



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**“Desarrollo de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para  
la detección rápida de la proteína no estructural 1 (NS1)  
del Virus del Dengue”**

**TESIS**

Que presenta

**MicroBiol. MAIDOLY BATISTA FERNÁNDEZ**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**BIOQUÍMICA**

Directores de la Tesis:

**Dr. Edgar Morales Ríos**

**Dra. Leticia Cedillo Barrón**

Ciudad de México

Agosto, 2024

**ASESORES:**

Dr. José Víctor Calderón

Investigador titular del Departamento de Bioquímica, CINVESTAV-IPN.

Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes

Investigador titular del Departamento de Bioquímica, CINVESTAV-IPN.

Dr. David Andrés Fernández Benavides

Profesor Investigador ITB, Ingeniero de Proyectos, CIDESI.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica en colaboración con el Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. Edgar Morales Ríos y la Dra. Leticia Cedillo Barrón. Este trabajo es parte del proyecto F003-322623 Laboratorio Nacional de Investigación y Tecnologías Médicas (LANITEM) CONAHCYT. Al mismo tiempo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) a través de una beca de maestría de CVU 1233870.

## AGRADECIMIENTOS

*La gratitud, como ciertas flores, no se da en la altura y reverdece en la tierra buena de los humildes.*

*José Martí*

A mi madre, por su inquebrantable fortaleza mientras enfrentaba la dificultad de tenerme lejos durante este proceso. Su apoyo constante y su amor incondicional han sido mi roca en los momentos difíciles. Te amo.

A la Dra. Leticia Cedillo Barrón por abrirme las puertas de su laboratorio. Su comprensión y apoyo han sido fundamentales para superar los desafíos que encontré en el camino. Su paciencia infinita me ha permitido crecer y aprender en este proceso.

Al Dr. Edgar Morales Ríos por haberme permitido establecer esta colaboración, por su apoyo constante y comprensión. Su contribución ha sido fundamental en este camino.

A mis asesores: Dr. Víctor Calderón Salinas y Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes por su guía y apoyo lo cual ha permitido el perfeccionamiento de este trabajo.

A mi asesor Dr. David Andrés Fernández Benavides y el proyecto Biosensor Multiespectral KANAN.COVDEN-LANITEM 2023 del Centro de Ingeniería y Desarrollo industrial (CIDESI) por sus consejos y el financiamiento brindado para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Julio Cordero por sus consejos siempre oportunos. Por ser un excelente maestro y compartir sus conocimientos experimentales conmigo. Por brindarme su amistad y paciencia.

A Juve. Muchísimas gracias por toda la ayuda que me dio en mis experimentos. Por siempre darme ánimos y brindarme su amistad.

A mis compañeros del lab de Biomedicina Víctor, Gerardo y Yandy y a mis compañeros del lab de Bioquímica Luis Janiel, Nicole, Jorge, Karim, Sergio y

Daniela por su amistad y compañerismo. Por siempre estar dispuestos a ayudarme y a compartir sus conocimientos.

A mi querida comunidad de cubanos, en especial a mi grupito de atrás Cele, Anaisa, Maikel, Mari y Javi; a mis amigos Darian, Luisin y Yani; y por supuesto mi querida Clarys, por formar parte de esta familia donde, a pesar de nuestras diferencias ocasionales, siempre prevalecen las risas y el apoyo mutuo. Gracias por ser mi pedacito de Cuba en México.

A Chuchi, por ser más que un compañero de vida, por ser mi apoyo incondicional y mi complemento perfecto. Juntos hemos aprendido a superarnos y a ser mejores personas. Gracias por tu constante presencia y por compartir este camino conmigo.

A la coordinación del Departamento de Bioquímica y a todos los Dres y Dras que nos brindaron sus experiencias y conocimientos.

## INDICE

|   |      |
|---|------|
| ABREVIATURAS .....  | viii |
| INDICE DE FIGURAS.....  | x    |
| INDICE DE TABLAS .....  | xi   |
| RESUMEN .....   | xii  |
| ABSTRACT.....   | xiii |
| 1 INTRODUCCIÓN .....  | 1    |
| 1.1 Características estructurales y genómicas.....  | 1    |
| 1.2 Ciclo Replicativo Viral.....  | 4    |
| 1.3 Infección por el Virus del Dengue.....  | 6    |
| 1.3.1 Respuesta inmune e inmunopatogenia.....   | 7    |
| 1.3.2 Función de NS1 en el desarrollo de la infección .....                                       | 9    |
| 1.4 Diagnóstico de DENV.....  | 13   |
| 1.4.1 Detección de ARN viral .....  | 14   |
| 1.4.2 Detección serológica.....   | 15   |
| 1.4.3 Detección antigénica NS1.....   | 16   |
| 2 JUSTIFICACIÓN .....   | 19   |
| 3 HIPÓTESIS: .....  | 20   |
| 4 OBJETIVOS .....   | 21   |
| 4.1 Objetivo General:.....  | 21   |
| 4.2 Objetivos específicos:.....   | 21   |
| 5 MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 22   |
| 5.1 Células y virus .....   | 22   |
| 5.2 Anticuerpo monoclonal murino .....  | 22   |
| 5.3 Vector de expresión para la proteína NS1 de DENV-2 .....                                      | 22   |
| 5.4 Transformación de células <i>E. coli</i> BL21 quimiocompetentes.....                          | 22   |
| 5.5 Sobreexpresión de la proteína NS1 recombinante en células BL21.....                           | 23   |
| 5.6 Lavado de los cuerpos de inclusión y purificación de la proteína NS1 ...                      | 23   |
| 5.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot.....                        | 24   |
| 5.8 Esquema de inmunización y obtención de suero policlonal.....                                  | 24   |
| 5.9 Purificación y cuantificación de anticuerpos monoclonales murinos y policlonales de rata..... | 25   |
| 5.10 Ensayo de ELISA indirecto .....  | 25   |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 5.11 | Estandarización del ensayo de ELISA de captura. ....   | 27 |
| 5.12 | Validación del ensayo de ELISA de captura y Límites de detección.....  | 28 |
| 6    | RESULTADOS.....  | 29 |
| 6.1  | Expresión y purificación de la proteína NS1 recombinante de DENV-2 en el sistema BL21 de <i>E. coli</i> . ....                   | 29 |
| 6.2  | Evaluación de los sueros de rata en el reconocimiento de la proteína NS1 recombinante.....                                       | 30 |
| 6.3  | Purificación y caracterización funcional de los anticuerpos monoclonales murinos y policlonales de rata. ....                    | 31 |
| 6.4  | Optimización de las concentraciones de anticuerpo monoclonal (AcM), anticuerpo policlonal (AcP) y proteína recombinante NS1..... | 33 |
| 6.5  | Desarrollo del ensayo de ELISA de captura para la detección de NS1 de DENV.33  |    |
| 6.6  | Límites de detección del ensayo de ELISA de captura.....   | 34 |
| 6.7  | Evaluación de sobrenadantes de células infectadas mediante ensayo de ELISA de captura.....                                       | 35 |
| 7    | DISCUSIÓN .....  | 37 |
| 8    | CONCLUSIONES.....  | 41 |
| 9    | PERSPECTIVAS .....   | 42 |
| 10   | REFERENCIAS.....   | 43 |

## ABREVIATURAS

|                |  |
|----------------|--|
| ADE            | Infección mejorada por anticuerpos                     |
| ARN            | Ácido ribonucleico                                     |
| ARNdc          | Ácido ribonucleico de doble cadena                     |
| DC-SIGN        | Proteína de adhesión celular 3 no asociada a integrina |
| DENV           | Virus Dengue   |
| ELISA          | Ensayo inmunoenzimático                                |
| GAG            | Glicosaminoglicano                                     |
| GPI            | Glicosilfosfatidilinositol                             |
| IFN            | Interferón   |
| Ig             | Inmunoglobulina  |
| IL             | Interleucina   |
| IMAC           | Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados    |
| IPTG           | Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido           |
| MIF            | Factor inhibitorio de migración de macrófagos          |
| NF- $\kappa$ B | Factor de necrosis kappa B                             |
| NS1            | Proteína no estructural 1                              |
| NS1r           | Proteína no estructural 1 recombinante                 |
| OPD            | Diclorhidrato de o-fenilendiamina                      |
| ORF            | Marco abierto de lectura                               |
| PVDF           | Fluoruro de polivinilideno                             |
| RE             | Retículo endoplásmico                                  |
| RER            | Retículo endoplásmico rugoso                           |
| RIG-1          | Gen inducible por ácido retinoico                      |
| TAM            | Receptores de cinasas de tirosina                      |
| TGN            | Red Trans-Golgi  |
| TIM            | Receptores de fosfatidilserina                         |
| TLR            | Receptores tipo Toll                                   |



|         |  |
|---------|--|
| TNF     | Factor de necrosis tumoral                         |
| qRT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real |
| UTR     | Región no traducida                                |

## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Estructura y genoma de DENV. ....   | 2  |
| Figura 2. Ciclo replicativo de DENV.....  | 5  |
| Figura 3. Estructura del dímero NS1.....  | 10 |
| Figura 4. Línea de tiempo de la aparición de los biomarcadores de la infección por dengue.....  | 14 |
| Figura 5: Sensibilización de placas a diferentes concentraciones de antígenos, de anticuerpos y diferentes diluciones de sueros de rata. .... | 26 |
| Figura 6: Expresión y purificación de la proteína NS1r cepa BL21.....   | 29 |
| Figura 7: Reconocimiento de la proteína NS1 recombinante con sueros de rata mediante ensayo de ELISA indirecto. ....                          | 30 |
| Figura 8: Purificación de los anticuerpos monoclonales y policlonales por cromatografía de afinidad. ....                                     | 32 |
| Figura 9: Actividad de los anticuerpos monoclonales y policlonales en el reconocimiento de NS1r mediante ensayo de ELISA indirecto.....       | 32 |
| Figura 10: Estandarización de las concentraciones de antígeno y anticuerpos mediante ensayo de ELISA indirecto. ....                          | 33 |
| Figura 11: Evaluación de los anticuerpos mediante ensayo de ELISA de captura. ....  | 34 |
| Figura 12: Límites de detección del ensayo de ELISA de captura con la proteína NS1 recombinante .....   | 35 |
| Figura 13. Evaluación de la proteína NS1 proveniente de sobrenadantes de células infectadas con DENV-2.....                                   | 36 |

## **INDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Sensibilidad de ELISAs para NS1 en dengue primario y secundario ..... 18

## RESUMEN

La infección por el virus del Dengue (DENV) es un grave problema de salud global, siendo la región de Las Américas de las más afectadas. Existen múltiples estrategias para el diagnóstico del DENV. Una de las más utilizada es el uso de kits basados en ELISA de captura para detectar el antígeno viral NS1, identificado como un marcador de las etapas tempranas de la infección. Estas pruebas son costosas y poseen baja capacidad de procesar muestras, sobre todo en países con alta incidencia de la infección.

Este estudio conduce a diseñar, desarrollar y evaluar un ensayo de ELISA de captura para detectar la proteína NS1 de DENV, lo que puede contribuir en un futuro al diagnóstico viral. Primeramente, se expresó y purificó la proteína NS1 de DENV-2 a partir de bacterias. Con esta proteína, se llevó a cabo un esquema de inmunización en ratas y se obtuvo un suero hiperinmune específico contra NS1, cuya fracción de IgG fue purificada. Para la purificación del anticuerpo monoclonal murino se partió de sobrenadantes de la clona 12.1810 de células de hibridoma. Ambos anticuerpos fueron evaluados mediante un ensayo de ELISA indirecto, demostrando su capacidad de reconocer y detectar a la proteína NS1 recombinante.

Para el ensayo de ELISA de captura, se establecieron concentraciones óptimas de 1  $\mu\text{g/mL}$  para el anticuerpo monoclonal de ratón y de 4  $\mu\text{g/mL}$ , para el anticuerpo policlonal de rata. Utilizando estas concentraciones, se determinó que el anticuerpo monoclonal actuaría como anticuerpo de captura y el anticuerpo policlonal como anticuerpo de detección. Bajo estas condiciones se pudo detectar una concentración mínima de 11.7 ng/mL de NS1 recombinante. Además, el ensayo se validó con sobrenadantes provenientes de células infectadas con DENV-2. Los anticuerpos utilizados no pudieron reconocer la forma nativa de NS1, solo la forma recombinante utilizada como control. El desarrollo de conjuntos de anticuerpos monoclonales, así como, de esquemas de inmunización con la proteína en su forma hexamérica y glicosilada permitirá una mejor estandarización del ensayo de ELISA de captura como herramienta diagnóstica.

## **ABSTRACT**

Dengue virus (DENV) infection is a serious global health issue, with the Americas region being among the most affected. There are multiple strategies for diagnosing DENV. One of the most widely used methods is the capture ELISA kits to detect the viral NS1 antigen, identified as a marker of early infection stages. These tests are expensive and have limited sample processing capacity, especially in countries with high infection rates.

This study aims to design, develop, and evaluate a capture ELISA assay for detecting the NS1 protein of DENV, which could contribute to future viral diagnostics. Initially, the NS1 protein from DENV-2 was expressed and purified from bacteria. This protein was used for immunization in rats to produce specific hyperimmune serum against NS1, with the IgG fraction purified. Monoclonal antibody purification was based on supernatants from the 12.1810 hybridoma cell clone. Both antibodies were evaluated using an indirect ELISA, demonstrating their ability to recognize and detect recombinant NS1 protein.

For the capture ELISA assay, optimal concentrations were established at 1 µg/mL for the mouse monoclonal antibody and 4 µg/mL for the rat polyclonal antibody respectively. Using these concentrations, it was determined that the monoclonal antibody would act as the capture antibody and the polyclonal antibody as the detection antibody. Under these conditions, a minimum concentration of 12 ng/mL of recombinant NS1 could be detected. Additionally, the assay was validated using supernatants from cells infected with DENV-2. The antibodies used could recognize the recombinant form of NS1 used as a control but not the native form of NS1, only the recombinant form used as a control.

Developing pools of monoclonal antibodies and immunization schemes with the protein in its hexameric and glycosylated form will enable better standardization of the capture ELISA assay as a diagnostic tool.

## 1 INTRODUCCIÓN

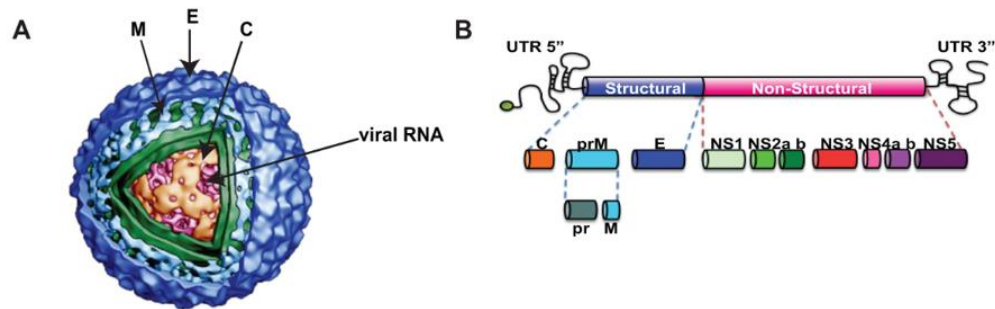
El Dengue es una enfermedad viral causada por el Virus del Dengue (DENV, del inglés: *Dengue Virus*), la cual es transmitida por la picadura de las hembras de dos especies de mosquitos del género *Aedes*: *A. aegypti* y *A. albopictus*. Existen cuatro serotipos del virus, que se encuentran estrechamente relacionados entre sí (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4). Para el año 2022 en la región de Las Américas se contabilizaron 2, 811, 433 casos de dengue. El mayor número de casos en la región se reportó en Brasil, Nicaragua, Perú, Colombia y México (PAHO, 2023). México reportó 59, 918 casos con un total de 52 defunciones (Secretaría de Salud, 2023). En este año se ha documentado un repunte de 5 veces más casos en el mismo mes. Cabe mencionar que en México se encuentran presentes los 4 diferentes serotipos de DENV, pudiendo existir predominancia de algún serotipo en particular en un año determinado. Por lo anterior, el dengue es un problema muy importante de salud pública, no sólo en México sino también a nivel mundial.

### 1.1 Características estructurales y genómicas.

El DENV pertenece al género *Orthoflavivirus*, familia *Flaviviridae*. Es un virus envuelto, de simetría icosaédrica, cuyo diámetro es de aproximadamente 50 nm. Está compuesto por tres proteínas estructurales: la proteína de la cápside (C), la proteína de membrana (M) y la proteína de envoltura (E); estas dos últimas se encuentran ancladas a la bicapa lipídica que rodea la nucleocápside. La proteína E está conformada por tres dominios estructurales y funcionales, denominados EDI, EDII y EDIII. EDI Por otro lado, la proteína C se encuentra asociada al genoma y forma la nucleocápside (Lindenbach et al., 2013) (Figura 1).

El genoma se caracteriza por ser un ARN de cadena simple y polaridad positiva que contiene alrededor de 10, 700 nucleótidos. Presenta un solo marco de lectura abierto (ORF, del inglés: *Open Reading Frame*) que al traducirse da lugar a una poliproteína de 3411 aminoácidos. El ORF se encuentra flanqueado por regiones 3' y 5' no traducidas (UTR, del inglés: *Untranslated Region*). En el extremo 5' se localiza una caperuza Cap tipo 1 (m7GpppAmp); hacia el extremo 3', aunque

carece de cola de poli-A, posee una estructura tipo horquilla (SL, del inglés: *Stem-loop*) y dos horquillas tipo mancuernas (DB) (del inglés: *Dumbbell*). La primera está conservada entre los distintos flavivirus y se encarga de modular la síntesis y traducción del ARN viral a través de la interacción con diversas proteínas virales y celulares. Mientras la segunda estructura interviene fundamentalmente en la replicación del genoma y la formación de ARN subgenómico flaviviral (Ng et al., 2017). La poliproteína es procesada para dar origen a 3 proteínas estructurales (C, E y M) y 7 no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (figura 1).



**Figura 1. Estructura y genoma de DENV.** (A) Virión maduro y localización de proteínas estructurales (C, cápside; M, membrana; E, envoltura). (B) Genoma viral que codifica para una poliproteína que es procesada o escindida y dar origen a las proteínas estructurales y no estructurales (tomado y modificado de Angel & Valle, 2013).

La proteína NS1 juega un papel fundamental en la replicación del genoma viral a través de interacciones con las proteínas transmembrana NS4A y NS4B en las primeras etapas de la infección (Youn et al., 2012). Adicionalmente, es secretada por la célula desempeñando importantes funciones a nivel sistémico. NS3 es la segunda proteína no estructural más grande del virus y se ha descubierto que posee varias actividades enzimáticas durante la replicación del virus. La región N-terminal forma una serina proteasa similar a la tripsina, necesaria para el procesamiento de la poliproteína junto con NS2B como cofactor. La actividad catalítica de la enzima requiere que el dominio hidrofílico central de ~40 residuos de NS2B funcione de manera eficaz (NS2BH-NS3pro). La proteasa escinde los siguientes sitios: i) NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A, NS4B-NS5, ii) río arriba de las secuencias señal en las uniones C-prM y NS4A-NS4B, iii) dentro de NS2A,

y también iv) dentro de la propia NS3. Además, presenta otras dos actividades que durante la replicación viral comparten el mismo sitio activo en la región C-terminal. Las actividades ATPasa/helicasa y NTPasa combinadas son necesarias para fundir estructuras secundarias antes del inicio de la síntesis de ARN y para desenrollar los dúplex de ARN, ya sea para separar el ARN intermediario de doble cadena formado durante la síntesis de ARN viral o como una translocasa que puede eliminar las proteínas unidas al mismo (Norazharuddin & Lai, 2018). Por otra parte, NS5 es la proteína más conservada de DENV y tiene dos funciones importantes. En primer lugar, es una polimerasa de ARN dependiente de ARN y además posee actividad metiltransferasa de ARN importante en la traducción de la poliproteína. Junto a NS3, NS5 forma un complejo de replicación de ARN en el retículo endoplásmico durante la replicación viral. Después de la replicación, NS5 se disocia de NS3 y se parte de ella se traslada al núcleo en algunos serotipos. Si bien la acumulación nuclear de NS5 no parece ser esencial para la replicación viral, parece estar relacionada con un aumento en la producción de la citocina IL-8 que históricamente se ha relacionado con el dengue grave (Bhatnagar et al., 2021).

NS2A y NS2B son componentes importantes del complejo de replicación en la membrana celular y en el ensamblaje de los viriones. NS2A juega un papel importante en el ensamblaje del virus a través de su participación en la biogénesis y remodelación de las membranas inducidas durante la infección. Además, es capaz de suprimir la respuesta del interferón  $\alpha/\beta$ , que afecta la replicación viral e induce la apoptosis en las células infectadas (Li & Kang, 2022). Recientemente se demostró que ambas proteínas se comportan como viroporinas y que son capaces de activar el inflammasoma. Ambas moléculas permeabilizan diferentes modelos de membranas formando canales, así como, auto-oligomerizando (León-Juárez et al., 2016; Shrivastava et al., 2017). NS4A y NS4B son proteínas de membranas que funcionan como proteínas de andamiaje para la formación del complejo de replicación. Además, se ha visto que NS4A induce reorganización del retículo endoplásmico mientras que NS4B interactúa con NS3 contribuyendo a su disociación del ARN viral (Norazharuddin & Lai, 2018).

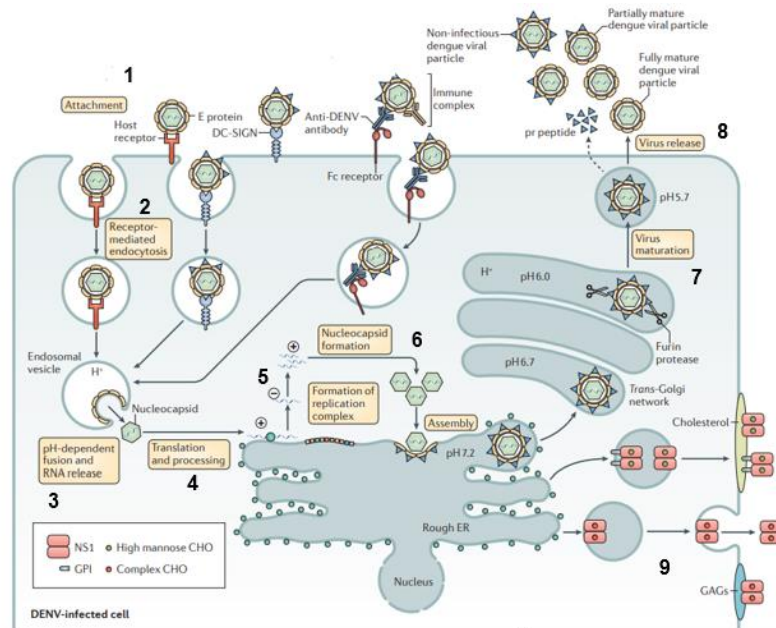


## 1.2 Ciclo Replicativo Viral

DENV se une a una amplia variedad de moléculas, pudiendo infectar a diversos tipos de células como las células epiteliales, fibroblastos, macrófagos, monocitos, células dendríticas, queratinocitos, células B y T, células endoteliales y hepatocitos. El virus interactúa con su receptor a través de la proteína E. Entre estos receptores se encuentran el receptor de manosa (Welsch et al., 2009), sulfato de heparán, un tipo de glicosaminoglicano (GAG) que actúa como receptor en líneas celulares epiteliales (Germi et al., 2002); receptor para laminina LAMR1 (Phaik et al., 2005), la proteína de adhesión celular 3 no asociada a integrina (DC-SIGN del inglés, *Dendritic Cell- Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin*) también llamada ICAM-3 o CD209 (Tassaneeritthep et al., 2003) y receptores de fosfatidilserina (TIM del inglés, T cell immunoglobulin and mucin) y receptores de cinasas de tirosina (TAM) por citar algunos (Nanaware et al., 2021) (Figura 2). Una vez el virus hace contacto con su receptor este es internalizado dentro de la célula hospedera. Aunque generalmente la entrada viral es por endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina, se ha reportado que dependiendo del serotipo de DENV y de la célula, la endocitosis puede ser independiente de clatrina o no clásica (Cruz-Oliveira et al., 2015). El virión es internalizado en un endosoma temprano, y después se fusiona con un endosoma tardío. La acidificación del pH en el endosoma conlleva a que la proteína E experimente varios cambios conformacionales dejando expuesto un bucle de fusión, el cual interactúa con la membrana endocítica lo que conduce a la fusión con la envoltura viral (Heinz & Allison, 2003; Urcuqui-Inchima et al., 2010).

La fusión permite que se disocie la nucleocápside y quede expuesto el genoma viral en el citoplasma donde se transporta hacia el retículo endoplásmico rugoso (RER) a través de la maquinaria del citoesqueleto (García-Blanco et al., 2016 (Figura 2). El ARN viral de sentido positivo actúa como mensajero y se traduce en una poliproteína, y además como plantilla para la síntesis de ARN durante la replicación viral (Harapan et al., 2020). La replicación del genoma está acoplado a la traducción del polipéptido, la síntesis de las proteínas no estructurales junto a factores del hospedero forma el complejo de replicación. La traducción y maduración de las

proteínas virales conducen a cambios conformacionales sobre las membranas del RE, formando invaginaciones que se conectan al citoplasma a través de una estructura similar a un poro (Welsch et al., 2009) (Figura 2). La polimerasa NS5, utiliza el ARN viral de sentido positivo como molde para sintetizar ARN complementario de sentido negativo. Este ARN complementario servirá como molde para la síntesis de la cadena positiva formando un intermediario de ARNdc (Lindenbach et al., 2013). Finalmente, los nuevos ARNsc de sentido positivo pueden traducirse más o encapsularse para facilitar la generación de nuevas partículas virales.



**Figura 2. Ciclo replicativo de DENV.** Se muestra un resumen esquemático del ciclo de replicación. Una vez el virus hace contacto con el receptor (1) este es internalizado por la célula hospedera mediante endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina (2). La acidificación del endosoma provoca la fusión de la envoltura viral y la membrana del este liberando el genoma hacia el citoplasma (3). El ARN viral sirve como molde para la traducción y la replicación en el RE (4). El genoma replicado y las proteínas no estructurales traducidas se ensamblan para formar el virión inmaduro (5). Esta partícula experimentará la maduración a través de su tránsito por la TGN (7) y será liberado por exocitosis (8). Secreción de la proteína NS1 de la célula hospedera (9) (tomado y modificado de Guzman et al., 2016).

El ensamblaje ocurre en la membrana del RE, donde el genoma del ARN viral se asocia con la proteína C para formar la nucleocápside, posteriormente las partículas virales parcialmente ensambladas se desprenden del RER mediante gemación

adquiriendo una bicapa lipídica en la que se encuentran las proteínas transmembrana prM y E, en forma de heterodímeros prM-E (Nanaware et al., 2021). Estas partículas viajan por la vía secretora convencional a través de la red trans-Golgi (TGN). El ambiente ácido de la TGN provoca la disociación de los heterodímeros prM-E, produciendo proteína E en forma dimérica (Urcuqui-Inchima et al., 2010). Adicionalmente, la proteína prM es escindida por la proteasa furina, obteniéndose la proteína M y el péptido pr, el cual continúa asociado al virión hasta su liberación previniendo la unión de E a la membrana exosomal (Yu et al., 2008). Una vez maduro el virión, es liberado por exocitosis (Figura 2).

La proteína NS1 del Virus del dengue, una vez se escinde, permanece asociada con el RE; el monómero se glicosila con alto contenido de manosa (CHO), lo que da como resultado la posibilidad de asociación con la membrana. Una parte de la proteína adquiere glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Tanto la NS1 unida a la membrana como la NS1 anclada a GPI se transportan a la superficie celular a través de una vía desconocida, donde se ha demostrado que se asocian con lípidos como el colesterol. Adicionalmente, se puede unir a glicosaminoglicanos (GAGs) de la superficie celular y algunas partículas se secretan directamente a partir de células huésped (Figura 2) (Guzman et al., 2016).

### **1.3 Infección por el Virus del Dengue**

El curso exacto de eventos que se desarrolla después de la transmisión de DENV por la picadura del mosquito no está clara. El estado de viremia puede detectarse entre las 24 y 48 h antes del inicio de los síntomas clínicos y puede durar hasta 12 días. La compleja interacción de factores virales y hospederos determina el devenir de la infección. En este sentido al clasificar los casos de dengue se manejan tres categorías: Dengue Sin Signos de Alarma (DSSA), Dengue Con Signos de Alarma (DCSA) y Dengue Grave (DG) (World Health Organization., 2016). El dengue típico se caracteriza por aparición repentina de fiebre, dolor corporal, dolor de cabeza, dolor en las articulaciones, erupciones cutáneas y dolor retroorbitario, aunque también puede ser asintomático. En ocasiones la infección puede progresar a condiciones más severas, lo que se conoce como dengue grave (Guzman et al.,

2016). Los síntomas incluyen aparición de manchas oscuras en la piel por hemorragia de pequeños vasos sanguíneos petequias o purpura (petequias y púrpuras), hemorragia nasal, daño hepático, aumento de la permeabilidad vascular, trombocitopenia y manifestaciones hemorrágicas que pueden afectar la piel, la nariz, las encías y el tracto gastrointestinal. Todo lo cual da como resultado una caída repentina de la presión arterial.

### **1.3.1 Respuesta inmune e inmunopatogenia**

Tanto la respuesta inmune innata como adaptativa son fundamentales en la infección por DENV. Células de la piel como queratinocitos y fibroblastos, así como, células migratorias como macrófagos y células dendríticas de la piel parecen ser los primeros blancos de infección. Estas últimas células se mueven a los nódulos linfáticos, pudiendo diseminarse a otros órganos por el sistema linfático (López-González et al., 2018). Una vez ocurre la inoculación viral, los receptores de reconocimiento de patógenos son los encargados de reconocer y detectar antígenos del DENV, como los intermediarios de ARNdc. Entre ellos encontramos los receptores tipo Toll 3 y 7 (TLR3 y TLR7), RIG-1 y el gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma (MDA5) (Costa et al., 2013). La interacción con estos receptores activará dos familias importantes de factores de transcripción: factores reguladores de IFN (IRF) y NF- $\kappa$ B, los cuales inducirán la expresión de IFNs tipo I y citocinas proinflamatorias. La activación de los IFNs tipo I mediada por los TLR sucesivamente activa la vía JAK/STAT permitiendo amplificación de la señal para la síntesis de IFN- $\alpha/\beta$ , resultando en un estado antiviral, lo cual restringe la replicación de los virus (Green et al., 2014). Estudios del plasma de pacientes con cuadro de dengue grave han encontrado niveles elevados de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, TGF-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN - $\gamma$  (Costa et al., 2013).

La respuesta inmune mediada por células T es crítica para la resolución de la infección. Se ha encontrado que la respuesta celular está dirigida a determinados proteínas virales. Las células T CD8<sup>+</sup> reconocen epítomos presentes principalmente en las proteínas NS5, NS3 y NS4B (Weiskopf et al., 2015), mientras que las células T CD4<sup>+</sup> están dirigidas principalmente hacia proteínas estructurales como C, prM y

E y a la proteína no estructural NS1 (Grifoni et al., 2017). Varios trabajos sugieren que la respuesta celular T CD8+ y T CD4+ está asociada con formas no graves de la enfermedad a través de la producción de IFN- $\gamma$ , la activación de células B y la producción y secreción de anticuerpos contra el virus (Tian et al., 2019). Se conoce que la respuesta protectora contra el DENV está mediada fundamentalmente por anticuerpos neutralizantes dirigidos hacia epítomos presentes en las proteínas E y prM, por lo cual, la infección con cualquier serotipo viral induce una inmunidad homotípica duradera y una inmunidad heterotípica de corto plazo (Guzman et al., 2016). Adicionalmente otra proteína blanco de la respuesta de anticuerpos es NS1, la cual activa la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Rothman, 2011).

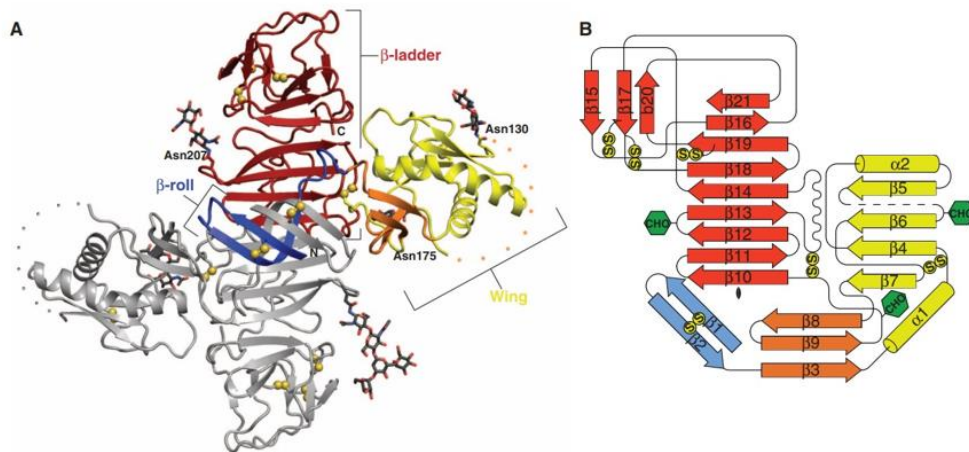
El estado inmunológico, el serotipo viral, el estado genético y la edad del individuo son los factores principales que condicionan la respuesta a la infección, así como las formas clínicas de dengue (Guzman et al., 2016). La presencia de citocinas y quimiocinas (como parte del sistema inmune) pueden desempeñar funciones tanto protectoras como perjudiciales durante la infección (Costa et al., 2013). En este sentido, diversos estudios demuestran, que el desequilibrio entre las respuestas Th1 y Th2 genera la conocida "tormenta de citocinas", la cual está asociada a las formas graves de dengue. Ejemplo de ello es la sobreproducción de IL-10 (citocina característica de la respuesta Th2), la cual termina dominando las respuestas de IFN, conduciendo a un aumento de la carga viral del DENV (Abhishek et al., 2017) y a una serie de procesos que culminan en fuga vascular provocando hemorragia, y en última instancia, daño tisular y falla multiorgánica (Roy & Bhattacharjee, 2021). Otras citocinas vinculadas a estos procesos son MIF, IL-1, IL-2, IL-10, CXCL-10, CCL-2, VEGF, TNF- $\alpha$ , IFN-  $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Un factor que contribuye a la gravedad observada en pacientes con infección secundaria es la respuesta de células T de memoria en un fenómeno llamado pecado antigénico original. Tras la infección secundaria con un serotipo heterólogo, las células T CD8+ con alta reactividad cruzada y baja afinidad se activan masivamente e inducen una alta producción de citocinas proinflamatorias (Harapan et al., 2020). Sin embargo, estas células contra serotipos heterólogos pueden disminuir su actividad citolítica provocando un retardo en la eliminación del virus (Rothman, 2011).

Generalmente la mayoría de los anticuerpos circulantes en la infección no son neutralizantes y están dirigidos contra epítomos de la proteína E y prM conservados entre dos o más serotipos, lo cual favorece la entrada del virus a monocitos, macrófagos y células dendríticas a través del receptor Fc- $\gamma$ . La internalización a través de dicho receptor genera un proceso denominado infección facilitada por anticuerpos (ADE, del inglés: *antibody-dependent enhancement*), otro factor que contribuye a la tormenta de citocinas (Katzelnick et al., 2017). Datos epidemiológicos indican que los bebés que adquieren pasivamente anticuerpos neutralizantes maternos contra dengue están protegidos de la enfermedad durante varios meses. Luego, la concentración de estos anticuerpos maternos neutralizantes finalmente cae por debajo de un umbral protector. Durante un período corto, si el bebé está infectado con el DENV, puede ocurrir una enfermedad grave mediada por ADE debido a la presencia de anticuerpos maternos no neutralizantes (Guzman et al., 2016). Para amortiguar las respuestas inmunes del huésped este fenómeno también provoca la producción del inmunosupresor IL-10, lo cual regula negativamente la producción de IFNs tipo 2. El medio antiinflamatorio y la dominancia Th2 promueven la proliferación de células B para fomentar una mayor producción de anticuerpos. Esto exacerba la situación ya empeorada para generar anticuerpos que faciliten la entrada del DENV dependiente de anticuerpos en las células huésped (Narayan & Tripathi, 2020).

### **1.3.2 Función de NS1 en el desarrollo de la infección**

La secuencia codificante para la proteína NS1 en todos los flavivirus tiene una longitud aproximada de 1056 nucleótidos y codifica una proteína de 352 aminoácidos con un peso molecular de 46 a 55 kDa, dependiendo de su estado de glicosilación (Glasner et al., 2018). La secuencia aminoacídica de NS1 de diferentes flavivirus, incluidos DENV1–4, ZIKV, WNV, JEV y YFV, así como los virus de la encefalitis de St. Louis, la encefalitis del valle de Murray y la encefalitis transmitida por garrapatas, son conservadas entre sí, presentando de 50-80% de similitud entre sus secuencias (Song et al., 2016). NS1 es una proteína multifuncional que dentro de la célula se encuentra como dímero, pero es secretada en forma de hexámero (Glasner et al., 2018). La estructura cristalina de NS1 de WNV y DENV fue resuelta

por Akey y colaboradores en 2014. De manera general cada monómero de NS1 presenta tres dominios. Un pequeño dominio de dimerización conocido como dominio central  $\beta$ -roll, forma la cara hidrófoba orientada hacia el interior la cual interactúa con los lípidos. Un segundo dominio que sobresale es conocido como dominio del ala, contiene dos sitios de glicosilación (Asn130 y Asn175), un enlace disulfuro interno y dos subdominios discretos: el subdominio  $\alpha/\beta$  y un subdominio de conector discontinuo que vincula el dominio ala con el dominio central del rollo  $\beta$  ( $\beta$ -roll). La protuberancia hidrofóbica (dedo grasoso) entre el  $\beta$ -roll y los dominios del ala facilita la interacción de NS1 con la membrana del RE y las proteínas virales, como NS4A y NS4B, que son esenciales para la replicación viral. Finalmente, un tercer dominio, conocido como escalera  $\beta$  está formado por una lámina  $\beta$  continua que forma la mitad del extremo C de NS1 y posee un sitio de glicosilación en Asn207 (Figura 3). De los sitios de glicosilación que se presentan en la estructura de NS1, el DENV solo presenta 2, en Asn130 y Asn207 (Akey et al., 2014). Esta característica se mantiene en los cuatro serotipos conocidos. La punta C-terminal de la escalera  $\beta$  junto con el dominio del ala son las regiones más antigénicas y contienen los epítomos identificados con mayor frecuencia del hexámero NS1 (Yap et al., 2017).



**Figura 3. Estructura tridimensional del dímero NS1.** (A) Dímero NS1. Se muestra una subunidad en gris y la otra subunidad coloreada por dominios. De color azul se representa el dominio  $\beta$ -roll; en amarillo, el dominio ala y su subdominio conector en naranja; en rojo se muestra el dominio  $\beta$ -escalera. Los puentes disulfuros se muestran con esferas amarillas y los sitios de N-glicosilación como varas negras. (B) Diagrama topológico para el monómero NS1, los sitios de glicosilación se muestran como hexámeros verdes. (tomado de Akey et al., 2014).

Esta proteína está relacionada con múltiples procesos ya sea de manera intracelular como extracelular. En el interior de la célula interactúa con proteínas que intervienen en la replicación viral. La localización de la proteína NS1 en la luz del RE se co-localiza con el ARN intermediario de doble cadena y otros componentes del complejo de replicación viral como el precursor proteico NS4A-2K-NS4B a través del dominio ala de NS1 (Płaszczycza et al., 2019). Otro de los mecanismos propuestos por los que NS1 apoya la replicación del ARN del DENV es la formación de orgánulos de replicación membranosos, es decir, paquetes de vesículas (Youn et al., 2012), aunque esta función no está relacionada con la interacción con el precursor NS4A-2K-NS4B (Płaszczycza et al., 2019).

Debido a que los niveles de la proteína NS1 se asocian con la gravedad de la enfermedad, NS1 puede influir directamente en la patogénesis. Estudios recientes demuestran que NS1 puede interactuar con células inmunitarias innatas a través de TLR4, lo que contribuye a la secreción de citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-1 $\beta$  y el factor inhibitorio de migración de macrófagos (MIF)), quimiocinas y mediadores que provocan fuga vascular. Lo anterior se debe a los cambios de las uniones estrechas de las células endoteliales al desestabilizar a las proteínas VE-caderina y ZO-1 y provocando autofagia en pacientes con dengue severo (Chen et al., 2016; Modhiran et al., 2017). Sin embargo, también se ha demostrado que NS1 induce fuga vascular en ratones deficientes de TLR4 sugiriendo que este proceso también se puede originar mediante mecanismos independientes de este receptor. Uno de los mecanismos mediante los cuales induce fuga vascular es el aumento de expresión de las sialidasas y de la activación de la catepsina L, lo que conduce a la escisión del ácido siálico y mayor expresión de la heparanasa respectivamente. Esta última escinde heparán sulfato y proteoglicanos de la superficie del endotelio. Estos procesos dan como resultado la degradación del glicocáliz endotelial y la consecuente fuga vascular (Glasner et al., 2017; Puerta-Guardo et al., 2016). Además de la fuga vascular, DENV NS1 también puede contribuir al dengue grave al interferir con la coagulación. En pacientes con dengue se encontró el complejo NS1/trombina en el suero. La unión de NS1 a la protrombina inhibe su activación, lo que lleva al incremento del tiempo parcial de tromboplastina activada (Chen et



al., 2018). Desde hace mucho tiempo se ha reconocido que las partículas de lipoproteínas que circulan en la sangre tienen funciones importantes en la regulación de la salud vascular, la inflamación y la respuesta inmune (Ramasamy, 2014). Se ha descubierto que la proteína NS1 forma complejos con lipoproteínas de alta densidad (HDL), cuya interacción desencadena la producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos primarios humanos, lo que exacerba la inflamación sistémica durante la infección (Benfrid et al., 2022).

La literatura ha identificado a NS1 como una proteína soluble fijadora del complemento. Las proteínas del complemento son principalmente serina proteasas que se encuentran en la sangre y en los tejidos y, cuando se activan, pueden provocar inflamación, opsonización o lisis celular a través de la formación del complejo de ataque de membrana C5b-9 (Glasner et al., 2018). Durante la infección por dengue, NS1 se puede unir a la proteína del complemento C4, reclutando y activando la proteasa C1, lo que conduce a la escisión de C4 a C4b y reduciendo tanto la deposición de esta última en la superficie de las células, como la actividad convertasa de C3 (Avirutnan et al., 2010). Un hecho interesante es que puede interactuar directamente con C4b e incluso con el regulador del complemento vitronectina (Conde et al., 2016). Estudios previos indican que la interacción de la lectina de unión a manosa (MBL, del inglés: *Mannose Binding Lectine*) con DENV disminuyó la infección a través de mecanismos dependientes e independientes del complemento (Avirutnan et al., 2011). En este contexto Thiemmecca y colaboradores en 2016, reportaron que NS1 es capaz de unirse competitivamente a MBL en solución (Thiemmecca et al., 2016). Estos resultados sugieren que la proteína viral atenúa tanto la vía clásica como la de las lectinas, lo que protege a DENV de la neutralización mediada por el complemento y protege a las células de la lisis. Resultados similares se han observado al estudiar mosquitos infectados con el virus DENV, ya que se ha detectado NS1 soluble en la saliva de estos. Por tanto, esta proteína puede ser inoculada en el humano durante la transmisión viral e intervenir en la evasión inmunitaria (Thiemmecca et al., 2016). Por otro lado, NS1 ayuda al virus a superar la barrera inmunitaria del intestino medio del mosquito al suprimir la expresión de genes que intervienen en la respuesta innata del vector. Tal es el caso

de los genes relacionados con la expresión de ROS y con la activación de la vía de señalización JAK/STAT, sistemas que son fundamentales en el control de la infección viral en los mosquitos. Por tanto, NS1 contribuye al ciclo viral dentro del vector (Liu et al., 2016).

Recientemente, se ha reportado que anticuerpos anti-NS1 generados en pacientes con DENV pueden reaccionar de forma cruzada con diferentes moléculas y células relacionadas con la coagulación, como el plasminógeno humano, la trombina, las plaquetas y las células endoteliales (Glasner et al., 2018). Diversos estudios apuntan a que existe una homología de secuencias entre los aminoácidos 311-352 de la región C-terminal de la proteína NS1 y algunas proteínas integrinas y adhesinas de la superficie de las células endoteliales (Wan et al., 2008). Por lo cual, los anticuerpos de reactividad cruzada contra NS1, pueden reconocer estas moléculas e inducir fuga vascular.

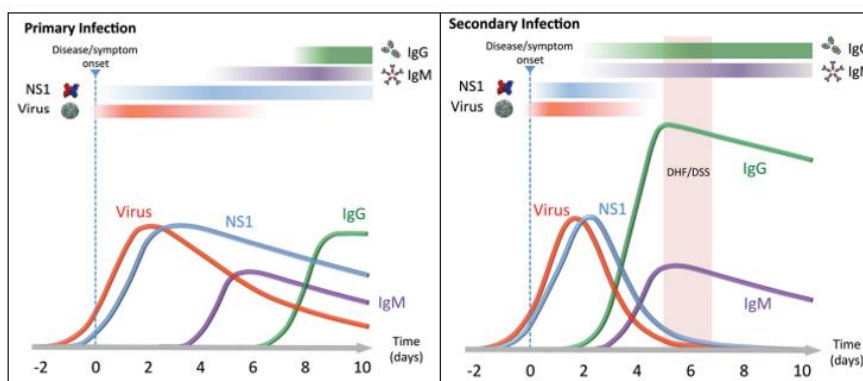
Otra función que se ha descrito para la proteína NS1 es su capacidad para activar al inflamasoma de una manera dependiente de caspasa 1 y de CD14, en la cual no se induce piroptosis. La delección de genes que codifican para los elementos de los inflasomas NLRP3, Pirina y AIM2 utilizando el sistema CRISPR-Cas9 no afectó la activación del inflamasoma mediado por NS1. Sin embargo, se necesitan más estudios para establecer si NS1 activa otros inflasomas como NLRP1B, CARD8, NLRP6 y NLRP10 (Wong et al., 2023).

#### **1.4 Diagnóstico de DENV**

El diagnóstico de las infecciones por el virus del dengue no puede basarse únicamente en las manifestaciones clínicas ya que muchos pacientes son asintomáticos o presentan fiebre inespecífica, por tanto, se requiere un diagnóstico diferencial. Las herramientas de diagnóstico deben ser rápidas, precisas y de costo relativamente bajo, lo cual es fundamental para la confirmación de casos clínicos sospechosos especialmente en los países en desarrollo, con recursos de atención médica limitados o inaccesibles (Pang et al., 2017). Existen varios biomarcadores para el diagnóstico, estos incluyen, la detección propia del virus mediante aislamiento viral o PCR, los productos virales (NS1 y E) o la respuesta inmune del

hospedero (medida de IgM e IgG). El aislamiento viral es el método diagnóstico tradicional para detectar no solo dengue, sino cualquier otro virus. Sin embargo, ha sido remplazado gradualmente por la qRT-PCR y, más recientemente, por los ensayos serológicos y de detección de antígenos (Muller et al., 2017).

La ventana óptima para diagnosticar una infección por dengue mediante la detección de proteínas virales va desde el inicio de la fiebre hasta aproximadamente 7 días después de la infección. Mientras que la detección de anticuerpos específicos depende del patrón de la infección. En una infección primaria la IgM puede ser detectada a partir del día 3 y la IgG a partir el día 6. Por otra parte, en infecciones secundarias la IgM aparece en el mismo período de tiempo, aunque generalmente presentando títulos más bajos, no siendo así con la IgG, la cual aparece tempranamente y cuyo título aumenta rápidamente, debido a la respuesta anamnésica (Figura 4) (Peeling et al., 2010).



**Figura 4.** Línea de tiempo de la aparición de los biomarcadores de la infección por dengue. Pacientes que experimentan infección primaria (panel izquierdo) y secundaria (panel derecho). (tomado de Muller et al., 2017).

#### 1.4.1 Detección de ARN viral

El genoma viral puede detectarse en la fase aguda de la infección con PCR de transcripción reversa. La mayoría de las plataformas basadas en este tipo de PCR suelen centrarse en los 4 serotipos y logran diferenciarse entre ellos. Actualmente existen dos ensayos aprobados por la FDA, uno de ellos es el RT-PCR en tiempo real Multiplex para DENV 1-4 del centro de control de enfermedades (CDC), el cual permite diferenciar entre los cuatro serotipos, y el segundo es el Triplex rRT-PCR

que se utiliza para distinguir entre Dengue, Zika y Chikungunya (Waggoner et al., 2013). Otra forma de diagnóstico molecular es la amplificación isotérmica del ARN genómico del DENV. La misma no requiere termociclador, por lo que el costo y la complejidad en comparación con la PCR se puede reducir. Dentro de este método uno de los más conocidos es la amplificación isotérmica mediada por bucle de transcriptasa inversa (RT-LAMP) (Sahni et al., 2013). Diversos estudios han demostrado que este ensayo muestra una tasa de éxito del 100% y del 98,9% para diagnosticar aislados clínicos de DENV y pacientes infectados, respectivamente (Hu et al., 2015). Aunque los métodos basados en PCR son rápidos y certeros, requieren un laboratorio con equipamiento especializado y personal entrenado para desarrollar el análisis. Por lo que no siempre es una opción en zonas con pocos recursos donde el dengue es endémico.

#### **1.4.2 Detección serológica.**

La medición de anticuerpos IgM mediante ELISA de captura y/o IgG mediante ELISA indirecta son los métodos más utilizados para confirmar el diagnóstico de dengue. Esto se debe a la facilidad de uso comparada con técnicas como el cultivo celular o la detección de ARN. Sin embargo, la producción de anticuerpos no es inmediata (Kabir et al., 2021). En el mercado se encuentran disponibles una variedad de kits de ELISAs y pruebas de detección rápida. En áreas donde no es endémica la infección, se utilizan generalmente aquellos basados en ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA) (Tsai et al., 2018). El principal problema radica en que la circulación de IgM o IgG no es indicativa de una infección actual, para lo cual se requiere demostrar la seroconversión en los títulos de estos anticuerpos en sueros pareados (Pang et al., 2017). Es por ello por lo que se han desarrollado pruebas que evalúan la relación IgM:IgG, lo cual permite distinguir entre una infección primaria y secundaria (Raafat et al., 2019). La necesidad de muestras pareadas es una limitante de las pruebas serológicas al menos en zonas endémicas. En la práctica estas muestras son difíciles de obtener, ya que es probable que los pacientes no regresen para la segunda recolección de la muestra. Otra limitante de las pruebas serológicas es la reactividad cruzada con flavivirus relacionados, lo que aumenta la incertidumbre en las regiones donde cocirculan (Peeling et al., 2010).

Actualmente se están desarrollando estrategias que combinan la detección serológica con la detección de antígenos de dengue lo cual mejora el diagnóstico del DENV (Muller et al., 2017).

### **1.4.3 Detección antigénica NS1**

Otra forma de diagnosticar la infección por DENV es mediante la detección de la proteína NS1 y la de envoltura. La detección de esta proteína en el suero de pacientes con dengue es utilizada para diagnosticar la enfermedad no solo en la fase aguda de la infección, sino también desde el inicio de la fiebre (Libraty et al., 2002) y hasta 9 días o más en infecciones primarias, dependiendo del individuo. Utilizando ELISA de captura cuantitativa, se ha descubierto que NS1 se secreta en un nivel alto, dentro del rango de nanogramos a microgramos por mililitro (Allonso et al., 2014). Los kits comerciales para detectar proteínas NS1 se basan en inmunoensayos enzimáticos (ELISA). Sin embargo, también están disponibles ensayos rápidos de un solo paso basados en inmunocromatografía in vitro (Fisher et al., 2023). Por lo general, los ensayos rápidos basados en flujo lateral se utilizan como esquemas de detección rápida y los ELISA de captura de antígeno se utilizan en pruebas de laboratorio. Actualmente hay siete pruebas disponibles comercialmente, tres se basan en ELISA y cuatro son pruebas rápidas. Entre las que se basan en ELISA se encuentra Platelia Dengue NS1 Ag ELISA (BioRad), DENV Detect NS1 ELISA (InBios International) y Panbio Dengue Early ELISA (Alere, Waltham, WA, EE. UU) (Blacksell, 2012; Kabir et al., 2021). Uno de los desafíos de los ensayos basados en la detección de NS1 es la fluctuación de los niveles de este antígeno a lo largo del curso de la enfermedad. Los pacientes que presentan una infección secundaria experimentan un rápido aumento de los anticuerpos de reacción cruzada contra la proteína. Estos anticuerpos secuestran a la proteína en complejos inmunes que no pueden detectarse fácilmente en ensayos de captura. En consecuencia, la cinética de detección de NS1 durante el curso de la enfermedad durante las infecciones secundarias es más corta que la de las infecciones primarias (Muller et al., 2017).

La combinación de kits para la detección de IgM y NS1 como marcadores de la infección por DENV ofrece mayor sensibilidad para el diagnóstico y, por lo tanto, una mejora en general del rendimiento de las pruebas (Raafat et al., 2019b). En el 2011 en Malasia, investigadores exploraron como el rendimiento de la prueba rápida Panbio Dengue Early Rapid puede mejorar la sensibilidad diagnóstica cuando se usa en combinación con una prueba rápida comercial IgM/IgG (Dengue Duo Cassette). Como pruebas individuales, la sensibilidad de Dengue Early Rapid y Dengue Duo Cassette fue del 62,0% y 72,5% respectivamente. La combinación de detección de NS1 con detección de anti-IgM y anti-IgG dio como resultado un aumento significativo ( $P < 0,001$ ) en la sensibilidad hasta un 93 % (Fry et al., 2011)

Lai y colaboradores en 2019 desarrollaron un ensayo de ELISA que no solo es capaz de detectar NS1, sino que permite la identificación del serotipo correspondiente de DENV en etapas tempranas de la infección. Desarrollaron anticuerpos monoclonales para cada serotipo del DENV y utilizaron otro de reactividad cruzada como anticuerpo de captura. Un hecho interesante es que, del total de muestras analizadas, el ensayo de ELISA mostró sensibilidad del 88.2%, 94.7%, 75% y 66.6% para DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4, respectivamente en comparación con RT-PCR de serotipificación (Lai et al., 2019). Otros estudios comparativos han obtenido una sensibilidad entre un rango de 60% a un 75%, al comparar con este método molecular (Gaikwad et al., 2017).

En 2022, Mehdi y colaboradores desarrollaron un ELISA de detección de NS1 altamente sensible. Los anticuerpos monoclonales desarrollados muestran afinidades subnanomolares con especificidad por regiones no inmunodominantes. Este ensayo mostró una sensibilidad analítica mayor que el kit Platelia. El amplio y diverso repertorio de mAb generado contra DENV NS1 y la selección apropiada de los mismos permitió detectar eficientemente NS1 Ag incluso en muestras de pacientes con infección secundaria (Tabla 1) (Mehdi et al., 2022).

**Tabla 1. Sensibilidad de ELISAs para NS1 en dengue primario y secundario (Mehdi et al., 2022)**

| Categorías de las muestras   | Sensibilidad del ELISA NS1 desarrollado (%) (95% IC) | Sensibilidad del Platelia DENV NS1 Platelia (%) (95% IC) |
|--|--|--|
| <b>Panel 1A</b>  | 40, 70.18  | 27, 47.37  |
| positivos por RT-PCR y por IgG de DENV de captura (n=57) (dengue secundario) | (56.60-81.57)  | (33.98-61.03)  |
| <b>Panel 1B</b>  | 26, 96.30  | 24, 88.89  |
| positivos por RT-PCR y por IgG de DENV de captura (n=27) (dengue primario)   | (81.03-99.91)  | (70.84-97.65)  |

Hay indicios de que la proteína NS1 puede detectarse en fluidos corporales diferentes al suero. Un estudio realizado en Japón en 96 viajeros japoneses con DENV examinó la utilidad de la detección del antígeno NS1 en muestras de orina y suero (Saito et al., 2015). Este estudio y otros demostraron que, en algunos casos, la NS1 podría detectarse en muestras de orina incluso después de alcanzar niveles indetectables en el suero (Humaidi et al., 2021). Aunque la sensibilidad en este tipo de estudios es muy baja sugiriendo que se necesitan más estudios para evaluar el rendimiento y la aplicación del diagnóstico del DENV en orina y saliva.

## **2 JUSTIFICACIÓN**

La proteína NS1 del virus del dengue se ha identificado como un biomarcador fundamental en el diagnóstico de la infección. Sin embargo, a pesar de la disponibilidad de kits comerciales para este propósito, estos pueden resultar costosos y limitados en su capacidad para procesar muestras, lo que reduce su utilidad, especialmente en regiones de alta incidencia de casos del DENV, como México. Por eso, desarrollar un ELISA de captura casero para detectar NS1 para el diagnóstico viral podría contribuir significativamente a mejorar la atención médica y promover medidas preventivas oportunas.



### **3 HIPÓTESIS:**

La evaluación y caracterización de un anticuerpo monoclonal murino permitirá el desarrollo de un ELISA de captura para la detección de la proteína NS1.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General:**

Diseñar, desarrollar y evaluar un ELISA de captura para la detección de la proteína NS1 del virus del DEN.

### **4.2 Objetivos específicos:**

1. Expresar y purificar la proteína recombinante NS1 del virus DEN-2 en el sistema de expresión bacteriano de *Escherichia coli*, cepa BL21.
2. Realizar un esquema de inmunización con la proteína recombinante NS1 (rNS1) purificada en rata.
3. Purificar y caracterizar anticuerpos monoclonales murinos y policlonales de rata anti-NS1.
4. Estandarizar las condiciones de anticuerpos monoclonales murinos y policlonales de rata mediante un ensayo de ELISA indirecto.
5. Optimizar concentraciones de anticuerpos monoclonales murinos y policlonales de rata a través de un ensayo de ELISA de captura
6. Evaluar ensayo de ELISA de captura para detección de NS1 nativa en sobrenadantes de células infectadas.

## **5 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Células y virus**

Se trabajó con células Vero (ATCC CCL-81) y con la cepa de referencia DENV-2 Nueva Guinea (AF038403.1)

### **5.2 Anticuerpo monoclonal murino**

Para el ensayo se utilizó la clona 12.1810 de las células de hibridoma anti-NS1 desarrollado en el laboratorio en colaboración con la Dra. Gabriela Mellado Sánchez. Se colectaron 250 mL de sobrenadantes de dicha clona y los mismos fueron centrifugados y concentrados mediante filtración por centrifugación a 4,500 rpm y 4 °C empleando un Filtro Amicon Ultra-15 mL con un corte de 10 kDa.

### **5.3 Vector de expresión para la proteína NS1 de DENV-2**

Para la expresión de la proteína se usó como vector de expresión el plásmido pPROEX-HTb\_NS1/DENV2. El cual codifica para la proteína NS1 completa de DENV-2. Este vector fue clonado en colaboración con la Lic. Andrea Alejandra Meza Cano. El amplicón contiene un origen de replicación Ori, un gen de resistencia a ampicilina y el gen que codifica para el represor LacI. El cassette de expresión cuenta con el promotor trc y el operon *lac*, un sitio de corte para la proteasa TEV, y una secuencia que codifica para una etiqueta de seis histidinas. La secuencia de NS1 se encuentra flanqueada por sitios de restricción para *XbaI* y *XhoI*.

### **5.4 Transformación de células *E. coli* BL21 quimiocompetentes.**

Se transformaron células BL21 quimiocompetentes con el vector pPROEX-HTb\_NS1/DENV2 mediante choque térmico. Se mezcló 50 ng de plásmido con 50 µL de células quimiocompetentes se incubaron en hielo durante 20 minutos. Posteriormente se incubó a 45°C durante 45 seg, e inmediatamente se colocó en hielo y se incubó 2 minutos más. Luego se adicionaron 500 µL de medio LB y se incubaron en hielo durante 1h a 37°C y 180 rpm. Pasado este tiempo se sembró por diseminación en una placa con Agar-LB suplementado con 120 µg/mL de ampicilina. La placa fue incubada a 37°C durante toda la noche.

### **5.5 Sobreexpresión de la proteína NS1 recombinante en células BL21.**

Para la sobreexpresión de la proteína, se tomó 1 colonia de células BL21 transformadas con el plásmido de interés y se inocularon en 20 mL de medio LB suplementado con 120 µg/mL de ampicilina. Posteriormente los 20 mL se adicionaron a 500 mL de medio 2xYT suplementado con 100 µg/mL ampicilina. Dicho cultivo se incubó a 37°C y 180 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> entre 0.6-0.8. Una vez alcanzada la DO señalada se adicionaron 500 mL de medio 2xYT al cual se había adicionado previamente 1mM de MgSO<sub>4</sub> y 1 mM de IPTG. Finalmente se incubó a 37°C y 180 rpm toda la noche.

### **5.6 Lavado de los cuerpos de inclusión y purificación de la proteína NS1**

Una vez transcurrido el tiempo de inducción, el cultivo se centrifugó a 4,500 rpm por 30 min a 4°C en un rotor JLA 8-1000. El sobrenadante fue desechado y el sedimento bacteriano resuspendido en 40 mL de solución I (15% de sacarosa, 0.12% de Tritón x-100, 50 mM de Tris pH 8) para luego sonicarse durante 1 minuto con intervalos de 10 seg ON y 10 seg OFF hasta alcanzar una amplitud del 80%. Posteriormente el paquete se centrifugó a 8,000 rpm durante 20 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 48 mL de solución II (0.12 % de Tritón-100, 50 mM de Tris pH 8, 10 mM de EDTA). La suspensión se sometió a sonicación y posterior centrifugación con los parámetros anteriormente mencionados. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 20 mL de solución III (50 mM de Tris pH 8, 10 mM de EDTA). Para la purificación se utilizó el método de geles preparativos. Brevemente, se preparó un gel para electroforesis SDS-PAGE 10%. A la resuspensión se le agregó buffer de carga 5X, y la misma fue calentada a 95°C durante 10 minutos. La muestra se cargó en el gel y se dejó corriendo toda la noche a 40 mV. Se cortaron entre 3-4 bandas del gel alrededor del marcador correspondiente al peso predicho para la proteína (aproximadamente 41 kDa). Las bandas se sumergieron en PBS a 4°C durante toda la noche y luego se centrifugó a 4,500 rpm durante 10 min. Una vez transcurrida la centrifugación se extrajo con una pipeta la proteína difundida en el PBS y las fracciones se analizaron mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% y Western Blot.

### **5.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot**

La electroforesis en SDS-PAGE se utilizó para detectar la presencia de la proteína NS1 recombinante, así como de los anticuerpos monoclonales murinos y policlonales de rata. Se utilizaron geles de acrilamida/bisacrilamida al 10 % en el caso de la proteína NS1 recombinante y 12 % en el caso de los anticuerpos. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de 100 V durante 1 h. Para la detección de las bandas correspondientes a los pesos moleculares esperados, los geles fueron teñidos durante 15 min en agitación con azul de Coomassie. Adicionalmente, en el caso de la proteína NS1 recombinante se realizó Western Blot para su identificación. Brevemente, los geles se transfirieron a una membrana PVDF (Sigma-Aldrich) activada con metanol. Terminada la transferencia se bloqueó con PBS-Tween 0.1%/leche descremada 5 % por 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Al terminar el bloqueo la membrana se lavó con PBS-Tween 0.1 % y se incubó toda la noche a 4°C con un anticuerpo anti-histidina diluido 1:3000 con solución de bloqueo. Finalmente se realizó el último lavado de la membrana, se reveló en el equipo ChemiDoc XRS+ y las imágenes se procesaron con el software Image Lab (Bio-Rad).

### **5.8 Esquema de inmunización y obtención de suero policlonal**

Se empleó una rata Wistar hembra, de 200 g. Se administraron por vía intraperitoneal, 4 dosis de 50 µg de proteína NS1 recombinante en intervalos de 20 días. En la primera inmunización el antígeno se diluyó en 180 µL de PBS y 200 µL de adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich). En las restantes tres inmunizaciones el antígeno se diluyó de la misma manera, pero se utilizó adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich). La rata fue sangrada a partir de la vena caudal al día 0, 20, 40 y 60 previo a cada inmunización de acuerdo con los lineamientos éticos establecidos por la NOM-062-ZOO-1999 y de acuerdo con el protocolo 02-11-16 aprobado por el comité de ética del CICUAL/Cinvestav. La sangre obtenida se incubó 15 minutos a 37°C y para posterior retracción del coagulo se incubaron 15 minutos a 4°C. Después se centrifugó a 4,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente, pero a 7,000 rpm durante 10

min para poder separar el suero de la fase celular. El suero se congeló a -20°C hasta su utilización.

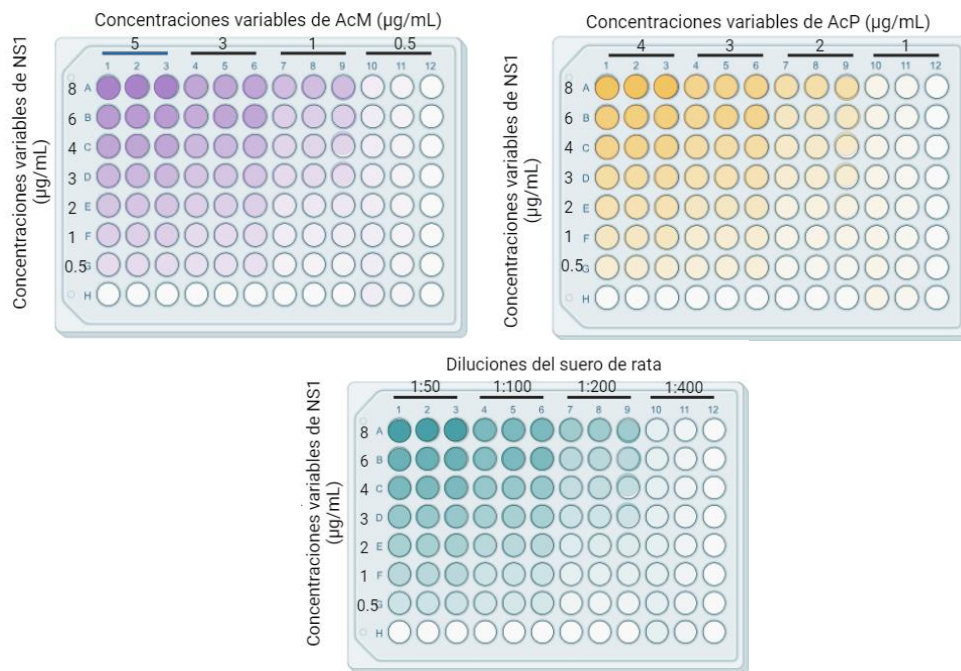
### **5.9 Purificación y cuantificación de anticuerpos monoclonales murinos y policlonales de rata**

El anticuerpo monoclonal murino se purificó a partir de sobrenadantes concentrados. En el caso del anticuerpo policlonal se partió del suero correspondiente al sangrado en blanco de la rata. Se siguió el mismo protocolo de purificación para ambos anticuerpos. Se diluyó la muestra en tampón de unión (0.02 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7) y se filtró con una membrana de PVDF con un poro de 0.22 µm (VWR®, Syringe Filters). La muestra se hizo pasar por una columna de afinidad de 1 mL de resina HiTrap Protein G (Cytiva) en un Sistema ÄKTA Pure (Cytiva) de FPLC. La columna previamente se equilibró con tampón de unión. La elución del anticuerpo de interés se realizó mediante un gradiente lineal, aplicando 5 volúmenes de columna (de 0 a 100 %) de tampón de elución (0.1 M de Glicina-HCl pH 2.7). Se colectaron fracciones 1 mL en tampón de neutralización (1M Tris-HCl pH 9). Las fracciones obtenidas fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE al 12 %. Aquellas en las que eluyó la proteína fueron dializadas con PBS y concentradas mediante filtración por centrifugación a 4,500 rpm y 4 °C empleando un Filtro Amicon Ultra-0.5 mL con un corte de 10 kDa, hasta obtener un volume de 500-1000 µmL. Finalmente se cuantificó cada muestra de anticuerpos por el método de Lowry. Los anticuerpos fueron alicuotados y almacenados a -20°C hasta su utilización.

### **5.10 Ensayo de ELISA indirecto**

La unión de los anticuerpos a la proteína NS1 recombinante se analizó por ensayo de ELISA indirecto. Placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Fisherscientific) fueron sensibilizadas con 50 µL/pocillo de proteína NS1 a concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 µg/mL en PBS1X (tampón de fosfatos pH 7.4) (Fig. 5). Para la evaluación de la actividad de los sueros de rata y de los anticuerpos monoclonales y policlonales purificados, se utilizó una concentración de 6 µg/mL de NS1. Las placas fueron incubadas por 24 h a 4°C y protegidas de la luz. Posterior a la incubación se realizaron 2 lavados con solución de lavado (PBS-Tween 0.1 %) y se bloquearon

durante 1 h en agitación continua a temperatura ambiente con 100  $\mu$ L de solución de bloqueo (PBS-Tween 0.1 % leche descremada 5 %). Se realizaron tres lavados y se procedió a adicionar 50  $\mu$ L/pocillo de los sueros de rata a distintas diluciones o los anticuerpos purificados a diferentes concentraciones en solución de bloqueo. Para los sueros se ensayaron diluciones seriadas dobles de 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400 (Fig. 5). Para establecer las condiciones óptimas a las cuales se emplearían los anticuerpos purificados, se evaluaron concentraciones de 0.5, 1, 3 y 5  $\mu$ g/mL para el anticuerpo monoclonal de ratón y 1, 2, 3 y 4  $\mu$ g/mL para el anticuerpo policlonal de rata (Fig. 5).



**Figura 5:** Sensibilización de placas a diferentes concentraciones de antígenos, de anticuerpos y diferentes diluciones de sueros de rata.

Las placas se incubaron nuevamente durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron cuatro veces y se adicionó 50  $\mu$ L/pocillo de anticuerpo secundario diluido 1:5000 en solución de bloqueo, incubándose 1 h en agitación a temperatura ambiente. Para las placas tratadas con los sueros y los anticuerpos policlonales de rata se utilizó un anticuerpo anti-IgG de rata conjugado a HRP y para los anticuerpos monoclonales murinos, un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a HRP. Finalmente, las placas fueron lavadas cuatro veces y se agregaron 50  $\mu$ L de solución reveladora (tampón de citratos pH 5.6, OPD, peróxido

de hidrógeno), se incubaron las placas a 37°C por 15 minutos. Para detener la reacción se adicionaron 50 µL de ácido sulfúrico 2N y se leyó en un lector múltiple de placas (Thermo-Scientific) con un filtro de 450 nm.

#### **5.11 Estandarización del ensayo de ELISA de captura.**

Se partió de las concentraciones óptimas de proteína NS1 y anticuerpos monoclonales y policlonales. Placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Fisherscientific) se sensibilizadas con 50 µL/pocillo de anticuerpo monoclonal murino o anticuerpo policlonal de rata de captura a concentraciones de 1 µg/mL y 4 µg/mL respectivamente diluido en PBS1X. Las placas fueron incubadas por 24 h a 4 °C y protegidas de la luz. Posterior a la incubación se realizaron 2 lavados con solución de lavado (PBS-Tween 0.1 %) y se bloquearon durante 1 h en agitación continua a temperatura ambiente con 100 µL de solución de bloqueo (PBS-Tween 0.1 % y albúmina bovina 5 %). Se realizaron tres lavados y se procedió a adicionar 50 µL/pocillo de la proteína rNS1 diluida en solución de bloqueo a una concentración de 3 µg/mL incubándose 1 h en agitación a temperatura ambiente. Después de este período se lavó nuevamente y se bloqueó una vez más. Se adicionó 50 µL/pocillo de anticuerpo monoclonal murino o policlonal de rata de detección a las concentraciones antes mencionadas. Las placas se incubaron nuevamente durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron cuatro veces y se adicionó el anticuerpo de revelado diluido 1:5000 en solución de bloqueo. Para las placas tratadas con los anticuerpos policlonales de rata como anticuerpo de detección se utilizó un anticuerpo anti-IgG de rata conjugado a HRP y para aquellas en las que se utilizó anticuerpos monoclonales murinos como anticuerpos de detección, un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a HRP. Finalmente, las placas fueron lavadas cuatro veces y se agregaron 50 µL de solución reveladora (tampón de citratos pH 5.6, OPD, peróxido de hidrógeno), se incubaron las placas a 37°C por 15 minutos. Para parar la reacción se adicionaron 50 µL de ácido sulfúrico 2N y se leyó en un lector múltiple de placas (Thermo-Scientific) con un filtro de 450 nm.



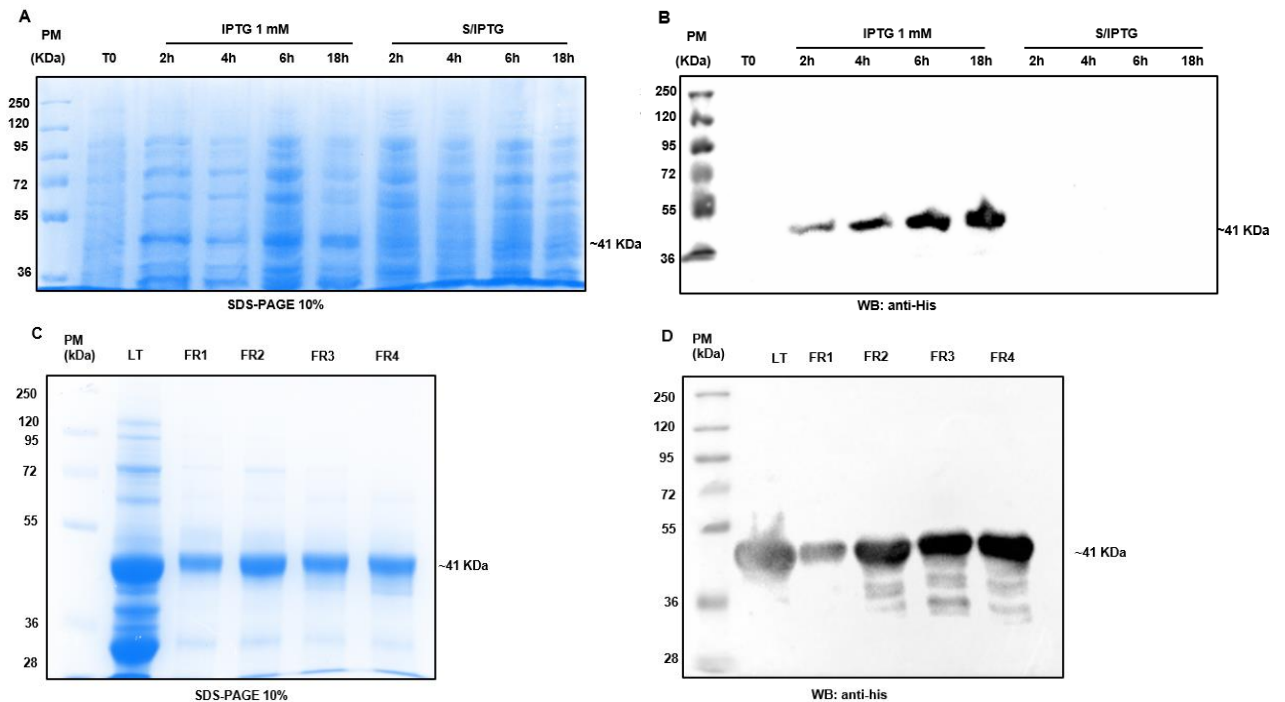
### **5.12 Validación del ensayo de ELISA de captura y Límites de detección**

Se sembraron células Vero en cajas de 75 mL y se incubaron a 37°C y una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar la confluencia requerida. Las células se infectaron a 2 MOI con DENV-2. Adicionalmente se infectaron células C6/36 con DENV-2. Se dejó que los virus se absorbieran durante 2 h, agitando suavemente las cajas en intervalos de 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se adicionó medio sin suero y se incubó durante 48 h a 37°C y una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se recolectaron los sobrenadantes y los mismos se concentraron mediante filtración por centrifugación a 4,500 rpm y 4 °C empleando un Filtro Amicon Ultra-15 mL con un corte de 10 kDa. Se monitoreó la presencia de la proteína NS1 de DENV-2 en los sobrenadantes mediante ensayo de ELISA indirecto y ELISA de captura utilizando el anticuerpo monoclonal murino y el anticuerpo policlonal de rata. Por otro lado, también se evaluaron los límites de detección del ensayo. Para ello se ensayaron diez concentraciones de NS1 recombinante desde 3 µg/mL hasta 5.86 ng/mL. Como controles negativos se utilizaron tres proteínas caseína, BSA y NSP1 de CHIKV. Se consideraron positivos aquellos valores de DO que fueran el doble del promedio calculado de las DO de las 30 muestras negativas. El ensayo de ELISA de captura se desarrolló sensibilizando con el AcM murino y se detectó con el AcP de rata.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Expresión y purificación de la proteína NS1 recombinante de DENV-2 en el sistema BL21 de *E. coli*.

Se realizó una cinética de expresión en la cepa bacteriana BL21 y establecer el tiempo óptimo con la finalidad de obtener el mayor rendimiento proteico. Para ello, se usó el plásmido pPROEX-HTb-NS1/DENV-2 donde se tiene clonada la la secuencia codificante para NS1 bajo el promotor *trc* y se evaluó la expresión de la proteína NS1 a 37°C a las 2, 4, 6 y 18 h posteriores a la inducción con IPTG. Como controles se utilizaron cultivos sin inducir (Fig. 6). Las muestras tomadas en cada uno de los tiempos se analizaron por electroforesis (SDS-PAGE). Tanto en la tinción con azul Coomassie (Fig. 6A) y el Western blot (Fig. 6B) se observó. Se obtuvo una banda de aproximadamente 41 kDa, peso que corresponde al peso molecular predicho de la proteína de interés. La proteína NS1r se expresó a niveles relativamente altos a las 18 h posteriores a la inducción, siendo este tiempo elegido para los ensayos de sobreexpresión proteica.

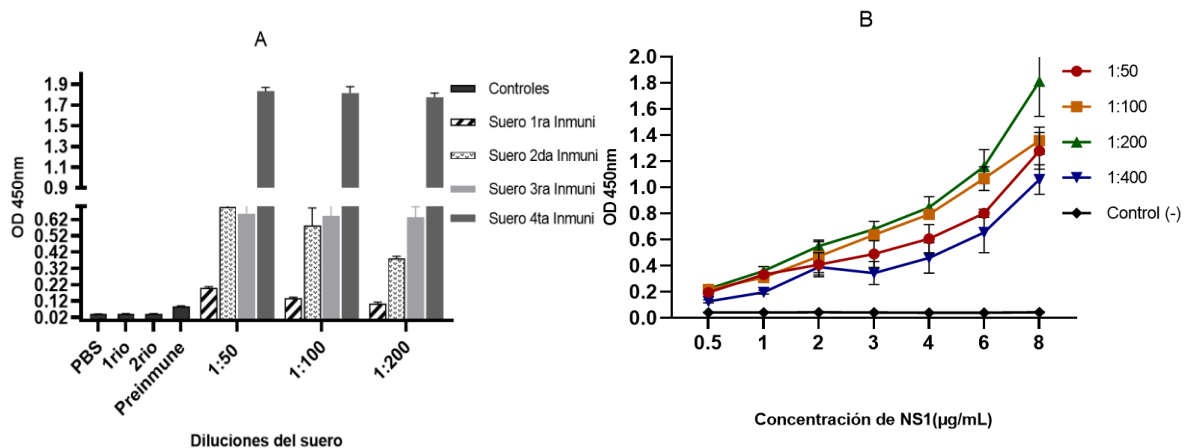


**Figura 6: Expresión y purificación de la proteína NS1r cepa BL21.** A y D) Electroforesis SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie. B y E) Western blot de la expresión de la proteína utilizando un anticuerpo anti-histidina. A y B) Expresión de la proteína distintos tiempos post-inducción. C y D) Fracciones de la proteína purificada mediante gel preparativo.

La proteína NS1r se obtuvo en cuerpos de inclusión. Después del lavado, se realizó su purificación mediante geles preparativos, obteniendo un rendimiento de 25 mg totales de proteínas. Aunque de manera general las fracciones se obtuvieron relativamente puras (Fig. 6C y 6D), se decidió utilizar las fracciones 3 y 4 (FR3 y FR4) para la posterior inmunización y estandarización de las condiciones del ensayo de ELISA de captura.

## 6.2 Evaluación de los sueros de rata en el reconocimiento de la proteína NS1 recombinante.

Con la proteína purificada, se desarrolló un esquema de inmunización en rata como se describió en materiales y métodos. Previo a cada una de las inmunizaciones, se extrajo sangre de la vena caudal. El suero obtenido se evaluó mediante ensayo de ELISA indirecto a diferentes diluciones. Los sueros obtenidos reconocieron a la proteína NS1r incluso a diluciones 1:400 (Fig. 7 A).

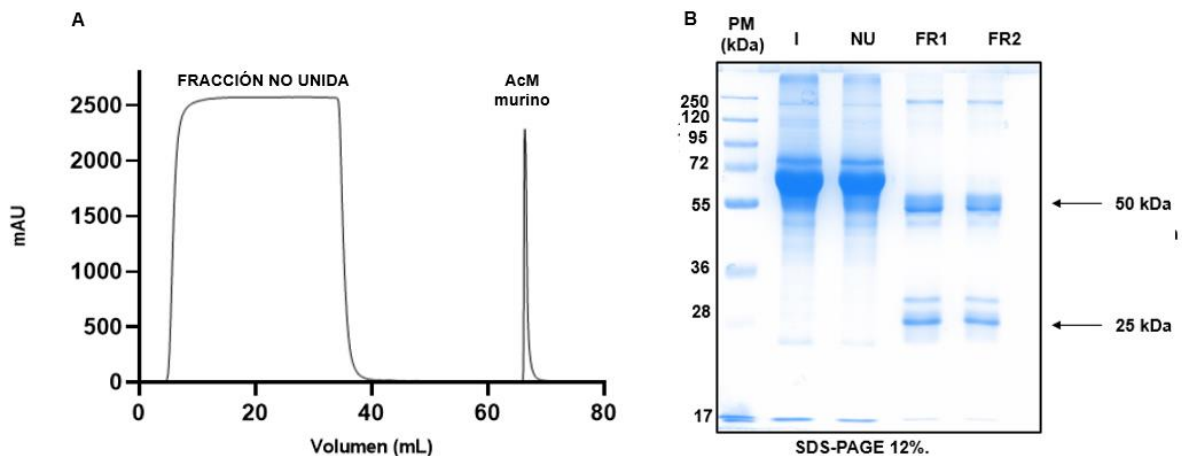


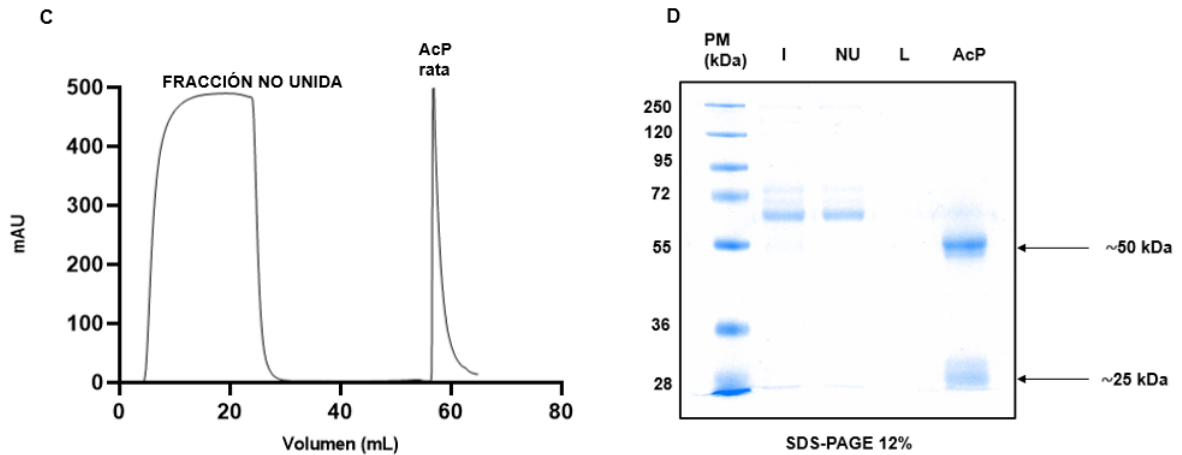
**Figura 7: Reconocimiento de la proteína NS1 recombinante con sueros de rata mediante ensayo de ELISA indirecto.** A) Evaluación de distintas diluciones de suero correspondiente a cada inmunización. B) Evaluación del suero hiperinmune a distintas concentraciones de proteína NS1r. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes.

Adicionalmente, el suero hiperinmune correspondiente a la última inmunización fue ensayado frente a distintas concentraciones de proteína NS1r (Fig. 7 B). Para establecer que concentraciones podían ser óptimas para el reconocimiento de la proteína NS1 se tomaron aquellos valores de densidad óptica entre 0.5 y 1. Se seleccionaron concentraciones de 2-4 µg/mL.

### 6.3 Purificación y caracterización funcional de los anticuerpos monoclonales murinos y policlonales de rata.

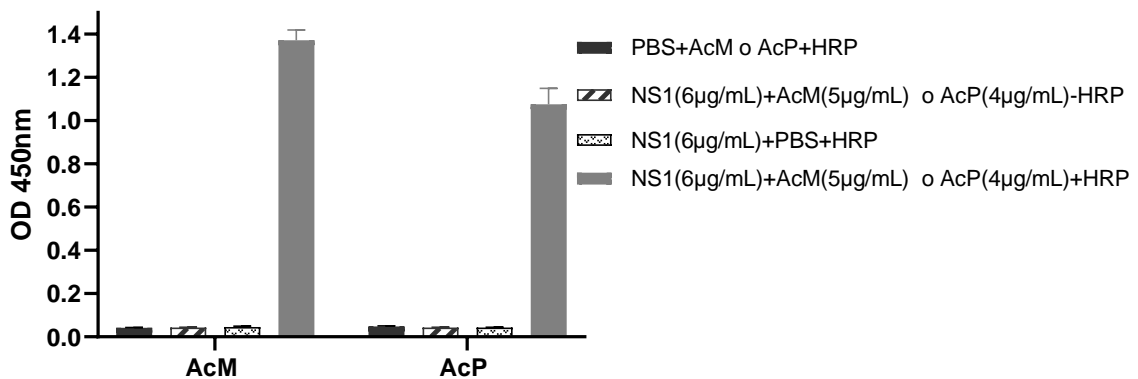
Para la purificación del anticuerpo monoclonal murino se partió del sobrenadante de las células del hibridoma anti-NS1, clona 12.1810. En el caso del anticuerpo policlonal de rata, se utilizó el suero hiperinmune. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad acoplado a proteína G. En la figura 8 A y C se aprecian los cromatogramas de ambos anticuerpos luego de la purificación. Durante la aplicación de la muestra, eluyeron todas las proteínas que no se unieron a la columna (pico de 5-40 mL en el caso del anticuerpo monoclonal y pico de 5-25 mL para el anticuerpo policlonal). El segundo pico que se representa en cada cromatograma corresponde a la elución de los anticuerpos de interés. Las fracciones obtenidas fueron dializadas, concentradas y se analizaron mediante SDS-PAGE al 12 % para comprobar la presencia de los anticuerpos. Se obtuvieron bandas de aproximadamente 50 y 25 kDa correspondientes a las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos de tipo IgG presentes en la muestra las figuras 8B y 8D. Se alcanzaron rendimientos de 10.48 mg para el anticuerpo monoclonal y 5.32 mg para el anticuerpo policlonal.





**Figura 8: Purificación de los anticuerpos monoclonales y policlonales por cromatografía de afinidad.** A y C) Cromatogramas de los anticuerpos purificados: A, anticuerpo monoclonal murino y C, anticuerpo policlonal de rata. B y D) Electroforesis SDS-PAGE al 12 % de las fracciones eluidas y concentradas: B, anticuerpo monoclonal murino y D, anticuerpo policlonal de rata (PM, peso molecular; I, input; NU, fracción no unida; L, lavado; AcP, anticuerpo policlonal; AcM, anticuerpo monoclonal).

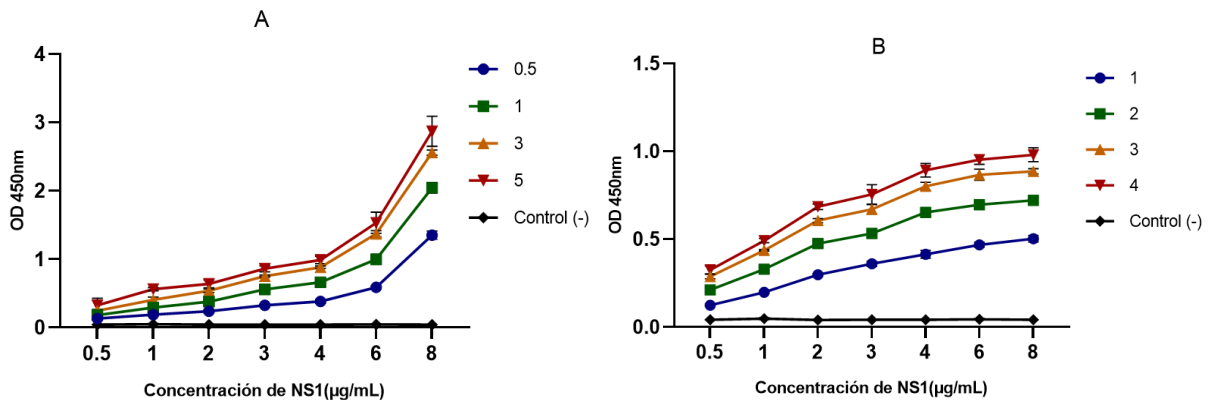
Los anticuerpos se evaluaron funcionalmente mediante ensayo de ELISA indirecto. Para lo cual se utilizó anticuerpo monoclonal y policlonal a diferentes concentraciones arbitrarias. El ensayo se evaluó con 5 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente (Fig. 9). Ambos anticuerpos reconocieron a la proteína NS1r.



**Figura 9: Actividad de los anticuerpos monoclonales y policlonales en el reconocimiento de NS1r mediante ensayo de ELISA indirecto.** El anticuerpo monoclonal se evaluó con una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el anticuerpo policlonal con 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las barras grises corresponden a la detección de NS1 recombinante, las barras restantes son controles. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes.

#### 6.4 Optimización de las concentraciones de anticuerpo monoclonal (AcM), anticuerpo policlonal (AcP) y proteína recombinante NS1.

Una vez comprobado que los anticuerpos monoclonales y policlonales poseían la capacidad de reconocer a la proteína NS1, se evaluaron varias concentraciones de estos, así como de la proteína NS1r mediante ensayo de ELISA indirecto (Fig. 10). Esto permitió conocer las concentraciones óptimas tanto de anticuerpos como de la proteína recombinante.

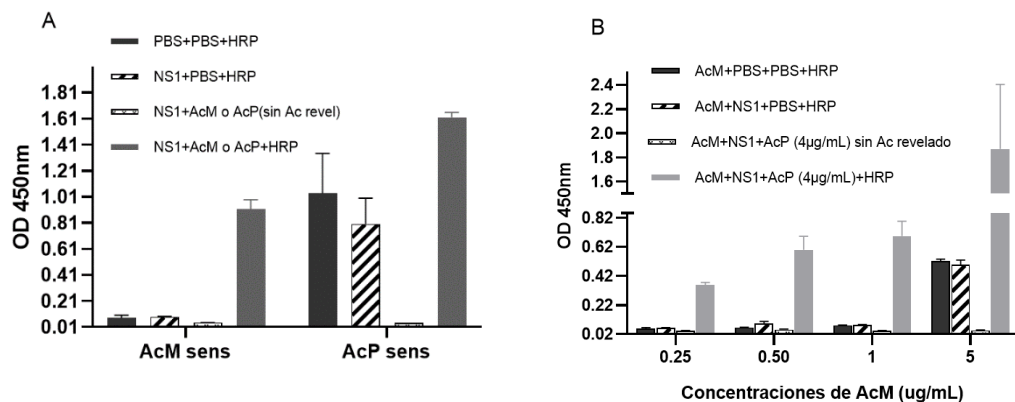


**Figura 10: Estandarización de las concentraciones de antígeno y anticuerpos mediante ensayo de ELISA indirecto.** Se evaluaron 4 concentraciones para cada uno de los anticuerpos. (A) Concentraciones evaluadas de anticuerpo monoclonal desde 0.5-5 µg/mL. (B) Concentraciones evaluadas de anticuerpo policlonal de rata desde 1-4 µg/mL. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes.

Se decidió trabajar con 1 µg/mL y con 4 µg/mL de anticuerpo monoclonal murino y policlonal de rata, respectivamente, en tanto que la concentración óptima de la proteína rNS1 detectada por ambos anticuerpos fue de 3 µg/mL.

#### 6.5 Desarrollo del ensayo de ELISA de captura para la detección de NS1 de DENV.

Una vez conocida las concentraciones óptimas de anticuerpos y proteína recombinante, se implementó el ensayo de ELISA de captura para seleccionar la mejor combinación de anticuerpo de captura y de anticuerpo de detección. Para esta finalidad se llevaron a cabo dos esquemas. Un esquema consistía en sensibilizar la placa de ELISA con el anticuerpo monoclonal murino y detectar el antígeno con el anticuerpo policlonal de rata. Para el segundo esquema se variaron los anticuerpos, esta vez sensibilizando con el anticuerpo policlonal de rata y detectando con el monoclonal murino



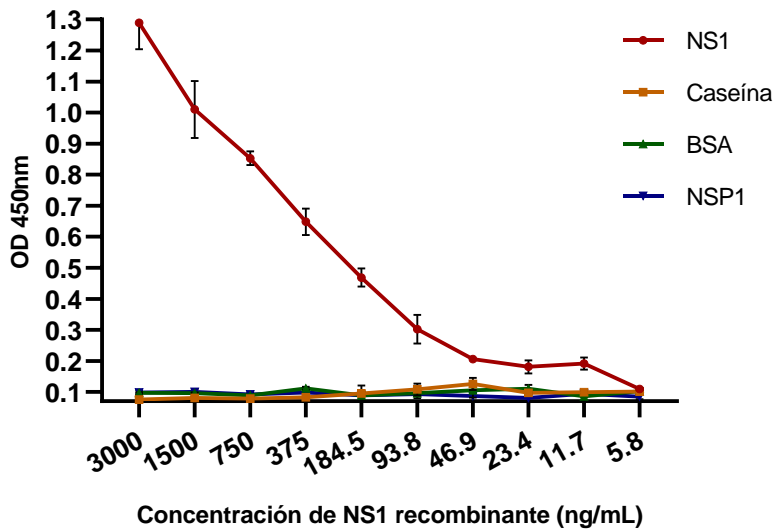
**Figura 11: Evaluación de los anticuerpos mediante ensayo de ELISA de captura.** A) Tamizaje de la combinación óptima de anticuerpos de captura y de detección. B) Análisis de concentraciones de anticuerpo monoclonal murino. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes.

Ambos sistemas ensayados pueden reconocer a la proteína NS1r (Fig. 11). Las mejores combinaciones de mayor sensibilidad se obtuvieron al sensibilizar con el anticuerpo policlonal de rata. Sin embargo, al analizar los controles se pudo observar que el anticuerpo de revelado anti-ratón conjugado a HRP muestra reactividad cruzada hacia el anticuerpo policlonal de rata. En el sistema en el cual se sensibilizó con el anticuerpo monoclonal, este fenómeno no fue observado, al menos a la concentración de 1 µg/mL (Fig. 11A). Aunque cabe resaltar que en una concentración más alta de 5 µg/mL el anticuerpo anti-rata conjugado a HRP mostró reactividad cruzada hacia el anticuerpo monoclonal. Con la finalidad de trabajar con la menor concentración de anticuerpo monoclonal posible se analizaron concentraciones más bajas de este (Fig. 11B). Aunque no hubo muchas diferencias en comparación con la concentración estandarizada de 1 µg/mL, de hecho, se vio una tendencia a disminuir la respuesta. Es por ello por lo que se decidió seguir trabajando con la concentración de 1 µg/mL preestablecida.

### 6.6 Límites de detección del ensayo de ELISA de captura.

Para evaluar la mínima concentración de NS1 recombinante que puede ser detectada por el ensayo, se evaluaron distintas concentraciones de NS1, desde 3 µg/mL hasta 5.86 ng/mL (Fig. 12). Para el establecimiento de la línea base, se evaluaron las proteínas caseína, BSA y NSP1 a las mismas concentraciones

ensayadas de NS1. Como se esperaba, solo se detectó señal en aquellos pozos tratados con la proteína recombinante.



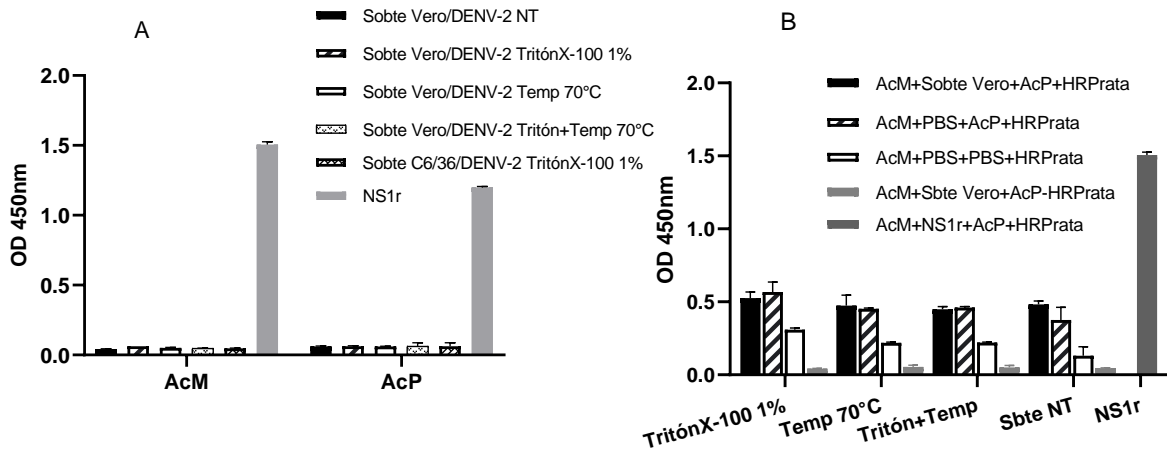
**Figura 12:** Límites de detección del ensayo de ELISA de captura con la proteína NS1 recombinante

El límite de detección se estableció a partir del promedio de las DO de los controles negativos. Se consideraron positivos aquellos valores de DO de al menos el doble del valor obtenido para los controles negativos. En este contexto, con el ensayo de ELISA de captura se pudo detectar una concentración mínima de 11.7 ng/mL de NS1 recombinante. Tomando en consideración estos resultados, se estableció que los límites de detección del ensayo se encontraban entre 0.5 ng/pozo.

### 6.7 Evaluación de sobrenadantes de células infectadas mediante ensayo de ELISA de captura.

Para la detección de la proteína NS1 nativa se infectaron células Vero con el DENV-2 y se realizaron ensayos de ELISA para la detección de esta. No se pudo detectar la forma hexamérica de NS1. Los sobrenadantes de células Vero fueron pretratados con detergente no iónico Tritón X-100 al 1% y/o temperatura a 70°C durante 10 min. Los mismos fueron evaluados por ensayo de ELISA de captura y ELISA indirecto (Fig. 13).





**Figura 13.** Evaluación de la proteína NS1 proveniente de sobrenadantes de células infectadas con DENV-2. **(A)** Detección de la proteína NS1 del sobrenadante de células infectadas mediante ensayo de ELISA indirecto. Los sobrenadantes fueron pretratados con TritónX-100 1% (barra con diagonal), 70°C de temperatura (barra blanca), con ambos tratamientos. Como controles se utilizaron sobrenadantes de células infectadas sin tratar y la proteína NS1r. **(B)** Detección de la proteína NS1 del sobrenadante de células infectadas mediante ensayo de ELISA de captura. Los sobrenadantes fueron pretratados con TritónX-100 1%, 70°C de temperatura o con ambos tratamientos. Como controles se utilizaron sobrenadantes de células infectadas sin tratar y la proteína NS1r. La barra negra corresponde a la detección de la proteína NS1 en sobrenadantes de células infectadas, el resto de las barras son controles del ensayo. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes.

Como se observa en ambos ensayos, los sobrenadantes tratados tuvieron un comportamiento similar a los no tratados, no detectándose a la proteína en ninguna de sus conformaciones. Solo se detectó señal en los pozos tratados con la proteína NS1 recombinante.

## 7 DISCUSIÓN

La incidencia mundial del DENV se ha incrementado considerablemente en las últimas dos décadas. La región de Las Américas es una de las más afectadas, con el 80 % de casos positivos reportados mundialmente en 2023. En este mismo año se registró la cifra histórica más alta de casos en la región con la presencia de los cuatro serotipos virales. Lo cual convierte a la infección por virus del dengue en un grave problema de salud pública. Dada esta situación epidemiológica y la introducción de otras enfermedades provocadas por arbovirus como zika, chikungunya y el Virus del Oeste del Nilo, se ha reforzado la red de laboratorios de diagnósticos de Arbovirus. Una de las principales estrategias es el diagnóstico viral en las etapas más tempranas de la infección (PAHO, 2023). En este contexto, la proteína NS1 ha alcanzado una gran relevancia. Esta proteína tiene la gran ventaja de ser secretada por la célula hospedera incluso antes de la salida de las partículas virales, lo que ha permitido su detección en el plasma de individuos infectados (Fisher et al., 2023).

En este trabajo se desarrolló un ensayo de ELISA de captura para la detección de la proteína NS1. Para ello se contó con anticuerpos policlonales de rata para detectar y monoclonales de ratón para capturar a la proteína NS1. Esta combinación de anticuerpos fue en la que menos se detectó reactividad cruzada del anticuerpo HRP, aunque no se eliminó por completo (Figura 11). Una posible explicación a este fenómeno radica en que dentro de las subclases de IgG de rata y de IgG de ratón pueden existir analogías funcionales. Tal es el caso de la IgG3 de ratón y la IgG2c de rata que comparten determinantes antigénicos polisacarídicos (Nahm et al., 1980; Nadeem et al., 2021).

La elección de la concentración óptima de los anticuerpos y de la proteína recombinante se llevó a cabo mediante ensayo de ELISA indirecto. Se seleccionaron las concentraciones que se encontraran entre 0.5 y 1 de DO (Figura 10). En este rango se asegura que la concentración de los analitos y la absorbancia tengan una relación lineal. Cuando la absorbancia alcanza valores de 1 la absorción

de luz por la muestra es del 90 % por lo que a valores superiores ya no existiría esta linealidad (Thiha & Ibrahim, 2015) .

Se determinó el límite de detección del ensayo de ELISA de captura para la detección de NS1. Se detectó una concentración mínima de 12 ng/mL (0.5 ng/pozo) al utilizar la proteína NS1 recombinante (Figura 12). Estos resultados indican que el ELISA de captura es adecuado para la medición de NS1 presente en el suero, ya que el nivel de la proteína circulante en muestras de suero de fase aguda se encuentra dentro del rango de 10 ng/mL y 50 µg/mL (Alcon et al., 2002). Adicionalmente otros grupos de investigación han reportado valores de límites de detección cercanos o similares al nuestro (Qiu et al., 2009; Puttikhunt et al., 2011)

Dentro de la célula, NS1 puede encontrarse de forma monomérica y dimérica. Una vez se escinde de la poliproteína, rápidamente se dimeriza. Un hecho interesante es que al utilizar el anticuerpo monoclonal murino se pudo detectar a la proteína NS1 en células Vero infectadas con DENV-2 mediante IFA (datos no mostrados). Sin embargo, no se pudo detectar en su forma hexamérica una vez es secretada por la célula. Sugiriendo que los epítomos reconocidos se encuentran ocultos en la proteína. Por un lado, las regiones de reconocimientos de los anticuerpos pueden estar orientadas hacia el interior del hexámero, posiblemente en el dominio  $\beta$ -roll. La proteína NS1 es considerada una apolipoproteína dada su capacidad de almacenar cargas lipídicas como colesterol y TAG. Estudios han evidenciado que los dímeros que forman el hexámero se mantienen unidos a través de interacciones hidrofóbicas débiles, siendo precisamente la presencia de lípidos en su interior uno de los factores que proporciona estabilidad (Flamand et al., 1999; Gutsche et al., 2011). Estas características contribuyen a que el hexámero sea resistente al tratamiento con altas concentraciones de sal y agentes quelantes, pero sensible a temperatura y tratamiento con detergentes iónicos y no iónicos. Los dímeros sin embargo son resistentes a los detergentes y sensibles a temperatura y pH ácido (Crooks et al., 1994). Considerando esto, los sobrenadantes de células infectadas y sueros de pacientes se sometieron a diversos tratamientos que incluían una previa incubación con detergente no iónico TritónX-100 al 1 % durante toda la noche

a 4°C y/o calentamiento de la muestra a 70°C. Sin embargo, no logramos detectar la proteína mediante ensayo de ELISA indirecto ni ELISA de captura (Figura 13).

Estudios previos en ratones inmunizados con NS1 de DENV-2 y sueros de pacientes infectados con este serotipo reportaron una región en el dominio ala de NS1 que fue inmunodominante tanto en ratones como en sueros humanos. Dicha región comprendía los aminoácidos del 101-135 y mostró reactividad contra otros serotipos como DENV-1 y DENV-3 (Hertz et al., 2017). Adicionalmente, se conoce que la proteína NS1 de DENV presenta un sitio de glicosilación precisamente en el aminoácido Asn 130. Este sitio sufre modificaciones en su tránsito a través de la red Trans-Golgi, adquiriendo patrones de glicosilación complejos en células de mamíferos (Muller & Young, 2013). Estas glicosilaciones presentes en el hexámero es otro factor que le da estabilidad (Yap et al., 2017) y posiblemente esté enmascarando en la proteína NS1 hexamérica péptidos inmunodominantes. Los anticuerpos utilizados en el estudio se produjeron mediante estimulación con la proteína NS1 monomérica recombinante, que no presenta glicosilaciones en su estructura. Por tanto, los anticuerpos pueden reconocer regiones que en el hexámero estén ocultas por la presencia de las glicosilaciones (Mehdi et al., 2022). Sin embargo, se requieren estudios para saber si esta es la causa de que no observemos reconocimiento.

Existen muchos tipos de sistemas de expresión, que permiten la obtención y secreción de proteínas con patrones de glicosilación como es el caso de células de insectos, células de mamíferos, levaduras, entre otros. Sin embargo, la utilización de estos sistemas en ocasiones posee un alto coste en cuanto a su mantenimiento y los medios utilizados. Adicionalmente se pueden obtener proteínas hiperglicosiladas o cuyo patrón de glicosilación sea diferente al de las células de mamíferos como es el caso de levadura. Aunque los sistemas de expresión procarióticos carecen de maquinaria para modificaciones postraduccionales son ampliamente utilizados debido a su facilidad de manipulación y la capacidad de expresar altos niveles de proteínas recombinantes, lo cual abarata el costo de producción de este tipo de proteínas (Zemella et al., 2015).

Este conjunto de resultados nos sugiere que se requiere de la producción de nuevos anticuerpos. Actualmente se está desarrollando un anticuerpo monoclonal de rata específico para NS1, el cual esperamos permita estandarizar nuestro ensayo de ELISA. Por otro lado, se podría producir otros anticuerpos monoclonales que reconozcan otras regiones inmunodominantes o incluso no inmunodominantes, que nos permita tener un pool de anticuerpos que aumente las posibilidades de capturar la proteína NS1 hexamérica y nativa (Lim et al., 2023; Rocha et al., 2017). Adicionalmente, el desarrollo de esquemas de inmunización con la proteína correctamente plegada y/o glicosilada incrementaría la probabilidad de obtener anticuerpos ya sean policlonales y monoclonales capaces de ser usados en el diagnóstico efectivo de DENV (Lai et al., 2019; Mehdi et al., 2022).

## **8 CONCLUSIONES**

Los anticuerpos monoclonales murinos y policlonales de rata son capaces de reconocer a la proteína recombinante NS1 de DENV mediante ELISA de captura y ELISA indirecto, mostrando potencial para uso diagnóstico. Sin embargo, se identificaron limitaciones relacionadas con la detección de la forma hexamérica de la proteína, posiblemente por la presencia de glicosilaciones en la estructura.

## **9 PERSPECTIVAS**

Desarrollar esquemas de inmunización con la proteína hexamérica y nativa para la obtención de anticuerpos monoclonales y policlonales orientados hacia otras regiones inmunodominantes o no inmunodominantes.

Producir y evaluar mediante ensayo de ELISA mezclas de anticuerpos monoclonales, que incrementen la posibilidad de detectar a la proteína NS1.

Evaluar la especificidad y sensibilidad del ensayo utilizando muestras de pacientes infectados con distintos serotipos de DENV, así como, sueros no relacionados.

## 10 REFERENCIAS

- Abhishek, K. S., Chakravarti, A., Baveja, C. P., Kumar, N., Siddiqui, O., & Kumar, S. (2017). Association of interleukin-2, -4 and -10 with dengue severity. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 60(1). <https://doi.org/10.4103/0377-4929.200027>
- Akey, D. L., Brown, W. C., Dutta, S., Konwerski, J., Jose, J., Jurkiw, T. J., DelProposto, J., Ogata, C. M., Skiniotis, G., Kuhn, R. J., & Smith, J. L. (2014). Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. *Science*, 343(6173). <https://doi.org/10.1126/science.1247749>
- Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., & Flamand, M. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2). <https://doi.org/10.1128/JCM.40.02.376-381.2002>
- Allonso, D., Meneses, M. D. F., Fernandes, C. A., Ferreira, D. F., & Mohana-Borges, R. (2014). Assessing positivity and circulating levels of NS1 in samples from a 2012 dengue outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113634>
- Avirutnan, P., Fuchs, A., Hauhart, R. E., Somnuk, P., Youn, S., Diamond, M. S., & Atkinson, J. P. (2010). Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *Journal of Experimental Medicine*, 207(4). <https://doi.org/10.1084/jem.20092545>
- Avirutnan, P., Hauhart, R. E., Somnuk, P., Blom, A. M., Diamond, M. S., & Atkinson, J. P. (2011). Binding of Flavivirus Nonstructural Protein NS1 to C4b Binding Protein Modulates Complement Activation. *The Journal of Immunology*, 187(1). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100750>



- Benfrid, S., Park, K., Dellarole, M., Voss, J. E., Tamietti, C., Pehau-Arnaudet, G., Raynal, B., Brûlé, S., England, P., Zhang, X., Mikhailova, A., Hasan, M., Ungeheuer, M., Petres, S., Biering, S. B., Harris, E., Sakuntabhai, A., Buchy, P., Duong, V., ... Flamand, M. (2022). Dengue virus NS1 protein conveys pro-inflammatory signals by docking onto high-density lipoproteins. *EMBO Reports*, 23(7). <https://doi.org/10.15252/embr.202153600>
- Bhatnagar, P., Sreekanth, G. P., Murali-Krishna, K., Chandele, A., & Sitaraman, R. (2021). Dengue Virus Non-Structural Protein 5 as a Versatile, Multi-Functional Effector in Host–Pathogen Interactions. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.574067>
- Blacksell, S. D. (2012). Commercial dengue rapid diagnostic tests for point-of-care application: Recent evaluations and future needs? In *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/151967>
- Chen, H. R., Chuang, Y. C., Lin, Y. S., Liu, H. S., Liu, C. C., Perng, G. C., & Yeh, T. M. (2016). Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Induces Vascular Leakage through Macrophage Migration Inhibitory Factor and Autophagy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004828>
- Chen, H. R., Lai, Y. C., & Yeh, T. M. (2018). Dengue virus non-structural protein 1: A pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 25, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0462-0>
- Conde, J. N., da Silva, E. M., Allonso, D., Coelho, D. R., Andrade, I. da S., de Medeiros, L. N., Menezes, J. L., Barbosa, A. S., & Mohana-Borges, R. (2016). Inhibition of the Membrane Attack Complex by Dengue Virus NS1 through Interaction with Vitronectin and Terminal Complement Proteins. *Journal of Virology*, 90(21). <https://doi.org/10.1128/jvi.00912-16>

- Costa, V. V., Fagundes, C. T., Souza, D. G., & Teixeira, M. M. (2013). Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: Protection versus disease induction. In *American Journal of Pathology* (Vol. 182, Issue 6).  
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.027>
- Crooks, A. J., Lee, J. M., Easterbrook, L. M., Timofeev, A. V., & Stephenson, J. R. (1994). The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell. *Journal of General Virology*, 75(12).  
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-12-3453>
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A. R. B., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 39, Issue 2).  
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>
- de Angel, R. M., & Valle, J. R. del. (2013). Dengue Vaccines: Strongly Sought but Not a Reality Just Yet. *PLoS Pathogens*, 9(10).  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003551>
- Fisher, R., Lustig, Y., Sklan, E. H., & Schwartz, E. (2023). The Role of NS1 Protein in the Diagnosis of Flavivirus Infections. In *Viruses* (Vol. 15, Issue 2). MDPI.  
<https://doi.org/10.3390/v15020572>
- Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F. A., & Deubel, V. (1999). Dengue Virus Type 1 Nonstructural Glycoprotein NS1 Is Secreted from Mammalian Cells as a Soluble Hexamer in a Glycosylation-Dependent Fashion. *Journal of Virology*, 73(7). <https://doi.org/10.1128/jvi.73.7.6104-6110.1999>
- Fry, S. R., Meyer, M., Semple, M. G., Simmons, C. P., Sekaran, S. D., Huang, J. X., McElnea, C., Huang, C. Y., Valks, A., Young, P. R., & Cooper, M. A. (2011). The diagnostic sensitivity of Dengue Rapid test assays is significantly enhanced by using a combined Antigen and Antibody testing approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(6).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001199>

- Gaikwad, S., Sawant, S. S., & Shastri, J. S. (2017). Comparison of nonstructural protein-1 antigen detection by rapid and enzyme-linked immunosorbent assay test and its correlation with polymerase chain reaction for early diagnosis of dengue. *Journal of Laboratory Physicians*, 9(03), 177–181.  
<https://doi.org/10.4103/0974-2727.208265>
- Garcia-Blanco, M. A., Vasudevan, S. G., Bradrick, S. S., & Nicchitta, C. (2016). Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. *Antiviral Research*, 134, 244–249. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2016.09.010>
- Germi, R., Crance, J. M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W. H., Zarski, J. P., & Drouet, E. (2002). Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology*, 292(1).  
<https://doi.org/10.1006/viro.2001.1232>
- Glasner, D. R., Puerta-Guardo, H., Beatty, P. R., & Harris, E. (2018). The good, the bad, and the shocking: The multiple roles of dengue virus nonstructural protein 1 in protection and pathogenesis. *Annual Review of Virology*, 5.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041848>
- Glasner, D. R., Ratnasiri, K., Puerta-Guardo, H., Espinosa, D. A., Beatty, P. R., & Harris, E. (2017). Dengue virus NS1 cytokine-independent vascular leak is dependent on endothelial glycocalyx components. *PLoS Pathogens*, 13(11).  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006673>
- Green, A. M., Beatty, P. R., Hadjilaou, A., & Harris, E. (2014). Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 426, Issue 6).  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.11.023>
- Grifoni, A., Angelo, M. A., Lopez, B., O'Rourke, P. H., Sidney, J., Cerpas, C., Balmaseda, A., Silveira, C. G. T., Maestri, A., Costa, P. R., Durbin, A. P., Diehl, S. A., Phillips, E., Mallal, S., de Silva, A. D., Nchinda, G., Nkenfou, C., Collins, M. H., de Silva, A. M., ... Weiskopf, D. (2017). Global assessment of dengue

virus-specific CD4+ T Cell responses in dengue-endemic areas. *Frontiers in Immunology*, 8(OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01309>

Gutsche, I., Coulibaly, F., Voss, J. E., Salmon, J., D'Alayer, J., Ermonval, M., Larquet, E., Charneau, P., Krey, T., Mégret, F., Guittet, E., Rey, F. A., & Flamand, M. (2011). Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(19).

<https://doi.org/10.1073/pnas.1017338108>

Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2.

<https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>

Harapan, H., Michie, A., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2020). Dengue: A minireview. In *Viruses* (Vol. 12, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v12080829>

Heinz, F. X., & Allison, S. L. (2003). Flavivirus Structure and Membrane Fusion. *Advances in Virus Research*, 59. [https://doi.org/10.1016/S0065-](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)59003-0)

[3527\(03\)59003-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)59003-0)

Hertz, T., Beatty, P. R., MacMillen, Z., Killingbeck, S. S., Wang, C., & Harris, E. (2017). Antibody Epitopes Identified in Critical Regions of Dengue Virus Nonstructural 1 Protein in Mouse Vaccination and Natural Human Infections. *The Journal of Immunology*, 198(10).

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700029>

Hu, S. F., Li, M., Zhong, L. L., Lu, S. M., Liu, Z. X., Pu, J. Y., Wen, J. S., & Xi, H. (2015). Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes 1-4. *BMC Microbiology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0595-1>

- Humaidi, M., Tien, W. P., Yap, G., Chua, C. R., & Ng, L. C. (2021). Non-invasive dengue diagnostics—the use of saliva and urine for different stages of the illness. *Diagnostics*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/diagnostics11081345>
- Kabir, M. A., Zilouchian, H., Younas, M. A., & Asghar, W. (2021). Dengue detection: Advances in diagnostic tools from conventional technology to point of care. In *Biosensors* (Vol. 11, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/bios11070206>
- Katzelnick, L. C., Gresh, L., Halloran, M. E., Mercado, J. C., Kuan, G., Gordon, A., Balmaseda, A., & Harris, E. (2017). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*, 358(6365). <https://doi.org/10.1126/science.aan6836>
- Lai, S.-C., Huang, Y.-Y., Shu, P.-Y., Chang, S.-F., Hsieh, P.-S., Wey, J.-J., Tsai, M.-H., Ben, R.-J., Hsu, Y.-M., Fang, Y.-C., Hsiao, M.-L., Lin, C.-C., Lai S-C, C., Y-y, H., P-y, S., S-f, C., P-s, H., J-j, W., M-h, T., ... Y-m, H. (2019). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Rapid Detection of Dengue Virus (DENV) NS1 and Differentiation of DENV Serotypes during Early Infection. In *jcm.asm.org 1 Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 57). <https://doi.org/10>
- León-Juárez, M., Martínez-Castillo, M., Shrivastava, G., García-Cordero, J., Villegas-Sepulveda, N., Mondragón-Castelán, M., Mondragón-Flores, R., & Cedillo-Barrón, L. (2016). Recombinant Dengue virus protein NS2B alters membrane permeability in different membrane models. *Virology Journal*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0456-4>
- Li, Q., & Kang, C. (2022). Structures and Dynamics of Dengue Virus Nonstructural Membrane Proteins. In *Membranes* (Vol. 12, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/membranes12020231>
- Libraty, D. H., Young, P. R., Pickering, D., Endy, T. P., Kalayanarooj, S., Green, S., Vaughn, D. W., Nisalak, A., Ennis, F. A., & Rothman, A. L. (2002). High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic

- Fever. In *The Journal of Infectious Diseases*.  
<https://academic.oup.com/jid/article/186/8/1165/2191417>
- Lim, P. Y., Ramaprabha, A., Loy, T., Rouers, A., Thein, T. L., Leo, Y. S., Burton, D. R., Fink, K., & Wang, C. I. (2023). A nonstructural protein 1 capture enzyme-linked immunosorbent assay specific for dengue viruses. *PLoS ONE*, 18(5 May). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285878>
- Lindenbach, B. D., Murray, C. L., Thiel, H. J., & Rice, C. M. (2013). Flaviviridae. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.). *Fields Virology*, 6.
- Liu, J., Liu, Y., Nie, K., Du, S., Qiu, J., Pang, X., Wang, P., & Cheng, G. (2016). Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. *Nature Microbiology*, 1(9).  
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.87>
- López-González, M., Meza-Sánchez, D., García-Cordero, J., Bustos-Arriaga, J., Vélez-Del Valle, C., Marsch-Moreno, M., Castro-Jiménez, T., Flores-Romo, L., Santos-Argumedo, L., Gutiérrez-Castañeda, B., & Cedillo-Barrón, L. (2018). Human keratinocyte cultures (HaCaT) can be infected by DENV, triggering innate immune responses that include IFN $\lambda$  and LL37. *Immunobiology*, 223(11), 608–617. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.07.006>
- Mehdi, F., Chowdhury, S. R., Yadav, S., Kansana, J. S., Sinha, S. K., Das, S. J., Lodha, R., Prakash, J. A. J., Lamminimäki, U., & Batra, G. (2022). Generation of a Large Repertoire of Monoclonal Antibodies against Dengue Virus NS1 Antigen and the Development of a Novel NS1 Detection Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *The Journal of Immunology*, 209(10).  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200251>
- Modhiran, N., Watterson, D., Blumenthal, A., Baxter, A. G., Young, P. R., & Stacey, K. J. (2017). Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. *Immunology and Cell Biology*, 95(5).  
<https://doi.org/10.1038/icb.2017.5>

- Muller, D. A., Depelsenaire, A. C. I., & Young, P. R. (2017). Clinical and laboratory diagnosis of dengue virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 215. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw649>
- Muller, D. A., & Young, P. R. (2013). The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Research*, 98(2), 192–208. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2013.03.008>
- Nahm, M., Der-Balian, G. P., Venturini, D., & Davie I, J. M. (1980). *Antigenic Similarities of Rat and Mouse IgG Subclasses Associated with Anti-Carbohydrate Specificities* (Vol. 11).
- Nanaware, N., Banerjee, A., Bagchi, S. M., Bagchi, P., & Mukherjee, A. (2021). Dengue virus infection: A tale of viral exploitations and host responses. In *Viruses* (Vol. 13, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v13101967>
- Narayan, R., & Tripathi, S. (2020). Intrinsic ADE: The Dark Side of Antibody Dependent Enhancement During Dengue Infection. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.580096>
- Ng, W. C., Soto-Acosta, R., Bradrick, S. S., Garcia-Blanco, M. A., & Ooi, E. E. (2017). The 5' and 3' untranslated regions of the flaviviral genome. In *Viruses* (Vol. 9, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v9060137>
- Norazharuddin, H., & Lai, N. S. (2018). Roles and prospects of dengue virus nonstructural proteins as antiviral targets: An easy digest. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 25(5), 6–15. <https://doi.org/10.21315/mjms2018.25.5.2>
- PAHO. (2023). *Epidemiological Update for Dengue, Chikungunya and Zika in 2022*.
- Pang, J., Chia, P. Y., Lye, D. C., & Leo, Y. S. (2017). Progress and challenges towards pointof-care diagnostic development for dengue. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 55, Issue 12). <https://doi.org/10.1128/JCM.00707-17>

- Peeling, R. W., Artsob, H., Pelegrino, J. L., Buchy, P., Cardoso, M. J., Devi, S., Enria, D. A., Farrar, J., Gubler, D. J., Guzman, M. G., Halstead, S. B., Hunsperger, E., Kliks, S., Margolis, H. S., Nathanson, C. M., Nguyen, V. C., Rizzo, N., Vázquez, S., & Yoksan, S. (2010). Evaluation of diagnostic tests: Dengue. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12).  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2459>
- Phaik, H. T., Wan, W. J., & Cardoso, M. J. (2005). Two dimensional VOPBA reveals laminin receptor (LAMR1) interaction with dengue virus serotypes 1, 2 and 3. *Virology Journal*, 2. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-25>
- Płaszczycza, A., Scaturro, P., Neufeldt, C. J., Cortese, M., Cerikan, B., Ferla, S., Brancale, A., Pichlmair, A., & Bartenschlager, R. (2019). A novel interaction between dengue virus nonstructural protein 1 and the NS4A-2K-4B precursor is required for viral RNA replication but not for formation of the membranous replication organelle. *PLoS Pathogens*, 15(5).  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007736>
- Puerta-Guardo, H., Glasner, D. R., & Harris, E. (2016). Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathogens*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005738>
- Puttikhunt, C., Prommool, T., U-thainual, N., Ong-ajchaowlerd, P., Yoosook, K., Tawilert, C., Duangchinda, T., Jairangsri, A., Tangthawornchaikul, N., Malasit, P., & Kasinrerak, W. (2011). The development of a novel serotyping-NS1-ELISA to identify serotypes of dengue virus. *Journal of Clinical Virology*, 50(4).  
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.01.001>
- Qiu, L. W., Di, B., Wen, K., Wang, X. S., Liang, W. H., Wang, Y. Di, Pan, Y. X., Wang, M., Ding, Y. Q., & Che, X. Y. (2009). Development of an antigen capture immunoassay based on monoclonal antibodies specific for dengue virus serotype 2 nonstructural protein 1 for early and rapid identification of dengue virus serotype 2 infections. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(1).  
<https://doi.org/10.1128/CVI.00212-08>



- Raafat, N., Blacksell, S. D., & Maude, R. J. (2019a). A review of dengue diagnostics and implications for surveillance and control. In *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (Vol. 113, Issue 11). <https://doi.org/10.1093/trstmh/trz068>
- Raafat, N., Blacksell, S. D., & Maude, R. J. (2019b). A review of dengue diagnostics and implications for surveillance and control. In *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (Vol. 113, Issue 11, pp. 653–660). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trz068>
- Ramasamy, I. (2014). Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. In *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (Vol. 52, Issue 12). <https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0358>
- Rocha, L. B., Dos Santos Alves, R. P., Caetano, B. A., Pereira, L. R., Mitsunari, T., Amorim, J. H., Polatto, J. M., Botosso, V. F., Gallina, N. M. F., Palacios, R., Precioso, A. R., Granato, C. F. H., Oliveira, D. B. L., Da Silveira, V. B., Luz, D., De Souza Ferreira, L. C., & Piazza, R. M. F. (2017). Epitope sequences in dengue virus NS1 protein identified by monoclonal antibodies. *Antibodies*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/antib6040014>
- Rothman, A. L. (2011). Immunity to dengue virus: A tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 11, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/nri3014>
- Roy, S. K., & Bhattacharjee, S. (2021). Dengue virus: Epidemiology, biology, and disease aetiology. In *Canadian Journal of Microbiology* (Vol. 67, Issue 10). <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0572>
- Sahni, A. K., Grover, N., Sharma, A., Khan, I. D., & Kishore, J. (2013). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for diagnosis of dengue. *Medical Journal Armed Forces India*, 69(3). <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2012.07.017>

- Saito, Y., Moi, M. L., Kotaki, A., Ikeda, M., Tajima, S., Shiba, H., Hosono, K., Saijo, M., Kurane, I., & Takasaki, T. (2015). Detecting dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) in urine samples using ELISA for the diagnosis of dengue virus infection. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 68(6), 455–460. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2014.441>
- Secretaría de Salud. (2023). *Panorama Epidemiológico de Dengue*.
- Shrivastava, G., García-Cordero, J., León-Juárez, M., Oza, G., Tapia-Ramírez, J., Villegas-Sepulveda, N., & Cedillo-Barrón, L. (2017). NS2A comprises a putative viroporin of Dengue virus 2. In *Virulence* (Vol. 8, Issue 7, pp. 1450–1456). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1356540>
- Song, H., Qi, J., Haywood, J., Shi, Y., & Gao, G. F. (2016). Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nature Structural and Molecular Biology*, 23(5). <https://doi.org/10.1038/nsmb.3213>
- Tassaneeritthep, B., Burgess, T. H., Granelli-Piperno, A., Trumpheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M. A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D. L., Steinman, R. M., Schlesinger, S., & Marovich, M. A. (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 197(7). <https://doi.org/10.1084/jem.20021840>
- Thiemmecca, S., Tamdet, C., Punyadee, N., Prommool, T., Songjaeng, A., Noisakran, S., Puttikhunt, C., Atkinson, J. P., Diamond, M. S., Ponlawat, A., & Avirutnan, P. (2016). Secreted NS1 Protects Dengue Virus from Mannose-Binding Lectin-Mediated Neutralization. *The Journal of Immunology*, 197(10). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600323>
- Thiha, A., & Ibrahim, F. (2015). A colorimetric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) detection platform for a point-of-care dengue detection system on a lab-on-compact-disc. *Sensors (Switzerland)*, 15(5). <https://doi.org/10.3390/s150511431>

- Tian, Y., Grifoni, A., Sette, A., & Weiskopf, D. (2019). Human T Cell Response to Dengue Virus Infection. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10).  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02125>
- Tsai, J. J., Liu, C. K., Tsai, W. Y., Liu, L. T., Tyson, J., Tsai, C. Y., Lin, P. C., & Wang, W. K. (2018). Seroprevalence of dengue virus in two districts of Kaohsiung City after the largest dengue outbreak in Taiwan since World War II. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(10).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006879>
- Urcuqui-Inchima, S., Patiño, C., Torres, S., Haenni, A.-L., & Díaz, F. J. (2010). *Chapter 1 - Recent Developments in Understanding Dengue Virus Replication*. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(10\)77001-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(10)77001-9)
- Waggoner, J. J., Abeynayake, J., Sahoo, M. K., Gresh, L., Tellez, Y., Gonzalez, K., Ballesteros, G., Guo, F. P., Balmaseda, A., Karunaratne, K., Harris, E., & Pinsky, B. A. (2013). Comparison of the FDA-approved CDC DENV-1-4 real-time reverse transcription-PCR with a laboratory-developed assay for dengue virus detection and serotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3418–3420. <https://doi.org/10.1128/JCM.01359-13>
- Wan, S. W., Lin, C. F., Chen, M. C., Lei, H. Y., Liu, H. S., Yeh, T. M., Liu, C. C., & Lin, Y. S. (2008). C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 is involved in endothelial cell cross-reactivity via molecular mimicry. *American Journal of Infectious Diseases*, 4(1). <https://doi.org/10.3844/ajidsp.2008.85.91>
- Weiskopf, D., Angelo, M. A., Bangs, D. J., Sidney, J., Paul, S., Peters, B., de Silva, A. D., Lindow, J. C., Diehl, S. A., Whitehead, S., Durbin, A., Kirkpatrick, B., & Sette, A. (2015). The Human CD8 + T Cell Responses Induced by a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Are Directed against Highly Conserved Epitopes. *Journal of Virology*, 89(1).  
<https://doi.org/10.1128/jvi.02129-14>
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., & Bartenschlager, R. (2009). Composition

and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host and Microbe*, 5(4).

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>

Wong, M. P., Juan, E. Y., Chelluri, S. S., Wang, P., Pahmeier, F., Blanc, S. F., Biering, S. B., Vance, R. E., & Harris, E. (n.d.). *The Inflammasome Pathway is Activated by Dengue Virus Non-structural Protein 1 and is 1 Protective During Dengue Virus Infection 2*. <https://doi.org/10.1101/2023.09.21.558875>

World Health Organization. (2009). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. World Health Organisation: Geneva, Switzerland; 2009. In *Supply Chain and Transportation Dictionary*.

Yap, S. S. L., Nguyen-Khuong, T., Rudd, P. M., & Alonso, S. (2017). Dengue virus glycosylation: What do we know? In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01415>

Youn, S., Li, T., McCune, B. T., Edeling, M. A., Fremont, D. H., Cristea, I. M., & Diamond, M. S. (2012). Evidence for a Genetic and Physical Interaction between Nonstructural Proteins NS1 and NS4B That Modulates Replication of West Nile Virus. *Journal of Virology*, 86(13), 7360–7371. <https://doi.org/10.1128/jvi.00157-12>

Yu, I. M., Zhang, W., Holdaway, H. A., Li, L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G., & Chen, J. (2008). Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*, 319(5871). <https://doi.org/10.1126/science.1153264>

Zemella, A., Thoring, L., Hoffmeister, C., & Kubick, S. (2015). Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems. *ChemBioChem*, 16(17). <https://doi.org/10.1002/cbic.201500340>