



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS
DOMINIOS I,II,III Y III DE LA PROTEÍNA E DE
DENGUE 2 EN BACTERIAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

YOSEF AMIN CHÁVEZ ROMERO



DIRECTOR DE TESIS

Dr. Juan Ernesto Ludert León

ASESORA INTERNA

Dra. Ma. Del Carmen García Rodríguez

México D.F a Nov. De 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN:

EL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL, UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTOMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR
LABORATORIO DE VIROLOGÍA:

Dra. Rosa María del Ángel Nuñez

(Investigadora titular del laboratorio de virología: un excelente ser humano, una exitosa científica y una hermosa mujer. GRACIAS POR EL APOYO RECIBIDO)

Dr. Juan Ernesto Ludert León

(Investigador de tiempo completo, un honorable representante del hermano pueblo Venezolano, un buen profesor y un gran amigo con gran sentido del humor)

M. en C. Clemente Mosso González

(Por su valioso e incondicional apoyo en el laboratorio, por su sencillez, por compartir con el corazón lo que posee y por ser un amigo sincero)

M. en C Henry Puerta Guardo

(Por su amistad, su compañía, y por ayudarme a entender fundamentos de la biología molecular)

Dr. Carlos Sandoval Jaime

(Por su ayuda logística, invaluable recomendaciones e interés por los demás)

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
	Manifestaciones clínicas	2
	Epidemiología	3
	El mosquito vector	5
	El virus del dengue	6
	Proteínas del virus del dengue	9
	Replicación viral	12
	Entrada viral	13
	Células blanco y sus receptores en la infección por el virus del dengue	17
II.	JUSTIFICACIÓN	19
III.	HIPÓTESIS	20
IV.	OBJETIVOS	21
	Generales	21
	Particulares	21
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	22
VI.	RESULTADOS	37
VII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
VIII.	CONCLUSIONES	61
	APENDICE I	62
	APENDICE II	72
IX.	REFERENCIAS	79

RESUMEN

La enfermedad causada por el virus del dengue es un problema de salud pública que va en aumento y que afecta a muchos países en vías de desarrollo. A pesar de los esfuerzos realizados por parte de los diversos grupos de investigación, actualmente no se cuenta con una vacuna efectiva contra la enfermedad. En el presente trabajo, se clonó y se expresó a los dominios I, II, III y III de la proteína de la envoltura ó proteína "E" del virus del dengue serotipo 2 en bacterias *Escherichia coli*, ambas fusionadas a una cola de 6 histidinas. Las dos proteínas recombinantes fueron expresadas, pero de manera insoluble, formando cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron en urea 8M y las proteínas recombinantes solubilizadas se semipurificaron en una columna de níquel por cromatografía de afinidad. Las proteínas recombinantes se probaron en un ensayo de inhibición de la infección por dengue. En células Vero. El ensayo mostró que las proteínas recombinantes fueron capaces de competir con el virus del dengue, lo cual sugiere que conservan su capacidad de reconocer el receptor para el virus del dengue en células Vero. Las proteínas recombinantes también fueron inoculadas en ratones BALB/c para probar su inmunogenicidad. El análisis de los sueros inmunes por western blot mostró que los sueros inmunes fueron capaces de reconocer tanto las proteínas recombinantes como las proteínas nativas. Se espera que las proteínas recombinantes sean de utilidad para el estudio de las interacciones tempranas virus del dengue - células.

I. INTRODUCCIÓN

El virus del dengue (DEN) es un miembro de la familia *Flaviviridae* y del género *Flavivirus*, que se caracterizan por ser relativamente pequeños (40-50 nm), esféricos y envueltos en una bicapa lipídica. Su genoma, compuesto de ARN de cadena sencilla y de polaridad positiva, tiene un tamaño aproximado de 11 Kb y codifica tres proteínas estructurales y siete no estructurales. Los *Flavivirus* son responsables de varias enfermedades importantes para el hombre como la fiebre amarilla, la encefalitis japonesa y la del oeste del Nilo, así como el dengue¹. Todos ellos tienen algunos epitopos en común en la proteína de envoltura E, provocando una excesiva reacción cruzada en las pruebas serológicas².

El virus del dengue es transmitido al hombre por la picadura de mosquitos del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti*. El ciclo replicativo de DEN se inicia cuando un mosquito infectado inocular al virus en la piel del huésped humano en donde el virus es captado por células dendríticas y monocitos, las cuales llevan al virus a diferentes tejidos y órganos. Después de 5 a 7 días, el individuo infectado presenta una viremia en sangre que coincide con el inicio de los síntomas. En este momento, si el individuo es picado por un mosquito sano, éste es capaz de ingerir al virus junto con la sangre. El virus se replica en el mosquito, especialmente en las glándulas salivales y a partir de ese lugar es inoculado a la piel de un individuo sano durante su siguiente alimentación.

Manifestaciones clínicas

La infección por dengue es, en la mayoría de los casos, asintomática o bien puede inducir un síndrome conocido como fiebre del dengue (FD), el cual se caracteriza por fiebre, dolor de cabeza (cefalea), dolor muscular (mialgia) y de articulaciones (artralgia), erupciones cutáneas, linfadenopatía (aumento en el tamaño de los nódulos linfáticos), leucopenia (disminución del número de leucocitos) y trombocitopenia (trastorno en el que se presenta una reducción del número de plaquetas). Algunos pacientes pueden desarrollar la forma más severa de la enfermedad conocida como fiebre hemorrágica por dengue (FHD), cuyas características más importantes son las anomalías en la hemostasia y en el incremento de la permeabilidad vascular, lo que puede desencadenar el síndrome de choque por dengue (SSD), que es una forma de choque hipovolémico (forma de choque causado por la pérdida de plasma) que está asociado clínicamente con hemoconcentración (aumento de la concentración de la sangre por disminución de plasma), la cual puede conducir a la muerte del paciente³.

La FD puede presentarse durante una primera infección con DEN, o en una infección secundaria y se manifiesta con un ataque repentino al estado general, con fiebre alta (40°C), un severo dolor de cabeza (especialmente en el área retro orbital), artralgia (dolor de articulaciones), mialgia (dolor muscular), anorexia (falta anormal de apetito) y molestias abdominales. Este padecimiento, debido a su sintomatología, se le conoce como la fiebre quebrantahuesos. La fiebre suele ser bifásica por 2 a 7 días y después de este tiempo, se mantiene una memoria inmunológica serotipo específica de por vida.

La FHD usualmente se presenta durante una infección secundaria, pero en algunos casos ocurre en infecciones primarias, especialmente en niños. A este respecto se postula que los anticuerpos maternos, para el caso de los lactantes, o bien los anticuerpos formados durante una infección primaria, en los adultos, pueden condicionar un incremento de la infección, proceso conocido como ADE (del inglés *Antibody Dependent Enhancement*). La FHD se caracteriza por fiebre alta, fenómenos hemorrágicos generalizados, daño circulatorio, dolor de cabeza severo, anorexia y vómito. La FHD se puede dividir en tres fases: la fase febril, la fase de derrame y la fase convaleciente. Es muy importante seguir de cerca la evolución del paciente durante cada una de las fases para evitar el SSD.

El SSD está asociado con una alta mortalidad y se puede presentar entre un 9.3 – 47% de los casos de FHD. Un derrame severo que lleva al SSD está asociado con manchas en la piel, cianosis circumoral, desórdenes circulatorios, dolor abdominal severo, vómito persistente y el choque prolongado es acompañado por acidosis metabólica⁴.

Epidemiología

La distribución geográfica de la infección por dengue correlaciona con la distribución del mosquito vector, e incluye las zonas tropicales y subtropicales del mundo, en las cuales además se encuentran las naciones más densamente pobladas y con mayores carencias económicas y de salud⁵. (Figura 1) Se estima que en estas zonas viven más de 2.5 mil millones de personas, que por lo tanto se encuentran en riesgo de contraer la infección. Datos recientes indican que cada año se presentan aproximadamente de 50 a

100 millones de casos de FD y de 250,000 a 500,000 casos de FHD, con más de 24,000 muertes. (Figura 2), Los humanos y los mosquitos son los principales huéspedes del virus. El mosquito permanece infectado toda su vida y durante ella puede transmitir la enfermedad a varios humanos. En las selvas ocurre el ciclo silvestre de la viriosis entre primates, no humanos, y mosquitos silvestres de diferentes géneros y especies. Las epidemias del dengue coinciden con las estaciones calurosas de lluvia y humedad justo cuando el mosquito tiene las mejores condiciones para su reproducción.

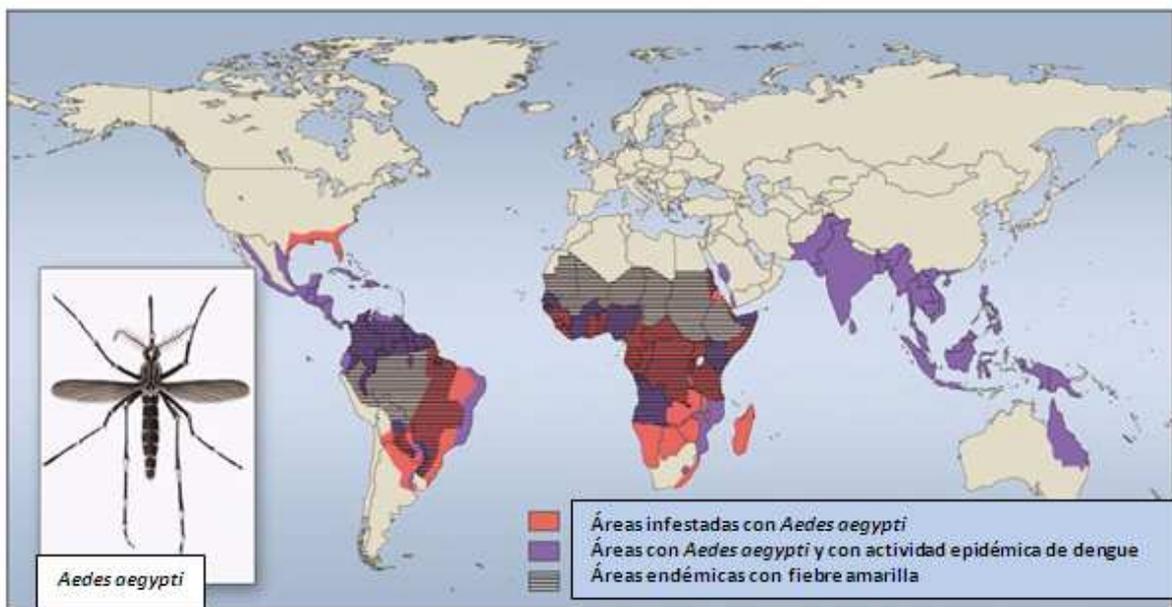


Figura 1. Mapa mundial de distribución del virus del dengue y del mosquito del género *Aedes*. Tomado de Monath 2007.⁵²

La infección por dengue es muy antigua, aunque durante el siglo XIX sólo se consideraba como causante de una enfermedad esporádica, sin embargo, esto ha cambiado dramáticamente durante los últimos años. La FHD surgió como un problema de salud pública en el año de 1954, cuando tuvo lugar una epidemia en Manila, Filipinas y desde entonces ha habido un crecimiento gradual del número de casos en todo el mundo. La segunda epidemia de FHD ocurrió en el sur de China en 1978, luego en Cuba en 1977 y en Venezuela en 1997⁴.

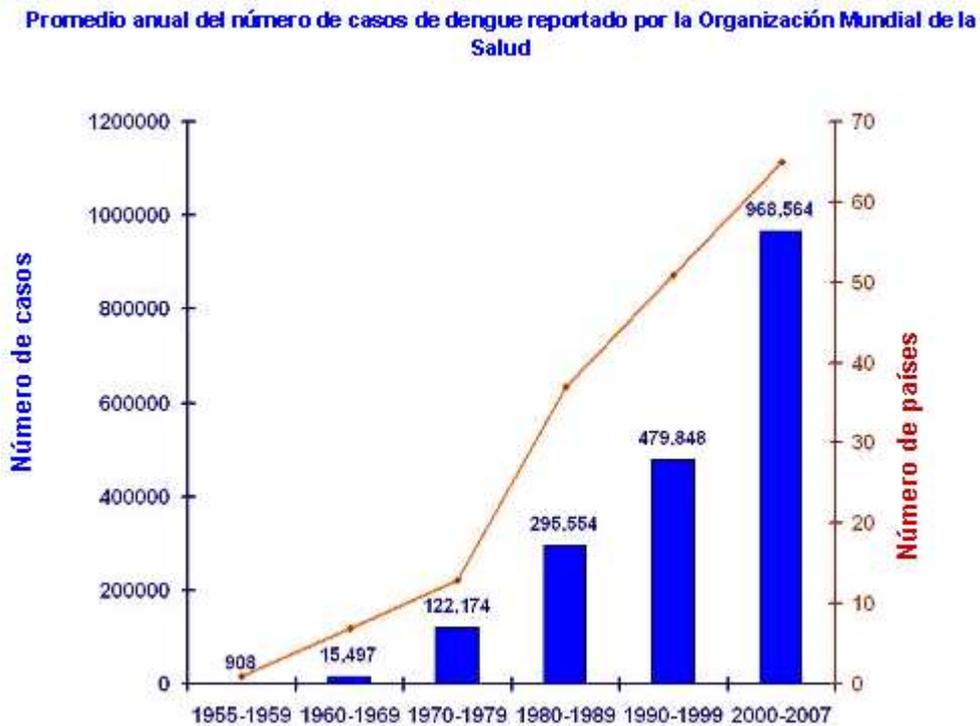


Figura 2. Promedio anual del número de casos de dengue reportado por la Organización Mundial de la Salud. Tomado de la página en internet de la WHO.

Mosquito vector

Los mosquitos del género *Aedes* (*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*) son los principales vectores de transmisión del dengue. Estos vectores han acompañado al hombre en sus viajes a través del mundo, lo cual ha sido causa de su dispersión y consecuente adaptación. De hecho *Aedes aegypti* es el más conspicuo por ser considerado el más doméstico de todos. Este mosquito de hábitos diurnos se ha adaptado a los mismos espacios que el hombre (jardines, piletas, habitaciones, basureros, etc.) y prefiere su sangre. Las hembras de *Aedes aegypti* se infectan cuando se alimentan de sangre contaminada, cuyas proteínas requieren para el desarrollo de los huevos. El virus con un efecto asintomático y de por vida (aproximadamente 65 días) se multiplica en el epitelio intestinal, ganglios nerviosos, cuerpo graso, ovario, hemocitos y glándulas salivales del mosquito infectado. Ni el tejido del músculo

ni los túbulos de Malpigio, son infectados, lo cual sugiere que existe un tropismo en los tejidos del insecto como ocurre en los humanos⁶.

En algunos estudios se ha demostrado la existencia de transmisión transovárica de DEN en las hembras de *Aedes*, lo que permite la propagación viral a la progenie del insecto y su propagación durante periodos interepidémicos sin la participación de huéspedes humanos⁷. Incluso los huevos pueden permanecer en recipientes secos, adheridos a sus paredes, por mucho tiempo, incluso años. Una vez que el recipiente vuelva a llenarse de agua, esos huevos se desarrollan en mosquitos, siendo éste un mecanismo que hace perpetuar la enfermedad en una población.

El virus del dengue

La familia *Flaviviridae* consiste de tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus* con más de 70 virus que incluyen el virus de la encefalitis japonesa, el virus del oeste del Nilo, el virus de la fiebre amarilla y el virus del dengue^{8,9}. El virus del dengue pertenece al género *Flavivirus* para el cual se han descrito cuatro serotipos (DEN1 – DEN4)¹⁰. El virión posee como material genético una molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 11 Kb con un solo marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína. Esta poliproteína es procesada para producir tres proteínas estructurales (la proteína de la cápside, C; la proteína de la membrana, M y la proteína de la envoltura, E) y además, siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5)¹¹. El marco de lectura abierto se encuentra flanqueado por dos regiones no traducidas (RNT) con conformación secundaria específica, de gran importancia para la

regulación de la traducción y la replicación viral. A este respecto cabe mencionar que el género *Flavivirus* inicia la traducción de su genoma mediante el reconocimiento del ribosoma por una estructura Cap dependiente en el extremo 5', mientras que el resto de la familia lo hace mediante un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES, del inglés, *Internal Ribosome Entry Site*)¹².

Morfológicamente el virión del virus del dengue es una partícula esférica de aproximadamente 50nm de diámetro, la cual contiene una nucleocápside icosaédrica de 30nm que protege al ARN y que se encuentra rodeada por una envoltura lipídica (Figura 3). La superficie del virión contiene dos proteínas, la E y la M. La glicoproteína E se encuentra acomodada en forma de 90 dímeros paralelos a la membrana (Figuras 4 y 5)¹³ y contiene la mayoría de los determinantes antigénicos del virus indispensables durante la entrada viral.

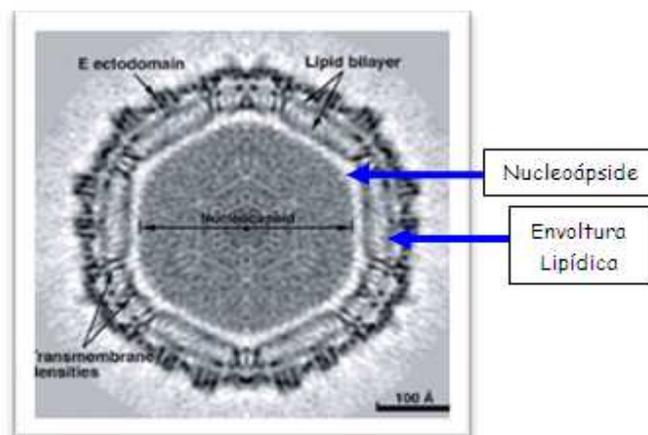


Figura 3. Imagen que muestra la cápside y la envoltura lipídica de un virión del dengue. (Modificado de Zhang *et. al.* 2003)⁴⁸

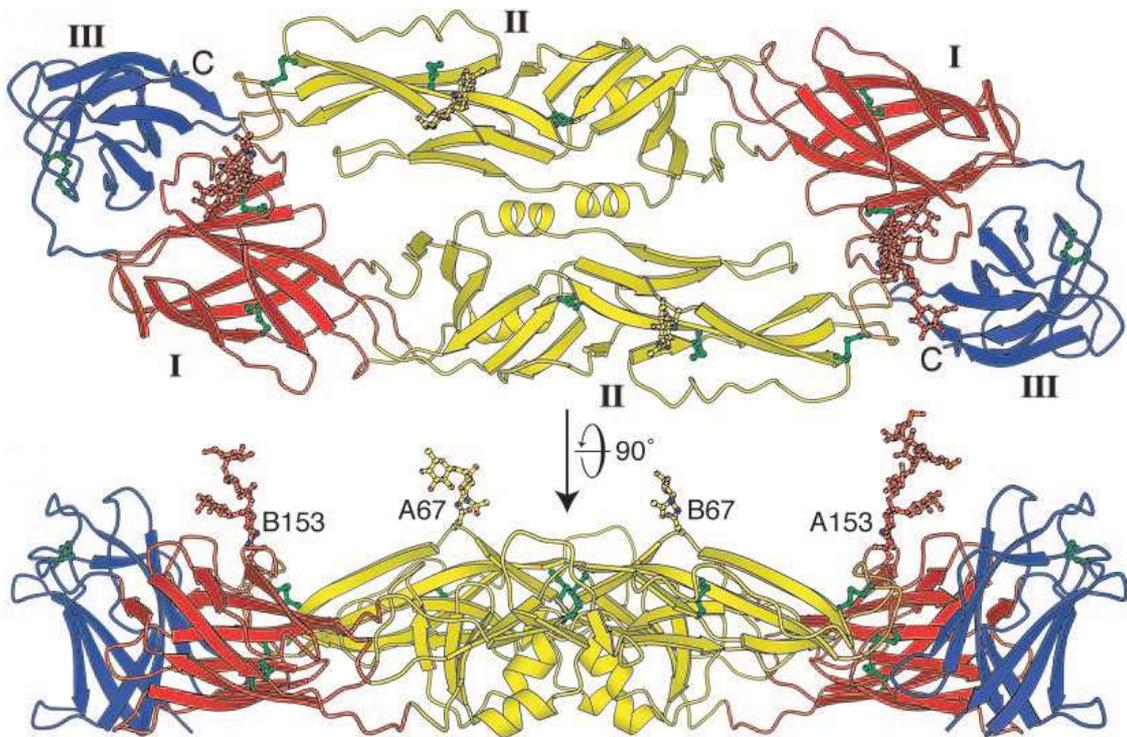


Figura 4. Estructura cristalina de la proteína E. Se muestra en rojo el dominio I que presenta un sitio de glicosilación, en amarillo el dominio II que tiene un sitio de glicosilación y un péptido de fusión y en azul el dominio III que presenta homología con las inmunoglobulinas y es el sitio de unión al receptor. (Tomado de Modis *et. al.* 2005)⁴⁹

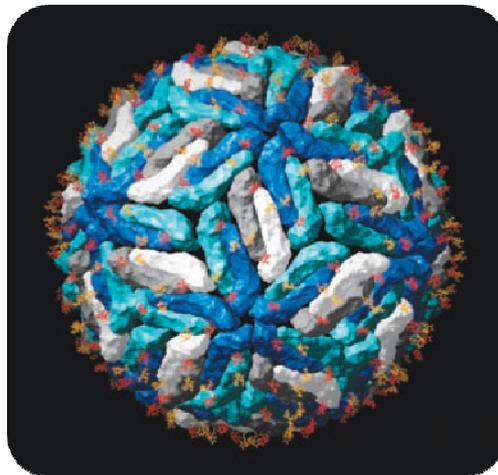


Figura 5. Distribución superficial de los 90 dímeros de la proteína E, se observa un patrón de simetría de 5 ejes, lo que permite que en algunas regiones (vértices) coincidan 5 dominios de la proteína E (azul fuerte) y en cada cara coincidan 3 dominios (verde agua). Como estructuras que sobresalen de la superficie se muestran los residuos de carbohidratos (en amarillo y naranja) (Tomado de Rey F. 2003)⁵⁰.

La traducción del genoma viral da origen a una gran poliproteína, que es procesada co- y post- traduccionalmente para dar origen a 10 proteínas virales maduras (Figura 6). Enzimas proteolíticas provenientes de la célula huésped, son responsables del corte entre C y prM, entre prM y E, entre E y NS1 y de NS4A, mientras que la enzima serina proteasa de origen viral es responsable del corte entre NS2A y NS2B, NS2B y NS3, NS3 y NS4A, NS4A y NS4B y NS5¹¹. La enzima responsable del corte entre NS1 y NS2A no se conoce.

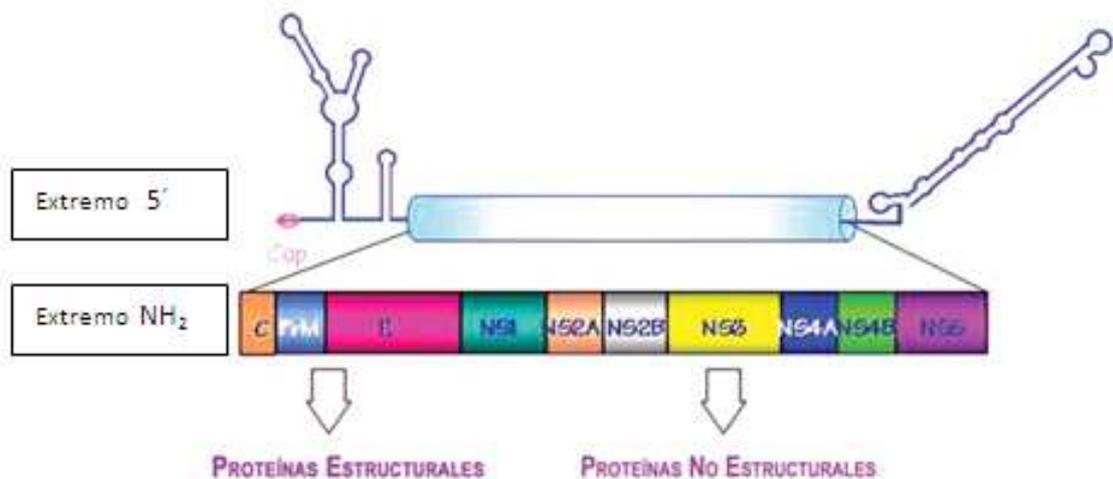


Figura. 6. Genoma del virus del dengue. El marco de lectura del virus del dengue, flanqueado por dos regiones no traducidas, codifica para tres proteínas estructurales: C, M y E, y siete proteínas no estructurales: NS1 a NS5. (Tomado de Del Ángel, R. M. 2006)

Proteínas del virus del dengue:

Proteína C. La proteína C es de carácter básico y pesa 11 KDa, contiene residuos de aminoácidos con carga en los extremos amino y carboxilo que median la interacción con el ARN viral, éstos se encuentran separados por un dominio hidrofóbico interno responsable de la asociación a membranas¹⁴. Contiene en su extremo carboxilo un péptido hidrofóbico que sirve como señal para la translocación de la proteína prM en el retículo endoplásmico (RE). Este dominio es separado de la proteína C madura por la serina proteasa viral.

Proteína M. La glicoproteína precursora de la proteína M (prM) de 26 KDa se localiza en el RE. La proteína E y prM forman un complejo heterodimérico inmediatamente después de su síntesis, donde prM es necesaria para el arreglo conformacional adecuado de E¹¹. Ya que la proteína prM presenta actividad de tipo chaperona. La conversión de partículas virales inmaduras a maduras ocurre en la vía secretora y consiste en la liberación del péptido prM por acción de una enzima residente en el Golgi denominada furina para generar la proteína M madura¹⁵.

Proteína E. La proteína E es la más grande y la más expuesta de la superficie viral, pesa aproximadamente 55 KDa y contiene los elementos estructurales y funcionales que participan en la unión e internalización del virus a la célula huésped. Esta proteína contiene 12 cisteínas conservadas que forman 6 enlaces disulfuro que mantienen su conformación. Su estructura como se observa en las Figuras 4 y 5, consiste en un homodímero antiparalelo, “arreglado” de cabeza a cola que se emplaza de manera paralela a la membrana viral. En la unión de los dominios I y II se forma una estructura como “saco” que puede servir como bisagra en los arreglos conformacionales durante la fusión membranar¹².

Proteína NS1. La proteína NS1 pesa 46 KDa y se encuentra tanto intracelular como en la superficie celular, además es secretada al medio extracelular como hexámero. Contiene 2 ó 3 sitios de N-glicosilación y 12 cisteínas conservadas que forman enlaces disulfuro. Después de su síntesis, forma homodímeros estables que son secretados extracelularmente. Durante la infección por dengue, existe una importante respuesta de anticuerpos fijadores de complemento dirigidos contra esta proteína¹⁶. La proteína NS1 presenta un

carácter parcialmente hidrofóbico y se asocia a la membrana celular, probablemente a través de un anclaje por glicosilfosfatidilinositol (GPI). La proteína NS1 puede ser reconocida por anticuerpos y de esta forma el complemento lisa a las células infectadas por el virus. NS1 es importante para la replicación viral. La proteína co-localiza ó comparte localización con vesículas membranosas en donde se postula que la replicación del virus se lleva a cabo. Mutaciones en su extremo amino producen defectos importantes en la replicación del ARN viral, los cuales pueden ser revertidos si se aporta la proteína en trans¹⁷.

Proteína NS2A. La proteína NS2A pesa 22 KDa y es hidrofóbica. También se asocia a vesículas activas en replicación y puede unirse a NS3 y a NS5 y a la región no traducida 3´del genoma. Una mutación en su aminoácido 190 resulta en un nivel de replicación normal de ARN viral, pero sólo se originan partículas virales que carecen de nucleocápside. Este efecto puede ser revertido en trans¹⁸. Por tanto es probable que esta proteína esté involucrada en coordinar el paso entre el empacamiento del ARN viral y la replicación¹².

Proteína NS2B. Esta proteína pesa 14 KDa y forma un complejo con NS3 que es un cofactor necesario para la actividad de serin proteasa de esta última¹².

Proteína NS3. La proteína NS3 pesa 70 KDa y tiene múltiples actividades enzimáticas, involucradas tanto en el procesamiento de la poliproteína, como en la replicación del ARN viral. La homología que presenta el tercio amino terminal de la proteína, con otras proteínas, predice la existencia de actividad de serina proteasa tipo tripsina. Asimismo, la proteína NS3 tiene actividad de

NTPasa estimulada por ARN y de ARN trifosfatasa (RTPasa) esenciales en la replicación viral¹².

Proteínas NS4A y NS4B. Estas proteínas pesan 16 y 27 KDa respectivamente. Su función es desconocida, sin embargo, ambas proteínas co-localizan en los sitios de replicación del genoma, por lo que podrían participar en este proceso. NS4B es una proteína transmembranal y con una secuencia de localización nuclear, cuya función es desconocida¹².

Proteína NS5. La proteína NS5 pesa 103 KDa, es la más conservada entre los miembros de la familia y tiene múltiples funciones, entre ellas la más importante es la replicación del ARN viral, ya que posee actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN¹⁹. Hacia la región amino terminal tiene homología con metil transferasa dependientes de S-adenosil metionina, lo que sugiere que esta proteína se encuentra involucrada en la formación del Cap 5'. Cuando se introducen deleciones que afectan la unión de S-adenosil metionina, éstas son letales para la replicación del virus²⁰. NS5 forma un complejo con NS3 estimulando su actividad de NTPasa.

Replicación viral

El ARN genómico del virus del dengue requiere primeramente ser traducido, generando las proteínas virales importantes en la formación del complejo de replicación. De acuerdo al mejor modelo estructural, el virión consta de 180 copias (90 homodímeros) de la proteína E, un número desconocido de las proteínas C y prM y una sola copia del ARN viral. Por lo tanto, la traducción del genoma viral debe ocurrir al menos para 180 ciclos por cada ARN genómico naciente que es producido y empacado. Una sola copia de ARN de polaridad

negativa sintetizada a partir del ARN genómico infectivo sirve como molde para la síntesis de ARN de polaridad positiva, originando un exceso de cadenas positivas de 10 a 100 veces con respecto a las negativas que continúan acumulándose durante la infección y que es posible aislar exclusivamente como moléculas de doble cadena²¹. Quizás, el uso del genoma viral como templado para la traducción es un proceso más eficiente que su uso como templado de replicación. El complejo de replicación se ensambla en el extremo 3', circularizando al ARN genómico de manera dependiente de las secuencias de ciclización y asociándose a membranas a través de su interacción con proteínas virales transmembranales. El templado es copiado en ARN de polaridad negativa el cual permanece unido por complementariedad de bases. Esta forma replicativa se convierte en un intermediario replicativo cuando el complejo comienza la síntesis de una nueva cadena mediante el proceso de replicación semiconservativa y asimétrica demostrado para el virus del dengue. La cadena naciente se mantiene unida al complejo replicativo por complementariedad hasta que es desplazada por otra cadena naciente, probablemente **Capeada** durante el siguiente ciclo de síntesis de ARN de polaridad positiva. Ciclos sucesivos de síntesis de ARN de polaridad positiva se llevan a cabo en la forma replicativa. Finalmente, el ARN de polaridad positiva es liberado al citoplasma en donde funciona como mensajero, o bien inicia el ensamblaje de viriones progenie.

Entrada viral

Los virus de manera general pueden entrar a la célula por varios mecanismos que incluyen : a) la fusión directa de la membrana viral en la membrana plasmática celular b) entrada por vesículas recubiertas por clatrina, c) entrada

por vesículas recubiertas por caveolina, ó d) por el mecanismo independiente de clatrina y caveolina. El virus del dengue, como todos los flavivirus, entra a las células por endocitosis mediada por receptor a través de vesículas cubiertas de clatrina²². Así que las macromoléculas presentes en la superficie celular juegan un papel crucial en los mecanismos que usa el virus para unirse y entrar a la célula blanco, así como para iniciar una cascada de señalización que posiblemente está relacionada con la fisiopatología de la enfermedad. Ambos procesos parecen estar íntimamente ligados.

La primera interacción con la célula huésped del virión del dengue está mediada por la unión de la proteína E con los receptores celulares. La proteína E es una glicoproteína de 55 KDa cuya estructura se ha determinado mediante cristalografía por difracción de rayos X y crio-electro microscopía descubriéndose tres dominios estructurales, los cuales son comunes para los distintos miembros de la familia *Flaviviridae* (Figura 4)⁴⁹.

El dominio I está formado por tres segmentos de aminoácidos que van de las posiciones 1 a la 52, de la 132 a la 191 y de la 278 a la 294 y contiene uno de los sitios de glicosilación, que es la aspargina 153. Este dominio central le da soporte estructural a la proteína entera. El dominio II está formado por los residuos 52 al 132 y del 193 al 280 y este dominio contiene al péptido de fusión. En este dominio se encuentra el segundo sitio de glicosilación en la aspargina 67. En los serotipos DEN2 y DEN4 sólo la Aspargina 67 está glicosilada, mientras que en los serotipos DEN1 y DEN3 presentan glicosilación en las dos posiciones aspargina 153 en el DI y aspargina 67 en el DII.

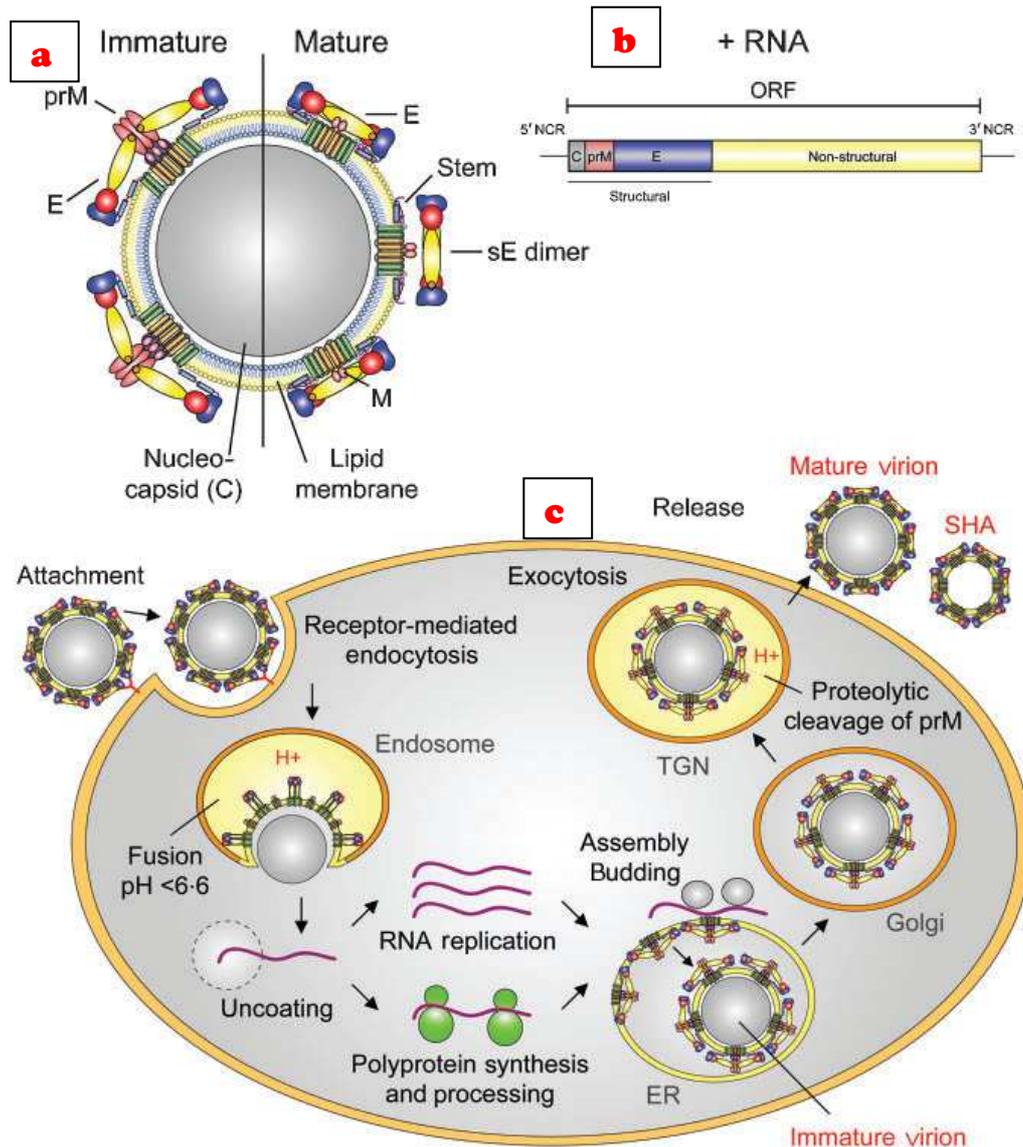


Figura 7. Representación esquemática del virus DEN maduro e inmaduro (a), de la organización del genoma (b) y del ciclo replicativo (c). En (a) del lado izquierdo se esquematiza la superficie de un virión inmaduro que contiene a las proteínas E y prM asociadas a la membrana, formando un estrecho complejo heterodimérico. En el curso de maduración del virus, prM es cortada, lo cual da por resultado el reacomodo de E en homodímeros (virus maduro, lado derecho del esquema). El producto del corte de prM, (M) en el extremo carboxilo, permanece asociado a la membrana. (b) Organización del genoma viral. (c) ciclo replicativo del virus, el virus entra por endocitosis mediada por receptor, luego el pH ácido en el endosoma induce alteraciones estructurales en E que permite la fusión con la membrana y la liberación de la nucleocápside al citoplasma. El ARN viral es traducido para iniciar la replicación. Después el virus se ensambla en el RE formando partículas virales inmaduras que son transportadas a través de la vía exocítica, a la red trans-Golgi (TNG, *trans-Golgi network*) donde el pH ácido y la acción de la proteína celular furina causan un cambio conformacional irreversible en el complejo prM-E necesario para la maduración del virus. Por último las partículas infecciosas maduras son liberadas por exocitosis (Tomado de Stiasny et. al. 2006).

El dominio III, esta formado por los aminoácidos 296 al 394, posee una estructura tipo inmunoglobulina, lo cual la hace única entre las glicoproteínas de envoltura. Este dominio participa en la interacción con el receptor de la célula huésped y por ello también en el tropismo tisular^{23,24,25}. Se ha visto que anticuerpos dirigidos contra este dominio, son capaces de inhibir la infección por dengue¹².

Una vez que el virus está dentro de la célula en una vesícula endocítica, el pH ácido en el interior causa alteraciones estructurales en la proteína E que conducen a la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal, la proteína E se vuelve trimérica, formando una estructura interna del tipo β -barril, tal como algunas proteínas bacterianas citotóxicas y porinas (Figura 8). El que E adopte esta estructura le permite formar una red de puentes de hidrógeno, mientras que en el exterior se despliegan los residuos hidrofóbicos para insertarse entre las cadenas alifáticas de la membrana celular fusionándose con la membrana del endosoma y así la nucleocápside es liberada al citoplasma de la célula huésped²⁶. (Figura 7).

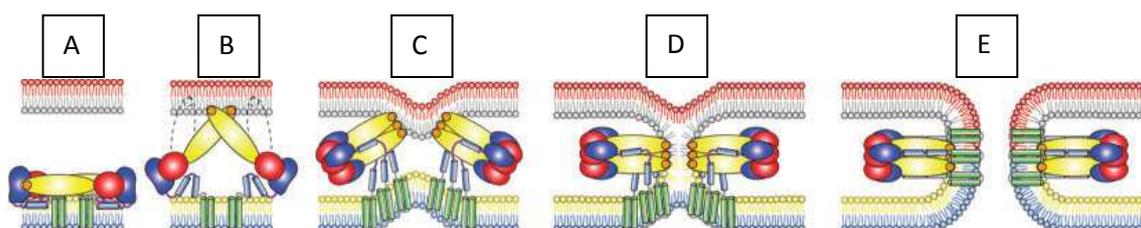


Figura 8. Esquema propuesto para los cambios conformacionales de la proteína E en el proceso de fusión de la superficie viral con la membrana. Código de colores: en gris la cara interna y en rojo la cara externa de la membrana de la célula huésped, en amarillo la cara interna y en azul la cara externa de la membrana viral. (a) Dímero de la proteína E sobre la superficie del virión maduro. (b) La acidificación del pH induce la disociación de los dímeros y la interacción de los monómeros con la membrana de la célula huésped vía proteínas de fusión. Las líneas punteadas indican la flexibilidad en la unión entre el DI (rojo) y DII (amarillo). (c) Iniciación de la formación de la horquilla de fusión, de la trimerización de la proteína E a través de la relocalización del DIII. (d) Hemifusión intermedia donde únicamente las caras externas de ambas membranas se unen. (e) Formación de la última estructura post fusión (trímero de E) y apertura del canal de fusión (Tomado de Stiasny et. al. 2006).

Células blanco y sus receptores en la infección por el virus del dengue

Como ya se mencionó, el primer evento en toda infección viral es la unión del virus a la superficie de la célula huésped y su entrada a ella. Este paso comprende la interacción entre la molécula de reconocimiento del receptor presente en la superficie del virus, a menudo llamada proteína de unión viral, y una molécula o moléculas presentes en la membrana de la célula huésped, conocida con el nombre de receptor celular. En el caso del virus del dengue la proteína de unión al receptor es la glicoproteína E⁴⁶. Esta proteína viral es multifuncional, ya que por una parte determina el reconocimiento del receptor, y por la otra media la fusión membranal una vez que el virus se encuentra dentro de una vesícula endocítica⁴⁷. A pesar de que la, ó las, moléculas receptoras para el virus no se han identificado, se han descrito varias proteínas que son reconocidas por éste en la superficie celular.

Se ha reportado que DEN2 es capaz de unirse a varias moléculas en la superficie de las células blanco, como el heparán sulfato (HS), un glicosaminoglicano (GAGs) que se encuentra presente en células Vero y BHK^{27,28,29}. Los GAGs son muy heterogéneos e importantes para el reconocimiento de diferentes tipos de ligandos y para la señalización celular⁵¹ y se encuentran ampliamente distribuidos en las células por lo que podrían participar en el tropismo celular del virus. DEN también se une a DC-SIGN en células dendríticas³⁰ y a GRP78 y al receptor de laminina en células hepáticas^{31,32}. Adicionalmente, se ha descrito que en células de neuroblastoma, U937 y en monocitos humanos, DEN usa un grupo de moléculas como su complejo receptor, entre las que se encuentran las proteínas de choque térmico HSP90 y HSP70. Este complejo receptor se

encuentra en microdominios membranales o rafts, sugiriendo que las regiones ricas en colesterol de la membrana plasmática son importantes para la entrada de DEN³³.

II. JUSTIFICACIÓN

Más de 2500 millones de personas, en más de 100 países, se encuentran en riesgo de infección por dengue, con millones de casos ocurriendo en todo el mundo cada año. En México las cifras van en aumento, lo cual representa un problema económico y de salud. Actualmente no existe una terapia antiviral efectiva para la infección por dengue, por tanto las estrategias de control contra la transmisión del dengue se basan principalmente en el exterminio de los mosquitos vectores. El desarrollo de vacunas contra el dengue representa una aproximación realista para controlar la infección por dengue^{34,35}. Sin embargo a pesar de los esfuerzos de diversos grupos de investigación y compañías farmacéuticas por crear vacunas, no se cuenta con una vacuna efectiva contra el virus del dengue, ya sea empleando virus atenuados, virus inactivados, virus quiméricos, vacunas de ADN, ó vacunas de subunidades recombinantes. Por lo tanto, el estudio de la proteína E y de sus diferentes dominios puede aportar información valiosa sobre su aplicación como subunidad vacunal, además de aportar información valiosa acerca del proceso de unión del virión a sus receptores celulares. Por que en la medida en que se conozcan los mecanismos de interacción entre el virus y los receptores celulares, será posible diseñar estrategias que permitan interrumpir ó impedir la unión del virus con sus receptores.

III. HIPÓTESIS

Si las proteínas recombinantes de los dominios DI,II,III y DIII de la proteína E del virus del dengue serotipo 2 son capaces de unirse a los receptores naturales del virus en células Vero entonces, dichas proteínas deben ser capaces de inhibir la infección en estas células, debido a que las proteínas recombinantes serian capaces de ocupar los sitios receptores, necesarios para la unión del virus del dengue con las células Vero.

IV. OBJETIVOS

Objetivos generales

Producir en *E. coli* proteínas recombinantes que contengan los dominios DI,II,III así como DIII por separado de la proteína E del virus del dengue serotipo 2 y verificar la funcionalidad y antigenicidad de dichas proteínas recombinantes.

Objetivos particulares

1. *Amplificar la secuencia nucleotídica que codifica para los dominios I,II,III y dominio III de la proteína E de DEN2.*
2. *Construir plásmidos recombinantes con la secuencia nucleotídica que codifica para las proteínas con los dominios I,II,III y III, de la proteína E de DEN2.*
3. *Inducir la expresión de las proteínas clonadas en E. coli.*
4. *Purificar las proteínas recombinantes.*
5. *Verificar la funcionalidad y antigenicidad de dichas proteínas recombinantes.*

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Amplificación de la secuencia nucleotídica que codifica para los DI,II,III y DIII de la proteína E de DEN2

La amplificación se logró por la técnica de PCR usando como templado el cADN genómico de la cepa Nueva Guinea de DEN2 (Donada por el Dr. Richard Kinney del CDC, Fort Collins, Colorado, USA) con los siguientes juegos de cebadores.

Oligonucleótido en sentido 5' a 3' (sentido) para el **DIII**:

5'-GATGGATCCAAAGGAATGTCATATTCTATG-3'

(Con un sitio de restricción para **Bam HI** subrayado)

Oligonucleótido en sentido 5' a 3' (antisentido) para el **DIII**:

5'-GATCTCGAGTTGGCCGATTGAGCTTCCTTT-3'

(Con un sitio de restricción para **Xho I** subrayado)

Oligonucleótido en sentido 5' a 3' (sentido) para el **DI,II,III**:

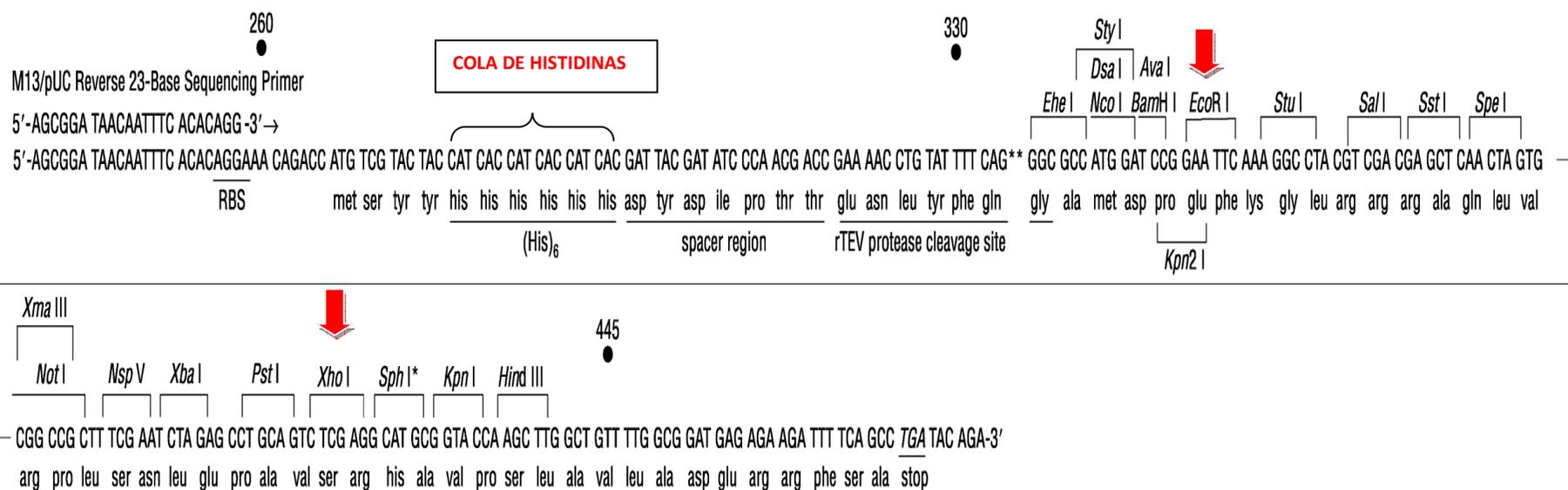
5'-GCCGGAATTCATGCGTTGCATAGGAATG-3'

(Con un sitio de restricción para **EcoRI** subrayado)

Se usó el mismo oligonucleótido antisentido para ambas amplificaciones. La secuencia de los oligonucleotidos fue diseñada tomando en cuenta la secuencia del sitio de multiclonación (poli-linker) del vector de expresión pProEx Hta y

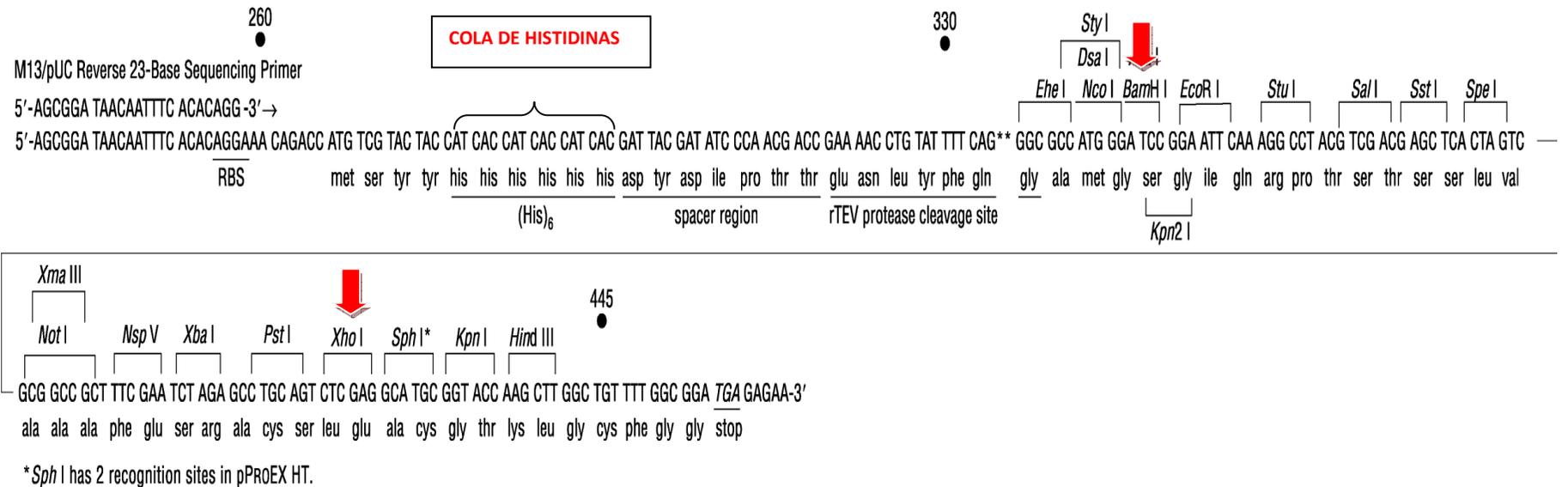
pProEx Htb, véase las paginas 23 y 24 (invitrogen™) de tal modo que se pudiera clonar la secuencia deseada sin errores en el sentido de la traducción, sin el corrimiento del marco de lectura y sin que las enzimas de restricción cortaran la secuencia o el plásmido en lugares no deseados.

Secuencia del sitio de multiclonación del vector de expresión **pPROEX HTa**. Las flechas rojas muestran el sitio de corte de las enzimas de restricción Eco RI y Xho I. En este vector se clonó el DI,II,III.



**Sph I* has 2 recognition sites in pPROEX HT.

Secuencia del sitio de multiclonación del vector de expresión **pPROEX HTb**. Las flechas rojas muestran el sitio de corte de las enzimas de restricción Bam HI y Xho I. En este vector se clonó el DIII.



La mezcla de reacción para la PCR se preparó según las especificaciones del proveedor, quedando como sigue:

Mezcla de reacción para DIII	Mezcla de reacción para DI,II,III
1 µL de cADN DEN2	1 µL de cADN DEN2
5 µL de amortiguador de reacción con MgCl ₂ 10X	5 µL de amortiguador de reacción con MgCl ₂ 10X
1 µL de cada oligonucleótido: 5'- GAT <u>GGATCC</u> AAAGGAATGTCATATTCTATG- 3' sen. 5'- GAT <u>CTCGAG</u> TTGGCCGATTGAGCTTCCTTT- 3' ansen.	1 µL de cada oligonucleótido: 5'- GCCG <u>GAATTC</u> ATGCGTTGCATAGGAATG-3' sen. 5'- GAT <u>CTCGAG</u> TTGGCCGATTGAGCTTCCTTT- 3' ansen.
0.25 µL de ADN Taq polimerasa 5 U/ µL	0.25 µL de ADN Taq polimerasa 5 U/ µL
1.25 µL de mezcla de dNTP's (10 mM cada uno)	1.25 µL de mezcla de dNTP's (10 mM cada uno)
40.5 µL de agua para PCR	40.5 µL de agua para PCR

Vol. Final para ambas reacciones: 50 µL

Condiciones de tiempo y temperatura para la PCR.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94° C	30 seg.
Alineamiento	55° C	30 seg.
Alargamiento	72° C	30 seg.
Alargamiento	72° C	10 min.
	4° C	∞
		30 ciclos

Terminada la PCR, se analizó una alícuota del producto de amplificación (tamaños esperados: 318 pb para DIII y 1197 pb para DI,II,III) por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio (ver apéndice I), usando un marcador de pares de bases de 1 Kb. El producto restante se guardó a -20°C.

Una vez que se identificaron las bandas con los tamaños moleculares buscados, se corrió un gel con el producto restante, las bandas se cortaron directamente del gel para su posterior purificación con el “*Gel extraction kit 150*” (QUIAGEN) según las indicaciones del fabricante.

Ligación del producto de amplificación purificado en el vector de clonación PJET1/blunt

La estrategia para la construcción de los plásmidos recombinantes y su expresión contempla como primer paso el clonaje de los genes de interés en un vector de clonación, y posteriormente el subclonaje de los genes de interés en vectores de expresión. En este caso se utilizó como vector de clonación el sistema “PJET1/blunt”, el cual permite el clonaje de los productos de PCR de manera directa e independiente de enzimas de restricción.

La mezcla de reacción se preparó según las indicaciones del fabricante “*Gene Jet PCR Cloning Kit*” (FERMENTAS™) quedando como sigue:

Reacción a) DIII	Reacción b) DI,II,III
10 µL de amortiguador de reacción 2X	10 µL de amortiguador de reacción 2X
2 µL del producto de PCR purificado secuencia nucleotídica de DIII	2 µL del producto de PCR purificado secuencia nucleotídica de DI,II,III
5 µL de agua libre de nucleasas	5 µL de agua libre de nucleasas
1 µL de enzima ADN blunting	1 µL de enzima ADN blunting

Se mezcló en vortex y se centrifugó 5 seg. Se incubó la mezcla a 70° C por 5 min pasando inmediatamente a hielo por 5 seg. Se añadió a cada tubo con la mezcla de reacción 1 µL del vector de clonación PJET1/blunt (50ng/ µL) y 1 µL de ADN ligasa T4 (5 U/ µL), se mezcló en vortex, se centrifugó por 5 seg, y se incubó la

mezcla a temperatura ambiente por 30 min. Esta mezcla de ligación se utilizó directamente para transformar células competentes (ver apéndice I).

Identificación de colonias que contienen el vector de clonación con el inserto DIII y DI,II,III por PCR colony

De la caja petri con el cultivo bacteriano se seleccionaron al azar 10 colonias, cada una se marcó, y de cada una se tomó una fracción para subcultivar en una caja petri con agar-LB-ampicilina 100 µg/mL y otra fracción para ser analizada por PCR. La mezcla de reacción para la PCR se preparó con: 5 µL de amortiguador de reacción con MgCl₂ 10X, 1 µL de cada oligonucleótido, 0.25 µL de ADN Taq polimerasa 5 U/ µL, 1.25 µL de mezcla de dNTP's (10mM cada uno) y 41.5 µL de agua. Los oligonucleótidos utilizados así como el programa empleado en el termociclador fueron los mismos que se emplearon para la amplificación de las secuencias de los dominios a partir del cADN genómico de DEN2.

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio y usando un marcador de 1 Kb. Posteriormente se eligió para cada una de las dos secuencias, una de las colonias aisladas que resultara positiva para el inserto deseado en base al análisis de las bandas más intensas. Los tamaños moleculares buscados fueron de 318 pb para DIII y 1197 pb para DI,II,III. Una azada de cada una de las colonias elegidas proveniente del subcultivo en cajas petri se hizo crecer por separado en 5 mL de medio LB-ampicilina 100 µg/mL, en agitación toda la noche a 37°C. Al día siguiente se tomó una asada del cultivo fresco para resembrar en una caja petri

con agar-LB-ampicilina y el resto para aislar y purificar el plásmido por lisis alcalina (ver apéndice I). Los plásmidos aislados y purificados de cada una de las dos secuencia provenientes de los 5mL de cultivo bacteriano se resuspendieron en 50µL de amortiguador, de este volumen se partió para el siguiente paso.

Reacción de restricción enzimática para liberar el inserto DIII y DI,II,III del plásmido PJET1/blunt

Como primer paso en el proceso de subclonaje, se procedió a liberar los genes de interés de los vectores de clonación PJET1/blunt utilizando los sitios de restricción ubicados en los oligonucleótidos empleados para la amplificación.

Mezcla de reacción a) DIII	Mezcla de reacción b) DI,II,III
Plásmido PJET1/blunt con DIII 70 µL	Plásmido PJET1/blunt con DI,II,III 70 µL
Anortiguador 10X de XhoI 10 µL	Amortiguador 10X de XhoI 10 µL
Enzima de restricción XhoI (20U/ µL) 4 µL	Enzima de restricción XhoI (20U/ µL) 4 µL
Enzima de restricción BamHI (20U/ µL) 4 µL	Enzima de restricción EcoRI (10U/ µL) 4 µL
Albúmina (100X) 1 µL	Albúmina (100X) 1 µL
H ₂ O 11 µL	H ₂ O 11 µL
Vol. Final = 100 µL	

La mezcla se agitó en vortex, se centrifugó 5 seg y se dejó incubando a 37°C toda la noche, al término de este paso, se analizó una alícuota en un gel preparativo de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio y usando un marcador de 1 Kb (MPB 1 Kb), una vez verificada la eficiencia del corte enzimático, se corrió el resto del volumen de la reacción en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio y MPB 1 Kb, se cortaron directamente las

bandas del gel, de 318 pb para el DIII y 1197 pb para el DI,II,III, se purificaron con el kit de extracción antes mencionado y se guardaron a -20°C.

Reacción de restricción enzimática para cortar el vector de expresión pProEx Hta y pProEx Htb

Para la expresión en *E. coli* de los genes clonados se utilizaron vectores de expresión de la familia pProExHt. Estos vectores poseen promotores para la expresión de proteínas clonadas en bacterias. A fin de mantener los marcos de lectura correctos para cada proteína, se utilizaron dos vectores de expresión diferentes. El vector de expresión pProEx Htb se utilizó para insertar la secuencia nucleotídica del dominio III y el vector pProEx Hta para insertar la secuencia para los dominios I,II,III. Para la linearización de los vectores cada vector fue restringido con las dos enzimas correspondientes al inserto al cual iban a ser clonados.

Mezcla de reacción a) pProEx Htb	Mezcla de reacción b) pProEx Hta
Vector pProEx Htb 20 µL	Vector pProEx Hta 20 µL
Amortiguador 10X de XhoI 10 µL	Amortiguador 10X de XhoI 10 µL
Enzima de restricción XhoI (20U/ µL) 4 µL	Enzima de restricción XhoI (20U/ µL) 4 µL
Enzima de restricción BamHI (20U/ µL) 4 µL	Enzima de restricción EcoRI (10U/ µL) 4 µL
Albúmina (100X) 1 µL	Albúmina (100X) 1 µL
H ₂ O 61 µL	H ₂ O 61 µL
Vol. Final = 100 µL	

La mezcla se agitó en vortex, se centrifugó 5 seg y se dejó incubando a 37°C toda la noche, al término de este paso, se analizó una alícuota en un gel preparativo de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio y usando un marcador de 1 Kb (MPB 1 Kb), una vez verificada la eficiencia del corte enzimático, se corrió el resto

del volumen de la reacción en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio y MPB 1 Kb. Se cortaron directamente las bandas con el tamaño molecular más grande del gel, correspondientes al vector cortado, se purificaron con el kit de extracción antes mencionado y se guardaron a -20°C.

Ligación del inserto en el vector de expresión

Para clonar el inserto en el vector de expresión primeramente se preparó un cocktail de ligación que contiene 1 µL de amortiguador de ligasa 10X, 0.5 µL de ATP 10 mM, 0.1 µL de BSA acetilado (10 mg/mL) y 1 µL de enzima de ligación T4. El volumen resultante es suficiente para una reacción y fue necesario multiplicarlo por el número de reacciones a realizar.

En un microtubo se agregó 1 µL del vector de clonación mas 1.5 µL del inserto, se aforó a 6.1µL con H₂O, se mezcló en vortex y centrifugó 5 seg, se incubó en baño maría a 68°C /3 min, se colocó inmediatamente en hielo, se le agregó 2 µL de cocktail de ligación, y se incubó en el termociclador con el siguiente programa: 3h/25°C, 3h/4°C, 10min/65°C, t[∞]/4°C.

Para verificar la eficiencia de ligación, se analizó una alícuota en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio y MPB 1 Kb. Luego se usó el resto del volumen para transformar bacterias competentes DH5α. De la caja de petri resultante se eligieron 6 colonias al azar para ser subcultivadas y analizadas por PCR colony para verificar la presencia de los dominios clonados. A manera de control negativo se sembró una caja petri con bacterias transformadas con vector cortado y sin inserto.

Inducción de la expresión de las proteínas DIII y DI,II,III en bacterias E. coli DH5α

Las bacterias usadas en este paso se eligieron a partir del análisis electroforético del producto de amplificación obtenido de la PCR colony, es decir se decidió usar aquellas colonias que mostraran la banda más intensa en el gel de agarosa. Las condiciones de inducción fueron las siguientes: densidad óptica $A_{550} = 0.6$, concentración de IPTG igual a 1mM y temperatura igual a 30°C, durante 4 h en agitación. Primeramente se llevó a cabo una inducción con un volumen de 3mL de cultivo bacteriano en medio LB con ampicilina (100 µg/mL) con cada una de las colonias elegidas con la finalidad de verificar por medio de un Western Blot (WB, ver apéndice I) la identidad de las proteínas y que éstas realmente se expresen óptimamente bajo las condiciones antes mencionadas. Las muestras a analizar en el gel se prepararon empastillando por centrifugación un volumen de 1mL de cultivo inducido. La pastilla se resuspendió en 50 µL de amortiguador Laemmli 1X y se desnaturalizó sumergiendo los tubos en baño maría hirviendo por 4 min. Una vez que se logró identificar las proteínas de interés, fue posible realizar una inducción con un volumen mayor de cultivo bacteriano para obtener la proteína necesaria para ensayos posteriores. Como control negativo en el ensayo de WB se usó un lisado de proteínas totales de bacterias transformadas sin inducir.

Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad

Los vectores de expresión utilizados pProEx Hta y pProEx Htb, generan las proteínas de interés fusionadas en su extremo amino-terminal a una cola de 6

histidinas (6XHis). Esta cola presenta una alta afinidad por el níquel y por lo tanto permite la purificación de las proteínas expresadas por cromatografía de afinidad con una resina con níquel. Las bacterias del cultivo recién inducido (500mL) se centrifugaron a 5000 g durante 20 min a 4°C. La pastilla se resuspendió con amortiguador de lisis (ver apéndice II) a razón de 5mL de amortiguador por cada gramo de peso húmedo de la pastilla. Se añadió 10 µL de lisozima (10µg/mL) por cada mL de amortiguador de lisis, dejando actuar 30 min en hielo. Posteriormente se añadió 4 µL de ADNsa (1U/mL) por cada 10mL, incubando por 10 min a 4°C, se centrifugó a 12000 g durante 30 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. A fin de extraer las proteínas de interés del sobrenadante, se agregó 1 mL de Ni-NTA (QUIAGEN) por cada 10 mL, y se dejó interaccionando en agitación toda la noche a 4°C. Al término de este tiempo se preparó una columna con filtro, se humedeció con amortiguador de lavado (ver apéndice II), se filtraron las perlas, se lavaron 3 veces con 5mL de amortiguador de lavado y por último se recuperó la proteína de interés con 3 lavados de 1mL cada uno con amortiguador de elución (ver apéndice II). Para eliminar la urea y el exceso de sales, el producto de la elución se dializó con membrana de 10 micras contra 1L de PBS 1X con 3 cambios consecutivos a PBS nuevo, durante 1 día en agitación a 4°C. Una vez dializada la proteína se dividió en alícuotas y se guardó a -20°C. Además cabe mencionar que cada alícuota de proteína fue cuantificada al momento de descongelarse para su uso inmediato debido a que la proteína sigue un proceso de descomposición.

Ensayo de inhibición de la infección en células Vero

A fin de evaluar si las proteínas recombinantes presentaban actividad funcional se llevaron a cabo ensayos en células *in vitro*, destinados a averiguar si las proteínas eran capaces de inhibir la infección por competencia con el virus por los sitios receptores. Estos ensayos se realizaron en células Vero (células de riñón de mono) sembradas en placas de 24 pozos, usadas al alcanzar el 85 % de confluencia; para ello en microtubos de plástico se mezclaron las proteínas recombinantes en las siguientes concentraciones: 1, 2, 4, 6, 8, y 10 µg/mL con 200µL de medio para células Vero sin suero por pozo. Se lavaron las células 2 veces con 1mL de PBS estéril en frío. Inmediatamente después se agregó el contenido de los tubos a los pozos de la placa con las células para permitir la interacción de la proteína con las células durante 1 hora a 37°C. Cuando terminó el tiempo de incubación con las proteínas, las células se lavaron 1 vez con 1mL por pozo con PBS estéril, de inmediato se agregó el virus a una MOI=10 a razón de 200µL por pozo y se permitió la infección durante 1 h a 37°C. Al fin de este tiempo y sin retirar el sobrenadante de los pozos se agregó 1mL de glicina ácida (ver apéndice II) por pozo para eliminar el virus que no logró entrar a las células durante el tiempo de infección, luego se retiró el sobrenadante, por aspiración, se lavó 3 veces con 1mL/pozo con PBS 1X estéril, se agregó 600 µL de medio completo para células Vero y se incubó por 48 h a 37°C. Al término de este tiempo se colectó el sobrenadante en microtubos de plástico y se mantuvieron a -70°C hasta su uso. La cantidad de virus presente en los sobrenadantes se evaluó por ensayos de plaqueo en células BHK-21.

Ensayo de plaqueo del virus del dengue en células BHK-21

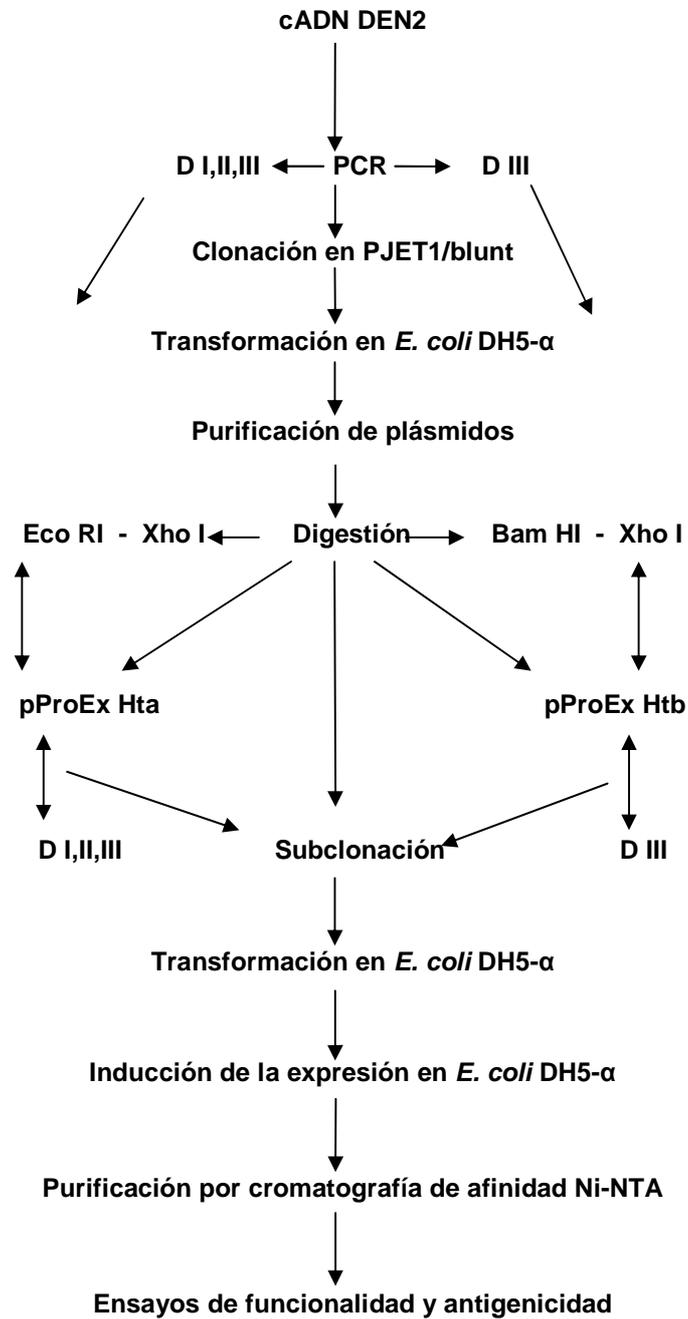
Para determinar la cantidad de virus producidos en el ensayo de inhibición de la infección se empleó el ensayo de plaqueo (formación de placas líticas) sobre células BHK21 (células de riñón de hámster) sembradas en placas de 24 pozos a un 75% de confluencia. Primeramente se tomó una alícuota de 50 μL de los sobrenadantes del ensayo de inhibición de la infección, y se hicieron cuatro diluciones seriadas con cada uno (10^{-1} a 10^{-5}) en microtubos con 500 μL de medio Hanks. Trascurrido este tiempo se comenzó a trabajar rápidamente con las células debido a que son muy susceptibles a la desecación y a los cambios de temperatura, sacando de la incubadora una caja a la vez, se retiró el sobrenadante de los pozos trabajando una fila a la vez, se agregó a cada pozo 200 μL de cada dilución por duplicado, se incubó 1 h a 37°C , se agregó 1 mL por pozo de carboximetilcelulosa al 0.8 % en medio completo (ver apéndice II) y se incubó por 5 días a 37°C .

Pasados los 5 días se retiró el sobrenadante de los pozos, se tiñó la monocapa celular con naftol blue-black, se retiró el exceso con agua y se dejaron secar las cajas al aire libre.

Inmunización de ratones y detección de anticuerpos

Una vez que fue probada la funcionalidad de las proteínas, se procedió a inmunizar ratones de laboratorio para averiguar si las proteínas recombinantes presentaban antigenicidad nativa, es decir saber si eran capaces de estimular la producción de anticuerpos capaces de reconocer la proteína E nativa. Un grupo de

cuatro ratones (R1 – R4) machos de un mes y medio de edad de la cepa BALB/c fueron inyectados intraperitonealmente en 5 ocasiones, una vez por semana con 50µg de proteína recombinante purificada (R1 y R2 con DIII; R3 y R4 con DI,II,III) emulsificada con “*Titer Max Gold Adjuvant*” (SIGMA). Los ratones fueron sangrados (100-200µL) de la cola un día antes de cada inoculación a fin de obtener suero preinmune a ser utilizado para el control negativo. Las subsecuentes muestras sanguíneas sirvieron para monitorear la aparición de los anticuerpos. Por último los ratones se sacrificaron 10 días después de la última inoculación, la sangre se centrifugó para separar el suero y éste se guardó a -70°C hasta su uso. La presencia de anticuerpos policlonales anti-DIII DEN2 y anti-DI, II, III DEN2 en el suero de ratón fueron analizados por WB en dilución 1:2000 sobre membranas de nitrocelulosa con **a)** las proteínas recombinantes, **b)** con proteínas totales de lisado de células C6/36 (células de mosquito) infectadas con DEN2 y **c)** con lisado de células C6/36 sin infectar como control negativo. Como anticuerpo secundario se usó el anti-ratón acoplado a peroxidasa siguiendo el protocolo antes mencionado.

ESQUEMA RESUMIDO DE LA METODOLOGÍA

VI. RESULTADOS

Amplificación de la secuencia nucleotídica que codifica para los DI,II,III y DIII de la proteína E de DEN2.

Para obtener las secuencias nucleotídicas que codifican para los dominios de interés que serían empleadas para insertar en el vector de clonación, se llevó a cabo la amplificación de dichas secuencias por RT-PCR a partir del genoma del virus del dengue serotipo 2 cepa Nueva Guinea "C" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con número de acceso U87411). La secuencia que codifica para la proteína E consta de 1,484 pb. El DI tiene 381 pb, el DII, 498 pb y el DIII, 318 pb. Las 287pb restantes pertenecen al dominio hidrofóbico de la proteína E. En la Figura 9 se muestra un gel de agarosa con los productos de amplificación obtenidos para los dominios I, II, III y III. Para ambos dominios se obtuvieron amplicones únicos con los tamaños esperados, es decir de 318 pb para el dominio III y de 1197 pb para los dominios I, II, III.

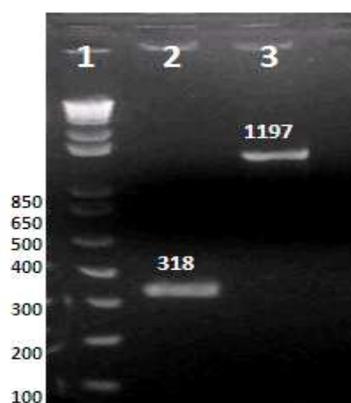


Figura 9. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos para los dominios III y I, II, III. El gel se preparó al 1.5% y se tiñó con bromuro de etidio. Carril 1: marcador de tamaño molecular (MTM), los valores en pares de bases (pb) se muestran a la izquierda. Carril 2: alícuota del producto de PCR correspondiente a la secuencia nucleotídica del dominio III de 318pb. Carril 3: alícuota del producto de PCR correspondiente a la secuencia nucleotídica de los dominios I,II,III de 1197pb.

Ligación en el vector de clonación PJET1/blunt.

Con la finalidad de obtener clones correspondientes a la secuencias nucleotídicas de interés, se ligó el producto de amplificación en un vector de clonación de un kit comercial. Para ello se empleó el plásmido PJET 1/blunt (FERMENTAS) que es un vector linearizado que permite clonar productos de PCR de manera independiente de enzimas de restricción. Este vector contiene un gen letal que es desactivado por la ligación del inserto de ADN en el sitio de clonación. El plásmido recombinante fue usado para transformar bacterias competentes de la cepa DH5- α . Como resultado sólo las células transformadas con el plásmido recombinante son capaces de propagarse.

Una vez clonadas las secuencias de interés en el vector PJET 1/blunt se procedió al subclonaje de las secuencias en un vector de expresión. Para liberar las secuencias insertadas en el vector de clonación que serían requeridas en el próximo paso, y para tener las secuencias nucleotídicas con los extremos cohesivos correctos para ser ligados en el vector de expresión, fue necesario extraer la secuencia ligada al vector de clonación con enzimas de restricción. Las enzimas se escogieron de modo que actúan única y específicamente sobre la secuencia de bases adicionadas en los oligonucleótidos y por tanto solo en los extremos de las secuencias de interés. Para ello se sometió a los plásmidos recombinantes a una reacción de digestión durante toda la noche con las enzimas Bam HI y Xho I para el plásmido con la secuencia del dominio III y con Eco RI y Xho I para el plásmido que contiene los tres dominios. En la Figura 10, carriles 5 y 9 se observa que los plásmidos restringidos liberan fragmentos de ADN que corresponden con los pesos esperados para los insertos correspondientes a los

dominios I, II, III de 1197pb y DIII de 318pb. También se aprecia que al cortar únicamente con la enzima Bam HI (carril 3) ó Xho I (carriles 4 y 8), se libera un fragmento no esperado, lo que sugiere que la enzima corta en dos sitios dentro de la secuencia del vector. A pesar de los resultados inesperados con el análisis de restricción del vector de clonación, se continuó con el proceso de subclonaje del inserto al vector de expresión.

Carril	Contenido
1	MTM 1 Kb.
2	Vector PJET-DIII sin cortar
3	Vector PJET-DIII cortado con Bam HI
4	Vector PJET-DIII cortado con Xho I
5	Vector PJET-DIII cortado con Bam HI y Xho I
6	Vector PJET-DI,II,III sin cortar
7	Vector PJET-DI,II,III cortado con Eco RI
8	Vector PJET-DI,II,III cortado con Xho I
9	Vector PJET-DI,II,III cortado con Eco RI y Xho I

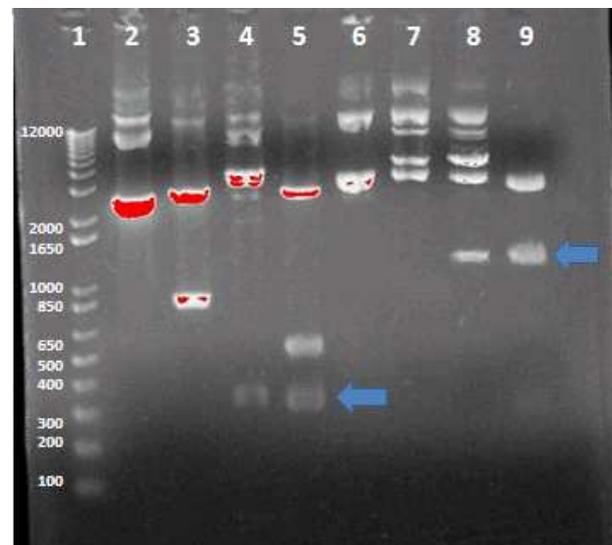


Figura 10. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión de los plásmidos recombinantes PJET1/blunt-DI,II,III y PJET1/blunt-DIII. El gel se preparó al 1.5% y se tiñó con bromuro de etidio. Para el contenido de cada carril, véase la Tabla a la izquierda de la Figura. En los carriles 5 y 9 se señalan con una flecha los fragmentos de DNA liberados que coinciden con el tamaño molecular de los dominios III y I, II, III respectivamente. Los tamaños de las bandas del marcador se muestran a la izquierda.

Reacción de restricción enzimática para cortar el vector de expresión pProEx Hta y pProEx Htb.

Con el objetivo de ligar la secuencia nucleotídica de interés en el vector de expresión, éste fue cortado con las mismas enzimas de restricción que cortaron la secuencia que sería ligada en dicho vector. De este modo, los extremos del

inserto y del vector resultan complementarios. Al utilizar enzimas de restricción distintas en el extremo 5' y en el extremo 3' se asegura la ligación del inserto en el vector de expresión en la orientación correcta. Ésto se logró sometiendo el vector de expresión pProEx Hta a la acción enzimática de Eco RI y Xho I y a pProEx Htb con Bam HI y Xho I. Al término de la reacción se tomaron alícuotas y se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% para verificar el resultado de las digestiones. Las bandas resultantes muestran la diferencia entre los vectores cortados con dos enzimas (Figura 11, carriles 5 y 9) y vectores cortados con cada una de las enzimas por separado (Figura 11, carriles 3,4,7 y 8). A manera de control se muestran los vectores de expresión sin cortar (Figura 11, carriles 2 y 6). Nótese que las bandas correspondientes a los vectores sometidos a acción enzimática se encuentran ligeramente por debajo de las bandas correspondientes a los vectores sin cortar, lo que sugiere la linearización de los vectores. Además el patrón de las bandas de los vectores cortados con las dos enzimas es claramente distinto a las de los vectores cortados con solo una enzima. Cabe mencionar que el tamaño de ambos vectores es de 4779 pb y que los tamaños de los fragmentos liberados son 72 pb para pProEx Htb y 65 pb para pProEx Hta (véase las secuencias de los polilinker en la pagina 23 y 24) y debido a su pequeño tamaño los fragmentos liberados no son visibles en el gel.

Carril	Contenido
1	MTM 1 Kb.
2	Vector pProEx Hta sin cortar
3	Vector pProEx Hta cortado con Eco RI
4	Vector pProEx Hta cortado con Xho I
5	Vector pProEx Hta cortado con Eco RI y Xho I
6	Vector pProEx Htb sin cortar
7	Vector pProEx Htb cortado con Bam HI
8	Vector pProEx Htb cortado con Xho I
9	Vector pProEx Htb cortado con Bam HI y Xho I

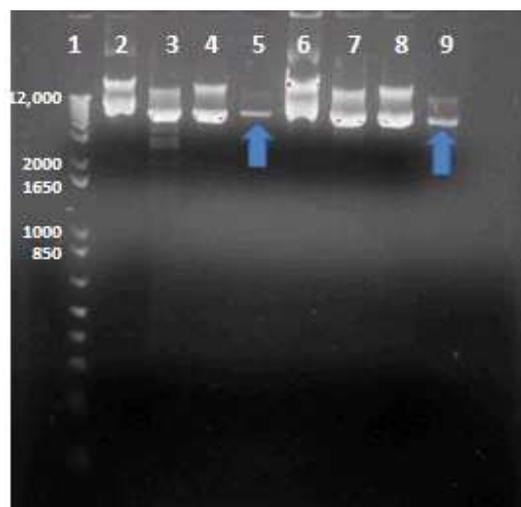


Figura 11. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la digestión de los vectores pProEx Hta (A) y pProEx Htb (B) con las enzimas de restricción. Las flechas azules indican la banda resultante de la digestión con ambas enzimas. Para el contenido de cada carril, véase la Tabla a la izquierda de la Figura.

Ligación de las secuencias nucleotídicas en el vector de expresión.

Para lograr la traducción y expresión de las secuencias es necesario subclonarlas en un vector que contenga los promotores y elementos necesarios que lo permita. Para tal efecto se emplearon los plásmidos comerciales pProEx Hta y pProEx Htb previamente linearizados con las enzimas de restricción. Posteriormente con la enzima ligasa T4 se catalizó la reacción que unió los extremos cohesivos y complementarios de los plásmidos pProEx Hta con los dominios I,II,III y pProEx Htb con el dominio III. En la Figura 12 se muestran los productos de la reacción de ligación del vector pProEx Hta con tres concentraciones diferentes de la secuencia con los dominios I,II,III analizados en un gel de agarosa al 1.5% donde se observa para todos los casos una banda muy tenue de un tamaño superior a las 5000 pb presumiblemente correspondiente al inserto ligado al vector, ya que

el vector mide 4779 pb y el inserto 1197 pb dando un total de 5976 pb. Dicha banda no se observó para el caso de la reacción control en donde se llevó a cabo la reacción de ligación en ausencia de inserto (Figura 12, carril 5). El mismo procedimiento fue aplicado para el vector pProEx Htb. El análisis de los productos de ligación por electroforesis mostró que también para el inserto del dominio III se obtuvieron productos de ligación (datos no mostrados).

Carril	Contenido
1	MTM 1 Kb
2	1 μ L de pProEx Hta + 0.5 μ L de DI,II,III cortado de PJET
3	1 μ L de pProEx Hta + 1 μ L de DI,II,III cortado de PJET
4	1 μ L de pProEx Hta + 1.5 μ L de DI,II,III cortado de PJET
5	1 μ L de pProEx Hta + 0 μ L de DI,II,III cortado de PJET como control (-)
	<i>NOTA: se probaron las mismas combinaciones para el caso del vector pProEx Htb con el inserto DIII.</i>



Figura 12. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos de reacción de ligación de la secuencia con los tres dominios en el vector de expresión pProEx Hta. Para el contenido de cada carril, véase la Tabla a la izquierda de la Figura.

PCR colony para la selección de colonias que contienen el plásmido con el inserto DIII y DI,II,III.

Con los plásmidos recombinantes pProEx Hta-DI,II,III y pProEx Htb-DIII formados con las combinaciones mostradas en la Figura 12 se transformaron bacterias competentes. El número de colonias que crecieron en cada caso fue proporcional a la cantidad de inserto utilizado en la reacción de ligación. Con el fin de identificar y aislar las colonias que realmente poseían el plásmido con el inserto de interés, se tomaron muestras de distintas colonias, se hizo una extracción de

ADN, y se sometieron a análisis por PCR con los oligonucleótidos utilizados para amplificar las secuencias de interés. De esta forma se eligieron a las colonias más apropiadas para inducir la expresión de las proteínas recombinantes. En las Figuras 13 y 14 se muestran los resultados del análisis por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% de los productos de la PCR de las distintas colonias escogidas al azar. En la Figura 13 se puede observar que de las 18 colonias analizadas, al menos 11 muestran poseer el inserto ya que se generan amplicones con el tamaño esperado de 1197 pb para la secuencia con los tres dominios. El mayor número de colonias positivas (5 de 6) se obtuvo cuando se utilizó la mayor concentración de inserto, es decir 1.5 μL (Figura 13 panel A). Es importante señalar que no se obtuvieron colonias positivas por PCR en la condición utilizada como control negativo, es decir, ligación de plásmido cortado pero sin inserto (0 μL).

Por otra parte, en la Figura 14 se demuestra que al menos 8 de las 18 colonias analizadas poseen el inserto de 318 pb correspondiente al dominio III y que el vector recombinante derivado de la ligación de 1 μL de pProEx Htb con 0.5 μL de DIII mostró el mayor número de colonias positivas, es decir, 5 de 6, seguido de la combinación con 1 μL de inserto con 3 colonias positivas. No se obtuvieron reacciones de amplificación positivas con el control negativo, es decir, plásmido ligado en ausencia de inserto.

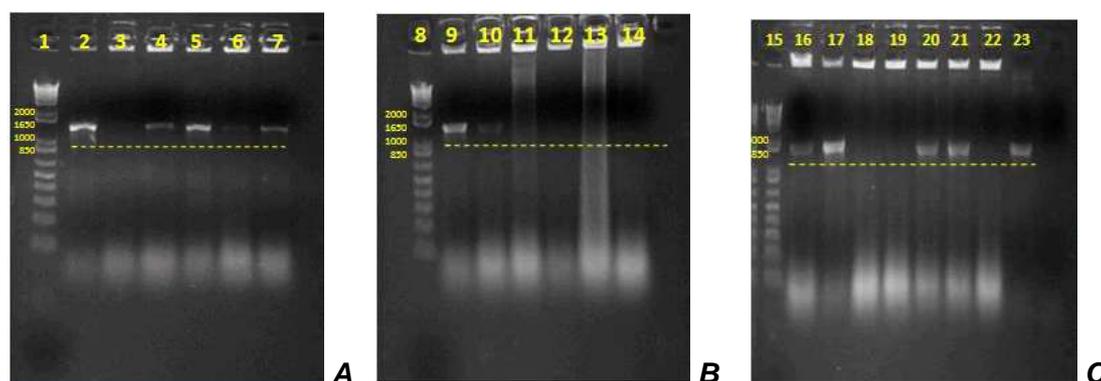


Figura 13. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de bacterias transformadas con el plásmido recombinante pProEx Hta-DI,II,III. **A)** En el carril 1 el MTM, los valores se muestran a la izquierda y 6 colonias (carriles 2 a 7) del cultivo con la ligación 1 μ L de pProEx Hta + 1.5 μ L de DI,II,III cortado de PJET. **B)** En el carril 8 el MTM y 6 colonias (carriles 9 al 14) del cultivo con la ligación 1 μ L de pProEx Hta + 0.5 μ L de DI,II,III cortado de PJET. Y **C)** En el carril 15 el MTM, 6 colonias (carriles 16 a 21) del cultivo con la ligación 1 μ L de pProEx Hta + 1 μ L de DI,II,III cortado de PJET. Carriles 22 y 23: Control negativo proveniente de una mezcla de colonias del cultivo de bacterias transformadas con pProEx Hta y control positivo proveniente del genoma de DEN2 respectivamente. Las bandas tienen el tamaño esperado de 1197pb lo que sugiere que la colonia posee el inserto del DI,II,III.

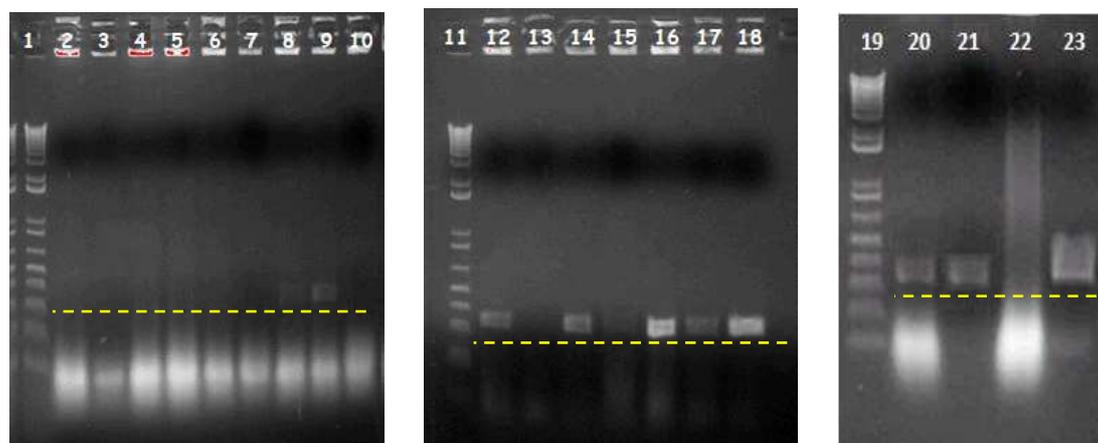


Figura 14. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de bacterias transformadas con el plásmido recombinante pProEx Htb-DIII. Carriles 1, 11 y 19: MTM. Carriles del 2 al 7: 6 colonias del cultivo con la ligación 1 μ L de pProEx Htb + 1.5 μ L de DIII cortado de PCR. Carriles del 8 al 14: 6 colonias del cultivo con la ligación 1 μ L de pProEx Htb + 1 μ L de DIII cortado de PCR. Carriles del 15 al 21: 6 colonias del cultivo con la ligación 1 μ L de pProEx Htb + 0.5 μ L de DIII cortado de PCR. Carriles 22 y 23: Control negativo proveniente de una mezcla de colonias del cultivo de bacterias transformadas con pProEx Hta y control positivo proveniente del genoma de DEN2 respectivamente. Las bandas tienen el tamaño esperado de 318pb lo que sugiere que la colonia posee el inserto del DIII.

Inducción de la expresión de las proteínas DIII y DI,II,III en bacterias E. coli DH5α.

Con el fin de confirmar que las proteínas recombinantes podían ser expresadas y de poner a punto las condiciones de inducción se llevaron a cabo ensayos de inducción a pequeña escala que posteriormente fueron analizados por electroforesis en geles de acrilamida y por WB.

Con base en el ensayo de PCR colony se separaron las colonias que mostraron de forma clara contener el inserto. Éstas se subcultivaron y se indujeron con IPTG por 4 horas en 3 mL de medio LB-ampicilina. Se centrifugó el cultivo, se resuspendió la pastilla con amortiguador de lisis y se centrifugó la solución de bacterias lisadas. Finalmente, el lisado se separó en sobrenadante y pastilla para determinar si la proteína de interés se encontraba en forma soluble o insoluble. Por último, las muestras fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 10% que se tiñó con azul de coomassie. En la Figura 15 se muestra la imagen de un gel de poliacrilamida teñido con azul de coomassie donde se analizaron las proteínas totales de 4 colonias de bacterias transformadas con los dominios I,II,III é inducidas con IPTG, y posteriormente separadas en dos fracciones, sobrenadante y pastilla. El patrón de bandas observado entre las fracciones, sobrenadante y pastilla es diferente, sin embargo, en ningún caso se observa ninguna banda correspondiente al peso de 44KDa esperado que sugiera la presencia de la proteína recombinante (para el DIII el peso esperado fue de aproximadamente 11 KDa, la imagen no se muestra). Fue por ello que se hizo necesario analizar las fracciones antes mencionadas mediante un ensayo de western blot utilizando anticuerpos comerciales contra la proteína E del virus. En la Figura 16 es posible

apreciar que efectivamente se esta produciendo la expresión de ambas proteínas recombinantes, y que las mismas se hallan primordialmente en la fracción de la pastilla. La localización de las proteínas recombinantes en la pastilla hace suponer que se encuentran de forma insoluble. A manera de control negativo se analizó un lisado de proteínas totales proveniente de bacterias no inducidas, y esta preparación resulto negativa (Figura 16). Asimismo, tampoco se observaron bandas con el lisado de bacterias inducidas en ausencia del primer anticuerpo, anti E.

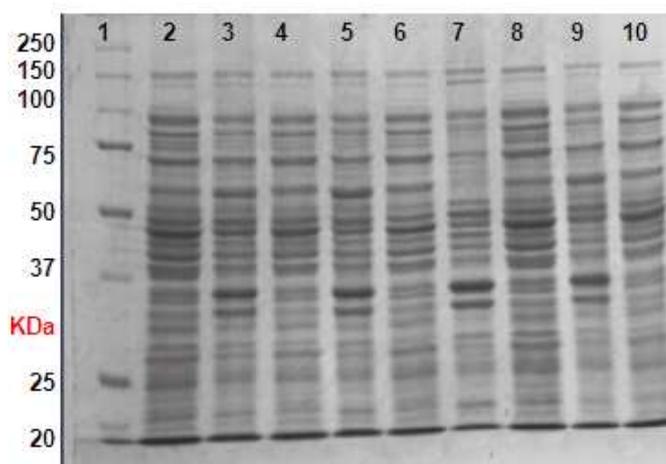


Figura 15. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de un lisado de proteínas totales de bacterias transformadas con pProEx Hta-DI,II,III. Carril 1: el marcador de peso molecular (MPM), los valores correspondientes a cada banda se muestran a la izquierda. Carriles 2,4,6 y 8: sobrenadante de proteínas totales de bacterias inducidas. Carriles 3,5,7 y 9: pastilla de proteínas totales de bacteria inducidas. Carril 10, proteínas totales de bacterias no inducidas.

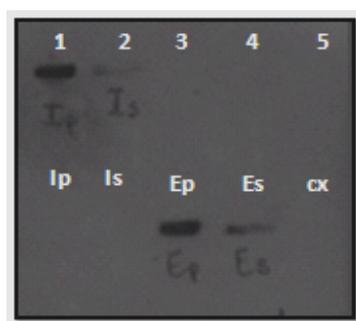


Figura 16. Análisis por Western blot de un lisado de proteínas totales de bacterias transformadas con los dominios de interés. Carril 1: pastilla (Ip) de proteínas totales de lisado de bacteria transformada con el plásmido recombinante pProEx Hta-DI,II,III é inducida con IPTG. Carril 2: sobrenadante (Is) de proteínas totales de lisado de bacteria transformada con el plásmido recombinante pProEx Hta-DI,II,III é inducida con IPTG. Carril 3: pastilla (Ep) de proteínas totales de lisado de bacteria transformada con el plásmido recombinante pProEx Htb-DIII é inducida con IPTG. Carril 4: sobrenadante (Es) de proteínas totales de lisado de bacteria transformada con el plásmido recombinante pProEx Htb-DIII é inducida con IPTG. Carril 5: a manera de control negativo (cx), proteínas totales de lisado de bacteria transformada con el plásmido recombinante pProEx Htb-DIII sin inducir. El marcador de peso molecular no se muestra sin embargo la disposición de las bandas es semejante al observado en la Figura 9. Nótese que las proteínas recombinantes se encuentran mayoritariamente en forma insoluble asociadas a la pastilla y no al sobrenadante.

Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad.

Las proteínas recombinantes se sometieron a un proceso de purificación por cromatografía de afinidad con el objetivo de tener la proteína lo mas pura posible y para evitar la presencia de proteínas contaminantes que pudieran interferir con los resultados esperados en los ensayos de funcionalidad y antigenicidad. Los vectores de expresión pProExHt contienen una secuencia de 6 histidinas que es adicionada a la secuencia de interés una vez que el inserto es ligado en el vector y es expresada junto con la proteína recombinante. La histidina tiene en su región variable un anillo de imidazol, este último presenta gran afinidad por el níquel, de este modo si se hace pasar la proteína recombinante a través de una columna con una resina compuesta con níquel es posible separarla casi por completo del resto de las proteínas. Sin embargo hay que tener en cuenta que cualquier proteína no

deseada que presente anillos de imidazol en su estructura también será capaz de unirse al níquel. La Figura 17 muestra el análisis de las proteínas recombinantes semipurificadas en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de coomassie. Como las proteínas se encontraban de manera insoluble fue necesario purificarlas bajo condiciones desnaturalizantes, solubilizándolas con urea 8M y dializándolas en PBS1X para eliminar la urea. Se puede observar que la primera elución (carriles 2 y 6) lleva la mayor cantidad de proteínas no deseadas mientras que en la segunda elución (carriles 3 y 7) y posteriores la cantidad de contaminantes disminuye y se obtiene un enriquecimiento considerable de las proteínas recombinantes. Aunque fue posible reducir la cantidad de proteínas contaminantes modificando el amortiguador de lavado e incrementando los lavados, no fue posible purificar las proteínas al 100% pero si con un alto grado de enriquecimiento.

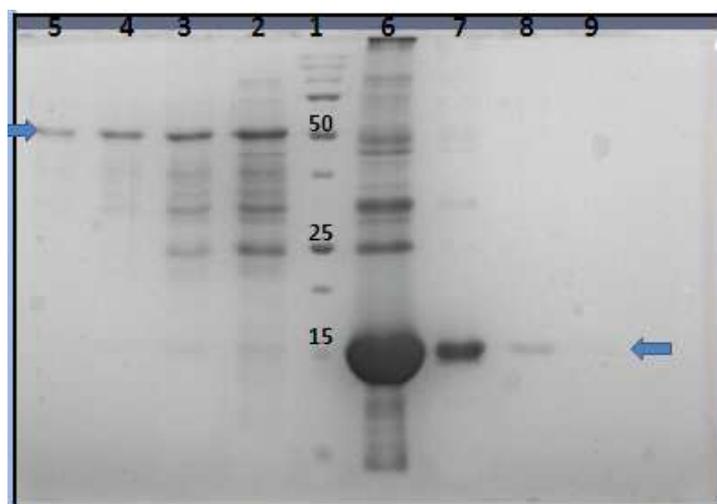


Figura 17. Análisis por electroforesis en gel de acrilamida de las proteínas recombinantes purificadas por cromatografía de afinidad. Carril 1: marcador de peso molecular, los valores se muestran arriba de cada banda. Carriles 2-5: eluciones consecutivas de la proteína de los dominios DI,II,III. Carriles 6-9: eluciones consecutivas de la proteína del DIII. Nótese que a partir de la segunda elución, (carriles 3 y 7) se obtienen las proteínas de interés en forma casi pura.

Inmunización de ratones y detección de anticuerpos.

Para saber si las proteínas recombinantes eran o no inmunogénicas, se inoculó con las proteínas emulsificadas con adyuvante a ratones Balb/c una vez por semana durante 5 semanas en forma dosificada. Una vez terminado el esquema de inmunización, los ratones fueron sacrificados para extraer el suero. Los sueros fueron analizados para evaluar su capacidad para reconocer a la proteína E nativa en un ensayo de WB sobre membranas de nitrocelulosa. Como antígeno se utilizó proteínas totales de células C6/36 infectadas con DEN2 que contienen a la proteína E completa en su forma nativa. Se utilizaron células C6/36 no infectadas a manera de control negativo y como control positivo a la proteína recombinante con los dominios I,II,III. En la figura 19 se muestra el análisis por western blot para la reactividad de los sueros inmunes de los 4 ratones inoculados con las proteínas recombinantes (2 ratones con DIII y 2 con DI,II,III). En éste se observa que todos los ratones respondieron ante el reto presentado por las proteínas recombinantes y que el suero inmune reconoce de manera eficiente a la proteína E presente en las células C6/36 infectadas con el virus del dengue serotipo 2. En los 4 sueros se observó el reconocimiento de una banda de aproximadamente 50 KDa, tamaño esperado para la proteína E completa. No se observó reactividad de ninguno de los sueros cuando se utilizó como antígeno las proteínas totales de lisados de células C6/36 no infectadas. Estos resultados sugieren que los sueros generados contra las proteínas recombinantes son capaces de reconocer la proteína E nativa.

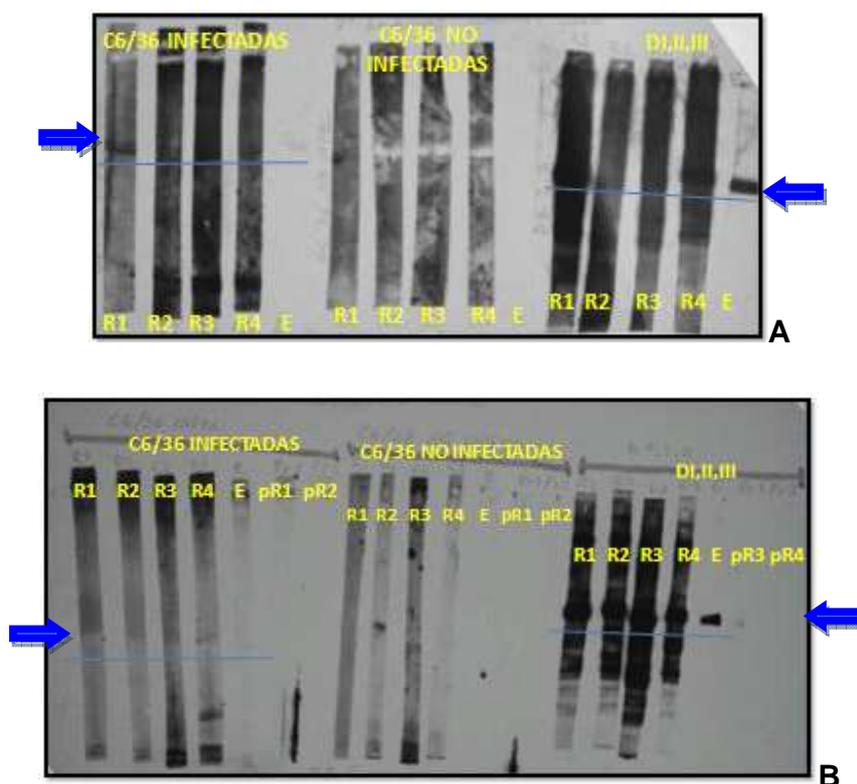


Figura 19. Análisis por western blot de la reactividad de los sueros inmunes anti-DEN2EDI,II,III y anti-DEN2EDIII producidos en ratón. **A)** Análisis de los sueros inmunes sobre tiras de nitrocelulosa con: 1) Proteínas totales de lisado de células de mosquito C6/36 infectadas con DEN2, 2) Proteínas totales de lisado de células C6/36 no infectadas y 3) Con la proteína recombinante de los tres dominios. **B)** Análisis de los sueros inmunes y de los sueros preinmunes sobre tiras de nitrocelulosa con: 1) Proteínas totales de lisado de células de mosquito C6/36 infectadas con DEN2, 2) Proteínas totales de lisado de células C6/36 no infectadas y 3) Con la proteína recombinante de los tres dominios. R1 y R2 son los ratones inoculados con la proteína del DIII, R3 y R4 con DI,II,III; pR1-4 son los sueros preinmunes.

Ensayo de inhibición de la infección en células Vero.

Con el fin de averiguar si las proteínas recombinantes eran capaces de mostrar funcionalidad biológica similar a la de la proteína E nativa, se llevó a cabo una serie de ensayos en células Vero de riñón de mono para intentar inhibir con las proteínas recombinantes la infección de las células con el virus DEN2 por competitividad por los sitios receptores. Las proteínas se dejaron interactuando 1 hora con las células y posteriormente fueron infectadas con el virus del dengue a

una MOI de 10 por 1 hora. Se permitió que la infección progresase por 48 horas y la progenie viral presente en el medio de cultivo se tituló por un ensayo de placas en células BHK-21. En la Figura 18 se muestran los resultados. El ensayo de inhibición de la infección en células Vero se llevó a cabo por triplicado mientras que el ensayo de plaqueo en células BHK21 se realizó por duplicado para cada uno de los ensayos de inhibición. El promedio de todos los ensayos practicados muestra que ambas proteínas recombinantes semipurificadas inhiben la infección en mayor ó menor grado de manera generalizada. Además los resultados sugieren que la proteína recombinante correspondiente al dominio III inhibe la infección de manera más eficiente que la proteína recombinante de los tres dominios. Aunque no se observa una clara relación dosis-respuesta, al parecer ambas proteínas en las concentraciones de 6 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhiben la infección en células Vero en mayor grado que el resto de las concentraciones ensayadas.

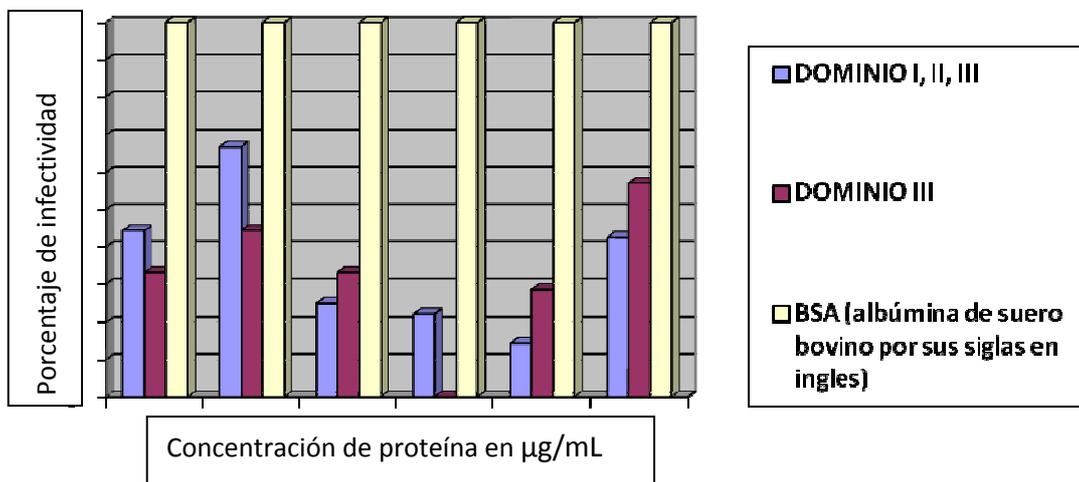


Figura 18. Ensayo de inhibición de la infección por el virus del dengue por competitividad con proteínas recombinantes. Gráfica de polígonos mostrando el promedio de los resultados observados en los ensayos de placas en células BHK-21. Los resultados están expresados en porcentaje tomando como 100% la infectividad observada en presencia de una proteína irrelevante.

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La infección por el virus del dengue tiene un gran impacto en la morbilidad y mortalidad en países en áreas tropicales y subtropicales del mundo. Como en toda infección viral, la interacción inicial entre la célula huésped y el virus representa un paso importante para el tropismo viral y para el comienzo del ciclo infeccioso celular. En el caso del virus del dengue esta interacción se lleva a cabo mediante la proteína de la envoltura ó proteína E. La proteína E media varias actividades biológicas importantes, que son esenciales para la infectividad del virus. Además en la proteína E se halla el epítipo neutralizante que induce la formación de anticuerpos protectores. Por lo tanto la proteína E es un importante antígeno en términos del desarrollo de estrategias de vacunación contra el virus del dengue y como reactivo para un rápido diagnóstico de la infección por dengue.

Se ha reportado que la proteína E del virus del dengue es un efectivo candidato como subunidad vacunal debido a su capacidad para interactuar con los receptores de la superficie celular¹¹ y por su habilidad para inducir la formación de anticuerpos protectores contra la infección viral^{38,39}. Sugrue y colaboradores³⁷ expresaron la proteína E del virus del dengue en *E. coli* y *P. pastoris* acompañada de una proteína de fusión llamada GST. Ellos lograron producir 2mg de proteína recombinante purificada por cada litro de cultivo bacteriano. Sin embargo la proteína de fusión provocó una excesiva degradación proteolítica de la proteína recombinante. Posteriormente resolvieron el problema deletando 100 aa del extremo carboxilo. De este modo alcanzaron un rendimiento final de 100 µg/L.³⁷ de la proteína recombinante. Por otra parte, Chiu y Yang reportaron haber removido el dominio hidrofóbico

de la proteína E, y lo remplazaron por una secuencia de S péptidos para luego ser expresado en *E. coli* (no mencionan el rendimiento). Su proteína recombinante pudo inhibir en un 90% la infección viral en células hospederas.⁴⁰ Además, Staropoli y colaboradores usaron células de insecto para expresar la proteína E con una proteína de fusión llamada MBP (por sus siglas en ingles, maltose-binding protein) obteniendo un rendimiento de aproximadamente 1mg/10⁹ cel.³⁶

Como se puede ver diversos investigadores han empleado diferentes proteínas de fusión y sistemas de expresión para lograr obtener a la proteína E. Y para ello han tenido que enfrentarse con problemas en la expresión y purificación que limitan la producción de la proteína a gran escala con fines de uso como subunidad vacunal. Una estrategia alterna contempla solo al dominio III de la proteína E por ser reconocido como el epítipo neutralizante de los receptores de las células hospederas, el cual en estudios previos ha sido expresado con proteínas de fusión usando proteínas acarreadoras como la TrpE,⁴² la proteína A,⁴³ la proteína MBP,⁴⁴ la proteína meningococica P64k,⁴⁵ esta ultima impidió su aplicación como subunidad vacunal. Además se reportó que la proteína TrpE conteniendo al DIII falló en la inducción de anticuerpos neutralizantes en ratones. Y que la proteína A no fue inmunogénica y que la gran afinidad de ésta por la inmunoglobulina humana impide su aplicación como candidato a subunidad vacunal. También se reporta que la proteína MBP con el dominio III expresado en *E. coli* confiere protección de forma parcial contra el reto letal, reduce la inmunogenicidad del DIII y produce un bajo título de anticuerpos. Además el riesgo de la proteína MBP en humanos no ha sido evaluado. La proteína P64k fusionada con el fragmento 286-426 aa de la

proteína E y expresado en *E. coli* semipurificado e inoculado en ratones proporcionó protección parcial contra el reto letal, pero causó degradación de la proteína además si se toma en cuenta que la proteína de fusión corresponde al 20% del total de la masa de la proteína quimérica eventualmente se comprometería la producción de la proteína recombinante a gran escala.

1. Construcción de los plásmidos recombinantes

Uno de los pasos más complicados en el proceso de clonación fue la ligación de las secuencias nucleotídicas de interés en sus respectivos vectores de expresión. La causa del fracaso en múltiples intentos por lograr hacer crecer bacterias con el nuevo plásmido producto de la ligación, es multifactorial. Sin embargo tal vez la razón más importante de tales fallos está relacionada con la subestimación de las concentraciones de inserto y vector. Una de las ventajas de haber ligado la secuencia de interés en un vector de clonación para productos de PCR (PJET1/blunt) es que se puede tener la certeza de que el fragmento de interés es liberado del vector por la acción de ambas enzimas de restricción y no sólo por una. Además de que la banda correspondiente a este fragmento se puede diferenciar claramente del resto del vector en el gel de agarosa. En cambio cuando se somete a los vectores de expresión pProEx Hta y pProEx Htb a la acción enzimática el fragmento que liberan es tan pequeño que sencillamente no se pueden diferenciar las bandas entre vector cortado y no cortado porque sus tamaños moleculares son casi iguales, además existe la posibilidad de que parte del vector haya sido cortado solo por una de las enzimas y no por ambas de este modo los extremos quedan complementarios y susceptibles a unirse nuevamente. Lo anterior trae como consecuencia la subestimación de la cantidad de vector cortado por las dos enzimas, cuyo

rendimiento al igual que el de la secuencia cortada del vector de clonación es ya de por sí bajo. Lo mismo sucede cuando se somete a acción enzimática a las secuencias de interés provenientes de la amplificación por PCR si se elimina el paso de la ligación en el vector de clonación PJET1/blunt.

La cantidad de plásmido para transformar células competentes depende de que cantidad de células competentes se desee transformar. La cantidad de inserto necesario para ligar en un vector está relacionado con la cantidad de este último. Así mismo la cantidad necesaria de cualquier enzima para la reacción de ligación está en función por ejemplo, de la cantidad de inserto y vector. Luego entonces la cantidad de producto depende de la adecuada proporción entre los reactivos en la mezcla de reacción. Entre otras cosas si uno de los reactivos está subestimado o no se conoce con certeza su concentración resulta fácil caer en un error de cálculo con el resto de los reactivos lo cual se ve reflejado en el resultado.

Otra particularidad de importancia que es necesario mencionar en este punto, es que por razones desconocidas el producto de la reacción de restricción enzimática del plásmido PJET1/blunt-DIII dió como resultado una conspicua banda extra de aproximadamente 500 pb que no se esperaba y que causó ciertas dudas al observar que fue ésta y no la de 300 pb como se esperaba, la que logró ligarse al vector de expresión. Debido a esta confusión se tomó la decisión de someter a reacción con las enzimas de restricción al producto de PCR correspondiente al DIII a reserva de la incertidumbre sobre si el inserto estaría cortado o no por ambas enzimas. Ambos insertos, uno cortado de PJET1/blunt y otro de PCR fueron ligados en el vector pProEx Htb e introducidos en bacterias competentes DH5 α , siendo mayor el crecimiento

bacteriano en el segundo caso. Observación que finalmente determinó la elección de tales bacterias para el trabajo posterior.

2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Teóricamente se esperaba que al eliminar el dominio hidrofóbico ó cola transmembranal de la proteína E, se resolvería el problema de la insolubilidad de las proteínas, que de antemano ya se tenía previsto, sin embargo no fue así. Las proteínas al ser insolubles forman cuerpos de inclusión, ello en primera instancia complica el proceso de purificación e incrementa el riesgo de degradación, subsecuentemente hace necesario el empleo de urea en altas concentraciones para poder solubilizar la proteína, lo que finalmente provoca la desnaturalización de la conformación estructural de la misma.

Con la finalidad de purificar las proteínas por cromatografía de afinidad, se adicionó a las mismas por medio del vector de expresión una secuencia nucleotídica codificante para una cola de 6 histidinas. La resina compuesta por perlas de níquel-ácido nitriloacético atrae no sólo a la cola de histidinas sino también a toda proteína no deseada que contenga anillos de imidazol en su estructura por lo que la técnica no es del todo eficiente. Se pudo observar que la primera elución lleva consigo la mayor concentración de las proteínas de interés, pero también va contaminada con una gran cantidad de proteínas extrañas que se unieron inespecíficamente a la matriz de níquel y que no se pudieron despegar en los lavados previos. En la segunda y tercera elución se puede observar una apreciable disminución de las proteínas contaminantes pero también va disminuyendo aunque en menor cantidad la concentración de las proteínas de interés, de hecho haciendo pequeñas modificaciones al

método de purificación fue posible reducir el problema, sin embargo a pesar de ello, nunca se logró una purificación al 100%. Cabe mencionar que inclusive se intentó un paso adicional consistente en correr en un gel de acrilamida las proteínas de la primera elución, teñir el gel con coomassie para identificar las bandas de interés cortarlas y electroeluir las para liberar las proteínas del gel. Lamentablemente el rendimiento fue muy bajo pues la mayor cantidad de las proteínas se perdió durante el proceso, además la proteína era acarreada junto con el colorante, y el amortiguador en el que eran recuperadas las proteínas resultaba inconveniente para ensayos posteriores.

Se ha reportado que las proteínas de bajo peso molecular son expresadas más fácilmente que las proteínas grandes^{36,37}. De hecho es posible apreciar en la imagen del gel de acrilamida (Figura 17) con las proteínas recombinantes eluidas que para una misma cantidad de cultivo se tiene más proteína del dominio III (12.6µg/mL) que de los dominios I,II,III (7.2µg/mL). Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford y su concentración disminuye gradualmente con el tiempo y con los cambios de temperatura.

3. Funcionalidad y antigenicidad de las proteínas recombinantes

Para ensayar y medir la capacidad de las proteínas recombinantes para neutralizar los sitios receptores de las células hospederas y por consiguiente disminuir o inclusive inhibir la infección por el virus DEN2, se realizaron ensayos de competencia entre las proteínas recombinantes y el virus. Para ello se infectaron células Vero previa incubación con las proteínas recombinantes; sin embargo, no fue posible observar placas líticas sobre éstas. Así que se

empleo un método indirecto consistente en usar el sobrenadante de las células Vero infectadas para sub-infectar células BHK21 donde si fue posible realizar un conteo de placas líticas. Tampoco se pudo llevar a cabo el ensayo de inhibición de la infección directamente sobre las células BHK21 pero a pesar de ello los resultados obtenidos por el método indirecto logran mostrar diferencias entre ambas proteínas. Las concentraciones de proteína recombinante que se ensayaron fueron 1,2,4,6,8 y 10µg/mL manteniendo constante una MOI=10, teóricamente se esperaba observar una disminución en la infección a medida que la concentración de proteína aumentaba, sin embargo los resultados mostraron un comportamiento aleatorio entre las distintas concentraciones e inclusive entre las dos proteínas. En todos los casos y para ambas proteínas se observó una reducción de la infección que en el mejor de los casos fue de hasta un logaritmo. También se observó que en promedio la proteína del dominio III confirió una mayor protección contra la infección con respecto a la proteína con los tres dominios y que las mejores concentraciones para inhibir la infección fueron las de 6 y 8 µg/mL. En el presente trabajo no se observó una clara relación entre la disminución de la infección y la concentración de proteína como el trabajo de Zhang *et al.*⁵³ Ellos reportan una reducción del 50% de unidades formadoras de placas (PFU del inglés *Plaque Forming Unit*) en células C6/36 con 4.5µg de proteína recombinante DEN2EDIII y una inhibición del 100% con 10µg de proteína recombinante. Además la inhibición obtenida con las proteínas recombinantes parece ser específica ya que no se observó ningún efecto a concentraciones idénticas de la proteína BSA utilizada como control.

En el caso de la antigenicidad se puede decir que los ratones presentaron una respuesta inmune satisfactoria ante el reto en la inoculación con las proteínas recombinantes lo cual significa que las proteínas son inmunogénicas en buena medida. Lamentablemente como se trata de anticuerpos policlonales el ensayo de WB se aprecia con poca claridad debido al reconocimiento inespecífico por parte de los anticuerpos policlonales, hacia un gran número de proteínas que comparten similitud de hasta solo fragmentos con las proteínas recombinantes, inclusive también se puede deber a anticuerpos contra los restos de proteínas contaminantes provenientes de *E. coli* que no se pudieron eliminar en el proceso de purificación de las proteínas recombinantes y que acompañaron a éstas en la inoculación de los ratones.

El mayor problema en torno a los nuevos candidatos vacunales siempre tiene que ver con la eficacia y la seguridad. Con respecto a la eficacia, se sabe que las vacunas contra *Flavivirus* que actualmente cuentan con licencia generan anticuerpos neutralizantes que brindan protección y que se requiere de bajos niveles de anticuerpos para generar una inmunidad protectora.⁵⁴ Lo que no se sabe es si esto es verdad o no para las vacunas contra el dengue, incluso si es así, como muchos investigadores creen, no se ha esclarecido cual es el nivel de anticuerpos neutralizantes que es requerido. Esta pregunta resulta particularmente complicada para una vacuna contra el dengue, ya que la enfermedad es causada por cuatro cepas de virus relacionados genética y serológicamente. Así que para una vacuna tetravalente, probablemente se requieran altos niveles de anticuerpos neutralizantes para controlar a las cuatro cepas de virus simultáneamente.⁵⁴ Además está el problema del ADE.

En pleno siglo XXI, la seguridad sigue siendo el principal atributo de una vacuna, aún más que la eficacia, ya que la sociedad no está dispuesta a aceptar eventos adversos asociados con la vacuna.⁵⁴ Por otro lado la lucha por controlar la fiebre por dengue y la fiebre hemorrágica por dengue, dependen en gran medida del esclarecimiento de la patogénesis de la enfermedad, de la respuesta inmune natural a la infección y de la diversidad genética del genoma viral, por lo que el desarrollo de vacunas potentes y seguras, sobre todo para las poblaciones que viven en áreas endémicas, continúa siendo un reto para los años venideros.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se logró clonar las secuencias que codifican para los dominios DI,II,III y DIII de la proteína E del virus del dengue serotipo 2.
2. Se logró la expresión de los dominios DI,II,III y DIII en bacterias *E.coli*. Sin embargo, ambos dominios fueron expresados principalmente en forma no soluble. El empleo de la técnica de cromatografía de afinidad con resinas de níquel permitió la purificación parcial de dichas proteínas.
3. Se obtuvieron sueros inmunes de ratón contra las proteínas recombinantes que fueron capaces de reconocer a la proteína E del dengue 2.
4. Las proteínas recombinantes de los dominios DI,II,III y DIII fueron capaces de competir con el virus del dengue y de bloquear parcialmente la infección en células Vero. La proteína correspondiente al DIII parece ser más eficiente que el dominio DI,II,III al competir con el virión.

APENDICE I

Método para la preparación de geles de agarosa

1. Se establece la concentración del gel en función del tamaño molecular de las muestras (entre más pequeño más concentrado) y se calcula el volumen necesario de gel en función del volumen de las muestras a correr y del volumen del molde que lo contendrá. Por ejemplo, para un gel al 1.5 % (para una secuencia de 1-2 Kb) en un volumen de 50mL, se disuelve 0.75g de agarosa en 50mL de TBE.
2. En un matraz erlenmeyer se disuelve la cantidad establecida de agarosa en el volumen necesario de amortiguador TBE 1X (ver apéndice II), calentando por breves lapsos de tiempo al microondas.
3. Una vez disuelto, se mezclan 2 μ L de bromuro de etidio*, se coloca el peine para formar los pozos en el molde equilibrado en una superficie firme y perfectamente horizontal para obtener un gel de espesor uniforme, se vierte suavemente la solución de agarosa y bromuro y se deja solidificar a temperatura ambiente.
4. El peine se retira, el molde se coloca en la cámara de electroforesis, la cámara se llena con amortiguador TBE 0.5X hasta cubrir el gel, las muestras se mezclan con 1/10 de volumen de amortiguador de carga (ver apéndice II), las muestras se vierten en los pozos, se agrega un marcador de tamaño molecular a uno de los pozos y por último la cámara se conecta a la corriente modulando el voltaje de tal forma que las muestras corran a

una velocidad que permita una buena separación de las bandas sin que estas se deformen. Generalmente 100 V son suficientes. El tiempo de electroforesis es variable, depende del momento en que se logra tener aislada hasta donde sea posible la banda de interés. En este sentido es necesario monitorear el gel exponiéndolo a la luz ultravioleta* el menor tiempo posible para evitar modificaciones en las secuencias nucleotídicas.

***Precaución:** A) el bromuro de etidio es un potente mutágeno y es moderadamente tóxico, por lo cual es necesario usar guantes cuando se trabaje con soluciones que contengan este colorante. Después del uso de estas soluciones es indispensable etiquetar, separar, descontaminar y/o desechar el material que tuvo contacto con las soluciones. B) la radiación ultravioleta es peligrosa, particularmente para los ojos. Para minimizar la exposición, es necesario usar adecuadamente el filtro del transluminador y usar goggles o una máscara que bloquee eficazmente la luz ultravioleta.

Preparación de células *E. coli* DH5 α competentes por el método de RbCl

1. En un tubo de ensaye estéril con 5mL de medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina 100 μ g/mL (ver apéndice II) se hace crecer una asada de bacterias de la cepa *E. coli* DH5 α , durante toda la noche en una incubadora con agitación a 37°C.

NOTA: es necesario evitar que las tapas de los tubos se sellen para permitir la aireación de las bacterias durante la agitación. A manera de

control se incluye un tubo con LB-amp. sin bacterias para corroborar que solo *E. coli* DH5 α creció.

2. Al día siguiente se inocula 1mL del cultivo anterior en 100mL de medio LB-amp. incubando a 37° C con agitación hasta una densidad óptica de $A_{550}=0.5$
3. Se deja enfriar el cultivo en hielo por 5 min y se centrifuga durante 5 min a 4000 g y 4°C, para colectar las células.
4. Se desecha el sobrenadante manteniendo las células siempre en hielo. Se resuspende la pastilla celular con un volumen de amortiguador TFB1 frío (ver apéndice II) correspondiente al 30% del volumen del cultivo celular y se incuba en hielo por 90 min.
5. Se colectan las células por centrifugación como en el paso 3, se desecha el sobrenadante y se resuspende la pastilla en 4mL de amortiguador TFB2 frío (ver apéndice II). Se hacen alícuotas en tubos estériles se congelan en nitrógeno líquido y se guardan a -70°C.

Transformación de bacterias competentes E. coli DH5 α

1. Se descongela en hielo una alícuota de 50 μ L de bacterias competentes *E. coli* DH5 α dejando incubar por 5 min.
2. Se agrega 0.7 μ L de β -mercaptoetanol 1:10, se mezcla manualmente y se incuba 10 min en hielo.

3. Se adiciona de 3-5 μL del vector, se mezcla manualmente y se incuba 10 min en hielo.
4. Se incuba durante 45 seg a 42°C en baño maría y rápidamente por 2 min en hielo.
5. Se adiciona 360 μL de medio LB atemperado a 37°C , se mezcla y se incuba en agitación por 30min a 37°C .
6. Se centrifuga por 30 seg a 12000 g y temperatura ambiente, se descarta el sobrenadante, la pastilla se resuspende en 100 μL de medio Luria, este volumen se siembra con espátula en una caja petri con agar-LB-ampicilina (ver apéndice II) y se deja crecer toda la noche a 37°C .

Purificación de plásmidos por lisis alcalina

1. En un microtubo de plástico se adiciona 1.5mL de cultivo bacteriano y se centrifuga a 12,000 g durante 30 seg a 4°C .
2. El sobrenadante se descarta y el botón celular se resuspende en vortex con 100 μL de solución I (ver apéndice II).
3. Se adiciona 200 μL de solución II (esta se debe preparar al momento ver apéndice II), se agita manualmente y se coloca en hielo.
4. Se agrega 150 μL de la solución III (ver apéndice II), se agita manualmente, se incuba 5 min en hielo y se centrifuga a 12,000 g durante 6 min a 4°C .

5. El sobrenadante sin la nata se transfiere a un tubo limpio, se le agrega un volumen igual de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamilico 25:24:1 y se agita suavemente.
6. Se centrifuga como en el paso 4 y se transfiere la fase superior a un tubo limpio, para precipitar el DNA agregando dos volúmenes de etanol al 100 %.
7. La mezcla se agita suavemente, se incuba a temperatura ambiente por 10 min, se centrifuga a 13,000 g durante 6 min a 4°C, se desecha el sobrenadante por decantación y se deja secar parcialmente la pastilla a temperatura ambiente.
8. Se lava la pastilla 2 veces con 1mL de etanol al 80%, centrifugando y dejando secar la pastilla como en el paso 7.
9. La pastilla se resuspende con 20-50µL de amortiguador TE (ver apéndice II) en función de que tan concentrado se quiera tener el plásmido, se adiciona 1 µL de RNAsa A, se incuba por 15 min a 37°C y se guarda a -20°C.

Método para la preparación de geles de poliacrilamida-SDS para proteínas

1. Primero es necesario armar el molde para el gel según las especificaciones del fabricante y verificar que no presente fugas de líquido. Los moldes se venden de diferentes espesores, en este caso se emplearon los de 1.5 mm de espesor.

2. Se prepara el gel separador. Para un gel separador al 10 % se mezcla 5mL de solución A, 3.7mL de solución B, 100 μ L de solución C, 1mL de H₂O, 40 μ L de persulfato de amonio (10 % p/v) y 16.6 μ L de TEMED. Este volumen es más que suficiente para llenar las $\frac{3}{4}$ partes necesarias del molde con espesor de 1.5 mm.
3. Se vierte la mezcla para el gel separador hasta las $\frac{3}{4}$ partes del volumen del molde, se vierte una pequeña cantidad de isopropanol sobre la superficie, se deja solidificar y se retira el isopropanol por decantación dejando evaporar los remanentes.
4. Se prepara la mezcla para el gel concentrador con 665 μ L de solución A, 625 μ L de solución D, 50 μ L de solución C, 3.6mL de H₂O, 100 μ L de persulfato de amonio y 5 μ L de TEMED. La mezcla se adiciona hasta llenar el espacio restante del molde, se coloca el peine para formar los pozos y se deja solidificar.
5. El peine se retira, el molde con el gel se coloca en la cámara para electroforesis, y la cámara se llena con amortiguador de proteínas 1X (ver apéndice II).
6. Las muestras se hierven 2-4 min en baño maría con amortiguador de carga de proteínas (Laemmli), se vierten en los pozos, se adiciona a un pozo extra el marcador de peso molecular y se conecta la cámara de electroforesis a la fuente de poder en este caso a 100 V hasta que el frente de corrida llega al borde del molde.

Método para Western Blot (WB)

1. La mezcla de proteínas totales sometidas a electroforesis en acrilamida se transfirieren a una membrana de nitrocelulosa empleando una cámara de electrotransferencia semihúmeda de la siguiente manera: se humedece en amortiguador de transferencia (ver apéndice II) una membrana de nitrocelulosa y 6 hojas de papel filtro ambos del tamaño del gel.
2. Se colocan en la cámara en forma de sándwich en el siguiente orden: tres hojas de papel filtro, la membrana de nitrocelulosa, el gel de poliacrilamida y finalmente tres hojas de papel filtro.
3. Se eliminan las burbujas entre el material, se cierra la cámara y se conecta a la fuente de poder a 16 V por 45 min.
4. Para verificar la transferencia, la membrana se tiñe con rojo de Ponceau (ver apéndice II), luego se señalan con lápiz las bandas del marcador y se retira el colorante de la membrana con abundante agua destilada.
5. La membrana se bloquea con leche sin grasa al 5% en PBS 1X (ver apéndice II) durante 1 h a 37°C en agitación, se enjuaga con PBS 1X y se añade el anticuerpo monoclonal primario anti E DEN2 (CHEMICON™) dilución 1:5000 con leche sin grasa al 1% en PBS 1X, así se incuba por 1 h a 37°C en agitación.
6. Transcurrido este tiempo, se realizan 4 lavados de 5 min cada uno con PBS 1X, se agrega el anticuerpo secundario anti-ratón femto peroxidasa dilución

1:1000 con leche sin grasa al 1% en PBS 1X y se deja incubando 1 h a temperatura ambiente en agitación.

7. Se realizan 3 lavados de 5 min cada una con PBS 1X, se retiró el exceso de PBS y se agrega la solución quimiolumincente (*“Kit Supersignal West Femto Maximum Sensivity Substrate”* Thermo Scientific Pierce Protein Research Products™.), se baña la membrana con la solución por 1 min protegida de la luz y se revela contra una placa fotográfica, la placa se fija se lava y seca.

Tratamiento de células para inmunofluorescencia

1. Las células Vero se siembran sobre laminillas de vidrio, en placas de 12 pozos al 60% de confluencia, se retira el sobrenadante y se hacen interaccionar con las proteínas purificadas a 37°C en concentraciones de 1,6 y 10 µg diluidas en medio para células Vero sin suero. Se retira el medio y se lavan las células 3 veces con PBS 1X frío estéril y filtrado para evitar contaminar las células y para evitar interferir con partículas extrañas en las imágenes del microscopio confocal.
2. Se fijan las células con 500µL de paraformaldehído fresco al 4% (ver apéndice II) por pozo, se incuban por 1 hora a temperatura ambiente, se lavan 3 veces con PBS 1X frío estéril y filtrado y se dejan secar a temperatura ambiente.
3. Si es necesario se pueden guardar a -70°C hasta su uso. Se hidratan con PBS 1X frío estéril y filtrado por 15 min, se retira la laminilla, se succiona el

exceso de PBS y se bloquean con una gota por laminilla de bloqueador para inmunofluorescencia (ver apéndice II) a 37°C por 1 hora. NOTA: Resulta económico fabricar una pequeña cámara húmeda para emplear solo unas cuantas gotas de reactivo en las laminillas de este modo se aplica la gota sobre una hoja de papel parafilm™, se coloca la laminilla cara abajo sobre la gota y se sella la cámara para evitar la evaporación.

4. Las laminillas se regresan a una caja de 12 pozos nueva para realizar un lavado con el PBS 1X filtrado y estéril, se retiran las laminillas, se seca el exceso de PBS y se agrega el anticuerpo primario anti E comercial (CHEMICON) en dilución 1:50 diluido con diluyente de anticuerpos para inmunofluorescencia (ver apéndice II), de esta dilución se agrega 25 µL por laminilla, se incuba por 1 hora a 37°C en cámara húmeda como se indica en el punto 3.
5. Se retiran las laminillas y se colocan en una caja limpia para lavarse con PBS 1X filtrado y limpio 5 veces por 10 min cada vez.
6. Se retira el exceso de PBS y se incuba 1 hora a 37°C (como antes pero en caja oscura para evitar la descomposición del fluorocromo) con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado al fluorocromo FITC dilución 1:100 diluido con diluyente de anticuerpos.
7. A partir de este punto es indispensable trabajar con rapidez debido a la degradación gradual del fluorocromo; después de incubar con el segundo anticuerpo, se lavan las laminillas 4 veces por 10 min con 1mL por vez de

PBS1X/NH₄Cl 50mM (ver apéndice II) para inhibir la autofluorescencia. Por último se hace un lavado con PBS1X filtrado para eliminar el NH₄Cl.

8. Sobre un portaobjetos perfectamente limpio y nuevo se aplica una gota de 3.5µL por laminilla de vectashield con dapi que retarda la descomposición del fluorocromo y tiñe de azul los núcleos de las células. Sobre la gota se coloca la laminilla cara abajo, se deja secar por 15 min y se sellan los bordes de la laminilla colocando esmalte transparente de secado rápido en el perímetro de la laminilla.
9. Si las laminillas no se emplean en el momento se pueden guardar por un corto periodo de tiempo a -70°C en una caja oscura y sellada hasta el momento de su observación al microscopio confocal.

APENDICE II

AMORTIGUADOR TBE 10X

- 108g de Tris base.
- 55g de ácido bórico.
- 9.3g de EDTA
- Aforar a 1L con H₂O destilada.
- Guardar a temperatura ambiente

AMORTIGUADOR DE CARGA PARA GELES DE AGAROSA 5X

- 2.5mL de Glicerol.
- 12.5mL de TBE 10X
- 2.5mL de SDS 10%
- 25mg de azul de bromofenol.
- 25mg de xilen xianol.
- Guardar a temperatura ambiente.

STOCK DE AMPICILINA (50mg/mL)

- Se pesan 0.5g de ampicilina y se mezclan en un tubo falcon con 9mL de H₂O destilada.
- Se agrega gota por gota NaOH 40% hasta lograr disolver la ampicilina.
- Aforar a 10mL con H₂O destilada.
- Se hacen alícuotas y se guardan a -20°C protegidas de la luz. Descongelar y mantener en hielo al momento de usarse. Una vez descongelada la ampicilina pierde actividad gradualmente.

MEDIO LB

- Se pesan 25g de medio LB y se afora a 1L con H₂O destilada.
- Mezclar perfectamente.
- Esterilizar en autoclave (20min. a 15lb/sq. in.) con el frasco cerrado no sellado, dejando libre 1/4 parte del volumen del frasco libre.
- Guardar a 4°C bien sellado, abrir en campana.

CAJAS PETRI CON AGAR-LB-AMP.

- 25g de medio LB.
- 14g de agar.
- Aforar a 1L con H₂O destilada.
- Mezclar perfectamente.

- Esterilizar en autoclave (20min. a 15lb/sq. in.).
- Dejar enfriar hasta 37°C y trabajar rápidamente antes de que solidifique.
- Trabajando en campana de aquí en adelante; se agrega la ampicilina 100µg/mL (2mL del stock) y se mezcla perfectamente.
- Llenar las cajas petri hasta la mitad de su volumen con la solución agar-LB-amp. Y eliminar las burbujas con un mechero a manera de soplete.
- Permitir que solidifique, las tapas se colocan y se sellan, las cajas se protegen de la luz con papel aluminio y se guardan a 4°C, abrir en campana.

AMORTIGUADOR TFB1

- RbCl 100 Mm
- $MnCl_2(2H_2O)$ 50 mM
- CH_3COOK 30 mM
- $CaCl_2$ 10 mM
- Glicerol 15 %
- Ajustar el pH a 5.8 con ácido acético y filtrar, guardar a 4°C.

AMORTIGUADOR TFB2

- MOPS 10 mM
- RbCl 10 mM
- $CaCl_2$ 75 mM
- Glicerol 15 %
- Ajustar el pH a 6.8 con KOH y filtrar, guardar a 4°C.

SOLUCIÓN I (PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS)

- Glucosa 50 Mm
- Tris-HCl (pH 8.0) 25 mM
- EDTA (pH 8.0) 10 mM
- Guardar a 4°C.

SOLUCIÓN II (PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS)

- NaOH 10 N (20 µL)
- SDS 10 % (100 µL)
- H_2O (880 µL)
- Preparar al momento

SOLUCIÓN III (PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS)

- CH_3COOK 5 M
- Àc. Acético glacial (11.5 mL)
- H_2O (28.5 mL)
- Guardar a 4°C.

AMORTIGUADOR TE

- 10 Mm de Tris.Cl
- 1 Mm de EDTA
- Ajustar el pH a 8.0
- Guardar a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN A (SDS-PAGE)

- 30 g de acrilamida
- 0.8 g de bis-acrilamida
- Aforar a 100 mL con H_2O destilada
- Guardar a 4°C.

SOLUCIÓN B (SDS-PAGE)

- 12.11 g de Tris base
- Aforar a 100 mL con H_2O
- Ajustar pH 8.8
- Guardar a 4°C.

SOLUCIÓN C (SDS-PAGE)

- SDS 10 % p/v
- Guardar a temperatura ambiente

SOLUCIÓN D (SDS-PAGE)

- 12.11 g de Tris base
- Aforar a 100 mL con H_2O
- Ajustar pH 6.8
- Guardar a 4°C.

AMORTIGUADOR DE CARGA LAEMMLI (SDS-PAGE) 2X

- 100 mM Tris.Cl (pH 6.8)
- 200 mM de β -mercaptoetanol
- SDS 4%
- 0.2% de azul de bromofenol
- 20% glicerol
- Guardar a temperatura ambiente protegido de la luz.

AMORTIGUADOR PARA ELECTROFORESIS (SDS-PAGE) 10X

- 14.4% p/v de glicina
- 3% p/v de Tris base
- 1% p/v de SDS
- Guardar a temperatura ambiente.

AMORTIGUADOR DE ELECTROTRANSFERENCIA

- 2.91 g de Tris base
- 1.41 g de glicina
- 50 mL de metanol
- Aforar a 500 mL con H₂O
- Guardar a temperatura ambiente.

ROJO DE PONCEAU

- 0.1% p/v de Ponceau S
- Ácido acético al 5%
- Guardar a temperatura ambiente.

AZUL DE COOMASIE

- 0.2% p/v de azul de coomassie R250
- 50% de metanol
- 7% de Ácido acético
- Aforar con agua destilada al volumen deseado.
- Guardar a temperatura ambiente protegido de la luz.

SOLUCION PARA DESTENIR

- 30% de metanol
- 7% de Ácido acético
- Aforar con agua destilada al volumen deseado.
- Guardar a temperatura ambiente.

PBS 10X

- 2.4g de NaH_2PO_4
- 14.4g de NaHPO_4
- 80g de NaCl
- 2g de KCl
- Aforar a 900mL con H_2O destilada y ajustar el pH a 7.2-7.4 con NaOH ó HCl .
- Aforar a 1L con H_2O destilada.
- Guardar a temperatura ambiente.

AMORTIGUADOR DE LISIS PARA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

- NaH_2PO_4 100 Mm
- Tris base 0.1 mM
- Imidazol 20 mM
- En H_2O , ajustar el pH 8.0 y preparar al momento

AMORTIGUADOR DE LAVADO PARA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

- NaH_2PO_4 100 Mm
- Tris-Cl 10 mM
- Urea 8 M
- Imidazol 20 mM
- En H_2O , pH 6.3 preparar al momento.

AMORTIGUADOR DE ELUCIÓN PARA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

- NaH_2PO_4 100 Mm
- Tris-Cl 10 mM
- Urea 8 M
- Imidazol 250 mM
- En H_2O , pH 4.5 preparar al momento.

BLOQUEADOR PARA INMUNOFLUORESCENCIA

- PBS 1X
- Suero fetal bobino 10%
- Albúmina de suero bovino 3%
- Glicina 10 mM
- Guardar a -20°C

DILUYENTE DE ANTICUERPOS PARA INMUNOFLUORESCENCIA

- PBS 1X
- Suero fetal bobino al 3%
- Albúmina serica bovina 1%
- Glicina 10 Mm
- Guardar a -20°C

PARAFORMALDEHIDO 4%

- 0.6 g de paraformaldehido granular
- 15mL de PBS1X
- Calentar a no más de 56°C hasta disolver.
- Hacer alícuotas y guardar a -20°C protegido de la luz, una vez descongelado no se vuelva a usar.
- **Precaución:** el paraformaldehido es en extremo toxico, se requiere el uso de guantes y cubre bocas, el reactivo en polvo es muy susceptible a la más leve electroestática, cuidado al pesar.

GLICINA ÁCIDA

- 8g de NaCl
- 0.38g de KCl
- 0.1g de MgCl.6H₂O
- 0.1g de MgCl.2H₂O
- 7.5g de glicina
- Aforar a 100mL con H₂O destilada y ajustar el pH a 2.8-3
- Guardar a 4°C.

CARBOXIMETILCELULOSA

- 1.6g de carboximetilcelulosa
- Disolver el 100mL de agua destilada con ayuda de un agitador magnético, una vez disuelto se esteriliza en autoclave, se deja enfriar y se le adiciona 100 mL de medio completo para células BHK-21.
- Guardar bien sellado a 4°C y abrir en campana.

NAPHTHOL BLUE BLACK

- 1g de naphthol blue black
- 13.6g CH₃COONa
- 60mL de ácido acético glacial
- Aforar a 1L con agua destilada.

PERSPECTIVAS

- Realizar un ensayo de neutralización del virus del dengue en células Vero o C6/36 con los sueros inmunes.
- Realizar un ensayo de protección contra la infección por el virus del dengue en ratones BALB/c lactantes mediante la inoculación con los sueros inmunes.
- Evaluar el potencial de las proteínas recombinantes como antígeno de protección contra la infección por el virus del dengue en un modelo murino.

IX. REFERENCIAS

1. Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. and Rossmann, M. (2005) *A structural perspective of the Flavivirus life cycle*. Nature Rev. Microbiol.
2. Gluber, D. (1998) *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Clin. Microbiol. Rev. 11:450-496.
3. Mc Bride, W. and Bielefeldt-Ohmann, H. (2000) *Dengue viral infection: pathogenesis and epidemiology*. Microbes and Infection 2:1041-1050.
4. Malavige, G., Fernando, S., Fernando, D. and Seneviratne S. (2004) *Dengue viral infections*. Postgrad. Med. J. 80:588-601.
5. Del Angel, R. M. (2006) *Entrada del Virus Dengue: Moléculas que pueden modular la patogenia viral*. Cinvestav. 38-43.
6. Mendoza, M., Benito, J., Mendoza H., Martinez, S., and Del Angel, R.M. (2002) *A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45-KDa glycoprotein*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 67:76-84.
7. Hull, B., Tikasingh, E., De Souza, M. and Martinez, R. (1984) *Natural transovarial transmission of dengue 4 virus in Aedes aegypti in Trinidad*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33:1248-1250.
8. Kuno, G., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N. and Cropp, C. B. (1998) *Phylogeny of the genus Flavivirus*. J. Virol. 72:73-78.
9. Lindenbach, B. D. and Rice, C. M. in Fields Virology (eds Knipe, D. M. and Howlwy, P. M.) 991-1041 (Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001).

10. Rosen, L. (1999) *Comments on the epidemiology, pathogenesis and control of dengue*. Med. Trop. 59:495–498.
11. Chen, Y., Maguire, T., Marks, R.M. (1996) *Demonstration of binding of dengue envelope protein to target cells*. J. Virol. 70:8765–8772.
12. Reyes del Valle, J. (2004) *Identificación del complejo receptor para el virus dengue en células humanas*. Tesis de Doctorado. CINVESTAV.
13. Kuhn, R. J. et al. (2002) *Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, end fusion*. Cell 717-725.
14. Markoff, L., Falgout, B., Chang, A. (1997) *A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein*. Virology 105-117.
15. Elshuber, S., Allison, S.L., Heinz F. X. and Mandl, C.W. (2003) *Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick borne encephalitis virus*. J. Gen. Virol. 183-191.
16. Falgout, B., Bray, M., Schlesinger, J. J, Lai, C. J. (1990) *Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus non-structural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis*. J. Virol. 4356-4363.
17. Khromykh, A. A., Sedlak, P., Westaway, E. G. (2000) *Cis- and trans-actin elements in flavivirus RNA replication*. J Virol. 3252-3263.
18. Kummerer, B. M., Rice, C. M. (2002) *Mutations in the yellow fever virus non-structural protein NS2A selectively block production of infectious particles*. J Virol. 4773-4784.

19. Ackermann, M., Padmanabhan, R. (2001) *De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase.* J. Biol. Chem. 39926-39937.
20. Liu, W. J., Sedlak, P. L., Kondratieva, N., Khromykh, A. A. (2002) *Complementation analysis of the flavivirus Kunji NS3 and NS5 proteins defines the minimal regions essential for formation of replication complex and shows a requirement of NS3 in Cis for virus assembly.* J. Virol. 10766-10775.
21. Khromykh, A. A., Westaway, E. G. (1997) *Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin. Constructions and applications* J. Virol. 1497-1505.
22. Rice, C. M. (2001) *Flaviviridae: The Viruses and the replication.* In: Field's Virology 4th edition Knipe, D. M., Howley P. M. Lippincott Williams & Wilkins pp 991-1041.
23. Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. and Harrison, S. (2004) *Structure of the DEN envelope protein after membrane fusion.* Nature. 427:313-319.
24. Crill, W. and Roehring J. (2001) *Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells.* J. Virol. 75:7769-7773.
25. Allison, S., Schalich, J. Stiasny, K., Mandl, C. and Heinz, F. (2001) *Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E.* J. Virol. 75:4268-4275.
26. Stiasny, K., and Heinz, F. (2006) *Flavivirus membrane fusion.* J. Gen. Virol. 87:2755-2766.

27. Hung, S., Lee P., Chen H., Kao, C. (1999) *Analysis of the steps involved in dengue virus entry into host cells*. Virology. 257:156-167.
28. Huang, K., Yang, Y., Lin, Y., Huang, J., Liu, H., Yeh, T., Chen, S., Liu, C. and Leiz, H. (2006) *The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection*. J. Immun. 176:2855-2832.
29. Lei, H. Y., T. M., Yeh, H. S., Liu, Y. S., Lin, S. H., Chen, and C. C. Liu (2001) *immunopathogenesis of dengue virus infection*. J. Biomed. Sci. 8:377-388.
30. Tassaneetrithep, B., Burgess, T., Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D., Steinman, R., Schlesinger, S. and Marovich, M. (2003) *DC-SIGN (CD209) Mediates dengue virus infection of human dendritic cells*. J. Exp. Med. 197:823-829.
31. Theppari, C. and Smith, D. (2004) *Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-KDa/67KDa high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor*. J. Virol. 78:12647-12656.
32. Lozach, P., Burleigh, L., Staropoli, I., Sanchez, E., Harriague, J., Virelizier, J., Rey, F., Despre's, P., Seisdedos, F. and Amara, A. (2005) *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals*. J. Biol. Chem. 280:23698-23708.
33. Reyes del Valle, J., Chavez, S., Medina, F. and Del Angel, R. (2005) *Heat Shock protein 90 and Heat Shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells*. J. Virol. 79:4557-4567.

34. Bhamarapravati, N., Sutee, Y., (2000) *Live attenuated tetravalent dengue vaccine*. *Vaccine* 18:44-47.
35. Eckles, K.H., Dubios, D.R., Putnak, R., (2003) *Modification of dengue virus strains by passage in primary dog kidney cells: preparation of candidate vaccines and immunization of monkeys*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69:12–16.
36. Staropoli, I., Clement, J.M., Frenkiel, M.P., Hofnung, M., Deubel, V., (1996) *Dengue virus envelope glycoprotein can be secreted from insect cells as a fusion with maltose-binding protein*. *J. Virol. Methods.* 56:179–189.
37. Sugrue, R.J., Cui, T., Xu, J., (1997) *The production of recombinant dengue virus E protein using Escherichia coli and Pichia pastoris*. *J. Virol. Methods.* 69:159–169.
38. Staropoli, I., Frenkiel, M. P., Megret, F., Deubel, V., (1997) *Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice*. *Vaccine* 15:1946–1954.
39. Feighny, R., Burrous, J., McCown, J., Hoke, C., Putnak, R., (1992) *Purification of native dengue-2 viral proteins and ability of purified proteins to protect mice*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47:405–412.
40. Chiu, M.W., Yang, Y.L., (2003) *Blocking the dengue virus 2 infections on BHK-21 cells with purified recombinant dengue virus 2 E protein expressed in Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309:672–678.
41. Sugrue, R.J., Cui, T., Xu, J., (1997) *The production of recombinant dengue virus E protein using Escherichia coli and Pichia pastoris*. *J. Virol. Methods* 69:159–169.

42. Fonseca, K., Khoshnood, K., Shope, R.E., Mason, P.W., (1991) *Flavivirus typespecific produced from fusion of the E protein gene with the E. coli trpE gene*. Am. J. Trop. Med. 44:500–508.
43. Srivastava, A.K., Putnak, J.R., Warren, R.L., Hoke Jr., C.H, (1995) *Mice immunized with a dengue type 2 virus E and NS1 fusion protein made in Escherichia coli are protected against lethal dengue virus infection*. Vaccine 11:1251–1258.
44. Simmons, M., Nelson, W.M., Wu, S.J., Hayes, C.G., (1998) *Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58:655–662.
45. Hermida, L., Rodriguez, R., Lazo, L., Silva, R., Zulueta, A., Chinea, G., Lopez, C., Guzman, M.G., Guillen, G., (2004) *A dengue-2 envelope fragment inserted within the structure of the P64k meningococcal protein carrier enables a functional immune response against the virus in mice*. J. Virol. Methods 115:41–49.
46. Anderson, R., King A.D., Innis B.L. (1992) *Correlation of E protein binding with cell susceptibility to dengue 4 virus infection*. J. Gen. Virol. 73:2155-2159.
47. Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S. L., Stura, E. A., Duquerroy, S. (2004) *Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH induced membrane fusion conformation*. EMBO J. 23:728-768.
48. Wei Zang, Paul R. Chipman, Jeroen Corver, Peter R. Johnson, Ying Zhang, Suchetana Mukhopadhyay, Timothy S. Baker, James H. Strauss, Michel G.

- Rossmann and Richard Kuhn. (2003) *Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus.*, Nature Structural Biology. 10: 908.
49. Yorgo Modis, Steven Ogata, David Clements, and Stephen C. Harrison. (2005) *Variable Surface Epitopes in the Crystal Structure of Dengue Virus Type 3 Envelope Glycoprotein*, Journal of Virology, 79:1223–1231
50. Rey, Félix A. (2007) *Dengue virus envelope glycoprotein structure: New insight into its interactions during viral entry.* PNAS 100: 6899–6901.
51. Chu, J. and Yang, P. (2007) *C-Src protein kinase inhibitors block assembly and maturation of dengue virus.* PNAS 104: 3520-3525.
52. Monath Thomas, P. (2007) *Dengue and Yellow Fever — Challenges for the Development and Use of Vaccine*, N. Engl. J. Med. 357:22.
53. Zhi-Shan Zhang, Yan-Sheng Yan, Yu-Wei Weng, Hai-Long Huang, Shi-Qing Li, Shi He, Jian-Ming Zhang. (2007) *High-level expression of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein and induction of neutralizing antibodies in BALB/C mice.* Journal of Virological Methods, 143:125-131.
54. Alan, D. T. Barrett (2008) *Flavivirus DNA vaccine with a kick*, Nature Biotechnology, 26:525-526.