



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Inmunogenicidad del Dominio III de la proteína de
envoltura del virus Zika, acoplado a nanopartículas
en un modelo murino.”**

T E S I S

Que presenta:

KAREN BERNAL SIRIA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR**

Directores de Tesis: **DRA. LETICIA CEDILLO BARRÓN**
DR. GOLDIE HARIKRISHNA OZA

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Investigadora titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV

Dr. Goldie Harikrishna Oza

Profesor CONACYT, subdirección- generación de energía por vía electroquímica

CIDETEQ

ASESORES

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Investigador titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Investigador titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV

Dr. José Isabel Tapia Ramírez

Investigador titular del departamento de Genética y Biología Molecular

CINVESTAV

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, la Dra. Leticia Cedillo Barrón y el Dr. Goldie Oza por guiarme y apoyarme en el desarrollo de este proyecto.

A mis asesores, el Dr. Marco Antonio Meraz, el Dr. Leopoldo Santos Argumedo y el Dr. José Tapia Ramírez por sus revisiones y aportaciones a este trabajo.

Al Dr. Julio García Cordero por el gran apoyo y asesoría en todo proceso experimental.

Al todos los Doctores del departamento de Biomedicina Molecular por sus enseñanzas y aportaciones.

A mis compañeros de laboratorio: Paola, Sofia, Gaurauv, Mayra, Giovani, Josselin, Verónica, Mariannela y Karime por todo el apoyo y colaboración en la parte teórica y experimental. Y en especial a Alfredo Montes por su gran apoyo en los ensayos de citometría de flujo.

A mis compañeros de generación por su apoyo durante los cursos.

A Gabriel Briones por sus revisiones a este escrito y apoyo incondicional.

A la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica (UGPM-CINVESTAV) por el préstamo de equipo necesario para la realización de Nanopartículas.

A la Dra. Dulce Ma. del Carmen Delgadillo Álvarez, por su tiempo y apoyo en el uso del equipo empleado en la UGPM-CINVESTAV.

A la UPEAL-CINVESTAV por el cuidado de los animales de laboratorio empleados.

Al Conacyt por otorgarme la beca con el No. 454224.

DEDICATORIAS

A mis padres, Ángeles Siria y Epifanio Bernal. A mi hermano Ángel Omar. A mi esposo Gabriel Briones. Y a mi hija Tonalli.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Epidemiología y transmisión	1
1.2 Manifestaciones clínicas	2
1.3 Generalidades del virus zika	3
1.4 Proteína de envoltura	4
1.5 Ciclo de replicación	5
1.6 Respuesta inmune contra el virus Zika	7
1.7 Características inmunológicas de la proteína de envoltura.	8
1.8 Facilitamiento mediado por anticuerpos	10
1.9 Uso de nanopartículas como adyuvantes	10
1.10 Nanopartículas de PLGA	12
1.11 Nanopartículas de Chitosan	13
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo general	16
4.2 Objetivos específicos	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1 Ratones BALB/c	17
5.2 Células C6/36	17
5.3 Células VERO	17

5.4	Virus Zika	17
5.5	Vector de expresión	18
5.6	Titulación de virus	18
5.7	Obtención del Dominio III del virus Zika	19
5.7.1	Amplificación de la secuencia	19
5.7.2	Clonación del dominio III de Zika en el plásmido pProEX HT	20
5.7.3	Transformación de bacterias XL10-Gold con las ligaciones	20
5.7.4	Análisis de las colonias transformadas	20
5.7.5	Obtención de la construcción a gran escala	20
5.7.6	Cinética de expresión	20
5.7.7	Obtención de cuerpos de inclusión.	21
5.7.8	Purificación de la proteína recombinante DIII (rDIII).	21
5.8	Preparación de nanopartículas de PLGA	23
5.9	Preparación de nanopartículas de Chitosan	24
5.10	Análisis de eficiencia de encapsulación	24
5.11	Esquema de inmunización de ratones	25
5.12	Detección de anticuerpos IgG por ELISA indirecta	26
5.13	Evaluación de anticuerpos neutralizantes	26
5.14	Análisis estadístico	27
6.	RESULTADOS	28
6.1	Clonación del Dominio III	28
6.2	Evaluación de la expresión y optimización de expresión de la proteína recombinante rDIII	29
6.3	Purificación del Dominio III	30
6.4	Análisis de eficiencia de encapsulación	30

6.5	Análisis de nanopartículas por microscopía electrónica.	31
6.6	Evaluación de la respuesta inmune Anticuerpos IgG de los ratones inmunizados con las diferentes condiciones	32
6.7	Evaluación de anticuerpos neutralizantes	33
7.	DISCUSIÓN	35
8.	CONCLUSIÓN	40
9.	PERSPECTIVAS	40
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Grupos de ratones.	25
Figura 1 Detección de infecciones por virus Zika. Enero 2013 - Enero 2017.	1
Figura 2. Estructuras de partículas de ZIKV.	4
Figura 3. Estructura de la proteína E de envoltura del virus Zika.....	5
Figura 4. Ciclo de replicación de ZIKV.....	6
Figura 5. Estructura del polímero de PLGA.	12
Figura 6. Estructura del Chitosan.....	13
Figura 7. Mapa del vector de expresión pProEX HT.....	18
Figura 8. Esquema de Inmunización.....	25
Figura 9. Clonación del Dominio III de Zika.	28
Figura 10. Cinética de expresión del rDIII.....	29
Figura 11.. Purificación del rDIII.....	30
Figura 12. Microscopía electrónica de nanopartículas de CaP-PLGA.	31
Figura 13. Microscopía electrónica de nanopartículas de CS.....	32
Figura 14. Evaluación de anticuerpos IgG contra el Dominio III.....	33
Figura 15. Evaluación de anticuerpos neutralizantes de los grupos inmunizados.	34

ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid
ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
ADE	Antibody-dependent enhancement (Facilitamiento dependiente de anticuerpos)
APC	Célula presentadora de antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
C	Cápside
CS	Chitosan
CaP	Calcium phosphate (Fosfato de calcio)
DCM	Diclorometano
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (Molécula no integrina de unión a ICAM-3 específica de células dendríticas)
DI	Dominio I
DII	Dominio II
DIII	Dominio III
rDIII	Dominio III recombinante de la proteína de envoltura de Zika
E	Envoltura
EDE	Epítipo del dímero de envoltura
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid (Ácido etilendiaminotetraacético)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
ER	Retículo endoplásmico
Fc	Fragmento cristizable
FcγR	Fc gamma receptor (Receptor Fc gamma)

FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
FL	Fusion Loop (Péptido de fusión)
IFITM1	Interferon-induced transmembrane protein 1 (Proteína transmembrana 1 inducida por interferón)
IFITM3	Interferon-induced transmembrane protein 3 (Proteína transmembrana 3 inducida por interferón)
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IPTG	Isopropiltiogalactósido
ISG's	Interferon-stimulated genes (Genes estimulados con Interferón)
LB	Luria Bertani
M	Membrana
MAb's	Anticuerpos monoclonales
MCS	Sitio múltiple de clonación
MEM	Medio mínimo esencial
MOI	Multiplicity of infection (multiplicidad de infección)
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas)
NK	Natural Killer
NLRP3	Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors, pyrin domain -3 (Receptor con dominio de oligomerización y unión a nucleótidos y dominio pirina tipo 3)
nm	Nanómetros
NP	Nanopartícula
NS	No estructural
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer de fosfatos salino

PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid) (Poli (ácido láctico-co-glicólico))
prM	Precursor de membrana
PVA	Polivinilic alcohol (Alcohol polivinílico)
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
STAT2	Signal transducer and activator of transcription 2 (Transductor de señal y activador de la transcripción 2)
SVP's	(Subviral particles) Partículas subvirales
TIM-1	T cell immunoglobulin mucin (Proteína con dominio de inmunoglobulina y de mucina del Linfocito T)
TM	Trans membrana
TNF	(Tumor necrosis factor) Factor de necrosis tumoral
TPGS	D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate
TYRO3	Tyrosine-protein kinase receptor
WRAIR	Walter Reed Army Institute of Research
ZIKV	Zika Virus

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud declaró la infección por Zika (ZIKV) como una emergencia de salud pública mundial en 2016, después de que se asociara con efectos teratogénicos en fetos y con el síndrome de Guillaine-Barré (GBS). Uno de los retos más importantes para el desarrollo de una vacuna contra este virus es evitar la inducción de anticuerpos de reacción cruzada entre los virus del Zika y Dengue (DENV); debido a la alta similitud antigénica de ambos virus. Este hecho podría aumentar el riesgo de la inducción de anticuerpos involucrados en el facilitamiento de la infección (ADE) por lo cual los anticuerpos contra el ZIKV, generados por una vacunación, podrían reaccionar de forma cruzada contra el DENV y favorecer su infección. Por lo tanto, es necesario trabajar en el desarrollo de vacunas específicas contra el ZIKV. Se ha demostrado que el DIII de la proteína de envoltura del ZIKV es capaz de generar una respuesta específica y protectora contra este virus. Dado que esta proteína recombinante es un antígeno soluble, necesita un agente adyuvante que potencie su respuesta inmune. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta inmune en ratones inmunizados con el dominio III de la proteína E del virus Zika (aislado de Oaxaca), empleando nanopartículas (NP's) de ácido láctico y ácido glicólico con fosfato de calcio (CaP-PLGA) y NP's de quitosan (CN) como adyuvantes. Para ello se clonó, expresó y purificó el DIII a partir de bacterias BL21. Se sintetizaron NP's de CaP-PLGA por el método de doble emulsión y evaporación de disolvente, y NP's de CN por gelificación iónica, obteniendo NP's de 50-130 nm y de 150-400 nm respectivamente. Se sintetizaron NP's libres de antígeno y NP's con antígeno encapsulado, obteniendo una eficiencia de encapsulación de 42.7% en las NP's de CaP PLGA y de 14.5% en las NP's de CN. Cada una de estas NP's se mezcló con 25 µg de DIII para inmunizar ratones Balb/c. Todos los grupos inmunizados con NP's mostraron una respuesta de anticuerpos IgG similar a la obtenida con alúmina, pero de manera importante, estos anticuerpos mostraron capacidad neutralizante. Así mismo, las respuestas provocadas por las NP de CaP-PLGA y de CN no fue distinta, siendo éste el primer estudio en el cual se realizó una comparación del efecto adyuvante entre ambos tipos de NP's.

ABSTRACT

After Zika Virus infection (ZIKV) was associated with teratogenic effects in fetuses and with Guillaine-Barré syndrome (GBS), the World Health Organization declared this as a global public health emergency in 2016. One of the most important challenges for the development of a vaccine against this virus is to avoid the induction of cross-reactive antibodies between Zika and Dengue (DENV) viruses; due to the high antigenic similarity of both viruses. This fact could increase the risk of induction of antibodies involved in the facilitation of the infection (ADE), for which the antibodies against the ZIKV, generated by a vaccination, could cross-react against the DENV and favor its infection. Therefore, it is necessary to work on the development of specific vaccines against ZIKV. It has been shown that the DIII of the envelope protein of ZIKV is able to generate a specific and protective response against this virus. Since this recombinant protein is a soluble antigen, it needs an adjuvant agent that potentiates the immune response. The objective of this study was to evaluate the immune response in mice immunized with domain III of the Zika virus E protein (isolated from Oaxaca), using poly (lactic-co-glycolic acid) with calcium phosphate (CaP-PLGA) nanoparticles (NP's) and chitosan (CN) NP's as adjuvants. For this, DIII was cloned, expressed and purified from BL21 bacteria. CaP-PLGA NP's were synthesized by double emulsion solvent evaporation method, and CN NP's were synthesized by ionic gelation, obtaining NP's of 50-130 nm and 150-400 nm respectively. We synthesized NP's free of antigen and NP's with encapsulated antigen, obtaining an encapsulation efficiency of 42.7% for CaP-PLGA NP's and 14.5% for CN NP's. Each of these NPs was mixed with 25 µg of DIII to immunize Balb/c mice. All the groups immunized with NPs showed an IgG antibody response similar to that obtained with alumina, but importantly, these antibodies showed neutralizing capacity. Likewise, the responses provoked by CaP-PLGA NP's and CN NP's were not different, being the first study in which a comparison of the adjuvant effect between both types of NP s was made.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología y transmisión

El Virus Zika (ZIKV) fue identificado en 1947 por primera vez en un mono Rhesus en el bosque Zika de Uganda¹. Durante varios años este virus circuló entre mosquitos de especies *Aedes* y primates no humanos, y solo se presentaron infecciones esporádicas en pequeños grupos de pacientes². Este patrón cambió en 2007, cuando se produjo el primer brote importante de infección en Yap (Micronesia), donde cerca del 73% de la población se infectó³. Desde entonces, el virus Zika se dispersó rápidamente, produciendo brotes en la Polinesia Francesa, Islas Cook, la Isla de Pascua y Nueva Caledonia. ²

A principios de 2015 se reportó la primera transmisión autóctona de ZIKV en Brasil, propagándose en el continente americano con casos esporádicos en Europa.^{2,4}



Figura 1 Detección de infecciones por virus Zika. Enero 2013 - Enero 2017.

En color azul se muestran los países con casos de infección por Zika de 2013 a 2017 notificados oficialmente por el país donde se produjo la infección, y casos informados de viajeros en países distintos a la ubicación de la infección. Los territorios con casos más recientes se indican en tonos azules más fuertes y los tonos débiles indican los casos menos recientes. El virus Zika no está necesariamente presente en todos los territorios sombreados en este mapa. (Imagen tomada de <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/05-january-2017/en/>)⁵

Al igual que otros flavivirus, el virus Zika es transmitido principalmente por mosquitos del género *Aedes*, de las especies *A. aegypti* y *A. albopictus*. Desafortunadamente estos mosquitos están ampliamente distribuidos en todo el mundo, y el hábitat natural de la mayoría de las especies son regiones cálidas tropicales y subtropicales.² Aunque esta es la vía de transmisión más común, se han descrito otras vías de transmisión del virus como la transmisión sexual, la transmisión por transfusiones de sangre y transmisión de madre a hijo en el útero (transmisión vertical).^{6,7}

El virus Zika continúa propagándose geográficamente en áreas donde hay vectores competentes. Y aunque en algunas regiones últimamente se ha registrado una disminución de los casos de infección por Zika, la Organización Mundial de la Salud (OMS) asegura que la vigilancia debe mantenerse elevada.⁵

1.2 Manifestaciones clínicas

El período de incubación de ZIKV es 3 a 12 días, y la enfermedad en los seres humanos es generalmente leve. Las tasas de mortalidad y de casos graves de enfermedad son muy bajas. Los síntomas de la enfermedad duran por lo general de 2 a 7 días, pero el virus puede detectarse en la sangre de una persona infectada, incluso 1 semana después de la recuperación⁶.

Afortunadamente solo el 20-25% de los individuos infectados desarrollan la enfermedad. Los signos y síntomas incluyen fiebre de bajo grado (37.8-38.5 ° C), junto con erupciones maculopapulares y pruríticas, conjuntivitis (no purulenta) y artralgia (en particular en articulaciones pequeñas de los pies y las manos). Las principales complicaciones asociadas con la infección ZIKV incluyen microcefalia congénita en los fetos de mujeres infectadas y Síndrome de Guillain-Barré (SGB).⁶

La relación causal entre infección por ZIKV y la microcefalia se ha sugerido con base en algunos estudios que han evidenciado el potencial patogénico de ZIKV durante el desarrollo del feto en modelos in vitro e in vivo^{8,9,10}. Sin embargo, la patogénesis aún no es clara. La infección por ZIKV durante el primer trimestre de

embarazo se ha asociado con un mayor riesgo de alteraciones congénitas y microcefalia.¹¹

El SGB abarca un número de neuropatías autoinmunes agudas relacionadas entre sí que afectan a las cuatro extremidades. El mimetismo molecular entre glicolípidos humanos y moléculas de la superficie de agentes infecciosos (como Zika) podría explicar la mayor parte de los casos de SGB precedidos por infección¹². Un estudio que apoya fuertemente al componente etiológico autoinmune como mecanismo de daño cerebral, muestra la existencia de una gran similitud entre péptidos de la poliproteína de ZIKV y proteínas humanas ligadas a la mielina, la mielinización, y la neuropatía axonal. Este podría ser un argumento robusto para el mecanismo de reactividad cruzada que relaciona la infección ZIKV y el SGB.¹³

1.3 Generalidades del virus zika

El virus Zika pertenece a la familia de los flavivirus, los cuales son virus envueltos que contienen un ARN genómico de cadena positiva de ~ 11 kb asociado a una proteína de la cápside (C) en una cápside isométrica (Figura 2). Esta cápside está rodeada por una membrana lipídica con dos proteínas integradas: E (envoltura) y prM (precursor de membrana [M]) en partículas inmaduras (Figura 2, Izquierda) y E y M en partículas maduras (Figura 2, derecha). Los viriones inmaduros tienen un diámetro de 60 nm, en cambio los viriones maduros, son más pequeños (diámetro de 50 nm).¹⁴

El virus ingresa a la célula huésped por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor, una vez que el genoma entra la traducción del ARN viral se lleva a cabo en el ER donde se genera una poliproteína que se escinde en las tres proteínas estructurales C, E y prM y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) que se encargan de la replicación del genoma, el procesamiento de poliproteínas y la manipulación de las respuestas inmunológicas del huésped.¹⁵

Existen dos linajes de ZIKV, el africano y el asiático/americano, y ambos linajes forman parte de un único serotipo. Por lo que se ha observado que la infección o la

vacunación con una sola cepa de ZIKV puede provocar anticuerpos ampliamente neutralizantes contra los dos linajes. ¹⁶

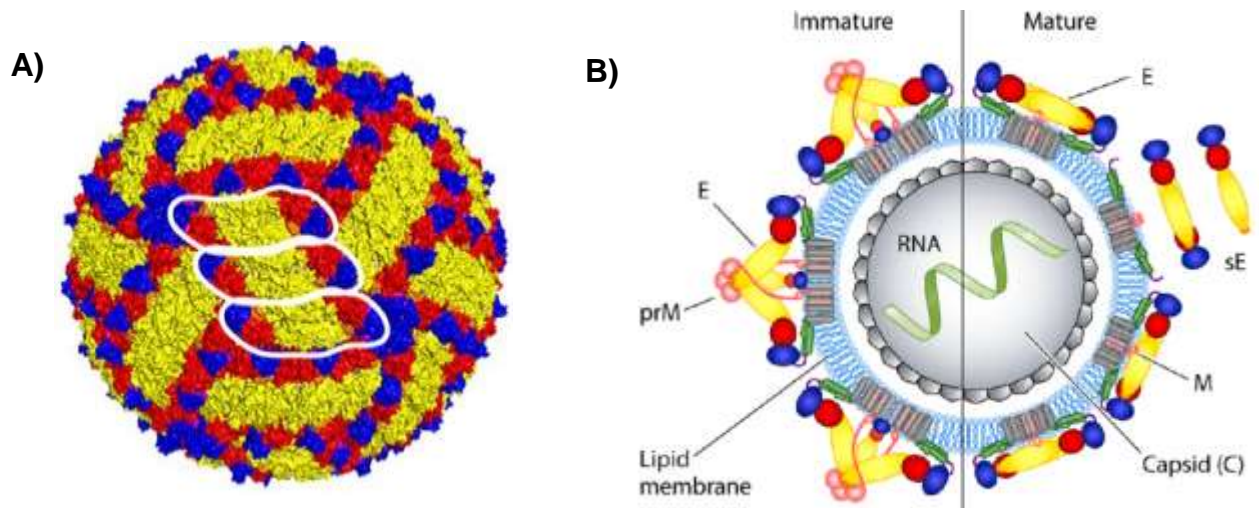


Figura 2. Estructuras de partículas de ZIKV.

A) Superficie del virión. B). Representación esquemática de los viriones inmaduros (izquierda) y maduros (derecha). C, proteína de la cápside; prM, precursor de la proteína de membrana (M); E, proteína de la envoltura; sE, proteína soluble de la envoltura. (Tomado de Heinz F, et.al., 2017) ¹⁴

1.4 Proteína de envoltura

La proteína E es el principal componente involucrado en la unión del virus al receptor, en la fusión de membranas para la salida del RNA viral al citoplasma y es el blanco más importante de la respuesta inmune del huésped. Esta proteína comprende una región transmembranal responsable del anclaje de la proteína a la membrana, y los dominios I, II y III, que constituyen la porción restante en la superficie de la membrana. El dominio I (DI) es un dominio β -barril que actúa como un puente entre el DII y el DIII. El extremo distal del DII (finger-like) contiene el péptido de fusión (FL por sus siglas en inglés) altamente conservado en DENV y ZIKV, este participa en la fusión de las membranas viral y endosomal. El DIII tiene una forma similar a la de una inmunoglobulina (Figura 3A), contiene el receptor de unión celular y tiene un papel importante en la fusión a la membrana endosomal^{15,17}. El extremo carboxilo de la proteína E está anclado a la membrana viral por dos hélices transmembranales (TM) que están seguidas una región denominada “stem,

la cual incluye hélices cortas, una de las cuales está parcialmente incrustada en la membrana viral (Figura 3B) ¹⁴.

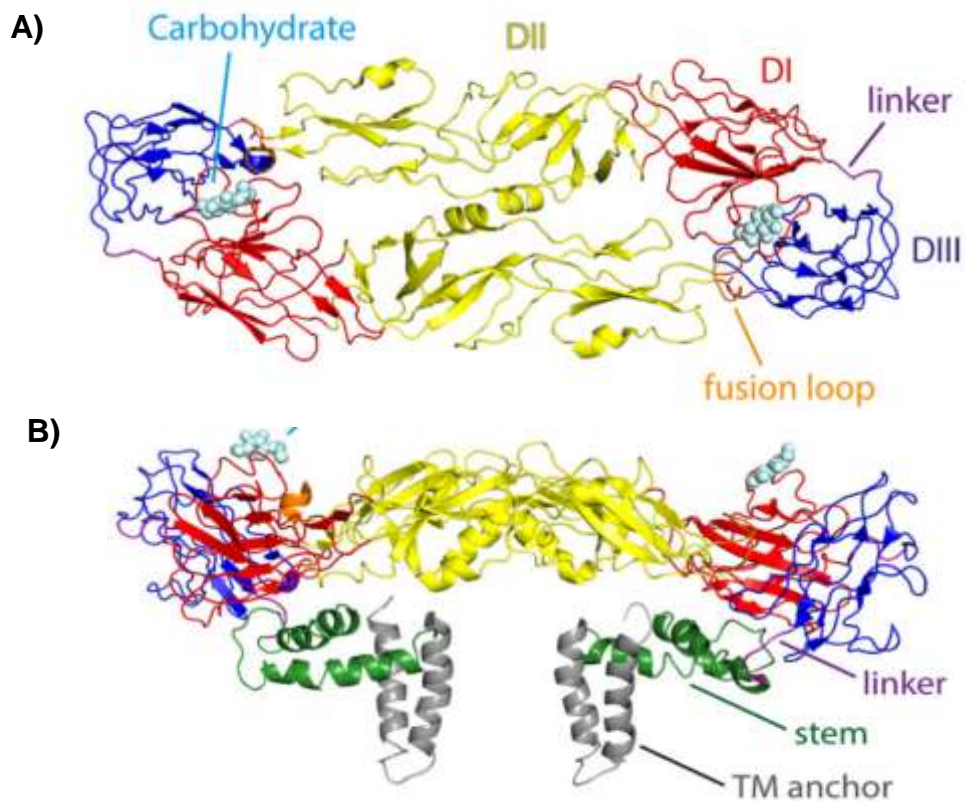


Figura 3. Estructura de la proteína E de envoltura del virus Zika.

A) Vista superior. B) Vista lateral. Los carbohidratos se muestran como esferas azul claro. TM, transmembrana. Los tres dominios de proteína E se muestran en rojo (DI), amarillo (DII) y azul (DIII), y los enlazadores DI-DIII y DIII-tallo se muestran en púrpura. El péptido de fusión en la punta del dominio II se muestra en naranja. (Tomado de Heinz F, et.al., 2017) ¹⁴

1.5 Ciclo de replicación

El virus entra en las células por endocitosis mediada por receptor. Algunos de estos receptores son TYRO3, AXL y TIM-1 en los fibroblastos y queratinocitos; y DC-SIGN en células de Langerhans¹⁸.

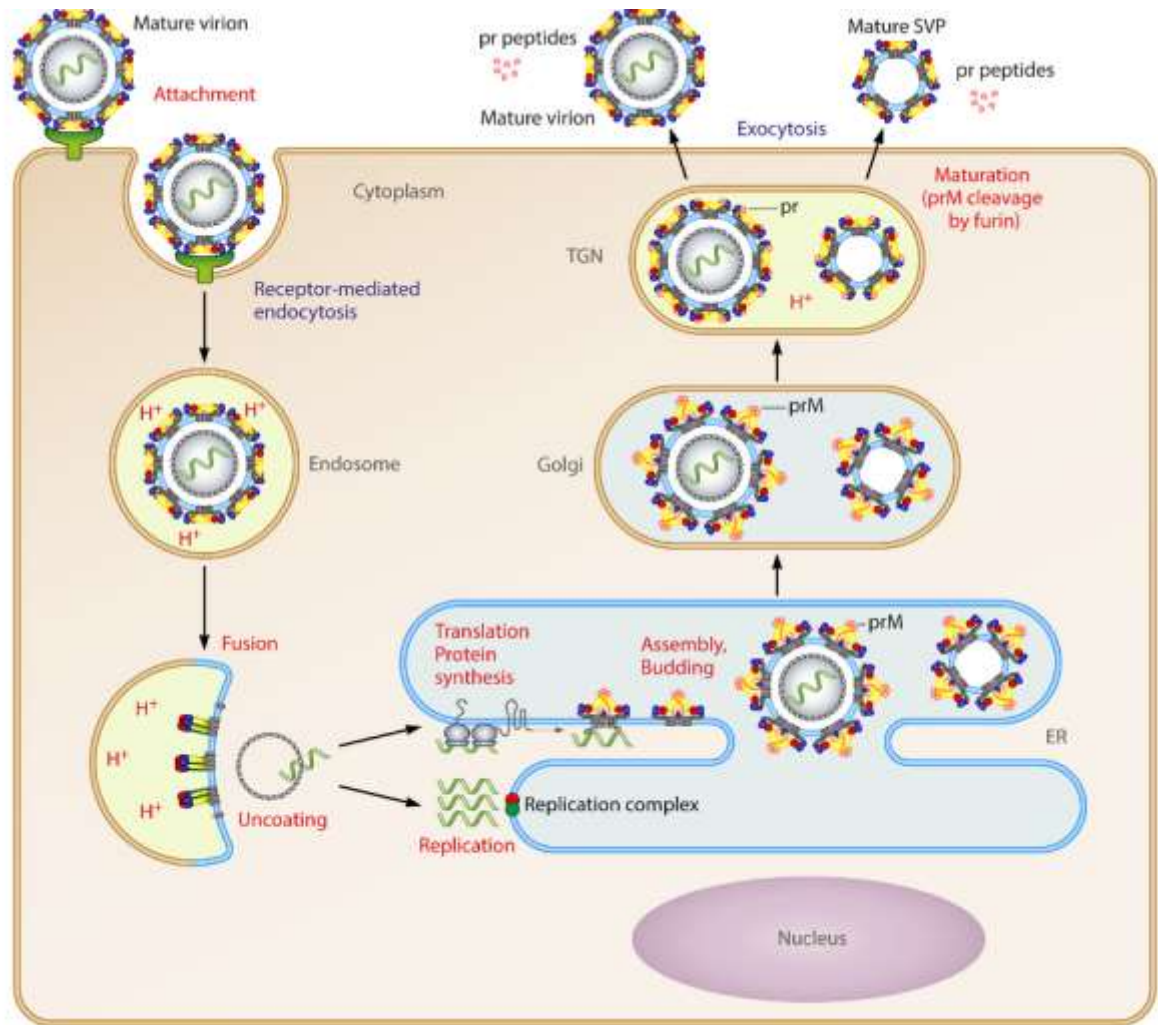


Figura 4. Ciclo de replicación de ZIKV.

Inicialmente ocurre la unión del virus a su receptor, endocitosis, fusión de las membranas viral con endosomal y liberación de ARN. Posteriormente la síntesis de la poliproteína, procesamiento en las distintas proteínas virales, ensamblaje en la membrana ER y transporte de viriones inmaduros por la ruta exocítica. Y finalmente la escisión de la prM en el trans Golgi y la liberación de viriones maduros y partículas subvirales (SVP). (Tomado de Heinz F, et.al., 2017) ¹⁴

Una vez que el virus ingresa al endosoma y con el cambio de pH se producen cambios conformacionales en la proteína de envoltura promoviéndose la fusión de membranas del virus y del endosoma permitiendo la salida del genoma viral. El ARN genómico de cadena positiva sirve como el único ARNm viral y conduce a la síntesis de una poliproteína que es procesada, co y post traduccionalmente en tres

proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales. El ensamblaje del virus tiene lugar en la membrana del ER y conduce a la formación de viriones inmaduros, que son transportados a través de la vía exocítica. El pH ácido en la red Trans-Golgi permite la escisión de prM por la furina (proteasa celular). A pH ácido, el péptido pr escindido permanece asociado con las partículas (que impiden la fusión prematura en la red Trans-Golgi) y se libera a pH neutro en el medio extracelular. Como subproducto de ensamblaje del virión se forman partículas subvirales (SVP's) que contienen una membrana de lípidos y complejos de prM-E, pero carecen de cápside. Las SVP's se transportan, procesan, y liberan como los viriones completos (Figura 4).¹⁴

1.6 Respuesta inmune contra el virus Zika

Tras la primera exposición del huésped con el virus se establece una inmunidad permanente⁶. La respuesta inmune innata tiene un papel clave en la orquestación de la protección contra ZIKV, ya que los ratones que carecen de sensores de la respuesta inmune innata muestran una mayor susceptibilidad a la infección^{19,20,17}. La infección por ZIKV estimula la producción de interferones (IFN) de tipo I (α , β), tipo II (γ) y tipo III (λ) y de numerosos genes estimulados con IFN (ISG's por sus siglas en inglés) que limitan la infección. Los ISG's IFITM3 y, en menor grado IFITM1, han demostrado inhibir al ZIKV en una etapa temprana del ciclo de replicación. Se ha demostrado que la proteína NS5 (RNA polimerasa) de ZIKV es capaz de degradar a STAT2 de una manera dependiente del proteasoma, y se ha descrito que un proceso similar limita la señalización de IFN en DENV. La naturaleza especie específica de este mecanismo de evasión inmune probablemente contribuye a la incapacidad del ZIKV para replicarse robustamente y causar la enfermedad en ratones inmunocompetentes.¹⁷

Se conoce poco sobre la respuesta celular contra el ZIKV; sin embargo, se ha demostrado que múltiples linajes de células T CD4⁺ contribuyen en la protección contra los flavivirus, a través de su capacidad de producir citocinas pro-inflamatorias y de apoyar a la maduración de la respuesta de anticuerpos. Se ha observado que durante la infección por el ZIKV, en el pico de respuesta de células T, las T CD4⁺

están polarizadas a un perfil Th1, con producción de IFN- γ , TNF- α e IL-2²¹. Por otro lado, se sabe que los linfocitos T CD8⁺ tienen un papel protector durante la infección por el virus Zika²² Así como también las células T $\gamma\delta$ y células NK en la inmunidad contra los flavivirus.²³

Los anticuerpos contra ZIKV contribuyen a la protección a través de su capacidad para neutralizar el virus directamente o a través de las funciones efectoras mediadas por la porción Fc de la cadena pesada^{17,24}. La accesibilidad del epítipo en el virión es un determinante clave en la potencia de neutralización.²⁵

1.7 Características inmunológicas de la proteína de envoltura.

La proteína de envoltura es el blanco principal de los anticuerpos neutralizantes, que interfieren con la unión al receptor y/o con la fusión de las membranas. Los anticuerpos neutralizantes son los principales mediadores de la protección a largo plazo contra la infección por los flavivirus¹⁴.

Se han descrito tres grupos de epítopos en la proteína de envoltura, estos son: epítopos del dímero E (EDE) (responsables de la neutralización cruzada virus Zika-dengue), epítopos de tipo específico del virus Zika, y epítopos del FL (de reacción cruzada entre flavivirus).¹⁴

Los EDE se encuentran localizados en la interfase de las dos subunidades. Este grupo de epítopos presentan una estructura cuaternaria muy compleja y se identificó originalmente con anticuerpos monoclonales (MAb's) humanos derivados de pacientes con dengue, dos de ellos levemente sintomáticos de la fiebre del dengue (FD), y cinco pacientes severamente sintomáticos de la fiebre hemorrágica del dengue (HFD). Se demostró que algunos de los anticuerpos neutralizan de forma cruzada los cuatro serotipos del virus dengue (DENV)²⁶. Después se demostró que algunos de estos MAb's de EDE derivados del virus del dengue neutralizan también al virus Zika²⁷. Los anticuerpos contra EDE aparentemente no son inmunodominantes, ya que se inducen sólo en una pequeña proporción de individuos infectados con el virus dengue o Zika.^{14,15}

Los anticuerpos contra el FL, de reacción cruzada entre flavivirus, neutralizan al virus del dengue, pero no neutralizan el virus Zika a pesar de la alta afinidad de unión a la proteína E del virus Zika, esto se demostró en un análisis comparativo de MAb's humanos²⁷. Esta discrepancia entre Zika y dengue puede ser producida por la diferencia en la estabilidad del virus y el grado de movimiento dinámico ("Virus Breathing") de la proteína de envoltura. Lo cual puede dar lugar a diferencias en los tiempos de exposición transitoria del péptido de fusión. Los epítomos FL pueden también ser más accesibles en la parte inmadura de los virus, una variable adicional a la presentación de antígenos durante las infecciones por flavivirus. Los anticuerpos contra el FL de Dengue durante una infección secundaria con otro serotipo, podrían condicionar el aumento de la infección dependiente de anticuerpos (ADE),¹⁴ fenómeno que se describe más adelante.

Los anticuerpos que se unen de manera específica al virus Zika pueden ser aquellos que están dirigidos contra epítomos localizados únicamente en el DIII y son independientes de la estructura del dímero E; o pueden estar dirigidos contra epítomos complejos dados por estructuras cuaternarias y que son de tipo Zika específicos y por lo tanto distinto de los EDE responsables de la neutralización cruzada del virus Zika-dengue¹⁴.

El DIII, además, contiene epítomos específicos responsables de inducir mayor neutralización en comparación a los dominios I y II¹⁵. Es por ello que se realizaron estudios estructurales detallados con MAb's de ratón dirigidos contra el DIII del virus Zika, demostrando que se dirigían a tres epítomos distintos que tenían actividad neutralizante variable. Siendo los MAb's, que reconocían el epítomo denominado de cresta lateral, los más potentes. ^{14,28}.

Además, un estudio reciente demostró que la inmunización subcutánea de ratones con el DIII es capaz de evocar una respuesta de anticuerpos específicos y neutralizantes contra ZIKV. En este mismo trabajo se comprobó que los anticuerpos inducidos por el DIII no aumentaban la infección por DENV en células que expresan FcγR²⁹.

1.8 Facilitamiento mediado por anticuerpos

La hipótesis del facilitamiento mediado por anticuerpos (ADE, por sus siglas en inglés), en las infecciones por dengue, postula que los anticuerpos generados durante una infección primaria no neutralizan eficientemente una infección subsecuente (o secundaria) con un virus de serotipo heterólogo. En cambio, el virus puede ingresar a la célula blanco a través de sus receptores y además una vez que esta opsonizado puede ingresar eficientemente a través de los receptores Fc que interaccionan con monocitos y macrófagos, que son células blanco de infección por DENV, y por lo tanto conduce a un aumento en la producción viral.³⁰ Este fenómeno ha sido implicado en la patogénesis de las formas graves de dengue (dengue hemorrágico y el síndrome de choque por dengue).¹⁷

El péptido de fusión es una de las regiones de la proteína de envoltura responsable de la amplia reactividad cruzada de anticuerpos observada entre todos los flavivirus y juega un papel importante como un sitio antigénico que contribuye al facilitamiento mediado por anticuerpos¹⁴.

Aunque todavía no está claro si los anticuerpos preexistentes contra los virus dengue pueden favorecer las infecciones de los virus Zika, o si los anticuerpos contra el virus Zika puede exacerbar la enfermedad del dengue, algunos estudios han abordado esta importante cuestión en diferentes modelos experimentales mediante el uso de anticuerpos policlonales y monoclonales, con los cuales han demostrado un extenso facilitamiento entre virus dengue y Zika.¹⁷

1.9 Uso de nanopartículas como adyuvantes

La palabra "adyuvante" proviene de la palabra latina "adjuvare", que significa "ayudar" o "potenciar", los adyuvantes de vacunas se pueden definir como cualquier producto o asociación de componentes capaz de aumentar o modular la respuesta inmune humoral o celular contra un antígeno³¹. Los péptidos, y las proteínas pequeñas o subunidades de las mismas son débilmente inmunogénicos y se someten a degradación enzimática más rápidamente que las proteínas plegadas, por lo tanto, requieren el uso de adyuvantes para mejorar la respuesta inmune en los modelos de inmunización.^{31,32}

Los adyuvantes para su uso clínico necesitan satisfacer requisitos estrictos, tales como: estimulación de una respuesta inmune tanto humoral como de células T robusta; regular la inmunidad a largo plazo; no ser tóxico; no inducir respuestas alérgicas o autoinmunes.³² Los adyuvantes, se pueden dividir en dos clases en función de sus mecanismos de acción dominantes, que son: inmunopotenciadores y sistemas de administración. Los inmunopotenciadores activan la inmunidad innata directamente (p.ej., Citocinas) o mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (como componentes bacterianos), mientras que los sistemas de administración (por ejemplo, micro y nanopartículas) concentran el antígeno y lo presentan en patrones repetitivos.³¹

Las nanopartículas se definen como partículas con un tamaño menor a 1000 nm³³. El antígeno vacunal se puede encapsular dentro o conjugar sobre la superficie de la NP. Al encapsular material antigénico, las NP's proporcionan un método para la administración de antígenos que de otro modo se degradarían rápidamente después de la inyección o inducirían una respuesta inmune de corta duración³⁴. En el sistema de suministro de nanopartículas mediante encapsulación el antígeno se libera conforme la NP se va degradando in vivo o dentro de la célula. Generalmente las nanopartículas tienen un tamaño comparable al de los patógenos, por lo que son reconocidas fácilmente y absorbidas eficientemente por APC's para la inducción de la respuesta inmune³⁵. Mientras que la captación de antígenos solubles está mediada principalmente por endocitosis, la internalización de las vacunas particuladas puede ocurrir a través de la fagocitosis, lo cual tiene consecuencias importantes pues se sabe que los fagosomas son organelos competentes para la presentación cruzada del antígeno.³⁶

Otra de las ventajas es que las NP's con un rango de tamaño de 10-100 nm pueden penetrar fácilmente en la matriz extracelular y viajar a los nódulos linfáticos, donde son absorbidas por DC residentes para la activación de la respuesta inmune.³⁵

1.10 Nanopartículas de PLGA

El poli (ácido láctico-ácido-glicólico) (PLGA) es un miembro de la familia de poliésteres alifáticos biodegradables (Figura 5). Está aprobado por la FDA para su uso en seres humanos y ha sido, durante mucho tiempo, una opción muy utilizada en la administración de fármacos de liberación prolongada,³⁷ entre ellos algunos implantes intramusculares hormonales utilizados en el tratamiento de cáncer de próstata como Lupron Depot®, el cual está basado leuprolida encapsulada en micro partículas de PLGA.³⁸

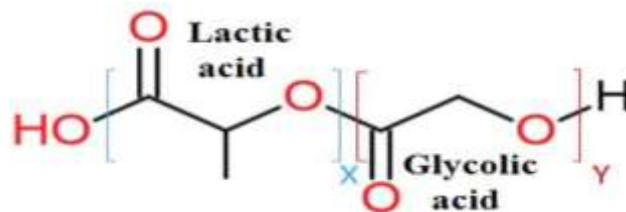


Figura 5. Estructura del polímero de PLGA.

Copolímero de ácido poli láctico (PLA) y ácido glicólico poli (PGA). X y Y indican el número de repeticiones de unidades de cada uno. (Tomado de Allahyari M et. Al., 2018) ³³

Las moléculas hidrófobas e hidrófilas están encapsuladas en partículas de PLGA a través de emulsión simple o doble respectivamente. El PLGA exhibe muchas de las propiedades ideales de un sistema de suministro a nano escala, proporcionando una liberación prolongada del agente encapsulado y degradándose en productos biocompatibles (ácido láctico y ácido glicólico) ³⁷.

Las partículas de PLGA sufren degradación por erosión masiva, durante la cual el agua se difunde en la matriz polimérica, hidrolizando los enlaces éster en la cadena principal del polímero, reduciendo su peso molecular hasta que se forman productos de degradación que pueden disolverse. Los monómeros de ácidos láctico y glicólico entran en el ciclo del ácido tricarbóxico y se eliminan posteriormente del cuerpo como dióxido de carbono y agua^{33,39}, a esto se debe su baja toxicidad.

Las partículas de PLGA pueden emplearse como adyuvantes debido a que, además de servir como acarreadores del antígeno, inducen la maduración de las células dendríticas al aumentar la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas³². Esto es debido a que son capaces de activar al

inflammasoma NLRP3, al ser absorbidas por las DC's, aumentando la secreción de interleucina-1 β (IL-1 β), lo cual contribuye a sus efectos potenciadores sobre la inmunidad celular innata y específica contra el antígeno. ⁴⁰

1.11 Nanopartículas de Chitosan

El Chitosan (CS) [α (1-4) 2-amino 2-desoxi] β -dglucano], es un copolímero de glucosamina y N-acetilglucosamina (Figura 6), que se obtiene por desacetilación de la quitina, y es abundante en crustáceos. ⁴¹

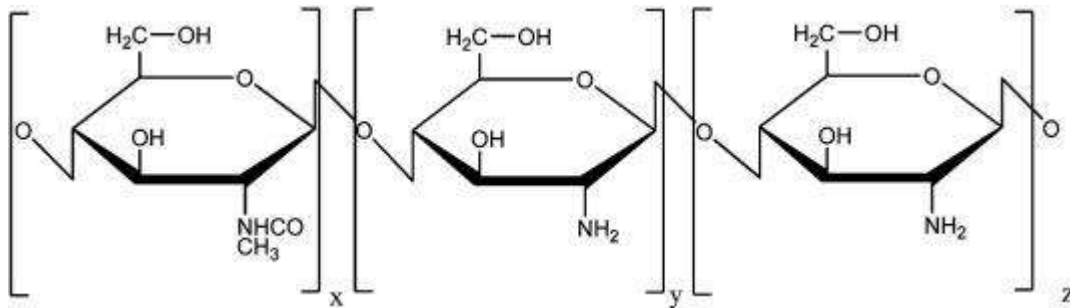


Figura 6. Estructura del Chitosan.

Polisacárido compuesto por D -glucosamina y N- acetilglucosamina. El grado de desacetilación (Y y Z) puede variar. (Tomado de Amidi M et. Al., 2009) ⁴¹

Es un material mucoadhesivo, catiónico y altamente básico que ha sido utilizado ampliamente como excipiente farmacéutico. Recientemente se ha investigado su papel como adyuvante de vacunas por sus características de biocompatibilidad y no toxicidad. Además está aprobado por la FDA para ingeniería de tejidos y administración de fármacos ^{42,43}.

Un método muy utilizado para la elaboración de nanopartículas de CS es la gelificación ionotrópica, por la cual es posible capturar moléculas dentro de una matriz polimérica. Algunos de los mecanismos mediante los cuales las moléculas quedan atrapadas son las interacciones electrostáticas, los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas⁴².

Al igual que el PLGA, el chitosan también funciona como un acarreador y un sistema de administración prolongada del antígeno, pero además se ha demostrado que las nanopartículas no conjugadas con el antígeno, y solo mezcladas con este,

también tienen una capacidad adyuvante⁴³. Estas NP's son capaces de activar el inflammasoma NLRP3⁴⁴, como se ha descrito para varios tipos de NP's⁴⁴. Y se ha sugerido que la activación del inflammasoma, por este y otros adyuvantes de vacunas en partículas, ocurre por medio un mecanismo referido como "fagocitosis frustrada". Según esta teoría, los macrófagos y las CD absorben las partículas que pueden conducir a la ruptura del fagolisosoma. Posteriormente las enzimas lisosómicas, como la catepsina B, entran en el citosol y activan directa o indirectamente al inflammasoma NLRP3⁴⁴.

2. JUSTIFICACIÓN

Tras la epidemia del Virus Zika, y su asociación con efectos teratogénicos en fetos y con el síndrome de Guillaine-Barre, la Organización Mundial de la Salud declaró a la infección por Zika como una emergencia de salud pública mundial⁴⁵. La inmunización de mujeres en edad reproductiva se consideró como la principal estrategia para la prevención de infecciones congénitas⁴⁶. La declaración de emergencia internacional se mantuvo de febrero a noviembre de 2016, y actualmente la OMS ha recomendado mantener una vigilancia elevada. Sin embargo, aún no existe una vacuna aprobada para la prevención de la infección por ZIKV. Por lo tanto, es necesario desarrollar una vacuna efectiva y de bajo costo.

Otro gran desafío que enfrenta la ciencia es la gran homología que existe entre los virus Zika y Dengue que condiciona una gran reacción cruzada, por lo que el diagnóstico ha resultado muy complejo. A esto se suma el fenómeno de facilitamiento reportado en las infecciones por virus Dengue, y condicionado por la presencia de anticuerpos de reacción cruzada entre los cuatro serotipos de dengue, por lo que existe el riesgo de que la vacunación contra Zika pueda generar anticuerpos de reacción cruzada capaces de favorecer una infección por el DENV. Adicional a esto algunos reportes proponen que la vacunación podría aumentar las posibilidades de desarrollar o empeorar el SGB, pues existe la hipótesis de que el mecanismo por el cual se desencadena la enfermedad es el mimetismo molecular¹², por lo tanto el uso de virus inactivados y SVP's debería evitarse hasta descartar dicha posibilidad. Por lo anterior es indispensable trabajar arduamente en el desarrollo de vacunas específicas para minimizar el riesgo de infecciones severas por DENV, así como el desarrollo de SGB.

Una de las estrategias para el diseño de vacunas es el uso de subunidades peptídicas. Recientemente se demostró que la inmunización de ratones con el DIII es capaz de evocar una respuesta de anticuerpos específicos y neutralizantes contra ZIKV²⁹. Sin embargo, el título de anticuerpos neutralizantes fue bajo por lo que es necesario optimizar la formulación con el uso de un adyuvante correcto para incrementar la respuesta de anticuerpos neutralizantes.

Recientemente se ha estudiado el uso de nanopartículas como adyuvantes, pues sirven como vehículos de administración, protegen la integridad de los antígenos hasta su endocitosis por las células dendríticas y permiten la liberación prolongada de los antígenos. Además, permiten la presentación cruzada, la cual es especialmente importante para la generación de respuestas celulares contra infecciones virales.⁴⁷

Por todo lo anterior, consideramos muy importante optimizar la respuesta inmune que se produce contra el dominio III de la proteína de envoltura, utilizando nanopartículas como agentes adyuvantes.

3. HIPÓTESIS

La inmunización de ratones con el dominio III del virus Zika acoplado a nanopartículas, induce una respuesta inmune más robusta a la que se observa cuando el dominio III se inocula con alúmina como adyuvante.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la respuesta inmune de ratones inmunizados con el dominio III de la proteína E del virus Zika (aislado de Oaxaca), empleando nanopartículas de CaP-PLGA y de CS como adyuvantes.

4.2 Objetivos específicos

- Diseñar, clonar, expresar y purificar el DIII de la proteína de envoltura del virus Zika.
- Sintetizar nanopartículas de CaP-PLGA y CS y caracterizar la encapsulación, por el tamaño de las partículas y por la eficiencia de la incorporación proteica.
- Evaluar la respuesta inmune humoral inducida en ratones, a través del análisis del nivel de anticuerpos por ensayos de ELISA.
- Evaluar la respuesta protectora de manera indirecta a través de la presencia de anticuerpos neutralizantes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Ratones BALB/c

Se utilizaron ratones hembra, BALB/c de 4 a 6 semanas de edad, procedentes del bioterio del CIVESTAV, para evaluar la inmunogenicidad y eficacia de vacunación.

5.2 Células C6/36

La línea celular C6/36, fue utilizada para la producción del abasto viral. Esta línea es procedente de la American Type Culture Collection (ATCC), con número de catálogo CRL-1660. Estas células son diploides, derivadas de mosquito *Aedes albopictus* en estado larvario. Crecen en monocapa en medio mínimo esencial (MEM), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) descomplementado, aminoácidos no esenciales 0.1mM, vitaminas 1.1µg/mL (Colina, pantotenato de calcio, ácido fólico, nicotinamida, piridoxal, riboflavina, tiamina, i-inositol), antibiótico-antimicótico al 1% (penicilina G sódica 10 000 U/MI, sulfato de estreptomycin 10 000 µg/MI, anfotericina B 25µg/mL, y tilosina al 0.1%).⁴⁸

5.3 Células VERO

Para la titulación del abasto viral y para la evaluación de los anticuerpos neutralizantes se empleó la línea de células VERO, donadas por el PhD. Stephen Whitehead del NIH. Estas células crecen en medio RPMI suplementado con SFB descomplementado al 10 %, aminoácidos no esenciales 0.1mM, vitaminas 1.1µg/mL (Colina, pantotenato de calcio, ácido fólico, nicotinamida, piridoxal, riboflavina, tiamina, i-inositol), antibiótico-antimicótico al 1% (penicilina G sódica 10 000 U/MI, sulfato de estreptomycin 10 000 µg/MI, anfotericina B 25µg/mL, y tilosina al 0.1%). En una atmosfera de CO₂ al 5%

5.4 Virus Zika

La secuencia codificante del Dominio III de la proteína de Envoltura y los ensayos de neutralización se basaron en una cepa del virus Zika aislada en Oaxaca en 2015, de linaje asiático.

5.5 Vector de expresión

Para la clonación del DIII se usó el vector de expresión pProEX HT (prokaryotic expression system) en la versión “B”. Las proteínas son expresadas con una cola de 6 histidinas (6xHis) en el extremo amino terminal para facilitar su purificación. La secuencia codificante de interés es clonada en el sitio múltiple de clonación (MCS). El promotor *trc* y en gen *lacI^q* permiten que la proteína sea inducible con IPTG (isopropiltiogalactósido, análogo de la lactosa). Este plásmido además contiene el gen β -lactamasa que le confiere resistencia a ampicilina.

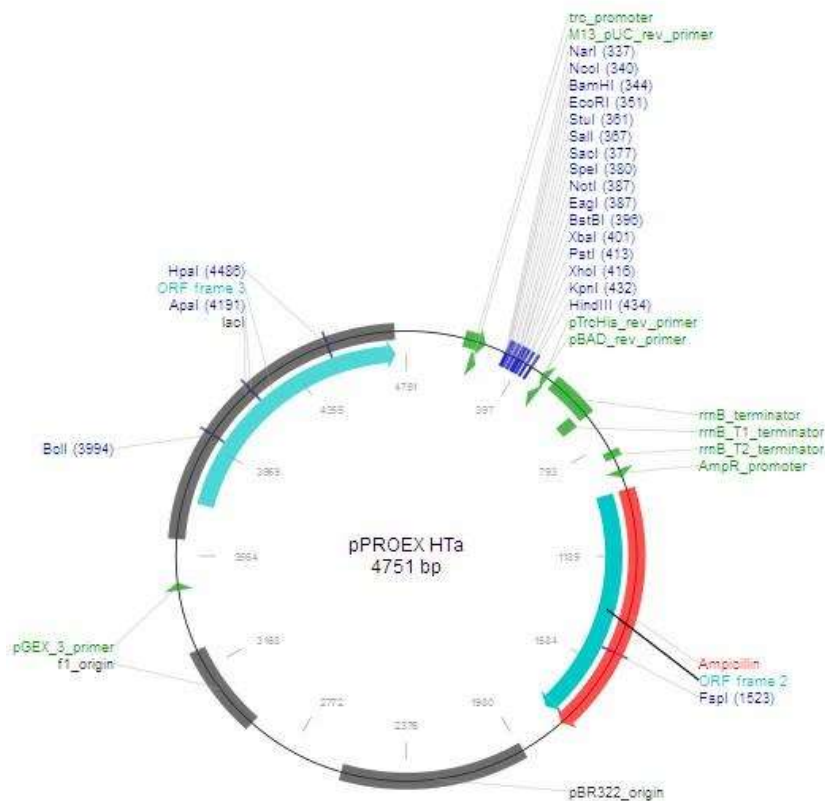


Figura 7. Mapa del vector de expresión pProEX HT.

5.6 Titulación de virus

Se emplearon cultivos de células VERO crecidas a confluencia en medio RPMI suplementado. Se desprendió la monocapa con tripsina EDTA (0.25% y 0.02% respectivamente en PBS). Las células se resuspendieron en medio suplementado y se realizó la cuenta viable con azul tripano.

Se colocaron 120,000 células/500 µl por pozo, en placas de 24 pozos. Se incubaron a 37 °C durante una hora en ambiente de CO₂ al 5%. Por otro lado, realizaron las diluciones del abasto viral con el factor de dilución de 10, en una solución Hanks suplementada con SFB al 0.5% y se mantuvieron en hielo. Pasado el tiempo de incubación de las células, se adicionaron 100 µL del virus en suspensión a cada pozo por triplicado. Como control negativo se adicionaron 100µL de diluyente del virus a tres pozos. Las placas se incubaron por 1 hora en las condiciones antes mencionadas, agitando cada 15 minutos. Posteriormente se añadió a cada pozo 0.5 mL de medio semisólido (10mL de SFB, 1mL de L-glutamina, 100mL MEM 2X sin rojo de fenol, 50mL de carboximetilcelulosa al 3% estéril y 1mL antibióticos) "Overlay" a pH 8-8.5. Se incubaron las placas en las condiciones antes mencionadas durante 5 días. Al término de la incubación se decantó el contenido de los pozos, se lavaron con PBS y se fijaron con 500 µl de metanol al 80% por 10 minutos. Se decantaron y se bloquearon con 1 ml de leche al 5% durante 20 minutos. Se decantaron, se agregó 200 µL de anticuerpo primario (4G2, dilución 1:2000) y se incubaron 1h en agitación. Cada pozo se lavó con 1 ml leche al 5%, se agregó 200 µl de anticuerpo secundario (anti-ratón HRP, Dilución 1:2000), y se incubó 1h en agitación. Se lavó con PBS y escurrió dos minutos. Se agregaron 160 µl de True Blue™ y se incubó 10 minutos. Se decantó y se contaron las unidades formadoras de placas.

5.7 Obtención del Dominio III del virus Zika

5.7.1 Amplificación de la secuencia

Se amplificó la secuencia codificante del Dominio III de la proteína de envoltura de virus Zika. Usando los iniciadores abajo descritos para la amplificación. La región codificante abarca los aminoácidos 311 al 403

Oligo rio arriba: (*Xba*I) TTT TCT AGA ATG ACC GCA GCG TTC

Oligo rio abajo: (*Xho*I) TTT CTC GAG TTA ACT CCT GTG CCA

Se analizó el producto amplificado en gel de agarosa al 2% y se tiñó con bromuro de etidio, para observar la banda con el tamaño predicho. Posteriormente se purificó el producto amplificado.

5.7.2 Clonación del dominio III de Zika en el plásmido pProEX HT

La secuencia del DIII y el vector de expresión pProEX HT se digirieron con las enzimas *XbaI* y *XhoI*, en una proporción de 10U/1µg de DNA, a 37°C durante 2 horas, se analizó la digestión total en un gel de agarosa al 1.5%. Se purificó el plásmido y el también producto de PCR y luego se ligaron con la enzima T4 DNA ligasa a 22°C durante toda la noche.

5.7.3 Transformación de bacterias XL10-Gold con las ligaciones

Los cultivos de la cepa de *E. coli* XL10-Gold se transformaron con los productos de ligación; para ello se adicionaron 5 µl del plásmido a bacterias competentes y se incubaron a 4°C por 5 minutos; posteriormente se sometieron a choque térmico incubando a 42°C por 45 segundos, seguido de una inmersión en hielo por 1min. Pasado este tiempo se adicionaron 450 µl de medio LB y se incubó a 37°C por una hora, manteniendo en agitación a 500rpm. Finalmente se sembró en placas Petri con agar LB suplementadas con 120 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37°C por 24 horas.

5.7.4 Análisis de las colonias transformadas

Se purificó el DNA plasmídico de 5 colonias por el método alcalino y se digirieron con las enzimas *XbaI* y *XhoI* durante 2 horas a 37°C. Se analizaron en un gel de agarosa al 1.5%.

5.7.5 Obtención de la construcción a gran escala

Se tomaron 2 de las colonias que liberaron el inserto para escalar el cultivo a un volumen de 300 mL de caldo LB con ampicilina a una concentración 120 µg/mL, y se incubó durante 12 horas. Se extrajo el DNA utilizando el kit para purificación de plásmidos QIAGEN Plasmid Maxi Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante, para finalmente determinar la concentración del plásmido.

5.7.6 Cinética de expresión

Con el DNA plasmídico de las colonias que habían liberado el inserto se transformaron bacterias BL21, para ello se realizó el mismo método de

transformación descrito anteriormente. Las bacterias transformadas fueron seleccionadas con 120 µg/ml de ampicilina. Se sembró una de estas colonias en 10 ml de caldo LB con 120 µg/ml de ampicilina a 37°C, en agitación durante 12 horas. Este cultivo se transfirió a un cultivo de 50 ml de LB, el cual se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 0.5 a 600 nm. Se adicionó IPTG a una concentración final de 1.0 mM para inducir la expresión de la proteína RDIII y se continuó incubando. Se tomaron muestras de 2 ml del cultivo a las 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas después de la inducción. Todas las muestras se ajustaron a una O.D de 0.4-0.5 y posteriormente se analizaron con SDS-PAGE al 17% por tinción de coomassie. La proteína de interés se identificó por Western Blot utilizando anticuerpo anti 6xHis.

5.7.7 Obtención de cuerpos de inclusión.

Se dejaron crecer las bacterias en un cultivo de 500 mL hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4-0.5 y se adicionó IPTG 1.0 mM. Se centrifugó el cultivo a 6000rpm durante 20 min y se resuspendió el paquete celular en 24 mL de solución 1 (sacarosa al 15%, tritón X-100 al 0.12% y Tris pH 8.0 50mM). Se colocó en vortex durante 1 min y después en hielo 1 min, repitiendo 5 veces. Se centrifugó a 8,000 rpm durante 20 minutos. Se resuspendió la pastilla en 24mL de solución 2 ((tritón X-100 al 0.12%, Tris pH 8.0 50 mM y EDTA 10 mM). Se colocó durante 1 min en vortex y después 1 min en hielo, repitiendo 5 veces. Se centrifugó de nuevo 8,000 rpm durante 20 minutos y se resuspendió en 10 mL de solución 3 (Tris 50 mM y EDTA 10 mM).

5.7.8 Purificación de la proteína recombinante DIII (rDIII).

Se utilizaron dos métodos para la purificación del rDIII, el primero se realizó por medio de geles preparativos, como se describe a continuación:

A la muestra obtenida de los cuerpos de inclusión se le agregó regulador Laemmlí, esta mezcla se hirvió por 5 minutos y se corrió en un gel preparativo de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 17%. Para identificar la banda correspondiente a las proteínas de interés, se sumergió una porción del gel de poliacrilamida en una solución 0.6 M de CuCl₂ por 5 minutos⁴⁹. Después se alineó esta porción del gel

con el resto y se cortó la banda donde no se había teñido el gel y que correspondía al peso de 16.6 kDa, se disgregó el gel y se dejó difundir la proteína en PBS a 4°C toda la noche. Finalmente se determinó la concentración de proteínas de cada muestra, y se verificó su pureza por SDS-PAGE y coomassie.

El segundo método de purificación utilizado se realizó por medio de una resina de Níquel. Para ello se dejó crecer un cultivo de bacterias transformadas de 500 mL hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 y se le adicionó IPTG 1.0 mM. Esto se centrifugó a 6000rpm por 20 minutos, se decantó el sobrenadante y se congeló la pastilla por 15 minutos. Se resuspendió la pastilla en 40 mL de buffer de lisis (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl y 8 M urea a pH 8), esto se agitó durante 60 segundos y se centrifugó a 14000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron 5 mL de sobrenadante y se adicionó BMR. Se lavó la resina 3 veces con buffer de lisis y se adicionaron 500 µL de ésta a un tubo falcon. Se cargó la mezcla de lisado y resina en una columna vacía con la tapa inferior puesta y se mantuvo en agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente, para permitir la interacción de los grupos imidazol de la secuencia 6xHis con los iones de níquel de la resina. Se retiró la tapa inferior y se dejó pasar el flujo por la columna para eliminar las proteínas no unidas. Se lavó 2 veces con 4 mL de buffer de lisis y 2 veces con 4 mL de buffer de lavado (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M urea a pH 6.3). Como los residuos de histidina en la etiqueta 6xHis tienen un pKa de aproximadamente 6.0 y se protonan si el pH es bajo (pH 4.5-5.3), la secuencia 6xHis de la proteína ya no se puede unir a los iones de níquel y se disocia de la resina. Por lo tanto, para eluir el rDIII se pasaron 2 mL de buffer de elución 1 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl a pH 5.9) por la columna y se recuperaron alícuotas de 500 µL (Los monómeros generalmente se eluyen a un pH 5.9). Posteriormente se pasaron 2 mL de buffer de elución 2 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl a pH 4.5) por la columna y nuevamente se recuperaron alícuotas de 500 µL (los agregados se eluyen a un pH de 4.5 aproximadamente). Finalmente, los eluidos se analizaron por SDS-PAGE y coomassie.

5.8 Preparación de nanopartículas de PLGA

Para la preparación de NP's de PLGA nos basamos en el método publicado por Dördelmann y col. en 2014⁵⁰ con el cual se elaboraron NP's de PLGA con fosfato de calcio (CaP-PLGA) por doble emulsión y evaporación de disolvente. Que consiste en preparar una primera emulsión de fase orgánica en fase acuosa y una vez obtenida esta emulsión agregarla a una segunda fase acuosa externa. De este proceso resulta una emulsión doble, que finalmente se deja en agitación para evaporar el disolvente orgánico.

El protocolo detallado de dicho método se describe a continuación:

El PLGA se disolvió en una fase orgánica, mezclando 26 µg de PLGA en 2 ml de diclorometano (DCM) y se mantuvo en agitación durante 10 minutos.

Se prepararon dos soluciones acuosas: Una con 280µL de proteína rDIII (3µg/mL) y 125µL de Na₂HPO₄ (10mM); y otra con 280µL de rDIII (3µg/mL) y 125µL de CaCl₂ (1.25mM). Para la elaboración de NP's sin proteína, se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero agregando el mismo volumen de PBS en lugar de proteína soluble. Se agregaron 375µl de PLGA/DCM a cada solución, y se agitaron en vortex. Se mezclaron ambas soluciones y se sonicaron por 20 ciclos de 30 segundos con intervalos de 30 segundos cada ciclo, hasta formar una emulsión entre la proteína y el polímero.

Después se realizó una segunda emulsión. Para ello se adicionó la primera emulsión, por goteo, a una solución de 3 mL de alcohol polivinílico (PVA) (10mg/mL) en agitación. Se volvió a ultrasonicar en las mismas condiciones. Después se permitió la evaporación del DCM por agitación durante tres horas. Las nanopartículas se recuperaron por centrifugación durante 45 minutos a 13,800rpm, se separó el sobrenadante y se almacenó para una posterior cuantificación de proteína. Se resuspendieron las nanopartículas en H₂O, se volvieron a centrifugar para lavar las nanopartículas y se resuspendieron en 1 mL de PBS. Finalmente, se analizó el tamaño de las partículas y su morfología en un microscopio electrónico de barrido.

5.9 Preparación de nanopartículas de Chitosan

La síntesis de nanopartículas de CS se realizó mediante gelificación inotrópica. Para ello se disolvieron 30 mg de CS en 10 mL de ácido acético al 1%. Esta solución se puso en agitación y se le agregaron 650µL de solución de Tripolifosfato (TPP) (10mg/mL) por goteo. Se centrifugó a 10000 rpm por 20 min, el sobrenadante se recuperó para los ensayos de eficiencia de encapsulación y el paquete se resuspendió en 1 mL de H₂O. Se volvió a centrifugar para lavar las nanopartículas y finalmente se resuspendieron en un mL de PBS. De este proceso se obtuvieron NP's sin proteína. Para elaborar NP's con proteína se realizó el mismo método, pero se agregaron 100 µL del rDIII (2.2mg/mL) a la solución de TPP.

5.10 Análisis de eficiencia de encapsulación

Durante el proceso de encapsulación de proteínas en nanopartículas, existe una porción de la concentración total que permanece libre. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo el análisis de la proteína que fue encapsulada.

Para ello fue necesario marcar el rDIII con Alexa 488. Esto se realizó mezclando el compuesto de marcaje DyLight® 488 NHS-Ester con el rDIII disuelto en buffer de borato de sodio 0.05M a pH 8.5. Esta mezcla se dejó incubar por 1 hora. De esta manera el compuesto de marcaje reacciona con las aminas primarias de la proteína, formando enlaces amida estables. Después se puso a dializar esta mezcla en PBS durante 24 horas. Durante este proceso hubo 4 cambios de buffer, con el fin de eliminar el reactivo no conjugado. Posteriormente se cuantificó la concentración de proteína en la solución por medio del kit *DC*TM Protein Assay (Bio-Rad). Finalmente se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de proteína, para ello se midió la intensidad de fluorescencia por medio de un fluorómetro a una longitud de excitación y de emisión de 485nm y 528nm respectivamente.

Una vez marcado y cuantificado rDIII, se realizaron los mismos métodos de encapsulación descritos anteriormente, pero con la proteína marcada, y se cuantificó la intensidad de fluorescencia del sobrenadante para conocer la cantidad de proteína no encapsulada en cada caso.

La eficiencia de encapsulación de proteína se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de encapsulación} = \frac{\text{Cantidad teórica de proteína encapsulada} - \text{proteína libre}}{\text{Cantidad teórica de proteína encapsulada}} \times 100$$

5.11 Esquema de inmunización de ratones

Todos los ratones utilizados durante este estudio se mantuvieron dentro de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del CINVESTAV con el número de protocolo 211-16, el cual fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, de acuerdo con los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Tabla 1. Grupos de ratones.

Grupo	rDIII Libre	Adyuvante	rDIII Encapsulado
1	25 µg	-	-
2	25 µg	Alúmina	-
3	25 µg	NP's CaP-PLGA	-
4	25 µg	NP's CS	-
5	25 µg	NP's CaP-PLGA	31.01 µg
6	25 µg	NP's CS	0.89 µg

Se utilizaron 6 grupos de ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas de edad y se inmunizaron vía intraperitoneal con 100µL de distintas preparaciones de adyuvantes (como se indica en la tabla 1) los días 1, 22 y 43. Además, se tomaron muestras de sangre (Figura 8) de aproximadamente 100µL los días 0, 21, 42 y 56 y se almacenaron a -20°C.

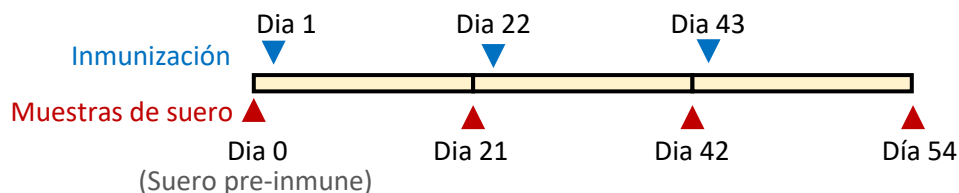


Figura 8. Esquema de Inmunización.

Todos los grupos se inmunizaron tres veces en lapsos de 21 días. Las muestras de sueros se recolectaron un día antes y 20 días después de la primera inmunización, 20 días después del primer refuerzo, y 12 días después del segundo refuerzo.

5.12 Detección de anticuerpos IgG por ELISA indirecta

Para la detección de anticuerpos IgG por ELISA se sensibilizaron varias placas de 96 pozos con la proteína rDIII del virus Zika a una concentración de 3µg/mL en buffer de carbonatos, y se incubaron a 4°C durante una noche.

Los pozos se lavaron tres veces con PBS–Tween (PBST) al 0.1% y se bloquearon con PBST-Leche al 5% durante 1 h a 37°C. Después se volvieron a lavar, se les agregó 50 µL de los sueros disueltos en PBST-Leche al 5% (1:100) y se incubaron a 37°C durante 1h. Una vez más se lavaron para adicionar 50 µL de anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (anti-ratón IgG HRP diluido 1:4000 en PBS-T-Leche al 5%) y se incubaron 1 h a 37°C. Se lavaron por última vez, se les adicionó 50 µL de solución reveladora ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) y se incubaron las placas por 1 hora a 37°C protegidas de la luz. Finalmente se analizaron a una absorbancia de 405 nm.

Como controles negativos se utilizó: solución de carbonatos, rDIII, rDIII con anticuerpo primario y rDIII con anticuerpo secundario.

5.13 Evaluación de anticuerpos neutralizantes

Los sueros de los ratones inmunizados se descomplementaron a 56°C por 30 min. Todas las muestras se diluyeron en medio de Hanks 1:100 y se analizaron por duplicado. El virus se diluyó en medio Hanks a 1 millón UFP/mL y se mezcló 1:1 con cada muestra de suero diluida. Estas mezclas de virus-suero se incubaron por 1 h a 37°C. Como control positivo de neutralización se utilizó por duplicado el virus mezclado con un suero procedente de un individuo de Veracruz infectado con Zika (diagnosticado por ELISA y RT-PCR) , y como control negativo se utilizó el pool de sueros preinmunes por cuadruplicado.⁵¹

Se plaquearon 20,000 células VERO en un volumen de 200 µl por pozo, en una placa de 96 pozos. A estas células se adicionaron 100µL de la mezcla virus-suero (50,000 UFP/pozo). De esta manera la infección viral se realizó a una multiplicidad de infección (MOI) de 2.5. Se incubaron a 37°C durante 1 hora y después se retiró la mezcla virus-suero. Se les adicionó 200 µL de medio y se incubaron durante 24

horas. Las células se tiñeron para evaluar la infección por citometría de flujo. Para ello se lavaron con PBS, se despegaron con tripsina y se lavaron nuevamente. Se incubaron con 50 μ L de solución permeabilizadora durante 20 min a 4°C, se lavaron y se bloquearon con suero humano al 5% disuelto en la solución de lavado. Se lavaron y se incubaron con 50 μ L de anticuerpo 4G2 1:500 durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron y se tiñeron con anticuerpo anti-ratón conjugado a Alexa 488 1:500 durante 30 minutos a 4°C. Se realizó otro lavado y se resuspendieron en 200 μ L de PBA (PBS, BSA 0.1-0.2 %, Azida de sodio 0.01%). Finalmente se analizaron por citometría de flujo.

5.14 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó con el software Graph Pad Prism versión 5.01. Se aplicó el análisis estadístico de ANOVA, con un post-análisis de Bonferroni para comparación entre grupos.

6. RESULTADOS

6.1 Clonación del Dominio III

La secuencia correspondiente al DIII, se amplificó, se purificó y se corroboró que tuviera el tamaño estimado de 297 pb (Figura 9A). Posteriormente el plásmido pProEX HT y la secuencia del DIII se digirieron con las enzimas XbaI y XhoI y se realizó su ligación.

Con el plásmido recombinante se transformaron bacterias XL10Gold. Y se seleccionaron en medio con ampicilina, obteniendo 5 colonias. Para verificar la clonación se purificó el DNA plasmídico de estas colonias y se realizó una digestión enzimática utilizando las enzimas XbaI y XhoI con lo que se observó la liberación del inserto de 297pb en tres de estas colonias (Figura 9B). Una de ellas se seleccionó para producir una maxiprep.

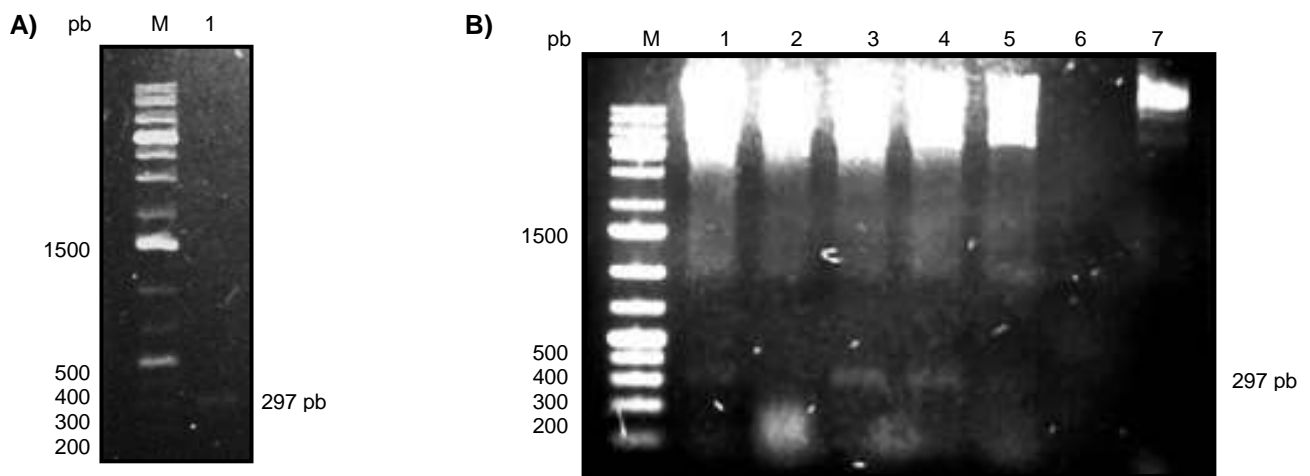


Figura 9. Clonación del Dominio III de Zika.

A) Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de la secuencia del Dominio III de Zika. Marcador de peso molecular (M); y fragmento correspondiente al Dominio III de Zika (Carril 1). B) Análisis de las colonias transformadas. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión enzimática con Xba I y Xho I de los plásmidos de 5 colonias (Carriles 1-5); 7, plásmido sin digerir.

6.2 Evaluación de la expresión y optimización de expresión de la proteína recombinante rDIII

Para obtener un rendimiento adecuado se transformaron bacterias BL21 para la expresión de la proteína. Para evaluar, identificar y optimizar el rendimiento máximo de la proteína rDIII se realizó una cinética de expresión con IPTG y se analizó por SDS-PAGE. Observando la expresión óptima de la proteína 3 horas después de la inducción (Figura 10. A y B). En el gel se observa la presencia de la banda de 16.6 kDa aproximadamente solamente en el lisado de bacterias a las cuales se les adicionó IPTG. El Western blot muestra la presencia de una banda de aproximadamente 17 kDa que corresponde al peso calculado para la proteína recombinante (Figura 10 B).

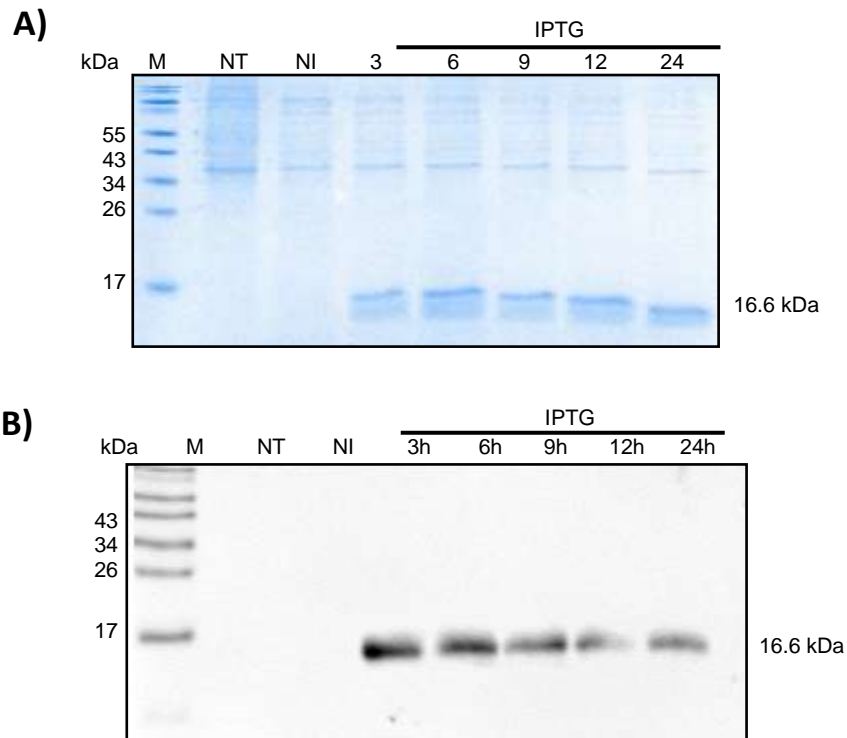


Figura 10. Cinética de expresión del rDIII

Se realizó una cinética de expresión de la proteína recombinante rDIII en bacterias BL21 adicionando IPTG 1mM. Las muestras tomadas a las diferentes horas se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 17%. A) Tinción de coomassie. B) Western Blot utilizando anticuerpo anti-6xHis para identificar la proteína. Como controles negativos se incluyen bacterias no transformadas (NT) y bacterias no inducidas (NI). M, Marcador de peso molecular.

6.3 Purificación del Dominio III

La purificación de la proteína se realizó utilizando geles preparativos. Para verificar la pureza se analizó por tinción de coomassie (Figura 11.A) y para identificarla se usó un Western Blot (Figura 11.B) obteniendo únicamente la banda de interés con un peso estimado de 16.6 kDa.

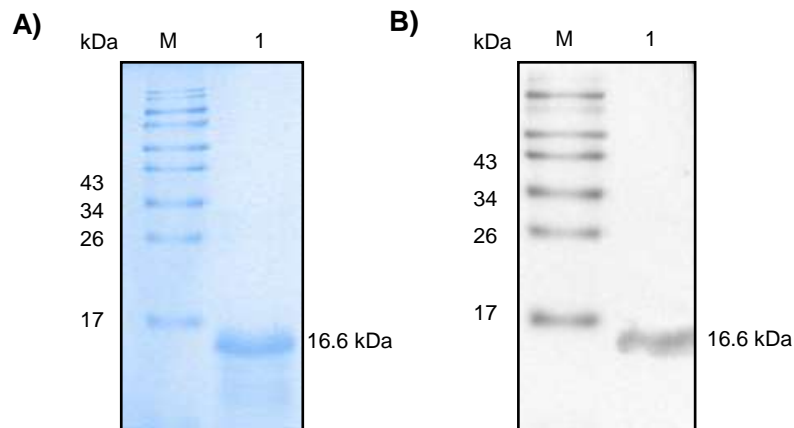


Figura 11.. Purificación del rDIII.

SDS-PAGE de la purificación del rDIII realizada con geles preparativos. A) Análisis por tinción de coomassie y B) por Western Blot utilizando anticuerpo anti-6xHis.

6.4 Análisis de eficiencia de encapsulación

Se sintetizaron nanopartículas de CaP-PLGA y de CS por separado, realizando dos tipos de síntesis, en ausencia del rDIII para generar NP's libres de proteína y en presencia del rDIII para encapsularlo en las NP's. Para conocer la cantidad de proteína encapsulada, el rDIII se marcó con Alexa 488. Para ello se mezcló el rDIII con el compuesto de marcaje. Posteriormente las NP's se sintetizaron utilizando el rDIII marcado con Alexa 488, se recuperaron los sobrenadantes y se analizaron por fluorescencia para determinar la concentración de proteína libre. Finalmente se calculó de manera indirecta el porcentaje de proteína encapsulada, obteniendo como resultado una eficiencia de encapsulación de 42.7% y 14.5% para las nanopartículas de CaP-PLGA y de CS respectivamente.

6.5 Análisis de nanopartículas por microscopía electrónica.

Para conocer el tamaño y morfología de las nanopartículas, éstas se analizaron por microscopía electrónica de barrido. Se observaron NP's de CaP-PLGA esféricas. Las NP's de CaP-PLGA sintetizadas en ausencia de proteína tuvieron un tamaño de 50-70nm (Figura 12 A) y las NP's con proteína encapsulada un tamaño de 80-130nm (Figura 12 B). Estas últimas tuvieron tamaños menos uniformes. Las NP's con diámetros mayores podrían corresponder a NP's que captaron un mayor volumen de fase acuosa interna y por lo tanto mayor cantidad de proteína que el resto.

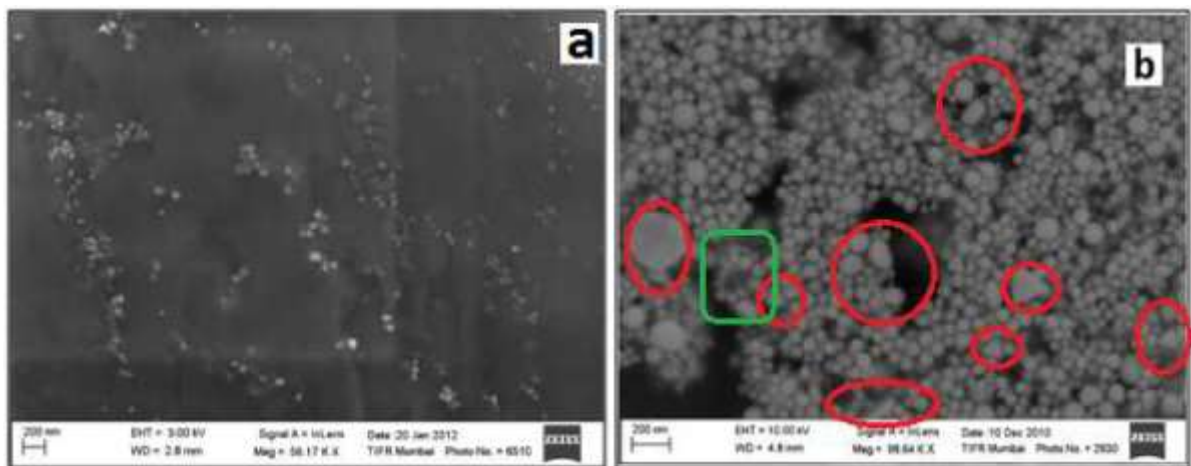


Figura 12. Microscopía electrónica de nanopartículas de CaP-PLGA.

a) Nanopartículas de CaP-PLGA sin proteína (50-70nm) y b) Nanopartículas de CaP-PLGA con proteína rDIII encapsulada (80-130nm). En círculos rojos y en el recuadro verde se pueden observar las NP's con diámetros más grandes que el resto.

Las NP's de CS también tuvieron una forma esférica. Las NP's de CS sintetizadas en ausencia de proteína midieron 150-200nm (Figura 13 A) y las NP's con proteína encapsulada 200-400 nm (Figura 13 B). Las NP's de CN con proteína encapsulada también tuvieron tamaños menos uniformes y fueron más grandes que las NP's libres de proteína.

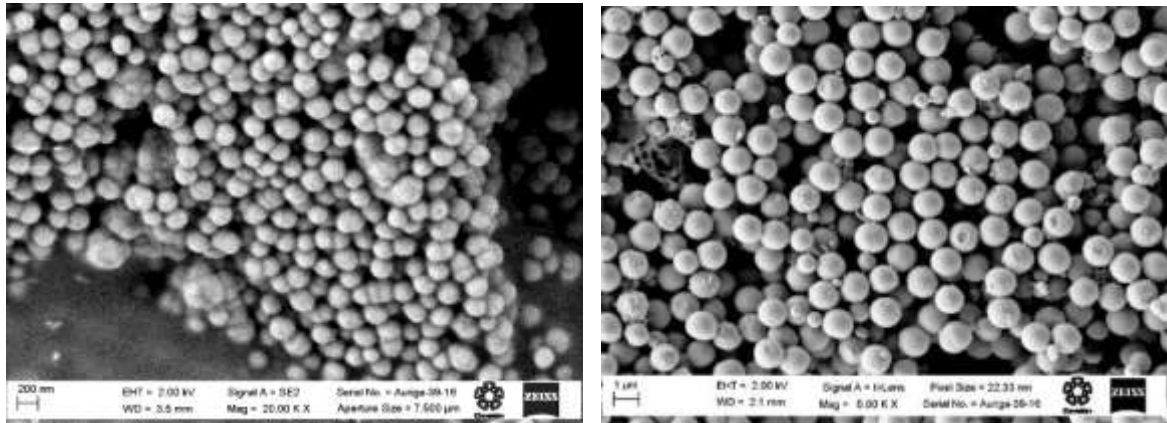


Figura 13. Microscopía electrónica de nanopartículas de CS

a) Nanopartículas de CS (150-200nm) sin proteína, b) Nanopartículas de CS con proteína encapsulada (200-400 nm).

6.6 Evaluación de la respuesta inmune Anticuerpos IgG de los ratones inmunizados con las diferentes condiciones

Con la finalidad de evaluar el grado de inmunogenicidad que la proteína rDIII es capaz de inducir, así como el efecto adyuvante de las nanopartículas, se inmunizaron 6 grupos de ratones. Todos los grupos fueron inmunizados con 25 μg del rDIII, el primer grupo se inmunizó con el rDIII sin adyuvante y los restantes con el rDIII mezclado con un adyuvante distinto: Alúmina; NP's de CaP-PLGA; NP's de CN; NP-CaP-PLGA más 31.01 μg rDIII encapsulado; NP's de CN más 0.89 μg rDIII encapsulado. Para evaluar la respuesta humoral evocada por las distintas preparaciones, todos los ratones fueron sangrados un día antes y 20 días después de la primera inmunización, 20 días después del primer refuerzo, y 12 días después del segundo refuerzo. Y se analizó el nivel de anticuerpos IgG contra el rDIII por medio de un ensayo de ELISA.

La figura 14, muestra los resultados de la respuesta inmune específica contra rDIII de Zika. Desde la primera inmunización, se empezó a observar un aumento de la respuesta de anticuerpos específica en todos los grupos. Las respuestas de anticuerpos más elevadas después de la última inmunización, y que fueron significativamente mayores a la administración del rDIII sin adyuvante, fueron las obtenidas con el rDIII mezclado con NP's de PLGA, seguido del rDIII mezclado con

NP's de PLGA con proteína encapsulada y el rDIII mezclado con NP's de CN con proteína encapsulada.

No se observaron diferencias significativas entre los distintos materiales utilizados para la elaboración de NP's, es decir, entre las respuestas inducidas por NP's CaP-PLGA ó CN. Y tampoco se observaron diferencias significativas entre las respuestas inducidas por las NP's libres de proteína y las NP's con proteína encapsulada.

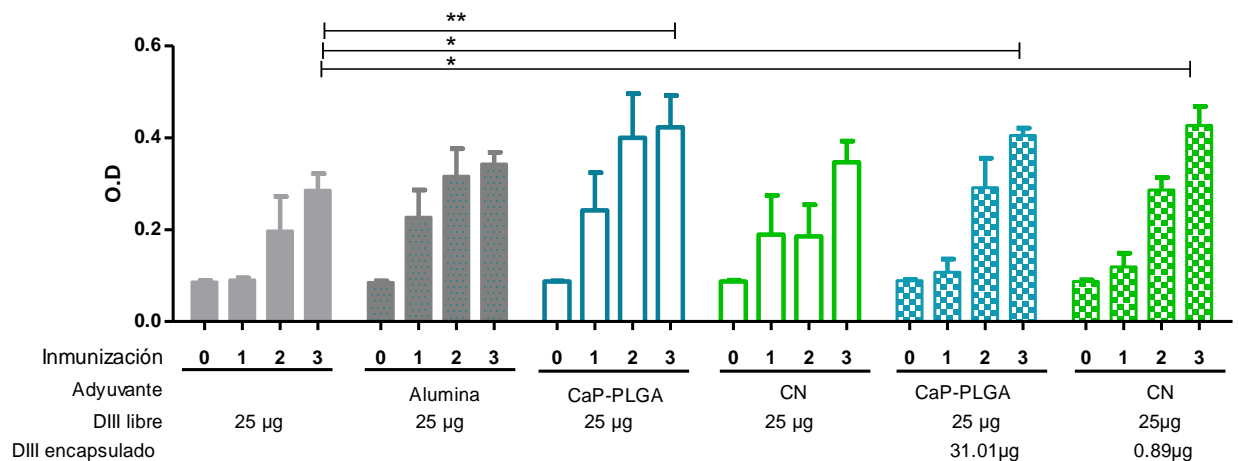


Figura 14. Evaluación de anticuerpos IgG contra el Dominio III

Se inmunizaron 6 grupos de ratones BALB/c (n=5) por vía intraperitoneal con 25 µg de rDIII mezclado con un adyuvante distinto en cada caso. La inmunización se hizo los días 1, 22 y 43 y se obtuvieron sueros los días 0, 21, 42 y 56. Los anticuerpos IgG contra el rDIII se detectaron mediante ELISA en sueros disueltos 1:100. Los resultados se muestran como la media de las densidades ópticas (O.D.) ± la desviación estándar. *p < 0.05.

6.7 Evaluación de anticuerpos neutralizantes

Para saber si los anticuerpos inducidos por las diferentes preparaciones utilizadas tenían la capacidad de neutralizar la infección por el virus, se realizó un ensayo de neutralización in vitro. Para ello se dejó interactuar al virus Zika con el suero de los ratones inmunizados, diluido 1:100, posteriormente se infectaron células VERO, se retiró el sobrenadante y se incubaron 24 horas. El porcentaje de infección se midió por citometría de flujo. Todos los grupos inmunizados con las diferentes preparaciones de NP's generaron anticuerpos con capacidad neutralizante. Como

se observa en la Figura 15, el porcentaje de infección de las células incubadas con estos sueros fue significativamente menor al porcentaje de infección de las células incubadas con suero preinmune. Siendo los grupos inmunizados con antígeno encapsulado los que mostraron un menor porcentaje de infección y por lo tanto mayor neutralización.

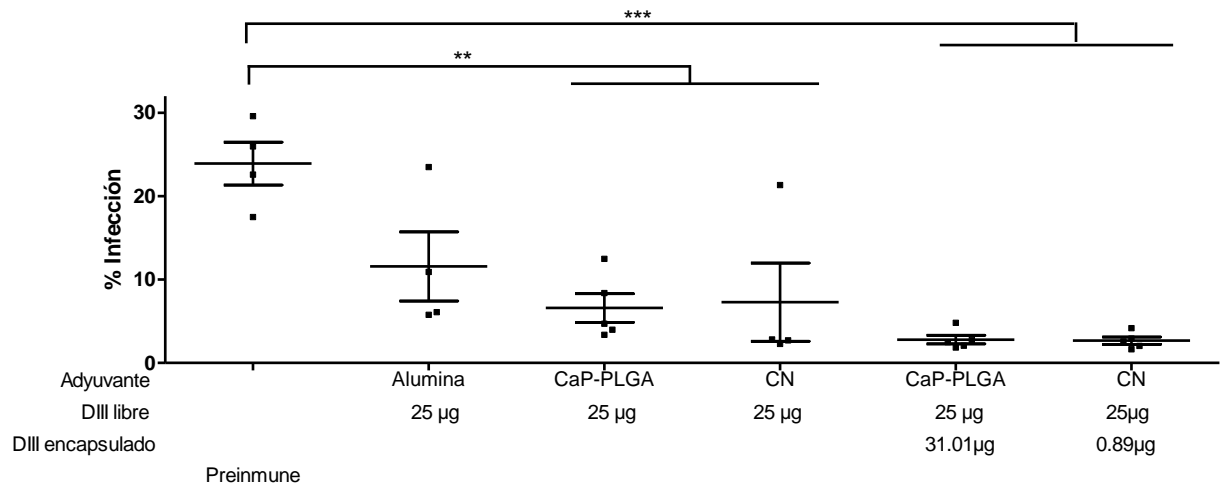


Figura 15. Evaluación de anticuerpos neutralizantes de los grupos inmunizados.

Se dejó interactuar al virus Zika con el suero de los ratones inmunizados diluido 1:100, por 1h y posteriormente se infectaron células VERO a 2.5 MOI, se retiró el sobrenadante y se incubaron 24 horas. El % de infección se midió por citometría de flujo utilizando el anticuerpo 4G2 y un anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 488. Los resultados se muestran cómo la media del % de infección \pm la desviación estándar. Como control positivo de infección se utilizó el pool de los sueros preinmunes cuya media de infección fue de 23.9%. Como control positivo de neutralización se utilizó el suero de un paciente infectado con Zika, con el cual la infección fue igual al 5%. * $p < 0.05$.

7. DISCUSIÓN

El virus Zika, perteneciente a la familia de los flavivirus, fue identificado por primera vez en 1947. Este virus no había sido considerado riesgoso, ya que la enfermedad que ocasiona no es grave y se presenta solo en uno de cada cuatro individuos infectados. Sin embargo, en 2016 la OMS declaró la infección por el virus Zika como una emergencia de salud pública de importancia internacional⁴⁵, dado que se le empezó a asociar con el SGB, así como con la microcefalia en recién nacidos (un defecto congénito que se incrementó en gran proporción en Brasil durante el brote de Zika). A finales del 2016 se declaró por terminada la emergencia por Zika, sin embargo, la OMS ha considerado esta infección como un desafío de salud pública perdurable que requiere una acción intensa, y ha declarado que la inmunización de mujeres en edad reproductiva sería una prioridad en caso de una emergencia⁴⁶.

No obstante, existen dificultades importantes en el desarrollo de una vacuna eficiente contra Zika. Una de ellas es la gran similitud que tiene con el virus Dengue. De tal manera que los individuos que hayan sido vacunados contra Zika, estarían en posible riesgo de infección por Dengue debido al facilitamiento (ADE) que podrían causar los anticuerpos generados por la vacunación, ó viceversa.

El Dominio III de la proteína de envoltura ha sido considerado un candidato idóneo para el desarrollo de una vacuna contra Zika, pues se ha observado que es un dominio que induce la producción de anticuerpos altamente neutralizantes y al mismo tiempo de baja reacción cruzada con Dengue. Esto fue demostrado por K. Stettler y M. Beltramello et.al. en 2016 ²⁴, quienes hicieron un estudio de especificidad y reactividad cruzada de anticuerpos contra Zika. En él analizaron anticuerpos procedentes de individuos infectados con el virus, observando que los anticuerpos neutralizantes más potentes eran específicos de Zika y estaban dirigidos contra el Dominio III o epítotos cuaternarios. La capacidad neutralizante del Dominio III fué corroborada por M Yang y M. Dent et.al en 2017. ²⁹ al inmunizar ratones C57BL/6 con este dominio. Ellos comprobaron que los anticuerpos, además de ser neutralizantes, no incrementaban la infección por DENV2 en células K562, y por lo tanto evitaban el fenómeno de ADE.

Por lo anterior, en este trabajo se usó el Dominio III de la proteína de envoltura como antígeno para la inmunización contra Zika. Se usó un sistema de expresión bacteriano ya que resultó muy eficiente y con un alto rendimiento. Logramos demostrar una correcta clonación (Figura 9), expresión (Figura 10) y purificación (Figura 11) de este dominio en bacterias BL21. La posibilidad de mejorar la estrategia de vacunación nos llevó a explorar el uso de nanopartículas. Por lo que procedimos a sintetizar NP's de Chitosan y PLGA, con la intención de potenciar la respuesta inmune contra el rDIII.

Se eligieron PLGA y CS para la síntesis de NP's debido a que se ha demostrado que ambos materiales son biodegradables, biocompatibles y están autorizados por la FDA para la administración de fármacos.^{35,37,42,43}

Para la síntesis de NP's de PLGA se realizó un método clásico de doble emulsión y evaporación de disolvente, pero adicionando fosfato de calcio en la fase acuosa interna para mejorar la eficiencia de encapsulación. Esta modificación fue propuesta por G. D'ordelmann y col. en 2014⁵⁰, debido a que con la técnica clásica de doble emulsión, los compuestos aniónicos de bajo peso molecular escapan fácilmente de la fase acuosa interna a la fase acuosa externa. Esto ocurre debido a ciertas características de las moléculas, como: la hidrofiliidad, el bajo peso molecular, y la repulsión electrostática de sus grupos negativos con los grupos terminales de ácido carboxílico del polímero de PLGA. Con la adición de fosfato de calcio D'ordelmann y col. (2014) comprobaron que era más eficiente la encapsulación de proteínas hidrofílicas y aniónicas. Sin embargo, en este estudio nosotros obtuvimos una eficiencia de encapsulación baja (42.7%) en comparación con la reportada en dicho trabajo (78%). El bajo peso molecular del rDIII (16.6kDa) pudo haber facilitado el escape del rDIII a la fase acuosa externa, pues esta proteína es más pequeña que la utilizada en el estudio mencionado (BSA~66 kDa). La baja eficiencia de encapsulación pudo deberse también al menor tamaño de las nanopartículas obtenidas, el cual fue de 80-130nm (Figura 12.B). Existen diversos parámetros adicionales que podrían ser ajustados para incrementar la eficiencia de encapsulación de las NP's de PLGA, tales como: concentración de proteína,

concentración de PLGA, el tiempo de sonicación y la relación entre los volúmenes de fase acuosa externa y fase orgánica. El tiempo de sonicación, por ejemplo, es un factor importante a considerar, ya que se ha observado que a mayor tiempo de sonicación menor tamaño de NP's y menor eficiencia de encapsulación⁵².

Para la síntesis de NP's de CS se utilizó el método de gelificación ionotrópica, con lo cual se obtuvo una eficiencia de encapsulación baja (14.5%). Al igual que lo sucedido con las NP's de CaP-PLGA el tamaño del rDIII pudo afectar la eficiencia de encapsulación, debido al escape de éste hacia el exterior de la NP.

Las nanopartículas elaboradas con PLGA tuvieron un tamaño de 50-130nm (Figura 12), el cual estuvo dentro del rango deseado, pues se sabe que las DC internalizan preferentemente partículas del tamaño de los virus (20-200 nm), que generalmente captan mediante endocitosis mediada por clatrina⁵³. Además se ha observado que las NP's con tamaños de 10-100 nm son capaces de penetrar fácilmente la matriz extracelular y viajar a los nódulos linfáticos³⁵. Por otro lado, las nanopartículas de CS tuvieron un tamaño mayor, que fue de 150-400 nm (Figura 13), lo cual podría limitar su captación por las DC's y su migración.

Para la inmunización se utilizaron 25 µg de proteína en todos los grupos, pues Yang y col.²⁹ reportaron que esta cantidad era la óptima para la inducción de anticuerpos IgG en ratones C57BL/6 inmunizados con Alúmina o TMG²⁹.

Una estrategia que se implementó fue la de mezclar antígeno encapsulado en las NP's y antígeno libre de acuerdo a lo descrito por Weifeng y col en 2014⁵⁴. Quienes demostraron que, al inmunizar ratones con una formulación de este tipo, se lograba efectivamente la exposición inicial adecuada al antígeno, así como la persistencia del antígeno a largo plazo. Mostrando una inducción mejorada de anticuerpos IgG específicos, en comparación con la administración de antígeno encapsulado únicamente. Sin embargo, en el presente trabajo no se observaron diferencias entre la respuesta obtenida con el rDIII mezclado con nanopartículas libres de antígeno y el rDIII mezclado con nanopartículas con el antígeno encapsulado en los ensayos de ELISA, a pesar de que se esperaba observar un efecto sumatorio con esta última preparación, ya que además de contener la misma cantidad de antígeno libre se

tenía al antígeno encapsulado que debía liberarse de manera prolongada de las nanopartículas. La ausencia de un incremento en la respuesta de anticuerpos en el caso de las nanopartículas de CS con la proteína encapsulada pudo deberse a que la cantidad de proteína encapsulada fue escasa (14.5% correspondiente a 0.89µg por ratón), no siendo suficiente para mantener la exposición del antígeno. Por otro lado, en el caso de las nanopartículas de CaP-PLGA se logró una mayor eficiencia de encapsulación, (42.7%) correspondiente a 31.01 µg por ratón, pero la respuesta tampoco fue diferente a la de las nanopartículas sin antígeno, esto pudo deberse a una lenta cinética de liberación de la proteína. Sin embargo, no fue posible determinar esta liberación de proteína in vitro.

En este trabajo no observamos diferencias en las respuestas de anticuerpos inducidas con la inmunización de rDIII mezclado con NP's libres de proteína sintetizadas con dos materiales distintos en los ensayos de ELISA. Hasta el momento se ha sugerido el mismo mecanismo adyuvante para las NP's de los dos tipos de materiales utilizados en este trabajo, el cual consiste en su capacidad de producir daño lisosómico con la posterior estimulación del inflammasoma NRLP3^{40,44}. El efecto adyuvante de las NPS en general también se atribuye a su capacidad de adsorber los antígenos en su superficie, lo cual favorece la presentación de antígenos solubles a las células B ya que al ser presentados en patrones repetitivos permiten el reclutamiento de los receptores BCR y por lo tanto la activación del linfocito B.⁵⁵

Todas las preparaciones de rDIII con NP's fueron capaces de inducir anticuerpos neutralizantes, siendo los sueros de los grupos inmunizados con las NP's con proteína encapsulada los que provocaron una mejor neutralización. Estas NP's contenían cantidades excedentes de antígeno y tamaños de partícula ligeramente mayores a las NP's libres de antígeno, por lo cual son necesarios más estudios para determinar cuál de estas variables pudo haber permitido una mejor inducción de anticuerpos neutralizantes.

De acuerdo con lo observado, la proteína recombinante utilizada en este estudio fue suficientemente inmunogénica, como lo muestra el nivel de anticuerpos IgG

observado (Figura 14). Nosotros utilizamos el rDIII en su forma desnaturalizada, por lo cual era de esperar que hubiera un limitado reconocimiento de los anticuerpos inducidos contra este dominio al momento de enfrentarse al rDIII en su forma nativa en el virión completo, sin embargo, estos anticuerpos no solo se unieron a rDIII en su forma nativa, sino que también fueron capaces de neutralizar al virus en porcentajes mayores al 50% a una dilución 1:100. La inmunización con el rDIII en su forma desnaturalizada pudo haber favorecido la exposición de epítomos crípticos lineales, pues recientemente se ha sugerido que ciertos anticuerpos capaces de reconocer este tipo de epítomos del DIII de Zika tienen capacidad neutralizante, y se sugiere que el reconocimiento ocurre debido al movimiento dinámico del virus "virus breathing"⁵⁶.

La capacidad neutralizante observada en este trabajo fue aceptable en comparación con otros estudios que analizan el porcentaje de neutralización producido por los anticuerpos inducidos con el DIII en su forma nativa. Ejemplo de ello es el estudio reportado por Yang y col en 2016.²⁹ quienes observaron un porcentaje de neutralización del 50 % a una dilución 1:16 tras inmunizar ratones con el fragmento del DIII en su forma nativa del aminoácido 303-403, utilizando Alúmina o TMG como adyuvante. La región del DIII utilizada por nosotros corresponde a los aminoácidos 311 al 403, la cual no se había analizado anteriormente. Wanbo Tai y col. en 2018⁵⁷ reportaron recientemente que los anticuerpos inducidos contra el fragmento que comprende los aminoácido 298 al 409, neutralizaban mejor la infección en comparación con los fragmentos 296-406 y 301-404, observando una neutralización de 50% a diluciones entre 1:400 y 1:800 con diferentes cepas de ZIKV, lo cual sugería que los aminoácidos adicionales en ambos extremos del dominio son importantes para la inducción de anticuerpos neutralizantes. Por lo que sería importante analizar este último fragmento para obtener una mejor neutralización del virus utilizando NP's.

8. CONCLUSIÓN

La inmunización de ratones con el Domino III de la proteína de envoltura del virus Zika mezclado con NP's de CaP-PLGA ó NP's de CN fue capaz de evocar respuestas de anticuerpos similares a las obtenidas con alúmina. Así mismo las respuestas evocadas entre las NP's de CaP-PLGA y de CN no fue distinta, siendo éste el primer estudio en el cual se realizó una comparación del efecto adyuvante entre ambos tipos de NP's.

9. PERSPECTIVAS

Utilizar el fragmento correspondiente al aminoácido 298 al 409 con el fin de obtener mayores respuestas de anticuerpos neutralizantes.

Optimizar la eficiencia de encapsulación y evaluar la cinética de liberación in vitro.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dick GW. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med.* 1952;46:521–534.
2. Plourde AR, Bloch EM. A Literature Review of Zika Virus. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(7):1185-1192. doi:10.3201/eid2207.151990.
3. Duffy M, Chen T-H, Hancock W, Al. E. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360:2536-2543.
4. Zanoluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos C, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(4):569-572. doi:10.1590/0074-02760150192.
5. WHO. Zika situation report. <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/05-january-2017/en/>. Published 2017.
6. Atif M, Azeem M, Sarwar MR, Bashir A. Zika virus disease: a current review of the literature. *Infection.* 2016;44(6):695-705. doi:10.1007/s15010-016-0935-6.
7. Besnard M, Lastère S, Teissier A, Cao-Lormeau VM, Musso D. Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance.* 2014;19(13):8-11. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751.
8. Garcez PP, Loiola EC, Higa RM da CLM, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Sci Reports.* 2016:1-7. doi:DOI: 10.1126/science.aaf6116.
9. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature.* 2016;534(7606):267-271. doi:10.1038/nature18296.

10. Li C, Xu D, Ye Q, et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):672. doi:10.1016/j.stem.2016.10.017.
11. PAHO/WHO. Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. 2015:1-11. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32405&lang=en.
12. Anaya J-M, Ramirez-Santana C, Salgado-Castaneda I, Chang C, Ansari A, Gershwin ME. Zika virus and neurologic autoimmunity: the putative role of gangliosides. *BMC Med*. 2016;14(1):49. doi:10.1186/s12916-016-0601-y.
13. Lucchese G, Kanduc D. Autoimmunity Reviews Zika virus and autoimmunity : From microcephaly to Guillain-Barré syndrome , and beyond. *Autoimmun Rev*. 2016;15(8):801-808. doi:10.1016/j.autrev.2016.03.020.
14. Heinz FX, Stiasny K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017;81(1):e00055-16. doi:10.1128/MMBR.00055-16.
15. Shi Y, Gao GF. Structural Biology of the Zika Virus. *Trends Biochem Sci*. 2017;42(6):443-456. doi:10.1016/j.tibs.2017.02.009.
16. Dowd KA, DeMaso CR, Pelc RS, et al. Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype. *Cell Rep*. 2016;16(6):1485-1491. doi:10.1016/j.celrep.2016.07.049.
17. Pierson TC, Graham BS. Zika Virus: Immunity and Vaccine Development. *Cell*. 2016;167(3):625-631. doi:10.1016/j.cell.2016.09.020.
18. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*. 2015;89(17):8880-8896. doi:10.1128/JVI.00354-15.
19. Tripathi S, Balasubramaniam VRMT, Brown JA, et al. A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. *PLoS Pathog*. 2017;13(3):1-19.

doi:10.1371/journal.ppat.1006258.

20. Lazear HM, Govero J, Smith AM, et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe*. 2016;19(5):720-730. doi:10.1016/j.chom.2016.03.010.
21. Weiskopf D, Bangs DJ, Sidney J, et al. Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1⁺ cytotoxic CD4⁺ T cells associated with protective immunity. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(31):E4256-E4263. doi:10.1073/pnas.1505956112.
22. Elong Ngono A, Vizcarra EA, Tang WW, et al. Mapping and Role of the CD8⁺ T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. *Cell Host Microbe*. 2017;21(1):35-46. doi:10.1016/j.chom.2016.12.010.
23. Wang T, Welte T. Role of natural killer and Gamma-delta T cells in West Nile virus infection. *Viruses*. 2013;5(9):2298-2310. doi:10.3390/v5092298.
24. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science (80-)*. 2016;353(6301):823-826. doi:10.1126/science.aaf8505.
25. Dowd KA, Pierson TC. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: A reductionist view. *Virology*. 2011;411(2):306-315. doi:10.1016/j.virol.2010.12.020. Antibody-mediated.
26. Dejnirattisai W, Wongwiwat W, Supasa S, et al. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nat Immunol*. 2015;16(2):170-177. doi:10.1038/ni.3058.A.
27. Barba-spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, et al. Structural basis of potent Zika – dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*. 2016;536(7614):48-53. doi:10.1038/nature18938.
28. Zhao H, Fernandez E, Dowd KA, et al. Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. *Cell*. 2016;166(4):1016-1027. doi:10.1016/j.cell.2016.07.020.

29. Yang M, Dent M, Lai H, Sun H, Chen Q. Immunization of Zika virus envelope protein domain III induces specific and neutralizing immune responses against Zika virus. *Vaccine*. 2017;35(33):4287-4294. doi:10.1016/j.vaccine.2017.04.052.
30. Rouvinski A, Dejnirattisai W, Guardado-Calvo P, et al. Covalently linked dengue virus envelope glycoprotein dimers reduce exposure of the immunodominant fusion loop epitope. *Nat Commun*. 2017;8(May):15411. doi:10.1038/ncomms15411.
31. Mohan T, Verma P, Nageswara Rao D. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *Indian J Med Res*. 2013.
32. Takami A, Masanori B, Mitsuru A. Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. *Adv Polym Sci*. 2011;247:1-35. doi:DOI: 10.1007/12_2011_150.
33. Allahyari M, Mohit E. Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles. *Hum Vaccines Immunother*. 2016;12(3):806-828. doi:10.1080/21645515.2015.1102804.
34. Gregory AE, Titball R, Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3(March):1-13. doi:10.3389/fcimb.2013.00013.
35. Zhao L, Seth A, Wibowo N, et al. Nanoparticle vaccines. *Vaccine*. 2014;32(3):327-337. doi:10.1016/j.vaccine.2013.11.069.
36. Temmerman M De, Rejman J, Demeester J, Irvine DJ, Gander B, Smedt SC De. Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. *Drug Discov Today*. 2011;16(13-14):569-582. doi:10.1016/j.drudis.2011.04.006.
37. McCall RL, Sirianni RW. PLGA Nanoparticles Formed by Single- or Double-emulsion with Vitamin E-TPGS. *J Vis Exp*. 2013;(82):1-8. doi:10.3791/51015.

38. Singh G, Kaur T, Kaur R, Kaur A. Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA. *Int J Pharmacol Pharm Sci.* 2014. doi:<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.679.2373&rep=rep1&type=pdf>.
39. Silva AL, Soema PC, Slütter B, Ossendorp F, Jiskoot W. PLGA particulate delivery systems for subunit vaccines: Linking particle properties to immunogenicity. *Hum Vaccines Immunother.* 2016;12(4):1056-1069. doi:10.1080/21645515.2015.1117714.
40. Sharp FA, Ruane D, Claass B, et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(3):870-875. doi:10.1073/pnas.0804897106.
41. Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W, Hennink WE. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(1):59-82. doi:10.1016/j.addr.2009.11.009.
42. Mohammed MA, Syeda JTM, Wasan KM, Wasan EK. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics.* 2017;9(4). doi:10.3390/pharmaceutics9040053.
43. Izaguirre-Hernández IY, Mellado-Sánchez G, Mondragón-Vásquez K, et al. Non-Conjugated Chitosan-Based Nanoparticles to Proteic Antigens Elicit Similar Humoral Immune Responses to Those Obtained with Alum. *J Nanosci Nanotechnol.* 2017;17(1):846-852. doi:10.1166/jnn.2017.13067.
44. Neumann S, Burkert K, Kemp R, Rades T, Dunbar PR, Hook S. Activation of the NLRP3 inflammasome is not a feature of all particulate vaccine adjuvants. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(6):535-542. doi:10.1038/icb.2014.21.
45. WHO. Fifth meeting of the Emergency Committee under the International Health Regulations (2005) regarding microcephaly, other neurological disorders and Zika virus. <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/zika-fifth-ec/en/>. Published 2016.

46. WHO/UNICEF. Zika Virus (ZIKV) Vaccine Target Product Profile (TPP). http://www.who.int/csr/research-and-development/who_zika_vaccine_tpp.pdf. Published 2017.
47. Oyewumi MO, Kumar A, Cui Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Rev Vaccines*. 2011;9(9):1095-1107. doi:10.1586/erv.10.89.Nano-microparticles.
48. Garcia-Machorro J, Cedillo-Barrón L. Evaluación de la inmunogenicidad de proteínas recombinantes del virus Dengue serotipo 2. 2011.
49. Mellado-Sanchez G, Cedillo-Barrón L, Estrada-García I. Evaluación de la respuesta inmune de secuencias codificantes de las proteínas E y NS1 del virus del Dengue 2 en un modelo murino. 2008.
50. Gregor Doerdelmann, Diana Kozlova, Sarah Karczewski, Rosario Lizio SK and ME. Calcium phosphate increases the encapsulation efficiency of hydrophilic drugs (proteins, nucleic acids) into poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for intracellular delivery. *J Mater Chem B*. 2014;2:7250-7259. doi:10.1039/c4tb00922c.
51. Kraus AA, Messer W, Haymore LB, De Silva AM. Comparison of plaque- and flow cytometry-based methods for measuring dengue virus neutralization. *J Clin Microbiol*. 2007. doi:10.1128/JCM.00827-07.
52. Feczko T, Tóth J, Dósa G, Gyenis J. Optimization of protein encapsulation in PLGA nanoparticles. *Chem Eng Process Process Intensif*. 2011;50(8):757-765. doi:10.1016/j.cep.2011.06.008.
53. Xiang SD, Scholzen A, Minigo G, et al. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods*. 2006;40(1):1-9. doi:10.1016/j.ymeth.2006.05.016.
54. Zhang W, Wang L, Liu Y, et al. Immune responses to vaccines involving a combined antigen- nanoparticle mixture and nanoparticle-encapsulated antigen formulation. *Biomaterials*. 2014;35:6086-6097.

doi:10.1016/j.biomaterials.2014.04.022.

55. López-Sagaseta J, Malito E, Rappuoli R, Bottomley MJ. Self-assembling protein nanoparticles in the design of vaccines. *Comput Struct Biotechnol J*. 2016;14:58-68. doi:10.1016/j.csbj.2015.11.001.
56. Wu Y, Li S, Du L, et al. Neutralization of Zika virus by germline-like human monoclonal antibodies targeting cryptic epitopes on envelope domain III. *Emerg Microbes Infect*. 2017. doi:10.1038/emi.2017.79.
57. Tai W, He L, Wang Y, et al. Critical neutralizing fragment of Zika virus EDIII elicits cross-neutralization and protection against divergent Zika viruses article. *Emerg Microbes Infect*. 2018. doi:10.1038/s41426-017-0007-8.