

LA HABANA

2012

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL  
“PEDRO KOURÍ”**

**DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA  
LABORATORIO DE VACUNA DENGUE**

**TESIS EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE MÁSTER EN CIENCIAS**

---

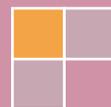
**EXPRESIÓN E INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA NS3  
RECOMBINANTE DEL VIRUS DENGUE 2 EN FORMA SOLUBLE**

**AUTORA: LIC. MARÍA SOLEDAD HERNÁNDEZ MENA**

**TUTORAS: PROF. ROSA RAMÍREZ BARTUTIS, M. Sc.**

**PROF. ROSABEL FALCÓN MÁRQUEZ, Dr. C.**

**ASESORA: PROF. MARÍA GUADALUPE GUZMÁN TIRADO, Dr. Cs.**





**DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA  
LABORATORIO DE VACUNA DENGUE**

**TESIS EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE MÁSTER EN CIENCIAS**

**EXPRESIÓN E INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA NS3 RECOMBINANTE DEL  
VIRUS DENGUE 2 EN FORMA SOLUBLE**

**AUTORA: LIC. MARÍA SOLEDAD HERNÁNDEZ MENA**

**TUTORAS: PROF. ROSA RAMÍREZ BARTUTIS, M. Sc.**

**PROF. ROSABEL FALCÓN MÁRQUEZ, Dr. C.**

**ASESORA: PROF. MARÍA GUADALUPE GUZMÁN TIRADO, Dr. Cs.**

*Para mi torre fuerte.*

*Familia, los amo.*

*Para todos mis amiguitos del I.P.H. quienes me regalaron su mejor sonrisa.*

*Especialmente a mis tutoras.*

*Gracias por su gentileza.*

**RESUMEN**

La búsqueda de un inmunógeno capaz de inducir tanto una respuesta humoral como celular para el desarrollo de una vacuna y el diseño de drogas antivirales es una prioridad para combatir la Fiebre de Dengue, enfermedad transmitida por artrópodos, que causa la mayor mortalidad y morbilidad en áreas tropicales y subtropicales. La proteína NS3 del virus dengue es multi-enzimática, y se considera como una diana inmunodominante de células T citotóxicas, mecanismo efector de la respuesta inmune antiviral. Por consiguiente, el presente trabajo tuvo como objetivo obtener por vía recombinante la proteína NS3 del DENV-2 en forma soluble y de esta forma garantizar el 80% de la actividad biológica de la misma. Para este estudio se realizó el clonaje del gen completo de la proteína NS3 del DENV-2 en el vector de expresión pET-21d y se evaluó la capacidad de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) para expresar la proteína recombinante de forma íntegra y soluble, comparando diferentes condiciones y parámetros que influyen en la expresión y obtención eficiente de la NS3. La presencia de la proteína en todos los procesos se detectó por SDS-PAGE e Inmunotransferencia empleando distintos anticuerpos monoclonales y policlonales. Como resultado de este estudio se logró la mejor expresión de la proteína NS3 en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) a una temperatura de 22°C, con una concentración de IPTG de 0.5mM y durante un tiempo de inducción de 22 horas. La proteína NS3 se detectó en la fracción soluble tras la ruptura celular eficiente por sonicación, empleando en el tampón lisis Tritón X-100 al 0.1%, lo cual favoreció un mayor grado de solubilidad. El reconocimiento de la proteína NS3 soluble por los anticuerpos policlonales y especialmente por el anticuerpo monoclonal sugiere que la proteína está en una conformación adecuada para su actividad biológica.

**ÍNDICE**

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
<b>3.1</b>	<b>LA ENFERMEDAD DEL DENGUE</b>	<b>4</b>
<b>3.2</b>	<b>EPIDEMIOLOGÍA</b>	<b>5</b>
<b>3.3</b>	<b>VIRUS DENGUE</b>	<b>8</b>
3.3.1	DIAGNÓSTICO	8
3.3.2	CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES	8
3.3.3	CICLO REPLICATIVO	12
3.3.4	INMUNOPATOGENIA Y RESPUESTA INMUNE	13
3.3.5	PROTEÍNA NS3	15
<b>3.4</b>	<b>SISTEMAS DE EXPRESIÓN PARA PROTEÍNAS RECOMBINANTES</b>	<b>18</b>
<b>3.5</b>	<b>DESARROLLO DE ANTIVIRALES Y VACUNAS PARA EL DENV</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>CEPA</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>BACTERIAS</b>	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b>PLÁSMIDOS</b>	<b>28</b>
<b>4.4</b>	<b>ANTICUERPOS</b>	<b>29</b>
<b>4.5</b>	<b>CONSTRUCCIÓN GENÉTICA DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE PARA LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA NS3 DEL DENV-2</b>	<b>29</b>
<b>4.5.1</b>	<b>CLONAJE DEL GEN CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA NS3 DEL DEN-2 EN EL VECTOR pGEM-T</b>	<b>29</b>
<b>4.5.2</b>	<b>SUBCLONAJE DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA NS3 EN EL VECTOR pET-21D</b>	<b>32</b>
<b>4.6</b>	<b>OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE NS3</b>	<b>33</b>
4.6.1	MINI-EXPRESIÓN DE LOS CLONES RECOMBINANTES pET-21D-NS3	33
4.6.2	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPRESIÓN EN E. COLI DE LA PROTEÍNA NS3	34
4.6.3	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE RUPTURA DE E. COLI PARA LA SOLUBILIDAD DE LA PROTEÍNA NS3	34
<b>5</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
<b>5.1</b>	<b>OBTENCIÓN DE LOS CLONES RECOMBINANTES pGEM-T-NS3</b>	<b>36</b>
5.1.1	SUBCLONAJE DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA NS3 EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pET-21D	39
5.1.2	SELECCIÓN DE LOS CLONES RECOMBINANTES pET-21D-NS3	40
<b>5.2</b>	<b>EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE NS3</b>	<b>41</b>
5.2.1	CONDICIONES DE RUPTURA Y SOLUBILIDAD PARA LA PROTEÍNA NS3	44
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b>	

## 1 INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el Dengue se ha convertido en la enfermedad más importante transmitida por artrópodos. Reportes recientes de la Organización Mundial de la Salud (-siglas- OMS) recogen un incremento dramático y paulatino, en términos de morbilidad y mortalidad, de los casos de Dengue notificados por los distintos países que sufren esta enfermedad. Anualmente se estiman entre 50 y 100 millones de infecciones por Fiebre Dengue (-siglas- FD) y aproximadamente, más de 250 mil casos de Fiebre Hemorrágica del Dengue/Síndrome de Choque por Dengue (-siglas- FHD/SCD), siendo las regiones más afectadas el Sudeste Asiático, el Pacífico Oeste y Las Américas (1). En los últimos cinco años, América Latina ha experimentado un aumento inusitado de casos de Dengue y Dengue grave. En Cuba se han registrado 5 epidemias de dengue durante las últimas 4 décadas (2-4).

La FD y su forma más severa FHD/SCD, es causada por los 4 serotipos de los virus del complejo Dengue (DENV -del inglés- Dengue viruses, DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) pertenecientes a la Familia *Flaviviridae* (5). Estos virus comparten el 70% de similitud en secuencia aminoacídica y aproximadamente el 50% con otros *Flavivirus* (6). Los viriones maduros consiste en una nucleocápside (C) que protege al genoma viral y una bicapa lipídica que proviene de la célula huésped (7, 8). El genoma viral es un ARN cadena positiva que es traducido como una larga poliproteína procesada co- y post- traduccionalmente por proteasas celulares y una proteasa viral, dando lugar a la formación de 10 productos proteicos: C-prM-E-NS1-NS2A-NS3-NS4A-NS4B-NS5, siendo las tres primeras proteínas estructurales y las restantes proteínas no estructurales (9). La proteína NS3 es la segunda proteína de mayor talla (68 a 70 kDa) con 610 aminoácidos y también la más conservada entre los *Flavivirus*. Es una proteína multifuncional, que hacia el extremo N-terminal se ubica el dominio proteasa mientras que hacia el extremo C-terminal posee otras dos actividades ARN helicasa/NTPasa (10-14). La proteína NS3 media el corte de varias proteínas virales maduras. En su actividad helicasa pudiera ayudar en el desenrollamiento del ARN durante la replicación. También pudiera eliminar estructuras secundarias involucradas en el reconocimiento del molde o en el inicio de la replicación, para lo cual se requiere energía proveniente de su actividad ATPasa (15, 16).

La proteína NS3, con importantes funciones catalíticas, es la mayor fuente de epítomos de células T, estimulando la respuesta de tipo CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>; produce altos niveles de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y  $\beta$ , además de quimoquinas y proteínas inhibitorias  $\alpha$  de macrófagos (17-19). Por la evidente importancia de la proteína NS3 en el ciclo replicativo del DENV, y su implicación en múltiples funciones catalíticas y destacadas características inmunogénicas, numerosas investigaciones

han sido encaminadas a su obtención por vía recombinante empleando diversos sistemas de expresión. Estudios experimentales inmunizando modelos animales han permitido discernir que la proteína NS3 recombinante puede ser consideradas como una diana inmunodominante de las células T citotóxicas, mecanismo efector de la respuesta inmune antiviral (20, 21). Además, los análisis de caracterización molecular han identificado a la proteína NS3 del DENV como una diana de gran importancia para el diseño de drogas antivirales (22).

Entre los sistemas de expresión más utilizados se encuentra la bacteria *Escherichia coli* (-siglas- *E. coli*), a partir de la cual se han desarrollado cepas capaces de expresar proteínas recombinantes con elevado rendimiento. (23). En este sentido estudios previos desarrollados por el grupo de Vacuna Dengue del IPK condujeron a la obtención de la proteína NS3 por vía recombinante en *E. coli*, en condiciones de insolubilidad, lo que conllevó a emplear métodos para la renaturalización de la proteína (24). Estudios de caracterización funcional realizados a dicha proteína demuestran que la proteína NS3 presenta actividad proteasa pero no actividad helicasa ni ATPasa, lo que sugiere una inadecuada conformación de la proteína tras el proceso de renaturalización. Las estrategias encaminadas a obtener la proteína NS3 en forma soluble garantizan un 80% de su actividad biológica y permiten diseñar nuevos estudios de caracterización de estructura-función. Por tal motivo el equipo de investigadores se propone la obtención de la proteína NS3 del DENV-2, empleando un vector, células de *E. coli* y condiciones más eficientes para la expresión de la proteína recombinante soluble. En este trabajo se presenta la estrategia de clonaje del gen ns3 del DENV-2 en el vector pET21d y el estudio de expresión en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) de la proteína NS3, bajo condiciones óptimas de ruptura y solubilidad para la proteína NS3.

## 2 OBJETIVOS

### **General**

*Obtener por vía recombinante la proteína NS3 del DENV-2 soluble en células de Escherichia coli BL21(DE3).*

### **Específicos**

1. Obtener el plásmido recombinante que contiene el gen ns3 del DENV-2 (pET-21d-ns3) para la expresión de la proteína NS3 en las células BL21(DE3).
2. Determinar los parámetros que influyen en la expresión de la proteína recombinante NS3 del DENV-2 en la cepa BL21(DE3).
3. Optimizar las condiciones de ruptura para la obtención de la proteína NS3 recombinante en forma soluble.

### 3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 La enfermedad del Dengue

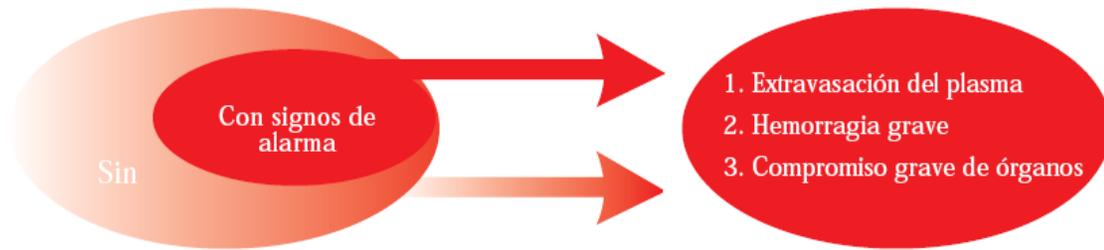
La FD y el Dengue grave representan en la actualidad la mayor problemática de salud pública en el mundo dentro de las *Arbovirosis* (25). Anualmente se estiman 50 millones de infecciones por Dengue, y aproximadamente 2.5 mil millones de personas viven en países con transmisión endémica de Dengue (1). En los últimos años, la magnitud y trascendencia mundial del Dengue y el Dengue grave han aumentado, debido a la expansión geográfica de los DENV y de su principal vector convirtiendo este último a las personas infectadas en portadores y potenciales multiplicadores del virus.

Esta enfermedad causada por los 4 serotipos DENV (5), tiene un amplio espectro de presentaciones clínicas, con evolución impredecible. La mayoría de los pacientes se recuperan después de un curso clínico benigno y de resolución espontánea, una pequeña proporción progresa a una enfermedad grave, caracterizada principalmente por aumento de la permeabilidad vascular, con hemorragia o sin ella. Es una enfermedad única manifestada en cada individuo en dependencia de determinados factores de riesgo, entre los que se encuentran factores relacionados con el virus, factores genéticos del individuo y factores socio-epidemiológicos (26, 27). En cuanto a la presentación del cuadro clínico grave de la enfermedad, además de los factores anteriormente señalados, se han descrito como factores de riesgo, la presencia de anticuerpos pre-existentes ante la infección secundaria con un serotipo diferente al anterior, el asma bronquial, anemia de células falciformes, diabetes mellitus y la raza (28).

Una serie de parámetros clínicos, de laboratorio o ambos, definen entre el Dengue y el Dengue grave. El primero se divide en dos subgrupos: Dengue sin signos de alarma y Dengue con signos de alarma (ver Figura 1), así se sugiere decidir dónde y cuan intensivamente se debe observar y tratar al paciente, así como, notificar casos más acorde con el sistema de vigilancia epidemiológica nacional e internacional (1).

DENGUE ± SEÑALES DE ALARMA

DENGUE GRAVE



CRITERIOS PARA EL DENGUE CON SIGNOS DE ALARMA Y SIN ELLOS

CRITERIOS PARA DENGUE GRAVE

Dengue probable  
 vivir en áreas endémicas de dengue/viajar a ellas  
 Fiebre y dos o más de los siguientes criterios:

- Náuseas, vómito
- Erupción cutánea
- Molestias y dolores
- Prueba de torniquete positiva
- Leucopenia
- Cualquier signo de alarma

Signos de alarma\*

- Dolor abdominal intenso o abdomen doloroso a la palpación
- Vómitos persistentes
- Acumulación clínica de líquidos
- Sangrado de mucosas
- Letargia, agitación
- Hepatomegalia >2 cm
- Laboratorio: aumento del hematocrito concurrente con rápida disminución del número de plaquetas

Extravasación grave de plasma que conduce a:

- Choque (SCD)
- Acumulación de líquidos con insuficiencia respiratoria

Sangrado intenso según la evaluación del médico tratante

Compromiso orgánico grave

- Hígado: AST o ALT 1000
- Sistema nervioso central: Alteración de la conciencia
- Corazón y otros órganos

Dengue confirmado por laboratorio (importante cuando no hay signos de extravasación de plasma)

\*(requiere estricta observación e intervención médica)

**Figura 1.** Clasificación de casos Dengue según nivel de gravedad. Este modelo está a prueba en 18 países y sujeto a modificación por la OMS (29).

### 3.2 Epidemiología

En los últimos años, la magnitud y trascendencia mundial del Dengue y el Dengue grave han aumentado, debido a la expansión geográfica de los DENV y de su principal vector, como resultado de los cambios demográficos y sociales al nivel mundial. A pesar de la dramática emergencia de esta entidad, existen escasas estimaciones económicas de su impacto tanto para situaciones epidémicas como endémicas.

Además del impacto humano, social y sanitario de esta entidad, el impacto económico no es despreciable. Los costos provocados por estos eventos resultan difíciles de precisar por la cantidad de personas, instituciones y recursos que intervienen en este proceso; así como la diversidad de acciones que se desarrollan para su control sin contar el sub-registro que existe en la mayoría de las áreas endémicas

El DENV es transmitido por el mosquito de más rápida propagación en el mundo el *Aedes (Stegomyia)*, principalmente *Ae. aegypti*, pero también *Ae. albopictus* y por algunos vectores endémicos como *Ae. polynesiensis* en la polinesia francesa (30). El mosquito hembra (vector) se infecta de por vida, al picar al humano en etapa de viremia, la cual dura en promedio cinco

días. En el mosquito la replicación viral ocurre entre ocho a 12 días (periodo de incubación extrínseco), después puede infectar a otros humanos al momento de alimentarse (31, 32).

En los últimos 50 años, la incidencia del DENV ha aumentado 30 veces con la creciente expansión geográfica del vector hacia nuevos países, así como, el aumento de la resistencia a insecticidas. En la década actual el vector circula de áreas urbanas a rurales como consecuencia de la urbanización (32, 33).

Los viajeros tienen una participación esencial en la epidemiología mundial de las infecciones por DENV, ya que aquellos con viremia pueden transportar los serotipos y cepas hacia áreas con mosquitos que pueden transmitir la infección; aumentando la circulación simultánea de varios serotipos y la forma severa de la enfermedad (28, 34, 35).

Originalmente el DENV, se dispersó del sudeste asiático a otros continentes, incluyendo América (36). Las regiones de Asia Suroriental y Pacífico Occidental aportan el 75% de la carga mundial de la enfermedad, contribuyendo a la creciente amenaza del DENV, el cual se está propagando a nuevas áreas geográficas y causando elevada mortalidad durante la primera fase de los brotes (1).

La resolución WHA55.17 de la Asamblea Mundial de la Salud de 2002 instó a un mayor compromiso con el Dengue por parte de los Estados Miembro de la OMS; en especial a la revisión del Reglamento Sanitario Internacional que incluye el Dengue como ejemplo de una enfermedad que puede constituir una emergencia de salud pública de interés mundial. El plan estratégico está dirigido a ayudar a los países a revertir la creciente tendencia del Dengue, mejorando su preparación para detectar, caracterizar y contener rápidamente los brotes, y así detener la propagación hacia nuevas áreas (1).

La región de las Américas aumentó el número de casos de Dengue y Dengue grave, sólo el 2010 reportó 1,574,028 de casos Dengue. El número de casos de FHD en el mismo período fue de 36,688. El número total de muertes por Dengue fue de 843 con una tasa de letalidad por la forma hemorrágica de 2.30%. La circulación de los cuatro serotipos del DENV se mantiene en la región agravando la situación epidemiológica (1, 37, 38).

La mayor incidencia correspondió a Brasil, país que ha llegado a contribuir con más de la mitad de lo notificado cada año, seguido en orden de frecuencia por Colombia, Venezuela, Honduras y México. En la actualidad México presenta variaciones anuales en su incidencia y brotes epidémicos de diferentes magnitudes, en particular en los estados de la región sur-sureste y costas del Océano Pacífico y Golfo de México, con eventos epidemiológicos más esporádicos en los estados del centro y norte del país. El comportamiento de la transmisión denota aumentos anuales progresivos, con repuntes en el segundo semestre de cada año. La OPS (-

*Siglas-* Organización Panamericana de la Salud) reportó hasta el 31 de octubre del 2012, el número de 32,445 casos confirmados por el laboratorio.

El Caribe en el 2010 notificó 130,735 casos de Dengue, 2,107 casos de Dengue Severo y 32 muertes con una tasa de letalidad de 5.75. Los países con el mayor número de casos de Dengue en el Caribe latino fueron Cuba, Puerto Rico y República Dominicana.

En el caso de Cuba, una epidemia de fiebre de dengue, por DENV-1, afectó en 1977 a casi la mitad de la población en ese momento (2). Cuatro años más tarde se produjo la primera epidemia de dengue hemorrágico en la región, causada por el DENV-2 y con más de 10,000 casos graves y 158 fallecidos. (3). En 1997, se reporta una epidemia de dengue con un número de casos de 2,946 de ellos 205 casos hemorrágicos y 12 fallecidos en el municipio de Santiago de Cuba (4). Después de un intenso trabajo de control, se elimina la transmisión en pocos meses. En 2001-02, se reporta una epidemia causada por DENV-3 principalmente en Ciudad de La Habana con más de 12,000 casos y 79 casos graves y tres fallecidos. A partir de 2005, se han reportado pequeñas transmisiones en diferentes áreas que han sido localmente controladas y eliminadas. Particularmente en el 2006 ocurrió un brote de Dengue que afectó varias provincias del país incluyendo la capital (1).

El impacto humano, social y sanitario provocado por eventos del Dengue se refleja en pérdidas económicas que resultan difíciles de precisar por la cantidad de personas, instituciones y recursos que intervienen en este proceso; así como la diversidad de acciones que se desarrollan para su control sin contar el sub-registro que existe en la mayoría de las áreas endémicas. Tailandia en 1980 estimó el costo de la epidemia de dengue grave en alrededor de 6,800,000 dólares, sólo por concepto de hospitalización y control del vector. En 1981 la epidemia de DH en Cuba, la primera de este tipo en la región de las Américas, con un costo de 103,151,543 dólares, de estos el 41.7% por concepto de lucha antivectorial, 37.6% por hospitalización, 5.6 % por pago de seguridad social y 13.9% por valores dejados de producir. En 1995, los costos en las actividades de control del Dengue en las Américas fue de 199,824,798 dólares; los países con mayores costos fueron Brasil con 150,000,000 dólares y Cuba con 20,884,658 dólares. Estas cifras demuestran que es necesario invertir en programas de control que logren revertir fenómenos epidémicos, donde los gastos del país afectado son infinitamente superiores; además de evitar el sufrimiento y la pérdida de vidas humanas.

### 3.3 Virus Dengue

#### 3.3.1 Diagnóstico

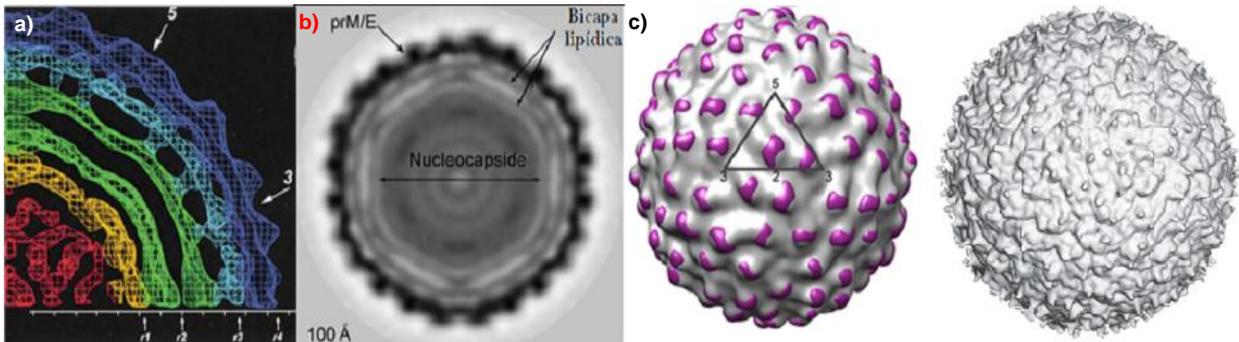
La mayoría de los laboratorios de diagnóstico emplean el cultivo celular y los métodos serológicos para la identificación del DENV (39). Los estudios serológicos son los más empleados para el diagnóstico del dengue (40). Cinco técnicas serológicas básicas se emplean para el diagnóstico de la infección por dengue: la Inhibición de la Hemaglutinación (-siglas- IH), que ha sido usada para clasificar infección por virus dengue en primaria o secundaria (40, 41); la Fijación del Complemento (42), la cual no ha sido muy utilizada y en la actualidad prácticamente no se emplea debido a que es la más difícil de realizar y requiere de un personal altamente entrenado; la Neutralización, es una prueba muy sensible y específica para la detección de anticuerpos contra los virus dengue siendo su protocolo más usado la neutralización por reducción del número de placas (43, 44); y los Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA -del inglés- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para detectar anticuerpos IgM e IgG y el antígeno viral NS1 (45, 46). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR -del inglés- Polymerase Chain Reaction) ha sido empleada para el diagnóstico del virus dengue, en la vigilancia epidemiológica y para estudios de epidemiología molecular, en sus distintas variantes (47, 48). Estas técnicas también constituyen una herramienta en los ensayos de vacunas y medicamentos contra el Dengue.

#### 3.3.2 Características y propiedades

La familia *Flaviviridae* está compuesta por tres géneros *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*. El género *Flavivirus* cuenta con más de 70 virus. Los de mayor importancia son el Virus de la Fiebre Amarilla (-siglas- VFA), el Virus de la Encefalitis Japonesa (-siglas- VEJ), el Virus de la Encefalitis por Garrapata (-siglas- VEG), el Virus del Nilo Occidental (-siglas- VNO) y los Virus del Dengue (49).

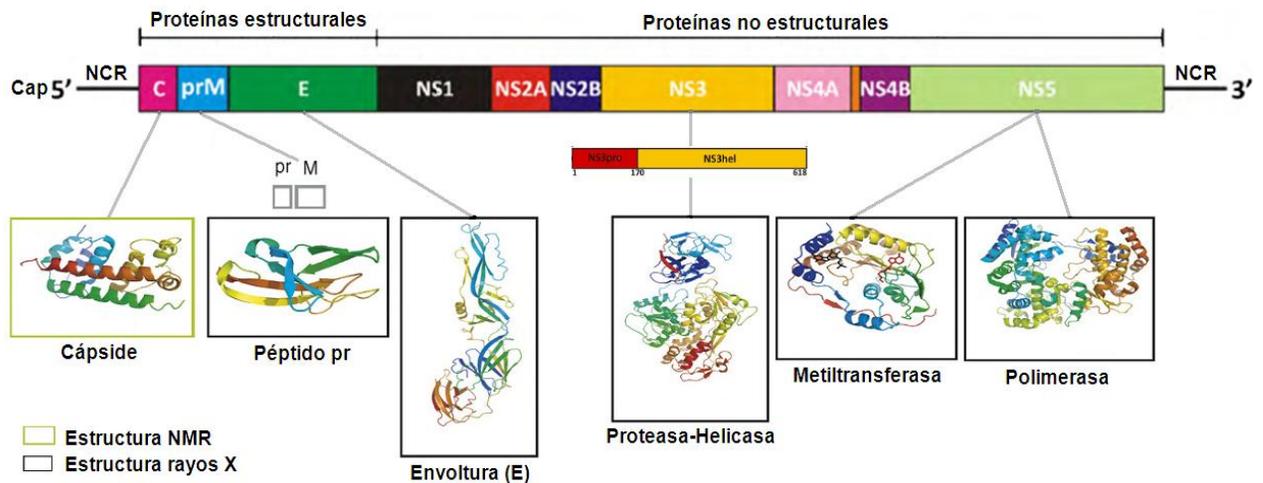
Los *Flavivirus* poseen morfología y estructura genómica similares y todos comparten determinantes antigénicos, lo cual dificulta su identificación por técnicas serológicas. La relación de los DENV con otros *Flavivirus* fue demostrada por Sabin y cols., (50). Henchal y cols., en 1988, definió la glucoproteína de membrana como un antígeno compartido por todos los *Flavivirus*. Los cuatro serotipos del DENV comparten el 70% de similitud en secuencia aminoacídica y aproximadamente el 50% con otros *Flavivirus* (51, 52). Los viriones maduros son esféricos, de un diámetro aproximado entre 40 a 60 nanómetros (-siglas- nm), poseen una densidad de 1.23 g/cm<sup>3</sup> y un coeficiente de sedimentación de 210s (7). La partícula viral

consiste en una nucleocápside (-*sigla*- C) icosaédrica de aproximadamente 30nm de diámetro, rodeada por una bicapa lipídica de 30nm de espesor que proviene de la célula hospedera (8). La bicapa lipídica protege a la C (ver Figura 2), ya que esta última es permeable a nucleasas capaces de degradar el genoma viral. Uno de los dominios de la proteína de envoltura (-*sigla*- E) y de la proteína de membrana (-*sigla*- M) interactúan con la bicapa lipídica quedando embebidas en ella (53, 54). Estos virus son estables a temperaturas de -70°C y en estado de liofilización a 5°C. Son inestables al ser sometidos al calor y se inactivan bajo la acción de la luz UV (55, 56).



**Figura 2.** Estructura del DENV. **a)** Microscopía crioelectrónica, estructura tridimensional de la organización de proteínas estructurales en base a su densidad radial, proteínas M/E en azul, bicapa lipídica en verde, la nucleocápside en anaranjado y rojo. **b)** Microscopía electrónica, virion inmaduro, heterodímero, proteínas pre-membrana PrM/E embebidas en la bicapa lipídica y nucleocápside icosaédrica. **c)** Cristalografía de rayos X, pseudoestructura atómica, virión inmaduro proteínas de prM/E en morado, unidad de icosaedro asimétrico, triángulo negro; así como, estructura del virión maduro, en blanco (57, 58).

Dentro de la nucleocápside se encuentra el genoma viral compuesto por ARN de cadena simple y polaridad positiva (58). El ARN genómico tiene una longitud de 11,000 nucleótidos (11kb) y un único marco abierto de lectura (ORF *-del inglés-* Open Reading frame) que codifica para una poliproteína de 3,400 aminoácidos (-*siglas-* aa) (49, 59, 60). Las regiones no codificantes 5' y 3' conservadas (NCR *-del inglés-* Non Coding Regions) tienen una longitud aproximada de entre 100 y 800 nucleótidos, respectivamente. Estas regiones no codificantes contienen elementos del ARN que son esenciales para que la replicación y la traducción se lleven a cabo eficientemente (61). El extremo 5' posee una guanina metilada o casquete "Cap" (*-del inglés-* Cap) y una secuencia que lo une al ribosoma (IRES *-del inglés-* Internal Ribosome Entry Site), pero no posee cola de poli (A) en el extremo 3' (5, 62). La poliproteína es procesada co- y post-traduccionalmente por enzimas celulares y proteasas virales para producir 10 proteínas maduras (ver Figura 3) (9).



**Figura 3.** Organización lineal del genoma, que codifica para la poliproteína, escindida en proteínas estructurales y no estructurales (representación conformacional obtenida a partir de NMR (NMR *-del inglés-* Nuclear Magnetic Resonance) y difracción por rayos X, así como las secuencias no codificantes 5', 3' y Cap. La secuencia codificante para la proteína NS3 (diagrama lineal más pequeño) abarca de 4,520 a 6,375 bases, del aa 1 al 170 y del 171 al 618 corresponden a los dominios proteasa/helicasa respectivamente (49, 63, 64).

Las proteínas C, M y E están ubicadas en la posición amino terminal de la poliproteína y forman la estructura de la partícula viral. Las proteínas no estructurales (*-siglas-* NS), en la región carboxilo terminal (*-siglas-* C-terminal), comprenden tres cuartas partes de la poliproteína, y participan en la replicación y expresión del genoma viral. Además, participan en el ensamblaje de la partícula viral, liberación y evasión de la respuesta inmune del hospedero, entre otras funciones (64-66).

La proteína C (también referida como proteína del core) tiene un peso molecular de 11 kiloDalton (*-siglas-* kDa), es la proteína estructural menos conservada entre los flavivirus y tiene un alto contenido de aminoácidos cargados positivamente como arginina y lisina. Esta alta proporción de aminoácidos puede estar involucrada en la unión al ARN viral (67, 68). La secuencia peptídica posee un dominio hidrofóbico "interno" (conservado entre los flavivirus) que juega un papel central durante el ensamblaje, y media la interacción con la membrana durante la liberación del virión (68, 69).

La proteína M en viriones inmaduros se presenta como prM, tiene un peso molecular de 19 a 23kDa, es una proteína glucosilada y contiene seis residuos de cisteína que forman tres puentes disulfuros (70). En virus maduro se elimina la porción amino-terminal (*-siglas-* N-terminal) del péptido soluble pr y se obtiene la proteína M (8kDa) la cual no está glucosilada ni presenta puentes disulfuros en su estructura (71). Esta proteína forma un heterodímero con la proteína E (72). La proteína M tiene un importante papel en la inducción de la amplificación mediada por anticuerpos, fenómeno muy importante en la inmunopatogénesis de la FHD (73).

La proteína E tiene un peso molecular de 51 a 60kDa y es la más conservada de las proteínas

estructurales. Se encuentra glucosilada en la mayoría de los virus de esta familia (54). Presenta tres dominios involucrados en la unión a los receptores, la fusión a las membranas celulares y el ensamblaje de los viriones. Además, es el principal determinante antigénico (74, 75). La proteína E juega un papel primordial en la inducción de anticuerpos neutralizantes e inmunoamplificadores (76). También presenta epítomos de células T, importantes en la inmunidad y etiopatogenia (77). La interacción E-prM sirve para proteger a la proteína E de la inactivación irreversible dada por cambios conformacionales prematuros en el medio ácido de las vesículas de transporte hacia la membrana citoplasmática (78, 79). Así, el heterodímero E/M plegado correctamente y asociado a membrana interviene en el ensamblaje del virus (54, 80).

La proteína NS1 (43 a 48kDa) es una glucoproteína no estructural que contiene 12 residuos de cisteína conservados en su estructura. Puede encontrarse asociada a la membrana plasmática en forma manométrica, sin interacciones covalentes o en el medio extracelular de forma multimérica y soluble (81, 82). Aunque, su función no está descrita completamente se cree que está involucrada en la replicación del ARN (59, 83). Además, se ha sugerido que es importante en la maduración del virión, tal vez cooperando en la conservación de una conformación apropiada para la proteína E inmadura (84, 85). La proteína NS1 puede encontrarse en la superficie celular o en el medio extracelular, constituyendo un blanco de la respuesta inmune humoral, capaz de inducir la generación de anticuerpos, entre los que se encuentran anticuerpos que potencian la lisis de células infectadas mediada por el complemento (86, 87). Se ha demostrado que presenta epítomos de células T, también presenta reactividad cruzada con proteínas humanas, asociada con algunos efectos patológicos (88).

La proteína NS3 con un peso molecular de 68 a 70kDa, es altamente conservada entre los *Flavivirus*. Se le reportan tres funciones en la replicación viral: el extremo amino-terminal posee actividad serinoproteasa y el C-terminal posee actividad ARN helicasa y NTPasa/RTPasa (51). La proteína NS3, es la mayor fuente de epítomos de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. La reactividad de esta respuesta produce altos niveles de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y  $\beta$ , además de quimoquinas y proteínas  $\alpha$  inhibitorias de macrófagos (17-19).

Otra proteína altamente conservada es la NS5 (67% de identidad entre los cuatro serotipos DENV), es la de mayor talla, con un peso molecular de 104 a 106kDa. Es bifuncional, en el extremo N-terminal presenta actividad metiltransferasa y en el extremo C-terminal actividad ARN polimerasa dependiente de ARN (89, 90).

Las proteínas NS2A (18 a 22kDa), NS2B (13 a 15kDa), NS4A (16 a 16.4kDa) y NS4B (27 a 28kDa) son pobremente conservadas. NS2A, NS4A/4B son proteínas integrales de membrana que poseen perfiles de hidrofobicidad conservados entre los *Flavivirus* (91, 92). NS2A parece intervenir en el procesamiento del C-terminal de NS1, y en la replicación viral mientras que

NS2B es requerida como cofactor para la actividad proteasa de la NS3, la NS4B parece participar con la NS3 en la replicación del ARN (51, 93, 94).

Las proteínas mencionadas anteriormente que conforman la partícula viral se sintetizan durante la infección por lo que constituyen dianas potenciales de la respuesta inmune del hospedero y actualmente las nuevas tecnologías se dirigen a dilucidar mejor sus funciones, así como la interrelación con las proteínas del hospedero (95).

### 3.3.3 Ciclo replicativo

La superficie del DENV está cubierta por 180 copias de las proteínas M y E, éstas forman las espículas del virión. El dominio III de la proteína E se une a los receptores de la superficie de las células huésped (células dendríticas de la piel, macrófagos, monocitos y linfocitos T y B, hepatocitos, neuronas y otras) (96-98), y permite la entrada del virus por endocitosis mediada por receptores. Las células dendríticas poseen los receptores primarios ICAM y CD14, mientras que el heparan sulfato y otros glucosaminoglicanos actúan como co-receptores de baja afinidad para varios *Flavivirus* (99-101). Otro mecanismo descrito para la entrada del virus a la célula es por la formación de inmunocomplejos, el virión forma complejos con las inmunoglobulinas de tipo IgG, las que se unen a las células por sus receptores Fc (102). La acidificación del endosoma permite la trimerización irreversible de la proteína E, así el dominio II se fusiona con la membrana de la vesícula endosomal del hospedero. Como resultado se libera el ARN y C al citoplasma a partir de la disociación esta última (103). El ARN de sentido positivo se usa como molde para ser traducido en una única poliproteína por la maquinaria celular. Dicha poliproteína es procesada por proteasas virales (NS3pro) y celulares (signalasa y furina) generándose proteínas virales maduras (104). En general, la replicación del virus es catalizada por un complejo replicativo compuesto por NS5/NS3, que conjuntamente con otros factores virales y del hospedero, transcriben la cadena positiva del ARN genómico en una cadena complementaria de ARN de polaridad negativa, que sirve como molde intermediario para la producción de genomas de cadenas positivas (90, 105-107). Después de la replicación el genoma viral es encapsulado por las proteínas C y entonces se dirige al retículo endoplasmático donde la C es envuelta por la bicapa lipídica donde están embebidas las proteínas virales prM y E. Los viriones inmaduros, compuestos por el ARN genómico, el heterodímero prM-E y la proteína C son transportados a la superficie celular por exocitosis (108, 109). Durante este proceso, son glucosiladas las proteínas prM, E y NS1. La liberación del virus puede ocurrir por fusión de las membranas de la vesícula exocítica que contiene al virus con la membrana citoplasmática o por efecto citopático a través de rupturas puntuales en la membrana celular (110-112).

Los virus con genoma de ARN, están expuestos a la acumulación de mutaciones ocasionadas

por la ARN polimerasa, que resulta en la diversidad de genomas virales, llamados cuasiespecies, que pueden reflejar el proceso de selección natural. Las cuasiespecies juegan un papel fundamental en la progresión de la infección crónica de la enfermedad del virus de la Hepatitis C y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (-siglas- VIH). Varios estudios demuestran la relevancia de las cuasiespecies en la evasión de la respuesta inmune por el DENV lo cual dificulta el desarrollo de vacunas y antivirales (113-115).

#### 3.3.4 *Inmunopatogenia y Respuesta inmune*

Se ha reportado que el desarrollo de la FHD es específico de cada cepa y puede estar relacionada además con la secuencia aminoacídica específica de la proteína E (116-118). Las cepas virulentas de DEN-2 se unen a los monocitos y son internalizadas de la misma manera que las cepas no virulentas, con la diferencia de que las primeras son capaces de fusionarse con la membrana lisosomal a un pH más básico. Se propuso por algunos autores que el dominio de fusión de la glucoproteína E puede ser el responsable de este fenómeno (119). Otros estudios sugieren que hay diferencias entre cepas del virus con respecto a su habilidad para unirse e infectar células diana así como su capacidad para generar una mayor progenie viral *in vitro* (120).

El fenómeno de la amplificación dependiente de anticuerpos plantea que durante las infecciones secundarias, los anticuerpos desarrollados durante la infección primaria pueden reconocer de manera heterotípica al segundo serotipo infectante y formar complejos inmunes que faciliten la entrada del virus a las células susceptibles a través de los receptores celulares para Fc presentes en las células B, células dendríticas y monocitos-macrófagos, dianas de la infección por el DENV. El incremento de la replicación viral durante las infecciones secundarias heterotípicas desencadena procesos donde participa activamente el sistema monocito-macrófago, que concluyen en el aumento de la permeabilidad vascular responsable de los síntomas severos de la enfermedad (121). El estudio de los eventos que ocurren después de la entrada del virus a las células, facilitada por los anticuerpos, mostró que esta vía de infección modifica los mecanismos antivirales intracelulares de la inmunidad innata y adaptativa. La infección mediada por los anticuerpos suprime la producción de IL-12 e INF- $\gamma$ , lo que conduce a una respuesta de células T cooperadoras tipo 2 (Th2 *-del inglés- T helper 2*), descrita en los pacientes con FHD (122).

Los estudios seroepidemiológicos en Cuba y Tailandia apoyan de manera firme la participación de la infección heterotípica secundaria como un factor de riesgo para Dengue grave, aunque se han informado algunos casos graves asociados con la infección primaria (123). El intervalo de tiempo y la secuencia viral entre las infecciones también pueden ser de importancia. Cuba reportó una elevada tasa de letalidad por DENV-2 posterior a una infección por DENV-1 en un

intervalo de 20 años, comparado con un intervalo de cuatro años (27, 124). El Dengue grave también se observa regularmente durante la infección primaria de lactantes cuyas madres son inmunes al DENV. La amplificación dependiente de anticuerpos se ha considerado hipotéticamente como un mecanismo para explicar el Dengue grave en el curso de una infección secundaria y en lactantes con infecciones primarias (125).

La respuesta inmune celular tiene un papel importante para el desarrollo de la enfermedad severa, las células T de memoria activadas reconocen epítomos peptídicos alterados que parecen estar involucrados en la extravasación del plasma, esto sugiere que la exposición de epítomos virales en la superficie de células infectadas conlleva a la producción de células T y de citoquinas proinflamatorias que tienen un efecto directo en las células del endotelio vascular resultando en la extravasación de plasma (17). La línea celular de endotelio pulmonar humano (HPMEC-ST1.6R) infectada con los cuatro serotipos del DENV expresa el factor de crecimiento de endotelio vascular, involucrado en la extravasación de plasma (126).

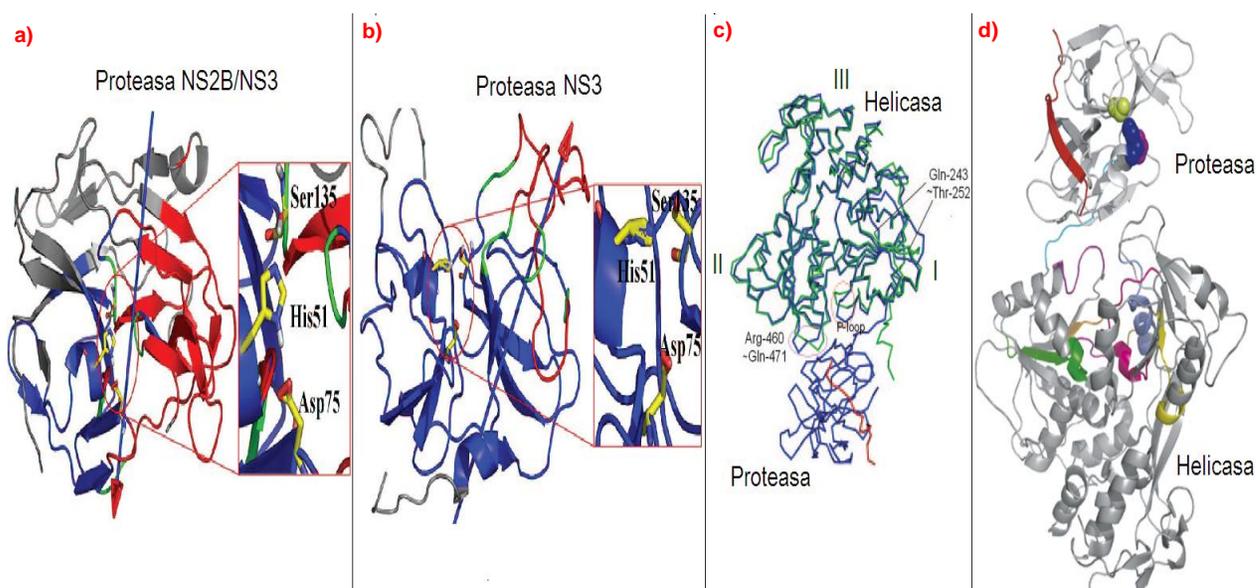
La respuesta inmune innata, al parecer, tiene un importante papel protector durante la infección con el virus del Dengue, uno de los componentes fundamentales de este tipo de respuesta son los Interferones (-siglas - INFs)  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (127). Se ha demostrado que, *in vitro*, los INFs son capaces de inhibir la infección (128). Entre las fuentes principales de estos mediadores, se encuentran las células asesinas naturales (NK -del inglés- Natural Killers) altamente productoras de IFN $\gamma$ . Los macrófagos, además, constituyen una fuente principal de los IFNs  $\alpha/\beta$  y una vez en el sitio de la inflamación, inducen la proliferación de las células NK, citólisis de células infectadas mediada por dichas células asesinas y secreción de quimoquinas (129).

Los anticuerpos neutralizantes son considerados como el mecanismo protector más importante contra la infección por DENV (130). La presencia de anticuerpos neutralizantes por más de cuatro décadas después de un episodio infeccioso sugiere el desarrollo de inmunidad de por vida al serotipo específico, sólo hay protección cruzada transitoria contra los otros serotipos, lo que hace posible una infección secuencial (131, 132).

Estudios epidemiológicos sugieren que personas con ascendencia africana son menos susceptibles a las manifestaciones severas de la infección por Dengue (133, 134). Las células T, y las presentadoras de antígeno, a través del HLA (HLA -del inglés- Human Leukocyte Antigens) (37), están asociadas a la susceptibilidad de la infección de una manera serotipo específico, por ejemplo HLA\*0207 a DENV-1 y HLA\*B52 a DENV-2 (135). Algunas asociaciones son protectoras por ejemplo los alelos HLA DR en poblaciones mexicanas y vietnamitas (136, 137). La respuesta de células T a un epítomo restringido para HLA-B\*07 de la proteína NS3 de DENV se correlaciona con la severidad de la enfermedad (138).

### 3.3.5 Proteína NS3

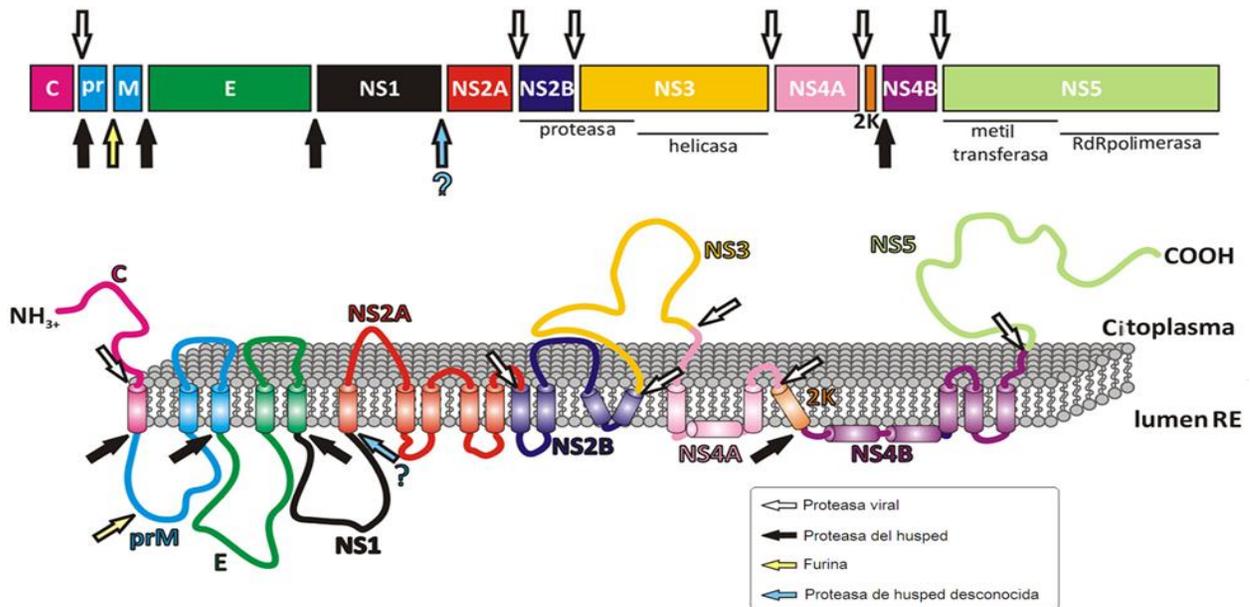
La segunda proteína de mayor talla y también la más conservada entre los *Flavivirus* es NS3 (68 a 70kDa). Es una proteína multifuncional con 610 aminoácidos, el extremo N-terminal (1 al 169 aa) comprende la actividad proteasa (-siglas- NS3pro), el extremo C-terminal (179 al 618 aa) posee otras dos actividades ARN helicasa/NTPasa (-siglas- NS3hel) (ver Figura 4) (10-14, 139).



**Figura 4.** Proteína NS3, **a y b)** comparación estructural de la proteína NS3 sola (azul) y unida al cofactor NS2B (rojo), a través de LIGPLOT se obtuvo el número de puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas, presentan mayor estabilidad en dualidad, sitio activo proteasa His<sup>51</sup>, Asp<sup>75</sup>, y Ser<sup>135</sup> (140). **c)** subdominios I al III de la ARN helicasa/NTPasa (verde), este último formado por Arg<sup>460</sup> a Gln<sup>471</sup> se unen para formar un bucle en el subdominio II, interacciona con el bucle P, envuelto por el dominio proteasa (azul, NS2B rojo), adopta diferente conformación y el dominio helicasa de Gln<sup>243</sup> a Thr<sup>252</sup> (139). **d)** la unión de los dominios proteasa y helicasa, residuos 169 a 179 (azul)(64).

Por alineación de secuencias de serinoproteasas conocidas, se clasifica dentro de la superfamilia de la tripsina, compuesta por la triada catalítica His<sup>51</sup>, Asp<sup>75</sup>, y Ser<sup>135</sup>, que se encuentra conservada entre los *Flavivirus*. La enzima consiste de seis hebras que forman dos hojas beta que se superponen entre sí para formar el sitio activo (15, 141). La proteasa requiere para su activación del cofactor NS2B, al adicionar el sustrato, el extremo C-terminal de NS2B sufre un cambio conformacional dramático, formando una horquilla que se inserta en el sitio activo y lo estabiliza (142), la región central compuesta por los residuos 67 al 80 interactúan con NS3, uniéndolas a través de la región rica en Gly-Ser en la porción N-terminal de NS3 (51). La secuencia mínima para la actividad proteasa está dentro de los 167 residuos de NS3, y tiene

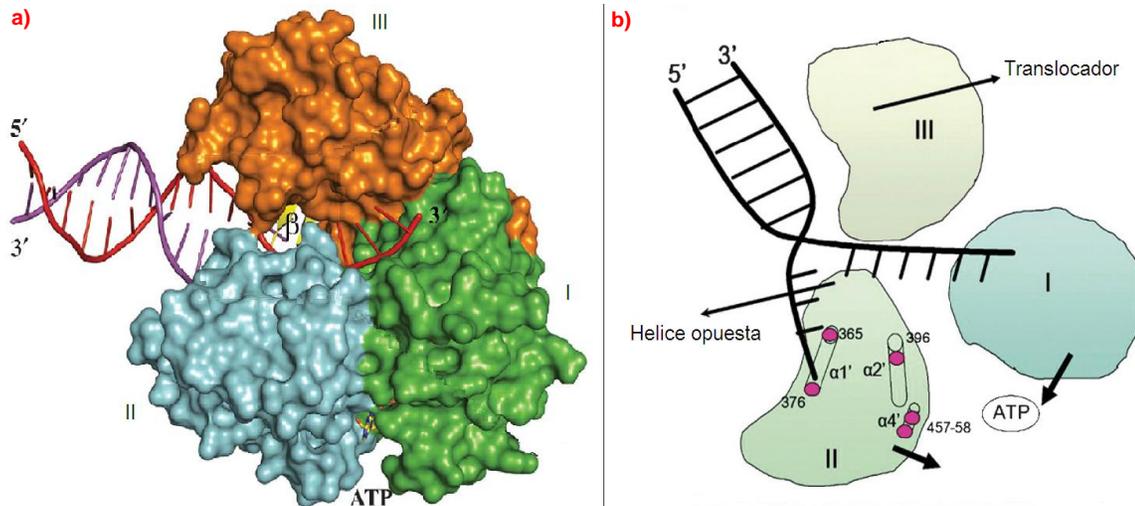
una marcada preferencia por los aminoácidos dibásicos Arg y Lys (Lys-Arg, Arg-Arg, Arg-Lys) en la posición P1 y P2, y ocasionalmente Gln-Arg; Gly, Ala, o Ser (aminoácidos pequeños) en la posición P1'. El corte de la cadena lateral es: (Arg/Lys/Gln)-(Arg/Lys) ↓ (Gly/Ser/Ala/Thr) (142-145); el complejo NS2B/NS3 realiza estos cortes a la poliproteína viral precursora en regiones no estructurales de forma *cis* entre: NS2A/NS2B, NS2B/NS3, y de forma *trans* entre: NS3/NS4A, y NS4B/NS5, así como, en el extremo C-terminal de la proteína C (ver Figura 5) (92, 143, 146-149).



**Figura 5.** Representación esquemática de la proteólisis en la poliproteína precursora de los *Flavivirus*, durante la maduración viral, e influencia sobre su estructura celular. Esta poliproteína es cortada por proteasas celulares del huésped en el retículo endoplásmico y por la proteasa viral en el citoplasma, indicado por las flechas (147, 150).

La NS3 también es miembro de la familia DEAH/D [región de homología Asp-Glu-Al-(His/Asp)], al poseer siete motivos estructurales conservados que la ubican dentro de la superfamilia 2 de las ARN helicasa/NTPasas (15, 151, 152). Tiene tres subdominios con secuencia y estructura significativamente conservada al igual que otras helicasas de *Flavivirus*, el subdominio I y II conformado por los residuos 181 al 326 y 327 al 481, respectivamente, están compuestos de un centro de seis hojas beta paralelas, las cuales están rodeadas de cuatro hélices alfa, el subdominio III (482 al 618) tiene cuatro hélices alfa paralelas y está rodeada por tres hélices alfa cortas y dos hojas beta anti-paralelas que se exponen a los solventes. El centro activo helicasa está dentro del dominio I, un segmento de 10 residuos de Gln<sup>243</sup> a Thr<sup>252</sup>. El bucle P de unión a fosfato, sitio activo de la ATPasa comprende el segmento de los residuos Arg<sup>460</sup> a Gln<sup>471</sup> en el subdominio II (16, 153). La función de la helicasa es separar el ARN de doble hebra (-

*siglas-* ARNdh), durante la replicación viral; esta actividad es dependiente de energía, la que se adquiere a partir de su actividad de NTPasa que es capaz de hidrolizar ATP para generar la energía necesaria (ver Figura 6) (10, 154-156).



**Figura 6.** Representación de la estructura de la proteína NS3 helicasa /NTPasa. **a)** los subdominios coloreados, I verde, II azul cielo, III anaranjado, el sustrato ARNdh en colores morado y rojo. **b)** el ARNdh se introduce por el túnel formado por los tres subdominios donde es desenrollado, la enzima sufre una translocación, y hay generación de ATP. (157-160).

La ARN 5' trifosfatasa (*-siglas-* RTPasa) cataliza el corte del enlace anhídrido fosfórico del grupo fosfato terminal de la cadena de ARN recién sintetizada, unido al extremo 5' trifosforilado en la posición  $\gamma$ - $\beta$ , y participa en la formación de la estructura de la Cap en el extremo 5' terminal del ARN viral, vinculada a la NS5 (coprecipitación como inmunocomplejo). Las tres actividades funcionales son dependientes de  $Mg^{2+}$  (11, 13, 161).

La proteasa y helicasa se unen por un interdominio pequeño (residuos de 169 a 179) conservado entre los *Flavivirus*, que juega un papel importante en la asociación entre los dos dominios de NS3. El dominio proteasa incrementa la afinidad del dominio helicasa por el ADP y ATP. Las actividades NTPasa y RTPasa de la proteína NS3 pueden ser estimuladas por la proteína NS5 *in vitro* (89, 139, 162).

En un experimento llevado a cabo en células de riñón de hámster recién nacido, la NS3 del DENV-2 interactúa con la proteína de unión a receptor nuclear humano (NRBP *-del inglés-* Nuclear Receptor Binding Protein), esta asociación altera la estructura de las membrana, posiblemente revierte el papel de la NRBP, en el tráfico entre el retículo endoplásmico y el complejo de golgi. (163). Otro estudio muestra inducción de apoptosis en células VERO post-infección con DENV-2 que codifica la NS3 serinoproteasa. Una proteína de fusión NS2B-NS3<sub>185</sub>(pro)-EGFP recombinante marcada con fluorescencia, se localizó en vesículas citoplasmáticas de células apoptóticas, sin embargo la misma proteína de fusión modificada

reemplazando His<sup>51</sup> por Ala mediante mutación sitio dirigido, redujo significativamente la habilidad de NS2B-NS3<sub>185</sub>(pro) para inducir apoptosis. Este hallazgo sugiere que a pesar de que la NS3 estimula la muerte celular programada, la presencia del cofactor NS2B incrementa esta respuesta 3 veces más (164). Mutaciones que disminuyen la actividad proteasa, sin eliminarla, son candidatas para su incorporación en el Ácido Desoxirribonucleico complementario (-*siglas*- ADNc) del DENV infeccioso completo, con el objetivo de crear virus potencialmente atenuados (148).

Por la evidente importancia de la proteína NS3 en el ciclo replicativo del DENV, y su implicación en múltiples funciones catalíticas y destacadas características inmunomoduladora, numerosas investigaciones están encaminadas a su obtención por vía recombinante.

### **3.4 Sistemas de expresión para proteínas recombinantes**

Actualmente, se pueden sintetizar proteínas recombinantes en cultivos celulares de bacterias, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, insectos, animales y plantas transgénicas. El vector de expresión se elige normalmente en combinación con el sistema de expresión a utilizar. Las ventajas de estos sistemas es que permite generar partículas pseudovíricas similares a los viriones, que expresan proteínas con características bioquímicas y biológicas similares a las de las proteínas nativas; facilitan su producción y ofrece seguridad de los antígenos para su uso farmacológico o en vacunas (165).

Las células de insectos son transformadas mediante vectores basados en baculovirus, que aprovechan el fuerte promotor de la polihedrina del virus para las siete proteínas no estructurales de *Flavivirus* en baculovirus. Las células de insectos muestran altos niveles de expresión y son capaces de llevar a cabo modificaciones postraduccionales como glucosilaciones, fosforilaciones, procesamientos proteolíticos, acilaciones, carboximetilaciones y procesar los puentes disulfuro. Las proteínas obtenidas en estos sistemas muestran similitud en talla, estado de glucosilación y antigenicidad con respecto a las proteínas nativas (166-168). Para evaluar la respuesta inmune hacia el proteoma DENV se diseñó un microarreglo de proteína, para evaluar la respuesta humoral tipo IgG de monos vacunados con virus dengue frente a las proteínas estructurales prM, C, y E y las no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 expresadas en baculovirus (95). La proteína NS1 con patrones de glucosilación se le añadió la secuencia S-tag para incrementar patrones de solubilidad, secreción y expresión en baculovirus, además mejorar el grado de purificación a través de la inmunoadfinidad (169).

Se emplean cultivos de células de mamífero para proteínas con modificaciones postraduccionales específicas, las líneas celulares T 293 y HeLa se emplearon para expresar el

dímero prM-E, el corte de prM fue mejor en esta última (170). Las células de mosquito C6/36 y BHK fueron infectadas con DENV recombinante con mutaciones sitio específica, para evaluar los patrones de glucosilación en la proteína E (Asn<sup>67</sup>Gln y Asn<sup>153</sup>Gln), concluyendo que interfieren en la replicación, transcripción y traducción así como en la generación de nueva progenie (171). Células BHK se infectaron con un clon de expresión que codifica para la proteína C, mutante en la posición de los aminoácidos Leu<sup>50</sup>Ser y Leu<sup>54</sup>Ser de la hélice  $\alpha$  2 para investigar sus propiedades bioquímicas y la participación en el plegado, dimerización, unión al ARN, concluyendo que esas mutaciones no alteran el plegado ni otras de sus propiedades (172).

En el caso del DENV se ha utilizado la levadura *Pichia pastoris*, capaz de glucosilar y plegar proteínas complejas, incluyendo aquellas que tienen un número elevado de puentes disulfuro, ya que su proceso de producción es muy similar al de las células de mamífero. La adición de una secuencia señal en el gen permite la secreción de la proteína al medio de cultivo, lo cual facilita su manipulación y purificación. Se han generado proteínas estructurales: C, prM, E, de esta última el dominio III, de los cuatro serotipos y la proteína no estructural NS1 (173-178).

Los microorganismos más utilizados para la síntesis de proteínas recombinantes son las bacterias, concretamente la especie *Escherichia coli*. Aunque se ha usado la superficie de *Salmonella* para expresar proteínas de E y la proteína NS1 del DENV (171, 179, 180).

*E. coli* es fácil de cultivar y de modificar genéticamente. Un efecto colateral experimentado por las bacterias cuando son forzadas a producir una proteína a concentraciones elevadas es la generación de cuerpos de inclusión; que no son más que agregados citoplasmáticos insolubles de dicha proteína (181). Las proteínas que forman cuerpos de inclusión son inactivas y además suelen mostrar alteraciones estructurales, como puentes disulfuro no nativos, tanto intra como intermoleculares y cisteínas libres no habituales, esto es un impedimento para la expresión de proteínas de interés en estudios de estructura y función biológica, actividad enzimática, unión a ligando, interacciones con otras proteínas, etc. (182). Por lo tanto se han desarrollado aproximaciones para reducir la producción de cuerpos de inclusión, que incluyen el direccionamiento de la proteína hacia el espacio periplásmico y el crecimiento de las bacterias a temperaturas inferiores a las estándar y la coexpresión con chaperonas (183). Por otro lado, condiciones subóptimas durante la expresión de la proteína, purificación, almacenamiento, o manejo pueden alterar la estructura de la proteína por agregados irreversibles, con la pérdida concomitante de la actividad. Para resolver estos problemas, una amplia variedad de cosolventes, identificados facilitan la solubilidad y por ende el plegado apropiado de la proteína (184). Un acercamiento alternativo es estabilizar las interacciones intramoleculares de la proteína nativa, en este sentido los cosmótopos débiles ayudan a estabilizar el estado nativo

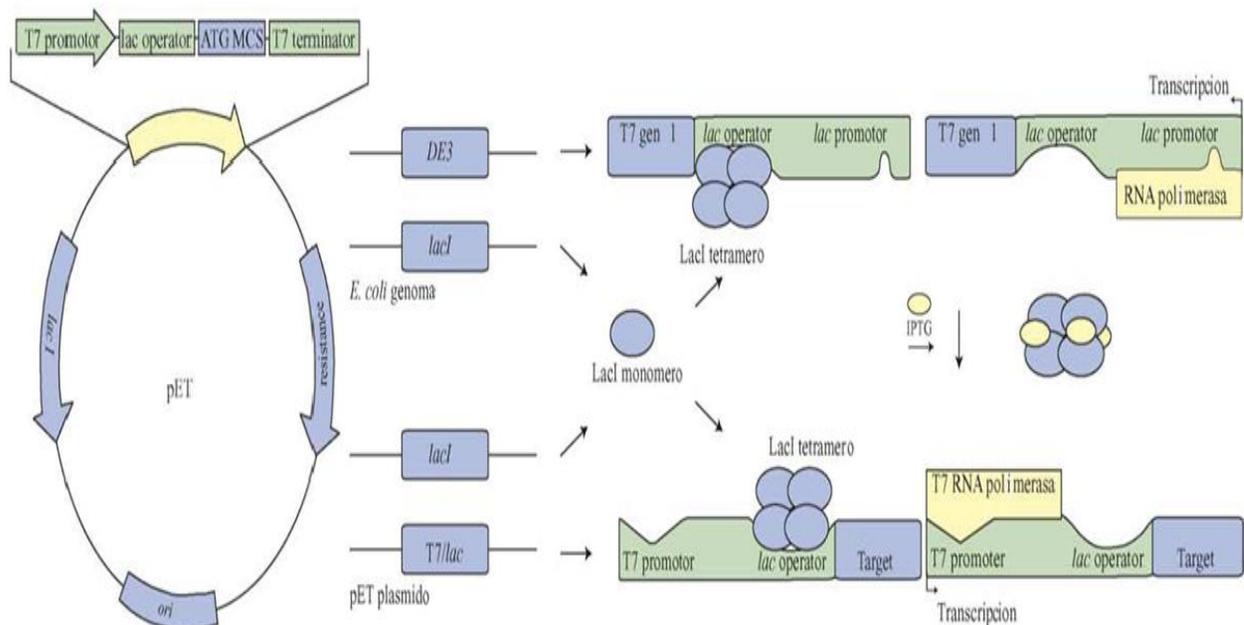
de proteínas. Por otro lado, los agentes reductores como ejemplo el  $\beta$ -mercaptoetanol puede facilitar la solubilidad de la proteína y prevenir la agregación inhibiendo la formación de uniones disulfuro no nativas (185).

Han sido usadas diferentes cepas de *E. coli* para la obtención de la proteína NS3 del DENV con la finalidad de hacer distintas investigaciones, así la cepa *E. coli* C41(DE3) fue transformada con un clon recombinante con mutaciones sitio específico para evaluar el sitio activo de la proteasa localizado dentro de los bucles S1 y S2. Los aminoácidos en las siguientes posiciones Leu<sup>115</sup>, Asp<sup>129</sup>, Gly<sup>133</sup>, Thr<sup>134</sup>, Tyr<sup>150</sup>, Gly<sup>151</sup>, Asn<sup>152</sup>, Ser<sup>163</sup> e Ile<sup>165</sup>, se sustituyeron por alanina y se observó que estos cambios afectaron la actividad enzimática cuando se obtuvo bajo condiciones desnaturalizantes (186). Un estudio con la finalidad de obtener un anticuerpo monoclonal anti-NS3 del DENV-2, realizó el clonaje de la proteína NS3 en el plásmido pQE31 obteniendo sus mejores resultados bajo condiciones desnaturalizantes cuando se usó la cepa *E. coli* JM109 (187). En otro estudio se usó el vector de expresión pGEX-4T y la cepa *E. coli* (BL21), en condiciones de expresión que permitieron obtener la proteína recombinante NS3 proteasa-ATPasa en los cuerpos de inclusión con la finalidad de desarrollar un anticuerpo monoclonal (188). Estudios previos realizados por el grupo de Vacuna Dengue del IPK usando las células de *E. coli* XL1-Blue y M15[pPREP4] y el vector pQE<sub>30</sub> permitieron la obtención de la proteína NS3 por vía recombinante con buenos rendimientos. No obstante las condiciones de insolubilidad en las que se obtiene la proteína, debido a la formación de cuerpos de inclusión, influyen negativamente en la renaturalización por lo que se hecho necesario el empleo de métodos más eficientes (24).

Metodologías recientes han permitido obtener la proteína NS3 de forma soluble y biológicamente activa. Con este fin la cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3) fue transformada con los vectores de expresión pET15b-DEN 1-4 CF<sub>40</sub>-Gly-NS3pro<sub>185</sub>, para posteriormente evaluar la actividad de la proteasa usando péptidos sintéticos como sustratos, obteniéndose buenos resultados (189). Por otro lado se obtuvo el dominio helicasa de la proteína NS3 del DENV-4, clonado en el plásmido pET-32b en las mismas células de *E. coli* BL21-CodonPlus (Stratagene) y se demostró que el ARN monocatenario unido a la enzima NS3 cambia a un estado catalítico competente impartido por un movimiento interior del bucle-P, que cierra el interdominio y mantiene una base estructural de hidrolisis de ATP estimulado por el ARN. Estas estructuras demuestran por primera vez cambios cuaternarios grandes en la helicasa de los *Flavivirus*, identifican la molécula de agua catalizadora y apuntan a una horquilla- $\beta$  que se destaca del subdominio II, como un elemento crítico para desenrollar el ARNdh. Estos resultados sugieren que la NS3 puede ejercer un efecto de fijación al ARN y participar en la replicación y ensamble de los *Flavivirus* (158). Varias construcciones de la proteína NS3 del

DENV-2 fueron clonadas en los vectores pET-28<sup>a</sup>, para su expresión en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta pLac con la finalidad de evaluar la función ATPasa, en el dominio C-terminal de la helicasa. El estudio propone que a diferentes concentraciones de ATP, la NS3 podría funcionar regulando el plegado de estructuras de ARN virales (190).

Como se ha descrito anteriormente la cepa de *E. coli* B más utilizada en los sistemas de expresión es la BL21, debido a que es defectiva en las proteasas OmpT y Lon, involucradas en la degradación de proteínas. En este sistema el vector pET permite clonar cerca del extremo 3' terminal del gen *lac Z*, lo que resulta muy útil debido a que el inicio de la transcripción y traducción es dirigida y regulada por la maquinaria biosintética de la célula produciéndose de este modo altos niveles de la proteína deseada. Dichas proteínas son marcadas con una cola de histidina, debido a una secuencia presente en el vector que codifica para seis aminoácidos de histidina, lo cual permite su posterior purificación en columna por cromatografía de afinidad a metal (Ni<sup>2+</sup>) (23, 191). La presencia de genes que codifican para β-lactamasas confiere al sistema de expresión resistencia a ampicilina (-siglas- Amp). El promotor T7 (presente en el plásmido) es una secuencia de 20 nucleótidos que no es reconocida por la ARN polimerasa de *E. coli*. La ARN polimerasa T7 transcribe 230 nucleótidos por segundo y es cinco veces más rápida que la ARN polimerasa de *E. coli* (50 nucleótidos por segundo) (ver Figura 7) (192-194). El promotor lacUV5 es menos sensible a la regulación por cAMP-CRP (-siglas- proteína receptora de cAMP) que el promotor del lac. Sin embargo, la incorporación de 1% glucosa en el medio de cultivo reduce niveles de cAMP y aumenta la represión del promotor significativamente (el cAMP se produce como una respuesta a niveles bajos de glucosa) (195).



**Figura 7.** La cepa de expresión contiene el ADN del bacteriófago DE3 integrado en el cromosoma. Este bacteriófago contiene a su vez el gen codificante de la T7 ARN polimerasa regulado por el promotor lacUV5 (operador *lac*) cuya actividad se induce por medio de la adición del inductor IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-Tiogalactopiranosido) al unirse al represor tetramérico Lacl (codificado en el genoma de *E. coli* y pET). En este sistema, el vector de expresión pET utilizado para la expresión de la secuencia codificante de la proteína de interés, incorpora una región promotora (híbrido T7/lac) reconocida por la T7 ARN polimerasa, de manera que tras la adición del IPTG, la T7 RNA polimerasa expresada desde el cromosoma bacteriano induce la expresión de la proteína a partir del vector (23).

### 3.5 Desarrollo de antivirales y vacunas para el DENV

El desarrollo de antivirales requiere del conocimiento del ciclo de multiplicación del virus en la célula huésped así como las características estructurales y funcionales de las proteínas virales, a fin de hallar los blancos más adecuados para bloquear la infección. Basado en estos aspectos reseñaremos a continuación aquellos que son objeto de estudio como potenciales blancos antivirales. (145, 196).

**Inhibidores de la entrada:** tienen como blanco de ataque a la glucoproteína E. Su capacidad inhibitoria está relacionada con el grado y tipo de distribución de cargas negativas y peso molecular elevado, lo que puede representar una seria desventaja para su uso clínico en forma sistémica. Se ha demostrado la eficacia anti-DENV *in vitro* de sustancias polianiónicas de estructura diversa, entre las que se encuentran heparina, suramina, polioxometalatos, carragenanos y galactanos extraídos de algas marinas (99, 197).

**Maduración:** es una etapa importante para la infectividad viral y se ha demostrado que el uso de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa celular, castanospermina, entre otros impide la remoción de las glucosas terminales en los N-glicanos de las proteínas E y prM, limitando el plegamiento

exitoso, lo que trae como consecuencia el bloqueo de la función de los viriones, y por tanto una infección no productiva (198, 199).

Inhibición a nivel de la expresión génica: está dirigida directamente a bloquear la expresión del genoma, utilizando pequeños oligonucleótidos antisentido. Se han ensayado exitosamente *in vitro* oligonucleótidos fosforotioatos con grupos propinilo en los C-5 de uridinas, citidinas y oligómeros morfolino fosforodiamidato conjugados a péptidos de arginina. En ambos casos, los mejores resultados se obtuvieron con oligos reactivos que contienen secuencias de las regiones no codificantes de los extremos 3' y 5' del ARN genómico, introduciendo así un nuevo blanco potencial de ataque en DENV, aunque las principales dificultades son su entrada a la célula y su estabilidad frente a la acción de las nucleasas (200, 201).

Inhibidores de la proteasa: para el DENV, que posee la proteína NS3 cuyo dominio serinoproteasa se encuentra en el extremo N-terminal, y utiliza la proteína NS2B como cofactor activante, constituyen una fuente valiosa de antivirales. El uso de inhibidores ha logrado caracterizar parcialmente los requisitos necesarios para la actividad proteolítica de NS3, a partir de la inhibición del clivaje producido en distintos sitios de la poliproteína viral. La proteína NS3 parece tener requerimientos únicos e inusuales por la presencia de residuos dibásicos como sustratos que alientan el diseño de inhibidores selectivos que no inactiven las proteasas celulares esenciales para las funciones fisiológicas (14, 186, 202).

Los análisis cinéticos indican por primera vez que Glu<sup>92</sup> y Asp<sup>50</sup> en NS2B y Gln<sup>27</sup>, Gln<sup>35</sup> y Arg<sup>54</sup> en NS3pro proporcionan el punto de interacción secundaria para la unión al sustrato. Este nuevo enfoque demuestra la contribución del cofactor NS2B a la activación de NS3 y puede utilizarse para refinar la estrategia de búsqueda basada en diseños computarizados y elevar la calidad de moléculas identificadas como candidatas a inhibidores potentes contra el *Flavivirus* (140). Por otro lado, se ha demostrado por mutagénesis de nueve residuos localizados dentro de la estructura del sitio activo S1 y S2 que Leu<sup>115</sup>Ala tiene la función catalítica de la enzima y por consiguiente representa un determinante funcional importante de la conformación de la NS3pro del DENV para la especificidad al sustrato (186). Se han sintetizado moléculas pequeñas basadas en péptidos que actúan como sustratos de NS2B-NS3pro, por ejemplo el tetrapéptido benzoil-norleucina (P4)-lisina (P3)-arginina (P2)-arginina (P1)-ACMC (Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-ACMC), un tetrapéptido aldehído: el Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H y el cofactor (CF40-Gly4-Ser-Gly4-NS3FL) que son inhibidores competitivos del dominio proteasa. El estudio se llevó a cabo para encontrar los inhibidores más potentes y revelar la relación estructura-actividad, resaltando la importancia relativa de varias cadenas laterales en la cadena conservada y la posibilidad de reemplazar los residuos cargados en P1 con un grupo neutro (203, 204).

Inhibidores de la síntesis de ARN: son de los compuestos más estudiados, dentro de ellos la ribavirina, un análogo de guanosina que produce un amplio espectro antiviral *in vitro* contra diferentes virus con genoma ARN. El efecto inhibitorio de la ribavirina contra DENV es muy débil y poco selectivo debido a su acción citostática (205, 206). Una fórmula de trifosfato NITD008 inhibe la actividad ARN polimerasa ARN dependiente de DENV y funciona como un terminador de la cadena durante la síntesis de ARN viral. El NITD008 tiene buenas propiedades farmacocinéticas *in vivo*, demostrándose que el tratamiento con NITD008 suprimió la viremia de ratones infectados con el DENV, redujo la elevación de citoquinas, y previno la muerte, sin efectos adversos. Estos resultados revelaron que la inhibición del nucleósido podría fomentarse para el tratamiento de infecciones por *Flavivirus* (207).

El dominio helicasa de la NS3 es esencial para la replicación viral y también es un blanco atractivo para el diseño de componentes virales (208). La estructura 3D de la helicasa/NTPasa del DENV muestra tres dominios: I y II situados en el N-terminal (el sitio NTPasa está entre estos dos dominios); y en el C-terminal el dominio III (16). Hay un túnel entre los tres subdominios que transloca una cola del ácido nucleico a lo largo de la enzima. Este movimiento se activa por el hidrolisis de NTP para proporcionar la energía (153). Se han identificado por mutagénesis regiones cruciales para la actividad ATPasa y helicasa que son de interés para el diseño de inhibidores alostéricos (159, 208). La sustitución de los residuos conservados <sup>184</sup>Arg-Lys-Arg-Lys localizados en el subdominio I de la helicasa, por <sup>184</sup>Gln-Asn-Gly-Asn (209), y Lys<sup>396</sup>Ala, localizados en la superficie del dominio II helicasa, atenúa drásticamente las tres actividades enzimáticas de la proteína NS3 del DENV (159). Además, la estructura cristalográfica del complejo NS3hel-ARN monocatenario de DENV muestra la reestructuración del ARN ligado, y sugiere que la actividad NS3hel de desenrollar el ARN del DENV produce hidrolisis de NTP (158, 210).

La Arg<sup>376</sup> y Lys<sup>396</sup> pertenecen a la hélice  $\alpha 1'$  y  $\alpha 2'$  de dominio II respectivamente, estos dos sitios espacialmente distintos actúan en la unión al ARN. La región entre el dominio II y III, especialmente la horquilla  $\beta$  expuesta a los residuos hidrófobos actúa como "separador de la hélice" rompiendo los puentes de hidrógeno. La cara cóncava básica entre los dominios II y III interviene como "translocador" para la unión al ARNdh. La sustitución Ile<sup>365</sup>Ala abolió la actividad helicasa asociada a función-estructura, una región atractiva para el diseño de moléculas antivirales pequeñas (157, 159, 211).

Como se ha visto, existen varias sustancias con acción antiviral promisorias, pero a pesar de los esfuerzos realizados aún se requiere mucha información acerca de los posibles efectos indeseados, que pudieran causar debido a su potente acción sobre muchas de las funciones celulares. Es por ello que un gran número de investigadores a nivel mundial están interesados

en lograr una vacuna efectiva contra el Dengue, puesto que se eliminarían los riesgos en el organismo, así como el posible efecto residual por el uso reiterado de estos compuestos.

La necesidad de desarrollar vacunas eficaces contra DENV tiene especial importancia si se toma en cuenta la magnitud del problema de la transmisión de los 4 serotipos en el mundo y que desde los años 40 del siglo pasado se han intentado desarrollar vacunas contra el DENV sin éxito en la protección contra los cuatro serotipos (50). Entre las proteínas codificadas por el genoma viral que se han identificado como buenos inmunógenos las proteínas estructurales E y prM, así como, las proteínas no estructurales NS1 y NS3 (17, 212, 213).

La eficacia de una vacuna contra el DENV depende de la intensidad del estímulo para obtener un nivel más alto de anticuerpos neutralizantes (214), proteja durante largos períodos de tiempo a las personas vacunadas y no represente un riesgo para la salud, ya sea por la producción de viremia o por la inducción de anticuerpos no neutralizantes (amplificación dependiente de anticuerpos) que potencien infecciones subsecuentes por virus heterólogos. Además debe producir anticuerpos neutralizantes contra los cuatro serotipos simultáneamente (120).

Para desarrollar una vacuna exitosa, es crucial comprender mejor la patogénesis del Dengue. La manera más eficaz de probar el estado inmunológico basal y la infección de DENV es usar modelos de experimentación en animales, siendo los animales de experimentación esenciales para probar la eficacia y seguridad de candidatos vacunales antes de ensayos clínicos en humanos. Aunque los mosquitos y los primates (inclusive el hombre) son los únicos hospederos naturales del DENV, experimentalmente, los chimpancés, monos rhesus y gibones desarrollan la viremia, pueden infectar a los mosquitos y tienen respuesta inmunitaria sin manifestaciones clínicas. Por lo que constituyen modelos adecuados para estudiar la respuesta inmunitaria frente a vacunas, ya que el inicio de la viremia es similar a la de los seres humanos (215). Los ratones normalmente son usados como un modelo animal antes de usar los primates no humanos. Sin embargo, los resultados obtenidos no son promisorios porque los ratones del tipo salvaje son resistentes a la enfermedad inducida por el DENV. De ahí, que se han desarrollado diferentes modelos de ratón que reproducen la respuesta del DENV similar a la de los humanos, utilizando la vía de inoculación intracerebral, ratones quiméricos trasplantados con células humanas, ratones inmunocomprometidos y ratones inmunocompetentes. (216).

En la actualidad se dispone de diversos enfoques metodológicos para producir vacunas contra DENV: virus vivos atenuados, virus completos inactivados o subunidades víricas, vectores víricos recombinantes, péptidos, proteínas recombinantes y vacunas de ADN. Sin embargo, la eficacia de una vacuna depende en gran medida de la inmunobiología de la infección vírica en cuestión y de la tecnología disponible para seleccionar el tipo de antígeno (217, 218).

La formulación de vacunas deben estar constituidas por componentes individuales del virus que sólo despierten respuestas protectoras, eliminando aquellas proteínas que no representan interés inmunológico y/o puedan estar relacionadas con la virulencia. De esta manera, se han desarrollado nuevas vacunas que no están formadas por el agente infeccioso completo, y que permiten, entre otras ventajas, la diferenciación serológica de los animales vacunados en relación con los enfermos (219).

Las proteínas no estructurales recombinantes inducen anticuerpos que no reaccionan con el virión para formar complejos, por tanto no presentan riesgos de facilitar la infección de células a través de los receptores Fc, que se asocian con la mayoría de los casos severos. Una vacuna efectiva podría estar formada por los epítomos de E, C, NS1 y NS3 que inducen anticuerpos protectores, pero no facilitadores de la infección (214, 220, 221). Por tal motivo, la OMS ha incentivado la búsqueda por mapeo de estos epítomos de uno o más *Flavivirus*. Por ejemplo en el DENV-1 se han encontrado dos dominios antigénicos en la proteína E; el dominio I (aa 76 al 93) contienen epítomos específicos de serotipo y el II (aa 293 al 401) que incluye tanto epítomos de serotipo como de subgrupo de *Flavivirus* (222, 223).

La secuencia de aminoácidos de la cepa atenuada PDK-53 comparada con la cepa original DEN-2 16681 mostró cambios, específicamente la mutación Glu<sup>250</sup>Val en NS3, que en ensayos *in vitro* afecta la capacidad replicativa del virus, evidenciándose a través de la presencia placas más pequeñas y difusas, e incremento de su sensibilidad a la temperatura, no obstante estos factores no fueron suficientes para atenuar el virus PDK-53 cuando se ensayó *in vivo* en ratones lactantes. Sin embargo, su administración por vía subcutánea en 10 voluntarios, a una dosis de 10<sup>4</sup> unidades formadora de placa demostró ser altamente inmunogénica ya que desarrollaron anticuerpos que perduraron durante dos años (224, 225).

Las mutaciones que disminuyen la actividad proteasa de NS3 sin eliminarla, son candidatas para la introducción en los ADNc del DENV infeccioso, con el objetivo de crear virus potencialmente atenuados. Por ejemplo Tyr<sup>150</sup> y Gly<sup>153</sup> no pueden ser reemplazados por alanina, Tyr<sup>150</sup> y Asn<sup>152</sup> podrían ser reemplazados por un cambio conservado y los residuos conservados Asp<sup>129</sup> y Phe<sup>130</sup>, pueden ser sustituidos por cualquier aa (148).

La proteína NS3 es considerada blanco principal para células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, respuestas celulares involucradas en protección, sin embargo, pocos estudios han evaluado el uso de esta proteína como inmunógeno (224). Vacunas basadas en ADN miden su eficacia y protección, a través de diferentes plásmidos recombinantes, usando como control la proteína NS3 completa con sus dominios funcionales (proteasa y helicasa), unido o no a un péptido señal (t-PA). Las proteínas recombinantes se expresaron con éxito en las células de BHK-21 transfectadas, y sólo los plásmidos que contienen la secuencia t-PA secretan la proteína. Los ratones Balb/c se

inmunizaron con las vacunas de ADN diferentes y retaron con una dosis letal de DENV-2. La mayoría de los animales inmunizados con plásmidos que codifican la NS3 completa o el dominio helicasa sobrevivieron al reto, sin tener en cuenta la presencia de t-PA. Sin embargo, algunos ratones presentaron signos clínicos de infección con morbilidad alta (parálisis de piernas posteriores y postura encorvada), principalmente en grupos de animales inmunizados con las vacunas de ADN basadas en el dominio helicasa. Por otro lado, la inoculación con plásmidos que presentan el dominio proteasa no indujo protección, la tasa de mortalidad y morbilidad en éste grupo de ratones fue similar a la detectada en el grupo control de animales. La respuesta inmune celular se analizó por ELISPOT específico al péptido NS3 para células T CD8<sup>+</sup>. Los resultados revelaron que las vacunas de ADN que codifican para la proteína completa inducen producción de INF lo que sugiere protección por el sistema inmunológico (21).

Es necesario fomentar la vigilancia epidemiológica de la enfermedad establecimiento de una red de laboratorios de diagnóstico y centros de referencia, a fin de caracterizar la circulación del virus. Durante las epidemias de DENV pueden aparecer mutantes antigénicos. Aunque estos mutantes no reflejen un aumento de la virulencia, podría ser de utilidad conocerlos para seleccionar las cepas más adecuadas e incluir en la elaboración de la mejor vacuna en la región.

Actualmente se tienen grandes esperanzas con el desarrollo de la biotecnología aplicada a los *Flavivirus*, el cual permitirá la identificación de epítomos relevantes y su disposición como inmunógenos con ayuda de adyuvantes inocuos que incrementen la inmunogenicidad de tales péptidos. Las estrategias para la inmunización contra el DENV favorecen el uso de vacunas que contengan antígenos inmunodominantes contra los cuatro serotipos. El reto consiste en usar proteínas estructurales, no estructurales o ambas, expresadas mediante la tecnología de proteínas recombinantes. Una vacuna eficaz contra DENV contribuirá a su prevención, control y la relación costo-beneficio será positiva. El hecho de que el DENV endémico afecte a niños de corta edad subraya la necesidad de inmunizarlos.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cepa

Se empleó la cepa Dengue 58/97 2P C6/36 HT, genotipo asiático/americano, serotipo 2 para amplificar el gen que codifica para la proteína NS3 completa. Esta cepa pertenece al banco de cepas del Laboratorio de *Arbovirus* del Departamento de Virología del IPK.

### 4.2 Bacterias

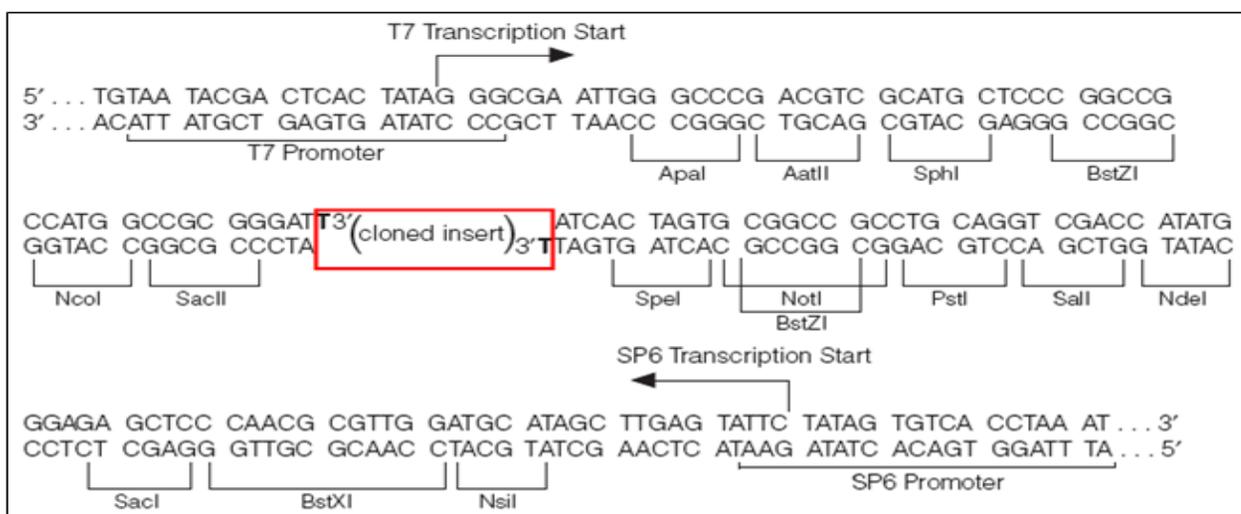
Las cepas de bacterias utilizadas para el crecimiento de los plásmidos y para la expresión de proteína fueron donadas por el Departamento de Investigaciones Biomédicas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y el Laboratorio de Genómica Estructural del Instituto de Biofísica Médica de la Universidad Federal de Rio de Janeiro (UFRJ):

XL1-Blue: supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46thi relA1 lac<sup>-</sup> F'[proAB<sup>-</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10(tet<sup>r</sup>) ]

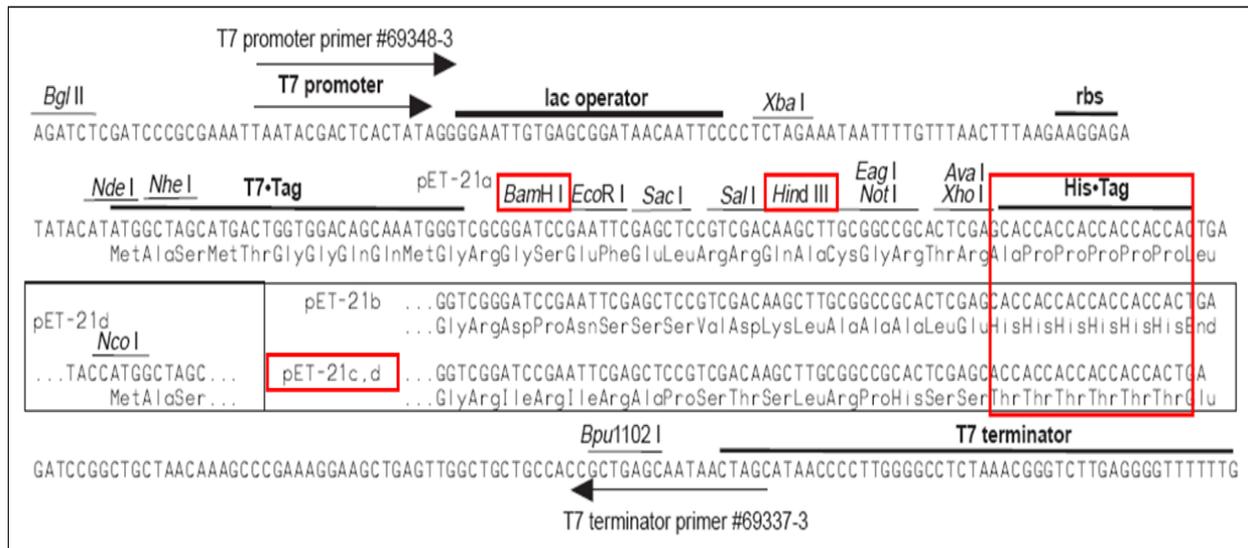
BL21(DE3): F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

### 4.3 Plásmidos

pGEM-T Vector (Promega, USA)



## pET-21d (Novagen)



#### 4.4 Anticuerpos

Anticuerpo monoclonal anti-NS3 gentilmente donado por la Dra. Cedillo del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV, IPN México.

Anticuerpo policlonal anti-proteasa gentilmente donados por el Prof. Ronaldo Mohana del Laboratorio de Genómica Estructural de la UFRJ.

Anticuerpo monoclonal anti-histidina, Amersham Biosciences, Uppsala Sweden.

#### 4.5 Construcción genética del plásmido recombinante para la expresión de la proteína NS3 del DENV-2

##### 4.5.1 Clonaje del gen codificante de la proteína NS3 del DEN-2 en el vector pGEM-T

###### 4.5.1.1 Extracción de ARN viral y amplificación del gen ns3

Para la obtención del ARN del DENV-2 se partió de 140µL de sobrenadante de cultivo celular, se empleó el estuche comercial *QIAmp viral RNA* (QIAGEN, Inc., Valencia, Calif) (ver Anexo I). La amplificación del gen completo de la proteína NS3 se realizó por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa RT-PCR (RT -*del inglés*- Reverse Transcriptase-PCR) de un fragmento de ADN de 1.85kb según el protocolo descrito por Lanciotti y cols., en el año 1992. Para la realización de la RT-PCR se ejecutó el siguiente programa: 45 minutos a 42°C, 5 minutos a 95°C y 35 ciclos de 1 minuto a esta misma temperatura, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a

72°C y para terminar la reacción, 10 minutos a 72°C. La mezcla de reacción se ejecutó en un termociclador (VWR).

Los oligonucleótidos empleados para amplificar la región comprendida entre la posición 4,520 y 6,375b del genoma viral, correspondiente al gen de la proteína NS3, contienen en su secuencia los sitios de restricción (letras minúsculas) necesarios para el posterior clonaje de este gen en un vector de expresión.

(+) 5' <b>g↓gatcc</b> TTATGCGGGCTGGAGTATTGT3'  (Promega)	(-) 5' <b>a↓agctt</b> TTTTCTTCTTCCAGCTTGCAA3'  (Promega)
---	--

#### 4.5.1.2 Detección del producto amplificado

La detección del producto de PCR se realizó mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa a una concentración del 1%, para ello se tomaron 10µL del producto de reacción y se mezclaron con 2µL de tampón estabilizador de muestra 6X (bromofenol azul 0.25%; SDS 1%; Na<sub>2</sub>EDTA 0.1M, pH 8; glicerol 0.1%). Posterior a la aplicación del producto de PCR, el gel de agarosa se sumergió en una solución tampón Tris-Borato EDTA (TBE 1X) (Tris base 0.089M; 0.089M de ácido bórico; 2mM de EDTA pH 8) conteniendo bromuro de etidio (Invitrogen) a una concentración final de 0.5µg/mL. La corrida electroforética se realizó a 100V durante 1 hora empleando como patrones de peso molecular 1kb DNA Ladder, λ DNA *EcoRI/HindIII* (Promega) y 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen). La visualización de las bandas se realizó por exposición del gel a la luz UV en un transiluminador (Spectroline Bio-Vision). Finalmente los productos amplificados se purificaron empleando el estuche comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) (ver Anexo II).

#### 4.5.1.3 Reacción de ligación pGEM-T-ns3

Con el objetivo de preservar y obtener grandes cantidades del fragmento de ADN correspondiente al gen que codifica para la proteína NS3, éste se insertó previamente purificado en el vector pGEM-T teniendo en cuenta la metodología descrita en el manual de protocolos para clonaje independiente de enzimas de restricción del fabricante *pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems* (Promega), (ver Anexo III).

La reacción de ligación se llevó a cabo teniendo en cuenta una relación molar inserto/vector de 3:1 de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{ng de vector (pGEM-T)} \times \text{talla del Inserto (kb) (gen ns3)}}{\text{talla del vector (kb)(pGEM-T)}} \times \text{relación molar inserto (gen ns3): vector (pGEM-T)} = \text{ng de inserto (gen ns3)}$$

Los componentes de la mezcla de reacción se muestran en la Tabla 1. La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a 4°C (Friocell). Transcurrido este tiempo se tomaron 10µL de la reacción de ligación para la transformación en células electrocompetentes.

**Tabla 1.** Componentes de la mezcla de reacción para la ligación del vector pGEM-T y el gen de la proteína NS3 y de los controles de la reacción.

Componentes de reacción	Reacción estándar	Control positivo	Control de fondo
2X tampón de ligación rápida, T4 ADN ligasa	5µL	5µL	5µL
pGEM-T (50ng)	1µL	1µL	1µL
Producto de RCP(gen ns3)	µL	-	-
Control de inserto de ADN*	-	2 µL	-
T4 ADN ligasa (3 UI/µL )	1µL	1µL	1µL
Volumen final (20 µL ) a completar con agua libre de nucleasas	10µL	10µL	10µL

\* Fragmento de ADN de 542bp correspondiente al vector pGEM@-luc (Catalogo # E1541 Promega)

#### 4.5.1.4 Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* cepas: XL1-blue, BL21(DE3)

Para la preparación de las células competentes de *Escherichia coli* (*E. coli*), las cepas, XL1-blue, BL21(DE3) se sembraron de forma independiente en placas de LB/Agar (LB -siglas- medio Luria Bertani) (Triptona 1%; extracto de levadura 0.5%; NaCl 1%, pH 7.5). Posteriormente, se inoculó independientemente una colonia de cada cepa en 5mL de LB y se dejaron crecer toda la noche a 37°C a 200rpm (N-Biotek). Al día siguiente se inoculó el medio LB de 300mL con 3mL del precultivo obtenido y se colocó en agitación (HT BLANK-LOBO-SA) a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica entre 0.5-0.7 medida a 600nm de longitud de onda (Jasco V-630, Japón). El cultivo obtenido se enfrió a 4°C durante 30 minutos y luego se centrifugó a una velocidad de 3,500rpm (ALC PM 140R) durante 15 minutos a una temperatura de 4°C, el sobrenadante se desechó y el pellet se lavó con 300mL de agua bidestilada estéril fría, centrifugándose bajo las mismas condiciones anteriores y desechándose el sobrenadante cuidadosamente. El pellet obtenido se resuspendió por agitación suave en 150mL de glicerol al 10% frío y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Nuevamente el pellet se resuspendió en

15mL de glicerol al 10% frío y luego de centrifugado, el pellet obtenido se resuspendió en 0.2mL de una solución fría conteniendo glicerol al 10%, extracto de levadura al 0.125% y triptona al 0.25%. Por último se hicieron alícuotas de 40µL (a una concentración celular mayor de  $10^8$  células por mL) que fueron congeladas inmediatamente y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### 4.5.1.5 Transformación del producto de la ligación y selección de recombinantes

Para la transformación se tomaron 10µL de los productos de las reacciones de ligación descrita en la Tabla 1, y se mezclaron con 40µL de células electrocompetentes de la cepa XL1-blue. Posteriormente se transformaron según el método descrito en el manual de electroporación para células de *E. coli* (BIO-RAD) (ver Anexo IV). El resultado de la transformación se sembró en el medio selectivo LB/Agar con IPTG/X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido)/Amp. Las colonias crecidas de coloración blanca se resembraron y se les realizó PCR de colonia (ver Anexo V), para la selección de los clones recombinantes. Posteriormente a los clones positivos se les realizó la extracción del ADN plasmídico utilizando el estuche comercial *Plasmid Mini Handbook* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante (ver Anexo VI).

El ADN plasmídico de los clones recombinantes se secuenció de forma automatizada, utilizando el método de terminación de cadena, con el estuche comercial *CEQ DTCS quick start kit* (Beckman Coulter) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia nucleotídica reportada para la cepa cubana 58/97 en la base de datos *GenBank* (número de acceso: AY702035).

### 4.5.2 *Subclonaje del gen que codifica para la proteína NS3 en el vector pET-21d*

#### 4.5.2.1 Preparación del vector pET-21d

El vector de expresión pET-21d se digirió con las enzimas *Bam*HI/*Hind*III (Promega). Para ello 15µg de ADN plasmídico se incubaron una hora a  $37^{\circ}\text{C}$  (Mettler) con 2µL (10U/µL) de ambas enzimas de restricción en su tampón correspondiente a una concentración final 1X. Posteriormente, el vector se desfosforiló utilizando 0.1U de la enzima fosfatasa alcalina derivada del intestino de ternero (Promega) durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  (Mettler). Transcurrido este tiempo, la enzima se inactivó completamente por calentamiento a  $65^{\circ}\text{C}$  (Stuart) durante 15 minutos. Por último, se procedió a la purificación del ADN del vector, por el método de agarosa de bajo punto de fusión, (ver Anexo II).

#### 4.5.2.2 Reacción de ligación pET-21d-ns3

Con el objetivo de insertar la banda correspondiente al gen de la proteína NS3 en el vector pET-21d, previamente se digirió el vector pGEM-T conteniendo el inserto NS3, con las enzimas *Bam*HI/*Hind*III, metodología descrita anteriormente. A continuación se procedió a la purificación

del fragmento de ADN correspondiente al gen de la proteína NS3 (ver Anexo II).

Para llevar a cabo la reacción de ligación se tomaron 100ng del plásmido pET-21d previamente digerido y desfosforilado y se colocaron en una mezcla de reacción con 100ng del fragmento digerido de NS3 en una relación molar inserto/vector de 3:1. A esta mezcla se le añadieron 2U de la enzima T4 ADN ligasa (Promega), con su respectivo tampón a una concentración final de 1X y se incubó a 4<sup>o</sup>C durante toda la noche. Dicha reacción se precipitó con n-Butanol adicionando 500μL de este reactivo. La mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó a 13,000rpm (eppendorf 5417R, Alemania) por 10 minutos a temperatura ambiente para coleccionar el pellet. Una vez eliminada las trazas de n-Butanol, el pellet se resuspendió en 10μL de agua libre de nucleasas, quedando listo para su transformación en las células electrocompetentes. Como control de la reacción de ligación se utilizó el vector pET-21d digerido y desfosforilado bajo las mismas condiciones pero sin el inserto ns3.

#### 4.5.2.3 Transformación del producto de ligación y selección de recombinantes

El producto de las dos reacciones de ligación se transformó cada uno en las células electrocompetentes XL1-blue (ver Anexo IV).

La selección de los clones recombinantes se realizó por el método de RCP y análisis de restricción con las enzimas *Bam*HI/*Hind*III, ambos resultados fueron observados mediante su separación en gel de agarosa a una concentración de 1% en las mismas condiciones anteriormente descritas en el acápite “*Detección del producto amplificado*”.

El ADN plasmídico de los clones recombinantes seleccionados se secuenció automáticamente, utilizando el método de terminación de cadena, con el estuche comercial *CEQ DTCS quick start kit* (Beckman Coulter) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia nucleotídica reportada para la cepa cubana 58/97 en la base de datos *GenBank* (número de acceso: AY702035).

## 4.6 Obtención de la proteína recombinante NS3

### 4.6.1 *Mini-expresión de los clones recombinantes pET-21d-ns3*

Para el estudio de expresión en *E. coli* de la proteína NS3, se seleccionaron 6 clones recombinantes (pET-21d-ns3) los cuales se transformaron (1μg de ADN) en la cepa *BL21(DE3)*, por electroporación (ver Anexo IV).

Tras la transformación, colonias aisladas se inocularon en 10mL de LB/Amp y se dejaron crecer a 37<sup>o</sup>C durante toda la noche con agitación (200rpm) (N-Biotek). De este precultivo inicial se tomaron 200μL y se inocularon en 5mL de LB/Amp incubándose a 37<sup>o</sup>C hasta que alcanzó una DO<sub>600nm</sub> entre 0.5-0.7. Una vez alcanzada esta DO, se le adicionó al cultivo IPTG a una

concentración final de 1mM y se incubó por otras 4 horas. Transcurrido este tiempo se colectó 1mL de cada cultivo, y se procesó la muestra para su análisis por Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) e Inmunotransferencia/WB (WB -del inglés- Western Blot) (ver Anexos VII y VIII).

#### 4.6.2 Determinación de las condiciones de expresión en *E. coli* de la proteína NS3

Para determinar las condiciones óptimas de expresión de la proteína NS3 en las células BL21(DE3) se evaluaron los siguientes parámetros: temperatura de expresión (20°C, 30°C, 37°C), concentración de IPTG (1, 0.5 y 0.1mM) y tiempo de inducción (4 y 22 horas).

Para ello, se tomaron 5µL de precultivo inicial (10mL) y se inocularon en 5mL de LB/Amp fresco, los que se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación. De este último cultivo se tomaron 500µL y se inocularon en 50mL de LB/Amp, incubándose a 37°C en agitación (200rpm) hasta que alcanzó una  $DO_{600nm}$  entre 0.5-0.7. A continuación se procedió a evaluar los distintos parámetros mencionados anteriormente: Temperatura favorable para la expresión de la proteína NS3, concentración de IPTG para inducir la expresión de la proteína NS3 y tiempo de inducción necesario para la aparición de la proteína recombinante con un elevado rendimiento. Trascurrido el tiempo de la inducción se colectó 1mL del cultivo para su análisis posterior por SDS-PAGE y WB (ver Anexos VII y VIII).

A lo largo de este estudio de expresión se tuvo en cuenta como control negativo las cepas BL21(DE3) transformadas con el vector pET-21d bajo las mismas condiciones de inducción.

#### 4.6.3 Determinación de las condiciones de ruptura de *E. coli* para la solubilidad de la proteína NS3

Para ajustar las condiciones de ruptura y solubilidad para la obtención de la proteína NS3 se evaluaron los siguientes parámetros:

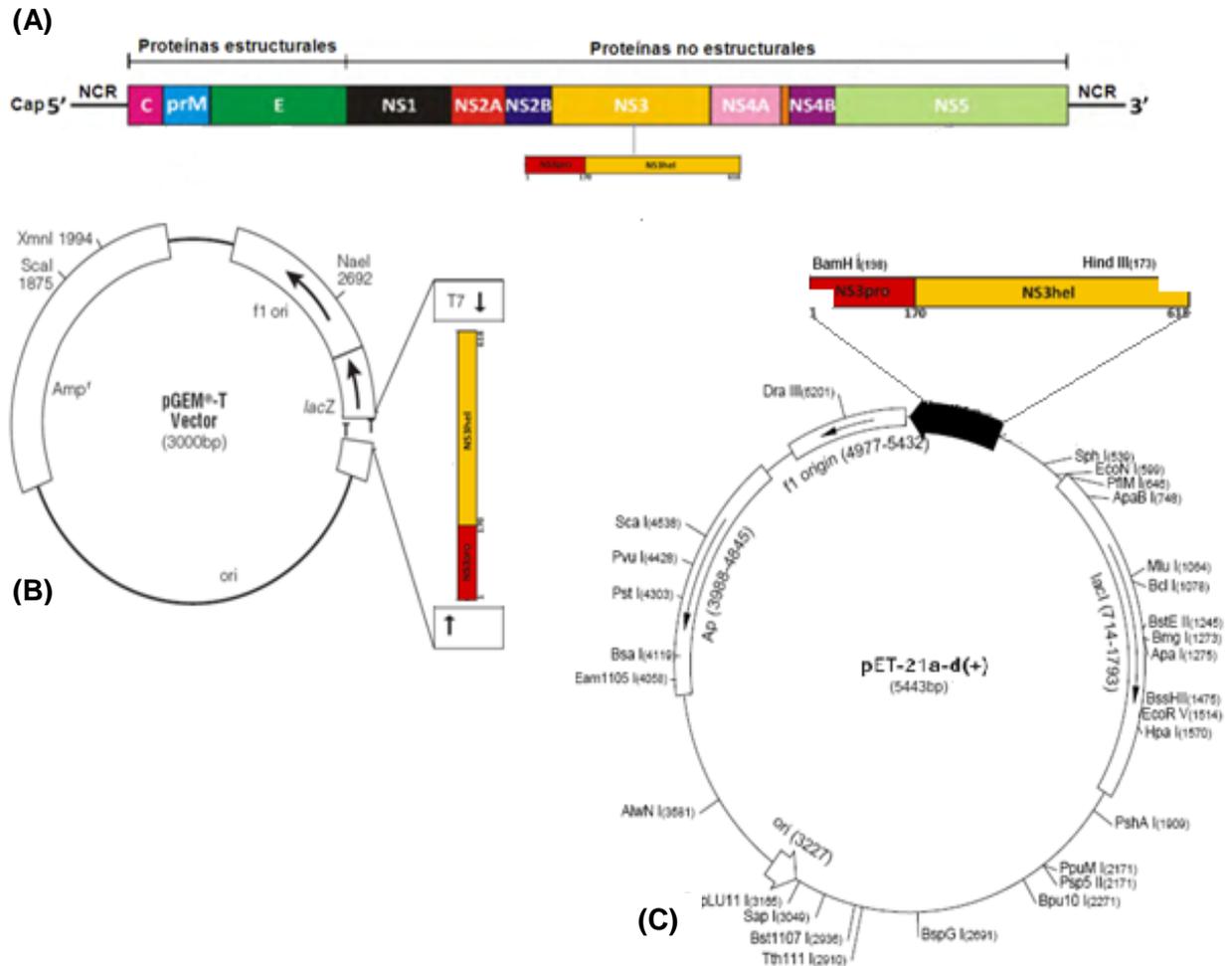
- 1) uso de detergentes (Tritón-X 100 y Sarcosyl) a las concentraciones de 1 y 0.1% en el tampón de lisis (Tris-HCL 50mM pH7.5, NaCl 200mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5mM, y PMSF 1mM)
- 2) uso de pH (7.5 y 8) en el mismo tampón de lisis
- 3) uso de lisozima a la concentración final de 50mg/mL
- 4) métodos físicos de ruptura:
  - a) ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación de las células en baño maría a 42°C hasta que la solución se observó viscosa y muy densa
  - b) sonicación con una potencia entre 200-300 W (Soniprep 150, Inglaterra):

- 6 ciclos de un minuto con intervalos de un minuto
- 6 ciclos de un minuto con intervalos de un minuto, con repetición

Para ello, posteriormente al tiempo de inducción se colectó la biomasa celular por centrifugación a 3,500rpm (ALC PM 140R) durante 10 minutos a 4°C. Las células colectadas se resuspendieron en 10mL del tampón lisis y se mantuvieron en agitación a 4°C toda la noche. Una vez resuspendidas se procedió a la ruptura celular. Al lisado celular obtenido se le adicionó 10µg/mL de DNasa y 2mM de MgCl<sub>2</sub> y se incubó durante 2 horas a 4°C. Por último el lisado celular se centrifugó a 30,000rpm a 4°C por 40 minutos (Beckman Coulter Optima L-90K ultracentrifuge) y se colectaron las fases solubles e insolubles las cuales se analizaron por SDS-PAGE y WB (ver Anexos VII y VIII).

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

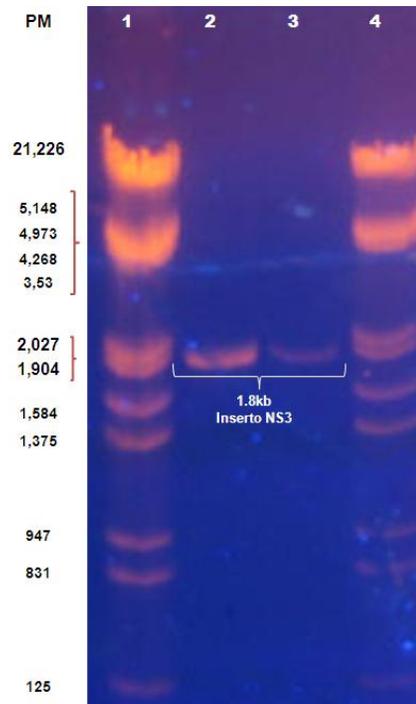
La estrategia de clonaje establecida para la obtención de clones recombinantes conteniendo el gen que codifica para la proteína NS3, se muestra gráficamente en la Figura 8.



**Figura 8.** Representación de la estrategia de clonaje para la expresión en *E. coli* de la proteína NS3. (A) Genoma del DENV-2 que codifica para las proteínas virales. La región correspondiente al gen que codifica para la proteína NS3 fue separada para ilustrar que la misma es clonada completamente. (B) Mapa del plásmido recombinante pGEM-T-ns3. La inserción del gen ns3 se realizó por los extremos T libres del vector pGEM-T. (C) Mapa del subclonaje en pET-21d del gen que codifica para la proteína NS3. La inserción del gen ns3 se realizó a través de los sitios de restricción *Bam*HI/*Hind*III.

### 5.1 Obtención de los clones recombinantes pGEM-T-ns3

El gen que codifica para la proteína NS3 se obtuvo a partir de la amplificación por RT-PCR del genoma viral extraído del sobrenadante de cultivo de la cepa 58/97. En la Figura 9 se muestra la pureza de un fragmento amplificado de ADN de 1.85kb, producto amplificado correspondiente al gen ns3 del DENV-2.



**Figura 9.** Producto de la RT-PCR correspondiente al gen ns3. Líneas 1 y 4: PM  $\lambda$  DNA *EcoRI/HindIII*. Líneas 2 y 3: fragmento de ADN del gen ns3 amplificado y purificado.

La estrategia de clonaje del gen de la proteína NS3 en el vector pGEM-T se grafica en la Figura 8. Este vector tiene la característica de ser circular y abierto con una base timina (T) libre en ambos extremos 3', lo que posibilita la inserción del gen completo ns3. Este sistema de clonaje independiente de enzimas de restricción aumenta la eficiencia de ligación al minimizar la recircularización del vector y aporta extremos compatibles con el producto de PCR generado por la enzima GoTaq polimerasa. Además, el uso de este vector permite la selección de clones recombinantes teniendo en cuenta la coloración de las colonias obtenidas. La presencia de colonias azules en un medio con IPTG/X-Gal demuestra la no inserción del gen ns3 en la región que codifica para el  $\alpha$ -péptido de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

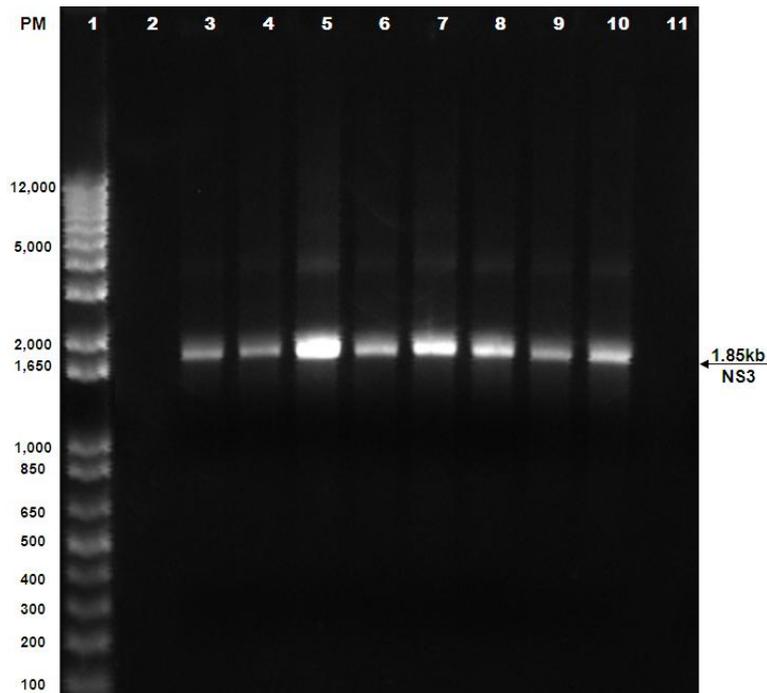
En la Tabla 2, se registra el número de colonias transformantes obtenidas luego de las reacciones de ligación con el vector pGEM-T y su transformación en las células XL1-blue. Como se observa, se obtuvo un número alto de colonias transformantes producto de la reacción de ligación pGEM-T-ns3. Este resultado está en correspondencia con la relación esperada entre reacción estándar/control de fondo, la cual debe ser mayor que 3.

**Tabla 2.** Colonias transformantes obtenidas por electroporación de los productos de ligación pGEM-T-ns3 en las células XL1-blue.

	Reacción estándar pGEM-T + ns3	Control positivo pGEM-T + control de inserto	Control de fondo pGEM-T
<b>Número de colonias transformantes*</b>	400 blancas y azules	Indeterminado blancas	20 azules

\*Resultado del plaqueo de 100µL en una placa petri de 55mm

La identificación de los clones recombinantes se realizó por PCR. En la Figura 10 puede apreciarse los productos de PCR del ADN plasmídico de ocho colonias transformantes. De las ocho colonias, siete amplificaron un fragmento de ADN de 1.85kb correspondiente a la talla del gen ns3, solamente una colonia no mostró este fragmento por lo que no se considera recombinante. Esto puede deberse a que durante el proceso de ligación y transformación puede haber ocurrido una alteración o mutación en el gen que codifica para el  $\alpha$ -péptido de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, que impide la funcionalidad de esta proteína y por tanto muestra la ausencia de color azul en sus colonias. Los siete clones recombinantes se confirmaron por secuenciación nucleotídica, mostrando un 100% de identidad con la secuencia de la cepa cubana 58/97 en la base de datos *GenBank* (número de acceso: AY702035).



**Figura 10.** Productos de amplificación para la selección de clones recombinantes (pGEM-T-ns3). Línea 1: PM 1kb Plus DNA ladder. Línea 2: control de reacción H<sub>2</sub>O. Línea 3: control positivo. Líneas del 4 al 11: producto de PCR de colonias transformantes.

### 5.1.1 Subclonaje del gen que codifica para la proteína NS3 en el vector de expresión pET-21d

Para la expresión en *E. coli* de la proteína NS3 completa del DENV-2, previamente se clonó el gen ns3 en el vector pET-21d. En este sistema el vector pET posee el promotor T7 el cual es reconocido con una elevada afinidad por la ARN polimerasa de *E. coli*, lo que la hace más procesativa en el proceso de transcripción. Por otra parte, éste vector permite clonar el gen cerca del extremo 3' terminal del gen *lac Z*, lo que resulta muy útil debido a que la proteína deseada es usualmente obtenida a altos niveles pues la iniciación de la transcripción y la traducción son dirigidas y reguladas por la maquinaria biosintéticas de la célula. Particularmente el pET-21d le confiere a las proteínas recombinantes una cola de histidina hacia el extremo C-terminal lo que permite su purificación en columna por cromatografía de afinidad a iones quelatos ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ).

Para crear la construcción genética que exprese la proteína recombinante NS3, el gen que codifica para dicha proteína fue obtenido por digestión enzimática *Bam*HI/*Hind*III a partir de grandes concentraciones del plásmido recombinante pGEM-T-ns3. Dicho gen se fusionó al vector de expresión pET-21d, el cual tiene como característica que posee codones hacia su extremo 3' terminal para la síntesis de seis residuos de histidina que se ubican en el extremo C-terminal de la proteína recombinante. Además, el vector pET-21d presenta un gen de resistencia al antibiótico ampicilina. En la Figura 8 se muestra el mapa de la construcción genética para el vector pET-21d con el gen ns3 insertado. Tal como se observa la inserción del gen ns3 se realizó por los sitios de restricción enzimática *Bam*HI/*Hind*III por lo que el vector también se digirió con estas enzimas y posteriormente se desfosforiló para realizar la reacción de ligación. Esta estrategia de clonaje favorece la orientación del gen ns3 en la construcción genética y permite disminuir las probabilidades de que el vector se religue.

La reacción de ligación entre el gen y el vector es un evento probabilístico que está sujeto a diversos factores para su ocurrencia. La espontaneidad de la reacción (energía libre) es favorecida por el tipo de corte que realizan las enzimas *Bam*HI/*Hind*III, las cuales generan extremos cohesivos que facilitan la entrada al vector y por tanto la posterior regeneración de los extremos complementarios. La afinidad entre el vector y la banda está relacionada también con la probabilidad de ocurrencia de la reacción. Teniendo en cuenta que la talla del vector pET-21d (5.44kb) es aproximadamente tres veces la talla del gen de la proteína NS3 (1.8kb), se presupone una adecuada estabilidad del enlace entre ambos al ocurrir la reacción de ligazón.

La Tabla 3 expone los resultados de las transformaciones en una relación molar inserto/vector de 3:1. El número de colonias obtenido en la reacción estándar de la ligación fue aproximadamente 10 veces mayor que las colonias observadas en el control negativo. Esto indica una correcta selección de los parámetros de electroporación, un buen estado de

electrocompetencia de las células XL1-blue y una óptima purificación y concentración de los productos de ligación. Todo esto garantiza un clonaje altamente eficiente que permite posteriormente la expresión de las proteínas recombinantes.

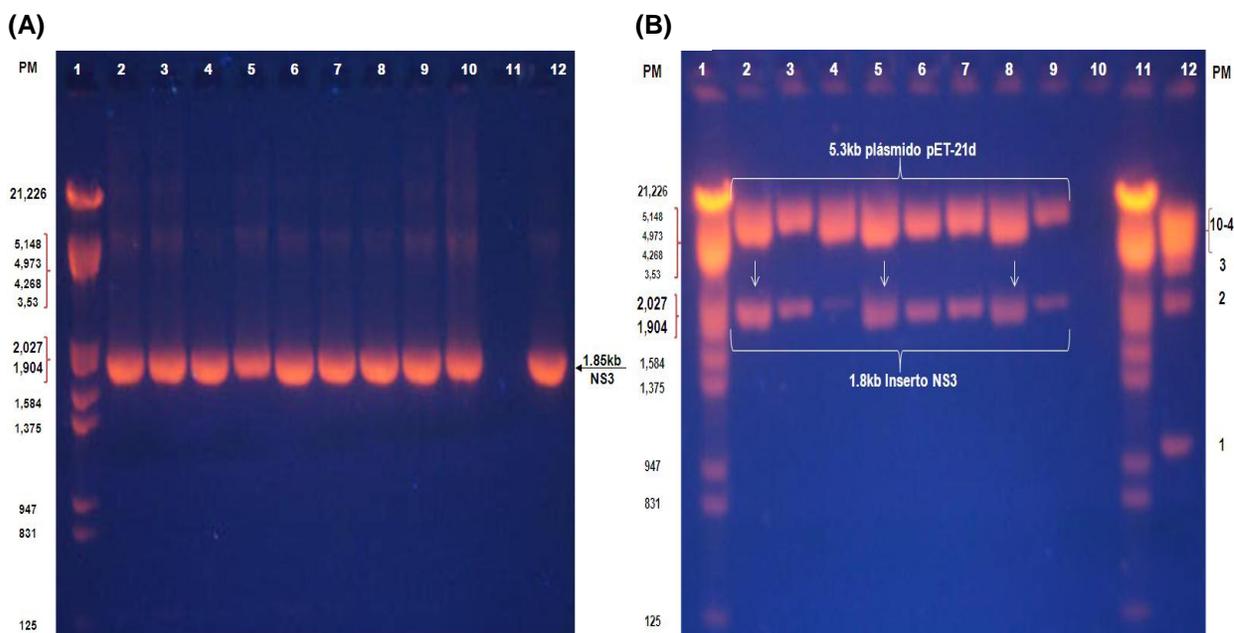
**Tabla 3.** Número de colonias transformantes obtenidas de las reacciones de ligación pET-21d en las células XL1-blue.

	Reacción estándar (A) pET-21d + ns3	Control negativo (B) pET-21d	RELACIÓN A/B
Número de colonias transformantes*	160	15	10

\*Resultado del plaqueo de 100µL en una placa de 55mm

### 5.1.2 Selección de los clones recombinantes pET-21d-ns3

La selección de los clones recombinantes se realizó por PCR de colonia y por restricción enzimática con las enzimas *Bam*HI/*Hind*III. En la Figura 11 (A), pueden apreciarse los resultados del PCR a partir de ocho colonias transformantes (líneas 3 al 10). Las líneas 2 y 12 corresponden a los controles positivos (gen ns3) amplificado a partir del propio gen ns3 y amplificado a partir de un clon pGEM-T-ns3, respectivamente. El control negativo (línea 11) corresponde a la mezcla de reacción. Además, se realizó el análisis de restricción enzimática como criterio de selección de recombinantes. En la Figura 11 (B) se muestra el producto de la digestión *Bam*HI/*Hind*III de los ocho clones que resultaron positivos por PCR de colonia. Dos fragmentos de ADN de 5.3kb y 1.85kb, correspondientes al vector pET-21d y al gen ns3, respectivamente, se visualizan en un gel de agarosa al 1% al compararlos con el patrón de peso molecular. Todos los clones recombinantes mostraron la banda correspondiente al gen ns3. La secuenciación nucleotídica reveló un 100% de identidad con la secuencia de la cepa cubana 58/97. Además se corroboró la correcta orientación del inserto y la correcta posición del marco de lectura durante el proceso de clonaje.

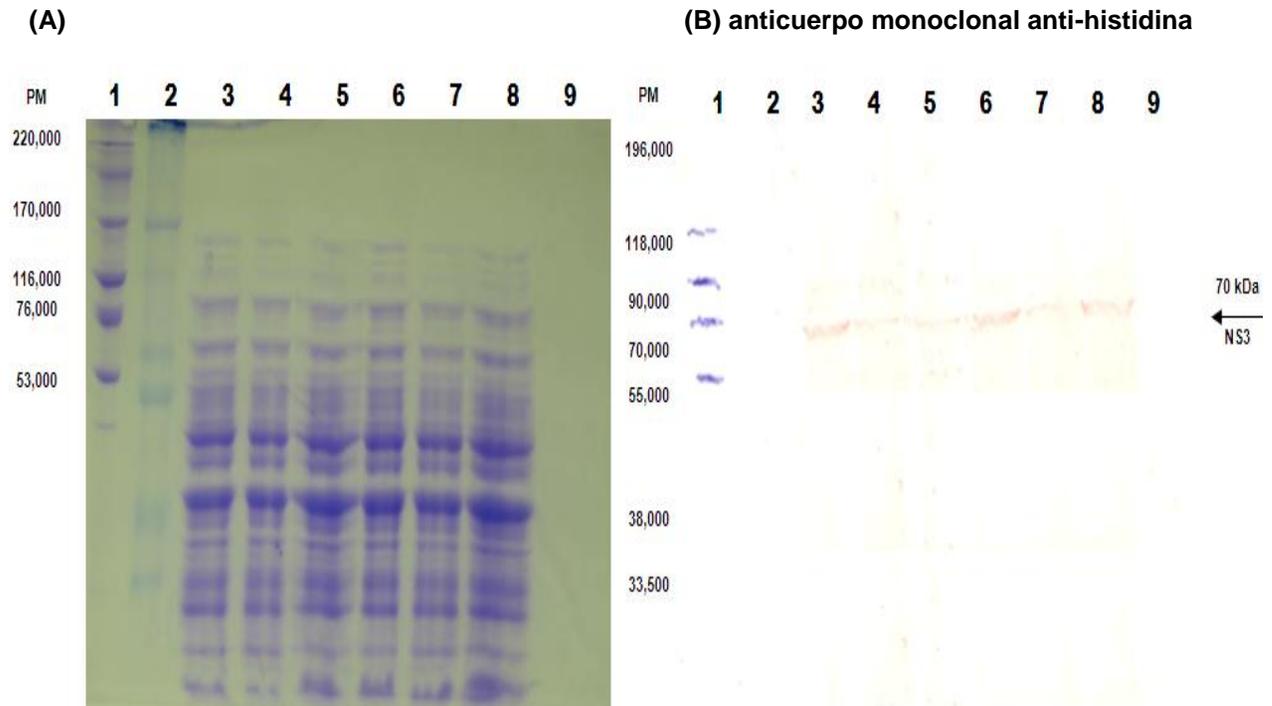


**Figura 11. (A)** Selección de recombinantes por RCP. Línea 1: PM  $\lambda$  DNA *EcoRI/HindIII*. Líneas 2 y 12: controles positivos. Líneas del 3 al 10: clones recombinantes. Línea 11: control de reacción H<sub>2</sub>O. **(B)** Selección de recombinantes por restricción enzimática *BamHI/HindIII*. Líneas 1 y 11: PM  $\lambda$  DNA *EcoRI/HindIII*. Líneas 2 al 9: clones recombinantes del 1 al 8. 10: vacío. 12: PM 1kb DNA Step Ladder.

## 5.2 Expresión de la proteína recombinante NS3

Para determinar cuáles de los clones recombinantes obtenidos expresó la proteína NS3 se transformaron seis clones (pET-21d-ns3), de los ocho confirmados (ver Figura 11), en las células electrocompetentes BL21(DE3), siguiendo la misma metodología de electroporación empleada para los transformantes y descrita en Materiales y Métodos. Estas células tienen la ventaja de ser defectivas de proteasas OmpT y Lon, involucradas en la degradación de proteínas lo que hace más eficiente la expresión de proteínas heterólogas en estas células. En la Figura 12 se muestra la mini-expresión de estos clones recombinantes por SDS-PAGE y WB respectivamente. Los seis clones evaluados expresaron la proteína NS3 junto con otras proteínas celulares Figura 12 (A). La proteína NS3 fue reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-histidina en los seis clones recombinantes Figura 12 (B). La Inmunodetección de la proteína recombinante NS3 por este anticuerpo confirma la presencia en el extremo C-terminal de la proteína, de seis residuos de histidina que son aportados por el vector de expresión pET-21d. Las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* se producen casi siempre en forma de agregados llamados cuerpos de inclusión. Sin embargo aún cuando los cuerpos de inclusión son mayoritarios alguna proporción de la proteína recombinante es usualmente soluble dentro de las células. Con el empleo de plásmidos pertenecientes a la serie pETs de Novagen y de las

células de expresión BL21(DE3) se podrían alcanzar significativas cantidades de proteína soluble aunque la mayor parte de la proteína heteróloga se obtenga en forma de agregados.

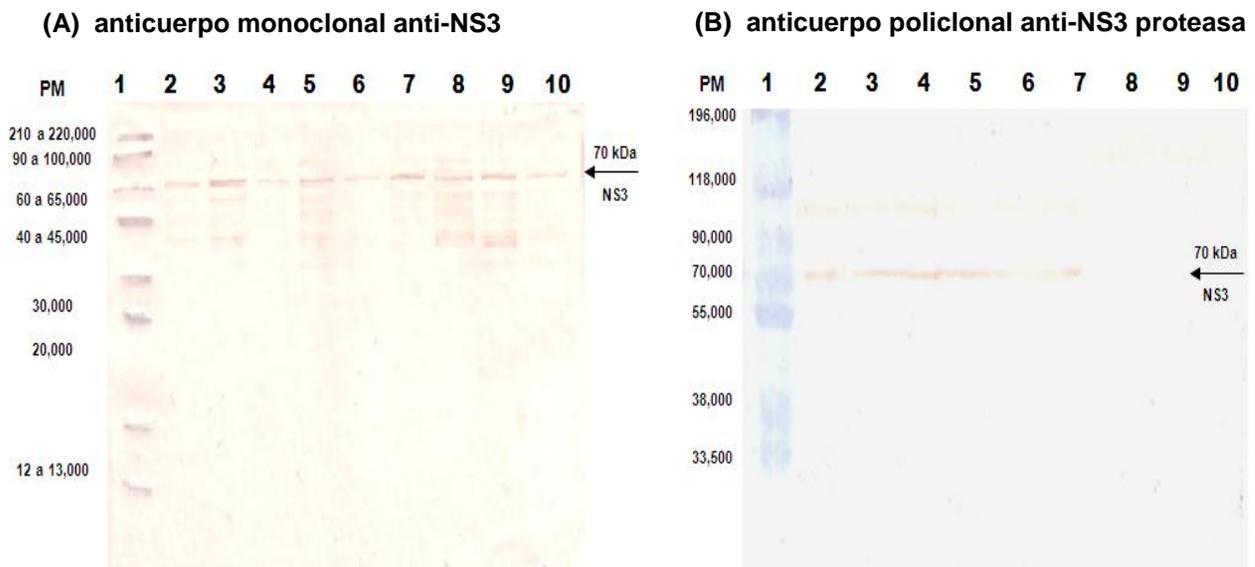


**Figura 12.** Mini-expresión de los clones recombinantes. **(A)** SDS-PAGE al 12%. **(B)** WB. Línea 1: PM High Molecular Weight, GE (HMW). Línea 2: PM Prestained Molecular Weight Standard Mixture, (PMWSM). Líneas 3 al 8: clones 7, 6, 5, 4, 2 y 1, respectivamente.

Muchas proteínas de los *Flavivirus* se han expresado eficientemente empleando estos plásmidos de expresión y las células BL21(DE3). Lin y cols., (226), en el año 2008 obtuvieron de forma insoluble formando cuerpos de inclusión, la proteína NS1 del VEJ utilizando el vector pET-24a, mientras que obtuvieron de forma soluble el dominio III de la proteína de la envoltura empleando el mismo vector de expresión. Resultados similares en la expresión de la proteína NS1 alcanzaron Amorim y cols., (227), en el 2010, pero en este caso la proteína correspondió al DENV-2 y el plásmido empleado para la expresión fue el pET-28a. Liao y cols., (228), en el 2005, clonaron el dominio III del DENV-2 en el plásmido pET-14b y la proteína se obtuvo de forma insoluble formando cuerpos de inclusión. Por su parte Shiryaev y cols. (229), en el 2007, empleando el vector pET-101 expresaron de forma soluble 48 aminoácidos correspondientes a la región hidrofílica de la proteína NS2B fusionado al dominio proteasa de la proteína NS3 para los virus DENV-2 y el VNO. Específicamente para este último resultado se plantea por diversos autores que la presencia de aminoácidos de la región hidrofílica de NS2B, aumenta significativamente la acumulación de forma soluble del dominio proteasa de la proteína NS3 en células de *E. coli* (Nall y cols., 2004; Leung y cols., 2001) (14, 230). En general, estos resultados nos permiten concluir que para la obtención de proteínas heterólogas solubles,

además de contar con un sistema de expresión basado en vectores y células eficientes como los plásmidos pET y la cepa BL21(DE3), también puede ser necesaria una secuencia específica de la proteína para incrementar o disminuir la proporción de formas solubles e insolubles de las proteínas recombinantes expresadas.

Para continuar el estudio de expresión de la proteína NS3 en las células BL21(DE3), se seleccionó el clon recombinante pET-21d-ns3-(4). En la Figura 13 se muestra la expresión del clon 4 a diferentes temperaturas 20, 30 y 37°C, concentraciones de IPTG (0.1mM, 0.5mM y 1mM) y tiempos de inducción 4 y 22 horas. Como se observa en la Figura 13 (A) que corresponde a las 4 horas de inducción, la proteína NS3 se detectó con mayor intensidad cuando la concentración de IPTG utilizada fue de 0.5mM a las temperaturas de 20 y 37°C, mientras que a 30°C la mayor intensidad de reconocimiento de la proteína NS3 se obtuvo con una concentración de 0.1mM de IPTG. Estos resultados nos permiten seleccionar la concentración óptima para la expresión de la proteína NS3 entre 0.1mM y 0.5mM, lo cual es muy favorable para el cultivo ya que altas concentraciones de IPTG pueden ser tóxicas para el crecimiento celular. Al comparar el tiempo de inducción en la Figura 13 (B) que corresponde a las 22 horas de inducción se confirmó que a 20°C con concentraciones de IPTG bajas se favorece la expresión de la proteína NS3, no así para la temperatura de 30°C donde se favorece la expresión a una concentración de 1mM de IPTG.



**Figura 13.** Inmunodetección de la proteína recombinante NS3. Expresión del clon pET-21d-NS3-(4), a diferentes temperaturas, concentraciones de IPTG y tiempos de inducción. **(A)** Expresión del clon (4) durante 4 horas de inducción; temperatura a 37°C: línea 2 (IPTG 1mM), línea 3 (IPTG 0.5mM), línea 4 (IPTG 0.1mM); temperatura a 30°C: línea 5 (IPTG 1mM), línea 6 (IPTG 0.5mM), línea 7 (IPTG 0.1mM); temperatura a 20°C: línea 8 (IPTG 1mM), línea 9 (IPTG 0.5mM), línea 10 (IPTG 0.1mM). **(B)** Expresión del clon (4) durante 22 horas de inducción; temperatura 20°C: línea 2 (IPTG 1mM), línea 3 (IPTG 0.5mM), línea 4 (IPTG 0.1mM); temperatura a 30°C: línea 5 (IPTG 1mM), línea 6 (IPTG 0.5mM), línea 7 (IPTG 0.1mM). **(A)** Línea 1: PM C1992 1VL Color Burst Electroforesis Marker (CMW). **(B)** Línea 1: PM Prestained.

Mertens y cols., 2010 (231), expresaron el dominio helicasa (182 a 619 aa) de la proteína NS3 del VNO de forma soluble. Por su parte Wu y cols. en el 2005 (153), también obtuvieron este mismo dominio de forma soluble al igual que el correspondiente al VFA. Ambos autores emplean bajas temperaturas de crecimiento celular, 22°C por 16 horas y 20°C por 5 horas, respectivamente y baja concentración de IPTG (0.5mM) para la inducción de la proteína recombinante. Los resultados obtenidos en este trabajo, para la expresión de la proteína NS3 completa del DENV-2 (ver Tabla 4) son coincidentes con los planteados por los autores referidos anteriormente. Como se observa en dicha tabla se seleccionó la temperatura de 20°C y 0.5mM de IPTG como condiciones óptimas, para la expresión de la proteína NS3. Por otra parte, es significativo que durante un tiempo prolongado de expresión no ocurre degradación de la proteína, lo que habla a favor del aumento del tiempo de inducción a 22 horas, para obtener un mayor rendimiento de la proteína recombinante. Se ha reportado que el crecimiento celular a 37°C para la expresión de la proteína NS3 del DENV-2 causa la acumulación de la misma en cuerpos de inclusión, (Yusof y cols., 2000) (145), mientras que la incubación a 30°C produce una proteína soluble y activa (Leung y cols., 2001) (14). Sin embargo, el crecimiento y la inducción de la expresión a temperaturas entre 15 y 20°C durante un tiempo prolongado permite la producción de elevadas concentraciones de proteína, sin afectar la integridad y la solubilidad de la misma (Luo y cols., 2008 y 2010; Li y cols., 2005) (139, 189).

**Tabla 4.** Parámetros evaluados para la expresión óptima de la proteína recombinante NS3 del DENV-2 en las células BL21(DE3).

Clones recombinantes	Concentración de IPTG (mM)	Temperatura (°C)	Tiempo de inducción (Horas)
1	0.1	<b>20*</b>	4
2	<b>0.5*</b>	30	<b>22*</b>
<b>4*</b>	1	37	
5			
6			
<b>7</b>			

\* Parámetros seleccionados para la expresión de la proteína NS3

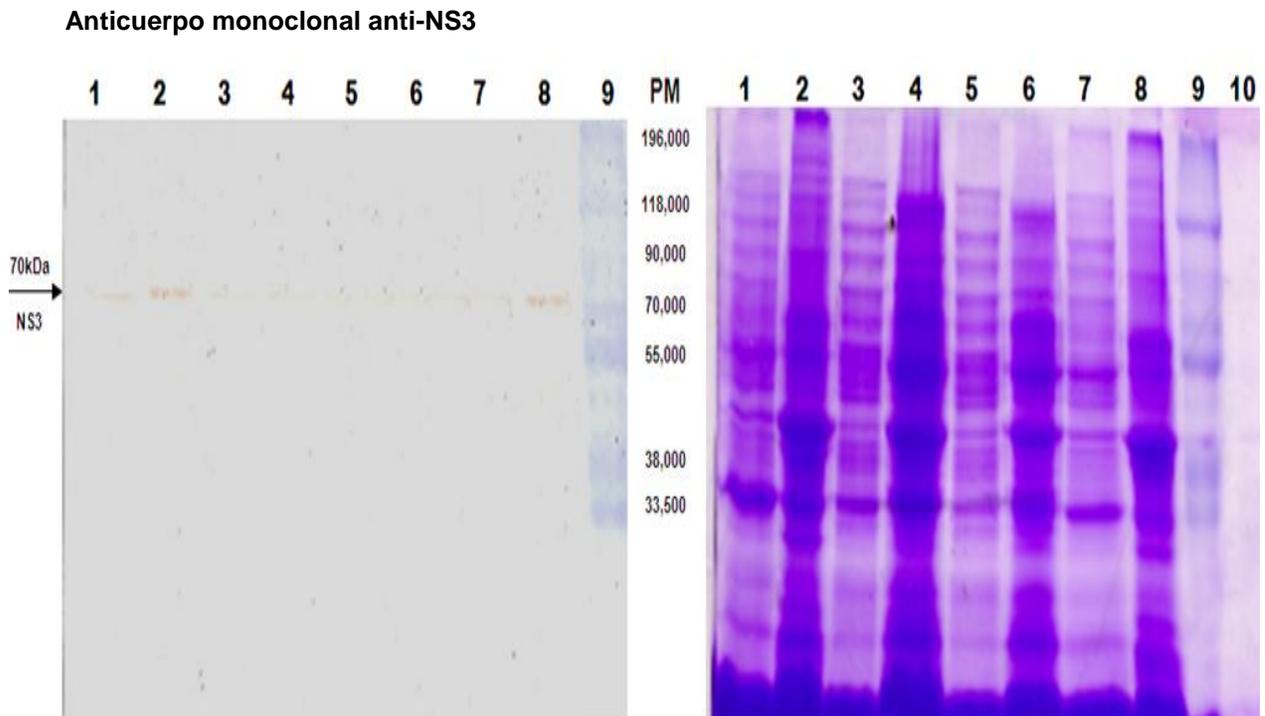
### 5.2.1 Condiciones de ruptura y solubilidad para la proteína NS3

Una vez expresada la proteína NS3 recombinante en las células BL21(DE3), éstas se lisaron con diferentes condiciones para evaluar la solubilidad de la proteína NS3 expuesta al medio. Así, se evaluó la ruptura empleando los métodos de congelación/descongelación y sonicación,

vinculados al uso de detergentes a diferentes concentraciones (Sarcosyl/Tritón X-100 al 1 y 0.1%), el uso de lisozima a una concentración de 50mg/mL y la optimización del pH (7.5 y 8).

En la Figura 14 se muestra el SDS-PAGE y WB (con el anticuerpo monoclonal anti-NS3) de las fracciones solubles (números impares) e insolubles (números pares) obtenidas tras la ruptura celular por congelación/descongelación, empleando dos detergentes a distintas concentraciones en el tampón lisis.

En las líneas 1 y 2, correspondientes a la ruptura celular empleando Tritón X-100 al 0.1% y en las líneas 7 y 8 correspondientes a Tritón X-100 al 1%, se observa un reconocimiento específico de la proteína NS3 que si bien es más intenso en la fracción insoluble, aparece también en la fracción soluble. Este resultado es congruente con lo planteado en la literatura sobre expresión de proteínas heterólogas en *E. coli*, referente a la obtención de una proporción de proteína recombinante soluble aún cuando los cuerpos de inclusión son mayoritarios dentro de las células de *E. coli*. La adición del detergente no iónico Tritón X-100 a bajas concentraciones (<0.1%) al tampón de ruptura mejora la solubilidad de la proteína, ya que posiblemente la presencia del mismo proporciona un ambiente muy similar al encontrado por la proteína NS3 in vivo, que se localiza en las proximidades de la membrana del retículo endoplasmático favoreciendo su solubilidad y por tanto su actividad enzimática (Steuer y cols., 2009) (232). Cui y cols., en 1998 (162), obtuvieron la proteína NS3 del DENV-1 soluble en un tampón lisis conteniendo Tritón X-100 al 0.5%. Por otra parte, el detergente iónico Sarkosyl en el tampón de ruptura no logró solubilizar la proteína NS3, como se observa en las líneas de 3 al 6. Esto puede deberse a la formación de agregados multimoleculares, producto de la interacción del detergente iónico con el agua, que conducen a la precipitación de la proteína.



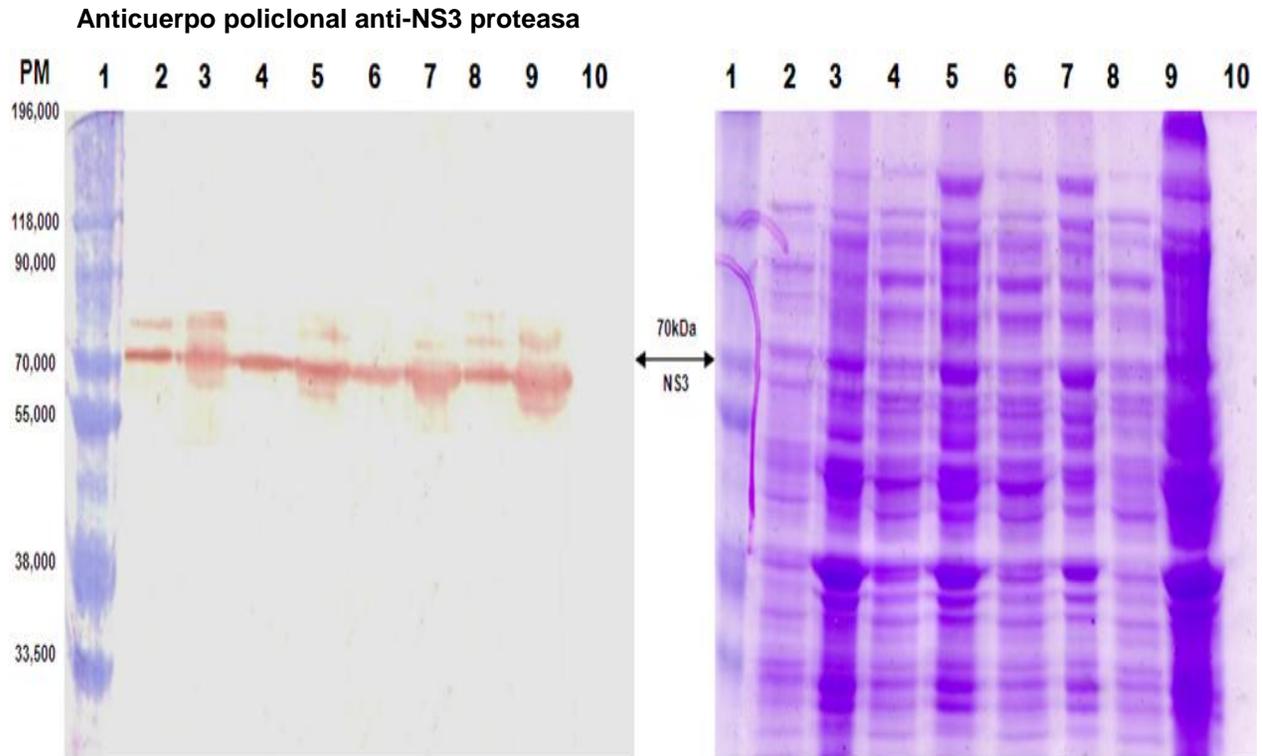
**Figura 14.** Inmunodetección y SDS-PAGE de la proteína recombinante NS3. Ruptura por congelación y descongelación de las células recombinantes BL21(DE3) e Influencia de los detergentes Tritón y Sarcosyl a diferentes concentraciones en la solubilidad de la proteína NS3. Líneas 1 y 2 Fracción soluble (FS) y Fracción insoluble (FI) con Tritón al 0.1%. Líneas 3 y 4, FS y FI con Sarcosyl al 0.1%. Líneas 5 y 6, FS y FI Sarcosyl al 1%. Líneas 7 y 8, FS y FI Tritón al 1%. 9) PM Presteined.

En la Figura 15 se muestra el SDS-PAGE y WB (anticuerpo policlonal anti-NS3 proteasa) de las fracciones solubles e insolubles obtenidas tras la ruptura celular por sonicación, empleando distintos pHs en el Tampón lisis.

El reconocimiento de la proteína NS3 es intenso para todas las fracciones (líneas 1 al 9 solubles e insolubles respectivamente), y no se observa diferencia significativa en las fracciones correspondientes a los diferentes pHs empleados en el tampón ruptura 7.5 y 8. El pH seleccionado en nuestro trabajo fue el de 7.5 por ser el más cercano al del punto isoeléctrico de la proteína NS3 (8.6) de esta forma se favorece el proceso de purificación por cromatografía de afinidad empleando iones quelatos.

Al comparar los resultados de sonicación (Figura 15) con los resultados obtenidos tras la ruptura por congelación/descongelación (Figura 14) se puede concluir que la ruptura celular fue más eficiente cuando se empleó el método de sonicación. Además se puede apreciar en la Figura 15 que durante el proceso de ruptura celular no ocurrió degradación de la proteína y se logra obtener la misma en la fase soluble. Estos resultados son coincidentes con lo que reportan otros autores. Mertens y cols., 2010 (231), obtuvieron soluble el dominio helicasa de la proteína NS3 del VNO en un tampón de ruptura muy similar al utilizado en este trabajo y con un

ciclo de sonicación de 30 segundos por 10 minutos. Resultados similares también fueron alcanzados por Chernov y cols., 2008 (233); los que obtuvieron soluble la proteína NS2B fusionada al dominio NS3 proteasa del VNO, empleando como método de ruptura celular 6 ciclos de sonicación de 30 segundos con intervalos de 60 segundos. Los parámetros seleccionados que permitieron obtener la proteína NS3 íntegra y soluble se resumen en la Tabla 5.



**Figura 15.** Inmunodetección y SDS-PAGE de la proteína recombinante NS3. Ruptura por sonicación de las células recombinantes BL21(DE3) e influencia del pH en la solubilidad de la proteína NS3. Línea 1: Presteined. 6 ciclos de un minuto con intervalos de un minuto: líneas 2 y 3, FS y FI, pH 7.5; líneas 4 y 5, FS y FI, pH 8. 6 ciclos de un minuto con intervalos de un minuto, con repetición: líneas 6 y 7 FS y FI, pH 7.5; líneas 8 y 9 FS y FI, pH 8.

El empleo conjunto y armonioso de los componentes presentes en el tampón de lisis permiten la ruptura celular eficiente al liberar los componentes celulares al medio y disminuir la intensidad de ondas sónicas de alta presión a la que es expuesto el pellet celular. Todo esto impide la degradación proteica y contribuye a mantener la proteína NS3 del DENV-2 soluble. Esta solubilidad debe mantenerse durante todo el proceso de purificación para garantizar la funcionalidad de la proteína.

**Tabla 5.** Parámetros seleccionados para las condiciones óptimas de ruptura y solubilidad de la proteína recombinante NS3 del DENV-2 en las células BL21(DE3).

<b>Detergentes</b>		<b>pH</b>	<b>Métodos físicos</b>
<b>Concentración (%)</b>			
<b>Sarcosyl</b>	0.1	<b>7.5*</b>	Congelación/descongelación
	1		
<b>Tritón X-100</b>	<b>0.1*</b>	8	<b>Sonicación*</b>
	1		

\* Parámetros seleccionados para la solubilidad de la proteína NS3

## 6 **CONCLUSIONES**

1. El empleo del sistema pET-21d y las células BL21(DE3) permitió la expresión de la proteína NS3 del DENV-2 soluble.
2. Las condiciones óptimas de expresión permitieron obtener la proteína NS3 integra y con elevada concentración.
3. El uso de la sonicación y de un detergente no iónico como método de ruptura favoreció la obtención de la proteína con un mayor grado de solubilidad.
4. La obtención de la proteína NS3 en forma soluble sugiere que la proteína está en una conformación adecuada para su actividad biológica.

## **7 RECOMENDACIONES**

1. Purificar la proteína NS3 del DENV-2 obtenida de forma soluble, empleando métodos cromatográficos
2. Caracterizar la actividad biológica de la proteína NS3 por métodos enzimáticos.
3. Realizar la caracterización antigénica de la proteína NS3 recombinante con sueros de origen murino y humano.
4. Producir un anticuerpo monoclonal anti-NS3 en el laboratorio.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

1. ; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
2. Cantelar N, Fernandez A, Albert L, Perez E. Survey of dengue in Cuba. 1978-1979. *Revista cubana de medicina tropical*. 1981;33:72-8.
3. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bulletin of the World Health Organization*. 1989;67:375-80.
4. Kouri G, Guzman MG, Valdes L, Vazquez S. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerging infectious diseases*. 1998;4:89-92.
5. Aleshin AE, Shiryayev SA, Strongin AY, Liddington RC. Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the Flaviviridae fold. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2007;16(5):795-806. Epub 2007/04/03.
6. Rico-Hesse R. Dengue virus evolution and virulence models. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;44(11):1462-6. Epub 2007/05/08.
7. Russell PK, Brandt WE, Dalrymple JM. Chemical and antigenic structure of flaviviruses. In: Schlesinger RW, editor. *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*. New York: Academic Press; 1980.
8. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002;108(5):717-25. Epub 2002/03/15.
9. Winkelmann ER, Widman DG, Suzuki R, Mason PW. Analyses of mutations selected by passaging a chimeric flavivirus identify mutations that alter infectivity and reveal an interaction between the structural proteins and the nonstructural glycoprotein NS1. *Virology*. 2011;421(2):96-104. Epub 2011/10/18.
10. Goralenya AE, Donchenko AP, Koonin EV, Blinov VM. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic acids research*. 1989;17(10):3889-97. Epub 1989/05/25.
11. Benarroch D, Selisko B, Locatelli GA, Maga G, Romette JL, Canard B. The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg<sup>2+</sup>-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology*. 2004;328(2):208-18. Epub 2004/10/07.
12. Wengler G. The carboxy-terminal part of the NS 3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. *Virology*. 1991;184(2):707-15. Epub 1991/10/01.
13. Wengler G. The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology*. 1993;197(1):265-73. Epub 1993/11/01.
14. Leung D, Schroder K, White H, Fang NX, Stoermer MJ, Abbenante G, et al. Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(49):45762-71. Epub 2001/10/03.
15. Chow VT, Seah CL, Chan YC. Use of NS3 consensus primers for the polymerase chain reaction amplification and sequencing of dengue viruses and other flaviviruses. *Archives of virology*. 1993;133(1-2):157-70. Epub 1993/01/01.
16. Xu T, Sampath A, Chao A, Wen D, Nanao M, Chene P, et al. Structure of the Dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4 Å. *Journal of virology*. 2005;79(16):10278-88. Epub 2005/07/30.
17. Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunological reviews*. 2008;225:300-13. Epub 2008/10/08.

18. Wen JS, Jiang LF, Zhou JM, Yan HJ, Fang DY. Computational prediction and identification of dengue virus-specific CD4(+) T-cell epitopes. *Virus research*. 2008;132(1-2):42-8. Epub 2007/12/07.
19. Mladinich KM, Piaskowski SM, Rudersdorf R, Eernisse CM, Weisgrau KL, Martins MA, et al. Dengue virus-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes target NS1, NS3 and NS5 in infected Indian rhesus macaques. *Immunogenetics*. 2012;64(2):111-21. Epub 2011/09/02.
20. Simmons M, Porter KR, Hayes CG, Vaughn DW, Putnak R. Characterization of antibody responses to combinations of a dengue virus type 2 DNA vaccine and two dengue virus type 2 protein vaccines in rhesus macaques. *Journal of virology*. 2006;80(19):9577-85. Epub 2006/09/16.
21. Costa SM, Yorio AP, Goncalves AJ, Vidale MM, Costa EC, Mohana-Borges R, et al. Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines. *PLoS one*. 2011;6(10):e25685. Epub 2011/10/28.
22. Qi RF, Zhang L, Chi CW. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2008;40(2):91-101. Epub 2008/02/01.
23. Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*. 2005;115(2):113-28. Epub 2004/12/21.
24. Ramirez R. Expression in *E. coli* and characterization of DEN-2 recombinant NS3 protein. *ISID News*. 2011;11(3):9-10.
25. Morrison AC, Zielinski-Gutierrez E, Scott TW, Rosenberg R. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. *PLoS medicine*. 2008;5(3):e68. Epub 2008/03/21.
26. Rodriguez-Roche R, Sanchez L, Burgher Y, Rosario D, Alvarez M, Kouri G, et al. Virus role during intraepidemic increase in dengue disease severity. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY)*. 2011;11(6):675-81. Epub 2011/01/25.
27. Guzman MG, Alvarez A, Vazquez S, Alvarez M, Rosario D, Pelaez O, et al. Epidemiological studies on dengue virus type 3 in Playa municipality, Havana, Cuba, 2001-2002. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2012;16(3):e198-203. Epub 2012/01/27.
28. Guzman Tirado MG. [Dengue. I. Historical antecedents; etiological agents; clinical picture]. *Revista cubana de medicina tropical*. 1980;32(2):123-30. Epub 1980/05/01. Dengue. I. Antecedentes historicos; agentes etiologicos; cuadro clinico.
29. van de Weg CA, van Gorp EC, Supriatna M, Soemantri A, Osterhaus AD, Martina BE. Evaluation of the 2009 WHO dengue case classification in an Indonesian pediatric cohort. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012;86(1):166-70. Epub 2012/01/11.
30. Rosen L. Comments on the epidemiology, pathogenesis and control of dengue. *Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial*. 1999;59(4 Pt 2):495-8. Epub 2000/07/21.
31. Vazquez A, Sanchez-Seco MP, Palacios G, Molero F, Reyes N, Ruiz S, et al. Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY)*. 2012;12(3):223-9. Epub 2011/10/26.
32. Santos FP, Lopes J, Vilas-Boas GT, Zequi JA. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Acta tropica*. 2012;122(1):64-70. Epub 2011/12/20.
33. Walker KR, Joy TK, Eilers-Kirk C, Ramberg FB. Human and environmental factors affecting *Aedes aegypti* distribution in an arid urban environment. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2011;27(2):135-41. Epub 2011/08/03.
34. Urdaneta-Marquez L, Failloux AB. Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2011;11(2):253-61. Epub 2010/12/21.
35. Wilder-Smith A, Tambyah PA. Severe dengue virus infection in travelers. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(8):1081-3. Epub 2007/03/16.
36. Rico-Hesse R. Dengue virus virulence and transmission determinants. *Current topics in microbiology and immunology*. 2010;338:45-55. Epub 2009/10/06.

37. Zouache K, Michelland RJ, Failloux AB, Grundmann GL, Mavingui P. Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. *Molecular ecology*. 2012;21(9):2297-309. Epub 2012/03/22.
38. San Martin JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solorzano JO, Bouckenoghe A, Dayan GH, et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2010;82(1):128-35. Epub 2010/01/13.
39. Halstead SB, Marchette NJ. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003;69(6 Suppl):5-11. Epub 2004/01/27.
40. Fernandez RJ, Vazquez S. Serological diagnosis of dengue by an ELISA inhibition method (EIM). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1990;85(3):347-51. Epub 1990/07/01.
41. Guzman MG, Vazquez S. [Notes on the laboratory diagnosis of dengue virus]. *Revista cubana de medicina tropical*. 2002;54(3):180-8. Epub 2005/04/26. Apuntes sobre el diagnostico de laboratorio del virus dengue.
42. Sabin AB, Young I. A complement fixation test for dengue. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*. 1948;69(3):478-80. Epub 1948/12/01.
43. Britton S, van den Hurk AF, Simmons RJ, Pyke AT, Northill JA, McCarthy J, et al. Laboratory-acquired dengue virus infection--a case report. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(11):e1324. Epub 2011/12/06.
44. Chanyasanha C, Hasebe F, Matias R, Igarashi A. Production of viral antigens in culture fluid of C6/36 mosquito cell line infected with dengue type 4 virus strains isolated from patients with different clinical severities. *Acta virologica*. 1999;43(4):213-8. Epub 2000/04/05.
45. Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes MR, Rodrigues SG, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2006;13(11):1185-9. Epub 2006/09/22.
46. Figueiredo LT, Simoes MC, Cavalcante SM. Enzyme immunoassay for the detection of dengue IgG and IgM antibodies using infected mosquito cells as antigen. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1989;83(5):702-7. Epub 1989/09/01.
47. Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, et al. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(6):2047-52. Epub 2012/03/24.
48. Chao DY, Davis BS, Chang GJ. Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(2):584-9. Epub 2006/11/17.
49. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clinical microbiology reviews*. 1990;3(4):376-96. Epub 1990/10/01.
50. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1952;1(1):30-50. Epub 1952/01/01.
51. Arias CF, Preugschat F, Strauss JH. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology*. 1993;193(2):888-99. Epub 1993/04/01.
52. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 1990;174(2):479-93. Epub 1990/02/01.
53. Hahn YS, Lenches EM, Galler R, Rice CM, Dalrymple J, Strauss JH. Expression of the structural proteins of dengue 2 virus and yellow fever virus by recombinant vaccinia viruses. *Archives of virology*. 1990;115(3-4):251-65. Epub 1990/01/01.
54. Zybert IA, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Smit JM. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 12):3047-51. Epub 2008/11/15.

55. Fontenille D. [Transmission cycles of arboviruses in Madagascar]. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar*. 1989;55(1):7-317. Epub 1989/01/01. Etude des circuits de vection d'arbovirus, a Madagascar.
56. Lindenbach B, Rice CM. *Fields Virology*. Boston, Massachusetts: Lippincott Williams & Wilkins 2007.
57. Yu IM, Holdaway HA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *Journal of Virology*. 2009;83(23):12101-7.
58. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews Microbiology*. 2005;3(1):13-22. Epub 2004/12/21.
59. Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *Journal of virology*. 1999;73(6):4611-21. Epub 1999/05/11.
60. Yu IM, Holdaway HA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *Journal of virology*. 2009;83(23):12101-7. Epub 2009/09/18.
61. Yu L, Nomaguchi M, Padmanabhan R, Markoff L. Specific requirements for elements of the 5' and 3' terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication. *Virology*. 2008;374(1):170-85. Epub 2008/02/01.
62. Takhampunya R, Ubol S, Houg HS, Cameron CE, Padmanabhan R. Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin. *The Journal of general virology*. 2006;87(Pt 7):1947-52. Epub 2006/06/09.
63. Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral research*. 2010;87(2):125-48. Epub 2009/12/01.
64. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Current opinion in microbiology*. 2008;11(4):369-77. Epub 2008/07/23.
65. Hershkovitz O, Zilka A, Bar-Ilan A, Abutbul S, Davidson A, Mazzon M, et al. Dengue virus replicon expressing the nonstructural proteins suffices to enhance membrane expression of HLA class I and inhibit lysis by human NK cells. *Journal of virology*. 2008;82(15):7666-76. Epub 2008/05/30.
66. Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(24):14333-8. Epub 2003/11/13.
67. Lazo L, Gil L, Lopez C, Valdes I, Blanco A, Pavon A, et al. A vaccine formulation consisting of nucleocapsid-like particles from Dengue-2 and the fusion protein P64k-domain III from Dengue-1 induces a protective immune response against the homologous serotypes in mice. *Acta tropica*. 2012. Epub 2012/07/04.
68. Bhuvanankantham R, Chong MK, Ng ML. Specific interaction of capsid protein and importin-alpha/beta influences West Nile virus production. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;389(1):63-9. Epub 2009/08/29.
69. Lopez C, Gil L, Lazo L, Menendez I, Marcos E, Sanchez J, et al. In vitro assembly of nucleocapsid-like particles from purified recombinant capsid protein of dengue-2 virus. *Archives of virology*. 2009;154(4):695-8. Epub 2009/03/24.
70. Wengler G, Koschinski A. A short treatment of cells with the lanthanide ions La<sup>3+</sup>, Ce<sup>3+</sup>, Pr<sup>3+</sup> or Nd<sup>3+</sup> changes the cellular chemistry into a state in which RNA replication of flaviviruses is specifically blocked without interference with host-cell multiplication. *The Journal of general virology*. 2007;88(Pt 11):3018-26. Epub 2007/10/20.
71. Guirakhoo F, Hunt AR, Lewis JG, Roehrig JT. Selection and partial characterization of dengue 2 virus mutants that induce fusion at elevated pH. *Virology*. 1993;194(1):219-23. Epub 1993/05/01.
72. Junjhon J, Edwards TJ, Utaipat U, Bowman VD, Holdaway HA, Zhang W, et al. Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. *Journal of virology*. 2010;84(16):8353-8. Epub 2010/06/04.

73. Zhu B, Ye J, Lu P, Jiang R, Yang X, Fu ZF, et al. Induction of antigen-specific immune responses in mice by recombinant baculovirus expressing premembrane and envelope proteins of West Nile virus. *Virology journal*. 2012;9(1):132. Epub 2012/07/18.
74. Rey FA. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(12):6899-901. Epub 2003/06/05.
75. Keelapang P, Sriburi R, Supasa S, Panyadee N, Songjaeng A, Jairungsri A, et al. Alterations of pr-M cleavage and virus export in pr-M junction chimeric dengue viruses. *Journal of virology*. 2004;78(5):2367-81. Epub 2004/02/14.
76. Guirakhoo F, Zhang Z, Myers G, Johnson BW, Pugachev K, Nichols R, et al. A single amino acid substitution in the envelope protein of chimeric yellow fever-dengue 1 vaccine virus reduces neurovirulence for suckling mice and viremia/viscerotropism for monkeys. *Journal of virology*. 2004;78(18):9998-10008. Epub 2004/08/28.
77. An J, Zhou DS, Zhang JL, Morida H, Wang JL, Yasui K. Dengue-specific CD8+ T cells have both protective and pathogenic roles in dengue virus infection. *Immunology letters*. 2004;95(2):167-74. Epub 2004/09/25.
78. Schmidt AG, Lee K, Yang PL, Harrison SC. Small-molecule inhibitors of dengue-virus entry. *PLoS pathogens*. 2012;8(4):e1002627. Epub 2012/04/13.
79. Monath TP, Arroyo J, Levenbook I, Zhang ZX, Catalan J, Draper K, et al. Single mutation in the flavivirus envelope protein hinge region increases neurovirulence for mice and monkeys but decreases viscerotropism for monkeys: relevance to development and safety testing of live, attenuated vaccines. *Journal of virology*. 2002;76(4):1932-43. Epub 2002/01/19.
80. Nayak V, Dessau M, Kucera K, Anthony K, Ledizet M, Modis Y. Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. *Journal of virology*. 2009;83(9):4338-44. Epub 2009/02/27.
81. Mackow E, Makino Y, Zhao BT, Zhang YM, Markoff L, Buckler-White A, et al. The nucleotide sequence of dengue type 4 virus: analysis of genes coding for nonstructural proteins. *Virology*. 1987;159(2):217-28. Epub 1987/08/01.
82. Falconar AK, Young PR. Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non-structural glycoprotein, NS1. *Journal of virological methods*. 1990;30(3):323-32. Epub 1990/12/01.
83. Sampath A, Padmanabhan R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral research*. 2009;81(1):6-15. Epub 2008/09/18.
84. Allonso D, da Silva Rosa M, Coelho DR, da Costa SM, Nogueira RM, Bozza FA, et al. Polyclonal antibodies against properly folded Dengue virus NS1 protein expressed in *E. coli* enable sensitive and early dengue diagnosis. *Journal of virological methods*. 2011;175(1):109-16. Epub 2011/05/17.
85. Amorim JH, Porchia BF, Balan A, Cavalcante RC, da Costa SM, de Barcelos Alves AM, et al. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *Journal of virological methods*. 2010;167(2):186-92. Epub 2010/04/20.
86. Schlesinger JJ. Flavivirus nonstructural protein NS1: complementary surprises. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(50):18879-80. Epub 2006/12/06.
87. Lin CF, Wan SW, Chen MC, Lin SC, Cheng CC, Chiu SC, et al. Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2008;88(10):1079-89. Epub 2008/08/06.
88. Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS, Alves AM. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology*. 2007;358(2):413-23. Epub 2006/10/06.
89. Kapoor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusakawa J, Ebner KE, Padmanabhan R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to

- differential phosphorylation of NS5. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(32):19100-6. Epub 1995/08/11.
90. Garcia-Montalvo BM, Medina F, del Angel RM. La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA. *Virus research*. 2004;102(2):141-50. Epub 2004/04/16.
91. Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology*. 1998;245(2):203-15. Epub 1998/06/24.
92. Preugschat F, Yao CW, Strauss JH. In vitro processing of dengue virus type 2 nonstructural proteins NS2A, NS2B, and NS3. *Journal of virology*. 1990;64(9):4364-74. Epub 1990/09/01.
93. Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *The Journal of general virology*. 2006;87(Pt 9):2605-14. Epub 2006/08/09.
94. Hori H, Lai CJ. Cleavage of dengue virus NS1-NS2A requires an octapeptide sequence at the C terminus of NS1. *Journal of virology*. 1990;64(9):4573-7. Epub 1990/09/01.
95. Fernandez S, Cisney ED, Tikhonov AP, Schweitzer B, Putnak RJ, Simmons M, et al. Antibody recognition of the dengue virus proteome and implications for development of vaccines. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2011;18(4):523-32. Epub 2011/01/29.
96. Sittisombut N, Maneekarn N, Kanjanahaluethai A, Kasinrerak W, Viputtikul K, Supawadee J. Lack of augmenting effect of interferon-gamma on dengue virus multiplication in human peripheral blood monocytes. *Journal of medical virology*. 1995;45(1):43-9. Epub 1995/01/01.
97. Dejnirattisai W, Duangchinda T, Lin CL, Vasanawathana S, Jones M, Jacobs M, et al. A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;181(9):5865-74. Epub 2008/10/23.
98. Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Baker TS, et al. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure (London, England : 1993)*. 2004;12(9):1607-18. Epub 2004/09/03.
99. Lin YL, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Chen SH, Liu HS. Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines. *Antiviral research*. 2002;56(1):93-6. Epub 2002/09/27.
100. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO reports*. 2003;4(7):723-8. Epub 2003/06/05.
101. Brown MG, Hermann LL, Issekutz AC, Marshall JS, Rowter D, Al-Afif A, et al. Dengue virus infection of mast cells triggers endothelial cell activation. *Journal of virology*. 2011;85(2):1145-50. Epub 2010/11/12.
102. Moi ML, Lim CK, Takasaki T, Kurane I. Involvement of the Fc gamma receptor IIA cytoplasmic domain in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *The Journal of general virology*. 2010;91(Pt 1):103-11. Epub 2009/09/25.
103. Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *Journal of virology*. 1995;69(2):695-700. Epub 1995/02/01.
104. Kondo MY, Oliveira LC, Okamoto DN, de Araujo MR, Duarte dos Santos CN, Juliano MA, et al. Yellow fever virus NS2B/NS3 protease: hydrolytic properties and substrate specificity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;407(4):640-4. Epub 2011/03/23.
105. Steffens S, Thiel HJ, Behrens SE. The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties in vitro. *The Journal of general virology*. 1999;80 ( Pt 10):2583-90. Epub 1999/11/26.
106. Issur M, Geiss BJ, Bougie I, Picard-Jean F, Despains S, Mayette J, et al. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA (New York, NY)*. 2009;15(12):2340-50. Epub 2009/10/24.

107. Raviprakash K, Sinha M, Hayes CG, Porter KR. Conversion of dengue virus replicative form RNA (RF) to replicative intermediate (RI) by nonstructural proteins NS-5 and NS-3. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1998;58(1):90-5. Epub 1998/02/06.
108. Markoff L, Falgout B, Chang A. A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein. *Virology*. 1997;233(1):105-17. Epub 1997/06/23.
109. Jones CT, Ma L, Burgner JW, Groesch TD, Post CB, Kuhn RJ. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *Journal of virology*. 2003;77(12):7143-9. Epub 2003/05/28.
110. Kanai R, Kar K, Anthony K, Gould LH, Ledizet M, Fikrig E, et al. Crystal structure of west nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes. *Journal of virology*. 2006;80(22):11000-8. Epub 2006/09/01.
111. Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Heinz FX. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *Journal of virology*. 2001;75(9):4268-75. Epub 2001/04/05.
112. Bartenschlager R, Miller S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future microbiology*. 2008;3(2):155-65. Epub 2008/03/28.
113. Kurosu T. Quasispecies of dengue virus. *Tropical medicine and health*. 2011;39(4 Suppl):29-36. Epub 2012/04/14.
114. Chao DY, King CC, Wang WK, Chen WJ, Wu HL, Chang GJ. Strategically examining the full-genome of dengue virus type 3 in clinical isolates reveals its mutation spectra. *Virology journal*. 2005;2:72. Epub 2005/08/27.
115. Ciota AT, Ngo KA, Lovelace AO, Payne AF, Zhou Y, Shi PY, et al. Role of the mutant spectrum in adaptation and replication of West Nile virus. *The Journal of general virology*. 2007;88(Pt 3):865-74. Epub 2007/02/28.
116. Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *Journal of virology*. 2003;77(7):3929-38. Epub 2003/03/14.
117. Kochel T, Wu SJ, Raviprakash K, Hobart P, Hoffman S, Porter K, et al. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 1997;15(5):547-52. Epub 1997/04/01.
118. Valdes I, Hermida L, Gil L, Lazo L, Castro J, Martin J, et al. Heterologous prime-boost strategy in non-human primates combining the infective dengue virus and a recombinant protein in a formulation suitable for human use. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2010;14(5):e377-83. Epub 2009/09/24.
119. Burke DS, Kliks S. Antibody-dependent enhancement in dengue virus infections. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(4):601-3; author reply 3-4. Epub 2006/01/21.
120. Morens DM, Halstead SB. Measurement of antibody-dependent infection enhancement of four dengue virus serotypes by monoclonal and polyclonal antibodies. *The Journal of general virology*. 1990;71 ( Pt 12):2909-14. Epub 1990/12/01.
121. Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *The Yale journal of biology and medicine*. 1970;42(5):350-62. Epub 1970/04/01.
122. Kumate-Rodriguez J, Llausas A. [Classic dengue and hemorrhagic dengue in Mexico]. *Gaceta medica de Mexico*. 1989;125(1-2):37-9. Epub 1989/01/01. Dengue clasico y dengue hemorragico en Mexico.
123. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, et al. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;75(6):1113-7. Epub 2006/12/19.
124. Guzman MG, Vazquez S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses*. 2010;2(12):2649-62. Epub 2011/10/14.

125. Kochel TJ, Watts DM, Halstead SB, Hayes CG, Espinoza A, Felices V, et al. Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 2002;360(9329):310-2. Epub 2002/07/31.
126. Srikiatkachorn A, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Kalayanarooj S, Libraty DH, Green S, et al. Virus-induced decline in soluble vascular endothelial growth receptor 2 is associated with plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *Journal of virology*. 2007;81(4):1592-600. Epub 2006/12/08.
127. Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, et al. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *Journal of virology*. 2005;79(9):5414-20. Epub 2005/04/14.
128. Munoz-Jordan JL, Fredericksen BL. How flaviviruses activate and suppress the interferon response. *Viruses*. 2010;2(2):676-91. Epub 2010/02/01.
129. Shirato K, Kimura T, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Different chemokine expression in lethal and non-lethal murine West Nile virus infection. *Journal of medical virology*. 2004;74(3):507-13. Epub 2004/09/16.
130. Roehrig JT, Hombach J, Barrett AD. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral immunology*. 2008;21(2):123-32. Epub 2008/05/15.
131. Pang T, Cardosa MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunology and cell biology*. 2007;85(1):43-5. Epub 2006/11/30.
132. Sim AC, Lin W, Tan GK, Sim MS, Chow VT, Alonso S. Induction of neutralizing antibodies against dengue virus type 2 upon mucosal administration of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing envelope domain III antigen. *Vaccine*. 2008;26(9):1145-54. Epub 2008/02/05.
133. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *The Lancet infectious diseases*. 2002;2(1):33-42. Epub 2002/03/15.
134. Sierra B, Alegre R, Perez AB, Garcia G, Sturn-Ramirez K, Obasanjo O, et al. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Human immunology*. 2007;68(6):531-40. Epub 2007/05/19.
135. Vejbaesya S, Luangtrakool P, Luangtrakool K, Kalayanarooj S, Vaughn DW, Endy TP, et al. TNF and LTA gene, allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais. *The Journal of infectious diseases*. 2009;199(10):1442-8. Epub 2009/04/28.
136. Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P, et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(39):16922-7. Epub 2010/09/15.
137. Nguyen TP, Kikuchi M, Vu TQ, Do QH, Tran TT, Vo DT, et al. Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1\*0901 and HLA-A\*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *PLoS neglected tropical diseases*. 2008;2(10):e304. Epub 2008/10/02.
138. Co MD, Terajima M, Cruz J, Ennis FA, Rothman AL. Human cytotoxic T lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine: identification of HLA-B35-restricted CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E. *Virology*. 2002;293(1):151-63. Epub 2002/02/21.
139. Luo D, Xu T, Hunke C, Gruber G, Vasudevan SG, Lescar J. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *Journal of virology*. 2008;82(1):173-83. Epub 2007/10/19.
140. Zuo Z, Liew OW, Chen G, Chong PC, Lee SH, Chen K, et al. Mechanism of NS2B-mediated activation of NS3pro in dengue virus: molecular dynamics simulations and bioassays. *Journal of virology*. 2009;83(2):1060-70. Epub 2008/10/31.
141. Chambers TJ, Nestorowicz A, Amberg SM, Rice CM. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *J Virol*. 1993;67(11):6797-807.

142. Robin G, Chappell K, Stoermer MJ, Hu SH, Young PR, Fairlie DP, et al. Structure of West Nile virus NS3 protease: ligand stabilization of the catalytic conformation. *Journal of molecular biology*. 2009;385(5):1568-77. Epub 2008/12/09.
143. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual review of microbiology*. 1990;44:649-88. Epub 1990/01/01.
144. Shiryayev SA, Ratnikov BI, Aleshin AE, Kozlov IA, Nelson NA, Lebl M, et al. Switching the substrate specificity of the two-component NS2B-NS3 flavivirus proteinase by structure-based mutagenesis. *Journal of virology*. 2007;81(9):4501-9. Epub 2007/02/16.
145. Yusof R, Clum S, Wetzel M, Murthy HM, Padmanabhan R. Purified NS2B/NS3 serine protease of dengue virus type 2 exhibits cofactor NS2B dependence for cleavage of substrates with dibasic amino acids in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(14):9963-9. Epub 2000/04/01.
146. Lin C, Amberg SM, Chambers TJ, Rice CM. Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site. *Journal of virology*. 1993;67(4):2327-35. Epub 1993/04/01.
147. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in virus research*. 2003;59:23-61. Epub 2003/12/31.
148. Valle RP, Falgout B. Mutagenesis of the NS3 protease of dengue virus type 2. *Journal of virology*. 1998;72(1):624-32. Epub 1998/01/07.
149. Clum S, Ebner KE, Padmanabhan R. Cotranslational membrane insertion of the serine proteinase precursor NS2B-NS3(Pro) of dengue virus type 2 is required for efficient in vitro processing and is mediated through the hydrophobic regions of NS2B. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(49):30715-23. Epub 1998/01/10.
150. Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, Owens RJ, et al. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *Journal of virology*. 2009;83(24):12895-906. Epub 2009/10/02.
151. Lain S, Riechmann JL, Martin MT, Garcia JA. Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins. *Gene*. 1989;82(2):357-62. Epub 1989/10/30.
152. Kadare G, Haenni AL. Virus-encoded RNA helicases. *J Virol*. 1997;71(4):2583-90.
153. Wu J, Bera AK, Kuhn RJ, Smith JL. Structure of the Flavivirus helicase: implications for catalytic activity, protein interactions, and proteolytic processing. *Journal of virology*. 2005;79(16):10268-77. Epub 2005/07/30.
154. Suzich JA, Tamura JK, Palmer-Hill F, Warrenner P, Grakoui A, Rice CM, et al. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *Journal of virology*. 1993;67(10):6152-8. Epub 1993/10/01.
155. Warrenner P, Tamura JK, Collett MS. RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria. *J Virol*. 1993;67(2):989-96.
156. Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol*. 1999;73(4):3108-16. Epub 1999/03/12.
157. Lescar J, Luo D, Xu T, Sampath A, Lim SP, Canard B, et al. Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. *Antiviral research*. 2008;80(2):94-101. Epub 2008/08/05.
158. Luo D, Xu T, Watson RP, Scherer-Becker D, Sampath A, Jahnke W, et al. Insights into RNA unwinding and ATP hydrolysis by the flavivirus NS3 protein. *The EMBO journal*. 2008;27(23):3209-19. Epub 2008/11/15.
159. Sampath A, Xu T, Chao A, Luo D, Lescar J, Vasudevan SG. Structure-based mutational analysis of the NS3 helicase from dengue virus. *Journal of virology*. 2006;80(13):6686-90. Epub 2006/06/16.
160. Xu T, Sampath A, Chao A, Wen D, Nanao M, Luo D, et al. Towards the design of flavivirus helicase/NTPase inhibitors: crystallographic and mutagenesis studies of the dengue virus NS3 helicase

catalytic domain. Novartis Foundation symposium. 2006;277:87-97; discussion -101, 251-3. Epub 2007/02/27.

161. Luo D, Xu T, Hunke C, Gruber G, Vasudevan SG, Lescar J. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *Journal of Virology*. 2008;82(1):173-83.

162. Cui T, Sugrue RJ, Xu Q, Lee AK, Chan YC, Fu J. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology*. 1998;246(2):409-17. Epub 1998/07/11.

163. Chua JJ, Ng MM, Chow VT. The non-structural 3 (NS3) protein of dengue virus type 2 interacts with human nuclear receptor binding protein and is associated with alterations in membrane structure. *Virus research*. 2004;102(2):151-63. Epub 2004/04/16.

164. Shafee N, AbuBakar S. Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 8):2191-5. Epub 2003/07/18.

165. Barr PJ, Gibson HL, Bathurst IC, Sabin EA, Medina-Selby A, Coit D, et al. Recombinant subunit vaccines from yeast. *Biotechnology (Reading, Mass)*. 1989;13:319-39. Epub 1989/01/01.

166. Khromykh AA, Harvey TJ, Abedinia M, Westaway EG. Expression and purification of the seven nonstructural proteins of the flavivirus Kunjin in the *E. coli* and the baculovirus expression systems. *Journal of virological methods*. 1996;61(1-2):47-58. Epub 1996/09/01.

167. Jaaskelainen A, Han X, Niedrig M, Vaheri A, Vapalahti O. Diagnosis of tick-borne encephalitis by a mu-capture immunoglobulin M-enzyme immunoassay based on secreted recombinant antigen produced in insect cells. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(9):4336-42. Epub 2003/09/06.

168. Metz SW, Pijlman GP. Arbovirus vaccines; opportunities for the baculovirus-insect cell expression system. *Journal of invertebrate pathology*. 2011;107 Suppl:S16-30. Epub 2011/08/04.

169. Rozen-Gagnon K, Moreland NJ, Ruedl C, Vasudevan SG. Expression and immunoaffinity purification of recombinant dengue virus 2 NS1 protein as a cleavable SUMOstar fusion. *Protein expression and purification*. 2012;82(1):20-5. Epub 2011/11/22.

170. Wang PG, Kudelko M, Lo J, Siu LY, Kwok KT, Sachse M, et al. Efficient assembly and secretion of recombinant subviral particles of the four dengue serotypes using native prM and E proteins. *PLoS one*. 2009;4(12):e8325. Epub 2009/12/18.

171. Luria-Perez R, Cedillo-Barron L, Santos-Argumedo L, Ortiz-Navarrete VF, Ocana-Mondragon A, Gonzalez-Bonilla CR. A fusogenic peptide expressed on the surface of *Salmonella enterica* elicits CTL responses to a dengue virus epitope. *Vaccine*. 2007;25(27):5071-85. Epub 2007/06/05.

172. Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assuncao-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, et al. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS pathogens*. 2009;5(10):e1000632. Epub 2009/10/24.

173. Tan BH, Fu JL, Sugrue RJ. Characterization of the dengue virus envelope glycoprotein expressed in *Pichia pastoris*. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2007;379:163-76. Epub 2007/05/16.

174. Batra G, Gurramkonda C, Nemani SK, Jain SK, Swaminathan S, Khanna N. Optimization of conditions for secretion of dengue virus type 2 envelope domain III using *Pichia pastoris*. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2010;110(4):408-14. Epub 2010/06/12.

175. Cai JP, Qian F, Wang JY, Zhao Y, Xu XJ, Jin WR, et al. [Characterization and secreted expression of dengue virus type I-IV envelope glycoprotein domain III in *Pichia pastoris*]. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]*. 2010;44(8):721-5. Epub 2010/11/09.

176. Liu W, Jiang H, Zhou J, Yang X, Tang Y, Fang D, et al. Recombinant dengue virus-like particles from *Pichia pastoris*: efficient production and immunological properties. *Virus genes*. 2010;40(1):53-9. Epub 2009/11/04.

177. Zhou JM, Tang YX, Fang DY, Zhou JJ, Liang Y, Guo HY, et al. Secreted expression and purification of dengue 2 virus full-length nonstructural glycoprotein NS1 in *Pichia pastoris*. *Virus genes*. 2006;33(1):27-32. Epub 2006/06/23.

178. Mune M, Rodriguez R, Ramirez R, Sierra B, Rodriguez R, Guillen G, et al. Carboxyl terminally truncated dengue 4 virus enveloped glycoprotein expressed in *Pichia pastoris* induced neutralizing antibodies and resistance to dengue 4 virus challenge in mice. *Archives of virology*. 2003;148:2267-73.
179. Cohen S, Powell CJ, Dubois DR, Hartman A, Summers PL, Eckels KH. Expression of the envelope antigen of dengue virus in vaccine strains of *Salmonella*. *Research in microbiology*. 1990;141(7-8):855-8. Epub 1990/09/01.
180. Liu WT, Lin WT, Tsai CC, Chuang CC, Liao CL, Lin HC, et al. Enhanced immune response by amphotericin B following NS1 protein prime-oral recombinant *Salmonella* vaccine boost vaccination protects mice from dengue virus challenge. *Vaccine*. 2006;24(31-32):5852-61. Epub 2006/06/09.
181. Singh J, Whitwill S, Lacroix G, Douglas J, Dubuc E, Allard G, et al. The use of Group 3 LEA proteins as fusion partners in facilitating recombinant expression of recalcitrant proteins in *E. coli*. *Protein expression and purification*. 2009;67(1):15-22. Epub 2009/04/15.
182. Petsev DN, Thomas BR, Yau S, Vekilov PG. Interactions and aggregation of apoferritin molecules in solution: effects of added electrolytes. *Biophysical journal*. 2000;78(4):2060-9. Epub 2000/03/29.
183. Goldberg ME, Rudolph R, Jaenicke R. A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. *Biochemistry*. 1991;30(11):2790-7. Epub 1991/03/19.
184. Bondos SE, Bicknell A. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Analytical biochemistry*. 2003;316(2):223-31. Epub 2003/04/25.
185. Lu H, Zhang H, Wang Q, Yuan H, He W, Zhao Z, et al. Purification, refolding of hybrid hIFN $\gamma$ kringle 5 expressed in *Escherichia coli*. *Current microbiology*. 2001;42(3):211-6. Epub 2001/03/29.
186. Salaemae W, Junaid M, Angsuthanasombat C, Katzenmeier G. Structure-guided mutagenesis of active site residues in the dengue virus two-component protease NS2B-NS3. *Journal of biomedical science*. 2010;17:68. Epub 2010/08/26.
187. Chen Z, Tian Y, Liu L, An J. Production of a monoclonal antibody against non-structural protein 3 of dengue-2 virus by intrasplenic injection. *Hybridoma (2005)*. 2008;27(6):467-71. Epub 2008/12/26.
188. Garcia-Cordero J, Ramirez HR, Vazquez-Ochoa M, Gutierrez-Castaneda B, Santos-Argumedo L, Villegas-Sepulveda N, et al. Production and characterization of a monoclonal antibody specific for NS3 protease and the ATPase region of Dengue-2 virus. *Hybridoma (2005)*. 2005;24(3):160-4. Epub 2005/06/10.
189. Li J, Lim SP, Beer D, Patel V, Wen D, Tumanut C, et al. Functional profiling of recombinant NS3 proteases from all four serotypes of dengue virus using tetrapeptide and octapeptide substrate libraries. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(31):28766-74. Epub 2005/06/04.
190. Gebhard LG, Kaufman SB, Gamarnik AV. Novel ATP-independent RNA annealing activity of the dengue virus NS3 helicase. *PloS one*. 2012;7(4):e36244. Epub 2012/05/05.
191. Luo D, Wei N, Doan DN, Paradkar PN, Chong Y, Davidson AD, et al. Flexibility between the protease and helicase domains of the dengue virus NS3 protein conferred by the linker region and its functional implications. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(24):18817-27. Epub 2010/04/09.
192. Dubendorff JW, Studier FW. Creation of a T7 autogene. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase under control of its cognate promoter. *Journal of molecular biology*. 1991;219(1):61-8. Epub 1991/05/05.
193. Dubendorff JW, Studier FW. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of molecular biology*. 1991;219(1):45-59. Epub 1991/05/05.
194. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in enzymology*. 1990;185:60-89. Epub 1990/01/01.
195. Calos MP. DNA sequence for a low-level promoter of the lac repressor gene and an 'up' promoter mutation. *Nature*. 1978;274(5673):762-5. Epub 1978/08/24.

196. Niyomrattanakit P, Yahorava S, Mutule I, Mutulis F, Petrovska R, Prusis P, et al. Probing the substrate specificity of the dengue virus type 2 NS3 serine protease by using internally quenched fluorescent peptides. *The Biochemical journal*. 2006;397(1):203-11. Epub 2006/02/24.
197. Talarico LB, Pujol CA, Zibetti RG, Faria PC, Nosedá MD, Duarte ME, et al. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral research*. 2005;66(2-3):103-10. Epub 2005/05/25.
198. Courageot MP, Frenkiel MP, Dos Santos CD, Deubel V, Despres P. Alpha-glucosidase inhibitors reduce dengue virus production by affecting the initial steps of virion morphogenesis in the endoplasmic reticulum. *Journal of virology*. 2000;74(1):564-72. Epub 1999/12/10.
199. Wu SF, Lee CJ, Liao CL, Dwek RA, Zitzmann N, Lin YL. Antiviral effects of an iminosugar derivative on flavivirus infections. *Journal of virology*. 2002;76(8):3596-604. Epub 2002/03/22.
200. Raviprakash K, Liu K, Matteucci M, Wagner R, Riffenburgh R, Carl M. Inhibition of dengue virus by novel, modified antisense oligonucleotides. *Journal of virology*. 1995;69(1):69-74. Epub 1995/01/01.
201. Kinney RM, Huang CY, Rose BC, Kroeker AD, Dreher TW, Iversen PL, et al. Inhibition of dengue virus serotypes 1 to 4 in vero cell cultures with morpholino oligomers. *Journal of virology*. 2005;79(8):5116-28. Epub 2005/03/30.
202. Chanprapaph S, Saparpakorn P, Sangma C, Niyomrattanakit P, Hannongbua S, Angsuthanasombat C, et al. Competitive inhibition of the dengue virus NS3 serine protease by synthetic peptides representing polyprotein cleavage sites. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;330(4):1237-46. Epub 2005/04/13.
203. Yin Z, Patel SJ, Wang WL, Wang G, Chan WL, Rao KR, et al. Peptide inhibitors of Dengue virus NS3 protease. Part 1: Warhead. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2006;16(1):36-9. Epub 2005/10/26.
204. Yin Z, Patel SJ, Wang WL, Chan WL, Ranga Rao KR, Wang G, et al. Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 2: SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2006;16(1):40-3. Epub 2005/10/26.
205. Crance JM, Scaramozzino N, Jouan A, Garin D. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral research*. 2003;58(1):73-9. Epub 2003/04/30.
206. Diamond MS, Zachariah M, Harris E. Mycophenolic acid inhibits dengue virus infection by preventing replication of viral RNA. *Virology*. 2002;304(2):211-21. Epub 2002/12/31.
207. Yin Z, Chen YL, Schul W, Wang QY, Gu F, Duraiswamy J, et al. An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(48):20435-9. Epub 2009/11/18.
208. Matusan AE, Pryor MJ, Davidson AD, Wright PJ. Mutagenesis of the Dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme activity and virus replication. *Journal of virology*. 2001;75(20):9633-43. Epub 2001/09/18.
209. Yon C, Teramoto T, Mueller N, Phelan J, Ganesh VK, Murthy KH, et al. Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(29):27412-9. Epub 2005/05/27.
210. Wang CC, Huang ZS, Chiang PL, Chen CT, Wu HN. Analysis of the nucleoside triphosphatase, RNA triphosphatase, and unwinding activities of the helicase domain of dengue virus NS3 protein. *FEBS letters*. 2009;583(4):691-6. Epub 2009/01/27.
211. Speroni S, De Colibus L, Mastrangelo E, Gould E, Coutard B, Forrester NL, et al. Structure and biochemical analysis of Kokobera virus helicase. *Proteins*. 2008;70(3):1120-3. Epub 2007/11/16.
212. Brinton MA, Kurane I, Mathew A, Zeng L, Shi PY, Rothman A, et al. Immune mediated and inherited defences against flaviviruses. *Clinical and diagnostic virology*. 1998;10(2-3):129-39. Epub 1998/09/19.
213. Roehrig JT. Antigenic structure of flavivirus proteins. *Advances in virus research*. 2003;59:141-75. Epub 2003/12/31.

214. Eckels KH, Putnak R. Formalin-inactivated whole virus and recombinant subunit flavivirus vaccines. *Advances in virus research*. 2003;61:395-418. Epub 2004/01/13.
215. Zompi S, Harris E. Animal models of dengue virus infection. *Viruses*. 2012;4(1):62-82. Epub 2012/02/23.
216. Yauch LE, Shresta S. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral research*. 2008;80(2):87-93. Epub 2008/07/16.
217. Swaminathan S, Batra G, Khanna N. Dengue vaccines: state of the art. *Expert opinion on therapeutic patents*. 2010;20(6):819-35. Epub 2010/04/14.
218. Collier BA, Clements DE, Martyak T, Yelmene M, Thorne M, Parks DE. Advances in flavivirus vaccine development. *IDrugs : the investigational drugs journal*. 2010;13(12):880-4. Epub 2010/12/15.
219. Lieberman MM, Nerurkar VR, Luo H, Cropp B, Carrion R, Jr., de la Garza M, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant subunit West Nile virus vaccine in rhesus monkeys. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2009;16(9):1332-7. Epub 2009/07/31.
220. Collier BA, Clements DE, Bett AJ, Sagar SL, Ter Meulen JH. The development of recombinant subunit envelope-based vaccines to protect against dengue virus induced disease. *Vaccine*. 2011;29(42):7267-75. Epub 2011/07/23.
221. Valdes I, Bernardo L, Gil L, Pavon A, Lazo L, Lopez C, et al. A novel fusion protein domain III-capsid from dengue-2, in a highly aggregated form, induces a functional immune response and protection in mice. *Virology*. 2009;394(2):249-58. Epub 2009/09/29.
222. Mellado-Sanchez G, Garcia-Machorro J, Sandoval-Montes C, Gutierrez-Castaneda B, Rojo-Dominguez A, Garcia-Cordero J, et al. A plasmid encoding parts of the dengue virus E and NS1 proteins induces an immune response in a mouse model. *Archives of virology*. 2010;155(6):847-56. Epub 2010/04/15.
223. Murrell S, Wu SC, Butler M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnology advances*. 2011;29(2):239-47. Epub 2010/12/15.
224. Kinney RM, Butrapet S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapravati N, et al. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology*. 1997;230(2):300-8. Epub 1997/04/14.
225. Vaughn DW, Hoke CH, Jr., Yoksan S, LaChance R, Innis BL, Rice RM, et al. Testing of a dengue 2 live-attenuated vaccine (strain 16681 PDK 53) in ten American volunteers. *Vaccine*. 1996;14(4):329-36. Epub 1996/03/01.
226. Lin CW, Liu KT, Huang HD, Chen WJ. Protective immunity of E. coli-synthesized NS1 protein of Japanese encephalitis virus. *Biotechnology letters*. 2008;30(2):205-14. Epub 2007/09/19.
227. Amorim JH, Diniz MO, Cariri FA, Rodrigues JF, Bizerra RS, Goncalves AJ, et al. Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. *Vaccine*. 2012;30(5):837-45. Epub 2011/12/20.
228. Liao M, Kielian M. Domain III from class II fusion proteins functions as a dominant-negative inhibitor of virus membrane fusion. *The Journal of cell biology*. 2005;171(1):111-20. Epub 2005/10/12.
229. Shiryaev SA, Kozlov IA, Ratnikov BI, Smith JW, Lebl M, Strongin AY. Cleavage preference distinguishes the two-component NS2B-NS3 serine proteinases of Dengue and West Nile viruses. *The Biochemical journal*. 2007;401(3):743-52. Epub 2006/10/28.
230. Nall TA, Chappell KJ, Stoermer MJ, Fang NX, Tyndall JD, Young PR, et al. Enzymatic characterization and homology model of a catalytically active recombinant West Nile virus NS3 protease. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(47):48535-42. Epub 2004/08/24.
231. Mertens E, Kajaste-Rudnitski A, Torres S, Funk A, Frenkiel MP, Itean I, et al. Viral determinants in the NS3 helicase and 2K peptide that promote West Nile virus resistance to antiviral action of 2',5'-oligoadenylate synthetase 1b. *Virology*. 2010;399(1):176-85. Epub 2010/01/27.
232. Steuer C, Heinonen KH, Kattner L, Klein CD. Optimization of assay conditions for dengue virus protease: effect of various polyols and nonionic detergents. *Journal of biomolecular screening*. 2009;14(9):1102-8. Epub 2009/09/04.

233. Chernov AV, Shiryaev SA, Aleshin AE, Ratnikov BI, Smith JW, Liddington RC, et al. The two-component NS2B-NS3 proteinase represses DNA unwinding activity of the West Nile virus NS3 helicase. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(25):17270-8. Epub 2008/04/30.

## 9 ANEXOS

### ***I. Extracción de ARN por columnas (QIAamp Viral RNA Mini Handbook, QIAGEN)***

1. Centrifugar el sobrenadante de cultivo celular C6/36-HT a 14,000rpm (Centrífuga eppendorf 5417R) durante una hora.
2. Tomar 140µL del sobrenadante y dispensar en vial de 2mL.
3. Añadir 560µL de tampón lisis (AVL) con 5.6µL de poli A (carrier RNA poli A-AVE), este último se resuspendió previamente en AVE.
4. Vortex para resuspender bien, incubar 10 minutos, aplicar un golpe de centrifuga.
5. Añadir 560µL de etanol al 100%, aplicar un golpe de centrifuga.
6. Transferir 630µL del lisado a la columna hasta terminar el volumen.
7. Lavar dos veces con las soluciones de lavado (AW1 y AW2 adicionar previamente el volumen correspondiente de etanol) respectivamente.
8. Centrifugar a 8,000rpm (Centrífuga eppendorf 5417R) por 1 minuto.
9. Añadir 60µL de la solución de elusión (AVE), incubar durante un minuto a temperatura ambiente y centrifugar a 14,000rpm (Centrífuga eppendorf 5417R) por un minuto.

### ***II. Purificación del ADN producto de PCR/Plásmido mediante el uso de agarosa de bajo punto de fusión y unión a sílica (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega)***

#### ***(A) A partir de un fragmento del gel de agarosa***

1. Disolver la agarosa de bajo punto de fusión al 1% en TBE 1X por calentamiento a 70°C, enfriarla a 37°C.
2. Cargar las muestras en los pozos de aplicación y realizar la electroforesis a 100V durante 1 hora a 4°C para asegurarse de que el gel no se funde durante la corrida.
3. Sumergir en bromuro de etidio a una concentración final 0.5µg/mL.
4. Examinar el gel sobre un transiluminador de luz UV, cortar el fragmento deseado del gel y colocarlo en un vial.
5. Adicionar 10µL solución de unión a membrana (Isotiocianato de guanidina) por cada 10mg de gel, agitar la mezcla.
6. Incubar a 55°C (50-65°C) hasta disolver, aproximadamente de 3 hasta 10 minutos, vortex.

#### ***(B) A partir de producto de PCR***

7. Transferir el volumen completo de la mezcla a una minicolumna de sílica con el tubo colector correspondiente, incubar durante un minuto a temperatura ambiente.
8. Centrifugar durante un minuto a 14,000rpm (Centrífuga eppendorf 5417R) a temperatura ambiente.
9. Quitar la minicolumna y desechar el líquido del tubo colector regresar la minicolumna al tubo colector.
10. Lavar con 700µL de solución de lavado de membrana (previamente diluido con etanol al 95%).
11. Centrifugar a 14,000rpm (Eppendorf Centrifuge 5417R) a 25°C durante un minuto.
12. Repetir los pasos: 9 y en el paso 10 cambiar el volumen por 500µL, en el paso 11 cambiar tiempo por 5 minutos.

13. Repetir los paso 9 y 11 con la tapa de la columna abierta para evaporar el etanol residual.
14. Transferir cuidadosamente la columna a un vial, aplicar a la minicolumna 30µL de agua bidestilada libre de nucleasas, no tocar la membrana con la punta de la pipita, incubar a temperatura ambiente durante un minuto.
15. Repetir paso 11, desechar la minicolumna y almacenar el ADN a 4 o -20°C.

### III. Mezcla pGEM-T-ns3 (pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems, Promega)

1. Establecer una relación inserto/vector de 3:1, mezclar en vial: 2µL (100ng) del inserto ns3 con 1µL del vector (100ng) y 1µL de la enzima ligasa T4 (3U/µL) (Promega), en el tampón de enzima a una concentración final 1X, así como agua bidestilada estéril libre de nucleasas, para completar un volumen final de reacción de 20µL. Desechar puntas en cada paso.
2. Incubar la mezcla durante toda la noche a 4°C (Friocell), guardar hasta su uso.

### IV. Transformación por electroporación (BIO-RAD)

1. Colocar en hielo los viales o crioviales con las células (40µL), y cubetas de cuarzo y el vial con el producto de la reacción de ligación.
2. Mezclar células competentes con el producto de la reacción de ligación (1 a 5µL de ADN) y transferir a una cubeta de cuarzo (BIO-RAD).
3. Electroporar a 2.5kV, aplicar corriente constante hasta que el equipo (BIO-RAD Gene pulser) emita la señal de término y rápidamente añadir 1mL de LB y colocar en hielo.
4. Pasar a un tubo de 15mL, agitar a 60rpm (N-Biotek) durante 1 hora a 37°C.
5. Pasado este tiempo sembrar por expansión 200µL, dejar secar e incubar a 37°C (Memmert) toda la noche.

### V. PCR de colonia

1. Picar una colonia aislada (cada clon de forma independiente).
2. Mezclar con 20µL de H<sub>2</sub>O en un vial.
3. Hervir por dos minutos.
4. Centrifugar 15 segundos a 12,000rpm (Eppendorf Centrifuge 5417R) y tomar 1µL de sobrenadante para usar en el PCR (volumen final 20µL).

Componentes de la Mezcla	Concentración Final
Tampón 5X green GoTaq (Promega)	1X
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2mM
dNTPs (10mM)	1mM
Cebador sentido (NS3) (10mM)	1,5mM
Cebador anti-sentido (NS3) (10mM)	1,5mM
GoTaq polimerasa (Promega)	1U
H <sub>2</sub> O	

#### Programa 35 ciclos

- |                |
|----------------|
| 94°C 2 minutos |
| 94°C 1 minuto  |
| 55°C 1 minuto  |
| 72°C 2 minutos |
| 72°C 1 minuto  |

## **VI. Purificación de ADN plasmídico (QIAGEN Plasmid Mini Handbook)**

1. Seleccionar y crecer una colonia en 5mL de LB hasta obtener una población bacteriana de  $1 \times 10^9$  células/mL ( $A_{600} = 1-1.5$ ) esto generalmente se obtiene después de 14 a 16 horas de incubación (toda la noche).
2. Trasferir 1mL del cultivo celular a vial, adicionar 300 $\mu$ L de tampón de resuspensión P1 (almacenado a 4°C, previamente preparado con RNasa A) y homogenizar completamente.
3. Adicionar 300 $\mu$ L tampón de lisis P2, homogenizar por inversión, incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Adicionar 300 $\mu$ L de tampón de neutralización P3, homogenizar por inversión aproximadamente 4-6 veces hasta obtener una pasta blanca, incubar en hielo 5 minutos.
5. Centrifugar a 13,000rpm (Eppendorf Centrifuge 5417R) durante 10 minutos a 22°C.
6. Adicionar 1mL de tampón equilibrio QBT, a la columna previamente montada, y repita la acción, verifique que el tampón pase a través de la columna.
7. Remover el sobrenadante que contiene el ADN plasmídico, cuidadosamente, no llevarse el precipitado blanco.
8. Lavar con 2mL de tampón lavado QC dos veces.
9. Colocar un vial como colector, añadir a la columna 800 $\mu$ L de tampón elución QF.
10. Precipitar el ADN, añadir 560 $\mu$ L de isopropanol al vial que contiene el QF, homogenizar ligeramente.
11. Centrifugar a 10,000rpm 30 minutos a 22°C.
12. Decantar el sobrenadante cuidadosamente.
13. Lavar el ADN con 1mL de etanol al 70%.
14. Repetir el paso 4.
15. Secar el ADN.
16. Resuspender el ADN en 50 $\mu$ L de agua libre de nucleasas, guardar a 4 o -20°C.
17. Verificar la integridad y purificación del plásmido a través de una electroforesis en un gel de agarosa al 1% anteriormente descrito.

## **VII. Análisis de la expresión por electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)**

Las muestras colectadas en los estudios de expresión y las muestras procedentes de la ruptura, fueron analizadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% bajo condiciones desnaturizantes (Laemmli, 1970) (Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Module Assembly, BIO-RAD).

1. Preparación del gel de acrilamida separador al 12%: mezclar los reactivos en el siguiente orden (4.9mL de agua destilada, 6mL acrilamida-bisacrilamida al 30%, 3.8mL tampón separador 1.5mM, pH 8.8, 0.15mL SDS al 10%, 0.75mL persulfato de amonio al 10% y 0.01mL TEMED). Adicionar a la cámara. Esperar a que polimerice.
2. Adicionar el gel concentrador (2.7mL agua destilada, 0.67mL acrilamida-bisacrilamida al 30%, 0.04mL SDS al 10%, 0.5mL tampón concentrador 1M, pH6.8, 0.04mL persulfato de amonio al 10% y 0.01mL TEMED). Colocar peine. Esperar a que polimerice.
3. Mezclar muestra con tampón muestra, calentar durante 2 minutos a 80°C.
4. Adicionar 12 $\mu$ L de la mezcla calentada a cada pozo y 7 $\mu$ L del marcador molecular comercial (14-97kDa) (Amersham Biosciences). (8,000-220,000Da) C1992 1VL Color Burst Electroforesis Marker (CMW) (SIGMA). (33,500-196,000Da) Prestained Molecular WEIGHT STANDARD Mixture (SIGMA).

5. Realizar electroforesis en presencia de tampón de corrida (Glicina 1.44%; Tris base 0.3%; SDS 0.1%).
6. Correr a 110V y una intensidad de 400A durante 90 minutos.
7. Teñir con azul brillante de Coomassie (Etanol 50%; Ácido acético 10%; azul brillante de Coomassie R-250 0.2%) y decolorar con una solución que contenía etanol al 25% y Ácido acético al 10%.

### **VIII. Inmunodetección de la proteína recombinante NS3 del DENV-2 (Western Blot)**

Se realizó la inmunodetección de la proteína NS3 a través de diferentes anticuerpos.

1. Transferir las proteínas del SDS-PAGE (sin teñir) a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) en un tampón de transferencia (Glicina 125 mM; Tris 25 mM; metanol 20%; pH 8.3) a 50V y una intensidad de 400A durante 240 minutos (Mini-PROTEAN 3 Transfer BIO-RAD) en refrigeración.
2. Incubar en una solución bloqueadora [leche descremada al 4%, solución salina fosfatada (PBS 1X), Tween-20 0.05%] a 4°C en agitación durante 1 hora.
3. Incubar con el anticuerpo correspondiente (resuspendido en solución bloqueadora) durante toda la noche a 4°C. Para la detección de la proteína NS3 recombinante se utilizaron varios tipos de anticuerpos, descritos en Material y Métodos y al pie de Figura según corresponde.
4. Lavar dos veces rápidamente.
5. Incubar durante 2 horas con un anticuerpo en oveja, anti-IgG de ratón (Amersham Biosciences) conjugado con peroxidasa a una dilución de 1:2,000 en solución bloqueadora a temperatura ambiente.
6. Repetir paso 5.
7. Revelar con una solución sustrato [Diaminobenzidina 0.1%; 0.03% de peróxido de hidrógeno en (PBS) 1X, Imidazol 0.1M pH8] a temperatura ambiente hasta la aparición del color. Lavar con agua corriente.
8. Secar y sellar para su conservación.