



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS IgG
CONTRA LAS PROTEÍNAS E Y NS1 VIRALES EN
PACIENTES CON DENGUE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

GARCÍA RAMÍREZ CLAUDIA VIANEY

ASESORES:

Dr. Salvador Fonseca Coronado

Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez

M. en C. Karina Ruiz Tovar

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

C.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Análisis de la respuesta de anticuerpos IgG contra las proteínas E y NS1 virales en pacientes con Dengue.

Que presenta la pasante: Claudia Vianey García Ramírez
Con número de cuenta: 405071201 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de mayo de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Marco Antonio Vega López	
VOCAL	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er. SUPLENTE	MVZ. Angel Germán Martínez Sosa	
2do. SUPLENTE	M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

DEDICATORIAS.

A Dios

Por ser mí guía y apoyo en todo momento y colmarme del amor y la fortaleza para caminar por la vida. Permittiendome entender que tus tiempos son perfectos y dejándome vivirlos siempre en tu amor.

A mis padres

Mario y Lourdes, por su amor y apoyo incondicional que me han permitido abrirme paso por la vida y ser la persona que soy. Ustedes son mi mayor motor y ejemplo a seguir. Soy muy afortunada al tenerlos y al vivir el amor de Dios porque ustedes están en mi vida. Los quiero mucho, este trabajo es para ustedes.

A mis hermanas

Mindy y Ana Karen, por todas las experiencias y el aprendizaje que vivo con ustedes día a día, por su apoyo en todo momento que me impulsa a seguir adelante y los momentos llenos de alegría y tristeza que me han permitido vivir a su lado. Las quiero.

A mi abuelo

Raul, por su amor, apoyo, consejos que han sido invaluable en mi vida. Eres parte muy importante de mi vida. Te quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios

Por todas las bendiciones que me has dado, soy muy afortunada. Muchas gracias, por darme la fuerza para salir adelante, por mi familia, por todas las personas que he conocido y que me han ayudado a lo largo del camino y por todas las personas que me faltan por conocer, las experiencias vividas y el aprendizaje que viene con ellas.

A mis padres

Por brindarme su amor, respeto, comprensión, enseñanzas, consejo y cuidados. Gracias por apoyarme en todo momento e impulsarme a ser mejor en todo aspecto durante mi desarrollo humano y profesional.

A mis hermanas

Por alentarme a seguir adelante con su apoyo y sus consejos. Esta aventura no hubiera sido la misma sin su presencia.

A mi abuelo

Por tu dedicación hacia toda tu familia, lo que nos ha demostrado el amor que le tienes y nos enseña lo valioso de dar. Tu apoyo ha sido invaluable.

Al Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez

Por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y realizar este trabajo, por su orientación y apoyo.

Al Dr. Salvador Fonseca Coronado

Por su apoyo, asesoría y el tiempo que dedico para la realización de éste trabajo.

A la M. en C. Karina Ruíz Tovar

Por la oportunidad de iniciarme profesionalmente, su consejo, apoyo, instrucción y el tiempo dedicado para la realización de éste trabajo.

A los miembros del Laboratorio de Investigaciones Inmunológicas en el InDRE

Raque, Juan Alberto, Pedrito, Juan Carlos, Fernando, Lupita R., Lupita T., Lupita G. y Barbarita por su apoyo incondicional, la experiencia profesional transmitida, consejos, ayuda que son invaluable y que me permitieron crecer profesionalmente y como ser humano.

Al Profe. Gerardo Cruz Jiménez

Por abrirme las puertas del Laboratorio BioTEST y brindarme su apoyo, confianza y afecto. Gracias por permitirme crecer tanto personal como profesionalmente. Tiene usted todo mi respeto, agradecimiento y admiración.

A mis profesores

Por darme la oportunidad con sus enseñanzas de tener acceso al conocimiento lo que me permitió ser lo que soy ahora.

A mis amigos

Tania, Mayeli, Ana Luz, Miguel Ángel, Diana, Leonardo, Uriel, Alejandro, Fernando, Leticia, Raul, Amilcar, Christian, Mariana, Yuliana, Omar, Rafael, Isbo, por su amistad, su apoyo, consejos, por estar conmigo en buenos y malos momentos. Los quiero.

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) como parte del proyecto CONACyT Salud-2008-C01-87653 “Desarrollo de una técnica de citometría de flujo para la determinación intracelular de la proteína NS1 (DV-NS1-CF) para el diagnóstico temprano de casos de dengue”.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ABREVIATURAS	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Agente etiológico.....	3
1.2 Proteínas E y NS1 virales	4
1.3 Estrategia de replicación viral.....	5
1.4 Respuesta inmune humoral en Dengue	6
1.5 Diagnóstico	9
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. HIPÓTESIS	10
4. OBJETIVOS	11
4.1 Objetivo general	11
4.2 Objetivos particulares.....	11
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	12
6. MATERIALES Y MÉTODOS	13
6.1 Células C6/36.....	13
6.2 Obtención de abasto viral.....	13
6.3 Titulación viral por el método de formación de placas líticas	13
6.4 Infección de células C6/36	14
6.5 Obtención de antígeno	14
6.6 Determinación de proteínas	14
6.7 Muestras clínicas	15
6.8 ELISA indirecto para detectar anticuerpos IgG anti-dengue	16
6.9 <i>Western blot</i>	17
6.10 Análisis estadístico.....	18
7. RESULTADOS	19
7.1 Obtención del abasto viral	19
7.2 Determinación de proteínas	20
7.3 Detección de IgG anti-DENV por <i>Western blot</i>	21
8. DISCUSIÓN	35

9. CONCLUSIONES	43
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
Anexo 1: Preparación de reactivos y soluciones	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Distribución de <i>Ae. aegypti</i> en Mexico.....	2
Fig. 2. Estructura y genoma del virus del dengue.....	3
Fig.3. Respuesta de anticuerpos durante la infección primaria y secundaria por DENV.....	7
Fig. 4. Plan general de trabajo. Diagrama de flujo.....	12
Fig. 5. Células C6/36.....	19
Fig. 6. Titulación de DENV-1 por formación de placas líticas en células BHK-21	20
Fig. 7. Titulación de anticuerpos para Western-blot	21
Fig. 8. <i>Western blot</i> de muestras de dengue para detectar IgG's específicas contra DENV-2.....	22
Fig. 9. Respuesta de anticuerpos tipo IgG contra cada serotipo viral del dengue, determinada por <i>Western blot</i> , empleando muestras de pacientes con dengue	29
Fig. 10. Detección de IgG anti-DENV por <i>Western blot</i> para cada serotipo viral con muestras de suero de pacientes con dengue	30
Fig. 11. Respuesta de anticuerpos tipo IgG en las distintas fases del dengue contra las proteínas virales E y NS1 en pacientes enfermos y determinados por <i>Western blot</i>	31
Fig. 12. Reactividad cruzada hacia los cuatro serotipos del DENV, determinados por <i>Western blot</i> empleando muestras de pacientes con dengue	33
Fig. 13. Reactividad cruzada de los anticuerpos tipo IgG contra las proteínas virales de los cuatro serotipos del DENV	34

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Cantidad de proteína presente en los lisados celulares infectados con cada serotipo viral del DENV 20

Tabla 2. Resultados de ELISA y *Western blot* para la detección de anticuerpos IgG anti-DENV en muestras de suero de pacientes con dengue 23

Tabla 3. Resultados de ELISA y *Western blot* de detección de anticuerpos IgG anti-DENV en muestras de suero de pacientes con sintomatología similar a dengue..... 27

Tabla 4. Resultados de detección de IgG anti-DENV por *Western blot* para cada serotipo viral con muestras de pacientes con dengue..... 29

Tabla 5. Porcentaje de muestras que presentaron reactividad cruzada hacia uno o más serotipos del virus del dengue 32

Tabla 6. Resultados de ELISA y *Western blot* para muestras de dengue y control..... 34

ABREVIATURAS

AcMo	Anticuerpo monoclonal
ADE	Infección facilitada por anticuerpos (del inglés: <i>Antibody-dependent enhancement</i>)
BSA	Albumina sérica bovina (del inglés: <i>Bovine Serum Albumin</i>)
DAB	Diaminobencidina
DENV	Virus del Dengue (del inglés: <i>Dengue viruses</i>)
FD	Fiebre por dengue
FHD	Fiebre hemorrágica por dengue
SCD	Síndrome de choque por dengue
ECP	Efecto Citopático
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
hpi	Horas post-infección
IET	Inmunoelectrotransferencia
IFA	Inmunofluorescencia
MEM	Medio Esencial Mínimo (del inglés: <i>Minimum Essential Media</i>)
mNS1	Proteína No Estructural 1 asociada a la membrana (del inglés: <i>Membrane Associated Non Structural Protein 1</i>)
MOI	Multiplicidad de infección (del inglés: <i>Multiplicity of infection</i>)
MPM	Marcador de peso molecular
NS1	Proteína no estructural 1 (del inglés: <i>Non Structural Protein 1</i>)
RE	Retículo Endoplásmico
SFB	Suero fetal bovino
sNS1	Proteína No Estructural 1 secretada (del inglés: <i>Secreted Non Structural Protein 1 soluble</i>)

1. INTRODUCCIÓN

El Dengue es una enfermedad febril e infecciosa causada por alguno de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) y es transmitida al humano a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes*, siendo las especies principales *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Este padecimiento es común en regiones donde predominan climas tropicales y subtropicales, que cuentan con las condiciones ambientales para el desarrollo del vector y la transmisión del virus, de ahí que sea considerada como endémica en más de 100 países (Yábar, 2003).

Independientemente del serotipo infectante, el dengue puede presentarse como un padecimiento autolimitado o asintomático, por otra parte es común que se manifieste inespecíficamente como fiebre por dengue (FD), que se caracteriza por la presencia de fiebre, dolor retroocular, mialgias, artralgias, náuseas y vómito durante la primera semana de la infección. Sin embargo, algunos pacientes pueden presentar hemorragias generalizadas a consecuencia de una elevada permeabilidad vascular, el incremento del hematocrito, petequias y trombocitopenia, etapa a la que se le denomina fiebre hemorrágica por dengue (FHD). La forma más severa de la enfermedad se puede presentar debido a un desorden de la presión arterial como consecuencia de las hemorragias y falla multiorgánica, que comprometen seriamente la vida del paciente y a la que se le denomina síndrome de choque por dengue (SCD) (Halstead, 1980; Pérez, 2010). Hasta el momento, el tratamiento para el dengue es de soporte (balance hidroelectrolítico, oxigenación y transfusión de plaquetas) ya que no existe ningún fármaco antiviral específico para tratar esta enfermedad, así como una vacuna eficiente (Domingo-Carrasco y Gascón-Bustrenga, 2005; Lindenbach y cols., 2007).

Al considerarse al dengue como la infección viral en humanos más importante transmitida por artrópodos, actualmente es catalogada como un problema de salud pública a nivel mundial y se estima que alrededor de dos quintas partes de la población mundial están en riesgo de infección, lo que representa un número aproximado de 100 millones de personas infectadas por DENV

anualmente (WHO, 1997). En México, la presencia de la enfermedad está condicionada a la existencia del vector, el cual requiere de ambientes con elevada humedad, por lo que la enfermedad presenta un patrón anual-estacional, con picos en los meses de lluvia y estando presente prácticamente en todo el territorio nacional, tanto en poblaciones urbanas como rurales (figura 1) (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005).

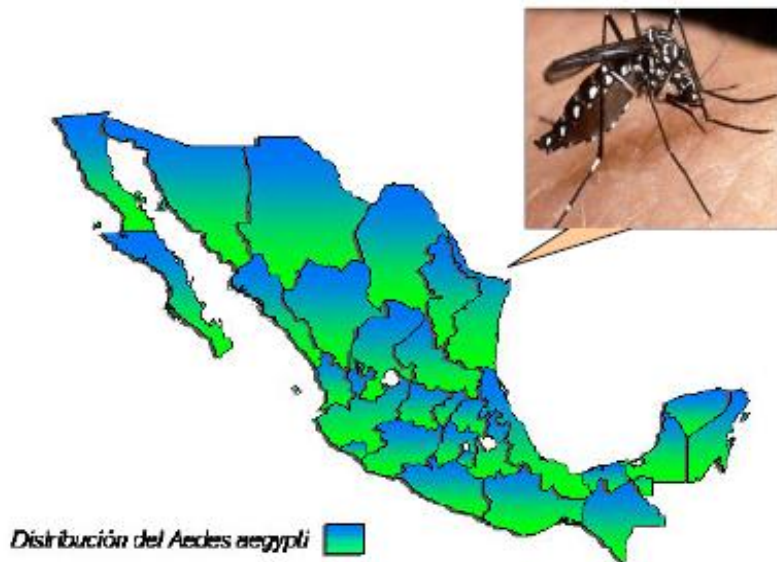


Fig. 1. Distribución de *Ae. aegypti* en México. (<http://www.cenavece.gob.mx/dengue>).

Según datos reportados por el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) de la Secretaría de Salud, en la semana 52 del año 2012 se confirmaron 50,368 casos de dengue, de los cuales, 32,662 correspondieron a FD y 17,706 a FHD, con 64 defunciones. Siendo Yucatán el estado de la República con mayor número de reportes (<http://www.cenavece.gob.mx/dengue>).

1.1 Agente etiológico

El DENV es un arbovirus del género *Flavivirus* y de la familia *Flaviviridae*. Se trata de un virus envuelto, de apariencia esférica y con un diámetro que varía entre 40 y 50 nm, presentando proyecciones superficiales que corresponden a las proteínas de envoltura y de membrana. Su genoma consta de una molécula de RNA monocatenario de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb que contiene un solo marco de lectura abierto, el cual codifica para una poliproteína que es procesada para dar lugar a diez proteínas individuales, de las cuales tres son estructurales (envoltura (E), membrana (M) y cápside (C)) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) que solo se manifiestan durante el proceso de replicación viral activa (Yábar, 2003; Lindenbach y cols., 2007) (figura 2).

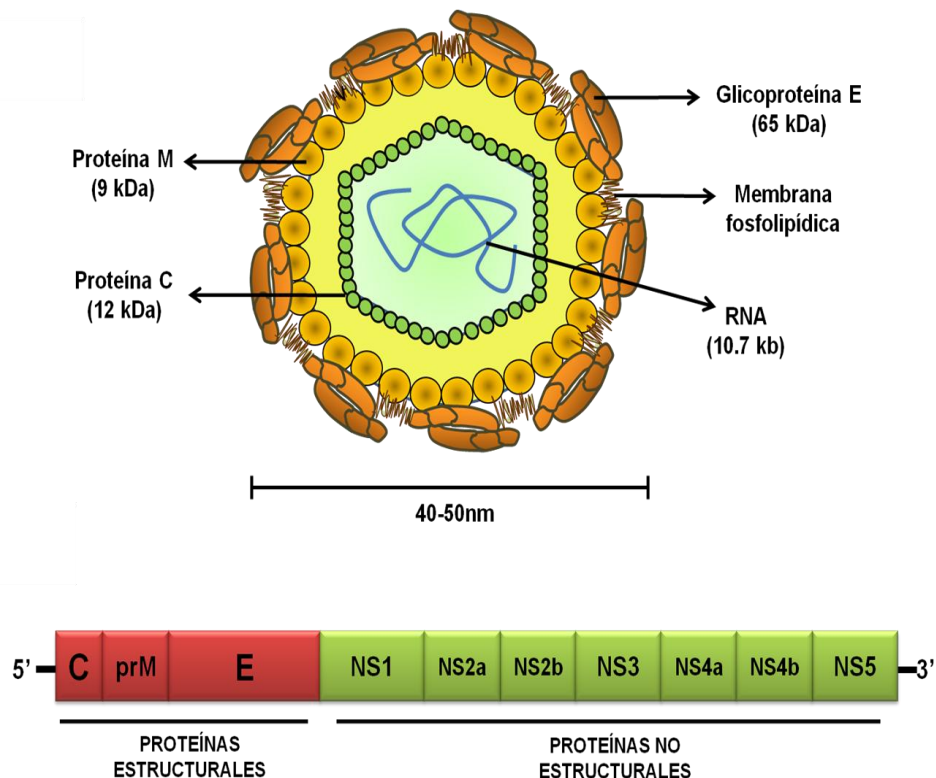


Fig. 2. Estructura y genoma del virus del dengue (Cortesía de la M. en C. Karina Ruiz Tovar).

1.2 Proteínas E y NS1 virales

Se ha descrito que las proteínas virales de mayor importancia en cuanto a la respuesta inmune del hospedero contra el DENV se refiere, son la E y la NS1, ya que se ha comprobado que éstas son los principales blancos de la inmunidad humoral que se desencadena contra el virus (Lindenbach y cols., 2007):

Proteína E

Es una glicoproteína de 65 kDa que posee 495 aminoácidos. Se sintetiza como una proteína de membrana tipo I, compuesta por tres dominios: dominio I, que presenta forma de β -barril; el dominio II, que se proyecta a lo largo de la superficie del virus entre las regiones transmembranales de las subunidades homodiméricas, en él encontramos también el péptido de fusión; y el dominio III, que es un objetivo importante de los anticuerpos neutralizantes; por estas razones la proteína E se considera el principal determinante antigénico de la partícula viral, además de ser la única proteína que interactúa con las moléculas receptoras de la membrana plasmática de las células vulnerables que favorecen la endocitosis del virus, esto se da mediante la unión al receptor y fusión viral con la célula hospedera durante el inicio de la replicación (Lindenbach y cols., 2007), y al ser expresada en la superficie de las células infectadas durante el mismo proceso (Lindenbach y Rice, 1999).

NS1

Es una glicoproteína de peso molecular comprendido entre 42 y 50 kDa conteniendo aproximadamente 353 aminoácidos, dependiendo del serotipo viral. Esta proteína es hidrofílica, carece de dominios transmembranales y la naturaleza de su asociación a la membrana celular sigue sin dilucidarse. Su estructura es generalmente dimérica y aunque su función aun no está caracterizada, ésta se asocia con el ensamblaje y maduración del virión y la

replicación del RNA viral ya que durante el proceso es indispensable como cofactor interactuando con la forma replicativa del mismo aunque está ausente en la partícula viral infecciosa, hecho que se da en diferentes flavivirus (Lindenbach y Rice, 1999). Se ha demostrado que participa en las primeras fases de la replicación viral de acuerdo con su retención en los organelos de la célula infectada y con su capacidad para interactuar con las membranas (Flamand y cols., 1999). Su función extracelular tampoco es clara, pero es otro de los principales blancos de la respuesta humoral (Yábar, 2003; Rojo y Delgado, 2004; Lindenbach y cols., 2007).

1.3 Estrategia de replicación viral

Tras la picadura del mosquito hembra infectado con DENV, éste libera partículas virales en el sitio de la inoculación (piel), donde las células de Langerhans, a través de la molécula DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin*) o CD209, interacciona con el virus, permitiendo su entrada a las células vía endocitosis mediada por receptor, al reconocerse sitios de glicosilación en el dominio III de la proteína E viral (Del Ángel y cols., 2006). Una vez dentro, la fusión de la membrana viral con la del endosoma inicia por una disminución en el pH que propicia un cambio conformacional en la proteína E, permitiendo así la liberación del genoma viral, iniciando así, la traducción de la poliproteína, que posteriormente es procesada en la membrana del retículo endoplásmico y para lo cual es necesaria la participación tanto de proteasas virales como de la célula del hospedero. (Mackenzie y Westaway, 2001; Rojo y Delgado, 2004; Clyde y cols., 2006; Lindenbach y cols., 2007).

La proteína NS5 funciona como RNA polimerasa viral, por lo que de inmediato se inicia la replicación mediante la generación de formas circulares del genoma viral que favorecen la unión de la RNA polimerasa. Posteriormente se inicia la síntesis de cadenas negativas de RNA (intermediario de replicación) que sirven como molde para la síntesis del RNA de polaridad positiva. El ensamblaje se lleva a cabo en la membrana del retículo endoplásmico, desde el cual las

partículas virales son transportadas al aparato de Golgi para su maduración y posterior liberación por exocitosis (Yábar, 2003; Clyde y cols., 2006).

Cabe señalar que algunos estudios han demostrado que durante el proceso de replicación, la proteína NS1 se sintetiza en la célula infectada como monómero soluble y rápidamente se dimeriza en el lumen del RE, posteriormente se transporta a la superficie de la célula (NS1 asociada a membrana {mNS1}) y se libera al medio extracelular como NS1 secretada (sNS) (Winkler y col., 1989). En el medio extracelular se registran altos niveles de proteína NS1 en forma hexamérica, debido a su secreción por las células hospederas acumulándose en grandes cantidades (hasta 50 µg/mL) en el suero de los pacientes (Libraty y col., 2002). También es posible encontrar proteína E diméricas en la superficie celular, por ello es que ambas proteínas se consideran los principales blancos de la respuesta inmune humoral (Flamand y cols., 1999), de ahí que sea fundamento para realizar diagnóstico de laboratorio mediante la detección de anticuerpos contra NS1 por ELISA o técnicas para la detección de anticuerpos dirigidos hacia ambas proteínas, como en el *Western blot*.

1.4 Respuesta inmune humoral en Dengue

Los anticuerpos se consideran el mecanismo más importante de protección en la infección por DENV, presentándose dos tipos de respuesta serológica: primaria y secundaria (Halstead, 2003). Durante la infección primaria tiene lugar un aumento lento y gradual de los anticuerpos de tipo IgM, que pueden ser detectados en más del 95 % de los casos a partir del cuarto día de la enfermedad y haciéndose indetectables al cabo de 30 días, encontrándose en mayores concentraciones que en infecciones secundarias (Cologna y Rico-Hesse, 2003; Karataa y cols, 2003). Los anticuerpos IgG, en cambio, se elevan lentamente a partir del quinto a sexto día del comienzo de los síntomas, los cuales son máximos hacia los 15 a 21 días, a diferencia de la infección primaria, en las infecciones secundarias se produce un incremento muy temprano de los anticuerpos y pueden detectarse elevados títulos a partir del

segundo día (figura 3) (Kourí y cols., 1983; Teles y cols., 2005; Wilder-Smith y Schwartz, 2005).

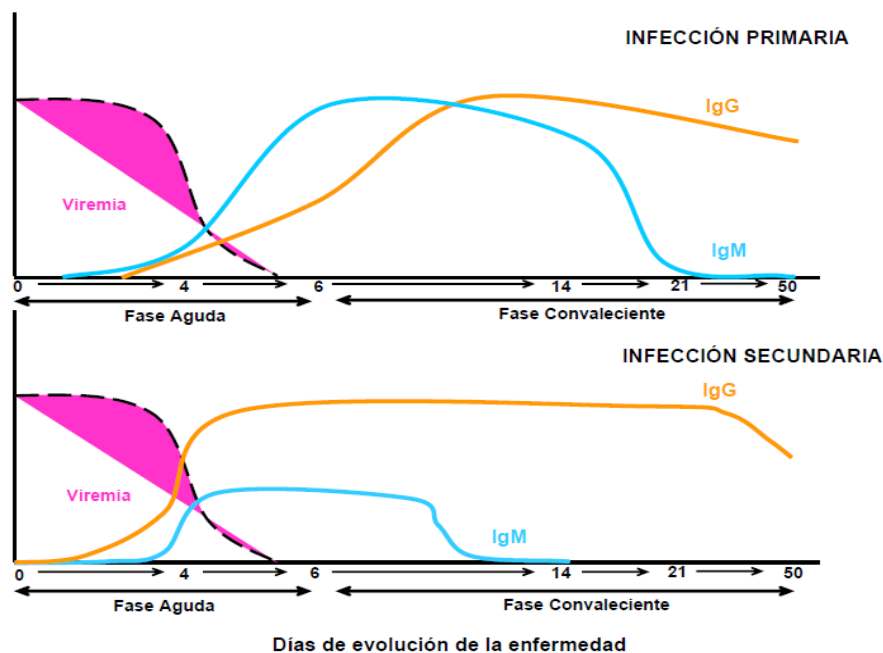


Fig.3. Respuesta de anticuerpos durante la infección primaria y secundaria por DENV. (Guzman y cols., 2010)

Lo anterior resume la respuesta de anticuerpos en pacientes que sufren una primoinfección, sin embargo, el hecho de que se formen complejos antígeno-anticuerpo durante el curso de una infección secundaria con serotipo distinto al que causó la primoinfección, son el principal factor de riesgo para sufrir FHD y sobre el cual recae el peso de desarrollar esta forma grave, por ello se ha propuesto el modelo de infección facilitada por anticuerpos (ADE, del inglés *Antibody Dependent Enhancement*) (Martina y cols., 2009). Este fenómeno se asocia comúnmente a la inmunopatogenia del dengue y se presenta con frecuencia en zonas endémicas donde circula más de un serotipo de DENV, estimulando y exacerbando la respuesta inmunitaria del paciente (Halstead, 2003). Este proceso se presenta durante la fase aguda de la infección, donde las partículas virales en circulación solo se replican específicamente en células B y en monocitos (Theofilopoulos y cols., 1976), ya que ambas células tienen receptores Fc lo que las convierte en blancos potenciales (Martina y cols., 2009).

Los anticuerpos producidos y dirigidos contra el serotipo de la primoinfección, reconocen y forman complejos con el segundo serotipo de virus causante de la reinfección, según ésta teoría, las cantidades subneutralizantes de inmunoglobulinas específicas del tipo IgG no protegen frente a un segundo serotipo y, por el contrario, al reaccionar con el segundo serotipo forman complejos virus-anticuerpo que facilitan la entrada del virus a la célula de linaje fagocito mononuclear a través de la unión del fragmento Fc de la inmunoglobulina y el FcR de la célula diana. Este mecanismo incrementa la proporción de células infectadas, la viremia y la capacidad de dispersión del virus en el organismo. Además, se estimula la activación de linfocitos y macrófagos, induciendo la liberación de citocinas y otros factores solubles que alteran, entre otros aspectos, la fisiología del tejido endotelial, promoviendo la extravasación y la formación de edemas, petequias y hemorragias (Cabezas, 2005; Heymann, 2009; Dejnirattisai y cols., 2010; Velandla y Castellanos, 2011).

Además del mecanismo descrito, los anticuerpos anti-DENV tienen reactividad cruzada con las plaquetas y células endoteliales en humanos y ratones (Falconar y Young, 1990; Lin y cols., 2006), mecanismo efector mediado por complemento, los anticuerpos de mayor importancia son aquellos dirigidos contra NS1, éstos reconocen un antígeno aún no identificado, homólogo a esta proteína y presente en la superficie del endotelio, lo anterior fue demostrado en pacientes con elevadas concentraciones plasmáticas de las proteínas C3 y C1q del complemento (Cabezas, 2005; Heymann, 2009; Velandla y Castellanos, 2011).

En la actualidad la relación entre los anticuerpos de tipo IgM e IgG se usan con mayor frecuencia para distinguir entre infecciones de tipo primarias y secundarias, y al ser tanto la proteína E como la NS1 blanco de respuesta de anticuerpos de tipo IgG, es que se analiza, su patrón de aparición durante la infección por dengue, por fenómenos de reactividad cruzada entre serotipos y por su influencia al potenciar la respuesta inmune lo que deriva en el desarrollo de la forma grave de la enfermedad.

1.5 Diagnóstico

El diagnóstico de laboratorio se basa en la detección tanto de antígenos virales y de anticuerpos específicos contra el virus en el suero de los pacientes con sospecha de la enfermedad. Entre las metodologías que se emplean se encuentra la detección de la proteína NS1 viral o de anticuerpos IgG por ELISA, al igual que del genoma viral por RT-PCR o el aislamiento del virus mediante la inoculación de la muestra en cultivos de células C6/36 y su posterior identificación por inmunofluorescencia (IFA), todas a partir del suero del paciente y durante los primeros 5 días después de la aparición de la fiebre. Si la muestra se toma en un tiempo posterior, se realiza la detección de anticuerpos de tipo IgM o IgG por ELISA (algoritmo vigente para el diagnóstico de dengue, disponible en línea a través de la página www.dgepi.salud.gob.mx).

2. JUSTIFICACIÓN

Durante la infección por DENV, el hospedero desarrolla una respuesta humoral dirigida principalmente contra las glicoproteínas E y NS1 virales y ya que se ha descrito que son antígenos serotipo-específico y principales blanco de la inmunidad humoral del hospedero, en este trabajo se pretende analizar la respuesta de anticuerpos IgG en pacientes con dengue, así como la reactividad cruzada que se puede dar entre los serotipos virales, hecho que da lugar al fenómeno de infección facilitada por anticuerpos (ADE).

3. HIPÓTESIS

Independientemente del serotipo viral infectante, los pacientes con dengue generan anticuerpos de tipo IgG contra las proteínas E y NS1 del DENV que son capaces de reconocer antígenos de serotipos heterólogos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la respuesta de anticuerpos de tipo IgG anti-proteína NS1 y anti-proteína E del DENV en sueros de pacientes con dengue mediante la prueba *Western blot*, y de manera conjunta determinar si es que existe reactividad cruzada entre los diferentes serotipos virales.

4.2 Objetivos particulares

1. Estandarizar un procedimiento de *Western blot* para la detección de anticuerpos IgG anti-proteína NS1 y anti-proteína E de los cuatro serotipos del DENV.
2. Analizar la respuesta de anticuerpos IgG contra las proteínas E y NS1 de los cuatro serotipos virales en sueros de pacientes con dengue mediante la técnica de *Western blot*.
3. Estudiar la reactividad cruzada existente entre serotipos virales para las muestras de los casos estudiados.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

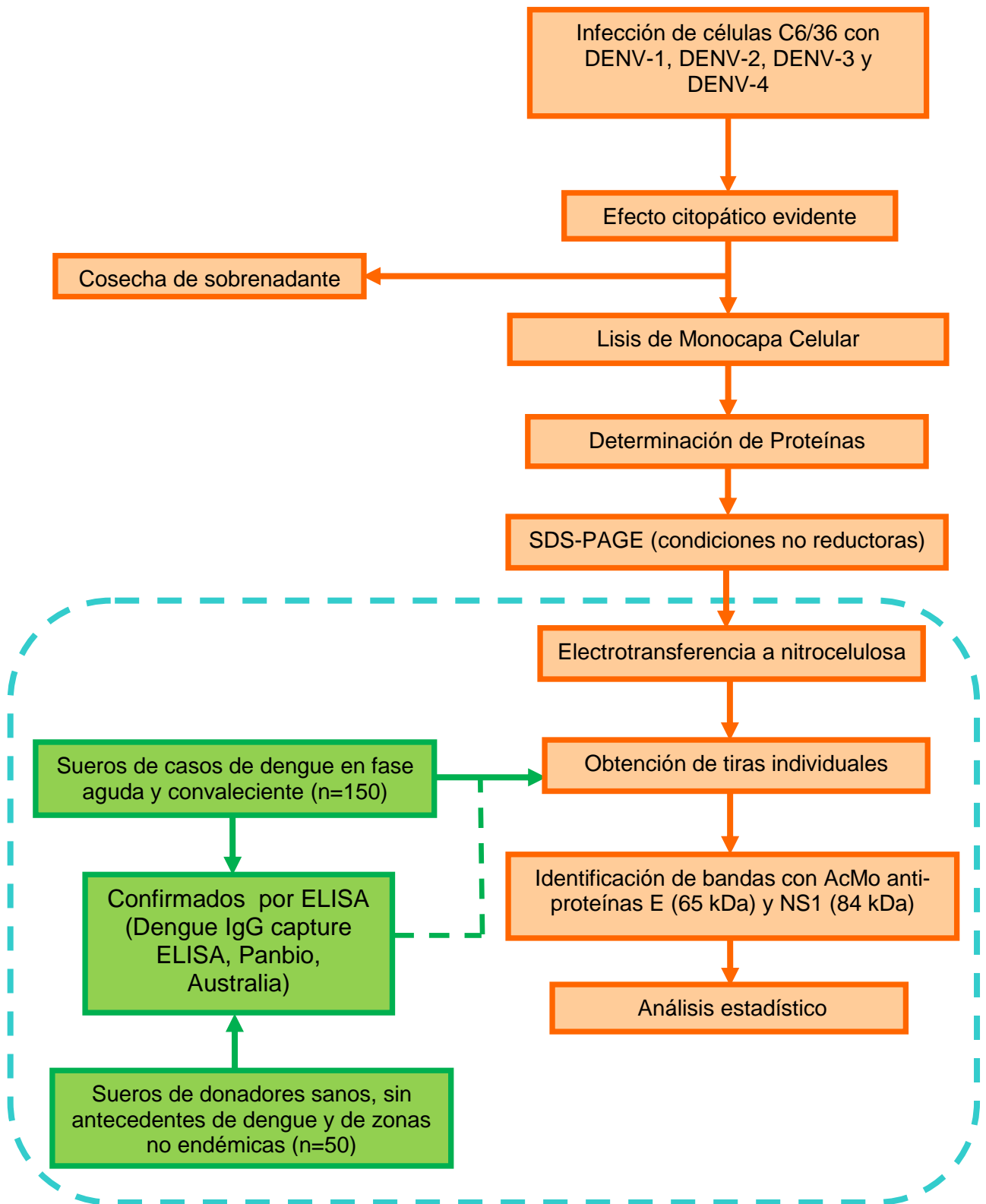


Fig. 4. Plan general de trabajo. Diagrama de flujo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Células C6/36

Para la obtención de antígeno viral se empleó la línea celular C6/36 (*Ae. albopictus*), la cual se propagó en medio MEM (Medio Mínimo Esencial, *GIBCO, Invitrogen, Camarillo CA, USA*) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, *GIBCO*) y para su mantenimiento se utilizó MEM con SFB al 2 %, en ambos casos con 1 % de aminoácidos no esenciales, vitaminas, L-glutamina y antibiótico-antimicótico (*GIBCO*). La línea celular se incubó en todo momento a 28 °C en atmósfera carente de CO₂.

6.2 Obtención de abasto viral

Se emplearon cepas de referencia de DENV-1 (Hawaii), DENV-3 (H87) y de DENV-4 (H241) y una cepa de DENV-2 aislada y caracterizada en el InDRE a partir de un caso de dengue clásico (Cam7786). Los virus se propagaron en cultivos de células C6/36 en condiciones de mantenimiento y se incubaron a 28 °C en atmósfera carente de CO₂ hasta que el efecto citopático fue evidente. Las células se cosecharon junto con el medio y se centrifugaron a 5000 xg durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se colectó y almacenó a -70 °C hasta su utilización.

6.3 Titulación viral por el método de formación de placas líticas

Cuando se contaba con suficiente abasto viral, se procedió a su cuantificación. Para ello se utilizó la técnica de formación de placas líticas en células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*), que consistió en preparar diluciones del virus e inocular cada una de ellas sobre una monocapa celular confluyente (150x10³ células) en placas de 24 pozos (*COSTAR, Corning Inc., NY, USA*), se incubó durante 2 horas y posteriormente el sistema se inmovilizó mediante la adición de un medio semisólido (MEM 2X-carboximetilcelulosa al 3 %) y se incubó durante 5 días. La visualización y conteo de las placas líticas se realizó por la adición del colorante naftol azul-negro al 0.1 % en agua destilada.

La dilución óptima del virus fue aquella en la que se contaron entre 10 y 100 placas líticas y el título viral se obtuvo usando la siguiente fórmula: (Número de placas)(dilución)(volumen) = Unidades formadoras de placa/mL (UFP/mL).

6.4 Infección de células C6/36

Se emplearon cultivos de células C6/36 con una confluencia de 70-80 % en botellas de 25 cm². Posteriormente se descartó el medio contenido en las botellas y se adicionaron 5 mL de MEM de mantenimiento, se inoculó el virus a una MOI (*Multiplicity of infection*, que se define como la cantidad de virus inoculado por célula de cultivo celular) de 1 (que se entiende como una partícula de virus por cada célula) y el sistema se incubó a 28 °C en atmósfera carente de CO₂ hasta que el efecto citopático fue evidente.

6.5 Obtención de antígeno

A los cultivos de células C6/36 infectadas se les retiró el sobrenadante y la monocapa celular se lavó con PBS (solución amortiguadora de fosfatos) pH 7.4 procurando no dañarla, el lavado fue descartado. Posteriormente se adicionaron 5 mL de *buffer* de lisis (75 µmol/L KCl, 1 % de Tritón 100 X, 0.2 mmol/L de inhibidores de proteasas [*Complete, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania*]) y la botella fue colocada sobre baño de hielo con agitación suave durante 30 min o hasta el desprendimiento total de la monocapa. El lisado celular fue transferido a microtubos y se centrifugó a 14,000 xg durante 10 min a 4 °C para después cosechar el sobrenadante y guardarlo en fracciones de 1 mL a -20 °C hasta la cuantificación de proteínas.

6.6 Determinación de proteínas

La cuantificación de proteínas fue realizada por el método de *Lowry*, para lo cual se preparó y siguió el sistema que se muestra a continuación:

- Solución A.
 - 50 mL de Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0.1 N.
 - 0.5 mL de Tartrato de Sodio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) al 2 %.
 - 0.5 mL CuSO_4 al 1 %.
- Solución B.
 - Reactivo de Folin – Ciocalteu (comercial) dilución 1:2.
- Estándar de albúmina sérica bovina (BSA) a 0.2 mg/mL.

	Tubo								
Reactivo	0	1	2	3	4	5	6	7	Problema
$\mu\text{L H}_2\text{O}$	1000	975	950	900	800	600	500	---	---
$\mu\text{L BSA (0.2 mg/mL)}$	---	25	50	100	200	400	500	1000	---
$\mu\text{L Problema}$	---	---	---	---	---	---	---	---	1000
mL Sol. A.*	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Mezclar y dejar reposar 10 minutos									
$\mu\text{L Sol. B.}^a$	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Mezclar y dejar reposar 30 minutos a 1 hora									
Leer a 500 – 550 nm (λ)									

*La solución A es estable un día. Al realizar la elaboración de la solución de Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0.1 N, es de suma importancia que la adición de reactivos sea en el orden señalado.

^a Esta debe ser preparada en el instante y debe protegerse de la luz.

6.7 Muestras clínicas

Se utilizaron 150 muestras de suero de pacientes en fase aguda y convaleciente con sintomatología típica de dengue, provenientes de brotes ocurridos durante el año 2010 y las cuales fueron analizadas para anticuerpos IgG anti-dengue por ELISA indirecta (*Panbio Dengue IgG Indirect ELISA*, Panbio, Australia). Las muestras fueron proporcionadas por la Sección de Virología del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Veracruz (LESPVer), siendo incluidas, aquellas estériles, sin hemólisis y no lipémicas.

Como control se procesaron 50 muestras de donadores sanos, de zonas no endémicas y sin antecedentes de haber padecido dengue. Todas las muestras fueron conservadas a 4 °C desde el momento de su obtención.

6.8 ELISA indirecto para detectar anticuerpos IgG anti-dengue

Para la determinación de anticuerpos IgG anti-dengue en muestras de suero, se utilizó el equipo comercial *Panbio Dengue IgG Indirect ELISA*, Panbio, Australia, el procedimiento se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante: las placas de 96 pozos estaban sensibilizadas con una mezcla de antígenos de los 4 serotipos del virus del Dengue. En los micropocillos se colocaron 100 µL de la muestra de suero de paciente diluido (10 µL de suero de paciente en 1000 µL de diluyente de muestra), controles o calibradores, la placa se incubó durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se lavó con solución de lavado (Tris-NaCl, 1 % Tween 20) y se adicionaron 100 µL de anti-IgG conjugada con HRP en cada pocillo, la placa se incubó durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se lavó 6 veces con solución de lavado (Tris-NaCl, 1% Tween 20) y se adicionaron 100 µL de solución de revelado (0.015% de una mezcla de 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en tampón citrato-ácido cítrico), se incubó durante 10 min a temperatura ambiente (20 °C), cronometrando desde la primera adición y finalmente se adicionaron 100 µL de solución de paro (H_3PO_4 1 M). La placa se leyó 30 minutos después de haber detenido la reacción en un lector de microplacas Multiskan® Plus (Labsystems, Vantaa, Finlandia) a 450nm y con las densidades ópticas (DO) obtenidas, se calculó el valor del punto de corte (CO) que corresponde al valor medio de las DO de los triplicados del Calibrador por el factor de calibración. También se calculó el valor índice dividiendo la absorbancia de la muestra entre el punto de corte y posteriormente este índice fue multiplicado por 10 para expresar los datos en unidades Panbio y así obtener el resultado para la muestra.

6.9 Western blot

Se elaboraron geles de poliacrilamida al 10 % y se cargaron con 0.2 mg de proteínas totales provenientes de los lisados celulares en condiciones no reductoras y se procedió a realizar una electroforesis a 110 V. Los geles se elaboraron como se muestra en las siguientes tablas:

Componentes del gel separador	Cantidad para 10 mL (2 geles de 8 x 10 cm)
Agua destilada	4 mL
Acrilamida 30 % - bisacrilamida 0.8 %	3.3 mL
Regulador del gel de separación, Tris – Base 2 M, pH 8.8.	2.5 mL
SDS 10 %	100 µL
APS 10 %	100 µL
TEMED	8 µL

Componentes del gel concentrador	Cantidad para 2 mL (2 geles)
Agua destilada	2.8 mL
Acrilamida 30 % - bisacrilamida 0.8 %	660 µL
Regulador del gel concentrador, Tris – HCl 2 M, pH 6.8.	500 µL
SDS 10 %	40 µL
APS 10 %	40 µL
TEMED	6 µL

Posteriormente se realizó la inmunoelectrotransferencia a membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.22 µm durante 1 h a 100 V. Para corroborar la transferencia se comprobó la presencia de los marcadores de peso molecular en la membrana y además esta se tiñó con Rojo de Ponceau S

(*Sigma-Aldrich*, St. Louis MO, EUA) para detectar las bandas de las proteínas transferidas y posteriormente se destiñó con lavados exhaustivos de agua bidestilada.

Una vez lavada la membrana se bloqueó durante 2 h con PBS-Tween 20 al 0.05 %-leche descremada al 5 % (regulador de bloqueo) a temperatura ambiente (20 °C) y con agitación constante, después se realizaron cinco lavados con PBS-Tween 20 al 0.05 % y se cortaron tiras de 3 mm de ancho. De manera independiente, a las tiras se les adicionaron 500 µL de los sueros a una dilución 1:100, se dejaron incubar durante 1 h a temperatura ambiente (20 °C) y con agitación constante. Posteriormente se realizaron cinco lavados con PBS-Tween 20 al 0.05 % y se adicionó el conjugado anti-IgG humana-Peroxidasa (*Jackson, ImmunoResearch*) a una dilución 1:7000, se incubó 1 h a temperatura ambiente (20 °C) y se lavó cinco veces con PBS-Tween 20 al 0.05 %. Finalmente se adicionaron 500 µL de la solución de revelado Tris–Base 0.05 M, pH 7.4, H₂O₂ 30 %, 5 mg de Diaminobencidina (DAB)] y se incubó a temperatura ambiente (20 °C) hasta la aparición de bandas (al menos en el control positivo). La reacción de revelado se detuvo mediante la adición de agua bidestilada, el sobrenadante se desechó y las tiras se dejaron secar para su interpretación. Como control positivo se emplearon anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-proteína NS1 dilución 1:1500 (*Abcam*, Inglaterra) y anti-proteína E dilución 1:50 (ATCC, clona 3H5) del virus del dengue en ambos casos se adicionó un conjugado anti-ratón IgG total, dilución 1:500 y un revelador para evidenciar la reacción en las tiras control.

6.10 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el programa MedCalc® versión 11-3-0.0 (2010) y con el programa *Prism 5* (*GraphPad*, 2007).

7. RESULTADOS

7.1 Obtención del abasto viral

Como primer paso fue indispensable obtener un abasto de todas las cepas de DENV, esto se realizó mediante su propagación en células C6/36 hasta que el efecto citopático fue evidente (figura 5) el cual se caracterizó, por la formación de sincicios, observándose el redondeamiento, aumento de tamaño celular y células multinucleadas, que conllevó al desprendimiento y la destrucción de la monocapa.

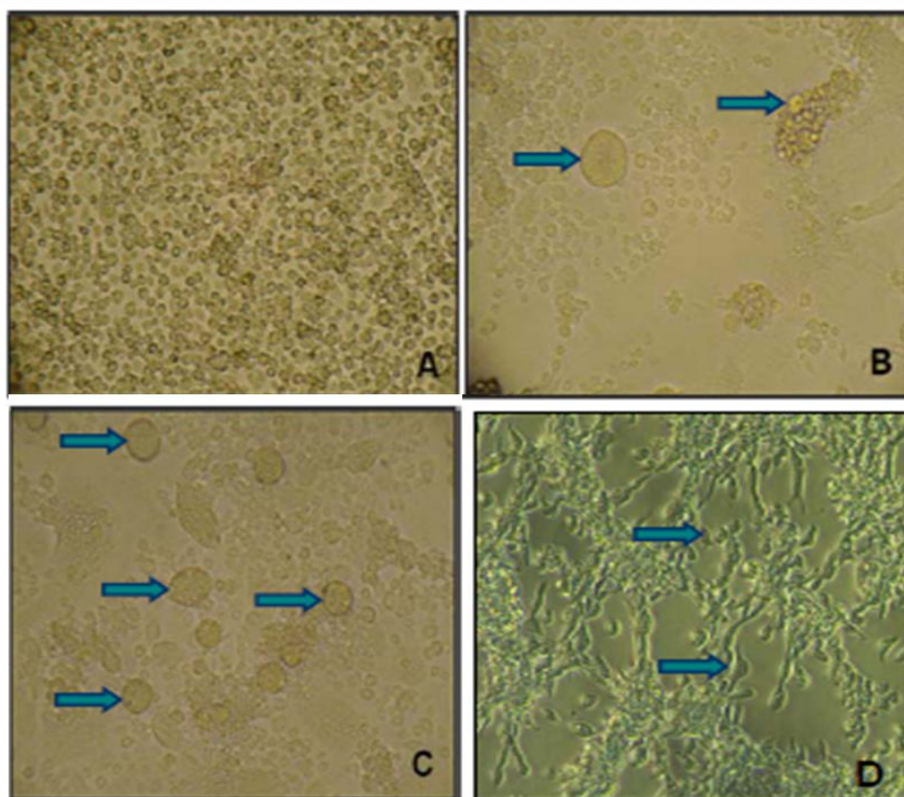


Fig. 5. Células C6/36: (A) sin infección, (B) infectadas con DENV-2 a las 72 hpi, (C) infectadas con DENV-1 a las 72 hpi y (D) infectadas con DENV-3 a las 96 hpi, 10x. Las flechas indican el efecto citopático.

El virus fue cuantificado por el método de formación de placas líticas sobre células BHK-21 (figura 6) y el título obtenido fue de 1.6×10^6 , 3.6×10^6 , 6×10^5 y 1.2×10^4 UFP/mL para DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, respectivamente.

Lo anterior se realizó con el objetivo de garantizar la infección de los cultivos celulares, así como para conocer la cantidad de inóculo con la cual fue infectada la monocapa celular.

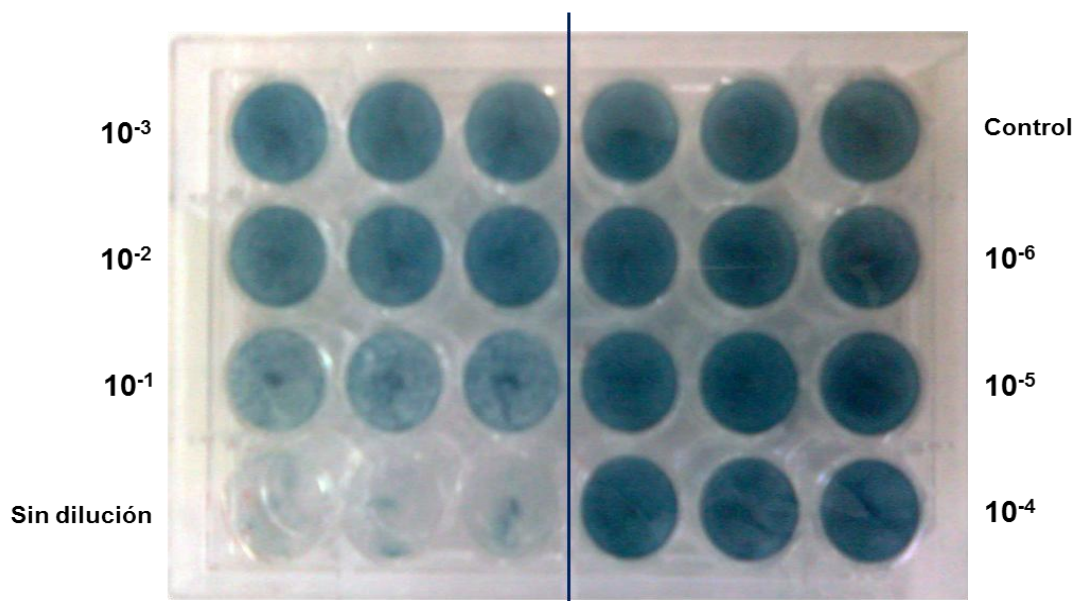


Fig. 6. Titulación de DENV-1 por formación de placas líticas en células BHK-21. El virus se probó a diferentes diluciones (10^{-1} - 10^{-6}) por triplicado y como control negativo se utilizó sobrenadante de células sin infección.

7.2 Determinación de proteínas

Una vez que se contó con suficiente lisado celular de los cuatro serotipos virales, se procedió a cuantificar las proteínas provenientes de la infección, con la finalidad de tener en todos los sistemas la misma concentración de proteína proveniente de la infección, el resultado de las determinaciones fue el siguiente (tabla 1):

Tabla 1. Cantidad de proteína presente en los lisados celulares infectados con cada serotipo viral del DENV.

	Concentración de proteína (mg/mL)
DENV-1	0.58
DENV-2	0.52
DENV-3	0.50
DENV-4	0.49

7.3 Detección de IgG anti-DENV por *Western blot*

Como parte de la estandarización del *Western-blot*, se llevó a cabo la titulación de los AcMo que se emplearon tanto para la detección de los antígenos E y NS1 virales como del conjugado anti-IgG humana, obteniendo que el AcMo anti-NS1 se emplearía a una dilución de 1:1,500, el anti-E a la dilución 1:50 y el conjugado anti-IgG a una dilución 1:7,000 (figura 7), ya que esta dilución no fue realizada durante el proceso de titulación del anticuerpo el criterio para elegirla consistió en tomarla como punto medio entre las diluciones 1:5,000 y 1:10,000, teniendo como referencia la intensidad del bandeo observada en las tiras correspondientes a éstas diluciones, este hecho fue corroborado al emplear la dilución en las muestras de pacientes lo cual permitió distinguir entre aquellas que eran positivas de las que no lo eran, otra razón por la cual se empleó fue economizar el reactivo para realizar todas las determinaciones de las muestras problema y controles.

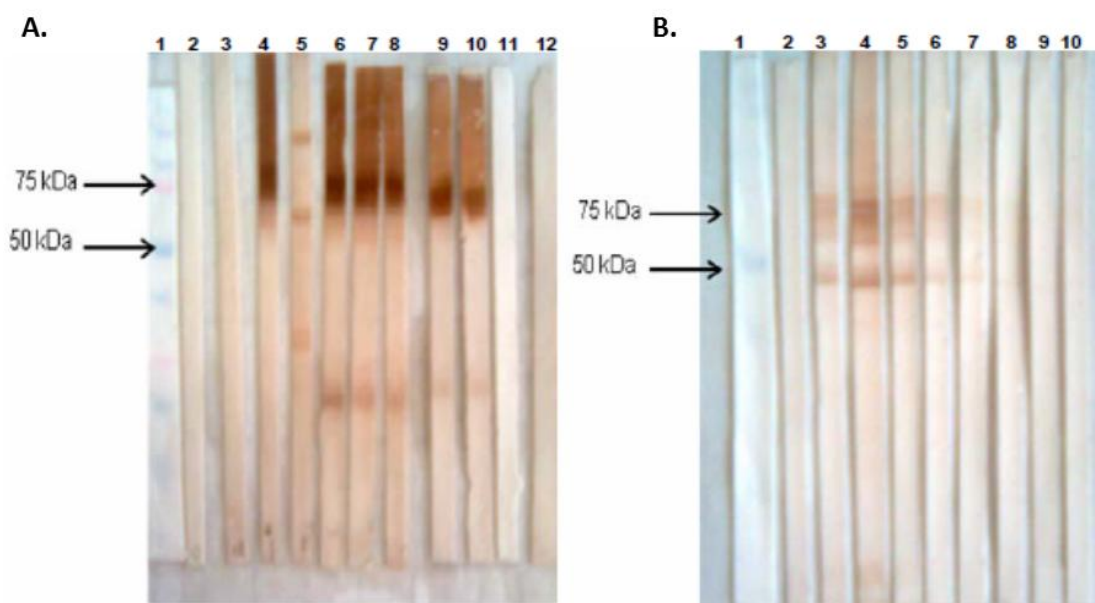


Fig. 7. Titulación de anticuerpos para *Western-blot*. **A:** Titulación de AcMo anti-NS1 y anti-E. (1) MPM, (2) Control de reacción, (3) Control conjugado, (4) anti-NS1 1:1500, (5) anti-E 1:50, (6) anti-NS1 1:200, (7) anti-NS1 1:400, (8) anti-NS1 1:800, (9) anti-NS1 1:1,000, (10) anti-NS1 1:1,500, (11) Control de reacción, (12) Control conjugado. **B:** Titulación de conjugado anti-IgG humana-Peroxidasa (hu-HRP). (1) MPM, (2) Control negativo, (3) Control positivo de reacción, (4) anti-IgG-hu-HRP 1:5,000, (5) anti-IgG-hu-HRP 1:10,000, (6) anti-IgG-hu-HRP 1:20,000, (7) anti-IgG-hu-HRP 1:40,000, (8) anti-IgG-hu-HRP 1:80,000, (9) anti-IgG-hu-HRP 1:160,000, (10) anti-IgG-hu-HRP 1:100,000.

Una vez que se estandarizaron las condiciones de detección de las proteínas E y NS1 virales, se procesaron las muestras de suero de los pacientes, para detectar anticuerpos de tipo IgG anti-NS1 y anti-E en pacientes que cursaban la fase aguda o convaleciente de dengue para uno o los cuatro serotipos existentes mediante *Western-blot* (figura 8). Se observaron bandas correspondientes al reconocimiento de los antígenos NS1 y E, que se encontraron cerca de los pesos moleculares reportados, 84 kDa para la forma dimérica de la proteína NS1 y 64kDa para monómeros de proteína E. Cabe destacar que las 150 muestras que se indicaron así como los controles, fueron analizadas para anticuerpos IgG anti-dengue por ELISA indirecta, de las muestras con sintomatología similar a dengue, solo 119 presentaron resultado positivo para anticuerpos de tipo IgG, por ello únicamente éstas fueron consideradas para realizar el tratamiento y análisis de resultados correspondiente. Se resalta que no todos los sueros presuntivos para dengue mostraron respuesta de anticuerpos IgG hacia ambos antígenos virales, algunos sólo fueron positivos para alguno de los dos (tabla 2) o negativos para ambos.

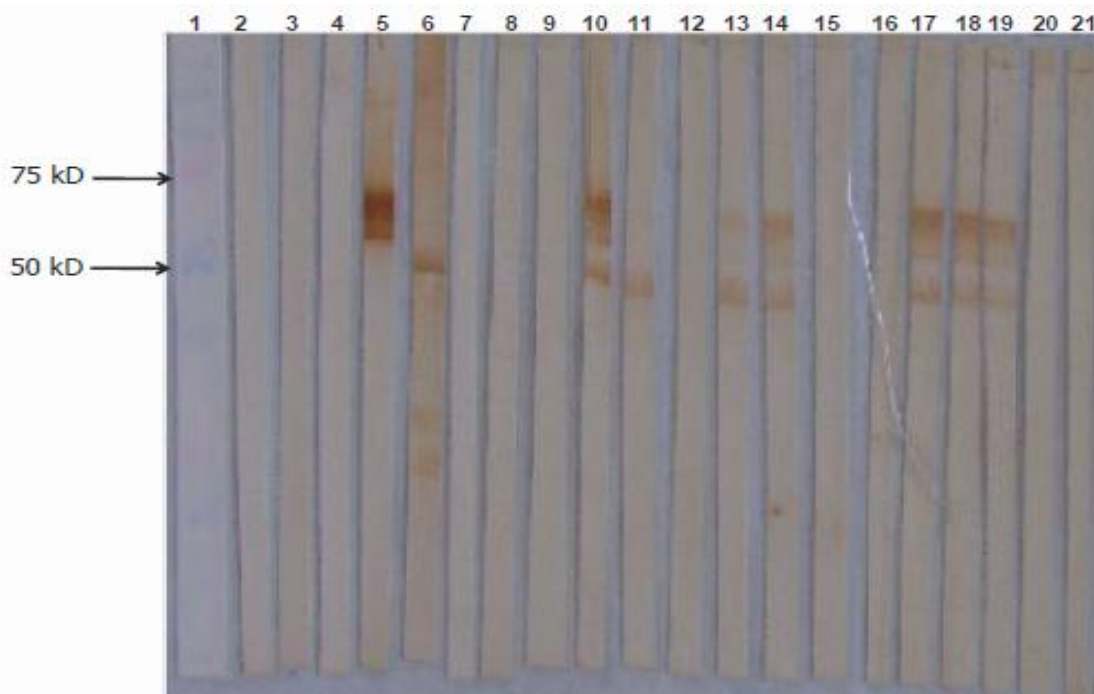


Fig. 8. *Western blot* de muestras de dengue para detectar IgG's específicas contra DENV-2. (1) MPM, (2) Control de reacción, (3) Control de anticuerpos primarios, (4) Control de conjugado, (5) Control positivo anti-NS1, (6) Control positivo anti-E, (7) Control negativo, (8-21) Muestras de pacientes.

Tabla 2. Resultados de ELISA y *Western blot* para la detección de anticuerpos IgG anti-DENV en muestras de suero de pacientes con dengue.

Muestra	Evolución (días)	ELISA (IgG)	<i>Western blot</i> (IgG anti-)								
			DENV-1		DENV-2		DENV-3		DENV-4		
			NS1	E	NS1	E	NS1	E	NS1	E	
2217	0 – 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2242		+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
2267		+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
2297		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2339		+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
3177		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1687	6 – 11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1743		+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
1777		+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
1825		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1835		+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
1842		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
1953		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1975		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
1997		+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
2005		+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
2006		+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
2012		+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2032		+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
2046		+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
2047		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2048		+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2052		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2084		+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
2098		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2099		+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
2102	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
2103	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	
2111	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
2112	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
2113	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	

Tabla 2. Continuación.

Muestra	Evolución (días)	ELISA (IgG)	Western blot (IgG anti-)							
			DENV-1		DENV-2		DENV-3		DENV-4	
			NS1	E	NS1	E	NS1	E	NS1	E
2149	6 - 11	+	+	+	+	+	+	-	+	+
2150		+	+	-	+	-	+	+	+	+
2151		+	+	-	+	-	+	+	-	+
2152		+	-	-	-	-	-	-	-	-
2159		+	+	-	+	-	-	-	-	-
2162		+	+	+	-	+	-	-	+	+
2165		+	+	-	-	-	-	-	+	-
2173		+	+	+	+	+	+	-	+	+
2194		+	+	+	+	+	+	-	+	+
2198		+	+	+	+	+	+	-	+	+
2200		+	-	-	-	-	+	-	+	+
2205		+	+	+	+	-	+	-	+	+
2214		+	-	-	+	+	+	-	+	+
2221		+	+	+	+	+	-	-	+	+
2226		+	+	+	-	-	-	-	-	-
2241		+	+	+	+	+	+	-	+	+
2243		+	-	+	+	+	+	+	-	-
2245		+	+	-	+	-	-	-	+	-
2249		+	+	+	+	+	+	-	+	+
2250		+	+	+	+	+	+	-	-	-
2252		+	+	+	+	+	+	+	+	+
2263		+	+	+	+	+	+	-	+	+
2271		+	+	+	+	+	+	-	+	+
2279		+	+	+	+	+	+	+	+	+
2280		+	+	+	+	+	+	-	+	+
2281		+	+	-	+	+	-	-	+	+
2283		+	+	-	-	-	-	-	-	-
2284		+	+	+	+	+	+	-	+	+
2295		+	+	+	+	+	+	+	-	-
2300		+	+	+	+	+	-	-	+	+
2310		+	-	+	-	+	-	-	+	+
2312	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
2313	+	+	-	+	+	+	-	-	+	
2316	+	+	+	+	+	+	-	+	+	

Tabla 2. Continuación.

Muestra	Evolución (días)	ELISA (IgG)	Western blot (IgG anti-)							
			DENV-1		DENV-2		DENV-3		DENV-4	
			NS1	E	NS1	E	NS1	E	NS1	E
2318	6 – 11	+	-	-	+	+	+	-	+	+
2320		+	+	+	+	+	+	+	+	+
2321		+	+	-	+	+	-	-	-	-
2322		+	+	+	+	+	+	+	+	+
2326		+	+	-	+	+	+	+	+	+
2327		+	+	+	+	+	-	-	+	+
2334		+	-	-	-	+	-	-	-	+
36	> 11	+	-	+	+	+	+	-	-	-
39		+	+	+	+	+	+	+	-	-
71		+	-	+	+	+	+	-	-	-
130		+	+	-	+	+	+	-	+	-
131		+	+	+	+	+	+	-	-	+
147		+	+	-	+	-	+	-	+	-
645		+	+	+	+	+	-	-	+	-
747		+	-	-	-	-	-	-	-	-
802		+	+	+	+	+	+	+	+	-
804		+	-	+	+	+	+	+	+	+
819		+	+	-	+	+	+	-	+	+
850		+	-	-	-	-	-	-	-	-
857		+	-	+	+	+	-	-	-	+
877		+	+	+	+	+	+	+	+	+
956		+	+	+	+	+	+	-	-	-
990		+	+	+	+	+	-	-	+	+
1028		+	+	+	+	+	+	-	-	-
1058		+	+	-	+	+	+	+	+	+
1078		+	-	-	-	-	-	-	-	-
1095		+	+	-	+	-	+	+	+	+
1219	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
1271	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
1299	+	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabla 2. Continuación.

Muestra	Evolución (días)	ELISA (IgG)	Western blot (IgG anti-)							
			DENV-1		DENV-2		DENV-3		DENV-4	
			NS1	E	NS1	E	NS1	E	NS1	E
1312	> 11	+	-	+	+	+	-	-	-	-
1453		+	-	+	+	+	+	+	+	+
1506		+	+	+	+	+	+	-	+	-
1533		+	-	-	+	-	-	-	-	-
1576		+	+	+	+	+	-	-	-	-
1582		+	+	+	+	+	+	-	-	-
1597		+	-	-	-	-	-	-	-	-
1661		+	+	+	+	+	+	+	+	+
1663		+	+	-	+	+	-	-	+	-
1680		+	-	+	+	+	+	-	+	-
1739		+	-	-	+	-	+	-	-	-
1742		+	+	+	+	+	-	-	-	-
1746		+	-	+	+	+	-	-	+	-
1747		+	-	+	+	+	+	-	+	+
1846		+	-	-	+	+	-	-	-	-
1917		+	+	-	+	+	+	-	+	+
1954		+	+	+	+	+	-	-	+	+
1998		+	+	+	+	+	+	-	-	-
2000		+	-	+	+	+	+	-	-	+
2008		+	-	-	+	+	+	-	+	+
2153		+	+	-	+	+	+	-	+	+
2211	+	-	-	+	+	-	-	+	+	
2239	+	+	-	+	+	+	-	-	+	
2311	+	+	+	+	+	+	-	+	+	

*Fase aguda: 0 – 5 días.

Fase convaleciente temprana: 6 – 11 días.

Fase convaleciente tardía: > 11 días.

La tabla anterior muestra en su contenido los datos a partir de los cuales se realizaron tanto el tratamiento como el análisis de los mismos, entre ellos están que, solo 119 de las 150 muestras de pacientes con sintomatología similar a dengue fueron procesadas y tomadas en cuenta por su resultado positivo al

ELISA indirecta para IgG considerando a esta última como referencia para conocer las muestras de pacientes enfermos, hecho que se pudo constatar al ser analizadas por *Western – blot*, la cual permitió tanto confirmar el resultado del ELISA como es analizar la reactividad cruzada entre serotipos para este estudio. Las muestras con resultado negativo (n = 31) para ELISA se tomaron en cuenta para conocer si esta era capaz de detectar aquellos casos que a pesar de presentar sintomatología similar a dengue no se encontraban enfermos (tabla 3), además en las tablas se puede observar como se clasificaron las muestras, de acuerdo a la evolución en días de las fases de la enfermedad, esta fue establecida por el laboratorio a la toma de muestra, indicando que el día cero correspondió a la aparición de la sintomatología de la enfermedad (inicio de la fiebre).

Tabla 3. Resultados de ELISA y *Western blot* de detección de anticuerpos IgG anti-DENV en muestras de suero de pacientes con sintomatología similar a dengue.

Muestra	Evolución (días)	ELISA (IgG)	<i>Western blot</i> (IgG anti-)							
			DENV-1		DENV-2		DENV-3		DENV-4	
			NS1	E	NS1	E	NS1	E	NS1	E
114	0 – 5	-	-	+	-	-	-	-	-	-
468		-	-	-	-	-	-	-	-	
774		-	+	+	+	+	+	-	-	
1598		-	+	-	-	+	+	+	+	
1790		-	-	-	-	-	-	-	+	
1893		-	+	+	+	+	+	-	-	
1946		-	-	-	-	-	-	-	-	
2184		-	-	-	-	-	-	-	-	
2275		-	-	-	-	-	+	-	+	
875			-	-	-	-	-	-	-	-
1085	-		+	-	-	+	+	-	+	
1988	-		-	+	-	-	-	-	-	
2002	-		-	-	-	-	-	-	-	
2045	-		+	-	-	-	+	-	-	
2157	-		-	+	-	-	-	-	-	
2160	-		-	-	-	-	-	-	-	
2164	-		-	+	-	-	-	+	-	

Tabla 3. Continuación.

Muestra	Evolución (días)	ELISA (IgG)	Western blot (IgG anti-)							
			DENV-1		DENV-2		DENV-3		DENV-4	
			NS1	E	NS1	E	NS1	E	NS1	E
2246	6 – 11	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2298		-	+	-	+	+	+	-	+	+
2317		-	-	-	+	+	+	-	+	+
73	> 11	-	-	-	-	-	-	-	-	+
368		-	-	+	-	-	-	-	-	-
407		-	-	+	-	-	+	-	-	-
513		-	-	+	-	+	+	-	-	-
722		-	-	-	-	-	-	-	-	-
968		-	-	-	-	-	-	-	-	-
1048		-	-	+	-	-	-	-	-	-
1879		-	+	-	-	-	-	-	-	-
1985		-	+	+	-	+	-	-	-	-
2050		-	-	-	-	-	+	+	-	-
2116		-	-	-	-	-	-	-	-	-
2118		-	-	-	-	-	-	-	-	-
2120		-	-	-	-	-	-	-	-	+
2209	-	-	-	-	-	-	-	-	+	

Con base a los resultados anteriores en la figura 9 se observa un mayor reconocimiento antigénico contra la partícula viral del serotipo 2 del dengue virus que contra los antígenos de los otros serotipos virales.

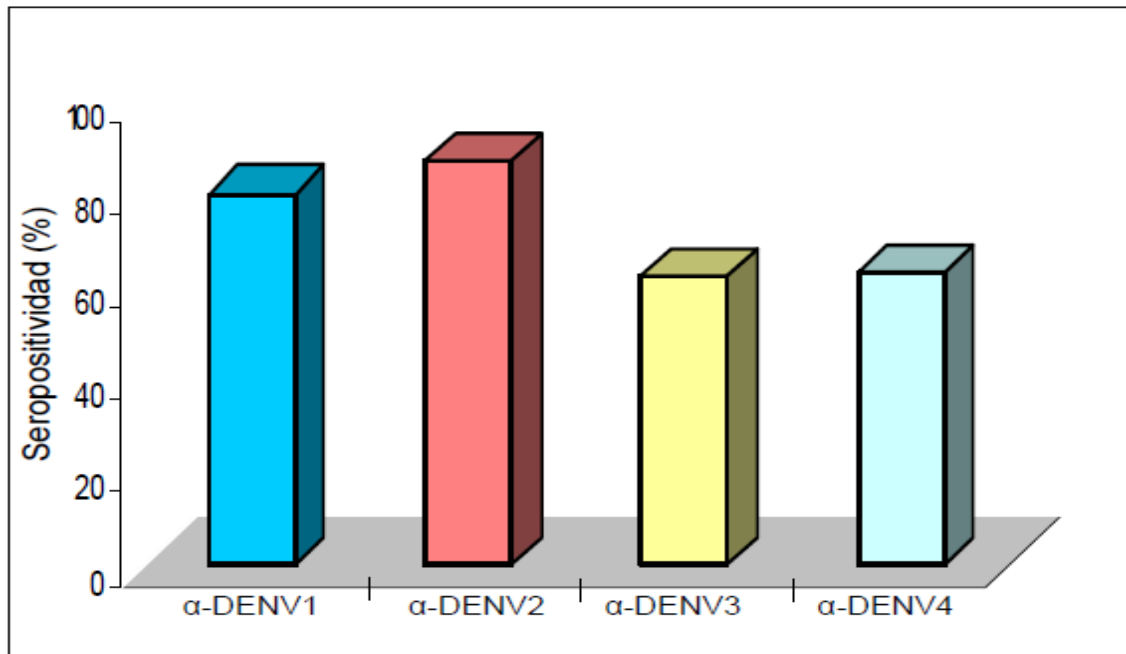


Fig. 9. Respuesta de anticuerpos tipo IgG contra cada serotipo viral del dengue, determinada por *Western blot*, empleando muestras de pacientes con dengue (n=119).

Con los datos que arrojó el estudio ya tratados se realizó el análisis del reconocimiento de los antígenos virales de interés (la proteína NS1 y la proteína E) para cada serotipo viral, resultados que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de detección de IgG anti-DENV por *Western blot* para cada serotipo viral con muestras de pacientes con dengue (n=119).

	<i>Western blot</i>	Positivos	Negativos
Serotipo 1	<i>NS1</i>	80	39
	<i>E</i>	67	52
	<i>E - NS1</i>	51	23
Serotipo 2	<i>NS1</i>	99	20
	<i>E</i>	90	29
	<i>E - NS1</i>	86	16
Serotipo 3	<i>NS1</i>	73	46
	<i>E</i>	25	94
	<i>E - NS1</i>	24	45
Serotipo 4	<i>NS1</i>	68	51
	<i>E</i>	62	57
	<i>E - NS1</i>	54	43

En la tabla anterior se muestra la presencia de anticuerpos hacia ambos antígenos virales para cualquier serotipo del virus del Dengue, con la finalidad de analizar cual es el posible patrón de respuesta durante el curso de la infección por DENV. En la figura 10, se corrobora la evidente seropositividad para el DENV-2 y con ello, se observó de manera más clara que estos pacientes montaron una mayor respuesta de anticuerpos IgG contra la proteína NS1, sin dejar de lado que dicha respuesta también es evidente para los serotipos restantes. En general, los pacientes tendían a montar una mayor respuesta de anticuerpos IgG anti-NS1 que anti-E cuando se evaluó la respuesta de manera individual hacia cada antígeno, pero al estudio de la respuesta hacia ambas proteínas se tuvieron muestras que eran seropositivas hacia ambos antígenos del virus en menor proporción con respecto a la respuesta que se tuvo hacia ellos de manera individual.

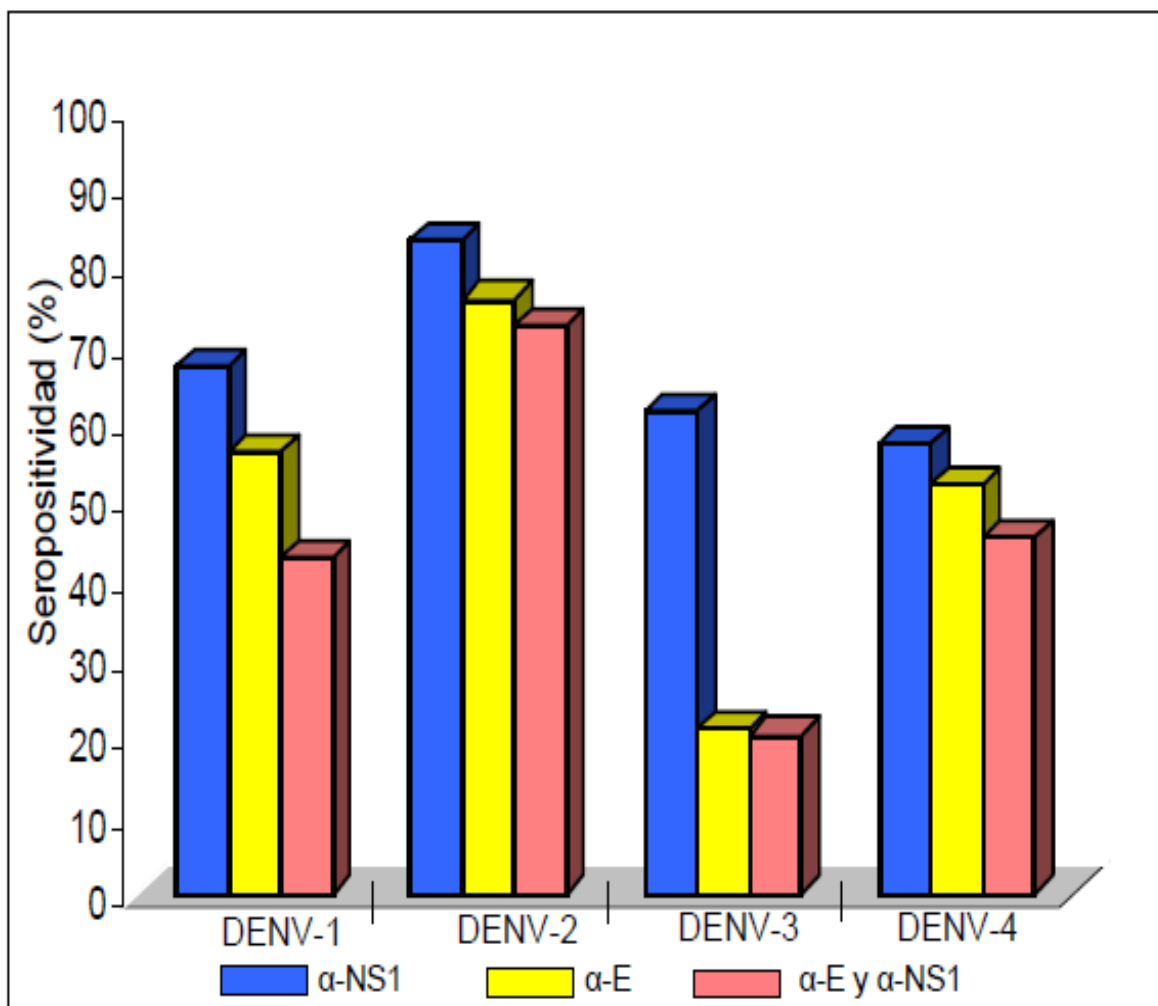


Fig. 10. Detección de IgG anti-DENV por *Western blot* para cada serotipo viral con muestras de suero de pacientes con dengue (n=119).

En la figura 11, específicamente para el DENV-3 se analizó el número de muestras positivas hacia el antígeno E del virus en relación con su aparición durante las diferentes fases de la enfermedad arrojando que, se tuvo mayor reactividad de anticuerpos IgG hacia el antígeno en la fase aguda de la enfermedad, siguiendo en seropositividad el DENV-2, donde se encontraron muestras para ambas fases de la enfermedad y siendo nula para los serotipos restantes, la fase convaleciente fue la que tuvo mayor número de muestras positivas y no solo para la proteína E también para la NS1 o ambos antígenos, pero esto se encuentra en función al número mayor de muestras analizadas para esta fase de la infección.

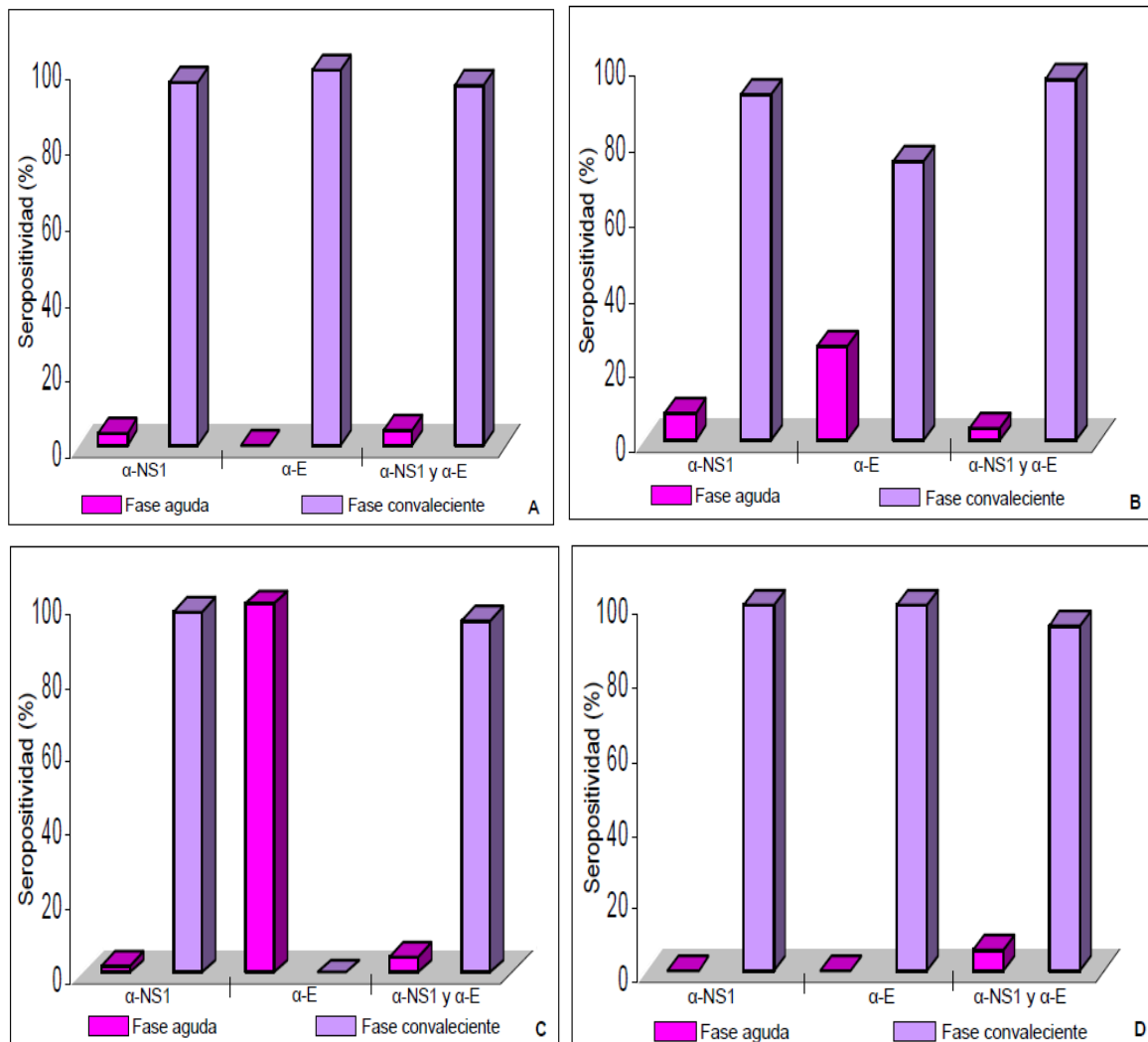


Fig. 11. Respuesta de anticuerpos tipo IgG en las distintas fases del dengue contra las proteínas virales E y NS1 en pacientes enfermos y determinados por *Western blot*. **A:** DENV-1. **B:** DENV-2. **C:** DENV-3. **D:** DENV-4 (n=119).

Ya que parte importante del trabajo fue el análisis de las reacciones cruzadas que se dieron entre serotipos virales, en la tabla 5 se presentó el porcentaje de muestras con reactividad cruzada hacia uno o más serotipos del DENV y la fase de la enfermedad a la cual correspondían.

Tabla 5. Porcentaje de muestras que presentaron reactividad cruzada hacia uno o más serotipos del virus del dengue.

Fase de la enfermedad	Muestras que fueron positivas hacia:			
	Un serotipo	Dos serotipos	Tres serotipos	Cuatro serotipos
Aguda	1	1	1	2
Porcentaje (%)	16.6	16.6	16.6	33.3
Convaleciente temprana	4	9	22	30
Porcentaje (%)	6.0	13.6	33.3	45.4
Convaleciente tardía	2	5	16	20
Porcentaje (%)	4.2	10.6	34.0	42.5

En la figura 12 se muestra de manera general, es decir, sin diferenciar entre serotipos, la cantidad de muestras que tuvieron IgGs que reconocieron determinantes antigénicos de uno o más serotipos virales. En ella se observan pocas muestras con IgGs que reconocieron solo un serotipo del virus, en el caso de muestras positivas para dos o tres serotipos virales existió mayor reactividad cruzada hacia el antígeno E, al hacer el estudio de aquellas muestras positivas para los cuatro serotipos se observó mayor reactividad cruzada hacia la proteína NS1.

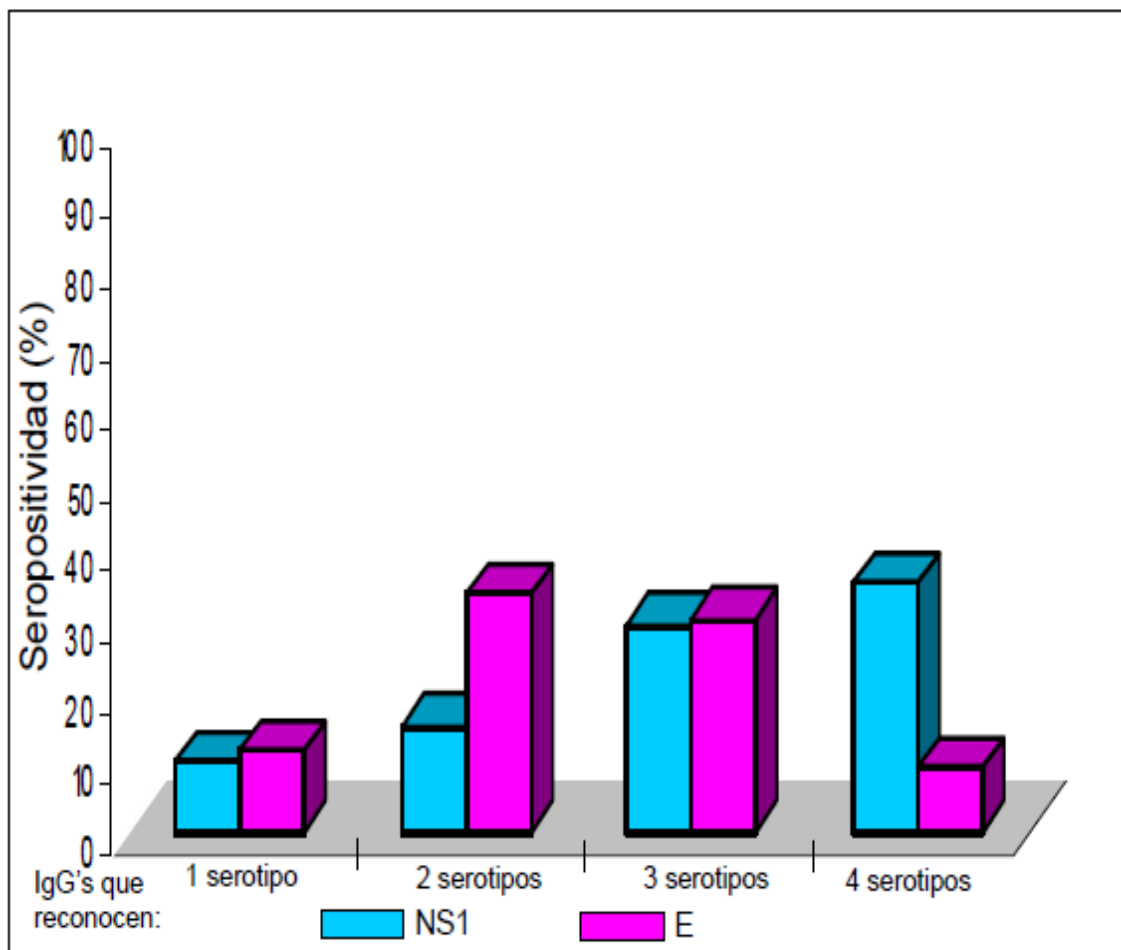


Fig. 12. Reactividad cruzada hacia los cuatro serotipos del DENV, determinados por *Western blot* empleando muestras de pacientes con dengue (n=119).

En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos del análisis de reactividad cruzada de los anticuerpos IgG contra las proteínas virales de los cuatro serotipos del DENV, este fenómeno se presentó entre casi todos los serotipos del DENV. Es de señalar que se evidenció la existencia de reactividad cruzada de anticuerpos tipo IgG hacia ambos antígenos (proteína E y NS1) y de forma general un mayor número de muestras presentaron reactividad hacia los cuatro serotipos virales y en menor proporción los serotipos 1, 2 y 4.

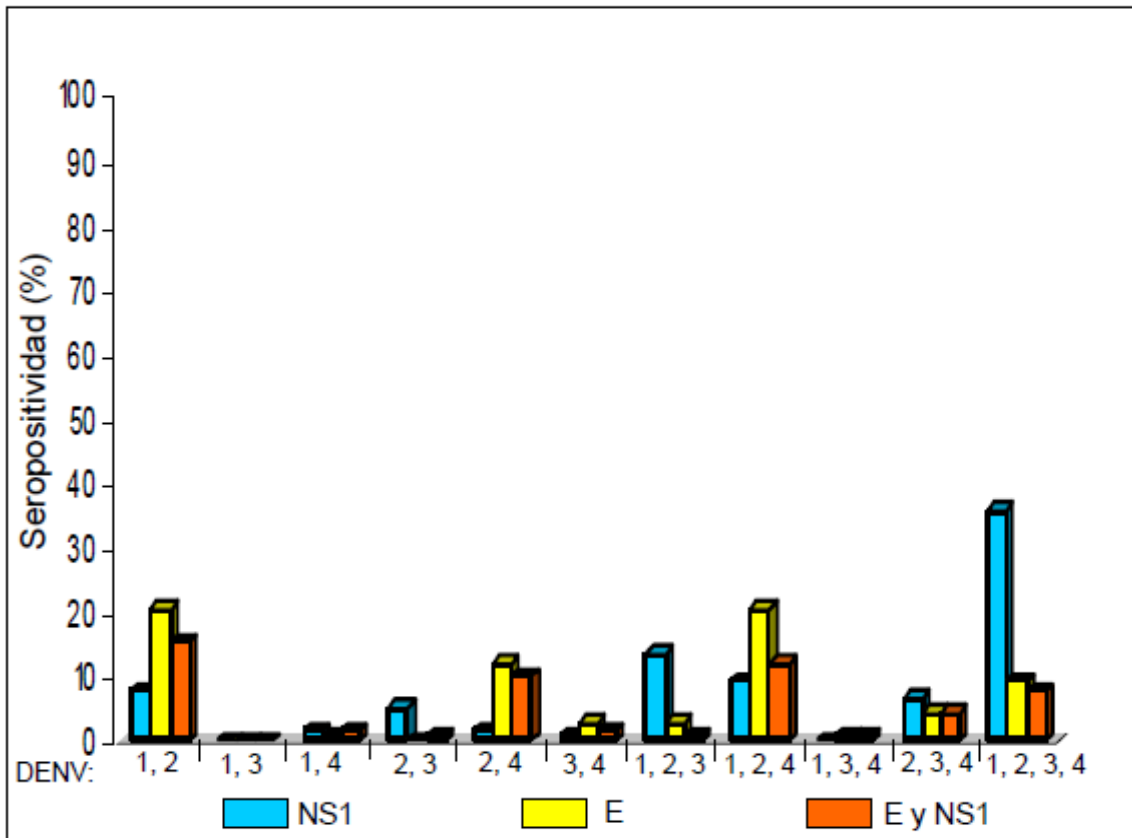


Fig. 13. Reactividad cruzada de los anticuerpos tipo IgG contra las proteínas virales de los cuatro serotipos del DENV (n=119).

Los resultados que arrojó la prueba *Western blot*, de igual manera permitieron analizar si esta técnica puede ser considerada como una prueba alternativa y tal vez con carácter confirmatorio en el diagnóstico serológico de Dengue, por ello y teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente se generaron los siguientes datos (tabla 6):

Tabla 6. Resultados de ELISA y *Western blot* para muestras de dengue y control.

	IgG α-DENV positivas	IgG α-DENV negativas	WB positivas				WB negativas			
			D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
Muestras de Dengue	119	31	80	99	73	68	39	20	46	51
Muestras Control	0	50	0				50			

8. DISCUSIÓN

Actualmente, el dengue es una de las enfermedades con mayor impacto en salud pública en México y en el mundo, convirtiéndose en un reto de importancia la detección oportuna de los casos y el tratamiento a los mismos.

La generación de anticuerpos es considerado el mecanismo más importante de protección en la infección por DENV, sin olvidar la dicotomía entre una infección primaria y una infección secundaria durante el transcurso de la enfermedad (Bielefeldt, 2000). Este es el punto de partida para que en este proyecto se planteara estudiar primordialmente el comportamiento de la respuesta de anticuerpos generados contra el DENV en pacientes infectados, específicamente aquellos de tipo IgG, utilizando una prueba fácil como es el *Western blot* para analizarlos en las distintas fases de la enfermedad.

En el trabajo se consiguió infectar células C6/36 con los cuatro serotipos del DENV, pudiendo corroborar su replicación en las células infectadas al observar el efecto citopático (formación de sincicios) y una vez realizado el *Western blot*, al detectar las bandas de las proteínas E y NS1 correspondientes a su peso molecular.

Con objeto de trabajar con sistemas homogéneos en cuanto a concentración de proteínas provenientes de infección es que se propuso controlar variables como la concentración de proteínas del lisado celular, garantizando la infección de la monocapa celular al conocer la cantidad de virus inoculado por cada célula (MOI de 1).

En este trabajo se estandarizó la técnica *Western blot* para la detección de anticuerpos contra el DENV lo que permitió analizar el patrón de respuesta de los anticuerpos de tipo IgG en las distintas fases de la enfermedad, así como, evaluar la reactividad cruzada que se da entre serotipos hecho en el cual recae el peso del fenómeno de ADE y como consecuencia la inmunopatogenia de la enfermedad.

Como apoyo para el estudio, la prueba de ELISA indirecta sirvió como referencia para seleccionar las muestras que integrarían el estudio, ya que esta detectaba anticuerpos IgG anti-DENV al igual que en el *Western blot*, la detección realizada fue únicamente cualitativa, es decir, de haber o no presencia de estos anticuerpos contra alguno de los serotipos del DENV en sueros de pacientes. Por lo anterior, los datos reportados en el kit para la sensibilidad de la prueba ELISA indirecta al cursar el paciente por una infección secundaria es 97.9 % (IC 95 %, 92.5-99.7 %), dengue endémico tiene una sensibilidad del 62.5 % (IC 95 %, 51.8-71.5 %) y una especificidad del 100% (IC 95 %, 96.6-100 %) (*Panbio Dengue IgG Indirect ELISA, Panbio, Australia*), datos que dieron una referencia a cerca del comportamiento de la prueba durante el estudio.

Con base a los resultados arrojados (tabla 6), la sensibilidad para el ELISA fue del 80 % y destacando que tanto el ELISA como el *Western blot* son técnicas previamente estandarizadas y se usaron siguiendo las especificaciones del fabricante así como las reportadas para el *Western blot*, los porcentajes de sensibilidad que se obtuvieron indican, que al emplear una dilución establecida de suero hay pacientes que pudieron tener bajo título de anticuerpo, por lo que éstos pueden pasar desapercibidos y no ser detectados, dando lugar a un falso negativo, este tipo de resultados se pueden presentar también al tener altos títulos de anticuerpo, hechos que se pudieron presentar al analizar las muestras por ambas pruebas. Hay que tener en cuenta que la confiabilidad del estudio depende de la enfermedad de interés, las condiciones reales en el medio y de la colectividad, lo que hizo considerar que se trata de una enfermedad endémica, por tanto hay circulando varios serotipos virales como genotipos de un mismo serotipo, los cuales pueden provocar fenómenos de reactividad cruzada, hechos que indican que el *Western blot* no puede ser considerada como herramienta para el diagnóstico pero si para conocer el patrón de respuesta de los anticuerpos IgG, así como para evaluar los fenómenos de reacción cruzada entre serotipos.

Un punto a retomar son las muestras de la tabla 3 donde se observan las muestras con resultado negativo para ELISA pero positivo para *Western blot*, lo

que puede indicar que el ELISA es capaz de diferenciar entre pacientes enfermos de aquellos que no lo son o que la sensibilidad del *Western blot* permitió detectar esas muestra positivas y que se pudo corroborar este hecho ya que al observar en las tiras correspondientes a los controles tanto de reacción como de anticuerpos primario y secundario y los controles positivos, no presentaron ninguna inespecificidad que indique que estos son falsos positivos.

Esta técnica, por lo tanto, permite separar eficientemente una mezcla de antígenos de interés y su detección empleando anticuerpos, puede ser mejorada si se probaran diluciones de suero que permitieran tener en consideración aquellas muestras de pacientes con títulos de anticuerpos muy elevados como muy bajos que dan resultados falsos negativos.

El comportamiento de los anticuerpos en este estudio, permitió establecer un comparativo entre los resultados obtenidos entre el ELISA y el *Western blot*. Los resultados reportados para la prueba de ELISA indirecta para IgG (119 muestras) son la pauta para analizar los resultados del *Western blot* para los antígenos proteicos E y NS1, ya que los pacientes con resultado positivo al ELISA son considerados como enfermos de Dengue y por lo tanto, estos expresarían cualquiera de los dos antígenos o ambos, propiciando así la producción de anticuerpos contra ellos (teniendo en cuenta que estos son el principal mecanismo de protección contra la enfermedad), los cuales serían detectados mediante el *Western blot*.

Se observó que del total de las muestras positivas a dengue por ELISA, se tienen algunas con resultado negativo a IgGs específicas contra NS1 en el *Western blot* para todos los serotipos virales, esto puede ocurrir en caso de una infección secundaria, el virus entró en circulación y la proteína E que se encuentra en la superficie del virus fue reconocida, neutralizando al virus y con ello impidiendo su replicación, por lo tanto evitando también la producción de la proteína NS1 (Bielefeldt, 2000; Teles y cols., 2005; Wilder-Smith y Schwartz, 2005).

Los casos en los que no se encontraron anticuerpos contra el antígeno E en el *Western blot* pero fueron seropositivos contra NS1, sugieren que por secretarse este último antígeno viral y encontrarse en pacientes infectados en concentraciones por arriba de 50 µg/mL en su forma hexamérica, la respuesta de anticuerpos fue más evidente (Dittmar y cols., 2004). Para el caso de los resultados de Western Blot negativos a ambos antígenos virales y que fueron positivos en el ELISA, como ya se mencionó tal vez se debió a que al trabajar solo una dilución de las muestras se pudo presentar el fenómeno de prozona o postzona.

De manera general, los resultados de este estudio permiten observar un porcentaje alto de seropositividad para el serotipo 2 del DENV, lo que concuerda con otros estudios que reportan que para este serotipo se monta una respuesta mayor de anticuerpos IgG anti-NS1 en comparación con resultados obtenidos hacia el serotipo 4 viral (Valdés y cols., 2000), además, se trabajó con sueros mayoritariamente obtenidos durante la fase convaleciente de la infección, momento en el cual es prácticamente imposible obtener el serotipo viral que infectó al paciente, ya que en esta fase de la enfermedad, la viremia va en decremento haciendo indetectable el virus. Por ello, es factible pensar que los anticuerpos que se encontraron están dirigidos principalmente contra DENV-2 debido a que fue uno de los principales serotipos circulantes en México durante 2010 (www.dgepi.salud.gob.mx), año en el que se realizó este estudio. También se hace notar que DENV-1 es el segundo en porcentaje de seropositividad, se hace alusión a esto, ya que, se tuvo un número considerable de muestras que corresponden a pacientes que padecieron dengue clásico en el mismo año, y según lo reportado en la literatura el serotipo 1 es más frecuente en pacientes que cursaron DF (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005), atribuyendo a este hecho el porcentaje reportado.

La respuesta de anticuerpos de tipo IgG durante el curso de la enfermedad contra uno o ambos antígenos virales (E y NS1) para los cuatro serotipos, fue analizada de acuerdo al patrón que estos presentaron en las distintas fases de la enfermedad. Es de hacer notar que se montó una mayor respuesta individual de anticuerpos IgG anti-NS1 en comparación con los anti-E, esto es

consistente con reportes para esta glicoproteína que nos indican que el hecho de encontrarla en su forma soluble (NS1s) es debido a que se produce en abundancia en pacientes con la enfermedad y sus niveles en sangre son proporcionales a los niveles de viremia y la cuantificación de los niveles circulantes varía entre los individuos durante el curso de la enfermedad, oscilando de varios nanogramos a varios microgramos por mililitros (Libraty y cols., 2002), aunque podemos observar que también se monta respuesta hacia ambas proteínas.

Hay estudios donde se indica que la proteína NS1 se ha encontrado en altas concentraciones en suero de pacientes infectados con dengue durante la fase temprana de la enfermedad (Young y cols., 2000; Alcon y cols., 2002), lo que concuerda con los resultados del presente estudio, ya que en casi todos los serotipos, las muestras de fase aguda presentan anticuerpos contra la misma, pero debido a que se trabajó con un número pequeño de muestras correspondientes a esta fase de la enfermedad, no fue evidente el fenómeno.

La fase convaleciente de la enfermedad presentó una mayor respuesta hacia la proteína NS1, esta proteína es detectable desde el día que aparece la fiebre y persiste hasta el noveno día ya que al replicarse el virus es excretada, en dicho lapso de tiempo hay producción de anticuerpos de tipo IgM e IgG (estos últimos, detectados por ELISA) y debido a que éstos aparecen entre el día 6-10 de la evolución de la enfermedad se evidencia la respuesta de anticuerpos contra dicho antígeno (Vorndam y Kuno, 1997; Miagostovich y col., 1999), aunque al contar con un número mayor de muestras de esta fase de la enfermedad, hace notoria la detección de anticuerpos contra ella.

Durante el curso de una infección primaria se muestran títulos bajos de anticuerpos de clase IgG hacia la proteína de envoltura (E) y los pacientes infectados secundariamente con el virus ya poseen anticuerpos de tipo IgG contra la proteína E como parte de una respuesta de memoria, por lo que pueden detectarse durante la fase aguda de la infección, así como también, altos títulos a muchas otras proteínas, incluyendo NS1 (Lindenbach y Rice, 1999), por lo que, aquellas muestras de fase aguda procesadas que

tuvieron anticuerpos contra el antígeno E en este estudio podrían corresponder a pacientes que cursan una infección de tipo secundario.

El diagnóstico serológico del dengue es complicado, a causa de los determinantes antigénicos de reactividad cruzada compartidos entre los cuatro serotipos virales y los *Flavivirus* en general (Gubler, 1996; Guzmán y Kouri, 1996), hecho que se encuentra íntimamente relacionado con el fenómeno de ADE (Morens y Halstead, 1990; Pérez, 2010). Los anticuerpos generados en una primoinfección contra un serotipo de DENV, pueden neutralizar a otros serotipos sólo durante dos a tres meses posteriores; sin embargo, en una infección secundaria con un serotipo diferente, hay un incremento de la multiplicación viral que es mediado por los anticuerpos heterotípicos no neutralizantes y los receptores para Fc de las células diana (Halstead y Simasthien, 1970).

En cuanto a los resultados obtenidos en el estudio acerca de la reactividad cruzada existente entre serotipos virales, se observó mayor número de muestras reactivas hacia tres serotipos. Resultados que reportan en otros estudios indican que para los cuatro serotipos virales hay una divergencia en la reactividad cruzada entre los anticuerpos anti-NS1, anti-E y anti-prM, mostrando reactividad cruzada limitada los anti-NS1 (Dejnirattisai y cols., 2010), lo que concuerda con los resultados reportados en la figura 12 y teniendo como excepción la reactividad cruzada hacia los cuatro serotipos virales, donde la proteína NS1 presentó un mayor número de muestras seropositivas. Lo anterior se apoya en el hecho de que algunos estudios (Muylaert y cols., 1996; Yábar y cols, 2003) indican que la integridad molecular de NS1 es importante para la síntesis de RNA viral, y en consecuencia, para la formación de nuevas partículas virales, por lo tanto, debe mantenerse conservada, ya que modificaciones o cambio de residuos aminoacídicos en su estructura molecular podría modificar la capacidad de replicación del virus, lo que explica la reactividad que existe entre serotipos a pesar de tener un mosaico de determinantes antigénicos específicos de serotipo (Young, 1990), ya que los conservados pueden causar la reactividad cruzada.

Por lo anterior, la prueba se ve afectada, ya que aun siendo específica y permitiendo identificar a pacientes con dengue, en proteína como la NS1 que es conservada entre serotipos como entre miembros de la familia *Flaviviridae*, hay una mayor probabilidad de obtener reactividad cruzada.

La infección con cualquier serotipo de DENV produce una amplia gama de anticuerpos anti-E que varían en su reactividad (Wayne y cols., 2009), ya que existe reactividad cruzada evidente entre todos los serotipos del DENV hacia estas proteínas y esto es apoyado por estudios realizados en muestras para el Virus del Oeste del Nilo (WNV), Virus de la Encefalitis de San Luis (SLEV) e incluso DENV analizadas mediante Western Blot, donde fue amplia la reactividad cruzada que se presentó hacia la proteína E. Por lo anterior, la proteína E no puede ser considerada para establecer la diferencia entre flavivirus por tan marcada reactividad cruzada (Oceguera y cols., 2007), pero si para diferenciarlos de otros arbovirus.

Los resultados que se muestran en la figura 13 sugieren que los datos obtenidos en ese rubro pueden ser atribuidos a una homología de secuencia (70%) y estructura entre los cuatro serotipos del DENV (Arias y cols., 1993).

Se debe tener presente que, tanto la glicoproteína E como la NS1 son objetivos importantes de la inmunidad humoral y que juegan papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Alcon-LePoder y cols., 2005). Como se pudo observar en los resultados de este trabajo, la reactividad hacia el antígeno E es amplia, lo que sugiere que una infección previa o anticuerpos subneutralizantes anti-DENV específicos contra el serotipo causal de la infección, pueden interactuar con el DENV sin neutralizarlo y por lo tanto utilizar los receptores Fc facilitando la entrada a células diana como monocitos y macrófagos intensificando la infectividad del virus (Avirutnan y cols., 2006).

La proteína NS1 es considerada un gran inmunogénico ya que esta puede residir en la membrana plasmática de células infectadas (mNS1) y ser liberada en forma oligomérica al medio extracelular (sNS1), hecho por el cual se convierte en blanco de anticuerpos específicos anti-NS1 los cuales juegan un papel importante en la protección contra la enfermedad así como en su patogénesis

9. CONCLUSIONES

1. El *Western blot* permitió detectar anticuerpos de tipo IgG anti-proteína NS1 y anti-proteína E del DENV en pacientes con dengue.
2. Al analizar el patrón de respuesta de anticuerpos IgG en las muestras, se observó que existe una mayor reactividad hacia la proteína NS1 para los cuatro serotipos del DENV.
3. Independientemente del serotipo viral que produzca la infección, se generan anticuerpos IgG contra las proteínas E y NS1 del DENV capaces de reconocer antígenos de serotipos virales heterólogos, por lo que el *Western blot* puede ser considerado como herramienta para estudios epidemiológicos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Bas C y Gómez-Cordero I (2005). Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Rev Biomed* **16**: 113-137.
- Alcon-LePoder S, Drouet MT, Roux P, Frenkiel P, Arborio M, Durand-Schneider AM, Maurice M, Le Blanc I, Gruenberg J and Flamand M (2005). The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity. *Journal of Virology* **79**(17): 11403-11411.
- Arias CF, Preugschat F and Strauss JH (1993). Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology* **193**(2):888-899.
- Avirutnan, P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, Jairungsri A, Kanlaya R, Tangthawornchaikul N, Puttikhunt C, Pattanakitsakul SN, Yenchitsomanus PT, Mongkolsapaya J, Kasinrerak W, Sittisombut N, Husmann M, Blettner M, Vasanawathana S, Bhakdi S and Malasit P (2006). Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis* **193**: 1078–1088.
- Bielefeldt H (2000). Pathogenesis of dengue virus diseases: missing pieces in the jigsaw. *Trends Microbiol* **5**: 409.
- Bielefeldt-Ohmann H, Beasley DW, Fitzpatrick DR and Aaskov JG (1997). Analysis of a recombinant dengue-2 virus-dengue-3 virus hybrid envelope protein expressed in a secretory baculovirus system. *J Gen Virol* (11): 2723-2733.
- Cabezas C (2005). Dengue en el Perú: aportes para su diagnóstico y control. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* **22**(3): 212-228.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R and Rice CM (1990). Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol* **44**: 669-688.
- Chih-Yun L, Wen-Yang T, Su-Ru L, Chuan-Liang K, Hsien-Ping H, Chwan-Chuen K, Han-Chung W, Gwong-Jen C, and Wei-Kung W (2008). Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and

recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain. *Journal of Virology* **82**(13): 6631-6643.

- Chungue E, Roche C, Gestas P, Glaziov P and Markoff JL (1994). Correlation between detection of plasminógeno cross-reactive antibodies and hemorrhage in dengue virus infection. *J Inf Dis* **170**: 1304-1307.
- Clyde K, Kyle JL and Harris E (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of Virology* **80**(23): 11418-11431.
- Cologna R and Rico-Hesse R (2003). American genotypes structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *Journal of Virology* **70**: 91-98.
- Crill W D, Hughes HR, Delorey MJ and Chang GJ (2010). Humoral immune responses of dengue fever patients using epitope-specific serotype-2 virus-like particle antigens. *Plos One* **4**(4): 1-18.
- De Filippis VR. *Virus Evolution*. En: Howley PM, editores. *Fields Virology*. 2001.
- Del Ángel RM (2006). Entrada del virus del dengue: moléculas que pueden modular la patogenia viral. *CINVESTAV*: 38-43.
- Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, Puttikhunt C, Edwards C, Duangchinda T, Supasa S, Chawansuntati K, Malasit P, Mongkolsapaya J and Screaton G (2010). Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* **328**: 745-748.
- Despres P, Frenkiel MP and Deubel V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology* **196**(1): 209-219.
- Dittmar D, Clearly TJ and Castro A (2004). Immunoglobulin G and M-specific enzyme-linked immunosorbent assay for detection of dengue antibodies. *J Clin Microbiol* **17**: 27-42.
- Domingo-Carrasco C y Gascón-Bustrenga J (2005). Dengue y otras fiebres hemorrágicas virales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **23**(10): 615-626.
- Falconar AK (1997). The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting

integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol* **142**: 897-916.

- Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA and 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): 6104-6110.
- Gluber DJ and Clark GG (1995). Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of global health problem. *Emerg Infect Dis* **1**: 55-57.
- Gluber DJ (1996). Serological diagnosis of dengue haemorrhagic fever. *WHO Dengue Bull* **20**: 20-23.
- Gubler DJ and Kuno G editors (1997). *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: Cab International 1-22.
- Guzmán MG, Halstead SB, Artsob H, Buche P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martinez E, Nathan MB, Pelegriño JL, Simmons C, Yoksan S and Peeling RW (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology* 7-16.
- Guzman MG and Kouri G (1996). Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* **3**(6): 621-627.
- Halstead SB and Simasthien P (1970). Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. II. Antigenic and biologic properties of dengue viruses and their association with disease response in the host. *Yale J Biol Med* **42**(5): 276-292.
- Halstead SB (1980). Immunological parameters of togavirus disease syndromes. En: *The togaviruses*, Schesinger RW (editores). New York Academic Press 107-173.
- Halstead SB (1989). Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock and haemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis* **11**: 5830-5839.
- Halstead, SB (2003). Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv. Virus Res* **60**: 421–467.
- Hasegawa H, Yoshida M, Shiosaka T, Fujita S. y Kobayashi Y (1992). Mutations in the envelope protein of japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology* **191**: 158–165.

- Henchal A and Putnak E (1990) The Dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.* **3**(4): 376-396.
- Heymann Warren R (2009). Dengue fever. *Journal of the American Academy of Dermatology* **60**: 306-307.
- Holmes EC and Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Gen Evol* **3**: 19–28.
- Hopp TP and Woods KR (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci* **78**: 3824–3828.
- Huan-Yao L, Kao-Jean Huang, Yee-Shin L, Trai-Ming Y, Hsiao-Sheng L and Ching-Chuan L (2008). Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *American Journal of Infectious Diseases* **4**(1):1-9.
- Jiang WR, Lowe A, Higgs S, Reid S and Gould EA (1993) Single amino acid codon changes detected in louping ill virus antibody-resistant mutants with reduced neurovirulence. *J Gen Virol* **74**:931–935.
- Karataa P, Murgue B and Deparis X (2003). Elevated levels of total and dengue virus-specific immunoglobulin E in patients with varying diseases severity. *J Med Virol* **70**: 91-98.
- Kouri G, Màs P, Guzmàn MG, Soler M, Goyenechea A and Morier L (1981). Dengue hemorrhagic fever in Cuba: rapid diagnosis of the etiologic agent. *PAHO Bull* **17**: 126-132.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J and Lenches E (2000). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* **108**(5): 715-725.
- Kyte J and Doolittle R F (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**:105–132.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ and Vorndam AV (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples using reverse transcriptase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**: 545-551.
- Libraty D, Young P, Pickering D, Endy T, Kalayanarooj S, Green S, Vaughn D, Nisalak A, Ennis F and Rothman A (2002). High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue

Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. *JID* 1861165–1861168.

- Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY and Lin YS (2006). Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol* **19**: 127-132.
- Lindenbach BD and Rice CM (1999). Genetic interaction of flavivirus non-structural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol* **73**: 4611-4621.
- Lindenbach BD and Rice CM (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* **59**: 23-61.
- Lindenbach BD, Thiel HJ and Rice CM (2007). Flaviviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology* 1101-1151.
- Mackenzie, JM and Westaway EG (2001). Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol* **75**: 10787-10799.
- Mandl CW, Guirakhoo F, Holzmann H, Heinz FX and Kunz C (1989). Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model. *J Virol* **63**:564–571.
- Martina BEE, Koraka P and Osterhaus ADME (2009). Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical Microbiology Reviews* **22** (4): 564-581.
- Mathew A, Kurane I, Rothman AL, Zeng LL, Briton MA and Ennis FA (1996). Dominant recognition by human CD8+ cytotoxic T lymphocyte of dengue virus nonstructural NS3 and NS1a. *J Clin Invest* **98**:1684-1689.
- Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araújo ES and Vorndam V (1999). Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol* **14** (3): 183-189.
- Morens DM and Halstead SB (1990). Measurement of antibodydependentinfection enhancement of four dengue virus serotypes by monoclonal and polyclonal antibodies. *J Gen Virol* **71** (12): 2909-14.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ and Rossmann MH (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews* **3**: 13-22.
- Muylaert IR, Chambers TJ, Galler R and Rice CM (1996). Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellor fever virus NS1 protein:

- effects on virus replication in mouse neurovirulence. *Virology* **222** (1): 159-168.
- Navarro-Sánchez E, Desprès P and Cedillo-Barrón L (2005). Innate immune responses to Dengue virus. *Archives of Medical Research* **36**: 425-435.
 - Pérez AB, Sierra B y Delgado I (2000). Ensayo de linfoproliferación antígeno específico al virus dengue con células T humanas. *Rev Cubana Med Trop* **52** (3): 197-202.
 - Pérez Y (2010). Papel del sistema inmune en la patogenia de la infección por el virus del dengue. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas* **19** (1): 23-29.
 - Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* **174**: 479–493.
 - Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gluber DJ, Reiter P, Sanders EJ and Vorndam AV (1998). Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* **352** (9132): 971-977.
 - Robertson MJ (2002). Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol Rev* **71**: 173–183.
 - Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J and Smit JM (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci* **67**: 2773-2786.
 - Rojo J and Delgado R (2004). Glycodendritic structures: promising new antiviral drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**: 579-581.
 - Rothman AL and Ennis FA (1999). Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *Virology* **257**: 1-6.
 - Staropoli I, Frenkiel MP, Megret F and Deubel V (1999). Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. *Vaccine* **15**: 1946-1954.
 - Sutcliffe, JG, Shinnick TM, Green N and Lerner RA (1983). Antibodies that react with predetermined sites on proteins. *Science* **219**: 660–666.
 - Teles FR, Prazeres DM and Lima-Filho JL (2005). Trends in dengue diagnosis. *Rev Méd Virol* **15**: 287-302.
 - Theofilopoulos AN, Brandt WE, Russell PK and Dixon FT (1976). Replication of dengue-2 virus in cultured human lymphoblastoid cells and

subpopulations of human peripheral leukocytes. *J Immunol* **117**: 953–961.

- Velandla ML y Castellanos JE (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo vital. *Infectio* **15** (1): 33-43.
- Vorndam AV and Kuno G (1997). Laboratory diagnosis of dengue virus infections. En: Gubler D, Kuno G, editores. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Wallingford: Cab International 313-334.
- Wilder-Smith A and Schwartz E (2005). Dengue in travellers. *N Engl J Med* **353**: 924-932.
- Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stoller V (1989). Newly synthesized dengue-2 virus non-structural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane associated after dimerization. *Virology* **171**: 302–305.
- Wong SS, Abd-Jamil J and Abubakar S (2007). Antibody neutralization and viral virulence in recurring dengue virus type 2 outbreaks. *Viral Immunol* **20** (3): 359-368
- Yábar, C (. 2003). Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del RNA del virus del dengue: propuesta de un modelo de replicación del RNA. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* **20** (1): 51-57.
- Young PR (1990). Antigenic analysis of dengue virus using monoclonal antibodies. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **21**(4): 646-651.

URL's

- <http://www.cenavece.salud.gob.mx/dengue>, consultado el 16/11/2011.
- <http://www.dgepi.salud.gob.mx>, consultado el 20/11/2011.

Anexo 1: Preparación de reactivos y soluciones

a. Para cultivo celular y aislamiento viral.

Cultivo de células C6/36 de mosquito *Aedes albopictus*: Medio MEM (Medio Esencial Mínimo, GIBCO Invitrogen, Camarillo, CA, USA), suplementado al 10% con suero fetal bovino (medio de crecimiento) y para mantenimiento se utilizó MEM al 2% de SFB, en ambos casos con 1% de aminoácidos no esenciales, vitaminas, L-glutamina y antibiótico-antimicótico (GIBCO).

Solución antibactericida y antimicótica 100X: Comercial (penicilina G sódica, estreptomina anfotericina B).

Suero fetal bovino: Comercial (SFB, GIBCO, Invitrogen, Camarillo, CA, USA), libre de micoplasma, inactivado.

Aminoácidos no esenciales, vitaminas y L – glutamina: Comercial (GIBCO).

b. Para obtención de lisado celular.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X, pH 7.4: Disolver 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 0.16 g de KH_2PO_4 y 0.79 g de Na_2HPO_4 en un volumen de 500 mL de agua destilada. Regular el pH a 7.4 con una solución de HCl concentrado o NaOH 1 N y aforar a 1000 mL con agua bidestilada. Filtrar por papel Whatman #1.

Solución de inhibidores de proteasas: Colocar una tableta de inhibidores de proteasas (Comercial, Complete, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

Buffer de lisis: Añadir a 100 mL de agua bidestilada 0.00056 g de KCl, de estos tomar 30 mL y retirar 1.5 mL de dicha solución para añadir 300 μ L de Triton y 1.5 mL de inhibidor de proteasas. Almacenar a 4°C.

c. Para determinación de proteínas.

Solución de Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0.1 N: Pesar 2 g de Na₂CO₃ y disolver en agua bidestilada, adicionar 0.4 g de NaOH y aforar a 100 mL. Almacenar a 4°C.

Solución de Tartrato de Sodio (Na₂C₄H₄O₆) al 2%: Pesar 2 g de Na₂C₄H₄O₆ y disolver en agua bidestilada. Aforar a 100 mL. Almacenar a 4°C.

Solución de CuSO₄ al 1%: Disolver 1 g de CuSO₄ en agua bidestilada y aforar a 100 mL. Almacenar a 4°C.

d. Para electroforesis e inmunoelctrotransferencia.

Acilamida 30%-bisacrilamida 0.8%: Pesar 29.2 g de acilamida y 0.8 g de bis-acrilamida, disolver en agua bidestilada y aforar a 100 mL. Filtrar por papel Whatman #1 y guardar en frascos ámbar a 4°C.

Regulador del gel de separación Tris-Base 2M, pH 8.8: Disolver 24.22 g de Tris-Base. Ajustar el pH empleando HCl concentrado, hasta alcanzar un pH de 8.8 y aforar a 100 mL con agua bidestilada. Almacenar a 4°C.

Regulador del gel concentrador Tris-Base 2M, pH 6.8: Para preparar 100 mL de solución se deben pesar 31.6 g de Tris-HCl, ajustar el pH a 6.8 con NaOH 1N y aforar. Almacenar a 4°C.

Lauril sulfato de sodio (SDS) 10%: Pesar 10 g de SDS y aforar a 100 mL con agua bidestilada.

TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina): Este reactivo es empleado según el porcentaje de acrilamida que se trabaje.

Persulfato de amonio ($H_8N_2O_8S_2$) al 10%: Disolver 1 g de persulfato de amonio en 10 mL de agua bidestilada. Almacenar a $-20^{\circ}C$.

Tris-glicina 5X: Pesar 12 g de tris-base y disolver en agua bidestilada, añadir 57.6 g de glicina y aforar a 1000 mL.

Regulador de corrimiento, Tris-glicina (para electroforesis): Medir 200 mL de tris-glicina 5X y agregar 12 mL de SDS al 10%. Aforar a 1000 mL con agua bidestilada. Guardar a $4^{\circ}C$.

Azul de Coomassie 0.06% (para tinción de geles): Pesar 300 mg de colorante Azul de Coomassie, añadir 150 mL de metanol al 30% y 50 mL de ácido acético glacial al 10%. Aforar a 500 mL con agua bidestilada, antes de almacenar es necesario filtrar por papel Whatman #1 y guardar en frascos ámbar.

Decolorante para geles 1 (Metanol 50%-Ácido acético 10%): Medir 500 mL de metanol absoluto y añadir 100 mL de ácido acético glacial. Aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

Decolorante para geles 2 (Metanol 5%-Ácido acético 7%): Para preparar 1000 mL de solución, medir 50 mL de metanol absoluto y añadir 70 mL de ácido acético glacial, llevar al aforo con agua bidestilada.

Regulador de transferencia: Pesar 3.02 g de Tris-Base y 14.4 g de glicina y disolver en agua bidestilada, posteriormente añadir 200 mL de metanol absoluto y ajustar el pH a 8.3 con NaOH 1 N. Aforar y almacenar a $4^{\circ}C$ hasta su uso.

Rojo de Ponceau 0.2%: Pesar 200 mg de rojo de Ponceau y añadir 3 g de ácido tricloroacético. Aforar a 100 mL con agua bidestilada y filtrar por papel Whatman #1 y guardar en frascos ámbar.

Regulador de lavado PBS, pH 7.4: Disolver 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 0.16 g de KH_2PO_4 y 0.79 g de Na_2HPO_4 en un volumen de 500 mL. Regular el pH a 7.4 con una solución de HCl o NaOH concentrados y aforar a 1 L con agua destilada.

Solución de lavado PBS-Tween 20 0.05%: A un litro de PBS pH 7.4 se añadir 500 μL de Tween 20.

Solución de bloqueo PBS-Tween 20 0.05%-Leche 5%: A 100 mL de PBS-Tween 20 0.05% añadir 5 g de Leche (BIO-RAD, Marnes-la-Coquette, Francia), preparar al momento de usarse.