), además se mandó secuenciar para verificar que contenía todos los elementos y que se encontrarán en el marco de lectura correcto (Figura 10).

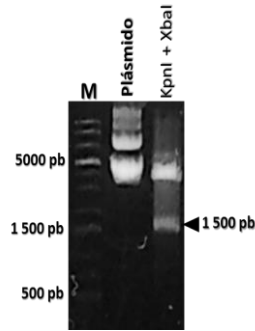


Figura 9. Digestión del plásmido pMTE-ZV. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular, carril 2 el plásmido sin digerir y en el carril 3 al producto de digestión con las enzimas KpnI y XbaI de 1.5 Kb.

FORWARD

CTACCTATATGAGTTATGCATATTACTGGCCGTCGTGGCCTTTGTTGGCCTCTCGCTCGGGAGATCT
 CCATGGCCCGGGGTACCTATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGTATGT
 CAGGTGGGACTTGGGTTGATGTTGTCTTGAACATGGAGGTTGTGTACCCTAATGGCACAGGAC
 AAACCGACTGTCGACATAGAGCTGGTTACAACAACAGTCAGCAACATGGCGGAGGTAAGATCCTA
 CTGCTATGAGGCATCAATATCAGACATGGCTTCGGACAGCCGCTGCCAACACAAGGTGAAGCCT
 ACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATGTCTGCAAAAGAACGTTAGTGGACAGAGGCTGGGGA
 AATGGATGTGGACTTTTTGGCAAAGGGAGCCTGGTGACATGCGCTAAGTTGCATGCTCCAAGAA
 AATGACCGGGAAGAGCATCCAGCCAGAGAATCTGGAGTACCGGATAATGTTGTCAGTTTCATGGCT
 CCCAGCACAGTGGGATGATCGTTAATGACACAGGACATGAAACTGATGAGAATAGAGCGAAGGT
 TGAGATAACGCCAATTCACCAAGAGCCGAAGCCACCCTGGGGGTTTTGGAAGCCTAGGACTTG
 ATTGTGAACCGAGGACAGGCCTTGACTTTTTCAGATTTGTATTACTTGACTATGAATAACAAGCACT
 GGTTGGTTCACAAGGAGTGGTTCACGACATTCCATTACCTTGGCACGCTGGGGCAGACACCGGA
 ACTCCACACTGGAACAACAAGAAGCACTGGTAGAGTTCAAGGACGCACATGCCAAAAGGCAAA
 CTGTCTGGTTTTCTAGGGAGTCAAGAAGAGCAGTTCACACGGCCCTTGCTGGAGCTCTGGAGCTG
 AGATGGATGGTGCAAAGGGAAGCTGTCTCTGGCCACTTGAAATGTCGCCTGAAATGGATAAAAC
 TTAGA

REVERSA COMPLEMENTARIO

TCCAGAATTTGGTATTTACTTGACTTATGAATAACAAGCACTGGTTTGGTTCACAAGGAGTGGTCA
 CGACATCATTACCTTTGGCACGCTGGGGCAGACAACCTGGAACCTCACACTGGAACAACAAGAAGC
 CTGGTAGAGTTCAAGGACGCACATGCCAAAAGGCAAACTGTCGTGGTTCTAGGGAGTCAAGAAG
 GGCAGTTCACACGGCCCTTGCTGGAGCTCTGGAGGCTGAGATGGATGGTGCAAAGGGAAGGCTG
 TCCCTGGCCACTTGAAATGTCGCCTGAAAATGGATAAACTTAGATTGAAGGGCGTGCATACCTCT
 TGTACCGCAGCGTTCACATTCACCAAGATCCCGGCTGAAACACTGCACGGGACAGTCACAGTGGGA
 GTACAGTACGCAGGGACAGATGGACCTTGAAGGTTCCAGCCAGATGGCGGTGGACATGCAAAA
 CTCTGACCCCAGTTGGGAGGTTGATAACCGCTAACCCCGTAATCACTGAAAGCACTGAGAACTCTA
 AGATGATGCTGGAACCTTGATCCACCATTTGGGGACTCTTACATTGTCATAGGAGTCGGGGAGAAG
 AAGATCACCCACCACTGGCACAGGAGTGGCAGCACCATTGGAAAAGCATTGGAAGCCACTGTGAG
 AGGTGCCAAGAGAATGGCAGTCTTGGGAGACACAGCCTGGGACTTTGGATCAGTTGGAGGCGCT
 CTCAACCATTGGGCAAGGGCATCCATCAAATTTTGGAGCAGCTTCAAATCATTGTTGGAGGAA
 TGTCTGTTCTCACAATTTCTATTGGAACGTTGCTGATGTGGTTGGGTCTGAACACAAGAATGA
 TCTATTTCCCTTATGTGCTTGGCCTTAGGGGAGTGTGATCTTCTTATCCACAGCCGTCTCTGCTG
 CTCGAGTCTAGAGGGCCCGCGGTTGAAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATT
 TACCGTACCGGTCATCATCACCACCATGAGAAATGTG

Figura 10. Análisis de la secuencia de la proteína E clonada en el vector de expresión pMT/BiP/V5-His. En amarillo la secuencia de secreción BiP, en verde la secuencia V5, en rosa la secuencia de polihistidinas y en azul los sitios de restricción que se adicionaron. Las letras resaltadas en color rojo indican el sitio de inicio de la traducción.

7.2 Expresión de las proteínas recombinantes en el sistema S2

7.2.1 Transfección transitoria de las células S2

Las células S2 se transfectaron en forma transitoria con la construcción pMTE-ZV como ya se mencionó en materiales y métodos, posteriormente se indujeron con CuSO_4 y cinco días después de la inducción se analizó la expresión de la proteína recombinante por inmunofluorescencia (Figura 11A), como control de transfección se empleó el plásmido pMT-GFP (Figura 11C) y en el panel D de la misma figura se puede apreciar las células sin transfectar.

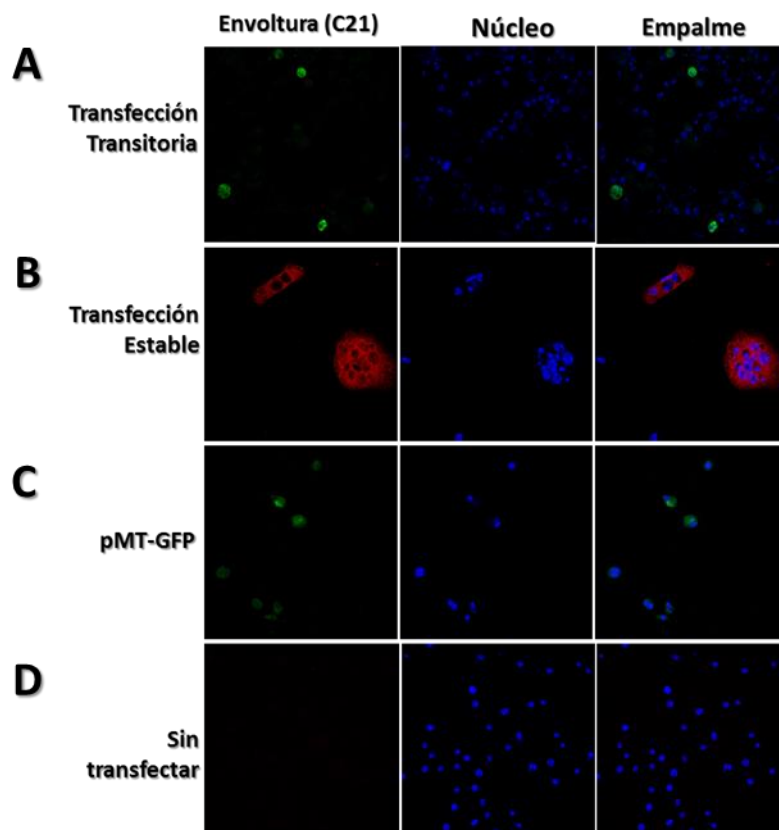


Figura 11. Inmunofluorescencia de células S2 transfectadas con pMTE-ZV. A. Las células S2 fueron transfectadas de forma transitoria con el plásmido pMTE-ZV y posteriormente se empleó como anticuerpo primario C21 y como secundario Alexa 488 para observar en verde las células que

expresan la proteína. **B.** Células S2 trasfectadas establemente con los plásmidos pMTE-ZV y pCoBlast, y posteriormente se empleó como anticuerpo primario C21 y Cy3 como anticuerpo secundario, se observa con rojo a las células que expresan la proteína E. **C.** Control de transfección empleando un plásmido pMT-GFP. **D.** Células S2 sin transfectar. En azul se puede apreciar los núcleos teñidos con DAPI.

7.2.2 Transfección estable de células S2

Una vez que se corroboró la expresión de las proteínas recombinantes, se cotransfectaron las células S2 con las construcciones pMTE-ZV y un plásmido de resistencia a blasticidina (pCoBlast) en una relación 29:1 (19 µg del plásmido pMTE-ZV + 1 µg del plásmido pCoBlast); cinco días después las células se seleccionaron con blasticidina hasta que se establecieron las colonias resistentes y cuando alcanzaron 100% de confluencia y se indujeron para evaluar la expresión de las proteínas por inmunofluorescencia (Figura 11B).

Una vez obtenidas las células estables se realizó una cinética de expresión de la proteína a partir del día 6 al 16 post inducción, analizando el sobrenadante mediante Western blot con ayuda del anticuerpo anti-proteína E (C21). En la Figura 12 se puede observar la presencia de la banda correspondiente a 55 KDa. Se observa al día 10 el máximo de expresión de proteína.

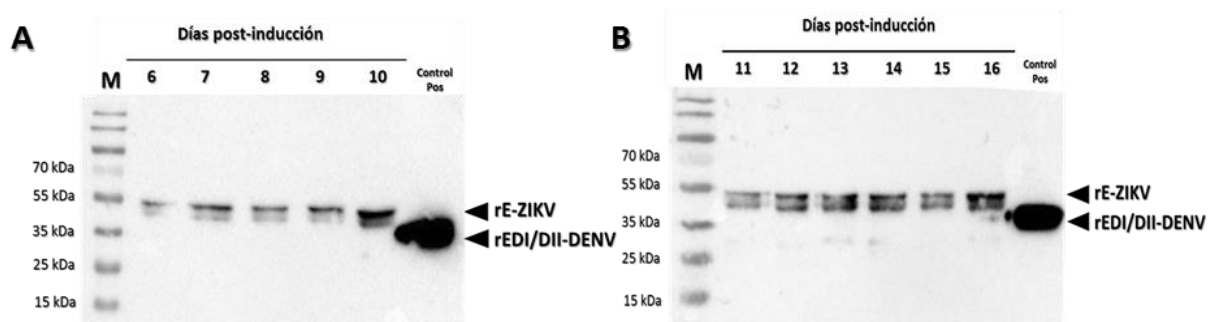


Figura 12. Cinética de expresión de la proteína rE-ZIKV. Los sobrenadantes de las células establemente transfectadas se recolectaron del día 6 al 16 post-inducción analizando la expresión de la proteína por WB. **A.** Expresión de la proteína rE-ZIKV obtenida de los sobrenadantes del día 6 al 10 post inducción. **B.** Expresión de la proteína rE-ZIKV obtenida de los sobrenadantes del día 11 al 16 post inducción. Como control positivo se empleó la proteína rEDI/DII-DENV.

7.3 Concentración de la proteína recombinante

Una vez que se determinó el día de expresión óptimo de la proteína, se expandieron las células estables hasta 300 millones, se transfirieron a un módulo rotatorio, se indujeron con CuSO_4 750 μM y al día 10 post-inducción se recolectó el sobrenadante, este se concentró primero con ayuda del equipo de concentración de proteínas Amicon® Stirred Cells empleando una membrana de 10 KDa y posteriormente con columnas de 30 KDa y se comprobó la presencia de la proteína recombinante mediante Western blot en el cual se observó la presencia de una banda de ~55 KDa que corresponden al peso molecular esperado, así como otra adicional en ~100 KDa que nos indica la formación de dímeros (Figura 13).

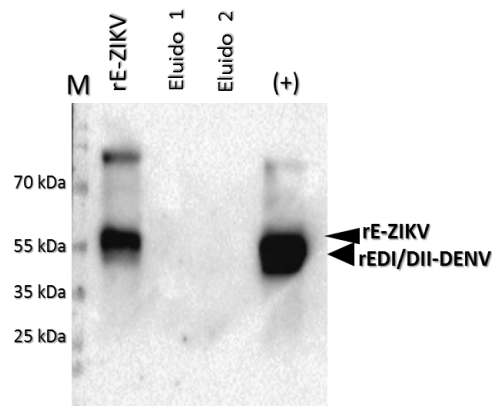


Figura 13. Purificación de las proteínas recombinantes. La proteína recombinante rE-ZIKV contenida en el sobrenadante del módulo rotatorio se concentró con ayuda del equipo Amicon® y una columna de 30KDa. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 proteína rE-ZIKV concentrada, carril 3 y 4 eluidos y carril 5 proteína rEDI/DII-DENV usada como control positivo

7.4 Evaluación de sueros de pacientes con Dengue y Zika con las proteínas rE-ZIKV y rPrM-E-DENV2, mediante ensayos de ELISA

La proteína recombinante se utilizó para sensibilizar placas de ELISA a una concentración de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todos los datos y especificaciones de los diferentes sueros se encuentran en la Tabla 1, dichos sueros se emplearon a diluciones seriadas desde 1:100 hasta 1:800 para evaluar los títulos de los anticuerpos IgM e IgG que reconocen a las proteínas rE-ZIKV y rPrM-E-DENV2 (Figura 14 y 15). Los datos se graficaron de acuerdo a los títulos obtenidos por cada muestra, de la misma

forma los sueros se agruparon de acuerdo a su procedencia. El punto de corte se estableció con base a la media del grupo de zona no endémica más dos desviaciones estándar, posteriormente se calculó el porcentaje de muestras de cada grupo que se encontraba por arriba del punto de corte.

En la respuesta de tipo IgM (Figura 15) encontramos en general una mayor cantidad de sueros de Dengue hemorrágico (DH) que sobrepasa el punto de corte para ambas proteínas 60.4% y 82% (rE-ZIKV y rPrM-E-DENV2 respectivamente) en comparación con los sueros de Dengue Clásico (DC) 34% y 54% (rE-ZIKV y rPrM-E-DENV2 respectivamente). Si prestamos atención al comparar los valores medios de los títulos obtenidos en ambos grupos para ambas proteínas notaremos que son muy similares, es decir, para DC tenemos medias de 216.9 y 257.8 (para rE-ZIKV y rPrM-E-DENV2 respectivamente) mientras que en DH se tienen valores medios de 356.4 y 322.3 (para rE-ZIKV y rPrM-E-DENV2 respectivamente), lo que nos sugiere que la gran mayoría de anticuerpos de clase IgM presentes en los sueros de pacientes con Dengue reconocen en forma cruzada a la proteína E de ZIKV.

Al analizar los sueros del grupo de Zika encontramos que un 54.5% de sueros por arriba del punto de corte para la proteína de ZIKV mientras que solo un 19% de estos reconoce la proteína de Dengue, esto nos propone que, a diferencia de lo observado en los sueros de Dengue, los Ac de tipo IgM presentes en los sueros de Zika son más específicos para este flavivirus.

Para el grupo control de zona endémica se obtuvo un alto porcentaje de muestras por arriba del punto de corte, 70% y 80% (para rE-ZIKV y rPrM-E-DENV2 respectivamente), esto nos sugiere que la mayoría de los sujetos de esta zona continuamente están expuestos a Dengue y estos anticuerpos presentan una alta reacción cruzada con la proteína E de ZIKV. Finalmente observamos una escasa reactividad del grupo control de zona no endémica hacia nuestros antígenos.

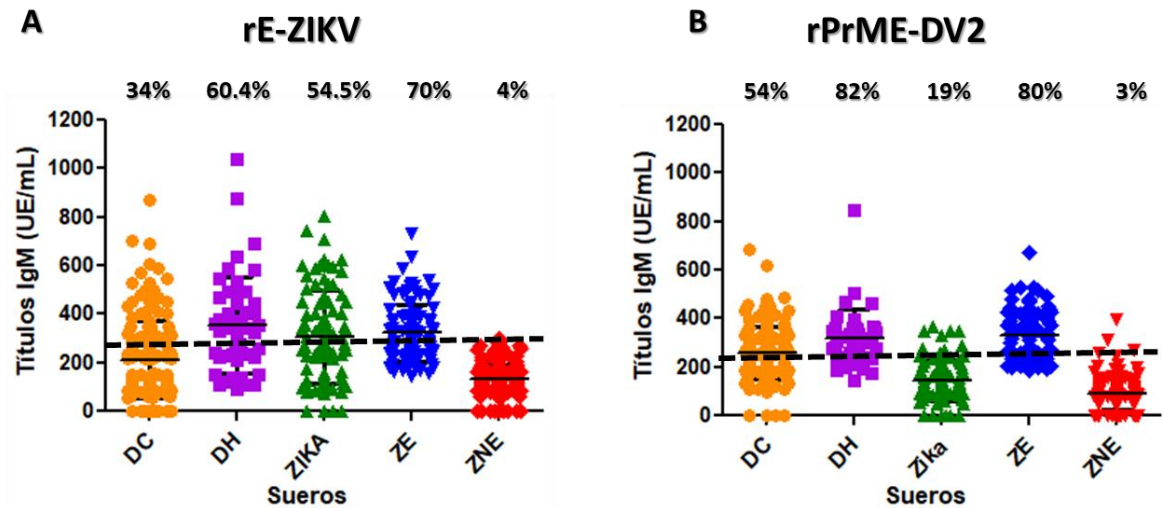


Figura 14. Evaluación de la respuesta de reacción cruzada de tipo IgM en sueros de pacientes con Dengue y Zika. Se evaluó la respuesta contra las proteínas recombinantes: **A. rE-ZIKV** y **B. rPrM-E-DENV2**. DC: Dengue Clásico (n=150), DH: Dengue Hemorrágico (n=45), Zika (n=88), ZE: Zona endémica (n=100) y ZNE: Zona no endémica (n=150). La línea punteada representa el punto de corte que fue establecido con base en el valor de la media del grupo de ZNE más 2 SD. Se graficaron los datos indicando la media con la desviación estándar de cada grupo.

Posteriormente se analizó la respuesta de tipo IgG (Figura 16), para esta se encontró que hay una mayor cantidad de sueros de DC que DH en el caso de rE-ZIKV 89.3% y 79.1% respectivamente (Figura 15A). Mientras que en el caso de rPrM-E-DENV2 (Figura 15B) para ambos grupos es muy similar DC: 99% y DH: 100%. Al comparar la respuesta para ambas proteínas encontramos que en cuanto al porcentaje de sueros arriba del punto de corte es un poco más alto para la proteína rPrM-E-DENV2 (99% para DC y 100% para DH) que para rE-ZIKV (DC: 89.3% y DH: 79.1%), sin embargo, al comparar la media de los títulos obtenidos encontramos que para rPrM-E-DENV2 DC es de 2395.5 mientras que en DH es de 2431.7 valores que están por arriba del doble de los que reconocen a la proteína E de Zika, DC: 905.4 y DH: 679.9. Estos datos aportan un claro indicio de la inmunodominancia del antígeno rPrM-E-DENV2: a pesar de que estos individuos viven en un área endémica y están continuamente expuestos a Dengue, la población de anticuerpos de reacción cruzada que presentan contra ZIKV es de solo alrededor de la mitad de los anticuerpos que pueden reconocer DENV, si esta cantidad de anticuerpos es suficiente para poder contener la infección con ZIKV y eliminarla es una pregunta que aún queda por resolver.

Los sueros del grupo de Zika presentan un 46.5% al reconocer a su antígeno homólogo mientras que tan solo 10% de muestras reconocen a la proteína heteróloga, una tendencia similar encontramos al comparar el título medio, rE-ZIKV: 345.3 rPrM-E-DENV2: 123.6, también cabe mencionar que estos valores están muy por debajo de lo que se observó con los sueros de Dengue. Dado que las muestras se colectaron en fase aguda de la infección, esto pudiera explicar la baja de anticuerpos de tipo IgG, además a pesar de ser pocos los anticuerpos de esta clase y que esta memoria apenas se está generando, estos presentan una baja reacción cruzada a DENV similarmente a lo que se observa en el escenario contrario. Sin embargo, es de llamar la atención que a pesar de que estas personas viven en un área endémica, los anticuerpos de memoria previamente generados para Dengue no parecen despertarse al encontrarse con este nuevo Flavivirus, lo cual pudiera sugerir que el ZIKV evoca una respuesta nueva y diferente.

Para el grupo control de zona endémica se observa una tendencia similar a la obtenida en los sueros de pacientes con Dengue, se obtuvo un 88% y 97% de muestras por arriba del punto de corte para las proteínas rE-ZIKV y rPrM-E-DENV2, respectivamente. Mientras que el título medio de los grupos fue de rE-ZIKV: 723.1 y rPrM-E-DENV2: 1577.8, nuevamente encontramos que los niveles basales de anticuerpos de reacción cruzada de tipo IgG se reducen a la mitad en la población, aunque si estos niveles son suficientes para proteger a la población de Zika tendría que determinarse. Finalmente observamos un escaso reconocimiento del grupo control de zona no endémica hacia nuestros antígenos.

En general podemos observar que las muestras de Dengue presentan títulos más altos de anticuerpos de tipo IgG que de IgM, lo que nos habla de repetidas exposiciones al virus.

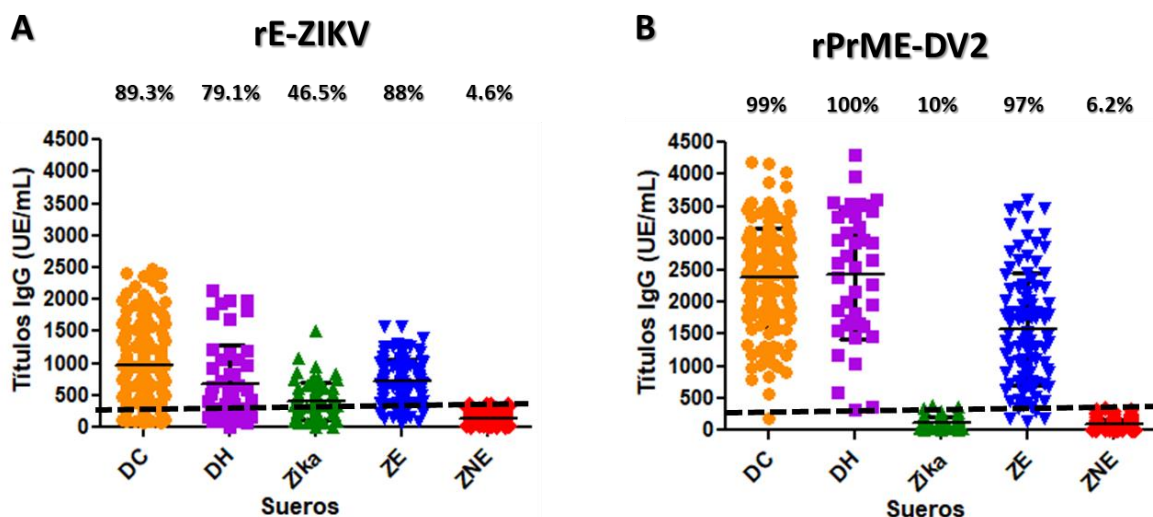


Figura 15. Evaluación de la respuesta de reacción cruzada de tipo IgG en sueros de pacientes con Dengue y Zika. Se evaluó la respuesta contra las proteínas recombinantes: **A.** rE-ZIKV y **B.** rPrM-E-DENV2. DC: Dengue Clásico (n=150), DH: Dengue Hemorrágico (n=45), Zika (n=88), ZE: Zona endémica (n=100) y ZNE: Zona no endémica (n=150). La línea punteada representa el punto de corte. Se graficaron los datos indicando la media con la desviación estándar de cada grupo.

7.5 Ensayo de ADE

Posteriormente se tomaron 15 sueros representativos de cada grupo (Dengue clásico, Dengue hemorrágico, Zika y zona no endémica) y se diluyeron de manera seriada (1:10²-1:10⁶) para realizar el ensayo de facilitamiento como se indica en la sección de materiales y métodos. En la Figura 16 podemos apreciar un panel representativo del ensayo de citometría de flujo para medir el ADE, en la parte A se indican los controles negativos que se tomaron en cuenta para realizar cada experimento estos incluyeron: células sin infectar, así como las células infectadas con 2.5 MOIs de ZIKV y células tratadas con 2.5 MOIs de ZIKV inactivo (Mock). En la parte B observamos el control positivo de facilitamiento empleando el anticuerpo monoclonal 4G2 a las diferentes diluciones y en la parte C se muestra un ejemplo representativo del facilitamiento de la infección empleando un suero de DC a las diferentes diluciones.

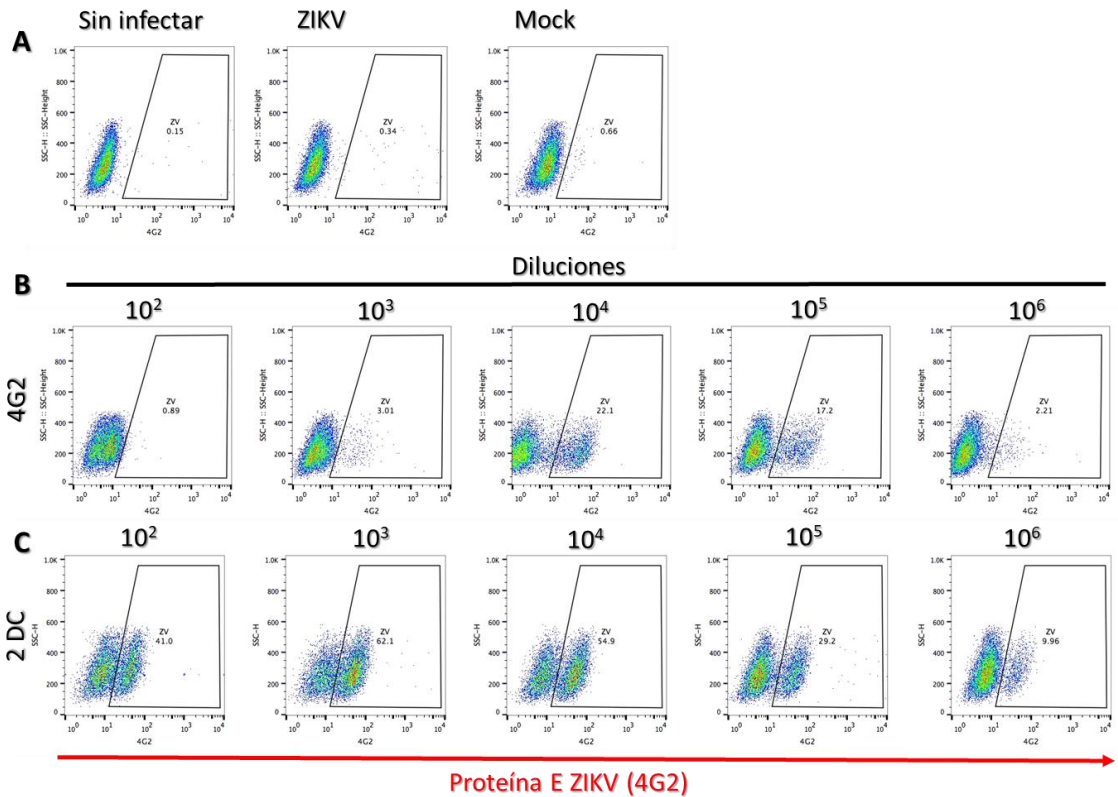


Figura 16. Resultados representativos del ensayo de citometría de flujo para medir el facilitamiento de la infección de ZIKV en células K562. A. Controles del ensayo de facilitamiento: células sin infectar, células infectadas con virus Zika y Mock. **B.** Control positivo de facilitamiento empleando el anticuerpo monoclonal 4G2. **C.** Suero de Dengue Clásico a las diferentes diluciones.

En la Figura 17A se observa que mientras algunos sueros de pacientes con DC presentan un porcentaje alto de infección (58.3-75.9%) otros no facilitan tanto (12-0.32%), cabe mencionar que los sueros con un incrementado ADE presentan un título bajo de anticuerpos (210-841 UE/mL) comparado con los sueros con un bajo porcentaje de infección cuyos títulos superan las 1000 UE/mL, todos estos valores para una dilución 10^3 del suero (Tabla 6). Para los sueros del grupo de DH (Figura 17A) encontramos que la gran mayoría de muestras presenta un incrementado ADE (32.5-53.42%), los títulos de estas muestras van de 266.7-1061.83 (Tabla 6). Como control además se facilitó la infección de ZIKV con los sueros de pacientes con Zika, se encontró que estos sueros facilitan la propia infección en un porcentaje de 0.71-43.8%, los títulos de estos sueros van desde 66.35-852.09 UE/mL. Como control

negativo se emplearon sueros de ZNE los cuales no presentan facilitamiento de la infección (Tabla 6).

Posteriormente al analizar los datos a una dilución 10^4 de los sueros (Figura 17B) observamos un comportamiento similar, para el grupo de DC, aunque se observa que algunas muestras presentan infecciones de 30.4-67.8% (cuyos títulos son los más bajos del grupo: 210-501 UE/mL) la gran mayoría de las muestras no presenta facilitamiento (0.33-5.18%). Mientras que los sueros de DH continúan presentando infecciones que van de 48.66-19.5%. Por su parte en el grupo de sueros de Zika se aprecia en general un aumento de la infección (14.5-52.8%) comparado con lo observado en la dilución 10^3 (Tabla 6). Como control negativo se emplearon sueros de ZNE los cuales no presentan facilitamiento de la infección.

En general podemos observar que a pesar de que un pequeño grupo de sueros de pacientes con DC presenta mayor facilitamiento, la mayoría de los sueros con DH son los que facilitan mayormente la infección. Mientras que los sueros de pacientes con Zika aumentan la infección a una dilución mayor.

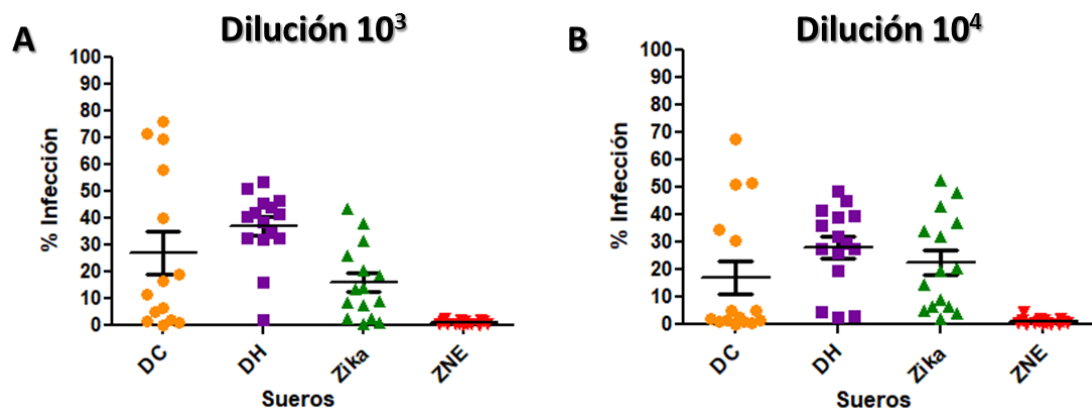


Figura 17. Evaluación del facilitamiento de la infección de ZIKV. Las muestras de suero de pacientes con Dengue clásico, Dengue hemorrágico, Zika y personas de zona no endémica todos con n=15, fueron evaluadas para el facilitamiento de la infección de Zika en un modelo de células K562 en una dilución de **A.** 10^3 y **B.** 10^4 .

Tabla 6. Resultados del facilitamiento de la infección de ZIKV

Sueros Dengue Clásico				Sueros Zika			
No. De suero	TITULO	Dilución suero		No. De suero	TITULO	Dilución suero	
		10 ³	10 ⁴			10 ³	10 ⁴
9	210.83	40.2	30.4	8	66.35	8.99	20.40
112	305.70	69.4	34.5	26	316.79	13.50	32.00
2	329.31	58.3	51.1	14	334.00	7.65	48.10
109	501.40	71.8	67.8	2	337.13	1.31	19.60
138	503.50	12.0	4.92	17	344.96	2.49	37.20
143	841.10	75.9	51.8	3	359.05	26.20	3.97
125	903.00	11.7	2.66	36	385.65	18.56	5.25
149	977.30	5.22	1.29	34	463.92	31.50	43.30
139	1338.00	6.65	1.58	12	465.48	0.71	34.00
228	1956.22	1.52	0.61	25	514.00	13.90	6.81
167	2104.26	16.7	5.18	18	620.44	38.00	6.40
170	2359.30	19.2	2.12	27	750.35	20.60	2.10
129	2560.00	1.3	1.06	1	770.70	43.80	14.50
134	2643.00	1.93	1.56	24	831.74	8.80	52.80
207	2756.32	0.32	0.33	5	852.09	2.60	8.90
Sueros Dengue Hemorrágico				Sueros Zona No Endémica			
No. De suero	TITULO	Dilución suero		No. De suero	TITULO	Dilución suero	
		10 ³	10 ⁴			10 ³	10 ⁴
66	83.89	41.52	25.90	8	0.00	0.65	0.65
113	113.00	38.50	39.70	5	14.95	1.91	2.28
71	164.96	46.50	39.10	6	44.29	1.72	0.87
294	166.52	43.90	36.10	2	59.95	1.7	1.7
80	210.35	40.80	27.50	10	62.69	1.4	1
62	266.70	32.59	27.69	9	67.38	0.61	4.37
121	473.78	15.90	2.59	14	72.47	0.3	0.45
92	562.52	42.26	48.66	7	75.60	0.41	0.6
131	642.35	45.70	45.00	11	97.51	0.58	0.39
70	648.61	51.25	29.35	15	97.51	0.3	0.26
72	731.57	34.70	4.53	4	117.47	1.99	1.93
290	928.78	32.10	32.00	1	124.90	2.55	1.8
41	1061.83	53.42	41.62	116	154.64	0.5	0.31
253	1198.00	32.50	19.50	12	163.25	0.34	0.28
78	1827.21	2.08	2.99	13	198.08	0.36	0.15

Posteriormente se realizó el experimento inverso, ahora se facilitó la infección del DENV empleando sueros de pacientes con Zika (Figura 18), en esta ocasión se logró observar un comportamiento similar al de la Figura 17 con los sueros de Zika, a una dilución de 10^4 se observa un ligero incremento de la infección (13.10-41.90%) comparado con la dilución 10^3 (15.30-34.90%). Aunque este facilitamiento es menor que al que presenta con virus Zika (0.71-43.8% para la dilución 10^3 y 14.5-52.8% para la dilución de 10^4) (Figura 17), cabe mencionar que los títulos de anticuerpos de reacción cruzada fueron mucho más bajos (47.59-215.68 UE/mL) que los que se observaron para su propio antígeno (66.35-852.06 UE/mL). Como control de facilitamiento se emplearon sueros de zona no endémica.

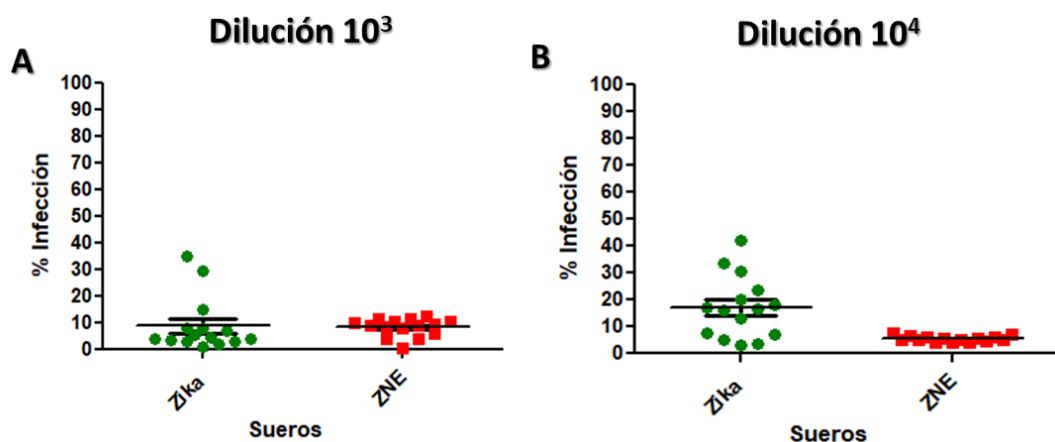


Figura 18. Evaluación del facilitamiento de la infección de DENV. Las muestras de suero de pacientes con Zika y personas de zona no endémica, todos con n=15, fueron evaluadas para el facilitamiento de la infección de Dengue en un modelo de células K562 a una dilución de **A.** 10^3 y **B.** 10^4 .

Tabla 7. Resultados del facilitamiento de la infección de DENV

Sueros Zika				Sueros Zona No Endémica			
No. De suero	TITULO	Dilución suero		No. De suero	TITULO	Dilución suero	
		10³	10⁴			10³	10⁴
34	47.59	4.14	33.70	2	0.00	0.61	5.35
2	73.27	2.93	5.01	4	0.00	8.40	4.80
25	97.33	15.30	23.50	6	12.82	4.05	4.05
5	98.27	4.52	3.40	10	50.87	8.90	5.62
14	108.54	2.02	41.90	1	62.55	11.70	5.01
3	109.94	5.35	16.00	8	99.67	10.60	7.02
112	112.28	1.32	3.29	12	105.04	9.62	6.03
108	112.49	3.27	6.91	5	121.85	4.05	4.05
27	121.36	29.50	17.20	11	134.92	9.88	5.06
26	132.57	7.88	18.20	15	136.09	6.26	4.99
36	140.97	34.90	13.10	7	231.34	11.50	6.74
24	149.38	3.47	30.70	14	232.28	8.16	4.15
1	156.85	3.90	16.40	13	261.23	10.70	5.14
18	210.54	7.06	20.10	116	269.63	12.5	7.83
17	215.68	8.11	7.69	8	270.80	9.23	6.22

8. DISCUSIÓN

En todos los Flavivirus la proteína E es el principal blanco de anticuerpos neutralizantes (Dai et al., 2016; Roehrig et al., 2004), estudios recientes han mostrado que la proteína E de ZIKV es estructuralmente altamente similar a la de DENV (Dai et al., 2016; Sirohi et al., 2016). Varios estudios han evaluado la respuesta específica de anticuerpos monoclonales identificando algunas regiones que son reconocidas de manera cruzada (asa de fusión y DI/DII) así como epítomos específicos de cada Flavivirus (epítomos conformacionales como el epítomo dímero de envoltura y DIII), por otro lado, también han evaluado un limitado número de muestras de suero que reaccionan contra el ZIKV (Dejnirattisai et al., 2016; Paul et al., 2016; Priyamvada et al., 2016; K Stettler et al., 2016; Swanstrom et al., 2016), a excepción de dos trabajos: en uno de ellos emplean dos cohortes amplias de sueros una de pacientes con Dengue proveniente de Brasil (n=297) y otra de pacientes con Zika proveniente de México (n=108), y evalúan el reconocimiento hacia el DIII de la proteína E de ZIKV, encontrando que una alta cantidad de pacientes reconocen al antígeno (Robbiani et al., 2017) contrario a lo reportado por otros grupos. El otro estudio usa muestras de suero de pacientes con Dengue (n=141) encontrando un amplio rango de reacción cruzada hacia la proteína E completa de Zika (Bardina et al., 2017). Colectivamente, estos estudios han presentado evidencias *in vitro* que, algunos anticuerpos de DENV pueden presentar reacción cruzada con ZIKV, por lo tanto, es fundamental evaluar la respuesta inmune en una población donde han circulado los cuatro serotipos de DENV.

Por otro lado, diversos estudios han caracterizado la respuesta humoral en las distintas formas clínicas de la enfermedad de Dengue, reportando una mayor cantidad de anticuerpos de tipo IgG contra el virus completo en Dengue severo, asociándolos a mayor activación del complemento que conduce a coagulación y permeabilidad vascular, así como al facilitamiento de la infección por serotipos heterólogos (Koraka et al., 2001; Toh et al., 2014), el cual es disparado por anticuerpos de reacción cruzada que reconocen la proteína E así como la prM/M que fallan a neutralizar el virus mientras facilitan la entrada del virus a través del receptor Fc resultando en activación inmune y tormenta de citocinas que

eventualmente conduce a permeabilidad endotelial y pérdida vascular (Guzmán et al., 2003). Por el contrario y en menor medida existen reportes donde encuentran mayor cantidad de anticuerpos en Dengue clásico dirigidos hacia los DI/DII que, aunque muestran una baja capacidad neutralizante contra el virus podrían presentar una amplia ocupancia la cual es suficientemente protectora, siendo menos probable que la enfermedad progrese a las formas severas (Montes-Gómez et al., 2017).

Para entender la relación inmunológica entre el ZIKV y DENV recientemente han surgido una serie de estudios que han abordado la respuesta inmune que presentan individuos infectados con DENV, desde una perspectiva de la temporalidad de la infección (infección aguda versus convaleciente) (Collins et al., 2017; Priyamvada et al., 2016; Swanstrom et al., 2016) así como la cantidad de veces que se ha infectado el paciente (infección primaria, secundaria, etc.) (Collins et al., 2017; Robbiani et al., 2017; Swanstrom et al., 2016).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la reacción cruzada que pudieran presentar los sueros de pacientes con diferentes grados de severidad de Dengue contra Zika es un tema no explorado, así como su repercusión en el facilitamiento. Tampoco se ha caracterizado la respuesta de reacción cruzada de acuerdo al tipo de anticuerpos IgM e IgG.

El objetivo del presente trabajo fue determinar los títulos de anticuerpos que reconocen a la proteína E de ZIKV para entender si el grado de severidad de la enfermedad de Dengue pudiera repercutir en el grado de reacción cruzada contra ZIKV, así como caracterizar esta respuesta de acuerdo al isotipo de inmunoglobulinas, para esto se evaluaron 150 muestras de suero de personas con Dengue clásico y 45 de Dengue hemorrágico todas recolectadas en la fase aguda de la enfermedad, el diagnóstico de dichas muestras se realizó a través de un kit de ELISA y RT-PCR tiempo final, en Veracruz, Ver., como control positivo se tuvo acceso a 88 muestras de personas infectadas con Zika y como controles negativos se contó con 100 muestras de suero de personas no infectadas de zona endémica y 150 muestras de suero de zona no endémica (Tabla 1). Al analizar los títulos de anticuerpos IgM (Figura 14A) con la proteína rE-ZIKV podemos observar que una

mayor cantidad de muestras de DH (60.4%) presenta una reacción cruzada significativa en comparación con DC (34%). Al comparar los datos de estos grupos con su contraparte del antígeno rPrME-DV2 (Figura 14A) volvemos a encontrar la misma tendencia que con la proteína de Zika, una mayor cantidad de muestras de DH (82%) reconoce al antígeno en comparación con DC (54%). Si posteriormente analizamos los títulos podemos encontrar que los valores son muy similares concluyendo que la gran mayoría de anticuerpos de tipo IgM presenta reacción cruzada. Posteriormente al analizar al grupo de sueros con Zika encontramos que un 54.5% presenta títulos significativos de anticuerpos mientras que su contraparte con la proteína rPrME-DV2 solo sobrepasa el 19%, aunque los títulos que presentan son muy similares con ambos antígenos, esto nos pudiera indicar que el ZIKV induce una respuesta más específica. Los títulos obtenidos en el control de zona endémica son muy similares a los obtenidos con los pacientes de Dengue, así como entre los dos antígenos, lo que nos habla que la población de esta región puede reconocer ampliamente a este nuevo virus. Finalmente, el grupo de individuos de zona no endémica sugiere que estos individuos no han estado en contacto con ninguno de los virus evaluados en este estudio, sugiriendo la especificidad de nuestro ensayo.

En el análisis de la respuesta de tipo IgG (Figuras 15) al comparar los porcentajes de sueros por arriba del punto de corte observamos que la gran mayoría de pacientes con DC (89.3%) y DH (79.1%) presenta una reacción cruzada significativa, mientras que al enfrentarlos con su antígeno rPrME-DV2 encontramos que un 99% y 100% de las muestras sobrepasa el punto de corte, aunque al fijar nuestra atención sobre los títulos de anticuerpos obtenidos encontramos que aquellos que presentan reacción cruzada es tan solo alrededor la mitad de anticuerpos que los que encontramos para el antígeno rPrME-DV2, esto nos sugiere que la respuesta de tipo IgG es más específica. En el grupo de sueros de Zika encontramos en general bajos títulos de IgG, esto debido a que las muestras que evaluamos en este estudio son agudas y los pacientes apenas comienzan a generar la respuesta de memoria, similarmente a lo que observamos con IgM, estos sueros una cantidad reducida de sueros (10%) reconoce al antígeno heterólogo (en

comparación de rE-ZIKV que es de 46.5%). Nuestro control de zona endémica presenta un comportamiento similar al de los enfermos de Dengue, los títulos al reconocer al antígeno de Zika se reducen a la mitad. El control de zona no endémica nos confirma la especificidad de nuestro ensayo. Todos estos datos en conjunto nos hablan de la respuesta específica que despierta Zika a pesar de que esta población vive en un área endémica de Dengue.

Aunque se logró demostrar el grado de reacción cruzada que presentan nuestros diferentes grupos de sueros esto no significa que necesariamente esto impactará en funciones como neutralización, facilitamiento, etc. Es por ello que se prosiguió a evaluar el fenómeno de facilitamiento que pudieran presentar los sueros en un modelo de células K562, para ello se seleccionaron 15 muestras representativas de cada grupo de individuos (Tablas 6 y 7), se observó que a diferencia de otros estudios donde la mayoría de sueros que prueban presentan facilitamiento, nosotros encontramos que algunos de nuestros sueros no llevan a cabo este fenómeno, esto puede ser debido a que algunos de ellos presentan una alta cantidad de anticuerpos que son capaces de neutralizar la infección por el contrario los sueros evaluados no presentan una cantidad suficiente de anticuerpos y por lo tanto no pueden formar complejos que puedan ser reconocidos por los receptores Fc.

En nuestro estudio encontramos que a pesar de que algunos sueros de DC pueden facilitar mucho la infección (58.3-75.9%), son los sueros de DH los que en su mayoría presentan ADE (32.5-53.42%), además se encontró que los pacientes con DC presentan un mayor título de anticuerpos (>1000 UE/mL) lo que pudiera ayudar a neutralizar la infección y evitar que progrese a las formas severas. Estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura de que los pacientes con DH tienden a facilitar más la infección, aunque también hay pacientes con DC que pueden ocasionar ADE, todo esto dependerá de la cantidad así como del tipo de anticuerpos que tengan los pacientes, nuestro ensayo solo evalúa la cantidad de anticuerpos dirigidos hacia la proteína E, sin embargo no se puede saber hacia que epítopos

van dirigidos, esto pudiera ser clave para poder entender por que algunos sueros a pesar de tener títulos similares de anticuerpos ocasionan facilitamiento o no.

Al evaluar el escenario contrario donde ahora se facilitó la infección del virus Dengue empleando sueros de pacientes con Zika encontramos un comportamiento similar: un mayor facilitamiento de la infección a mayores diluciones (13.10-41.90), aunque en menor medida que cuando se facilita el propio Zika (14.5-52.8%). Un diferente estudio demuestra que el facilitamiento de la infección de ZIKV en células K562, por plasma inmune a DENV y WNV es mediado por IgG (Bardina et al., 2017).

La hipótesis del ADE propuesta por Halstead en 1970 nos dice que durante una infección secundaria con un serotipo heterólogo los anticuerpos generados durante la primera infección al no presentar una concentración y avidéz suficiente fallan a neutralizar la infección y por el contrario la facilitan al permitir la entrada del virus presente en los complejos inmunes a través de los receptores Fc. Este fenómeno lo podemos apreciar claramente al evaluar el facilitamiento de la infección con ZIKV con los sueros de Dengue sin embargo al evaluar el escenario contrario (facilitamiento de Dengue con sueros de Zika) este facilitamiento se presenta en menor medida y a diluciones más altas lo que nos confirma lo observado en el ensayo de ELISA, que los sueros presentan tan pocos anticuerpos de reacción cruzada que ni siquiera pueden formar los complejos inmunes para ser reconocidos por el receptor Fc de las células K562.

A pesar de observar el fenómeno de facilitamiento en los ensayos *in vitro*, como similarmente reportan otros grupos (Bardina et al., 2017; Dejnirattisai et al., 2016; Kam et al., 2016; Priyamvada et al., 2016; K Stettler et al., 2016). Inclusive recientemente diversos grupos han evaluado el potencial del facilitamiento de la infección mediada por anticuerpos *in vivo*, administrando ya sea anticuerpos monoclonales provenientes de pacientes infectados con Zika o Dengue o sueros de pacientes en diferentes modelos de ratón, que incluyen AG129 y C57BL/6 *Stat2*^{-/-} previo a la infección con DENV o ZIKV. Encontrando síntomas como pérdida de peso y neurológicos, además de encontrar altas cargas virales en cerebro, medula espinal y testículos, inclusive en algunos casos la infección se facilita letalmente

debido a la pérdida vascular (Bardina et al., 2017; Stettler et al., 2016; Tripathi et al., 2017). Esto no precisamente pudiera reflejar lo que ocurre en la población en nuestro país, pues el InDRE ha reportado tan solo 11 casos de Guillain Barre y 5 de microcefalia asociados al virus Zika, se necesita realizar estudios epidemiológicos que puedan responder estas cuestiones.

9. CONCLUSIÓN

Estos resultados sugieren que la inmunidad preexistente contra el DENV tiene una reacción cruzada alta con la proteína E de Zika y en los anticuerpos de tipo IgM en comparación con los de tipo IgG, donde esta disminuye casi a la mitad. Del mismo modo estos anticuerpos pueden generar el facilitamiento de la infección, siendo mayor el fenómeno para los sueros de DH en contraste con el grupo de DC, aunque este fenómeno pudiera no representar exactamente lo que ocurre en la población mexicana pues no se han reportado tantas complicaciones asociadas al virus.

10. PERSPECTIVAS

Estudios in vitro

- Evaluar la respuesta de anticuerpos de tipo IgG1 e IgG3 en los sueros de pacientes con las diferentes formas de Dengue y Zika contra las proteínas rE-ZIKV y rPrME-DI/DII-DV2.
- Evaluar la respuesta de anticuerpos de reacción cruzada de tipo IgG, IgM en una cohorte de individuos con Zika en fase convaleciente.

Estudios in vivo

- Investigar el fenómeno de facilitamiento de la infección con el ZIKV mediado por los anticuerpos de los pacientes con las diferentes formas de la enfermedad del Dengue, así como su contraparte: el facilitamiento de Dengue con sueros de pacientes con Zika en un modelo de ratón.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Sistema Único de Información. Boletín Epidemiológico. Número 47, Vol. 32. Semana 47),

Althouse, B. M., Hanley, K. A., Diallo, M., Sall, A. A., Ba, Y., Faye, O., ... Cummings, D. A. T. (2015). Impact of climate and mosquito vector abundance on sylvatic arbovirus circulation dynamics in Senegal. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(1), 88–97.

Anaya, J., Ramirez-santana, C., Salgado-castaneda, I., Chang, C., Ansari, A., & Gershwin, M. E. (2016). Zika virus and neurologic autoimmunity : the putative role of gangliosides. *BMC Medicine*, 1–3.

Barba-Spaeth, G., Dejnirattisai, W., Rouvinski, A., Vaney, M.-C., Medits, I., Sharma, A., ... Rey, F. A. (2016). Structural basis of potent Zika–dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*, 1–23.

Bardina, S. V, Bunduc, P., Tripathi, S., Duehr, J., Frere, J. J., Brown, J. A., ... Lim, J. K. (2017). Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antinflavivirus immunity, (C), 1–6.

Bell, T. M., Field, E. J., & Narang, H. K. (1971). Zika virus infection of the central nervous system of mice. *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung*, 35(2), 183–93.

Beltramello, M., Williams, K. L., Simmons, C. P., MacAgno, A., Simonelli, L., Quyen, N. T. H., ... Sallusto, F. (2010). The human immune response to dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host and Microbe*, 8(3), 271–283.

Beltramello, M., Williams, K. L., Simmons, C. P., Macagno, A., Simonelli, L., Than, N., ... Lanzavecchia, A. (2010). Article The Human Immune Response to Dengue Virus Is Dominated by Highly Cross-Reactive Antibodies Endowed with Neutralizing and Enhancing Activity, (Di), 271–283.

Benazzato, C., Almeida, N., Pignatari, G. C., Romero, S., Polonio, C. M., Cunha, I., ... Beltrão-braga, P. C. B. (2016). in experimental models. *Nature*, 534(7606), 267–271.

Besnard, M., Eyrolle-Guignot, D., Guillemette-Artur, P., Lastère, S., Bost-Bezeaud, F., Marcelis, L., ... Mallet, H.-P. (2016). Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. *Euro Surveillanc e: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 21(13).

Brasil, P., Pereira, J. P., Moreira, M. E., Nogueira, R. M. R., Damasceno, L., Wakimoto, M., ... Cherry, J. D. (2016). new england journal, 2321–2334.

Buathong, R., Hermann, L., Thaisomboonsuk, B., Rutvisuttinunt, W., Klungthong, C., Chinnawirotpisan, P., ... Plipat, T. (2015). Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012–2014. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(2), 380–3.

- Burton, D. R., Saphire, E. O., & Parren, P. W. (2001). A model for neutralization of viruses based on antibody coating of the virion surface. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 260, 109–43.
- Calvet G et al. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study.
- Cao-Lormeau, V.-M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., ... Ghawché, F. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet*, 387(10027), 1531–1539.
- Chahal, J. S., Fang, T., Woodham, A. W., Khan, O. F., Ling, J., Anderson, D. G., & Ploegh, H. L. (2017). An RNA nanoparticle vaccine against Zika virus elicits antibody and CD8 + T cell responses in a mouse model, (October 2016), 1–9.
- Chanama, S., Anantapreecha, S., A-nuegoonpipat, A., Sa-gnasang, A., Kurane, I., & Sawanpanyalert, P. (2004). Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. *Journal of Clinical Virology*, 31(3), 185–189.
- Cockburn, J. J. B., Navarro Sanchez, M. E., Goncalvez, A. P., Zaitseva, E., Stura, E. A., Kikuti, C. M., ... Rey, F. A. (2012). Structural insights into the neutralization mechanism of a higher primate antibody against dengue virus. *The EMBO Journal*, 31(3), 767–79.
- Collins, M. H., MCGowan, E., Jadi, R., Young, E., Lopez, C. A., Baric, R. S., ... Silva, A. M. De. (2017). Lack of Durable Cross-Neutralizing Antibodies against Zika Virus from Dengue Virus Infection, 23(5).
- Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Russo, F. B., Freitas, B. C., Dias, J. L. M., Guimarães, K. P., ... Beltrão-Braga, P. C. B. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 534(7606), 1–15.
- D??az-Qui??onez, J. A., Escobar-Escamilla, N., Wong-Ar??mbula, C., V??zquez-Pichardo, M., Torres-Longoria, B., L??pez-Mart??nez, I., ... Ram??rez-Gonz??lez, J. E. (2016). Asian genotype zika virus detected in traveler returning to Mexico from Colombia, October 2015. *Emerging Infectious Diseases*, 22(5), 937–939.
- Dai, L., Song, J., Lu, X., Deng, Y.-Q., Musyoki, A. M., Cheng, H., ... Gao, G. F. (2016). Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host & Microbe*, 19(5), 696–704.
- Dang, J., Tiwari, S. K., Lichinchi, G., Qin, Y., Patil, V. S., Eroshkin, A. M., & Rana, T. M. (2016). Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell*, 19(2), 258–65.
- de Paula Freitas, B., de Oliveira Dias, J. R. J., Prazeres, J., Sacramento, G. A. G., Ko, A. I., Maia, M. M., ... Belfort Jr, R. (2016). Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital. *JAMA Ophthalmology*, 134(5), 1–19.
- Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., ... Screaton, G. (2010a). Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science (New York, N. Y.)*, 328(5979), 745–8.
- Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., ... Screaton, G. (2010b). Supporting Online Material for Cross-reacting Antibodies Enhance Dengue Virus Infection in Humans Materials and Methods, 745(May).

Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-spaeth, G., Duangchinda, T., ... Screaton, G. R. (2016). Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus, (June), 1–8.

DICK, G. W. A., & HADDOW, A. J. (1952). Uganda S virus; a hitherto unrecorded virus isolated from mosquitoes in Uganda. I. Isolation and pathogenicity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(6), 600–18. Retrieved from

Dirlikov, E., Kniss, K., Major, C., Thomas, D., Virgen, C. A., Mayshack, M., ... Rivera-Garcia, B. (2017). Guillain-Barré Syndrome and Healthcare Needs during Zika Virus Transmission, Puerto Rico, 2016. *Emerging Infectious Diseases*, 23(1), 134–136.

Dowd, K. A., Demaso, C. R., Pelc, R. S., Diamond, M. S., Ledgerwood, J. E., Pierson, T. C., ... Pierson, T. C. (2016). Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype Report Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype. *CellReports*, 16(6), 1485–1491.

Driggers, R. W., Ho, C.-Y., Korhonen, E. M., Kuivanen, S., Jääskeläinen, A. J., Smura, T., ... Vapalahti, O. (2016). Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *The New England Journal of Medicine*, 374(22), 2142–51.

Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., ... Hayes, E. B. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England Journal of Medicine*, 360(24), 2536–43.

Fagbami, A. H., Halstead, S. B., Marchette, N. J., & Larsen, K. (1987). Cross-infection enhancement among African flaviviruses by immune mouse ascitic fluids. *Cytobios*, 49(196), 49–55.

Foy, B. D., Kobylinski, K. C., Chilson Foy, J. L., Blitvich, B. J., Travassos da Rosa, A., Haddow, A. D., ... Tesh, R. B. (2011). Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5), 880–2.

Gourinat, A.-C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2015). Detection of Zika virus in urine. *Emerging Infectious Diseases*, 21(1), 84–6.

Gu, H., Ding, L., Xiong, S.-D., Gao, X.-M., & Zheng, B. (2014). Inhibition of CDK2 promotes inducible regulatory T-cell differentiation through TGFβ-Smad3 signaling pathway. *Cellular Immunology*, 290(1), 138–44.

Gubler, D. J. (2007). The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45(8), 1039–46.

Guzmán, M. G., Pelegrino, J. L., Pumariega, T., Vázquez, S., González, L., Kourí, G., & Arias, J. (2003). [Quality control of the serological diagnosis of dengue in laboratories throughout the Americas, 1996-2001]. *Revista Panamericana de Salud Pública = Pan American Journal of Public Health*, 14(6), 371–6. Retrieved from

Haddow, A. D., Schuh, A. J., Yasuda, C. Y., Kasper, M. R., Heang, V., Huy, R., ... Weaver, S. C. (2012). Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2), e1477.

Halstead, B. Y. S. B., Rourke, E. J. O., & Allison, A. C. (1977). DENGUE VIRUSES AND MONONUCLEAR PHAGOCYTES II . Identity of Blood and Tissue Leukocytes Supporting In Vitro Infection * In the previous paper we demonstrated for peripheral blood leukocytes (

PBL) 1 from nonimmune primate donors the dependence of dengue 2, *146*, 218–229.

Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., ... Missé, D. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of Virology*, *89*(17), 8880–96.

Heang, V., Yasuda, C. Y., Sovann, L., Haddow, A. D., Travassos da Rosa, A. P., Tesh, R. B., & Kasper, M. R. (2012). Zika virus infection, Cambodia, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(2), 349–51.

Hutchings, P. R., Varey, A. M., & Cooke, A. (1986). Immunological defects in SJL mice. *Immunology*, *59*(3), 445–50. Retrieved from

loos S1, Mallet HP2, Leparc Goffart I3, Gauthier V4, Cardoso T4, H. M. (n.d.). Current Zika virus epidemiology and recent epidemics.

Janahi, E. M., Dhasmana, A., Srivastava, V., Sarangi, A. N., Raza, S., Arif, J. M., ... Haque, S. (2017). In silico CD4+, CD8+ T-cell and B-cell immunity associated immunogenic epitope prediction and HLA distribution analysis of Zika virus. *EXCLI Journal*, *16*, 63–72.

Kam, Y., Lee, C. Y., Teo, T., Howland, S. W., Amrun, S. N., Lum, F., ... Rénia, L. (2016). Cross-reactive dengue human monoclonal antibody prevents severe pathologies and death from Zika virus infections, 1–10.

Kassavetis, P., Joseph, J.-M. B., Francois, R., Perloff, M. D., & Berkowitz, A. L. (2016). Zika virus–associated Guillain-Barré syndrome variant in Haiti. *Neurology*, *87*(3), 336–337.

Koraka, P., Murgue, B., Deparis, X., Setiati, T. E., Suharti, C., Gorp, E. C. M. Van, ... Groen, J. (2003). Elevated Levels of Total and Dengue Virus-Specific Immunoglobulin E in Patients With Varying Disease Severity, *98*(December 2002), 91–98.

Koraka, P., Suharti, C., Setiati, T. E., Mairuhu, A. T. A., Gorp, E. V. A. N., Hack, C. E., ... Osterhaus, A. D. M. E. (2001). Kinetics of Dengue Virus-Specific Serum Immunoglobulin Classes and Subclasses Correlate with Clinical Outcome of Infection, *39*(12), 4332–4338.

Krishnan, M. N., Sukumaran, B., Pal, U., Agaisse, H., Murray, J. L., Hodge, T. W., & Fikrig, E. (2007). Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. *Journal of Virology*, *81*(9), 4881–5.

Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V, Corver, J., Lenches, E., ... Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, *108*(5), 717–25. Retrieved from

Larocca, R. A., Abbink, P., Peron, J. P. S., Zanotto, P. M. D. A., Iampietro, M. J., Badamchizadeh, A., ... Barouch, D. H. (2016). Vaccine protection against Zika virus from Brazil.

Lazear, H. M., Govero, J., Smith, A. M., Platt, D. J., Fernandez, E., Miner, J. J., ... Miner, J. J. (2016). Resource A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis Resource A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host and Microbe*, *19*(5), 720–730.

Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., Foo, S.-S., Lee, S.-A., ... Jung, J. U. (2016). Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell*, *19*(5), 663–671.

Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses, *59*, 23–61.

Lok, S.-M., Kostyuchenko, V., Nybakken, G. E., Holdaway, H. a, Battisti, A. J., Sukupolvi-

- Petty, S., ... Rossmann, M. G. (2008). Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(3), 312–317.
- Mackenzie, J. (2005). Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 6(11), 967–77.
- MACNAMARA, F. N. (1954). Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(2), 139–45. Retrieved from
- Martines, R. B., Bhatnagar, J., Keating, M. K., Silva-Flannery, L., Muehlenbachs, A., Gary, J., ... Zaki, S. (2016). Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses--Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(6), 159–60.
- McGonigal, R., Rowan, E. G., Greenshields, K. N., Halstead, S. K., Humphreys, P. D., Rother, R. P., ... Willison, H. J. (2010). Anti-GD1a antibodies activate complement and calpain to injure distal motor nodes of Ranvier in mice. *Brain*, 133(7), 1944–1960.
- Messer, W. B., de Alwis, R., Yount, B. L., Royal, S. R., Huynh, J. P., Smith, S. A., ... Baric, R. S. (2014). Dengue virus envelope protein domain I/II hinge determines long-lived serotype-specific dengue immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(5), 1939–44.
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., ... Avšič Županc, T. (2016a). Zika Virus Associated with Microcephaly. *The New England Journal of Medicine*, 374(10), 951–8.
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., ... Avšič Županc, T. (2016b). Zika Virus Associated with Microcephaly. *The New England Journal of Medicine*, 374(10), 951–8.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion, 427(January).
- Montes-gómez, A. E., Vivanco-cid, H., Bustos-arriaga, J., Bano, M., Garcia-machorro, J., & Gutierrez-castañeda, B. (2017). prognosis. *Acta Tropica*, 171(April), 233–238.
- Musso, D. (2015). Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 21(10), 1887.
- Ngono, A. E., Vizcarra, E. A., Tang, W. W., Gorman, M. J., Diamond, M. S., Shresta, S., ... Shresta, S. (2017). Mapping and Role of the CD8 + T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice Article Mapping and Role of the CD8 + T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. *Cell Host and Microbe*, 21(1), 35–46.
- Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Di Lullo, E., Sandoval-Espinosa, C., Bershteyn, M., & Kriegstein, A. R. (2016). Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 18(5), 591–6.
- Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparco-Goffart, I., Lastere, S., Valour, F., ... Ghawche, F. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 19(9).

- Olson, J. G., Ksiazek, T. G., Suhandiman, & Triwibowo. (1981). Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(3), 389–93.
- Pardy, R. D., Rajah, M. M., Condotta, S. A., Taylor, N. G., Sagan, M., & Richer, M. J. (2017). Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8 + T Cell Epitope in Immunocompetent Mice, 1–26.
- Parra, B., Lizarazo, J., Jiménez-Arango, J. A., Zea-Vera, A. F., González-Manrique, G., Vargas, J., ... Pardo, C. A. (2016). Guillain–Barré Syndrome Associated with Zika Virus Infection in Colombia. *New England Journal of Medicine*, 375(16), 1513–1523.
- Paul, L. M., Carlin, E. R., Jenkins, M. M., Tan, A. L., Barcellona, C. M., Nicholson, C. O., ... Isern, S. (2016). Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection, 5(12), e117-9.
- Peña, J., & Harris, E. (2012). Early dengue virus protein synthesis induces extensive rearrangement of the endoplasmic reticulum independent of the UPR and SREBP-2 pathway. *PLoS One*, 7(6), e38202.
- Plevka, P., Battisti, A. J., Junjhon, J., Winkler, D. C., Holdaway, H. A., Keelapang, P., ... Rossmann, M. G. (2011). Maturation of flaviviruses starts from one or more icosahedrally independent nucleation centres. *EMBO Reports*, 12(6), 602–6.
- Priyamvada, L., Quicke, K. M., Hudson, W. H., Onlamoon, N., & Sewatanon, J. (2016). Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus, 113(28).
- Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A., & Petersen, L. R. (2016). Zika Virus and Birth Defects--Reviewing the Evidence for Causality. *The New England Journal of Medicine*, 374(20), 1981–7.
- Rivino, L., & Lim, M. Q. (2016). CD4 + and CD8 + T-cell immunity to Dengue – lessons for the study of Zika virus, 146–154.
- Robbiani, D. F., Bozzacco, L., Keeffe, J. R., Khouri, R., Olsen, P. C., Gazumyan, A., ... Nussenzweig, M. C. (2017). Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. *Cell*, 169(4), 597–609.e11.
- Rocklov J et al. (2016). Assessing Seasonal Risks for the Introduction and Mosquito-borne Spread of Zika Virus in Europe.
- Rodenhuis-Zybert, I. A., Moesker, B., da Silva Voorham, J. M., van der Ende-Metselaar, H., Diamond, M. S., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2011). A fusion-loop antibody enhances the infectious properties of immature flavivirus particles. *Journal of Virology*, 85(22), 11800–8.
- Roehrig, J. T., Volpe, K. E., Squires, J., Hunt, A. R., Davis, B. S., & Chang, G.-J. J. (2004). Contribution of disulfide bridging to epitope expression of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein. *Journal of Virology*, 78(5), 2648–52. Retrieved from
- Rossi, S. L., & Vasilakis, N. (2016). Modeling Zika Virus Infection in Mice. *Cell Stem Cell*, 19(1), 4–6.
- Sarno, M., Sacramento, G. A., Khouri, R., do Rosário, M. S., Costa, F., Archanjo, G., ... de Almeida, A. R. P. (2016). Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), e0004517.

- Savino, W., Messias, V., & Mendes-da-cruz, D. A. (2017). Zika Virus Infection in the Elderly : Possible Relationship with Guillain-Barré Syndrome, 210–215.
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T. C., Rossmann, M. G., & Kuhn, R. J. (n.d.). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus.
- Smith, S. A., Zhou, Y., Olivarez, N. P., Broadwater, A. H., Silva, A. M. De, & Crowe, J. E. (2012). Persistence of Circulating Memory B Cell Clones with Potential for Dengue Virus Disease Enhancement for Decades following Infection, 2665–2675.
- Stettler, K., Beltramello, M., Espinosa, D. A., Graham, V., Bianchi, S., Vanzetta, F., ... Corti, D. (2016). Supplementary Material for virus infection, (July).
- Stettler, K., Stettler, K., Beltramello, M., Espinosa, D. A., Graham, V., Cassotta, A., ... Corti, D. (2016). Specificity , cross-reactivity and function of antibodies elicited by Zika virus infection, 8505(July).
- Susuki, K., Rasband, M. N., Tohyama, K., Koibuchi, K., Okamoto, S., Funakoshi, K., ... Yuki, N. (2007). Anti-GM1 Antibodies Cause Complement-Mediated Disruption of Sodium Channel Clusters in Peripheral Motor Nerve Fibers. *Journal of Neuroscience*, 27(15), 3956–3967.
- Swanstrom, J. A., Plante, J. A., Plante, K. S., Young, E. F., MCGowan, E., Gallichotte, E. N., ... Heise, M. T. (2016). Isolated from Dengue Patients Are Protective against Zika Virus, 7(4), 1–8.
- Tabata, T., Pettitt, M., Puerta-guardo, H., Fang-hoover, J., Harris, E., Tabata, T., ... Fang-hoover, J. (2016). Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells , Suggesting Two Routes for Vertical Article Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells , Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host and Microbe*, 20(2), 155–166.
- Tang, H., Hammack, C., Ogden, S. C., & Jin, P. (2016). Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth Brief Report Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Stem Cell*, 18(5), 587–590.
- Toh, Y. X., Gan, V., Balakrishnan, T., Zuest, R., Poidinger, M., Wilson, S., ... Fink, K. (2014). Dengue serotype cross-reactive , anti-E protein antibodies confound specific immune memory for 1 year after infection, 5(August), 1–12.
- Tripathi, S., Balasubramaniam, V. R. M. T., Brown, J. A., Mena, I., Grant, A., Bardina, S. V., ... García-Sastre, A. (2017). A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. *PLOS Pathogens*, 13(3), e1006258.
- van den Berg, B., van den Beukel, J. C., Alsmas, J., van der Eijk, A. A., Ruts, L., van Doorn, P. A., ... Simon, C. C. (2016). [Guillain-Barré syndrome following infection with the Zika virus]. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde*, 160(0), D155.
- van der Schaar, H. M., Rust, M. J., Chen, C., van der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., Zhuang, X., & Smit, J. M. (2008). Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathogens*, 4(12), e1000244.
- Vaughan, K., Weiskopf, D., & Diamond, M. S. (2017). Identifying Candidate Targets of Immune Responses in Zika Virus Based on Homology to Epitopes in Other Flavivirus Species, 1–38.

- Ventura CV. (2016). Zika: neurological and ocular findings in infant without microcephaly.
- WEINBREN, M. P., & WILLIAMS, M. C. (1958). Zika virus: further isolations in the Zika area, and some studies on the strains isolated. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 52(3), 263–8.
- Welsch S et al. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites.
- Wen, J., Tang, W. W., Sheets, N., Ellison, J., Sette, A., Kim, K., & Shresta, S. (2017). Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8(+) T cells. *Nature Microbiology*, 2, 17036.
- Willison, H. J., Jacobs, B. C., & van Doorn, P. A. (2016). Guillain-Barré syndrome. *The Lancet*, 388(10045), 717–727.
- Yu, I.-M., Holdaway, H. A., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G., & Chen, J. (2009). Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *Journal of Virology*, 83(23), 12101–7.
- Yu, I.-M., Zhang, W., Holdaway, H. A., Li, L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., ... Chen, J. (2008). Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5871), 1834–7.
- Yuki, N., & Hartung, H.-P. (2012). Guillain-Barré syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 366(24), 2294–304.
- Zhang, X., Sheng, J., Plevka, P., Kuhn, R. J., Diamond, M. S., & Rossmann, M. G. (2013). Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), 6795–6799.