



Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias Marinas
Instituto de Investigaciones Oceanológicas

Anticuerpos de tiburón *Heterodontus francisci* para diagnóstico y vacunación contra Dengue tipo 3

TESIS

Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para
obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta

ELIA REZA ESCOBAR



Ensenada; Baja California, México
2012

Facultad de Ciencias Marinas
Instituto de Ciencias Oceanológicas
Posgrado en Ecología Molecular y Biotecnología

Anticuerpos de tiburón *Heterodontus francisci* para diagnóstico y
vacunación contra Dengue tipo 3

TESIS


Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el
grado de


MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta

Elia Reza Escobar

Aprobada por


Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de Tesis


Dra. Ivonne Giffard Mena
Sinodal


Dra. María Teresa Viana Castrillón
Sinodal

RESUMEN de la tesis de **ELIA REZA ESCOBAR**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRA EN CIENCIAS** en Ecología Molecular y Biotecnología. Ensenada, Baja California. Diciembre, 2012.

Anticuerpos de tiburón *Heterodontus francisci* para diagnóstico y vacunación contra Dengue tipo 3

A pesar de varias décadas y esfuerzos internacionales para combatir el virus del Dengue, todavía no se cuenta con un método de diagnóstico rápido, accesible y de rutina que este disponible para los laboratorios públicos y/o comerciales. Tampoco se ha logrado elaborar un método de prevención eficaz dirigido a la neutralización del virus en pacientes infectados. En este trabajo se dirigieron fragmentos de anticuerpos de tiburón tipo vNAR fusionados al dominio DIII del virus del Dengue tipo 3 hacia receptores celulares con fines de diagnóstico y vacunación. Mediante técnicas moleculares se construyeron dos proteínas quiméricas: -Una a partir de un vNAR específico al receptor DC-SNG (de células dendríticas) unido a la proteína DIII (quimera llamada AD), ésta generó una respuesta inmune de IgG anti DIII en ensayos de inmunización en ratones a los 5 días post-inoculación. -La segunda proteína quimérica fue un vNAR fusionado a la proteína DIII viral y específica al receptor glicoforina A de eritrocitos (quimera llamada GD), ésta proteína fue reconocida por anticuerpos de suero de ratón anti-DIII en ensayos de hemaglutinación, con una eficiencia de detección del 100% de los sueros positivos al virus mediante observaciones al microscopio. Los resultados indican que estas dos proteínas quiméricas recombinantes (AD y GD) representan una nueva alternativa para el diagnóstico rápido del Dengue y su posible vacunación.

Palabras clave: Dengue, dominio DIII, Tiburón cornudo, vNAR, diagnóstico, vacuna.

ABSTRACT of the thesis presented by **ELIA REZA ESCOBAR**, as a partial requirement to obtain the **MASTER OF SCIENCE DEGREE** in Ecología Molecular y Biotecnología. Ensenada, Baja California. December, 2012.

***Heterodontus francisci* shark antibodies for diagnosis and vaccination Dengue type 3**

Despite several decades and international efforts to combat dengue virus, yet there is a rapid diagnostic method available, accessible and routine for commercial or public laboratories. Neither has succeeded in developing a method of effective prevention targeting virus neutralization in infected patient. In this study, we directed shark antibody fragments type vNAR fused to dengue virus type 3 DIII-domains against cell receptors for diagnostic and vaccinating purposes. Using molecular techniques we constructed two chimeric proteins: -one from a vNAR specific to DC-SIGN receptor (from dendritic cells) bound to DIII protein (chimera called AD), this one generated an immune response of IgG during DIII immunization assays in mice at 5 days post-inoculation. -The second chimeric protein was obtained from one specific vNAR fused with viral protein-DIII and directed to erythrocyte glycoprotein-A (named chimera GD), this protein was recognized by mice sera anti-DIII antibodies in hemagglutination assays with a 100% of detection efficiency from positive sera by microscopic observations. The results indicate that these two recombinant chimeric proteins (AD and GD) represent a new alternative for the rapid diagnosis of Dengue and its possible vaccination.

Keywords: Dengue, domain DIII, horned shark, vNAR, diagnosis, vaccine

DEDICATORIA

*A los más fieles y grandes colaboradores de esta tesis que dieron su vida
sin su consentimiento para obtener los resultados...*

AGRADECIMIENTOS

Profesionales

Al Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro por brindarme nuevamente la oportunidad de pertenecer a su grandioso equipo de trabajo, por sus conocimientos, apoyo, paciencia, revisiones, su tiempo y su gran confianza.

A los miembros del comité de Tesis: Dra. Ivone Giffard Mena y Dra. María Teresa Viana Castrillón, por su apoyo, paciencia, sugerencias y comentarios durante el desarrollo de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

A la Universidad Autónoma de Baja California por permitirme ser parte de su grandioso programa de posgrado.

Al Dr. Miguel Ángel Gómez Lim por donar el gen del virus del dengue, esencial para el proyecto.

A la Dra. Edna Sánchez Castrejón por su orientación y apoyo técnico en el desarrollo de este trabajo.

Al M. C Pavel Lugo por su asesoría durante el desarrollo de la etapa final del trabajo.

Al Dr. José Luis Stephano Hornedo por su apoyo en la donación de la membrana de diálisis.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla y a la M. C Marisol Simón Díaz por recibirme en su laboratorio y facilitarme su equipo.

Al Dr. Ernesto García Mendoza y al M.C Jairo Fuentes por su disponibilidad y préstamo de su equipo.

Al Dr. Luis Enríquez Paredes por su franqueza, conocimientos, consejos y “tips” durante clases y el curso de técnicas de biología molecular.

A mis profesores del Posgrado en Ecología Molecular y Biotecnología por compartir sus conocimientos, experiencias, por sus correcciones, sus consejos y ánimos para seguir investigando.

A Angelica Maria Arce Bastida por su amabilidad y orientación en todos los procesos de trámites académicos a lo largo de la Maestría.

AGRADECIMIENTOS

Personales

A mi familia:

A mi madre Idalia Escobar por que siempre serás el mejor ejemplo que tengo de lucha y perseverancia, por tus ánimos, mimos y constantes apoyos a lo largo de mi vida.

A ti Eiko por ese inagotable apoyo de hermana, paciencia, fuerza, amor, regaños merecidos y confianza.

A ti Eder por continuar siendo mi buen y bromista hermano que no llama pero siempre nos tiene presentes, por tu cariño y el de tu linda familia.

A mi padre por sus consejos de vida y apoyo en los momentos más precisos.

A mi amor rojo: Martín por tu cariño, paciencia, sacrificios, asesorías y apoyo incondicional que me brindas.

A mis amigos:

A Tanya por su amistad, disponibilidad, apoyo, consejos y aclaraciones muy útiles para este trabajo.

A Carla Uranga y Janette que me brindaron su amistad, ayuda, sugerencias y muchos consejos para el laboratorio y la vida.

A Erika y Félix por su amistad, compañía y su siempre disposición para ayudarme con los ratoncitos.

A Ale y Viry por su gran amistad, compañía, ánimos, tiempo y apoyo incondicional en nuestro trayecto por esta etapa de Maestría.

A Minnie-Rudy y a Julio Magaña por su amistad y apoyo en todo momento.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Abraham, Alex, Ana Paola, Ana Laura, Andrea, Carmen, Constanza David, Edna, Erika, Félix, Hanna, Irasema, Jairo, Jennifer, Karla, Marco, Mimí, Olivia, Oscar, Pavel, Ricardo, Salvador, Samanta, Tanya por su apoyo, compañía y asesoría en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros en la Maestría: Alejandra, Carla, Daniela, Edelyn, Fernando, Javier, Jennifer, Norma, Roberto, Servando, Sarahi...por el mutuo apoyo a lo largo de las clases y cursos, por su paciencia y tiempo brindados.

CONTENIDO

	Página
Resumen en español	i
Resumen en inglés	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Lista de Figuras	ix
Lista de Tablas	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
II.1 La fiebre del Dengue.....	5
II.1.2 Panorama epidemiológico	5
II.1.3 Manifestaciones clínicas	7
II.2 Agente Viral	8
II.2.1 Proteínas no estructurales.....	9
II.2.2 Proteínas estructurales.....	10
II.3 El Diagnóstico	12
II.4 Vacunación	14
II.5 Anticuerpos.....	18
II.6 Anticuerpos de tiburón	22
III. HIPÓTESIS	26
IV. JUSTIFICACIÓN	26
V. OBJETIVOS	27
V.1 Objetivo general	27
V.2 Objetivos particulares	27
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	28
VI.1 Genes de interés.....	28
VI.2 Cepas Bacterianas.....	28
VI.3 Vectores.....	29
VI.4 Animales de experimentación.....	30
VI.5 Muestras biológicas	31

CONTENIDO (continuación)

Página

VI.6 Obtención de genes quiméricos	31
VI.6.1 Diseño de oligonucleótidos	31
VI.6.2 Preparación de células electrocompetentes.....	32
VI.6.3 Construcción de genes quiméricos en el vector pBR322.....	34
VI.6.4 Clonación de genes quiméricos y del gen D ₂ en el vector pCOMB3X-scFv	44
VI.7 Obtención de proteínas quiméricas	48
VI.7.1 Transformación de cepas <i>E. coli</i> BL21 (D3).....	48
VI.7.2 Expresión y extracción de proteínas quiméricas	49
VI.7.3 Purificación, análisis y cuantificación de proteínas quiméricas.....	50
VI.8 Bioensayos.....	52
VI.8.1 Ensayo de Vacunación con la proteína quimérica GD	52
VI.8.2 Ensayo de Hemoaglutinación con la proteína quimérica AD.....	53
VI.9 Análisis Estadístico.....	53
VII. RESULTADOS.....	54
VII.1 Construcción de genes quiméricos en el vector pBR322.....	54
VII.1.1 Amplificación de genes A, G y D ₁	54
VII.1.2 Digestión de genes y del vector pBR322.....	55
VII.1.3 Búsqueda de colonias positivas con pB-D y Digestión de pB-D.....	56
VII.1.4 Búsqueda de colonias positivas con AD y GD en pBR322.....	58
VII.2 Clonación en pCOMB3X-scFv.....	59
VII.2.1 Amplificación y digestión de genes quiméricos AD, GD, el gen D ₂ y el vector pCOMB3X-scFv.....	59
VII.2.2 Búsqueda colonias positivas con AD, GD y DIII.....	61
VII.2.3 Secuenciación de proteínas quiméricas AD y GD y la proteína DIII	62
VII.3 Análisis de la expresión de proteínas quiméricas AD y GD y la proteína DIII	65
VII.3.1 SDS- PAGE	65
VII.3.2 Western-Blot.....	66
VII.3.3 Cuantificación.....	66

CONTENIDO (continuación)

Página

VII.4 Ensayo de Vacunación	68
VII.5 Ensayo de hemoaglutinación	70
VIII. DISCUSIONES	73
VIII.1 Obtención de genes quiméricos	73
VIII.2 Obtención de proteínas quiméricas AD y GD y la proteína D ₂	75
VIII.3 Ensayo de Vacunación	76
VIII.4 Ensayo de hemoaglutinación	78
CONCLUSIONES	80
PERSPECTIVAS	81
LITERATURA CITADA	82
ANEXOS	94

LISTAS DE FIGURAS

Figura		Página
1	Reporte de casos de Dengue por la PAHO 2012.....	6
2	Curso de la enfermedad del Dengue.....	8
3	Estructura del Dengue.....	12
4	Estructura típica de un anticuerpo.....	14
5	Esquema donde se muestra la estructura y peso molecular en kilodaltons (kDa) de los anticuerpos y sus fragmentos.....	24
6	Esquemas de los vectores de clonación y de expresión.....	29
7	Amplificación de genes para clonación en pBR322.....	55
8	Digestión de genes A, G y D ₁	56
9	Digestión del vector pBR322.....	57
10	Colonias transformadas con pB-D.....	58
11	Digestión de pB-D con las enzimas EcoRI y BamHI.....	58
12	PCR para búsqueda de genes quiméricos clonados en pBR322...	59
13	Genes quiméricos, gen D ₂ y pCOMB3X-scFv.....	61
14	Genes quiméricos AD y GD en pCOMB3X.....	62
15	Gen D ₂ clonado en pCOMB3X.....	63
16	Secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica AD.....	64
17	Secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica GD.....	65
18	Secuencia de aminoácidos de DIII.....	65
19	SDS-PAGE al 12%.....	66
20	Western blot de proteínas quiméricas y la proteína DIII.....	68
21	Cinética de producción de anticuerpos IgG-antiDIII.....	70
22	Ensayo previo de hemoaglutinación.....	71
23	Ensayo de hemoaglutinación resultados macroscópicos.....	72
24	Ensayo de hemoaglutinación resultados microscópicos.....	73
25	Digestiones teóricas del vector pBR322.....	95
26	Alineamiento de secuencias DCSIGN.....	96
27	ELISA de reconocimiento de IgG-anti vNAR G4.....	97

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Secuencias de los oligonucleótidos.....	32
II	Componentes y cantidades de la mezcla para la PCR.....	35
III	Condiciones finales de la PCR.....	35
IV	Componentes usados para las reacciones de doble digestión.....	39
V	Componentes usados para la reacción de ligación.....	40
VI	Componentes y cantidades para la PCR de colonia.....	41
VII	Componentes usados para una reacción de digestión del vector pB-D.....	42
VIII	Componentes usados para la reacción de ligación a pB-D.....	43
IX	Componentes usados para la reacción de digestión con la enzima Sfil.....	46
X	Componentes usados para la reacción de ligación en el vector pCOMB3X-scFv.....	47
XI	Secuencias de oligonucleótidos ompseq y gback.....	48
XII	Tabla de casos de Dengue reportados en América hasta la semana 44 del 2012	93

I. INTRODUCCIÓN

El Dengue (DEN) o fiebre del Dengue (DF) es una enfermedad viral humana re-emergente provocada por un virus perteneciente al género de los *Flavivirus* con cuatro serotipos virales denominados Dengue 1, 2, 3 y 4 (D1-4). Esta enfermedad se transmite a los humanos por medio del mosquito *Aedes sp.* (A.) principalmente *A. aegypti*. El DF tiene una alta incidencia de dengue y es endémica de países tropicales y subtropicales. También se extiende de zonas urbanas a zonas rurales, debido a factores como la migración y escasos de servicios de salud e inadecuados procedimientos de vigilancia epidemiológica (Gubler, 1999; Vázquez et al., 2011). En el mundo se estima que existen ~50-100 millones de personas afectadas por la infección del dengue (Guilarde et al., 2008). El DEN se puede manifestar como una forma benigna; denominado Dengue Clásico (DC) o una variante grave; llamada fiebre del dengue hemorrágico (DH). Esta última provoca trastornos de la coagulación ocasionando pérdida de líquidos y sangre, mediante hemorragias y finalmente un estado de choque que lleva a la muerte del paciente. Numerosos casos fatales son a causa de un mal diagnóstico o sub-diagnóstico de la enfermedad, la cual es confundida con múltiples enfermedades exantemáticas, (influenza, rubéola, sarampión, entre otras) empeorando de un DC a DH (Maguiña et al., 2005; WHO, 2009). En América se reporta una alta circulación de los cuatro serotipos de Dengue haciendo más susceptible a la población de padecer casos graves de la enfermedad con la presencia de D2 y D3 causantes de DH (PAHO, 2011). En México también se ha reportado la circulación del D3 como serotipo prevalente, el cual está asociado con casos de DH (Martin et al., 2010, Vazquez et al., 2011).

Los métodos utilizados para diagnosticar DEN son: el método serológico mediante la técnica de ELISA (por sus siglas en inglés, Enzyme-Linked Inmunosorbent Assays) para detección de anticuerpos anti-Denge (anti-DEN) y la proteína NS1; el virológico empleando la técnica de qRT-PCR (del inglés Real

time-Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction), con la cual se busca la presencia de ARN viral y para la identificación del serotipo se realiza el aislamiento y cultivo viral en células específicas (Gurukumar et al., 2009; Vazquez et al., 2011). Sin embargo no es posible realizar estos métodos de diagnóstico en muchos hospitales pequeños o laboratorios de rutina, ya que se requiere de una preparación especial de muestras, personal capacitado y de equipamiento costoso (WHO, 2009). Por lo cual estos centros de salud necesitan conservar fría la muestra desde la toma, durante su envío y manejo, hasta la llegada al laboratorio de referencia donde se analizará, consumiendo tiempo para la entrega del resultado y con el riesgo que se degrade el material biológico (Acosta & Gomez, 2005).

La comunidad científica ha realizado múltiples esfuerzos para prevenir la infección con DEN, pero a la fecha no se ha logrado obtener ninguna vacuna eficiente contra él debido a que es necesario que una vacuna eficiente induzca inmunidad protectora de larga duración (Murrell et al., 2011). La inmunidad deficiente contra uno de los serotipos puede constituir un factor de riesgo para el desarrollo de DH durante las infecciones que ocurran con posterioridad a la vacunación. La hipótesis más aceptada para explicar la ocurrencia de este fenómeno es la amplificación dependiente de anticuerpos (ADA), en donde el incremento de la multiplicación viral es mediado por los anticuerpos heterotípicos no neutralizantes y los receptores Fc de las células dianas (Halstead & O'Rourke, 1977; Guy et al., 2008). Las vacunas que actualmente se encuentran en fases más avanzadas de desarrollo se basan en virus atenuados (Whitehead et al., 2007). Sin embargo, estos candidatos inducen reacciones adversas severas (entendidas como el desarrollo de los síntomas y signos de la enfermedad por dengue) después de la vacunación (Hombach et al., 2007). Una alternativa es el desarrollo vacunas con subunidades recombinantes del virus, como proteínas quiméricas, que al ser sistemas no replicativos es menos probable que induzcan los síntomas y signos de una infección por DEN después de la vacunación en

humanos, sin el riesgo de que sean transmitidos a los mosquitos y luego al hombre (Whitehead et al., 2007; Murrell et al., 2011). Por lo cual persiste la necesidad de desarrollar nuevos métodos de diagnóstico preventivo, eficientes, rápidos y accesibles a todos los laboratorios.

Las investigaciones para la detección y control del DEN se basan en los conocimientos de las características de conformación viral. El virus cuenta con una envoltura compuesta de proteínas de envoltura (pE), proteínas de membrana (pM) y proteínas de cápside (pC), estas últimas encapsula el genoma viral de ARN de una sola hebra, el cual codifica para las proteínas estructurales y no estructurales del virus (Lindenbach et al. 2007). Recientes investigaciones ponen especial énfasis en la proteína pE, que está involucrada en el ataque viral (reconocimiento de receptores celulares, la fusión y penetración a la célula blanco) (Zheng et al. 2010). La pE se constituye por tres dominios denominados dominio I (DI), dominio II (DII) y dominio III (DIII), siendo DIII considerado como el mayor dominio antigénico de toda la pE porque contiene los determinantes antigénicos (epítomos) los cuales son responsables de la neutralización del virus (Kim et al., 2009; Matsui et al., 2009). Así también es posible utilizar las proteínas involucradas en la respuesta inmunológica (anticuerpos específicos IgM-antiDEN, IgG-antiDEN) como blancos de diagnóstico de la infección por DEN (Leitmeyer et al., 1999).

Los anticuerpos (Ac) son glucoproteínas conocidas también como inmunoglobulinas (Igs) producidas para neutralizar y reconocer a las moléculas extrañas en el organismo llamadas antígenos (Ag) (Kumagai y Tsumoto, 2001, Abbas, 2009). Con los avances en la ingeniería de anticuerpos recombinantes se han logrado obtener anticuerpos modificados, los cuales son utilizados para obtener proteínas quiméricas o bifuncionales, que constituyen una nueva familia de moléculas para inmunoterapia y detección. Estas quimeras adquieren nuevas funciones como: activar la red antígeno-anticuerpo mediante péptidos de patógenos unidos a anticuerpos que van dirigidos a blancos específicos celulares (eritrocitos, células dendríticas, células tumorales, etc.) o despertar e incrementar

la respuesta inmune por células presentadoras de antígenos (macrófagos, linfocitos B y células dendríticas). Se ha demostrado que son un excelente modelo para el diseño de herramientas para diagnóstico, inmunización y hasta fármacos altamente específicos (Deffar et al., 2009; Shortman et al., 2009).

Los anticuerpos de tiburón de dominio sencillo ν NAR, han generado gran expectación como moléculas de reconocimiento antigénico, debido a sus características; elevada estabilidad química y térmica, pequeño tamaño (12-15 kDa) y elevada constante de disociación (kd) hacia determinados antígenos (Streltsov et al., 2005; Wesolowski et al., 2009). Desde su descubrimiento se han generado bibliotecas inmunes y no inmunes desplegadas en fagos para aislar fragmentos tipo ν NAR contra una variedad de antígenos importantes como interleucinas involucradas en el desarrollo de ciertos padecimientos, proteínas tumorales, toxinas escorpiónicas, proteínas de cápside viral y demás gama de antígenos (Saerens et al., 2008; Bowley, 2009). Beltrán (2006) logró generar un fragmento de anticuerpo ν NAR recombinante dirigido a células dendríticas para mejorar la respuesta inmune en caballos. Dávila (2009) y Lugo (2009) generaron ν NAR dirigidos a la glicoforina A de eritrocitos fusionados a péptidos específicos para desarrollar métodos por hemoaglutinación para VIH (virus de inmunodeficiencia humana) y tuberculosis en humanos (producida por *mycobacterium tuberculosis*) con resultados prometedores al generar ν NAR útiles en el reconocimiento, neutralización y el diagnóstico de enfermedades.

Los resultados anteriores nos alientan probar los anticuerpos de tiburón en quimeras con DIII de pE del D3 para desarrollar vehículos útiles en el diagnóstico y vacunación. Para ello se construirán dos proteínas quiméricas recombinantes; una con la capacidad de unirse a la proteína glicoforina A exclusiva de eritrocitos que sea reconocida por anticuerpos anti-DIII en sueros, para desarrollar una prueba de diagnóstico por hemoaglutinación, y la segunda se unirá a una proteína específica al receptor de células dendríticas DC-SIGN para producir anticuerpos específicos a D3 que pudiera servir como vacuna.

II. ANTECEDENTES

II.1 La fiebre del Dengue

El dengue es una enfermedad infecciosa aguda provocada por el virus del mismo nombre. Fue descrita y reconocida clínicamente por primera vez en 1780 por Benjamin Rush en Filadelfia, Estados Unidos de América, durante la primera epidemia conocida en el continente Americano (Kourí, 2006).

Hoy en día es la enfermedad viral más importante transmitida a los humanos por vectores artrópodos (Antuñano & Mota, 2000). Particularmente por la hembra hematófaga de mosquitos del género *Aedes* de las especies *A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. polynesiensis* y *A. scutellaris* pero principalmente *A. aegypti* (PAHO/WHO, 2000). El ser humano es el principal huésped amplificador del DEN, éste circula en la sangre de las personas infectadas. El virus es incorporado en los mosquitos hembra durante su alimentación (mordedura y consecuente ingestión) de un humano infectado con DEN. Los viriones transitan hacia el intestino medio del mosquito donde se propagan e incuban durante un periodo de 8 a 12 días. Posteriormente la infección se trasmite a otras personas durante la picadura y subsecuente alimentación del mosquito (WHO, 2009). El virus se replica, disemina y reinfecta a las células de las personas infectadas (Marovich et al., 2001; Kou et al., 2008)

II.1.2 Panorama epidemiológico

Es la enfermedad diseminada más rápidamente en el mundo. En los últimos 50 años su incidencia ha aumentado 30 veces y geográficamente ha alcanzado países donde nunca se había reportado (WHO, 2009). El calentamiento global, la creciente urbanización no sustentada, el incremento de los viajes aéreos y marítimos intercontinentales, la reinfestación del vector en zonas donde se tenía erradicado, la existencia de una infraestructura de salud deteriorada en muchos

países y en las últimas décadas, las migraciones poblacionales de las zonas rurales a la ciudad han aumentado los casos de DEN de zonas urbanas a zonas rurales, afectando a más de 60 países y con endemividad en regiones tropicales y subtropicales (Maguiña et al., 2005; WHO, 2009).

Los estudios epidemiológicos estiman que al año existen ~250,000-500,000 casos de DH y los demás casos de DC (50-100 millones) (Gibbons y Vaughn, 2009; WHO, 2009). Los casos de DEN en América se vuelven cada vez más endémicos, con brotes activos de DC y DH en diversas regiones con la circulación de más de un serotipo. El reporte de la semana epidemiológica No.44 de la PAHO (2012) indica 1,006,292 casos de DEN de los que 25,843 son DH. Siendo México (53.3%), Brasil (14.2%), Honduras (8.3%) y Bolivia (7.8%) los países con más afectados (Figura 1).

		Resumen por Subregión					
		Dengue	DSevero			Muertes	
Norte América		95	0			0	
Centro América		233,442	16,707			76	
Andina		153,959	4,962			125	
Cono Sur		597,639	3,781			305	
Caribe Hispano		13,373	135			36	
Caribe		7,784	258			10	
Total		1,006,292	25,843			552	

País o subregión	Semana ^a	Casos de D y DS ^b reportados			Tasa de Incidencia ^c	Serotipo ^d	Dengue Severo ^e
		Clinico	Tasa de Incidencia ^c	Lab. Confirm.			
Centro América y México							
Belice	35	1,421	441.30	88	27.33	DEN	6
Costa Rica	44	15,101	330.94	2,246	49.22	DEN1,2,3	33
El Salvador	44	41,429	647.63	12,328	192.72	DEN 1,2,3,4	723
Guatemala	44	7,936	67.90	1,354	11.59	DEN 1,2	42
Honduras	42	11,816	140.92	4	0.05	DEN 1,2	2,103
México	44	135,126	122.15	39,730	35.92	DEN 1,2,3,4	13,772
Nicaragua	42	19,639	377.09	3,351	64.34	DEN 1,3	23
Panama	44	974	27.38	757	21.28	DEN 1,2,3	5
Subtotal		233,442	154.87	59,858			16,707
Andina							
Bolivia	42	37,029	380.68	6,299	64.76	DEN 2	2,011
Colombia	44	44,651	194.65	5,510	24.02	DEN 1,3,4	1,199
Ecuador	41	18,995	141.67	140	1.04	DEN 1,2,4	278
Peru	44	19,360	65.59	1,047	3.55	DEN 1,2,3,4	149
Venezuela	40	33,924	119.52	0	0.00	DEN 1,2,3,4	1,325
Subtotal		153,959	148.08	12,996			4,962
Cono Sur							
Argentina	44	2,043	5.10	226	0.56	DEN 2,3	0
Brasil	42	561,785	293.39	110,135	57.52	DEN 1,2,3,4	3,662

Figura 1. Reporte de casos de Dengue por la PAHO 2012. Dengue severo= Dengue Hemorrágico y síndrome de shock por dengue, CFR= Tasa de letalidad del dengue (reporte completo en Anexo I)

En nuestro país prevalecen los cuatro serotipos D1-D4 ocasionando una hiperendemicidad; es decir la población se expone a un mayor riesgo de presentar DEN, con la posibilidad de reinfecciones en la misma población por serotipos diferentes lo que provoca cuadros clínicos graves de DH. Los serotipos D2 y D3 son los que están asociados con DH (Smith et al., 2010; PAHO, 2011). El serotipo D3 se había detectado únicamente en Asia y fue responsable de los casos de DH en Tailandia, Indonesia y Sri Lanka, pero se ha expandido rápidamente en todo el continente Americano y coincide con el incremento de casos de DH (King et al., 2008). La introducción y rápida circulación del serotipo D3 de DEN en nuestro país probablemente han sido factores importantes de los cambios en la incidencia o gravedad del DEN, sumado a que la población esta desprotegida inmunológicamente contra este serotipo (Gómez & Tapia, 1995; Díaz et al., 2006, SINAVE, 2011)

II.1.3 Manifestaciones clínicas

La infección con el virus de dengue puede resultar como una infección asintomática y sintomática iniciando con fiebre indiferenciada (38°-39° C de dos a siete días). El cuadro clínico para DC es: fiebre, somnolencia, dolor de cabeza, dolor muscular, dolor de articulaciones, dolor retroocular, pérdida de apetito, problemas con el sentido del gusto, náuseas, en algunos casos exantema, vómito, diarrea y hemorragias (Low et al., 2011). Además de esos síntomas en los casos de DH se presenta fiebre, trombocitopenia ($\leq 100\ 000$ plaquetas/mm³), hemorrágicas (a nivel de fosas nasales, encías, intestino, vagina, etcétera), daño hepático dependiente del serotipo y un estado de choque hipovolémico que es potencialmente fatal para el paciente. Además se pueden presentar trastornos neurológicos (irritabilidad, depresión, encefalitis). Para ambos casos de dengue se presentan incrementos en las inmunoglobulinas IgM e IgG, específicas a DEN, siendo detectables entre los 5-7 días de la enfermedad y perdurando ese

incremento hasta tres y 10 meses respectivamente (ver Figura 2) (Vázquez et al., 2006; Wichmann et al., 2007).

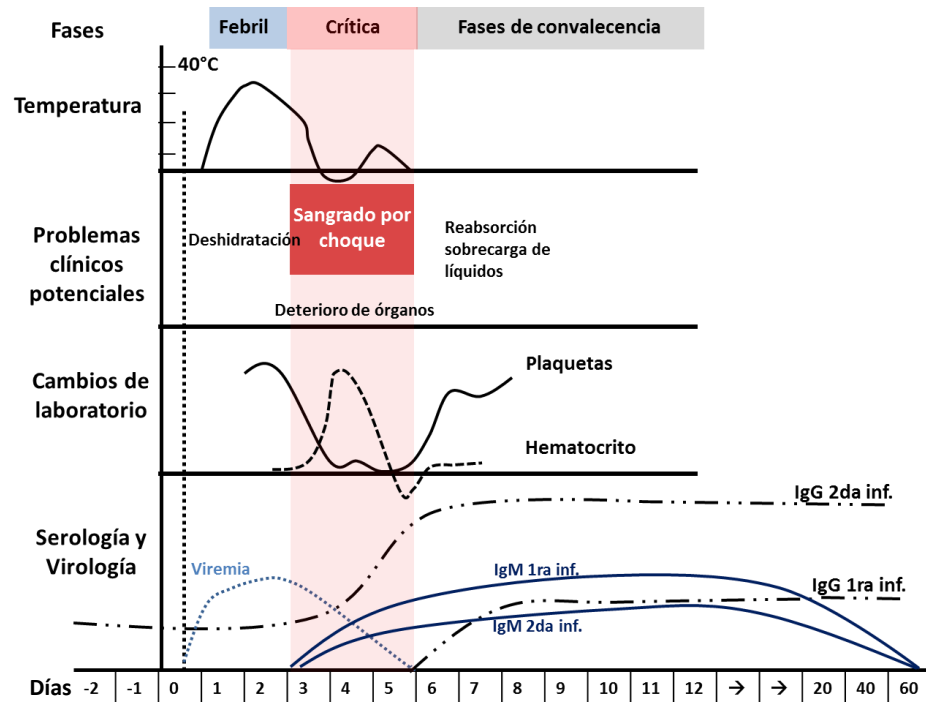


Figura 2. Curso de la enfermedad del Dengue. Se observan algunas de las características clínicas presentes en una primera (1ra inf) o segunda infección por dengue (2da inf).

II.2 Agente Viral

El virus del DEN pertenece a la familia *Flaviviridae* del género *Flavivirus* (del latín *Flavus* o amarillo) del grupo B. Los cuatro serotipos (DEN1-4), están estrechamente relacionados, comparten una homología del 70% de sus secuencias nucleotídicas, pero antigénicamente son diferentes (Maguiña et al., 2005).

El virión tiene un diámetro de ~40-60 nm, está conformado por una nucleocápside icosaédrica y una envoltura lipídica que adquiere de la célula huésped, sobre la cual se insertan las proteínas de membrana y de envoltura. En el interior del virus se encuentra el complejo riboproteico constituido de la proteína de cápside y el genoma viral que consiste en una molécula de ARN con una única hebra de sentido positivo, con un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para una poliproteína única que posteriormente es editada en siete proteínas no estructurales y tres proteínas estructurales, con aproximadamente 10,700 nucleótidos de longitud (Lindenbach et al., 2007; Chávez et al., 2010).

II.2.1 Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales (NS por sus siglas en inglés) del DEN son denominadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Figura 3a). Las funciones de estas proteínas se definen parcialmente: la proteína NS1 (46 kDa) forma dímeros o hexámeros asociados a balsas lipídicas de la membrana plasmática, se puede hallar soluble en el citoplasma y en el espacio extracelular y puede estimular al sistema inmunitario; NS2A (~22 kDa) *in vitro* promueve el ensamblaje y la replicación viral; NS2B (14 kDa) posee una región hidrofóbica que ancla a la membrana del retículo endoplásmico para formar el complejo NS2B/NS3 y actúa como cofactor de NS3; la proteína NS3 (70 kDa) actúa como trifosfatasa de nucleótidos estimulada por ARN y como helicasa del ARN, indispensables en la replicación viral; NS4A (~16kDa) es igual que NS2B un cofactor de NS3 regulando la actividad de la helicasa; los estudios recientes con NS4B (27kDa) demostraron que bloquea la respuesta de interferón por la célula huésped. Por último NS5 es la más conservada entre todos los flavivirus responsable de la metilación del extremo 5' del ARN genómico y actúa como polimerasa dependiente de ARN (Bollati et al., 2010; Hanley & Weaver 2010; Tajima et al., 2011).

II.2.2 Proteínas estructurales

Las proteínas estructurales que forman parte de la partícula viral han sido más estudiadas que las no estructurales, por lo cual su estructura, función e interacción es conocida.

La proteína de cápside (pC) de ~11 kDa, también conocida como proteína de cubierta se anclan a la membrana del retículo endoplásmico y se asocia fuertemente al ARN genómico recién sintetizado formando el complejo riboproteico o nucleocápside que protege al ARN viral de la degradación y promueve la organización del ARN en el interior de la partícula viral en formación (Lindenbach et al., 2007). También recluta pequeñas gotas lipídicas, presentes en el citoplasma, promoviendo la formación de la partícula viral e interactúa con la proteína precursora de membrana (prM) y de envoltura, para favorecer y completar el ensamblaje de las partículas virales (Sama et al., 2005).

La proteína precursora de membrana (prM) y proteína de membrana (M). La prM (~26 kDa) está presente en los viriones inmaduros y junto con la proteína M, participa fundamentalmente en el proceso de maduración de la partícula viral. Esta proteína es procesada después de la transducción por la proteasa celular furina, que la divide en dos y genera el péptido pr y la proteína M, que queda con un peso molecular de 8 kDa. Esta proteína cuenta con el dominio ApoptoM de ~40 aminoácidos (aa) el cual puede inducir apoptosis en las células hospederas (Chateau et al., 2003; Lindenbach et al., 2007).

La Proteína de envoltura (pE), tiene un peso molecular de ~53 kDa, contiene ~500 residuos de aa y un dominio N-terminal anclado en la membrana (ver Figura 3b). Presenta en su estructura 12 residuos de cisteína que forman seis puentes disulfuros intramoleculares. Es la principal proteína en la superficie del virión con 180 copias idénticas, unidas a la superficie de la membrana por el

segmento transmembrana corto formando complejos homodiméricos (Goodsell, 2008).

La importancia funcional de pE radica en ser la única proteína viral que interactúa con las moléculas receptoras de la membrana plasmática de las células vulnerables que favorecen la endocitosis del virus. La existencia de mutaciones y modificaciones que sufre esta proteína en cada ciclo de replicación, posteriores a la transducción, pueden afectar directamente la eficiencia de la replicación, la virulencia y el tropismo del DEN (Zheng et al. 2010). Esta proteína es el principal inmunógeno del virus, debido a que contiene regiones antigénicas o epítomos que reconoce el sistema inmunológico, estimula la respuesta inmune del individuo e induce la producción de anticuerpos neutralizadores.

II.2.2.1 Dominios

Los estudios para caracterizar la estructura de pE por cristalografía de rayos X demostraron que esta proteína posee tres dominios denominados I, II y III (DI, DII, DIII). El DI es un dominio central en hoja plegada, contiene 120 residuos de aminoácidos, con epítomos de tipo específico no neutralizantes (King et al., 2008) y se distribuyen en tres segmentos de los cuales dos dimerizan con el DII. Este DII se cree, es la región de interacción entre los monómeros de los dímeros de pE y contiene regiones inmunodominantes que pueden provocar reacción cruzada con anticuerpos subneutralizantes, lo que puede favorecer la entrada del virus a la célula huésped (Brandler et al., 2010). El DIII es de tipo inmunoglobulina que constituye el dominio carboxilo-terminal (100 aa), se encuentra expuesto e interacciona entre el virus y los receptores de las células vulnerables. Se ha reportado que contiene epítomos neutralizantes que inducen la obtención de fuertes anticuerpos monoclonales bloqueadores de la adsorción viral a las células (Figura 3c) (Crill & Roehrig, 2001; Cháves et al., 2010).

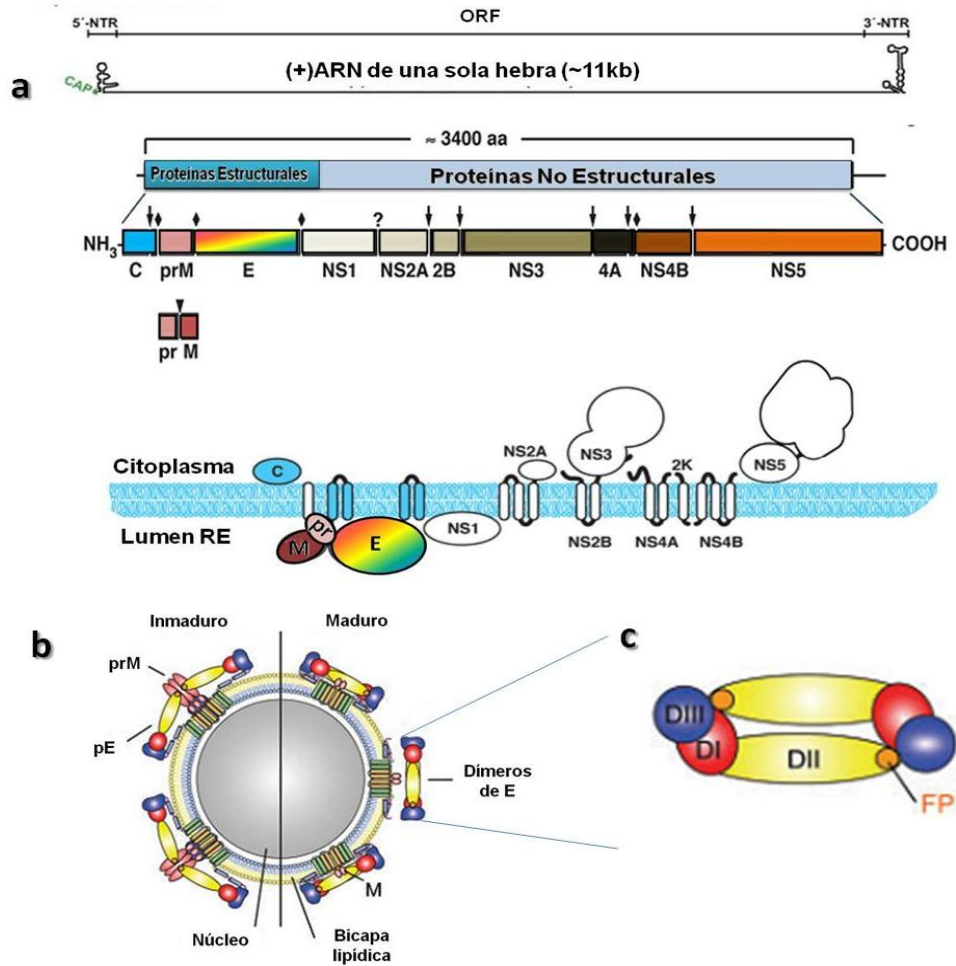


Figura 3. Estructura del Dengue. **a.** Se representa el genoma viral, las proteínas a las que se traduce y los sitios de corte para las enzimas señalasa del huésped (\blacklozenge), para la proteasa viral NS2B-3 (\blacktriangledown), la furina (\blacktriangledown) y otra proteasa desconocida (?), así como la forma propuesta en que están conectadas a la membrana del retículo endoplásmico y el orden de su aparición en la poliproteína (de izquierda a derecha) (RE) **b.** Los virus inmaduros caracterizados por la presencia de prM y pE asociadas formando un complejo en forma de tallo, a diferencia de los virus maduros que presentan un reordenamiento de pE en homodímeros. **c.** El esquema de un homodímero de pE, sus dominios (DI-, II,III) y el péptido FP usado durante la fusión de membranas (modificado de Lindenbach et al., 2007)

II.3 El Diagnóstico

El DEN produce una gran diversidad de síntomas por lo cual es necesaria la confirmación del diagnóstico por el laboratorio. Las técnicas de laboratorio para la detección del DEN se determinan dependiendo del tiempo iniciada la fiebre. El

DEN tiene un periodo de incubación de tres a siete días (antes de presentarse la fiebre), después continua circulando en la sangre hasta cinco días después de iniciada la fiebre. Durante este periodo (denominado fase aguda) el virus, el antígeno viral NS1 y los IgM anti-DEN pueden ser detectados. Después del sexto día de iniciada la fiebre se detectan anticuerpos IgG-anti DEN (Hu et al., 2011). En reinfecciones por serotipos diferentes se observa una respuesta inmune en donde los anticuerpos se detectan en un periodo más corto y en concentraciones menores (Shu et al., 2003, Vázquez, 2010).

Para determinar el serotipo viral, la muestra sanguínea es tomada en la fase aguda, almacenada y transportada en frío (4 °C) a la mayor brevedad, ya que el traslado no debe tardar más de 48 horas para garantizar la calidad de los resultados. Entre los principales métodos de diagnóstico empleados están los cultivos del virus en células de mosquito (C6/36 *A. albopictus*, AP61 *A. pseudoscutellaris*), o en células de mamífero (Vero de mono verde, BHK21 de hámster (C6/36 *A. albopictus*, AP61 *A. pseudoscutellaris*, Vero de mono verde ó BHK21 de hámster) (Aquino et al., 1995; Vázquez, 2010).

Otro método es el serológico con ELISA de captura para determinación de anticuerpos IgM después de seis días de fiebre. La detección de IgG se realiza con muestras de la fase aguda de la primera semana y después de dos semanas de fiebre para determinar el incremento de anticuerpos IgG. Con esta prueba se puede distinguir entre una infección primaria y una secundaria (Vázquez, 2010).

En los últimos años la técnica molecular de PCR aplicada para detección de esta enfermedad se ha venido estandarizando. Esta es denominada Transcripción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo real qRT-PCR (*Real time-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* en inglés). Esta permite la identificar el serotipo viral en suero y sobrenadantes de muestras clínicas con células infectadas. La toma de muestra debe ser durante los primeros tres días de iniciada la fiebre, manejada y almacenada adecuadamente a

4 °C, para que se detecte una mayor carga viral, promoviendo la detección de serotipos por qRT-PCR y su posterior aislamiento. Sin embargo no se puede distinguir entre una infección primaria o secundaria, el qRT-PCR debe realizarse en laboratorios que cuentan con el equipo, reactivos y con el personal experimentado, lo cual eleva su costo y limita su accesibilidad a muchos laboratorios y hospitales pequeños (WHO, 2009).

II.4 Vacunación

La necesidad de contar con una vacuna segura y efectiva contra el virus es considerada como prioritaria, debido a diversas causas como las características de la enfermedad, la ausencia de un tratamiento específico, el incremento en el número de enfermos de casos de DC y DH, el número de países afectados y los problemas para el control del vector hacen difícil el control de la enfermedad (WHO, 2009).

Actualmente no existe un buen modelo animal que reproduzca el cuadro clínico de una infección por DEN en humanos. Se han empleado una gran variedad de monos que son susceptibles a la enfermedad, los cuales presentan respuesta similar en los humanos, pero su disponibilidad es limitada y su costo es elevado (Smith et al., 2010). Los ratones son el modelo animal más utilizado por razones prácticas (disponibilidad y costo), sin embargo, su uso presenta limitaciones, debido a que algunas de las rutas de infección empleadas son fisiológicamente diferentes a las de la infección natural. No obstante, la respuesta de anticuerpos inducida por el virus DEN en estos roedores es comparable a la observada en humanos (Smith et al., 2010; Murell et al., 2011).

Existen cuatro tipos de vacunas contra el dengue actualmente en desarrollo: vacunas atenuadas, vacunas quiméricas atenuadas, vacunas a base

de ácidos nucleicos (ADN) y vacunas inactivadas o de proteínas recombinantes (Zambrano-Mora, 2010; WHO, 2011).

Sabin, en 1945, fue el primero en obtener el virus D1 atenuado en el cerebro de ratón. Sin embargo, el grado de atenuación parece variar dependiendo de la cepa viral, llevando a muchos voluntarios a tener reacciones secundarias. El problema de atenuación se solucionó cuando se descubrió que el virus podía ser cultivado, propagado y atenuado en pasajes seriados de células de riñón de perro Beagle, es decir se subcultivos de las células infectadas previas a saturación (semiconfluencia) (PDK en inglés *primary dog kidney*) (Halstead & Marchette; 2003). Si bien la atenuación se consigue normalmente mediante la introducción de una mutación genética en el genoma del virus, esta atenuación tiene el inconveniente de conducir a cambios moleculares imprevisibles no deseados, los cuales pueden acumular mutaciones en la cepa viral. Esto provocaría que un individuo inmune a la cepa original no sea inmune a aquella cepa que sufrió los cambios, provocando brotes esporádicos y epidemias del virus mutado (Shimizu et al., 2001; Hombach et al., 2007).

Hasta el momento existen dos candidatos vacunales atenuados formulados como vacunas tetravalentes en fase clínica (pruebas en humanos). El primer candidato vacunal fue desarrollado por científicos de la Universidad de Mahidol, Tailandia, e incluye cepas de los serotipos D1, 2 y 4 atenuadas en cultivos primarios de células de riñón de perro PDK y la del virus D3 se obtuvo en cultivo primario de células de riñón de mono verde africano (PGMK en inglés *primary green monkey kidney*). La reacción adversa fue moderada, sin embargo, el 5% de los niños tuvieron reacciones sistémicas considerables y el virus del D3 estaba poco atenuado (Whitehead et al., 2007).

El instituto de investigaciones del ejército de Estados Unidos (WRAIR en inglés *Walter Reed Army Institute of Research*) desarrolla una formulación similar a la anterior, con la diferencia de que los virus fueron atenuados en PDK y

después cultivados en células fetales de pulmón de monos Rhesus. Después de reformulaciones monovalentes (protege contra uno solo de los serotipos) le permitieron llegar a una fase II (personas voluntarias que padecen la enfermedad), siendo el candidato vacunal más avanzado en desarrollo. No obstante, aún en esta etapa no se logró la inducción de anticuerpos para cada serotipo en todos los casos después de dos dosis y se observaron reacciones adversas (Sun et al., 2003).

Los investigadores del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH –del inglés- *Nacional Institute of Health*) desarrollaron candidatos quiméricos atenuados del serotipo D4 mediante la eliminación de 30 nucleótidos ($\Delta 30$) en el extremo 3' del genoma, reemplazando las proteínas prM y pE. Los estudios en humanos de la variantes rDEN1/4 $\Delta 30$, rDEN2/4 $\Delta 30$ y rDEN3/4 $\Delta 30$ están en curso actualmente y aún se debe evaluar la factibilidad de esta formulación tetravalente para humanos (Whitehead et al., 2007).

La vacuna quimérica que se encuentra más avanzada en su evaluación clínica es hasta el momento la “Chimerivax DEN” que sustituye los genes PrM/E de los cuatro serotipos del virus DEN sobre la vacuna atenuada de la fiebre amarilla (17D) que se desarrolla por la compañía Acambis y se licencia por Sanofi Pasteur. De acuerdo a los datos preliminares, la formulación tetravalente también resultó segura en humanos. No obstante, ésta mostró el inconveniente de que debe ser administrada en dosis superiores que no son aprobadas en las regulaciones vacunales (Kanasa-thasan et al., 2001, Whitehead et al., 2007).

Las vacunas de ADN tienen la ventaja de inducir el procesamiento de antígenos intracelulares de la inmunidad adaptativa, que es estable así como una fácil fabricación. La desventaja de las vacunas de ADN es que inducen una baja producción de anticuerpos neutralizantes y han tenido un éxito limitado debido a la absorción inadecuada por las células, dando lugar a una baja expresión de antígenos (Raviprakash et al., 2008).

Las vacunas de proteínas recombinantes presentan dos ventajas fundamentales sobre los otros métodos vacúnales: 1) son seguras debido a su naturaleza no replicativa y 2) pueden inducir una respuesta elevada de anticuerpos. Sin embargo presentan como desventajas la necesidad de adyuvantes (moléculas o sustancias que potencian la respuesta inmune) para inducir una respuesta inmune óptima y requieren de múltiples dosis para lograr una inmunidad de larga duración. Entre los adyuvantes más usados están las sales de aluminio (alumbre), fosfato de calcio, liposomas, virosomas, proteínas acarreadoras hacia células presentadoras de antígenos, entre otros (O'Hagan, 2007; Whitehead et al., 2007).

Entre las proteínas quiméricas más avanzadas esta la desarrollada por *Hawaii Biotech*, estas se componen de un fragmento soluble de pE junto a la proteína NS1 y son expresadas en *Drosophila S2*. Esta vacuna indujo títulos de anticuerpos neutralizantes elevados en monos después de tres dosis y protección frente al reto para algunas de las formulaciones ensayadas, por el momento no ha completado los ensayos en humanos (Hombach et al., 2007).

Las diversas estrategias utilizando subunidades recombinantes se basan en la región DIII de pE como inductor de una respuesta de anticuerpos neutralizantes específica de cada serotipo. Se han llevado a cabo varias combinaciones de fusiones como: DIII fusionado a la TrpE (proteína del metabolismo del triptófano de *E. coli*) (Fonseca et al., 1991); DIII unido a NS1 del dengue 2 (D2) y a la proteína A de *Stafilococcus aureus* (Srivastava et al., 1995); DIII del D2 fusionado a la proteína de unión a maltosa de *E. coli* (MBP en inglés *maltose binding protein*)(Simmons et al., 1998). La mayoría de estas fusiones quiméricas lograron inducir en los animales un título adecuado de anticuerpos neutralizantes así como protección para el serotipo probado. Sin embargo se necesitaron un número elevado de dosis para desarrollar anticuerpos neutralizantes por lo que se debe trabajar en mejorar la inducción de una buena respuesta inmune (inmunogenicidad) mediante esta vía (Murell et al., 2011).

II.5 Anticuerpos

Todos los organismos unicelulares o pluricelulares tienen mecanismos de defensa contra posibles ataques de patógenos o alguna molécula extraña que sea capaz de inducir una respuesta inmune (denominados también como antígeno, inmunógeno o blanco molecular). Uno de los sistemas más complejos es el que presentan los vertebrados (denominado Sistema Inmune Adaptativo o Adquirido), gracias a que poseen células como los linfocitos T, B y anticuerpos (Bartl et al., 1994).

Estos anticuerpos son moléculas de glucoproteínas, presentes en el suero y fluidos tisulares, llamadas inmunoglobulinas (Igs) que reaccionan específicamente con el antígeno. Estas Igs pueden ser receptores de membrana o estar circulando en el plasma en busca de sus blancos moleculares. Existen cinco tipos de Igs predominantes IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, pero diferentes entre sí en cuanto a tamaño, carga, composición de aminoácidos y contenido de hidratos de carbono (Kumagai & Tsumoto, 2001).

La estructura molecular de las Igs está constituida por dos cadenas polipeptídicas pesadas (H) 50-70 kD y dos cadenas ligeras (L) de 23 kD unidas por enlaces disulfuro (S-S) en forma de Y. Esta se divide en una fracción de unión al antígeno (Fab) y una fracción constante (Fc). La Fab contiene dominios variables pesados (V_H) y ligeros (V_L) y dominios constantes pesados (C_H) y ligeros (C_L). Estos dominios presentan zonas hipervariables, encargadas de la interacción con el antígeno, denominadas CDR1, CDR2 y CDR3 (*Complementarity Determining Region* en inglés), siendo el CDR3 el que presenta una mayor tasa de mutación, con fines de maduración de la especificidad y afinidad por el antígeno para su identificación y neutralización (ver Figura 4) (Kumagai & Tsumoto, 2001; Wesolowski et al., 2009).

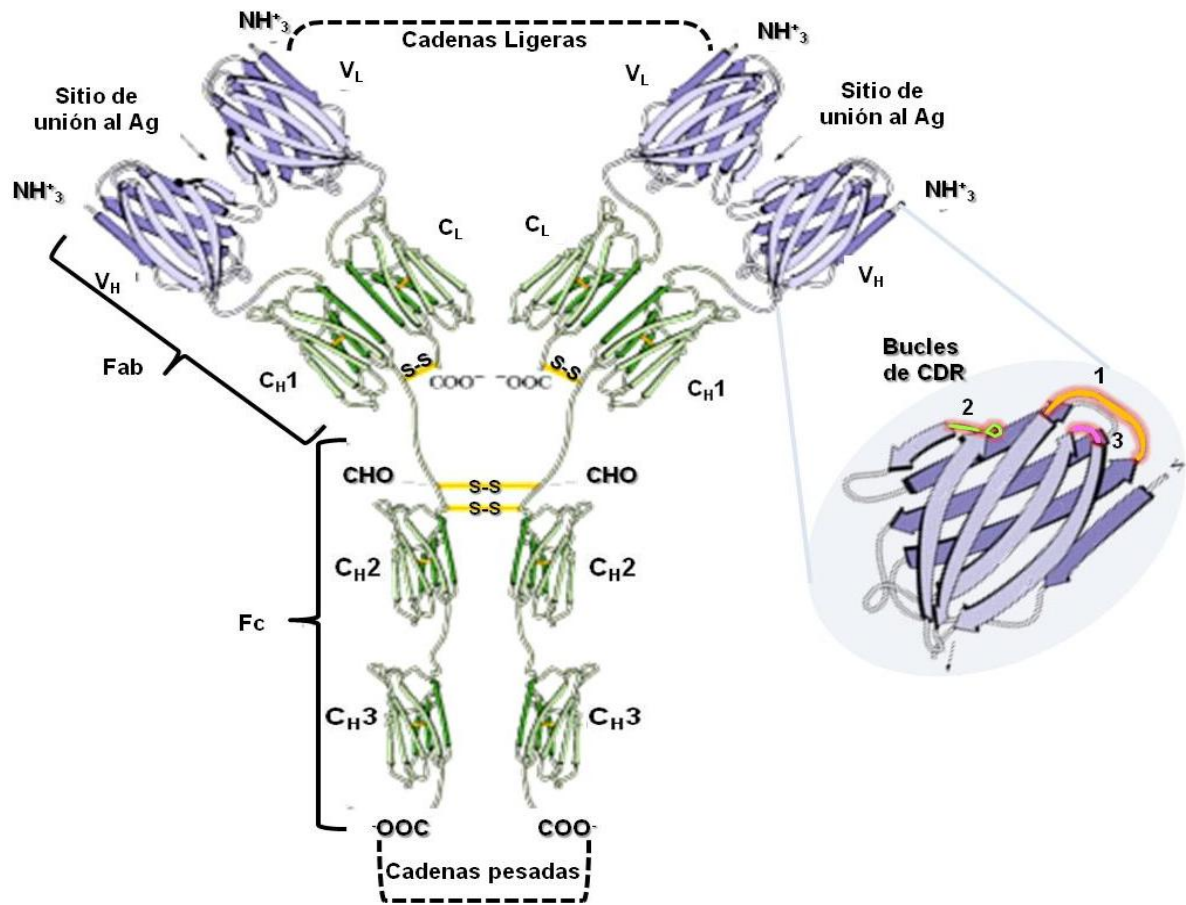


Figura 4. Estructura típica de un anticuerpo. Se muestra las cadenas pesadas y ligeras con sus enlaces disulfuro de residuos Cisteínas (S-S), su fracción de unión al antígeno (Fab) y constante (Fc) y en su región variable (V_L/V_H) se observan los sitios de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) (modificado de Garrett y Grisham, Biochemistry. 2da edición, Saunders College Publishing, 1999).

Hoy en día con las tecnologías de ADN recombinante se han podido modificar los anticuerpos para mejorar su eficiencia. Estos anticuerpos modificados se convierten en excelentes herramientas para el diseño de moléculas de alta especificidad y afinidad con aplicaciones médicas para diagnóstico y terapéuticas (Holliger & Hudson, 2005; Wesolowski et al., 2009).

En relación al campo de diagnóstico, se emplean procedimientos basados en la especificidad de la unión Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) que pueden ser determinados visualmente por varios fenómenos; como precipitación, aglutinación y fluorescencia (Drake et al., 2004).

Entre las técnicas de aglutinación esta la hemoaglutinación directa, esta se produce cuando se añaden antígenos a la superficie de eritrocitos que al estar en presencia de sueros con anticuerpos específicos estos los reconocen y se logra apreciar la formación de agregados de estas partículas, como es el caso para la identificación del tipo sanguíneo. Esta prueba de hemaglutinación requiere de una pequeña cantidad de muestra (10-50 μ L), lo que significa mayor facilidad en la ejecución e interpretación de resultados y ofrece resultados rápidos (Dávila, 2009).

Recientemente se fusionaron anticuerpos específicos a la glicoforina A (glicoA) de células eritrocíticas a diferentes péptidos para detectar al virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 y 2 (VIH 1, 2) con la intención de desarrollar pruebas por hemoaglutinación para este virus (Gupta & Chaudhary, 2006; Shao & Zhang, 2008, Dávila, 2009). Debido a que la glicoA es la proteína más abundante y se encuentra solo en la membrana de los eritrocitos, se elimina la posibilidad de que esos anticuerpos anti-glicoA se unan a otro compuesto celular.

Un nuevo enfoque para la mejora en la eficacia de vacunas, es entregar los antígenos de forma selectiva a las células dendríticas (DC) *in situ*. Debido a que estas células son las centinelas cruciales del sistema inmune adaptativo y presentadoras de antígeno, profesionales en el sistema inmunológico (Steinman, 1991). Las DC tienen la capacidad de iniciar una respuesta inmunitaria, promover tolerancia hacia un antígeno y además determinan el tipo de respuesta inmunitaria que se genera frente a un antígeno, pues ellas determinan la diferenciación de los linfocitos Th naive hacia Th1 (productores de IFN γ , eficaces en la eliminación de patógenos intracelulares), Th2 (productores de IL-4, efectivos en la eliminación de patógenos extracelulares), Th17 (productores de IL-17, implicados en respuestas autoinmunes) o Treg (células T reguladoras, implicadas en procesos inmunosupresores) (Banchereau et al. 2000; Kubach et al., 2005).

Se han llevado a cabo estudios donde anticuerpos modificados mediante complejos inmunogénicos son dirigidos a receptores de células dendríticas,

proporcionando una respuesta inmunológica eficaz para el control de microorganismos patógenos y tumores (Shortman et al., 2009). Los anticuerpos son direccionados a receptores de las células dendríticas como CD11 que con el complejo antigénico N418/Ac cabra (Ac de hámster específico a CD11/Ac de cabra), se obtuvieron títulos de anticuerpos contra el anticuerpo de cabra con una sola dosis de inmunización con concentraciones mínimas de antígeno (Wang et al., 2000). Siguiendo esta estrategia Berry y colaboradores (2003) usaron el mismo receptor CD11 unido a péptidos de DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* en inglés), siendo ambos receptores endocíticos inducen una mejor respuesta inmune al estar involucrados en la internalización de antígenos e interacciones con los linfocitos T. El complejo utilizado le permitió obtener anticuerpos específicos a DC-SIGN en 10 días después de la inoculación en ratones y en otro estudio se inmunizaron ratones con anti-DC-SIGN/KLH (Ac de ratón/Ag toxoide tetánico) obteniendo una mayor respuesta de células T (Kretz et al., 2007)

El desarrollo de vacunas basadas en dirigir antígenos a las células dendríticas tiene como ventajas la posibilidad de no usar adyuvantes y generar una mejor respuesta inmune en un corto tiempo (Beltran, 2006; Shortman et al., 2009).

Recientemente se buscan fragmentos de anticuerpos recombinantes cada vez más pequeños como los fragmentos monovalentes de anticuerpo: Fab (*fraction binding antigen* en inglés), scFv (*single chain variable fragments* en inglés), V_HH (en *heavy chain variable domain* inglés) y vNAR (*variable new antigen receptor* en inglés) que conservan la especificidad de la Ig completa. Estos se pueden producir más económicamente y poseen propiedades únicas para su empleo en una gama de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas (Wesolowski et al. 2009).

II.6 Anticuerpos de tiburón

El sistema inmunológico de los peces cartilaginosos (tiburones, rayas y quimeras) también es un sistema inmune adaptativo, con receptores celulares de células T, receptores MHC I y II y anticuerpos, el cual divergió evolutivamente del sistema de los vertebrados hace ~450 millones de años (Strelsov et al., 2005).

Los anticuerpos que presentan estos peces son las inmunoglobulinas IgW, e IgM con dos cadenas pesadas y ligeras como las Igs humanas. También poseen un anticuerpo inusual del tipo IgNAR (*New Antigen Receptor* en inglés) el cual no es como los descritos para el resto de vertebrados ya que carecen de cadenas ligeras (Greenberg et al., 1995; Dooley & Flajnik 2005).

Los IgNAR están compuestos de dos cadenas pesadas (H) unidas por puentes disulfuro, cinco dominios pesados constantes y dos dominios variables pesados (V_H) (Dooley et al., 2003). Los dominios variables de IgNARs llamados v NAR contienen cuatro regiones conservadas (FR 1-4 en inglés *Framework*) y tres CDRs (en inglés *Complementarity determining regions*) con alta especificidad y afinidad de unión al antígeno. Este tipo de Igs también se ha descrito para los camélidos (camellos, llamas) que cuentan con anticuerpos llamados HCAbs (heavy-chain Antibodies en inglés) que carecen también de cadenas ligeras y la constante pesada 1 (CH1) pero tienen dominios variables pesados V_{HH} (Ferrari et al., 2007) (Figura 5).

Los dominios v NAR tienen sustituciones residuos de aminoácidos hidrofóbicos a hidrofílicos en su región FR2, donde normalmente se formaría la interface entre las regiones variable ligera (V_L) y variable pesada (V_H), lo cual hace a los dominios v NAR más solubles evitando la formación de agregados o precipitados en el medio, una mala biodistribución en el organismo, un comportamiento farmacocinético indeseable e inmunogenicidad *in vivo* (Kerns y Di, 2003). Se ha demostrado que tienen una homología del 90% con las regiones conservadas humanas (C_H) y haciendo unas modificaciones en su FR puede ser

humanizado con una homología del 95-99% para disminuir la inmunogenicidad generada del organismo humano frente a los anticuerpos terapéuticos (Deffart et al., 2009). Es posible su unión a sitios activos de enzimas e inhiben de ese modo su actividad enzimática. Debido a que sus CDR3 son más largos (16-18 residuos) en longitud que aquellos encontrados en humanos (9 residuos) y en ratones (12 residuos), compensan la ausencia de la cadena ligera y siendo más complejos (Nuttall et al., 2004; Deffar et al., 2009).

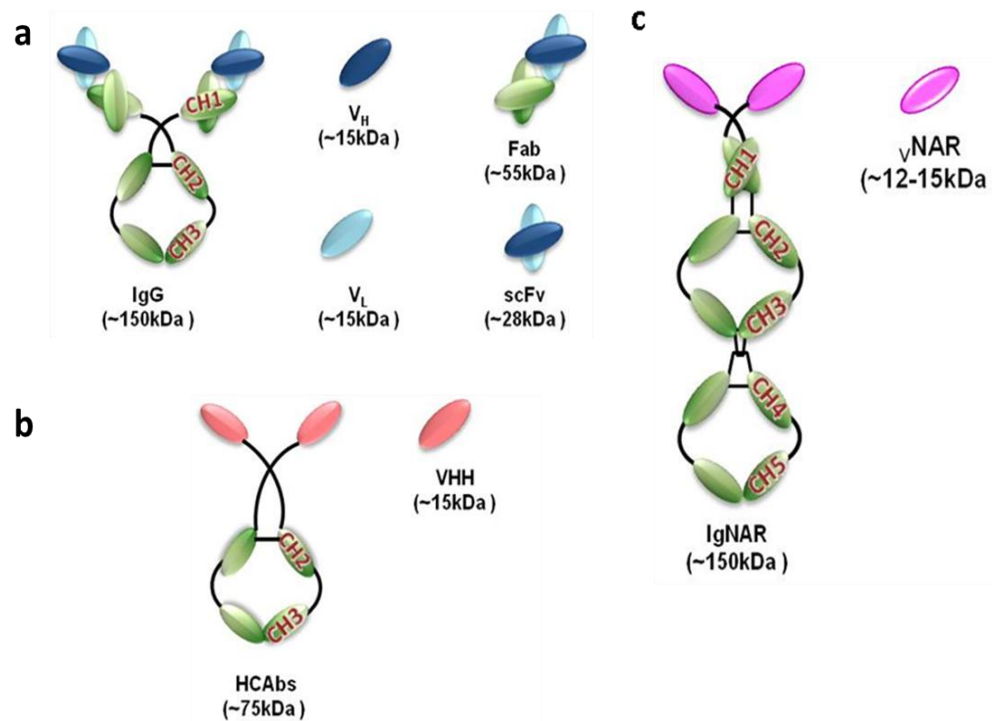


Figura 5. Esquema donde se muestra la estructura y peso molecular en kilodaltones (kDa) de los anticuerpos y sus fragmentos. a) IgG humana como anticuerpo convencional, que contiene tres dominios constantes (CH1-3) y sus dos regiones variables variable pesada= V_H , variable ligera= V_L , dimerizadas para el reconocimiento de antígenos. **b)** La Ig HCAbs de camélidos con sus dos cadenas pesadas, dos regiones constantes y su región variable que despliega sus dominios VHH. **c)** IgNAR de tiburón con dos cadenas pesadas, cinco regiones constantes y su dominio variable v_{NAR} (modificado de Deffar et al., 2009).

Los ν NAR poseen mayor estabilidad debido a enlaces disulfuro que crean estabilidad en la región CDR3 extendida, también son estables a altas concentraciones de urea (350 mM) comparado con los anticuerpos humanos (40-60 mM). Estos dominios de tiburón también tienen una alta estabilidad térmica después de ser sometidos una hora a altas temperaturas (95°C) (Dooley et al., 2003; Liu et al., 2007). Su tamaño es reducido (~12-15 kDa) debido a que sus dominios variables pesados no dimerizan entre sí, funcionando cada uno como un sitio de unión al antígeno, comparados con los fragmentos de anticuerpos convencionales scFv de ~28 kDa o Fab de ~55 kDa, favoreciendo una mayor penetración en tejidos, puede cruzar la barrera sangre-cerebro. Sin embargo, su eliminación de la circulación a través de los riñones, es mayor que los anticuerpos completos que poseen una vida media mayor (Holliger y Hudson, 2005, Wesolowski et al., 2009, Buxbaum, 2010).

Además se demostró la alta afinidad que tienen los ν NAR por sus antígenos al medir la constante de disociación (K_d), que entre menor sea su valor mayor será la afinidad de interacción Ag-Ac. En un estudio un ν NAR capaz de reconocer con una $K_d = 2.2 \times 10^{-9}$ M a la proteína Tom70 (Receptor de traslocasa en la mitocondria humana), en otro estudio se obtuvieron ν NARs específicos a la lisozima de huevo blanco (HEL) con una afinidad de nanomolar (en un rango de 10^{-7} a 10^{-10} M) y gran resistencia a la desnaturalización por calor (Dooley et al., 2003). Nutall y colaboradores (2004) obtuvieron ν NARs específicos contra la lisozima y el antígeno 1 de la membrana apical de *Plasmodium falciparum* (AMA-1) con alta afinidad de 1.31×10^{-7} M y recientemente obtuvieron ν NARs con afinidad a AMA-1 de 5×10^{-9} M (Henderson et al., 2007).

Debido a las características mencionadas de los ν NAR se han realizado estudios para la obtención de fragmentos ν NAR anti-glicoA unidos a receptores específicos (viral y bacteriano) como pruebas de diagnóstico para el VIH y

detección de *mycobacterium tuberculosis* obteniendo una alta eficiencia de detección pruebas de hemoaglutinación (Dávila, 2009; Lugo, 2009).

Así también se ha logrado desarrollar un vehículo de vacunación para equinos dirigido al receptor DC-SIGN de células dendríticas. El vehículo estaba conformado por un fragmento de anticuerpo de tiburón vNAR unido a un anticuerpo anti-HA de ratón sin adyuvantes, el cual generó anticuerpos anti-HA a los 7 días post-inoculación (Beltran 2006).

Por lo tanto en base a sus propiedades particulares los vNARs son moléculas de gran de interés para usarse como nuevas herramientas alternativas en el campo biotecnológico de aplicaciones clínicas.

III. HIPÓTESIS

Los fragmentos de anticuerpos vNAR fusionados al Dominio III de la proteína E del Dengue tipo 3 permitirán desarrollar un método de diagnóstico y una vacuna recombinante contra ese virus.

IV. JUSTIFICACIÓN

El Dengue es un grave problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en México, debido a la presencia de dengue tipo 3 y su relación como causante de dengue hemorrágico. No es posible realizar el diagnóstico específico en los hospitales pequeños o rurales y en laboratorios de rutina, ya que no se cuenta con el equipo necesario para realizar una detección rápida. Con ello se imposibilita poder dar un tratamiento adecuado de la enfermedad, fundamental para la mejora en la calidad de vida de los pacientes. Por ello es necesario mejorar los métodos de diagnóstico, así como las estrategias para erradicar la incidencia del virus mediante vacunas eficaces. En este trabajo proponemos emplear anticuerpos vNAR de tiburón fusionados al dominio III de dengue tipo 3, dirigirlos a la glicoforina A de eritrocitos y al receptor DC-SIGN de células dendríticas para desarrollar una prueba de diagnóstico por hemoaglutinación y una vacuna recombinante contra dengue tipo 3.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

Obtener proteínas quiméricas con fragmentos de anticuerpos vNAR fusionadas al dominio DIII de la proteína E viral de dengue para diagnóstico y vacunación del dengue tipo 3 (D3).

V.2 Objetivos particulares

- Construir un gen quimérico que codifique para un vNAR específico al receptor DC-SING de células dendríticas y el dominio III del D3.
- Construir un gen quimérico que codifique para un vNAR específico a glicoforina A de eritrocitos y el dominio III de D3.
- Clonar, expresar y purificar estas dos proteínas quiméricas recombinantes construidas.
- Evaluar a la proteína quimérica recombinante específica al receptor DC-SIGN, para obtener anticuerpos anti-DIII mediante ensayos de inmunización en ratones.
- Evaluar a la proteína quimérica recombinante específica a glicoforina A, para detectar anticuerpos anti-DIII mediante ensayos de hemoaglutinación.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Genes de interés

El gen viral de la proteína E que contiene la secuencia codificante para el dominio DIII, clonado en el vector pUC57, fue donado por el Dr. Miguel Angel Gómez Lim perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Unidad Irapuato. El gen se conservó a -20 °C.

Los genes de vNARs: AG16 que codifica para el fragmento de anticuerpo que reconoce a la glicoforina A de eritrocitos, clonado en el vector pCOMB3X y G4 que codifica para un fragmento de anticuerpo que reconoce al receptor DC-SIGN de células dendríticas, clonado posiblemente en el vector pHEN2, fueron obtenidos del Laboratorio de Inmunología molecular y toxinas del CICESE, guardados a -20 °C.

Se llevo a cabo un análisis de sitios de restricción en los genes con el programa NEBcutter V2.0 (New england Biolabs™).

VI.2 Cepas Bacterianas

Las cepas bacterianas competentes utilizadas para los procesos de clonación de genes y expresión de proteínas fueron *E.coli* TOP10 y *Ecoli* BL21 (D3) criopreservadas en glicerol a -70 °C. La primera cepa se empleo para los procesos de clonación y preparación de plásmidos debido a que contiene una mutación en el gen *recA*, que codifica para una recombinasa, reduciendo la recombinación indeseada en el ADN clonado, también presenta la mutación *endA1* que produce una forma inactiva de endonucleasa I, reduciendo con esto de la degradación del ADN. La segunda se uso como sistema de expresión de proteínas recombinantes, debido la deficiencia de los genes *OmpT* y *Lon*, que

codifican para la producción de proteasas involucradas en la degradación de proteínas heterólogas.

VI.3 Vectores

Los vectores pBR322 y pCOMB3X-scFv fueron obtenidos del Laboratorio de Inmunología molecular y toxinas del CICESE, estos plásmidos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

El pBR322 se uso para el proceso de unión de genes de origen distinto y con base a su genoma se planeo usar los sitios de corte por las enzimas EcoRI, BamHI y Sall para quitar ese fragmento e insertar en su lugar los genes quiméricos deseados. Para la parte de expresión se empleo el plásmido pCOMB3X-scFv que presenta sitios de corte para la enzima Sfil, permitiendo que los fragmentos digeridos sean ligados en la orientación correcta, consta del promotor lac inducible mediante IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) que se mantiene a concentraciones constantes en el medio conservando la expresión de los genes de interés. También presenta las etiquetas de 6 histidinas (His₆), una de Hemaglutinina (HA) para la purificación y detección de la proteína expresada, un codón de paro ámbar (UAG) que permite apagar la expresión del gen de la proteína siguiente (pIII de un fago filamentoso) que no es de interés para este trabajo (Ver Figura 6).

La secuencia de los plásmidos fue analizada para los sitios de las enzimas seleccionadas en el programa NEBcutter V2.0 (New england Biolabs™).

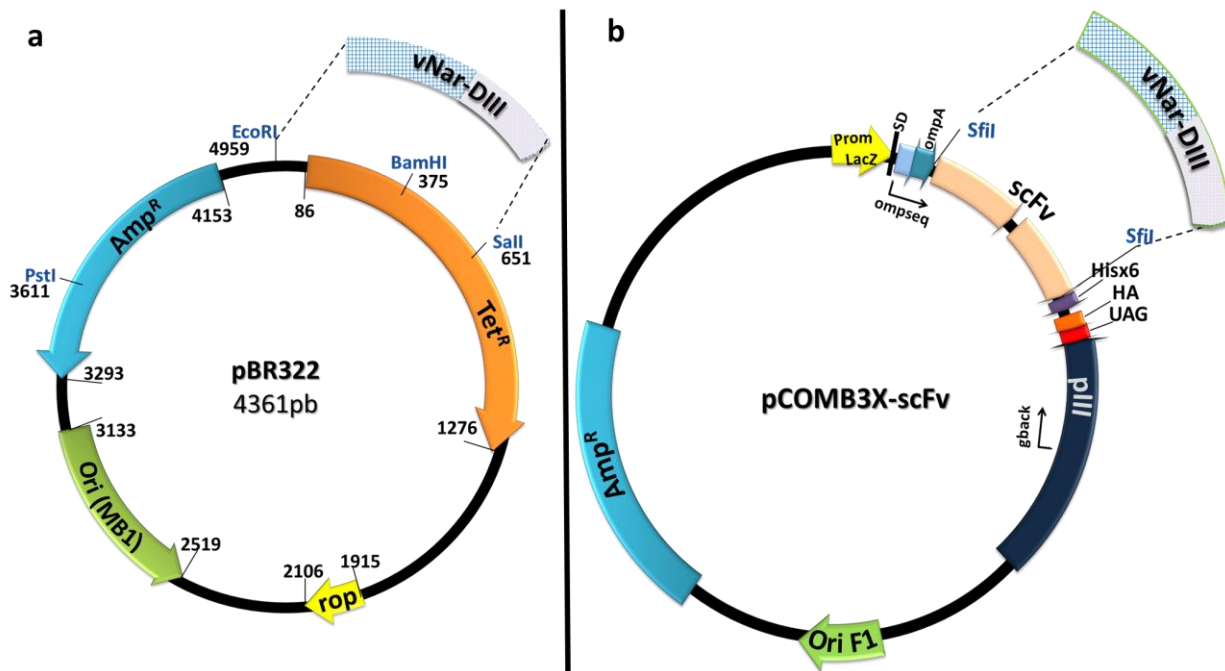


Figura 6. Esquemas de los vectores de clonación y de expresión. a) Genoma pBR322 que presenta los genes de resistencia a ampicilina (Amp^R) y tetraciclina (Tet^R), secuencias de restricción para EcoRI, BamHI y Sall, un gen para la regulación de copias del plásmido (*rop*). **b)** Genoma de pCOMB3X-scFv que presenta el promotor lacZ (Prom LacZ), la secuencia Shine-Dalgarno (*sd*) para regulación de la traducción, la señal de secreción de proteínas (*ompA*), regiones de empalme de oligonucleótidos específicos al vector (*ompseq*, *gabck*), regiones de corte para Sfil, marcadores de secuencia expresada (Hisx6, HA). Un gen que codifica para un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (*scFv*). Las líneas punteadas señalan el lugar seleccionado para la inserción del gen de interés (*vNar-DIII*).

VI.4 Animales de experimentación

En este estudio se emplearon para el bioensayo ratones CD1® (Harlan™) machos de 4-6 semanas de edad, con un peso de 15-18 gramos, alimentados con comida comercial para ratones y agua potable *ad libitum*, mantenidos a temperatura ambiente.

VI.5 Muestras biológicas

Se emplearon sueros de ratones positivos y negativos a DIII, inmediatamente después de la obtención de los sueros estos se almacenaron a -20°C, después fueron conservados a 4°C para el proceso de evaluación. Los eritrocitos humanos usados en los ensayos de hemoaglutinación se mantuvieron en solución de PBS 1X a 4 °C.

VI.6 Obtención de genes quiméricos

VI.6.1 Diseño de oligonucleótidos

A partir de la comparación de secuencia donada del gen DIII (D) con la reportada por Block y colaboradores (2010) se diseñaron los oligonucleótidos For BamHI, RevD3/SalI, ForD3/SfiI y RevD3/SfiI. Las secuencias de los genes vNAR's (AG16= A, G4= G) fueron obtenidas de los trabajos previos de García (2005) y Lugo (2009) para diseñar los oligonucleótidos For563/EcoRI, For559/EcoRI, RevShark/BamHI, For563/SfiI y For 559/SfiI. El diseño se inició por el extremo 5' colocando de 6-8 nucleótidos, enseguida se ubico el sitio de restricción para un enzima de restricción determinada, se continuó con 21-24 nucleótidos complementarios a la secuencia del ADN blanco hacia el extremo 3'. Estos oligonucleótidos se mandaron sintetizar a Allele Biotechnology™ (ver Tabla I).

Tabla I. Secuencias de los oligonucleótidos. El sitio de restricción se muestra en negrita, ▼ indica el sitio de corte, secuencia del ADN blanco se encuentra subrayado.

Nombre	Secuencia	Tamaño de oligonucleótido
For563/EcoRI	5'GATGAT GAATTC <u>GCATTGACGGACCAAACACC</u> 3' EcoRI ▼	32b
For559/EcoRI	5'GATGAT GAATTC <u>ACAAGGGTAGACCAAACACC</u> 3' EcoRI ▼	32b
ForD3/BamHI	5'TCAAAG GGATCC <u>AAGGGAATGAGTTACGCAATG</u> 3' BamHI ▼	33b
RevShark/BamHI	5'TCAAAG GGATCC <u>CACAGTCAGCACGGTGCCAGC</u> 3' BamHI ▼	33b
RevD3/SalI	5'TGGGAA GTCGAC <u>CTTCTGTACCAATTTATAGC</u> 3' SalI ▼	33b
For563/SfiI	5'AGGCGG GGCCAGGCGGCC <u>GCATTGACGGACCAAACACCAAAG</u> 3' SfiI ▼	43b
For559/SfiI	5'AGGCGG GGCCAGGCGGCC <u>ACAAGGGTAGACCAAACACCAAGAGC</u> 3' SfiI ▼	45b
ForD3/SfiI	5'AGGCGG GGCCAGGCGGCC <u>AAGGGAATGAGTTACGCAATGTGC</u> 3' SfiI ▼	43b
RevD3/SfiI	5'GTGGAGCA GGCCGGCCTGGCC <u>CTTCTGTACCAATTTATCTTC</u> 3' SfiI ▼	43b

VI.6.2 Preparación de células electrocompetentes

Se toman células competentes *E. coli* TOP10 o *E. coli* BL21 (D3) con un asa y se siembra en placa con medio LB (Luria Broth) más carbenicilina a [100 µg/mL] para incubarse a 37 °C toda la noche (O/N).

Al siguiente día, tubos con 3 mL de medio SB (Super Broth) fueron inoculados con una colonia aislada de células vírgenes *E. coli* TOP10' o *E. coli* BL21 (D3) de la placa del O/N, se incuban a 37 °C a 300 rpm toda la noche (O/N). Después se inoculó un volumen de 500 mL de medio SB con 3 mL del cultivo del O/N y adicionando glucosa al 20 % (10 mL) y MgCl₂ [1 M] (5 mL) estériles, esto se incubó a 37 °C a 300 rpm hasta una densidad óptica medida a 600 nm de longitud de onda (DO₆₀₀) de 0.7-0.9 leída con un espectrofotómetro SmartSpec®3000 (Bio-

Rad™). Se pasó el cultivo a 6 tubos de polipropileno de 50 mL (estériles y libres de RNasa/DNasa) incubados previamente en hielo dejando 15 min en hielo para después centrifugar a 4,000 rpm por 20 minutos a 4 °C (Centrifuga Multifuge 1_{S-R} Heraeus™), se retiró el sobrenadante para la resuspensión de los pellets con 25 mL de glicerol al 10 % frío (4 °C), agregando primero 10 mL de glicerol para una mejor resuspensión del paquete celular, después se agregó el glicerol faltante manteniendo siempre fríos los tubos, se volvió a centrifugar como se explicó anteriormente, se descarto el sobrenadante y se resuspendió en 50 mL glicerol 10 % para juntar los pellets de dos tubos en un solo tubo, obteniendo así 3 tubos al final, nuevamente esa resuspensión se centrifugó a 4,000 rpm a 4°C por 20 min, se retiro una vez más el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 50 mL de glicerol al 10 % frío (4 °C), juntando los pellets de dos tubos en uno, obteniendo 2 tubos. Se centrifugo nuevamente a las mismas condiciones, se descarto el sobrenadante y resuspendió con 25 mL de glicerol al 10 % frío (4 °C), se junto ambos paquetes celulares, obteniendo 1 tubo el cual después se centrifugó a 3,500 rpm a 4°C por 15 min y con cuidado se retiró el sobrenadante para no tirar las células (observando su deslizamiento por el tubo), con el poco de glicerol restante, se resuspendieron las células pipeteando arriba y abajo lentamente, inmediatamente hacer alícuotas de 50 µL en tubos para microcentrifuga de 600 µL (estériles y libres de RNasa/DNasa) previamente incubados y mantenidos en hielo seco (CO₂, -78 °C). Las alícuotas se guardaron a -70 °C.

Para comprobar que no hubo contaminación se realizó una siembra de 10 µL de las células recién preparadas en placa con medio LB (Luria Broth) más carbenicilina a [100 µg/mL] y se incubó a 37 °C por O/N.

VI.6.2.1 Prueba de Electrocompetencia

Se coloco en hielo el tubo con un plásmido cuantificado previamente, para este prueba se uso pUC 19 [10 pg/ µL], la(s) cubeta(s) para electroporar y la(s)

célula(s) electrocompetente(s), incubándose todo de 10-15 min. Pasado el tiempo correspondiente, se agregaron a los 50 µL de la cepa a utilizar 1 µL del plásmido, se mezcló pipeteando arriba/abajo lentamente y se pasó a la cubeta de electroporación incubando 1 min en hielo, luego se electroporaron las células en un MicroPulser (Bio-Rad™) con el programa Ec2 (2.5 kV, 25 µF, 200 Ω en un tiempo de 4.6-4.7 msec) inmediatamente después se pasó 1 mL de medio SOC (medio SOB con glucosa a 20 mM) a la cubeta de electroporación pipeteando para resuspender las células electroporadas y se combinó con otros 2 mL de medio SOC en un tubo de polipropileno de 50 mL (estéril y libre de RNasa/DNasa) incubándose a 37 °C por 1 h a 250-300 rpm (Shaker 311DS, Labnet™). Pasado ese tiempo, se agregó al tubo 7 mL de medio SB, se homogenizó y sembró 1 µL, 10 µL, 100 µL en placas con agar LB+carbenicilina [100 µg/mL] incubándose a 37 °C O/N. Calculándose la competitividad en colonias por µg de plásmido con la siguiente fórmula:

$$\left\{ \left(\frac{\text{\#colonias}}{\text{Volumen de plaqueo en } \mu\text{L}} \right) \times \left(\frac{1 \times 10^4 \mu\text{L}}{10 \text{pg}} \right) \times \left(\frac{1 \times 10^6 \text{pg}}{1 \mu\text{g}} \right) \right\} = \text{\# de colonias}/\mu\text{g de plásmido}$$

VI.6.3 Construcción de genes quiméricos en el vector pBR322

VI.6.3.1 Amplificación de genes A, G y DIII

Los genes A y G se amplificaron con los pares de oligonucleótidos For563/EcoRI- RevShark/BamHI y For559/EcoRI- RevShark/BamHI respectivamente mediante PCR, las reacciones fueron de 25 µL, mostrándose en las Tablas II y Tabla III los componentes y condiciones de la reacción (previamente se realizó un gradiente de temperatura de 50-60 °C, para obtener esas condiciones). Se realizaron tres reacciones de PCR por gen para obtener una cantidad suficiente de los genes para los siguientes procesos. Al final las reacciones para un mismo gen se juntaron en un solo tubo y se continuó con la

evaluación del tamaño de los fragmentos en un gel de agarosa al 1.8 %-TBE 1X (Tris-Acetato 45 mM, EDTA 1 mM) teñido con 8 μ L de bromuro de etidio [1 mg/mL] (BrEt) y un marcador de peso molecular de 100 pb (Axygen BiosciencesTM). Para el gen D se uso el par de oligonucleótidos ForD3/BamHI- RevD3/Sall para ser clonado en el vector pBR322 al producto obtenido se le nombro D₁.

Tabla II. Componentes y cantidades de la mezcla para la PCR. * Indica la cantidad usada solo para amplificar los genes G y D₁ (con oligonucleótidos para el vector pBR322).L.N= Libre de nucleasas.

Reactivo	Volumen	Concentración final
Buffer GoTaq 5X	5 μ L	1 X
MgCl ₂ 25mM	3 μ L / *4 μ L	3 mM / *4 mM
dNTP's mM	2 μ L	0.2 mM
Oligonucleótido Sentido	0.5 μ L	0.2 μ M
Oligonucleótido antisentido	0.5 μ L	0.2 μ M
GoTaq flexi (5U/ μ L) Promega TM	0.125 μ L	1.25 U
ADN (plásmidos)	1 μ L	3-5 μ g/25 μ L
H ₂ O (L.N)	12.88 μ L / *11.88 μ L	
Volumen Final	25μL	

Tabla III. Condiciones finales de la PCR.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	2 min	1
95 °C	30 s	
50 °C	45 s	30
72 °C	45 s	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	1

VI.6.3.1.1 Purificación de los genes D₁, A y G

Los genes D₁, A y G como producto de las PCR fueron purificados mediante el kit QIAquick PCR Purification (QUIAGEN™) de la siguiente manera para cada gen: Los 70 µL del producto de la reacción se mezclaron con 5 volúmenes (350 µL) de la solución PB, se paso esta mezcla a una columna de sílice colocada previamente en un tubo recolector de 2 mL, se incubo por 1 min y después se centrifugo a 13000 rpm por 1 min, el volumen que paso al tubo recolector se descarto y la columna se coloca nuevamente en mismo tubo. A la columna se le agrego 750 µL de la solución PE y se incubo por 5 min, se centrifugó a 13000 rpm por 1 min y se descarto nuevamente el volumen que pasó al tubo, se regreso la columna al tubo y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Para recuperar el ADN la columna se colocó en un tubo nuevo para microcentrífuga de 1.5 mL (estéril y libre de RNasa/DNasa), se le agregó 30 µL de H₂O destilada (estéril y L.N) a la columna y se dejo incubar por 2 min a T.A., a continuación se centrifugo a 13000 rpm por 1 min. Este último paso se repitió una vez más obteniendo dos tubos por gen purificado. Esta purificación se hizo para eliminar cualquier contaminante que pudiera interferir en los siguientes procesos.

Posteriormente se verifico el producto de purificación en un gel de agarosa al 1.8 %-TBE 1X (Tris-Acetato 45 mM, EDTA 1 mM) teñido con 8 µL BrEt [1 mg/mL] y un marcador de peso molecular de 100 pb (Axygen Biosciences™). La concentración de los genes se obtuvo mediante espectrometría a 260 nm (G&E Healthcare Life Sciences, Nanovue Plus Spectrophotometer™).

VI.6.3.2 Amplificación del vector pBR322

Se siguió el protocolo de la prueba de electrocompetencia para la transformación de *E. coli* BL21 (D3) con el plásmido pBR322. Al día siguiente se prepararon 4 tubos de 15 mL (estériles y libres de RNasa/DNasa) con 3 mL medio SB+carbenicilina [100 µg/mL] cada tubo, de las colonias crecidas en placa se tomo con un palillo estéril una colonia aislada y se dejo caer en uno de los tubos, se

tapo el tubo e incuba a 37 °C, O/N a 300 rpm, se realizo lo anterior para cada uno de los tubos.

VI.6.3.2.1 Extracción del vector pBR322

El plásmido se extrajo basándose en el protocolo kit QIAprep Spin Miniprep (QUIAGEN™) para 1-5 mL de cultivo. El volumen de 3 mL de cultivo crecido O/N se centrifugo a 1300 rpm a T.A., el sobrenadante se descarto y el pellet que se obtuvo se resuspendió en 100 µL de solución GTE (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8) adicionada con RNAsa [0.2 mg/mL], se homogenizo la mezcla con vortex. Después a la mezcla se le agrego 200 µL de 0.2N NaOH 1%SDS, se mezclo por inversión (5 tiempos), se incubó 5 min a T.A. y después 5 min en hielo. Terminado ese tiempo se adiciono 150 µL de 3M KOAC (acetato de potasio-ácido acético pH 4.8), se mezclo por inversión (5 tiempos), se incubo en hielo por 10 min y se centrifugo a 13000 rpm, T.A., 15 min, el sobrenadante (~ 400 µL) se recupero en un tubo nuevo para microcentrífuga de 1.5 mL (estéril y libre de RNasa/DNasa) y se le adicionaron dos volúmenes de Etanol al 100% (EtOH, ~ 800 µL), la mezcla se homogenizo por inversión e incubo a -20°C por 30 min. Luego se centrifugo a 13000 rpm, T.A. por 15 min, el sobrenadante se descarto y se lavo el pellet con 1mL de EtOH 70%. Nuevamente se centrifugo bajo las mismas condiciones descartando el sobrenadante y se dejo secar el pellet con el tubo boca abajo sobre un papel secante. Finalmente se resuspendió el ADN con 30 µL de H₂O destilada (estéril y L.N.) a 30°C.

La evaluación del plásmido fue en un gel de agarosa al 0.8 % TBE 1X (Tris-Acetato 45 mM, EDTA 1 mM) teñido con 8 µL BrEt [1 mg/mL] y un marcador de peso molecular de 1 kb (Axygen Biosciences™). La cuantificación se realizo por espectrometría a 260 nm (G&E Healthcare Life Sciences, Nanovue Plus Spectrophotometer™). Los tubos con el plásmido se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

VI.6.3.3 Digestión y purificación de los genes D₁, A y G y el vector pBR322

Los genes D₁, A, G y el plásmido pBR322 fueron sometidos a dobles digestiones con las enzimas EcoRI, BamHI y Sall (FermentasTM). Se realizaron 3 reacciones de 30 µL por gen y 3 más para el plásmido, en la Tabla IV se muestran los reactivos y cantidades utilizadas para una reacción. La digestión de los genes se incubó a 37°C por 5 h y para digerir el plásmido se incubó por 4 h a 4 °C.

Los productos digeridos de los genes fueron purificados con el kit QIAquick PCR Purification (QUIAGENTM). Para los fragmentos del vector se usó el kit QIAquick Gel Extraction (QUIAGENTM) para lo cual se cargaron los 90 µL de la reacción en un gel preparativo de agarosa al 1.5 %-TBE 1X (Tris-Acetato 45 mM, EDTA 1 mM) teñido con 8 µL BrEt [1 mg/mL] y se corrió a 80 V por 60 min. Se cortó la banda correspondiente al plásmido digerido y se colocó en un tubo para microcentrífuga de 2 mL (previamente pesado), se determinó la cantidad de gel contenida en el tubo (370 mg) y se le agregó 3 volúmenes de la solución QG, el tubo con la mezcla se incubó a 12 min (a 50 °C (resuspendiendo con vortex cada 2-3 min)). Después se agregó la solución a una columna de sílice (colocada previamente en un tubo recolector) y se incubó 1 min a T.A. Luego se centrifugó por 1 min a 13000 rpm, el líquido del tubo recolector fue descartado y la columna se regresó al tubo colector. Enseguida se agregó 500 µL de solución QG y se centrifugó por 1 min a 13000 rpm, nuevamente se descartó el líquido y la columna se colocó en el tubo colector. Se adicionó 750 µL de PE y la mezcla se incubó 5 min a T.A. Concluido ese tiempo se centrifugó por 1 min a 13000 rpm, se descartó el líquido y se volvió a centrifugar 1 min adicional a 13000 rpm. Finalmente la columna se pasó a un tubo nuevo de 1.5 mL (estéril y libre de RNasa/DNasa), se le agregó H₂O destilada (estéril y L.N), se incubó por 2 min a T.A. y centrifugó bajo las condiciones anteriormente utilizadas. En todos los casos el ADN fue eluido con 30 µL de H₂O destilada (estéril y L.N.), estos productos digeridos y purificados se cuantificaron por espectrofotometría y conservaron a -20°C hasta su uso.

Tabla IV. Componentes usados para las reacciones de doble digestión.

Digestión del gen A		Digestión del gen G		Digestión del gen D ₁		Digestión de pBR322	
Reactivo	Vol	Reactivo	Vol	Reactivo	Vol	Reactivo	Vol
Buffer BamHI	3 µL	Buffer BamHI	3 µL	Buffer O	3 µL	Buffer O	3 µL
Gen A	24 µL	Gen G	15 µL	Gen D ₁	24 µL	pBR322	6 µL
EcoRI	2 µL	EcoRI	2 µL	BamHI	2 µL	BamHI	2 µL
BamHI	1 µL	BamHI	1 µL	Sall	1 µL	Sall	1 µL
H ₂ O (L.N)	—	H ₂ O (L.N)	9 µL	H ₂ O (L.N)	3 µL	H ₂ O (L.N)	18 µL
Vol. Final	30 µL	Vol. Final	30 µL	Vol. Final	30 µL	Vol. Final	30 µL

VI.6.3.4 Ligación de D₁ con pBR322

Los fragmentos de ADN digeridos y purificados en el paso anterior fueron ligados en relación molar de 1:3 y 1:5 (vector: inserto) utilizando la enzima ligasa T4 DNA (New england BiolabsTM). El volumen total de cada reacción fue de 10 µL con los componentes descritos en la Tabla V. Las reacciones se dejaron a temperatura ambiente (T.A.) durante 18 h, inactivando la reacción a 70 °C por 10 min. El plásmido resultante se nombro pB-D.

Tabla V. Componentes usados para la reacción de ligación.

Ligación de D ₁ -pBR322 (pB-D)			
Reactivo	1:3	Reactivo	1:5
Buffer [10X]	1 µL	Buffer [10X]	1 µL
pBR322	6.1 µL	pBR322	6.1 µL
D ₁	1.05 µL	D ₁	1.8 µL
T4 ligasa	1 µL	T4 ligasa	1 µL
H ₂ O (L.N)	0.85	H ₂ O (L.N)	—
Volumen Final	10 µL	Volumen Final	9.9 µL

VI.6.3.4.1 Transformación de cepas *E. coli* TOP10 con pB-D

Finalizado el tiempo de inactivación se siguió el protocolo descrito en el apartado VI.6.2.1 usando 1 µL de cada reacción del vector pB-D para transformar por electroporación células *E. coli* TOP10. Se sembró 50 µL y 100 µL de cada reacción en placas con agar LB+carbenicilina [100 µg/mL] incubándose a 37 °C O/N.

Al día siguiente se seleccionaron 10 clones de cada transformación las cuales se resembraron en placa con agar LB+carbenicilina [100 µg/mL], bajo las mismas condiciones de incubación, para continuar con la evaluación mediante PCR de colonia con los pares de oligonucleótidos ForD3/BamHI- RevD3/Sall. Para la PCR de colonia se tomo con la punta de palillo estéril un poco de la colonia, se mezclo moviendo la punta con colonia dentro del tubo que contenía previamente la mezcla correspondiente para PCR (ver Tabla VI para cantidades de reactivos y Tabla III para condiciones de la PCR).

Tabla VI. Componentes y cantidades para la PCR de colonia.

Reactivo	Volumen	Concentración final
Buffer GoTaq 5X	5 µL	1 X
MgCl ₂ 25mM	4 µL	4 mM
dNTP's mM	2 µL	0.2 mM
Oligonucleótido Sentido	0.5 µL	0.2 µM
Oligonucleótido antisentido	0.5 µL	0.2 µM
GoTaq flexi (5U/µL) Promega TM	0.125 µL	1.25 U
Colonia	Una porción de la colonia	
H ₂ O (L.N)	12.88 µL	
Volumen Final	25µL	

De las clonas positivas con el inserto se eligió una para ser sembrada en 3mL medio de cultivo líquido LB+carbenicilina [100 µg/mL], teniendo 6 tubos de cultivo los cuales se incubaron a 300 rpm, 37 °C, O/N. Para su extracción se siguió el protocolo del apartado VI.6.3.2.1, se resuspendió en 30 µL por media hora a 30°C, se corroboró su calidad y purificación mediante gel de agarosa al 0.8 % TBE 1X (Tris-Acetato 45 mM, EDTA 1 mM) teñido con 8 µL BrEt [1 mg/mL] y un marcador de peso molecular de 1 kb (Axygen BiosciencesTM). Se cuantificó por espectrometría como anteriormente se describe.

A continuación se evaluó la presencia del gen D en el vector mediante PCR de plásmidos con los pares de oligonucleótidos ForD3/BamHI- RevD3/Sall (ver Tabla II y Tabla III para reactivos y condiciones). Los tubos con el vector purificado pB-D fueron almacenados a -20 °C hasta su empleo.

VI.6.3.5 Digestión del vector pB-D

Se realizó una doble digestión del plásmido pB-D con las enzimas EcoRI y BamHI (FermentasTM) para 5 reacciones con un volumen final de 30 µL cada una (ver Tabla VII), la digestión se incubó a 37°C por 5 h. La evaluación se realizó cargando todo el volumen de las reacciones en un gel preparativo de agarosa al 1.5 %-TBE 1X (Tris-Acetato 45 mM, EDTA 1 mM) teñido con 8 µL BrEt [1 mg/mL] y se corrió a 80 V por 75 min. Se cortó la banda correspondiente al plásmido digerido, ese segmento de agarosa se colocó en un tubo para microcentrífuga de 2 mL (previamente pesado), se determinó la cantidad de gel contenida en el tubo y se llevó a cabo la purificación con el kit QIAquick Gel Extraction (QUIAGENTM), el plásmido digerido fue eluido con 30 µL de H₂O destilada (estéril y L.N.), se cuantificó por espectrofotometría y almacenó a -20°C hasta su uso (ver apartado VI.6.3.3).

Tabla VII. Componentes usados para una reacción de digestión del vector pB-D.

Reactivo	Volumen
Buffer Tango 2X [10X]	6 µL
pB-D	5 µL
EcoRI	1 µL
BamHI	2 µL
H ₂ O (L.N)	16 µL
Volumen Final	30 µL

VI.6.3.6 Ligación del vector pB-D con los genes A y G

Las reacciones de ligación de pB-D con el gen A y pB-D con el gen G se llevaron a cabo al emplear la enzima ligasa T4 DNA (New England BiolabsTM), nuevamente las relaciones molares usadas fueron 1:3 y 1:5 (vector: inserto) y el volumen de 10 µL para cada reacción (ver Tabla VIII). La ligación se incubó a T.A.

por 18 h, al termino de este tiempo se inactivaron las enzimas a 80°C por 20 min. Los plásmidos obtenidos se nombraron pB-AD y pB-GD.

Tabla VIII. Componentes usados para la reacción de ligación a pB-D. *Se tomaron de diluciones a concentración adecuada para las relaciones molares.

Ligación de pB-D-A (AD)				Ligación de pB-D-G (GD)			
Reactivo	1:3	Reactivo	1:5	Reactivo	1:3	Reactivo	1:5
Buffer [10X]	1 µL	Buffer [10X]	1 µL	Buffer [10X]	1 µL	Buffer [10X]	1 µL
pB-D	1.75 µL	pB-D	1.75 µL	pB-D	1.75 µL	pB-D	1.75 µL
A	0.9 µL	A	1.4 µL	G	1 µL*	G	1 µL*
T4 ligasa	1 µL	T4 ligasa	1 µL	T4 ligasa	1 µL	T4 ligasa	1 µL
H₂O (L.N)	5.35 µL	H₂O (L.N)	4.85	H₂O (L.N)	—	H₂O (L.N)	—
Vol. Final	10 µL	Vol. Final	10 µL	Vol. Final	10 µL	Vol. Final	10 µL

VI.6.3.6.1 Transformación de cepas *E. coli* TOP10 con pB-AD y pB-GD

Después de la ligación 50 µL *E. coli* TOP10 fueron transformadas con 2 µL de cada reacción de ligación bajo las mismas condiciones para la prueba de electrocompetencia (ver VI.6.2.1). Del cultivo líquido se sembró 50 µL, 100 µL y 150 µL en placas con agar LB+carbenicilina [100 µg/mL] incubándose a 37 °C O/N. De las clonas crecidas se seleccionaron 12 clonas por cada ligación para resembrar en placa con agar LB+carbenicilina [100 µg/mL] con las mismas condiciones de incubación.

Se hizo PCR de las colonias resembradas con los pares de oligonucleótidos específicos For563/EcoRI-RevD3/Sall para AD y For559/EcoRI-RevD3/Sall para GD con MgCl₂ 3mM (Ver Tabla VI para reactivos y Tabla III para condiciones).

De las clonas positivas con el inserto se eligieron dos por vector (pB-AD y pB-GD) para ser sembrada en 3mL medio de cultivo líquido LB+carbenicilina [100 µg/mL], teniendo 4 tubos para cada clona. Los cultivos se incubaron a 300 rpm, 37 °C, O/N. La extracción se realizo como en el apartado VI.6.3.2.1, se resuspendió en 30 µL por media hora a 30°C, se corrobore su calidad y purificación mediante gel de agarosa al 0.8 % TBE 1X (Tris-Acetato 45 mM, EDTA 1 mM) teñido con 8 µL BrEt [1 mg/mL] y un marcador de peso molecular. Se cuantifico por espectrometría y los plásmidos se almacenaron a -20 °C hasta su empleo.

Posteriormente se mando a secuenciar una muestra de cada plásmido para verificar la presencia de los genes quiméricos esperados. Las reacciones se prepararon con base a las especificaciones de Seqxcel™.

VI.6.4 Clonación de genes quiméricos y del gen D₂ en el vector pCOMB3X-scFv

VI.6.4.1 Amplificación y purificación de los genes AD, GD y D₂

Los genes AD y GD se amplificaron de los plásmidos obtenidos anteriormente (pB-AD y pB-GD). Los pares de oligonucleótidos usados fueron For563/Sfil-RevD3/Sfil para AD y For559/Sfil- RevD3/Sfil para GD. El gen DIII se amplifico usando el par de oligonucleótidos ForD3/Sfil-RevD3/Sfil al producto de PCR se le nombro D₂ (para ser clonado ahora en el vector pCOMB3X-scFv). Las condiciones de la reacción fueron las mismas para todas las reacciones (ver Tabla II con MgCl₂ 3mM y Tabla III). La evaluación de los productos se realizo en un gel de agarosa al 1.5%-TBE 1X (Tris-Acetato 45 mM, EDTA 1 mM) teñido con 8 µL de BrEt [1 mg/mL] y un marcador de peso molecular de 100 pb (Axygen Biosciences™).

La purificación de las reacciones se realizo mediante el kit QIAquick Gel Extraction (QUIAGEN™) como se describió en el apartado VI.6.3.3 y de igual manera se verifico el producto obtenido de la purificación en un gel de agarosa al

1.5 %-TBE 1X (Tris-Acetato 45 mM, EDTA 1 mM) teñido con 8 μ L BrEt [1 mg/mL] y como marcador del peso molecular 5 μ L de la reacción de PCR sin purificar. Se cuantifico como anteriormente se ha descrito y almaceno a -20 °C.

VI.6.4.2 Amplificación y extracción del vector pCOMB3X-scFv

Se transformaron células *E. coli* TOP10 siguiendo el método descrito en VI.6.2.1 y de las colonias crecidas en placa se hicieron cultivos de 3 mL de medio SB+carbenicilina [100 μ g/mL] para continuar con la extracción de plásmido siguiendo el protocolo usado para la extracción de pBR322 (ver VI.6.3.2.1).

VI.6.4.3 Digestión y purificación de los genes quiméricos AD, GD, del gen D₂ y del vector pCOMB3X-scFv

Para los genes quiméricos AD y GD se llevaron acabo digestiones de 50 μ L con la enzima Sfil (New england Biolabs™). Paralelamente se hizo la digestión del gen D₂ y el plásmido pCOMB3X-scFv, 2 reacciones para D₂ y 6 reacciones para el vector con un volumen de 20 μ L por reacción. Estas reacciones se incubaron a 50°C por 5 h y se inactivaron a 65 °C por 10 min (Ver Tabla IX).

Los fragmentos de los genes se purificaron con el kit QIAquick PCR Purification (QUIAGEN™) y para el vector digerido se uso el kit QIAquick Gel Extraction (QUIAGEN™) (ver apartados VI.6.3.1.1 y VI.6.3.3). La elución de los genes digeridos se hizo con 30 μ L de H₂O destilada (estéril y L.N.) y para los fragmentos del vector se usaron 50 μ L. Estos productos también se cuantificaron y almacenaron a -20°C hasta su uso.

Tabla IX. Componentes usados para la reacción de digestión con la enzima SfiI.

Digestión de pCOMB3X-scFv		Digestión del gen D ₂		Digestión del gen AD o el gen GD	
Reactivo	Vol.	Reactivo	Vol.	Reactivo	Vol.
Buffer B [10X]	2 µL	Buffer B [10X]	2 µL	Buffer B [10X]	5 µL
BSA [10 mg/µL]	2 µL	BSA [10 mg/µL]	2 µL	BSA [10 mg/µL]	5 µL
pCOMB3X-scFv	1.6 µL	D ₂	15 µL	Gen quimérico	39 µL
SfiI HC [40 U/µL]	1 µL	SfiI HC [40 U/µL]	1 µL	SfiI HC [40 U/µL]	1 µL
H ₂ O (L.N)	13.4 µL	H ₂ O (L.N)	—	H ₂ O (L.N)	—
Volumen Final	20 µL	Volumen Final	20 µL	Volumen Final	50 µL

VI.6.4.4 Ligación de los genes quiméricos con el vector pCOMB3X y el gen D₂ con pCOMB3X

La reacción de ligación se llevo a cabo con la enzima ligasa T4 DNA (New england Biolabs™), las reacciones fueron de 10 µL cada, en relación molar 1:3 y 1:5, se tuvo un control positivo (c+) donde se uso el vector digerido y su inserto scFv. Las ligaciones se incubaron a T.A. por 18 h y al final de este periodo se inactivo la reacción 70 °C por 10 min (Ver Tabla X para componentes).

Tabla X. Componentes usados para la reacción de ligación en el vector pCOMB3X-scFv.

*Se tomaron de diluciones a concentración adecuada para las relaciones molares.

AD-pCOMB3X-scFv		GD-pCOMB3X-scFv		D ₂ - pCOMB3X-scFv		c+	
Reactivo	1:5	Reactivo	1:5	Reactivo	1:5	Reactivo	1:3
Buffer [10X]	1 µL	Buffer [10X]	1 µL	Buffer [10X]	1 µL	Buffer [10X]	1 µL
Vector digerido	3.6 µL	Vector digerido	3.6 µL	Vector digerido	7 µL	Vector digerido	3.3 µL
AD	1 µL*	GD	1.2 µL	D ₂	1 µL*	scFv	3.7 µL
T4 ligasa	1 µL	T4 ligasa	1 µL	T4 ligasa	1 µL	T4 ligasa	1 µL
H ₂ O (L.N)	3.4 µL	H ₂ O (L.N)	3.2 µL	H ₂ O (L.N)	—	H ₂ O (L.N)	1 µL
Vol. Final	10 µL	Vol. Final	10 µL	Vol. Final	10 µL	Vol. Final	10 µL

VI.6.4.5 Transformación de cepas *E. coli* TOP10

La transformación de las células bacterianas se llevo acabo usando 2 µL de cada reacción de ligación para electroporar 50 µL *E. coli* TOP10. Se continuó con base al método descrito en VI.6.2.1 y finalmente se sembró 50 µL, 100 µL de cada reacción en placas con agar LB+carbenicilina [100 µg/mL] incubándose a 37 °C O/N.

Las clonas obtenidas fueron resembradas en placa con agar LB+carbenicilina [100 µg/mL] y se incubaron a 37 °C O/N. Después se evaluaron con PCR de colonia usando los oligonucleótidos específicos For563/Sfil-RevD3/Sfil para AD, For559/Sfil-RevD3/Sfil para GD y ForD3/Sfil-RevD3/Sfil para D₂ y además los oligonucleótidos específicos al vector ompseq y gback que se describen su secuencia en la Tabla XI (para el volumen, componentes y condiciones usados ver Tabla VI con MgCl₂ 3mM y Tabla III).

De las clonas positivas con el inserto se eligió dos para ser sembrada en 3mL medio de cultivo líquido LB+carbenicilina [100 µg/mL], y extraer su plásmido en base a los descrito en VI.6.3.2.1. Posteriormente se evaluó mediante PCR de plásmidos (ver Tabla II y Tabla III) la presencia de los genes quiméricos y el D₂ con los mismos oligonucleótidos descritos para el PCR de colonia (ver VI.6.4.5). Los plásmidos obtenidos en esta etapa se nombraron pC-AD, pC-GD y pC-D. Finalmente para corroborar la correcta clonación de los genes de interés se mandaron a secuenciar (SeqxCel™).

Tabla XI. Secuencias de oligonucleótidos ompseq y gback.

Nombre	Secuencia
ompseq	5' AAGACAGCTATCGCGATTGCAG ^{3'}
gback	5' GCCCCCTTATTAGCGTTTGCCATC ^{3'}

VI.7 Obtención de proteínas quiméricas

VI.7.1 Transformación de cepas *E. coli* BL21 (D3)

Se selecciono un plásmido con la secuencia correcta para cada construcción y se transformaron bacterias *E. coli* BL21 (D3) como se describe en VI.6.2.1. Se continuó con la selección y resiembra de colonias, las cuales se evaluaron mediante PCR de colonia como se describe anteriormente (ver VI.6.4.5). Las placas que contenían a las colonias fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso (no más de un mes).

VI.7.2 Expresión y extracción de proteínas quiméricas

Cada construcción de proteínas fue expresada individualmente en 2 L de medio de cultivo SB+carbenicilina [100 µg/mL] basándose en el siguiente protocolo: Se preparo cuatro inóculos de 5 mL de medio SB+carbenicilina [100 µg/mL], cada uno con una colonia positiva e incubo a 37 °C, O/N a 300 rpm. Al día siguiente se vació 5 mL del cultivo O/N en cada 500 mL medio SB+carbenicilina [100 µg/mL], se coloco en agitación a 300 rpm, a 37 °C hasta una DO de 0.6 (0.4-0.8) leída a 600 nm. Después se adiciono 1 mL de IPTG [0.5M] para una concentración final de [1mM] por cada 500 mL del cultivo, se incubó por 6 h mismas condiciones. Posteriormente, se centrifugó el cultivo en tubos de 50 mL (estériles y libres de RNasa/DNasa) a 4,400 rpm por 20 min a 4 °C, se descarto el sobrenadante, obteniendo en cada tubo el pellet de 100 mL de cultivo. Los pellets celulares se guardaron a 4 °C para continuar inmediatamente con el proceso de extracción.

La extracción se realizó por choque osmótico con base al protocolo para proteínas periplásmicas con etiquetas Hisx6 de The QIAexpressionist™. Se resuspendió el pellet de cada tubo con 50 mL de solución fría de 30mMTris.Cl, 20 % sacarosa pH 8.0, se pasaron a un recipiente el cual se mantuvo incubado sobre hielo, inmediatamente se le adiciono por goteo EDTA [500 mM] para concentración final [1mM], los pellets resuspendidos fueron incubados por 10 min con agitación ligera. Finalizado ese tiempo se regreso el volumen a los tubos para centrifugarse a 8000 x g a 4 °C por 20 min, el sobrenadante fue descartado y ahora el pellet fue resuspendido con MgSO₄ [5 mM] frío, agitando en hielo por 10 min. Después se centrifugo a las mismas condiciones, el sobrenadante se recupero y almaceno a -20 °C ya que es el fluido que contiene las proteínas periplásmicas denominado sobrenadante 2 (S2).

Las proteínas quiméricas se continuaron nombrando como los genes quiméricos AD, GD y DIII para la proteína recombinante D₂.

VI.7.3 Purificación, análisis y cuantificación de proteínas quiméricas

VI.7.3.1 Purificación

La purificación se realizó mediante una cromatografía de afinidad a metales inmovilizados, con una matriz de Ni-NTA (níquel-ácido nitrilotriacético) para purificación de proteínas con etiqueta-6xHis de QUIAGEN™. Se usaron dos columnas de plástico con 1 mL de la matriz Ni-NTA cada una, se dejó asentar la matriz y se procedió a equilibrar cada columna adicionando 15 mL de buffer de lavado ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 50 mM, NaCl 300mM, Imidazol 20 mM, pH 8.0), ya equilibradas se comenzó a pasar el S2 por gravedad 4 °C (1-2 veces). En seguida se adicionó a cada columna 15 mL de buffer de lavado y se prosiguió con la elución de la proteína para esto se colocó el tapón a las columnas y se agregó a cada una 500 μL de buffer de elución ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 50 mM, NaCl 300mM, Imidazol 250 mM, pH 8.0) incubando 5 min y después se colectó la solución en un mismo tubo de 2 mL para microcentrífuga (estéril), este procedimiento se repitió 5 veces.

Para corroborar la presencia de nuestras proteínas de interés se tomó una muestra en cada paso de la purificación para análisis en un gel SDS-PAGE (gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) al 12% y un Western Blot.

VI.7.3.2 SDS-PAGE

Para el SDS-PAGE 20 μL de cada muestra se resuspendieron en 20 μL de buffer de carga 2X (Tris-HCl 125 mM, SDS 4% (p/v), glicerol al 20 % (v/v), β -mercaptoetanol 10 % (v/v), azul de bromofenol 0.004 %) y se desnaturalizó por 10 min a 95 °C. Se cargaron en el gel los 40 μL de cada muestra y 10 μL del marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards de Bio-Rad™). El gel se corrió a 150 Volts, 500 mA constantes por ~3 h, una vez transcurrido el tiempo se tiñó con azul de Comassie. Para desteñirlo, se usó una solución de metanol 40 % y ácido acético 10 %, aplicándose el proceso de desteñido hasta que se observaron las bandas proteicas. El gel fue colocado sobre un papel filtro previamente humedecido en H_2O destilada y se cubrió con un

pedazo de acetato para ser secado al vacío por 1.5 h a 80 °C (Gel Dryer, Bio-Rad™).

VI.7.3.3 Western-blot

Paralelamente al paso anterior se realizó otro gel SDS-PAGE bajo las mismas condiciones descritas y muestras sin embargo este no es teñido. Las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot Medium de 0.45 µm Bio-Rad™), usando un buffer de transferencia Towbin 1X (Tris-Base 250 mM, Glicina 192 mM, metanol 20% (v/v) , pH 8.3) con un sistema de transferencia Semi-Dry Electrobloetter a 200 mA constantes 20 V máximo por 1 h.

A continuación se realizó la inmunodetección colocando la membrana en un recipiente con 30 mL de la solución bloqueadora PBS 1X-T-Svelty 5% (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM--Tween-20 0.05 % (v/v), pH 7.4 –leche descremada 5% (p/v)) incubando O/N a 4 °C con agitación moderada. Después se descartó la solución de bloqueo y se enjuagó la membrana para incubar con el anticuerpo Anti-HA unido a peroxidasa de rábano, diluido 1: 1000 en PBS 1X-T-Svelty 1% 2 h a T.A con agitación moderada. Pasado ese tiempo se hicieron 4 lavados con PBS 1X-T de 5 min cada uno, con agitación. Finalmente se agregó el cromógeno TMB (tetrametil bencidina) como revelador, se agitó lentamente y espero a coloración. La reacción paro con H₂O destilada, después la membrana se pasó sobre papel secante y analizo.

VI.7.3.4 Diálisis y cuantificación

El volumen obtenido de cada proteína fue dializado con una membrana de celulosa (Regenerated Cellulose Dialysis Tubing 33 mm: 6000-8000 Da, Fisherbrand™) durante 16 h a 4 °C, en agitación moderada constante y con dos recambios de PBS 1X para obtener las proteínas de interés en una solución de PBS 1X. La concentración de cada proteína obtenida se cuantificó mediante el Kit Protein assay de Micro BCA® ROCHE™ en placa de ELISA, después de su diálisis.

VI.8 Bioensayos

VI.8.1 Ensayo de Vacunación con la proteína quimérica GD

El la dosis para inmunización se baso conforme a Berry y colaboradores (2003) para conjugados de proteínas dirigidos a células dendríticas. Se tuvo tres grupos de 4 ratones denominados G1, G2 y G3. El grupo G1 se inmunizo con 2 µg de la proteína quimérica GD en PBS 1X (a un volumen final de 200 µL) la mitad vía subcutánea y la otra vía intraperitoneal (v.i, v.sc), el grupo 2 se inmunizo con 2 µg de la proteína D₂ en PBS 1X (mismo volumen final) mitad v.i y mitad v.sc, el grupo G3 fue el grupo control inmunizado con PBS 1X mismas condiciones.

Los ratones se sangraron antes de la inmunización y durante 15 días continuos post-inmunización, también se obtuvieron sueros a los 25, 46 días post-inmunización, las muestras de sangre colectadas fueron centrifugadas a 8000 rpm T.A por 5 min. Se retiro el suero y fue guardado a -20 °C hasta su análisis.

VI.8.1.1 Evaluación de IgG-anti DIII presentes en los sueros

Se analizo la producción de anticuerpos IgG en los sueros obtenidos de los ratones, mediante una ELISA (Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a enzimas), en la cual se colocó 500 µg/ pozo de la proteína D₂ (antígeno) en 50 µL PBS 1X, sellando e incubando a 37 °C por 2 h. Después se desechó la solución de la placa, bloqueándose cada pozo con 150 µL de BSA 3 %-PBS 1X sellando e incubando por 2h. Pasado ese tiempo se descartó la solución bloqueadora y se agregó 50 µL de las diluciones 1:100 en BSA 3%-PBS 1X de los sueros obtenidos por cada grupo, se incubo a 4 °C, O/N, para después descartar la solución. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1X-T, para después añadir 50 µL de anti-ratón IgG de ratón marcado con peroxidasa (dilución 1:1000 en BSA 1%-PBS 1X), incubándose a 37°C durante 2 h. Se desechó el líquido y realizaron 3 lavados con PBS 1X-T. Finalmente se colocaron 50 µL sustrato de peroxidasa ABTS®, se tapo

la placa e incubó 30 min a 37 °C para ser leída a 405 nm en un lector de placas de ELISA (Microplate reader Benchmark de Bio-Rad™).

VI.8.2 Ensayo de Hemoaglutinación con la proteína quimérica AD

VI.8.2.1 Extracción y lavado de eritrocitos

Se extrajo 5 mL de sangre periférica humana por punción venosa, esta muestra de sangre se transfirió a un tubo de 15 mL (estéril), inmediatamente se le adiciono 10 mL de PBS 1X, se homogenizo por inversión y se centrifugó a 2500 rpm por 2 min a T.A, el sobrenadante se retiro cuidadosamente y se repitieron 2 veces más los lavados. Se tomaron aproximadamente 0.5 mL del paquete celular resultante, el cual se resuspendió con 8 mL de PBS 1X. Se almacenó a 4 °C para su conservación.

VI.8.2.2 Ensayo de hemoaglutinación con sueros de ratón

Se realizaron ensayos con los sueros S15, S16, S17 para determinar los volúmenes adecuados a usar, resultando en los siguientes: En una placa de ELISA fueron cargados en cada pozo 30 µL de los eritrocitos diluidos en PBS 1X (del paso anterior), 10 µL de la proteína quimérica AD y 20 µL de los sueros del día 46 post-inmunización obtenidos de los ratones inmunizados. La mezcla se dejo reposar por 30 min para después documentar los resultados mediante fotografías macroscópicas y microscópicas. En el ensayo se tuvo un control negativo (c-) que fue un suero preinmune y un control (+) usado en el laboratorio (la proteína ESAT-6 con su respectivo suero positivo a VIH).

VI.9 Análisis Estadístico

Los datos fueron evaluados estadísticamente (Statsoft Statistica 8™ para Windows™) con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de un prueba de comparaciones múltiples (prueba Tukey). Se consideró diferencia significativa con valores de $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

VII.1 Construcción de genes quiméricos en el vector pBR322

VII.1.1 Amplificación de genes A, G y D₁

De la amplificación por PCR se obtuvieron los genes con los tamaños esperados (Figura 7). En el caso del gen A (codificante del vNAR AG16 para el ensayo de hemoaglutinación) se observa una banda de 366 pb, 12 pb correspondientes a los sitios de restricción adicionados a los extremos. El gen G (codificante del vNAR G4 para el ensayo de vacunación) se obtuvo de 351 pb incluyendo las bases para los secuencias de restricción en sus extremos. Los sitios de restricción agregados a ambos genes (A y G) fueron para las enzimas EcoRI (extremo 5') y BamHI (extremo 3'). El fragmento del gen E codificante para el D₁, que es el dominio DIII del virus del dengue con extremos de corte para BamHI (extremo 5') y Sall (extremo 3') fue de 312 pb, al igual que los genes anteriores tiene 12 pb que pertenecen a sitios de restricción.

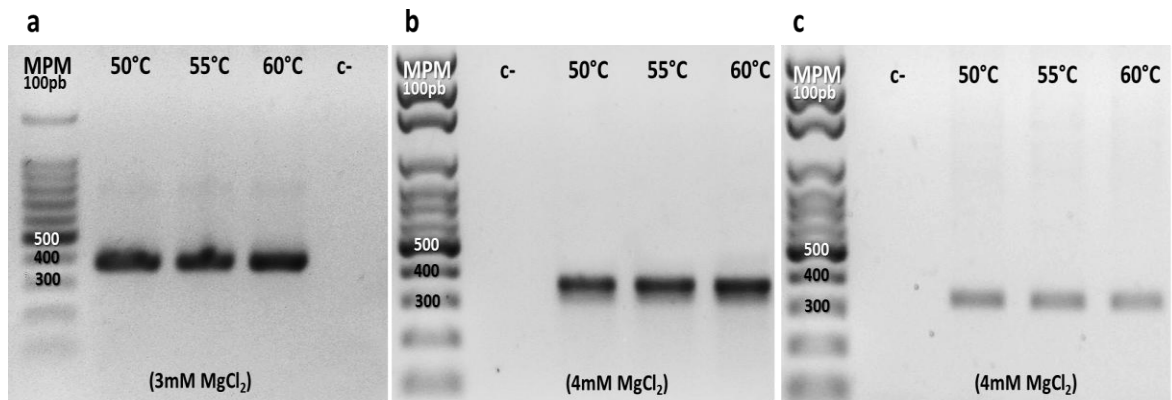


Figura 7. Amplificación de genes para clonación en pBR322. a) Gel de agarosa al 1.8%-TBE 1X muestra los resultados del PCR con gradientes de temperaturas. a) Amplificación del gen A, b) Bandas del gen G, c) Gen codificante de D₁, cada gen se muestra con su respectivo control negativo (c-) y Marcador de peso molecular (MPM).

VII.1.2 Digestión de genes y del vector pBR322

Los resultados de la digestión son mostrados en la Figura 8 donde son apreciadas las bandas esperadas con respecto al tamaño de los genes. Por otro lado en la Figura 9 se muestra el fragmento de mayor tamaño del vector pBR322 (4.1 kb) para la digestión con BamHI y Sall, sin embargo no es posible apreciar claramente el fragmento de relleno.

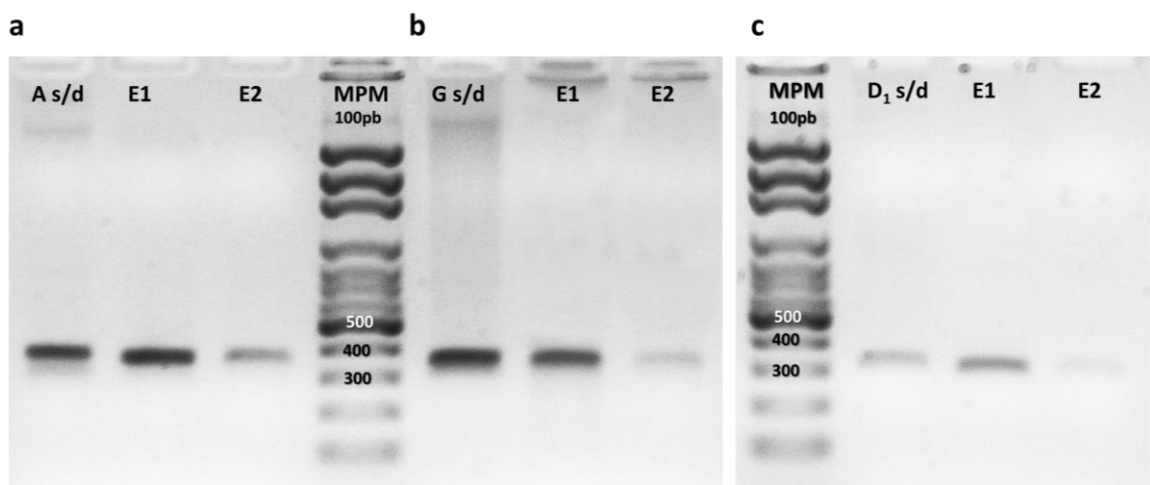


Figura 8. Digestión de genes A, G y D₁. Gel de agarosa al 1.8%-TBE 1X muestra los fragmentos sin digerir (s/d) de cada gen y los obtenidos después de su digestión y purificación. **a)** A s/d=gen A sin digerir, E 2-3=eluciones digeridas con EcoRI-BamHI, MPM=marcador de peso molecular **b)** G s/d=gen G sin digerir, E 2-3=eluciones digeridas con EcoRI-BamHI **c)** D₁ s/d gen DIII sin digerir, a continuación E 2-3=eluciones con el fragmento digerido por BamHI-Sall.

La concentración de los genes digeridos después de su purificación en un volumen de 30 μ L fue: 30.5 ng/ μ L del gen A, 75.5 ng/ μ L de G y 21 ng/ μ L para D₁. Resultando en un 90-95% de la concentración inicial, mientras para el vector la concentración fue de 15.7 ng/ μ L en 30 μ L representando esto el 5 % del total digerido.

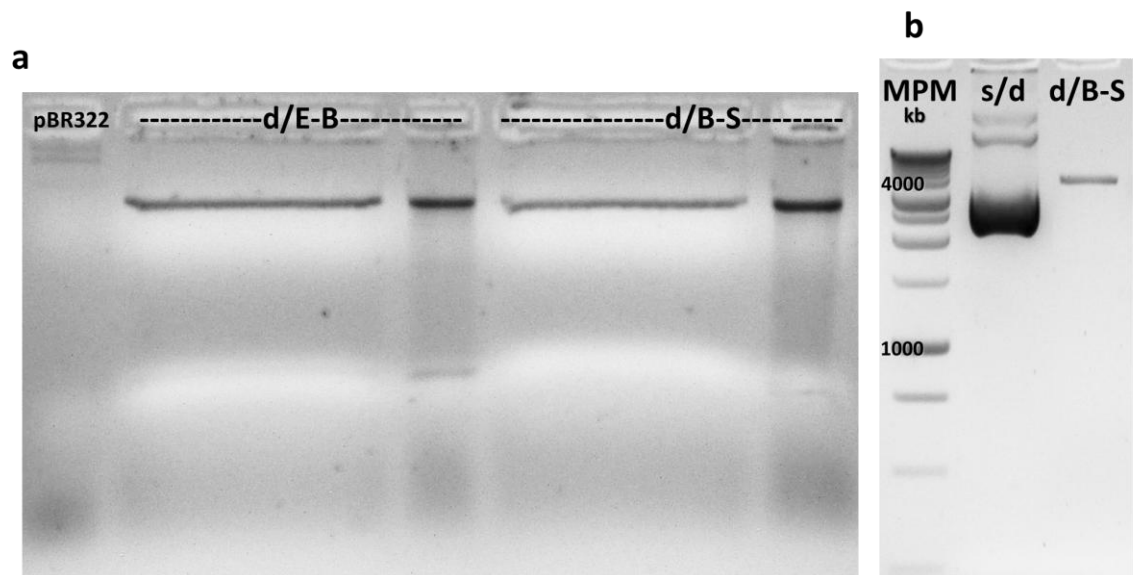


Figura 9. Digestión del vector pBR322. a) Gel preparativo de agarosa 1.5 % TBE 1X con pBR322 digerido previo a su purificación, pBR322=vector sin digerir, d/E-B=fragmentos de la digestión con EcoRI-BamHI, d/B-S =fragmentos resultantes del corte con BamHI-Sall. b) Gel de agarosa 1.5% con el vector digerido y purificado, MPM=marcador de peso molecular, s/d=pBR322, d/B-S=fragmento de mayor tamaño purificado del corte con BamHI-Sall.

VII.1.3 Búsqueda de colonias positivas con pB-D y Digestión de pB-D

De la ligación a relación 1:3 y 1:5 se obtuvieron colonias crecidas en todas las placas. El resultado del PCR de colonia nos muestra que las analizadas contenían el plásmido pB-D con el inserto D₁ de 312 pb (Figura 10) pero solo la clona 2b fue seleccionada para obtener el plásmido pB-D, el cual al ser digerido con las enzimas EcoRI y BamHI dio como resultado el tamaño del fragmento esperado (4 kb) mostrado en la Figura 11. Esto nos permitió continuar con la inserción de los genes A y G (Figura 8) en el vector pB-D.

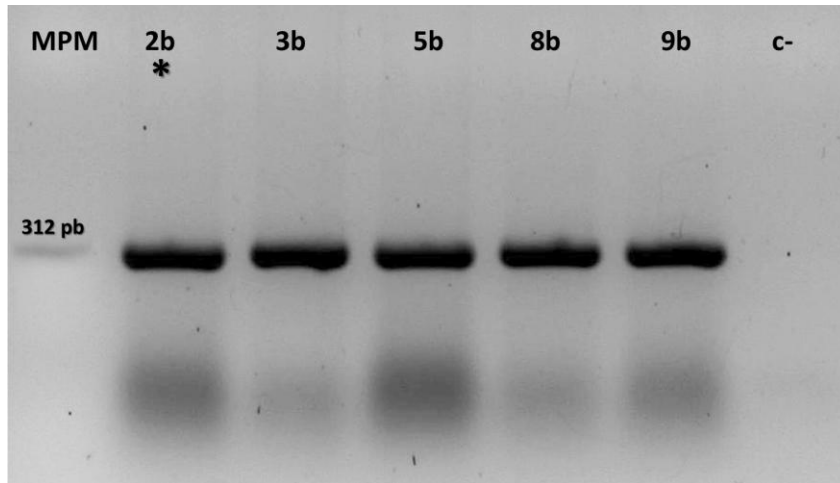


Figura 10. Colonias transformadas con pB-D. Gel de agarosa 1.5 %-TBE 1X. MPM=el gen D₁ del paso VII.1.1 como marcador de peso molecular, 2b-5b clonas analizadas, c-=control negativo. * Indica la clona seleccionada para obtención del plásmido pB-D.

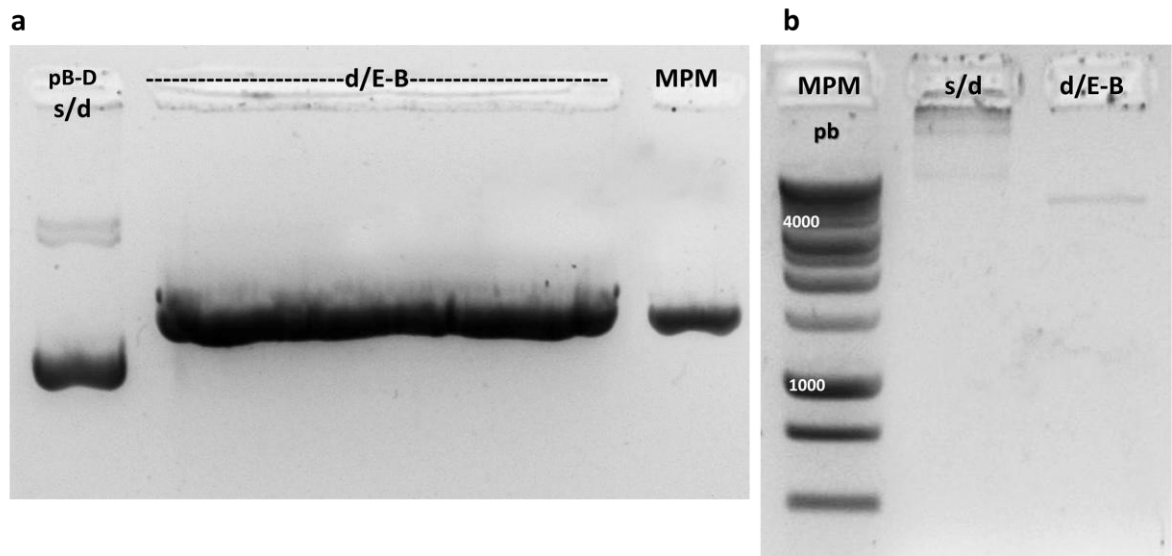


Figura 11. Digestión de pB-D con las enzimas EcoRI y BamHI. a) Gel preparativo de agarosa 1.5% TBE 1X de pB-D previo a purificar, pB-D s/d=plásmido sin digerir, d/E-B=pB-D digerido con EcoRI-BamHI, MPM=pB-D digerido en ensayos previos como marcador de peso molecular. b) Gel de agarosa 1.5% TBE 1X de pB-D digerido y purificado, s/d=pB-D sin digerir, d/E-B=fragmento pB-D purificado.

VII.1.4 Búsqueda de colonias positivas con AD y GD en pBR322

De las colonias transformadas con AD se obtuvieron 2 clonas con un inserto de tamaño ideal (672 pb). En cuanto a GD se obtuvieron 3 colonias positivas con un inserto por arriba de los 600 pb sin embargo para el siguiente proceso solo fue seleccionada aquella con el inserto de 657 pb (Figura 12).

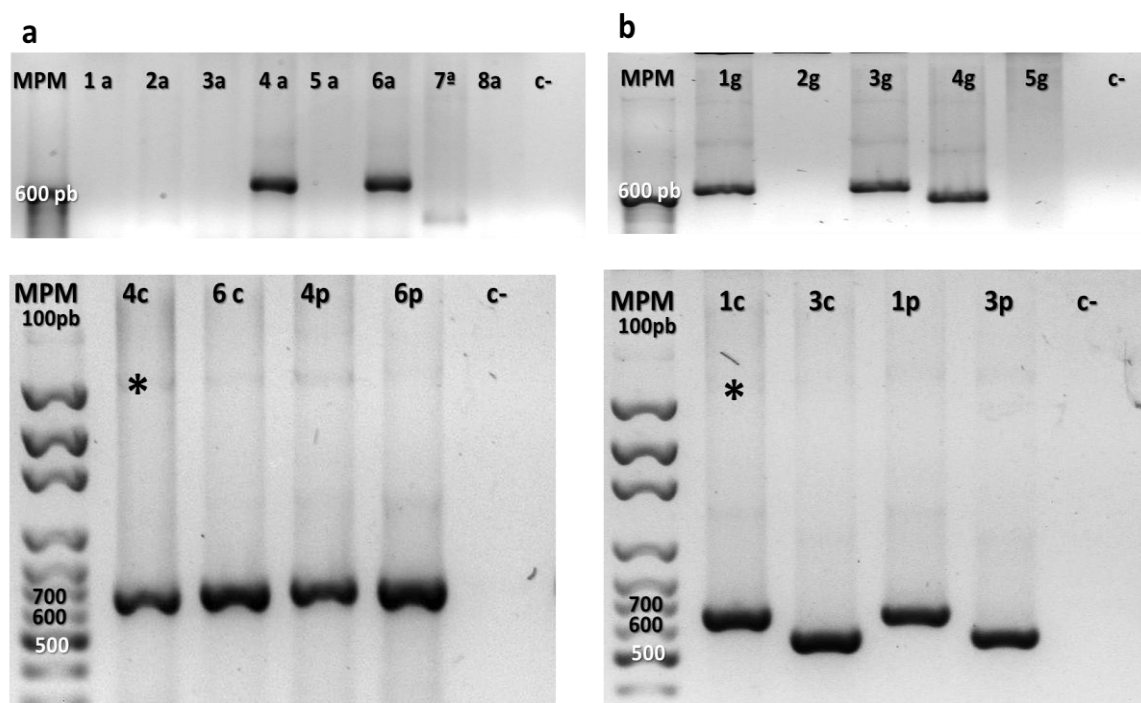


Figura 12. PCR para búsqueda de genes quiméricos clonados en pBR322. a) Arriba evaluación de colonias para AD, MPM=marcador de peso molecular, 1a-8a clonas, c-=control negativo. a) Abajo análisis de las 2 colonias positivas (4c, 6c) y sus plásmidos (4p, 6p) con oligonucleótidos con extremos EcoRI-Sall b) Arriba análisis de colonias para el gen GD, 1g-5g clonas, c-=control negativo. b) Abajo Amplificación de GD, 1c y 3c=colonias positivas, 1p y 3p=plásmidos de las clonas positivas 1c, 3c. *Indica la clona seleccionada para su clonación en pCOMB3X-scFv.

VII.2 Clonación en pCOMB3X-scFv

VII.2.1 Amplificación y digestión de genes quiméricos AD, GD, el gen D₂ y el vector pCOMB3X-scFv

Después de comprobar la adecuada secuencia de los genes AD, GD y D₂ se continuo con su amplificación usando los oligonucleótidos diseñados con la secuencia para Sfil nos dieron las bandas esperadas: 698 pb para AD incluyendo ya sus 26 pb correspondientes a los sitios de restricción, 683 pb para GD y pb 326 D₂ (gen DIII con secuencias para la enzima Sfil adicionadas en los extremos) (Figura 13a).

La purificación por gel de los genes previo a la digestión permito eliminar cualquier banda inespecífica que interfiriera en los siguientes procesos y se observo claramente los tamaños adecuados para cada gen (Figura 13.b). En el caso del vector se observo la banda del fragmento de relleno (scFv) con el tamaño esperado de 750 pb y otras bandas cercanas al tamaño esperado (~3.4 kb) por lo cual se dio un mayor tiempo de corrida (1.5 h).

Las concentraciones obtenidas en 30 µL fueron: 146.5 ng/µL para AD, 46.5 ng/µL de GD y 122 ng/µL del gen D₂ sin embargo, la cantidad recuperada del vector fue baja (13.8 ng/µL) resultando en el 4% del total digerido por lo que se realizo una 2da digestión obteniendo una concentración mayor de 28 ng/µL, esas cantidades fueron suficientes para llevar a cabo las construcciones deseadas: AD-pCOMB3X (AD), GD-pCOMB3X (GD) y D₂-pCOMB3X (DIII).

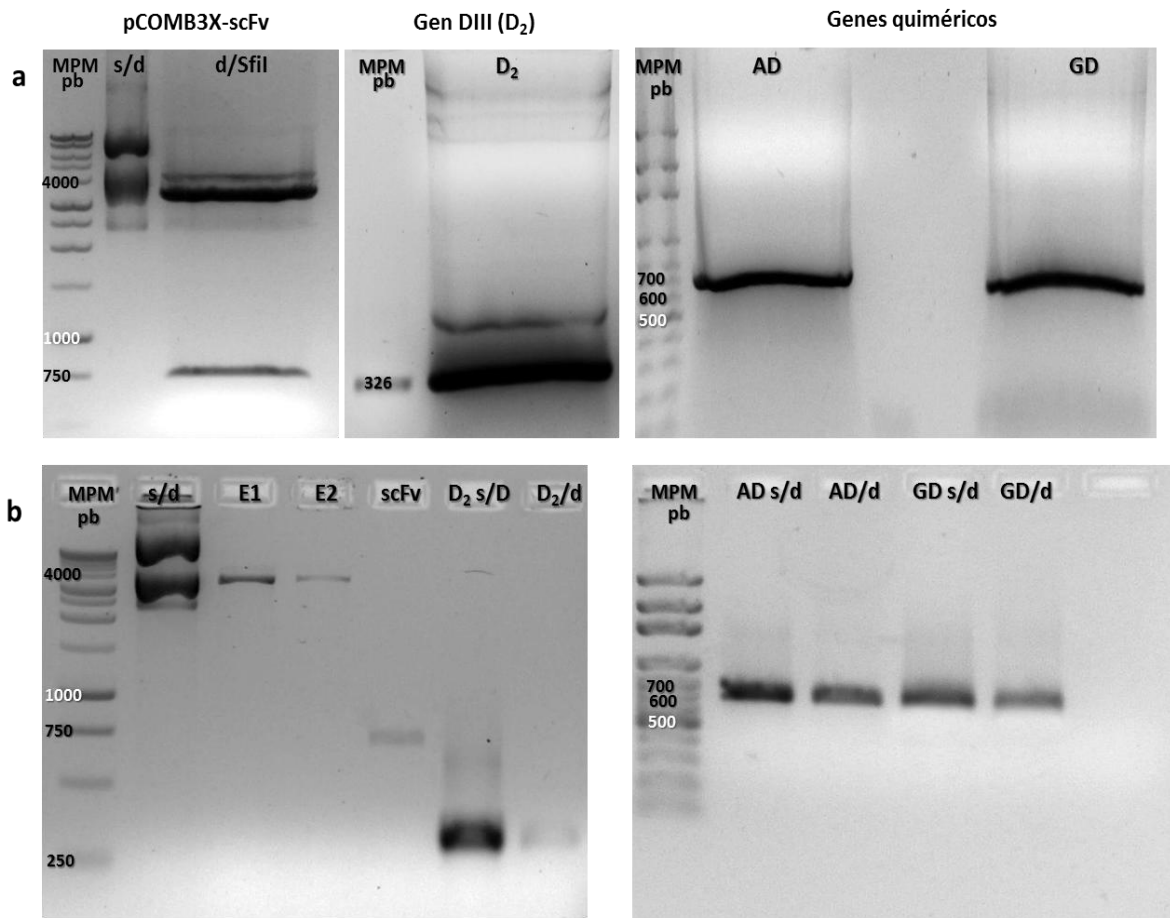


Figura 13. Genes quiméricos, gen D₂ y pCOMB3X-scFv. a) Arriba (izq-der) Evaluación de la digestión del vector pCOMB3X-scFV, MPM=marcador de peso molecular (MPM), s/d=vector sin digerir, d/Sfil=fragmentos del vector después del corte con Sfil. Al lado Gel con DIII amplificado con oligonucleótidos con sitios de restricción para Sfil (D₂) y Gel con genes quiméricos AD GD amplificados con sitios de corte para Sfil previo a su purificación. b) (izq-der) Resultados de la purificación del vector pCOMB3X-scFV y D₂ digeridos previamente, s/d=plásmido sin digerir, E1-E2=fragmento pCOMBB3X purificado, scFv=fragmento que se quitó del plásmido o fragmento de relleno, D₂ s/D=DIII sin digerir, D₂/d=DIII digerido con Sfil y purificado. Al lado Gel con genes quiméricos AD y GD antes (AD s/d y GD s/d) y después de la reacción de digestión (AD/d y GD/d).

VII.2.2 Búsqueda colonias positivas con AD, GD y DIII

Se obtuvo un bajo número de clonas transformadas (8-10 por placa) para los genes quiméricos no así para la transformación con D₂. El resultado de las colonias analizadas demostró que 5 eran positivas al inserto AD con un tamaño de 698 pb ya incluidos los sitios de corte para Sfil. En el caso de GD se obtuvo una sola clona con el inserto de 653 pb correspondiendo 26 pb a los sitios de restricción (Figura 14). De las colonias resembradas para DIII se obtuvieron 2 positivas al fragmento de 326 pb con sitios de corte para Sfil (Figura 15).

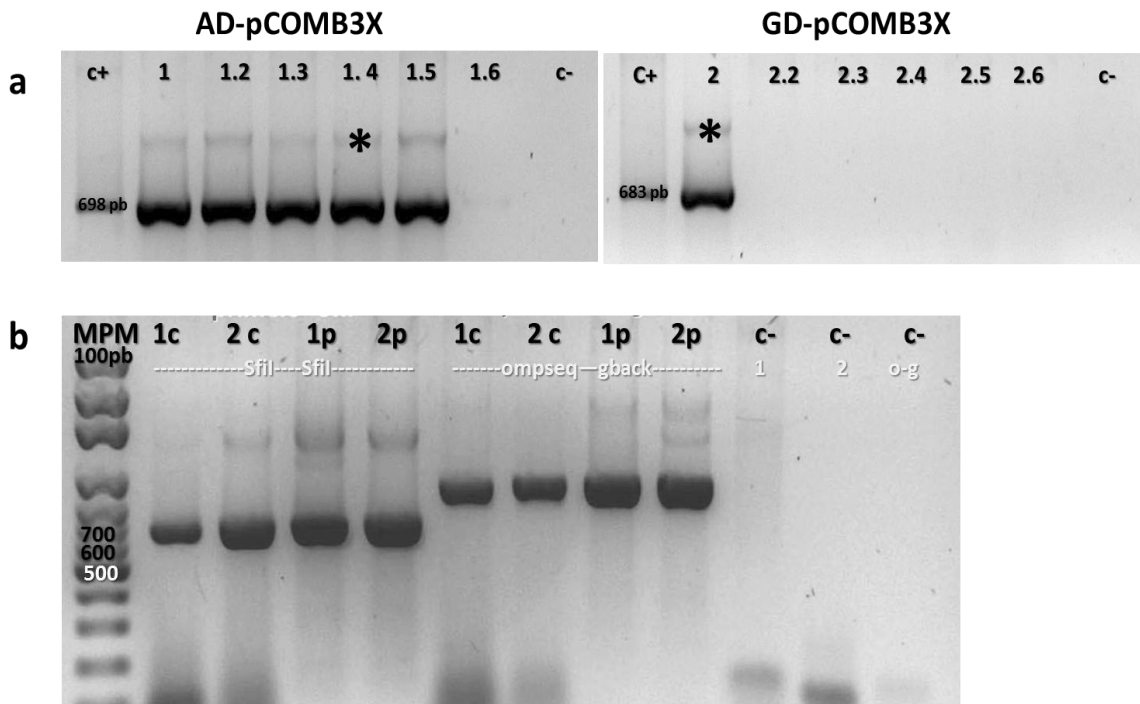


Figura 14. Genes quiméricos AD y GD en pCOMB3X.a) (izq) Evaluación de colonias para el inserto AD, c+=muestra tomada del VII.2.1 como marcador de peso molecular, 1-1.6=clonas analizadas, c-=control negativo **a)** (der) Evaluación de clonas (2-2.6) para el inserto GD. *Indica la clona seleccionada para secuenciación. **b)** Gel de agarosa 1.8%-TBE 1X para análisis de clonas positivas para AD (1c) y GD (2c) y sus respectivos plásmidos. ---Sfil---Sfil---=amplificación con oligonucleótidos específicos al inserto, ---ompseq-gback---=amplificación con oligonucleótidos específicos al vector.

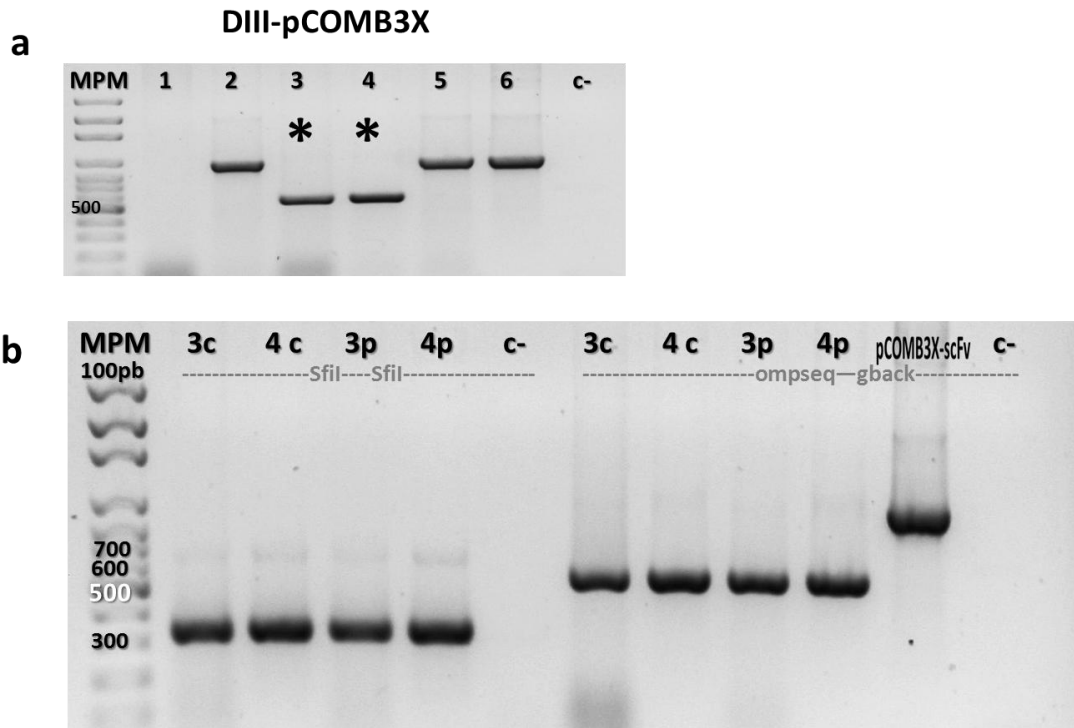


Figura 15. Gen D_2 clonado en pCOMB3X. **a)** Evaluación de colonias para el inserto D_2 , D_2 = codifica para la proteína DIII, MPM=marcador de peso molecular, 1-6=clonas analizadas con oligonucleótidos específicos al vector, c-=control negativo. *Indica las clonas seleccionadas para secuenciación. **b)** Gel de agarosa 1.8%-TBE 1X para análisis de clonas positivas (3c, 4c) y sus respectivos plásmidos (3p, 4p), pCOMB3X-scFv=amplificación de scFv como control, c-=c-=control negativo, ---SfiI---SfiI---=amplificación con oligonucleótidos específicos al inserto, ---ompseq---gback---=amplificación con oligonucleótidos específicos al vector.

VII.2.3 Secuenciación de proteínas quiméricas AD y GD y la proteína DIII

La secuencia obtenida de la clona AD y la GD se alinearon con las secuencias bases correspondientes usadas en el diseño de oligonucleótidos. Tras su análisis se corroboró que contenían las secuencias características de cada vNAR, la secuencia de restricción para BamHI, la secuencia del DIII del virus del Dengue 3, las secuencias codificantes a las etiquetas (Hisx6, HA) y sitios de restricción para SfiI en los extremos. Sin embargo se observó una mutación al

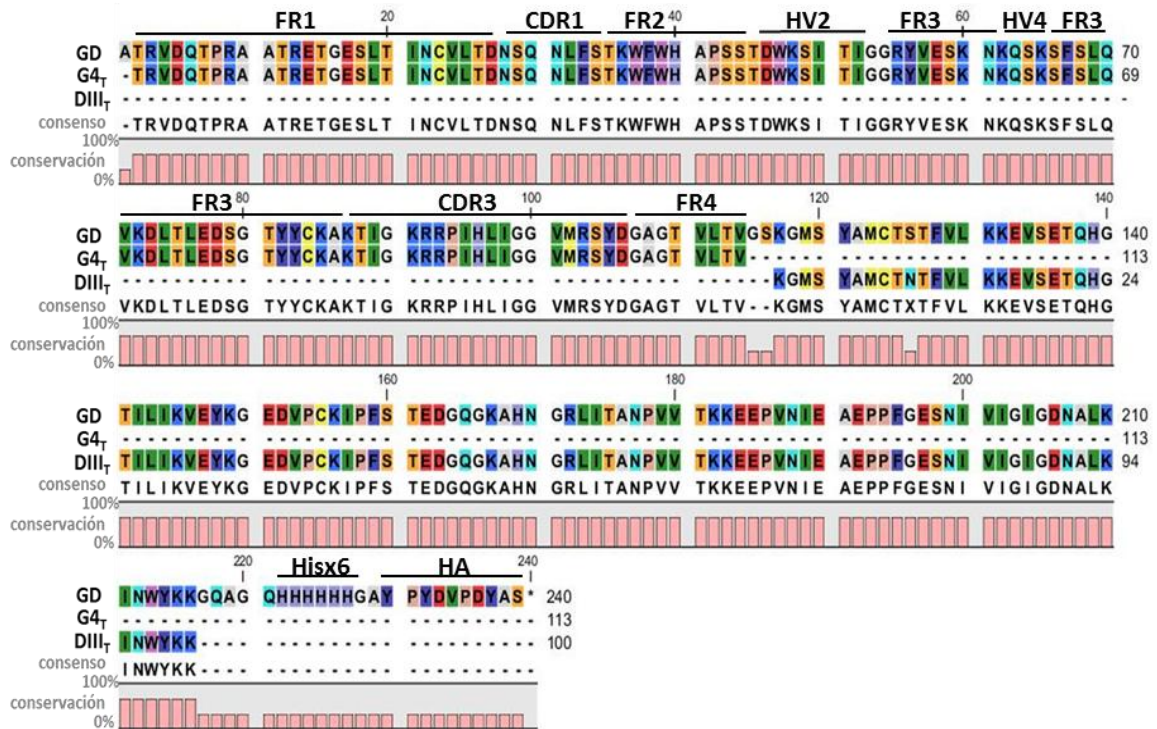


Figura 17. Secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica GD. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de GD con respecto a las secuencias patrón reportadas (G4_T y DIII_T). [FR1, CDR1, FR2, HV2, FR3, HV4, FR3, CDR3, FR4]=regiones características de un vNAR tipo II, Zona sin línea=secuencia del dominio DIII viral. Al término se encuentran la secuencia de seis histidinas (Hisx6) y la de hemaglutinina (HA).

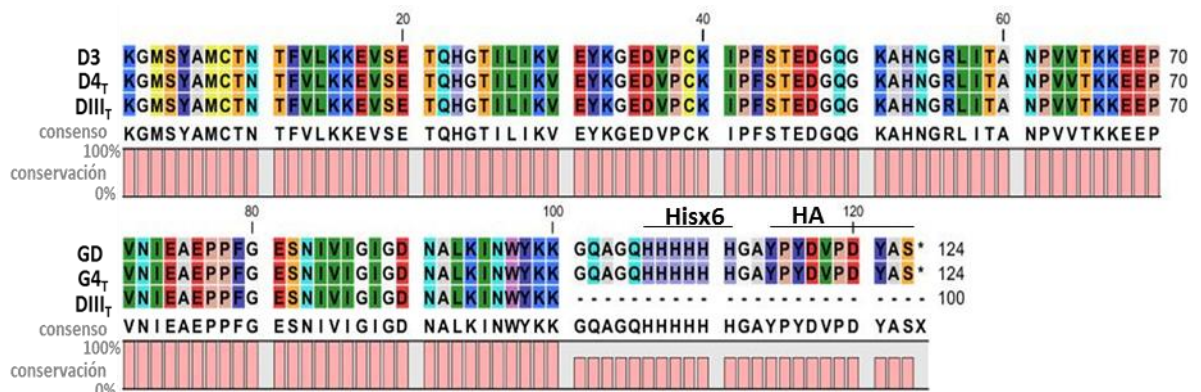


Figura 18. Secuencia de aminoácidos de DIII. Se muestran las alineaciones de aminoácidos de las dos clonas obtenidas (D3, D4) con respecto a la secuencia patrón reportada (DIII_T), la secuencia de seis histidinas (Hisx6) y la secuencia de hemaglutinina

VII.3 Análisis de la expresión de proteínas quiméricas AD y GD y la proteína DIII

VII.3.1 SDS- PAGE

Al analizar la expresión de las proteínas recombinantes en gel de poliacrilamida SDS-PAGE se observa la obtención de una banda cercana a los 25 kDa y otras bandas de menor tamaño cerca de los 15 kDa, siendo la primera considerada como la banda esperada ya que es más próxima al peso teórico calculado de 26.7 kDa para AD y 26.3 kDa para GD. Mientras para la proteína DIII se observa una banda en los 15 kDa determinándose como la adecuada y cercana al peso molecular esperado de 13.5 kDa (ver Figura 19).

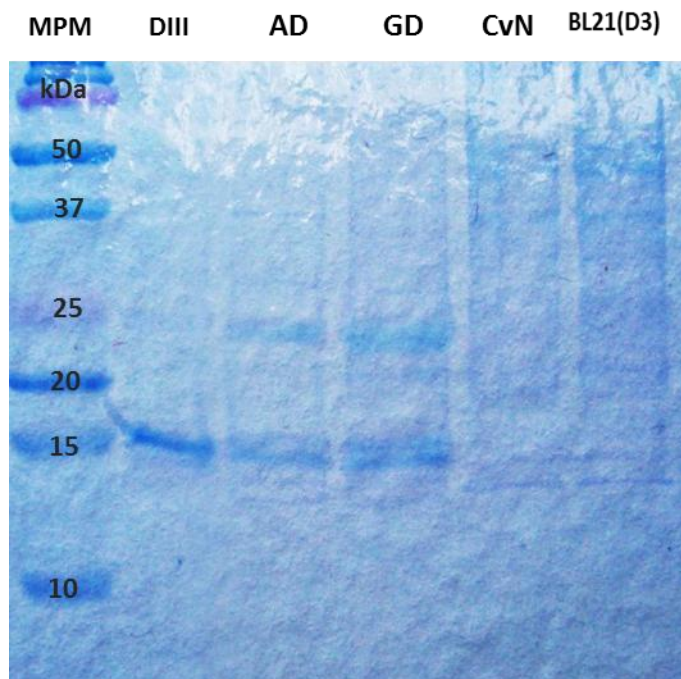


Figura 19. SDS-PAGE al 12%. MPM=marcador de peso molecular, DIII=Proteína DIII, AD=proteína quimérica AG16-DIII para hemoaglutinación, GD=proteína quimérica G4-DIII para vacunación, CvN extracto bacteriano de células que expresan un vNAR; BL21 (D3)=extracto bacteriano de células no transformadas.

VII.3.2 Western-Blot

Los resultados anteriores fueron confirmados con el ensayo de inmunodetección (Western Blot). Sin embargo se detectaron más de una banda obteniéndose un patrón similar entre las proteínas.

Además se determinó que en la elución 1 y 2 (E1, E2) de la purificación se encuentra la mayor cantidad de nuestras proteínas quiméricas. Para las proteínas quiméricas el pasar solo una vez los extractos bacterianos (S2) que las contenían por la columna de Ni-NTA fue más que suficiente recuperar la proteína expresada, esto con base a que no se observa ninguna banda (26.7 kDa o de 26.3 kDa) en el análisis del extracto bacteriano después haberse pasado por la columna (dc). Sin embargo, la proteína DIII es encontrada en las 5 eluciones pero de igual manera en mayor concentración en E1 y E2. (Figura 20).

VII.3.3 Cuantificación

La concentración determinada para la proteína quimérica AD fue de 11.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de 18.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la proteína quimérica GD y la cantidad de 98.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la proteína DIII, esto en volúmenes finales de 2 mL para AD y 3 mL para GD y D₂.

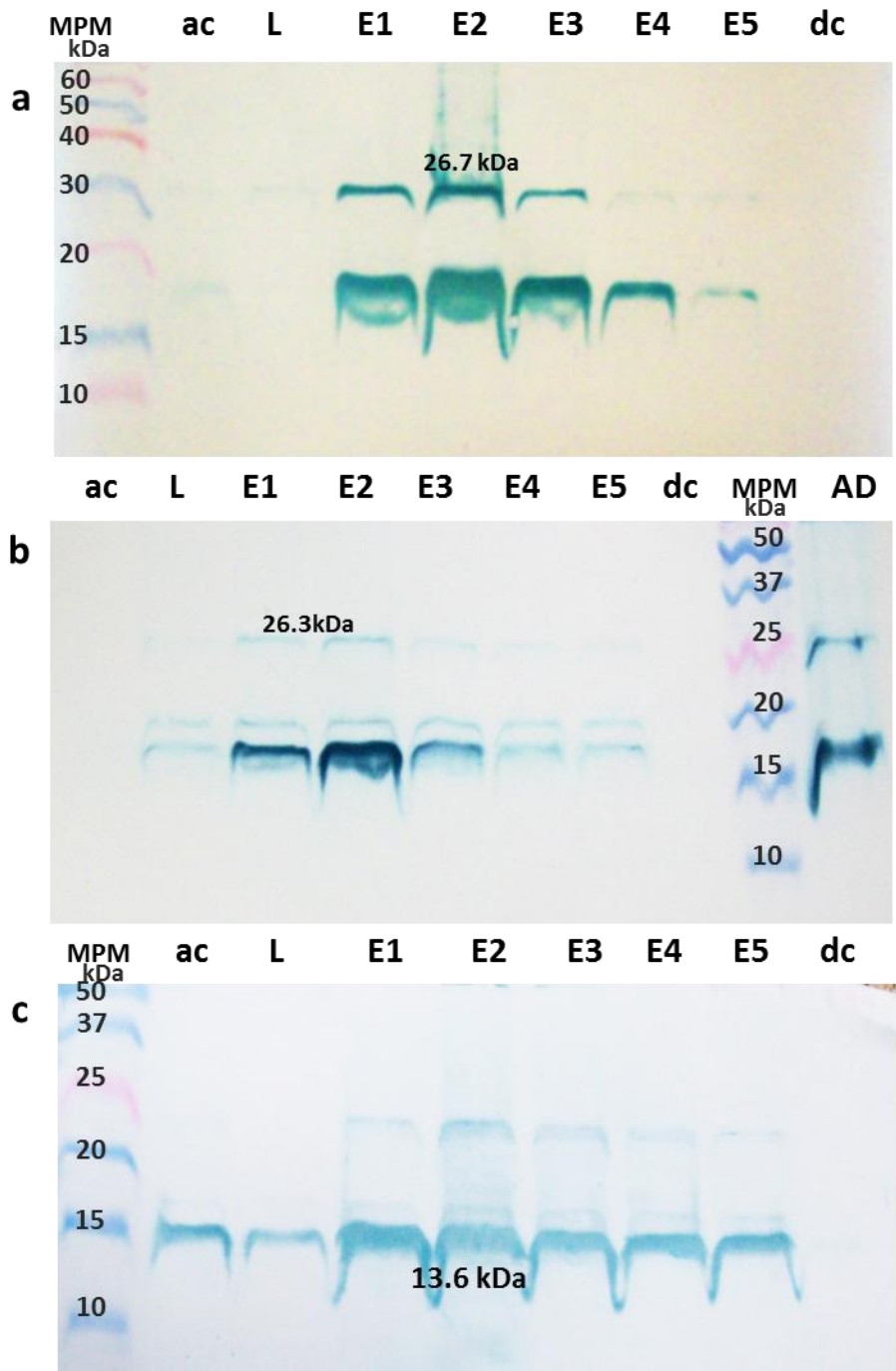


Figura 20. Western Blot de proteínas quiméricas y la proteína DIII. a) Muestras de los pasos de purificación para la proteína quimérica AD. b) Muestras de los pasos de purificación para la proteína quimérica GD. c) Muestras de los pasos de purificación para la proteína DIII. MPM=marcador de peso molecular, ac=extracto bacteriano antes de pasar por la columna, L=solución obtenida del lavado, E1-E5=Eluciones de la proteína purificada, dc=solución del extracto después de pasar por la columna. AD=muestra de la E2 del proteína quimérica AD.

VII.4 Ensayo de Vacunación

Los resultados del ensayo de vacunación se evaluaron y representaron como la cinética de producción de anticuerpos IgG-anti DIII en los sueros extraídos durante 15 días post-inoculación.

En los sueros de los ratones inmunizados con la proteína quimérica GD (G4-DII) se presentó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) de IgGs en los días 5, 6 y 7 comparado con la respuesta producida por los otros dos grupos de ratones inmunizados. En el día 8 los IgG-anti DIII de G1 disminuyen observándose una cantidad constante hasta el día 12, donde la cantidad vuelve a disminuir y seguir una tendencia constante de anticuerpos. Lo observado con los ratones de G2 (inoculados con DIII) es que presentan un incremento de anticuerpos desfasado por dos días (día 8) con respecto a G1, también se presentan una disminución constante de IgG-anti DIII hasta el día 11 para después ir en aumento. Respecto a los ratones del grupo control (G3) su respuesta de producción de anticuerpos se mantiene constante a lo largo del experimento presentando leves incrementos estadísticamente no significativos ($p = 0.05$).

La comparación de producción de anticuerpos IgG-anti DIII entre grupos no resultó diferente significativamente ($p = 0.09$) para G1 y G2, sin embargo como se esperaba ambas respuestas si fueron mayores estadísticamente ($p < 0.05$) respecto al grupo control G3 (ver Figura 21)

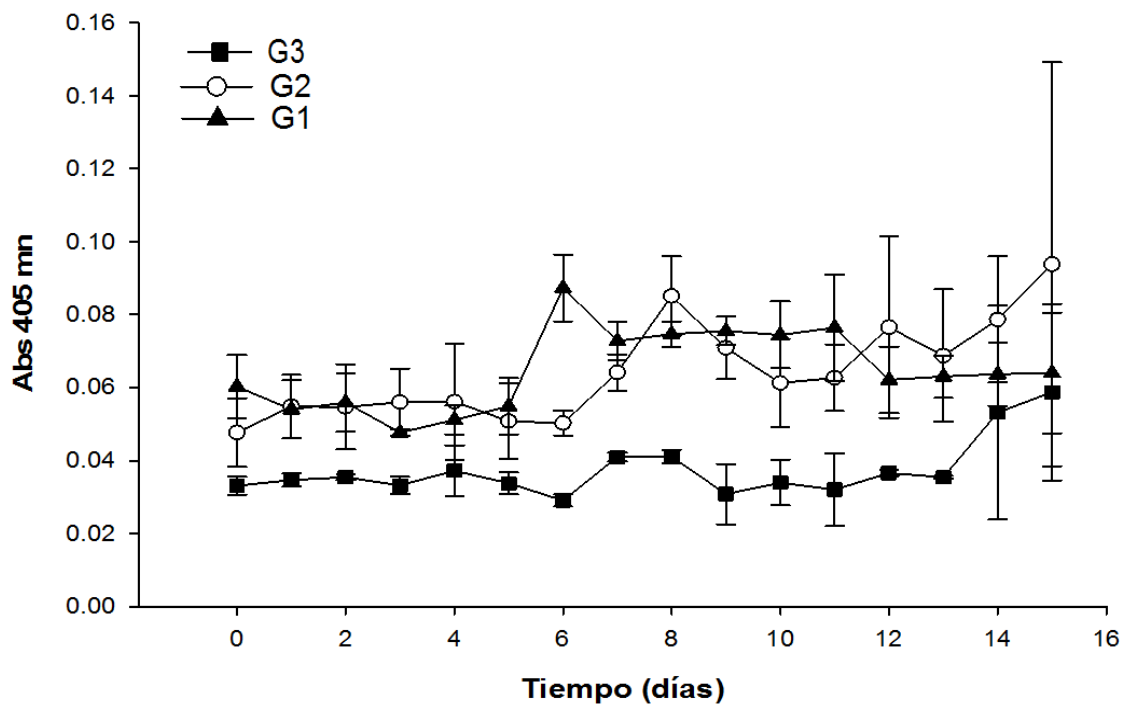


Figura 21. Cinética de producción de anticuerpos IgG-antiDIII. Los títulos de anticuerpos son expresados como la absorbancia obtenida a 405 nm, con una dilución de los sueros 1:100. G3= grupo control de ratones inoculados con PBS 1X, G2= grupo de ratones inoculados con la proteína DIII, G1= grupo de ratones inoculado con la proteína quimérica G4-DIII. Las barras indican la desviación estándar (n=3).

VII.5 Ensayo de hemoaglutinación

En los ensayos de prueba solo se documento macroscópicamente y se observo siempre la aglutinación con los sueros de los ratones G1 inoculados con la construcción quimérica GD. Los volúmenes finales adecuados son los descritos en el apartado VI.8.1.2. (Figura 22). Esto permitió continuar con el análisis macroscópico de 12 sueros (Suero 17 extraído a los 48 días) de los ratones inmunizados (apartado VII.4) donde se observaron 3 muestras positivas en los sueros G1, un suero indeterminado (+/-) para G2 y las 4 muestras de G3 fueron negativas, siendo lo esperado solo para este último grupo (Figura 23).

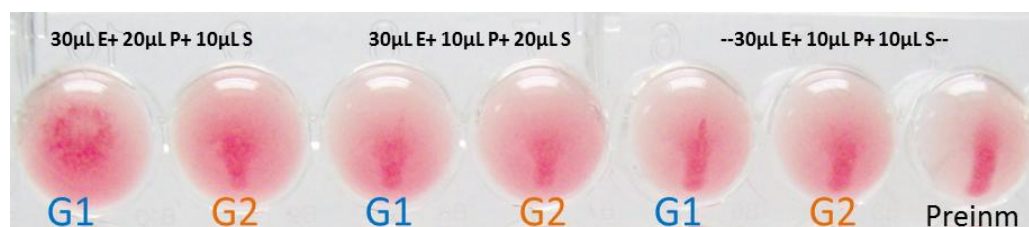


Figura 22. Ensayo previo de hemoaglutinación. En la parte superior se anotan las cantidades probadas para determinación de volúmenes a usar, donde E=eritrocitos, P=proteína quimérica AD, S=suero, G1=sueros pertenecientes al grupo de ratones inoculado con la proteína quimérica GD. G2=sueros del grupo de ratones inoculados con la proteína DIII, Preinm=muestra de suero de ratón.

En la documentación microscópica se observaron: para el control positivo aglomeraciones de eritrocitos y formaciones de cadenas de eritrocitos a diferencia del control negativo donde los eritrocitos se encontraron totalmente dispersos y no se observó ninguna hemoaglutinación. Para los sueros de G2 y G1 si logro observar conglomerados y cadenas de eritrocitos en todas las 8 muestras pero de menor grado de aglutinación comparado con el control positivo (Figura 24).

Con base en lo anterior la proteína quimérica AD, usada para este ensayo de hemoaglutinación fue eficiente para detectar aquellas muestras de suero con anticuerpos anti Dengue mediante documentación microscópica.

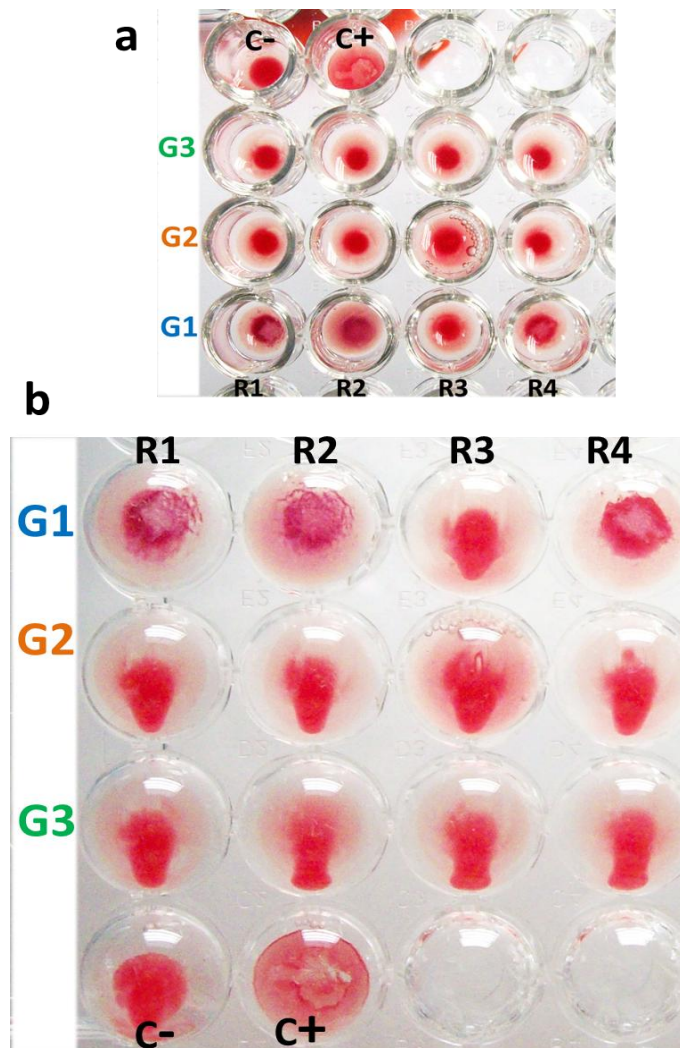


Figura 23. Ensayo de hemoaglutinación resultados macroscópicos. a) Fotografía de la parte superior de la placa de ELISA, G1=muestras de sueros de los ratones inoculados con la proteína quimérica GD, G2 muestras de sueros de los ratones inoculados con la proteína DIII, G3=muestras de sueros de ratones del grupo control inoculados con PBS 1X. R1=suero del ratón 1, R2=suero del ratón 2, R3=suero del ratón 3, R4=suero del ratón 4, c-=control negativo, c+=control positivo. **b)** Fotografía de la placa virada verticalmente En los sueros positivos los eritrocitos se aprecian algo dispersos, precipitando en forma de red la cual se mantiene al girar la placa. Los sueros negativos presentan un botón rojo precipitado en el centro del pozo que se corre al momento de girar la placa.

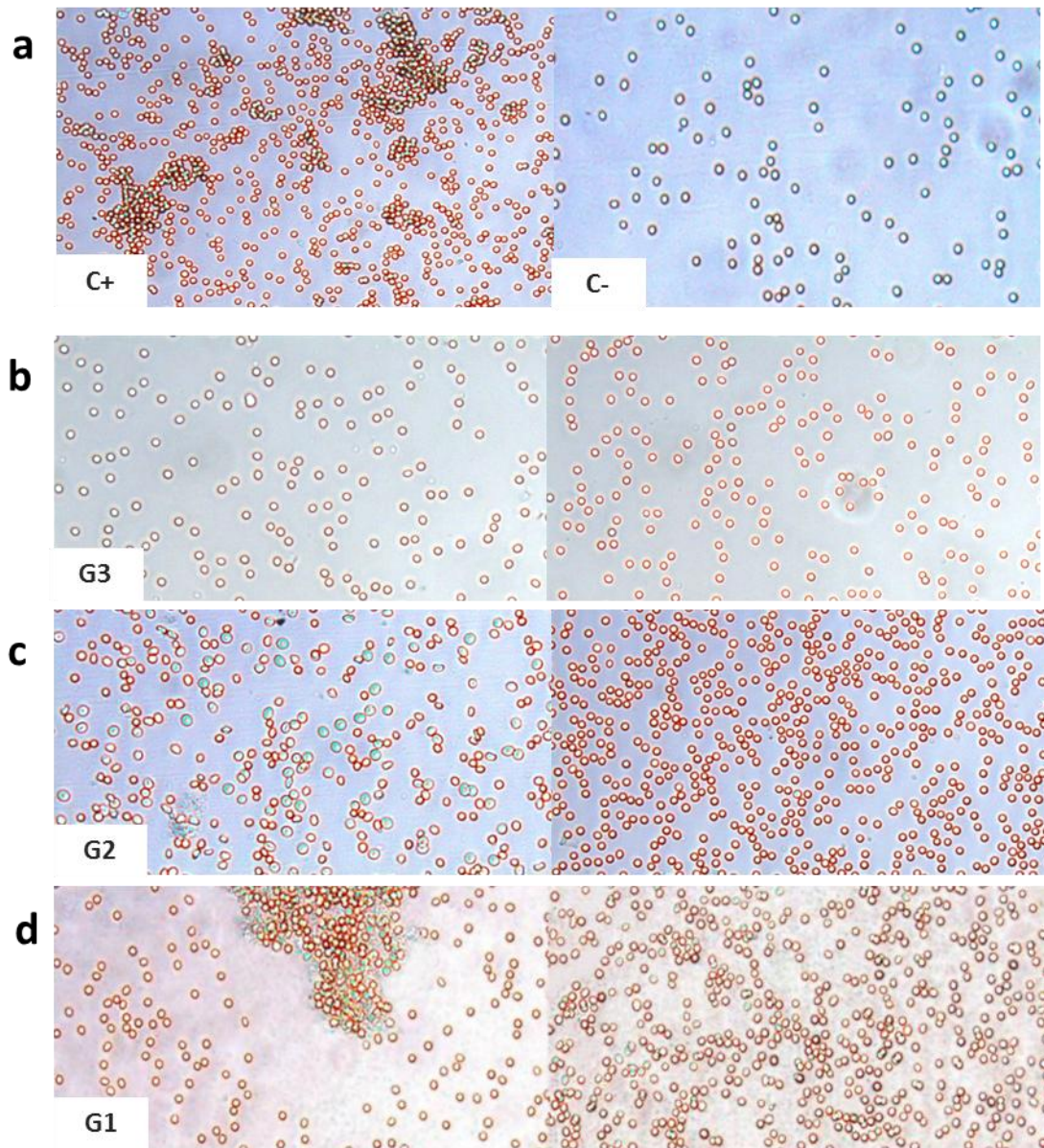


Figura 24. Ensayo de hemoaglutinación resultados microscópicos. Fotografías tomadas en un microscopio invertido a 10X. **a)** Muestras de sueros control, c+= control positivo, c-=control negativo. **b)** Sueros negativos del grupo control (G3). **c)** Sueros positivos del grupo inoculado con la proteína DIII (G2). **d)** Sueros positivos de los ratones inoculados con la proteína quimérica GD (G1).

VIII. DISCUSIONES

Con el fin de mejorar o desarrollar pruebas de diagnóstico y métodos de vacunación para enfermedades infecciosas como el Dengue se ha venido empleando la tecnología del ADN recombinante. Mediante sus técnicas se buscan nuevas biomoléculas e inmunogénicos recombinantes que permitan detectar y prevenir eficientemente la infección del virus. Por lo que esta tecnología fue la base para amplificar, fusionar y caracterizar las construcciones quiméricas de los genes AD y GD.

VIII.1 Obtención de genes quiméricos

El resultado obtenido de la amplificación de los genes por separado A, G y DIII fue eficiente y específico ya que obtuvimos una banda intensa que se reflejó en la concentración de ADN cuantificado, usando concentraciones de 3mM MgCl₂ para los genes A, G, DIII (D₂ que fue clonado en pCOMB3X) y 4mM MgCl₂ para DIII (D₁ clonado en pBR322). Los tamaños de los genes de los fragmentos de anticuerpos AG16 y G4 así como el gen codificante para DIII coinciden con los reportados por Beltran (2006), Dávila (2009) y Leitmeyer (1999) respectivamente para cada gen.

En los pasos de la digestión y purificación como productos de PCR se obtuvieron porcentajes de recuperación favorables dentro del rango (90-95 %) establecido por el fabricante del kit de purificación (QUIAGEN™)

Durante las amplificaciones de vectores iniciales pBR322 y pCOMB3X se observaron para ambos las bandas características de las tres formas conformacionales de un plásmido superenrollada, linealizada y relajada. Sin embargo durante previos ensayos de doble digestión del plásmido pBR322 con las enzimas EcoRI-BamHI y BamHI-Sall a las condiciones establecidas por el fabricante no se lograron obtener las bandas correspondientes a los fragmentos de relleno para cada doble digestión (377 pb con EcoRI-BamHI y 276 pb corte con BamHI-Sall). Esto coincide con los resultados obtenidos en este laboratorio por

Camacho-Villegas (comunicación personal) para el mismo plásmido. Por lo que probablemente el ADN plasmídico este en un estado superenrollado abundante, limitando con esto la exposición de los sitios de restricción a las enzimas determinadas o también es probable una cantidad considerable de ADN se encontrara metilado por daños previos a su obtención en las regiones de corte para las enzimas (ver Anexo II). Para pCOMB3X se obtuvieron los resultados de digestión esperados y coinciden con los reportados por Olivares (2012).

Con respecto a la concentración de ADN plasmídico digerido y purificado por gel no fue la esperada, ya que se obtienen porcentajes de recuperación (4,5-8%) 16 veces menores a los señalados por el fabricante (recuperación del 70-80%). Estos resultados son similares a otros reportados en el laboratorio durante el mismo periodo, por lo que creemos la pérdida de ADN en el proceso de purificación sea en el paso de adhesión a la membrana de la columna de purificación o durante la fase de elución en la que es muy importante que la solución para eluir sea colocada correctamente sobre la membrana de purificación.

Para los genes quiméricos AD y GD su amplificación, como productos con extremos Sfil, fue eficiente ya que se observaron las bandas con tamaños teóricos calculados. Sin embargo no fue tan específica por la aparición de bandas accesorias una de explicaciones es que probablemente la concentración de $MgCl_2$ no sea la adecuada para los pares de oligonucleótidos usados. Ya que se ha reportado que un exceso de $MgCl_2$ reduce la fidelidad de la enzima incrementando las uniones inespecíficas siendo necesario realizar curvas de $MgCl_2$ en un rango de 1.5 a 4.0 mM para obtener la concentración adecuada (Eckert y Kunkel, 1990). Sin embargo se decidió, para mejores resultados en la ligación, esas bandas se eliminarán realizando una purificación en gel previa a la digestión con Sfil. La cual resulto exitosa logrando observar solo la banda correspondiente a cada gen.

Con respecto a la obtención de clonas positivas a los genes quiméricos AD y GD se obtuvo una baja transformación, pero el número reducido de colonias positivas obtenidas (1-5 clonas) fue suficiente para seleccionar una clona con la secuencia correcta para cada gen quimérico (AD o GD) y para el gen DIII.

Si bien es sabido, las polimerasas empleadas en la técnica de PCR carecen de actividad correctora 3'-5' y provocan mutaciones al amplificar la secuencia original. Estas mutaciones pueden ocasionar cambios en los aminoácidos al ser traducidas y algunas afectan la estructura conformacional de las proteínas (Cline et al. 1996). Por lo que creemos esto fue lo ocurrido con la mutación observada en las proteínas quiméricas en donde se presentó una mutación. Sin embargo, esta es clasificada como mutación neutra, es decir se presentó un cambio de aminoácidos distintos pero del mismo grupo, conservando así la función de la proteína sin cambio alguno (Krebs et al. 2012). Por lo que se decidió continuar con la expresión proteica.

VIII.2 Obtención de proteínas quiméricas AD y GD y la proteína D₂

El sistema de expresión para proteínas recombinantes comúnmente utilizado es la bacteria *E. coli* debido al amplio conocimiento de su genoma, crecimiento rápido y aunado a reportes de altos niveles de expresión para proteínas recombinantes desde 1-50 mg/L (Baneyx 1999, Mayer et al. 2004, Agüero et al. 2011). Contrario a esto, en este trabajo el nivel de expresión obtenido fue bajo pero coincide con los niveles bajos obtenidos para fragmentos de anticuerpos reportados en el laboratorio por Vargas (2010) y Olivares (2012). Siendo necesario para futuras pruebas establecer las condiciones más óptimas para la expresión de cada proteína quimérica variando los factores de: temperatura de crecimiento y expresión, densidades celulares en el punto de inducción, concentración del inductor IPTG, así como las cantidades del extracto de levadura y triptona en el medio de cultivo (Quiroga 2010).

Los resultados de la purificación fueron favorables ya que se logro apreciar en mayor tamaño las bandas esperadas de las proteínas quiméricas AD y GD, así como a la proteína DIII de aquellas proteínas nativas de la célula hospedera. Esto nos indica que la célula hospedera si dirigido sus recursos a la producción de las proteínas recombinantes y no hacia las propias (Novagen, 2006). Sin embargo la presencia de bandas adicionales en las eluciones nos indica que probablemente las proteínas de *e.coli* BL21 (D3) no se están eliminando con el paso de lavado o proteínas del huésped forman enlaces con nuestras proteínas quiméricas.

Esto es reflejado en los resultados del Western Blot donde se mostraron dos bandas para cada construcción. Para la proteína DIII ya se ha reportado la formación de dímeros en los virus el dengue tipo 1 y 2 con un peso de ~ 26-30 kDa y que se observan en muestras tratadas bajo condiciones reductoras y con proteínas contaminantes (Ludolfs et al. 2002, Labrada, 2006). En cuanto a las proteínas quiméricas es probable que sufrieran una descomposición proteolítica durante los procesos de extracción y almacenamiento, ya que las bandas adicionales son de menor masa molecular que nuestra proteína completa. Por lo cual se sugiere para trabajos próximos se realicen ensayos para optimizar el proceso de purificación de las proteínas.

VIII.3 Ensayo de Vacunación

Una de las investigaciones para el desarrollo de vacunas contra el Dengue se basa en el estudio de la respuesta inmune como la producción de títulos de anticuerpos anti-dengue por ratones inoculados. Para después pasar a pruebas de protección en el modelo animal primate no humano adecuado para esta enfermedad (e.g mono Rhesus *Macaca Mulata*, *Aotus nancymae*) (Webster et al. 2009, WHO 2011). Por lo que en este estudio se enfoco sólo a la evaluación de los títulos de anticuerpos anti-DEN 3 obtenidos de ratones inmunizados.

Los resultados que se obtuvieron no fueron del todo los esperados. Si se obtuvo una respuesta primaria en pocos días post-inoculación con la inmunización de la proteína quimérica GD dirigida al receptor DC-SIGN de células dendríticas con respecto a los resultados obtenidos al inmunizar solo la proteína DIII. Estos resultados fueron similares a los reportados por Wang (2002) y Beltrán (2006) en donde al inocular a ratones una cantidad pequeña de complejos inmunogénicos dirigidos a receptores de DC lograron obtener una respuesta temprana de anticuerpos IgG específicos a los 7-8 días post inoculación. Con esto se demuestra que una respuesta inmune temprana puede ser inducida con la proteína quimérica construida.

Sin embargo, la respuesta de IgG fue baja comparada con los resultados de Berry y colaboradores (2003) y Beltran (2006) para compuestos inmunogénicos hacia células dendríticas. Estos resultados de baja productividad pueden deberse a: 1) El anticuerpo vNAR haya sufrido un cambio en su conformación al traducirse unido a DIII y las regiones de reconocimiento al receptor DC-SIGN se vean afectada. 2) La existencia de la homología de 65-70% en la secuencia de DC-SIGN humano y los homólogo de ratón DC-SIGN y DC-SIGNR puede hacer variar la especificidad del fragmento vNAR de nuestra proteína quimérica, ya que variaciones mínimas en la constitución del antígeno pueden ser suficientes para que no se lleve a cabo el reconocimiento por un anticuerpo (ver Anexo III) (Park et al. 2001, Abbas, 2009). Provocando que la proteína quimérica GD no reconozca fácilmente al receptor, viéndose disminuida la entrada hacia las células dendríticas de ratón y resultando en una respuesta inmune similar a la del grupo G2 (inoculado solo con DIII), lo que explica la similitud entre las curvas de anticuerpos IgG-anti DIII de G1 con la de G2, la cual es una curva característica de una infección por el virus del Dengue en donde a los 6 días se detecta la presencia de anticuerpos IgG anti-Dengue en una primera infección (Acosta-Bas, 2005).

VIII.4 Ensayo de hemoaglutinación

Para los métodos de diagnóstico es necesario evaluar su validez; que tan sensible y eficiente es, su reproducibilidad; que ofrezca los mismos resultados cuando se aplica bajo las mismas circunstancias, seguridad; determinada por el valor predictivo de un resultado positivo o negativo, así como si es sencillo de interpretar (Peling et al. 2010).

En este trabajo se logró evaluar la validez de la proteína quimérica AD (vNAR-anti glicoforina A unido a la proteína DIII) dándonos una alta sensibilidad y especificidad de la prueba en observaciones microscópicas (eficiencia 100%), sin embargo esto no pudo observarse macroscópicamente obteniendo una sensibilidad del 50%. Los resultados microscópicos son similares a los obtenidos por Davila (2009) y Lugo (2009) en relación a la alta eficiencia de vNAR recombinantes (100% y 82% respectivamente) como pruebas de diagnóstico por hemoaglutinación. Siendo esta una prueba segura por aplicarse in vitro y de sencilla interpretación mediante observación directa. Esto nos sugiere que la proteína quimérica AD es viable para su uso como prueba de diagnóstico mediante hemaglutinación microscópica para Dengue.

Con respecto a la baja hemoaglutinación presentada por los sueros del G2 inoculado solo con la proteína DIII, lo cual aparenta no coincidir con los resultados obtenidos en el ensayo de inmunización. Esto es debido quizás a que los anticuerpos anti-DIII producidos por G2 sean de una afinidad menor a DIII que los producidos por GD. Para explicarlo lo anterior, se sabe que al introducir una sustancia extraña (un antígeno) al organismo, el sistema inmune producirá anticuerpos estructuralmente diferentes que se unen a distintas partes del antígeno y por lo tanto estos anticuerpos anti-antígeno tendrán diferente afinidad y aidez por el antígeno completo. Entendiendo afinidad como la fuerza de unión entre un anticuerpo y su antígeno, que depende de los enlaces que existan entre el antígeno-anticuerpo y esto determina la fuerza y rapidez para que un anticuerpo se una a su antígeno determinado. La aidez es la fuerza de unión de anticuerpos

polivalentes (tiene más de un sitio de unión al antígeno) al antígeno y depende de la afinidad hacia cada uno de los sitios de unión (Wilson y Walker, 2000).

La proteína DIII al ser procesada por las células presentadores de antígenos, estas obtendrían un menor número de epítomos para exponer en su superficie, obteniéndose un bajo número anticuerpos monoclonales con diferente afinidad al antígeno completo, no así con GD que es de mayor tamaño y es probable se expongan un mayor número de epítomos para DIII, (Sandberg et al. 2001; Abbas, 2009). Con lo anterior se podría pensar que regiones del vNAR que forma parte de la proteína quimérica GD fueran expuesto como epítomos y se produjeran anticuerpos contra vNAR, por lo cual se realizó una evaluación de los sueros contra G4 y se observó que entre los valores obtenidos con los sueros de G2 y G1 no había diferencia estadísticamente significativa ($p>0.05$), por lo tanto no se produjeron anti-G4 en los ratones inmunizados con GD (ver anexo IV).

Cabe mencionar que recientemente Wahala y colaboradores (2012) han reportado que los epítomos del DIII reconocidos y neutralizados por anticuerpos de ratón no son siempre el objetivo de los anticuerpos producidos en humanos infectados por el virus completo. Lo que es probable debido a la diferencia entre especies o la existencia de un mal plegamiento al producir las proteínas recombinantes que pueda interferir en su exposición de epítomos para el reconocimiento de los anticuerpos. Con base a lo anterior es recomendable realizar la validación de la prueba de hemoaglutinación con sueros de pacientes humanos infectados con dengue.

CONCLUSIONES

Se lograron obtener dos genes quiméricos: uno codificante para un vNAR-anti glicoforina A fusionado a al gen DIII del virus del dengue (AD) y otro con la secuencia para un vNAR-anti DC-SING unido al gen DIII (GD).

En este trabajo fue posible expresar y obtener las dos proteínas quiméricas AD, GD y así también se logro obtener la proteína DIII de manera recombinante.

La proteína quimérica GD como vehículo de vacunación en ratones logro inducir una respuesta temprana de anticuerpos IgG-anti DIII. Sin embargo los títulos de IgG-anti DIII producidos fueron similares a los inducidos con la proteína DIII recombinante.

Con la proteína quimérica AD usada en ensayos de hemoaglutinación se logro determinar eficientemente los sueros de ratón positivos y negativos a DIII con observaciones microscópicas, no así de manera macroscópica.

PERSPECTIVAS

Realizar pruebas para mejorar las condiciones de expresión y purificación de las proteínas con el fin de obtener mejores rendimientos proteicos.

Llevar a cabo ensayos *in vitro* con la proteína GD para evaluar su afinidad con DC-SIGN de ratón, DC-SIGN mono, DC-SIGN humano así como la respuesta inmune inducida en células dendríticas de estas especies *in vitro*

Validar la prueba de hemoaglutinación con sueros humanos positivos y negativos a dengue tipo 3 y sueros positivos los otros tipos de dengue, con la finalidad de evaluar si existe o no reactividad cruzada.

LITERATURA CITADA

- Abbas A. K., Litchman A. H, Pillaj S. 2009. Cellular and Molecular Immunology, 6ta Edición, Saunders Elsevier. 576 pp.
- Acosta B. C. y Gómez C. I. 2005. Biología y Métodos de Diagnóstico del Dengue. Rev. Biomed.113-137
- Agüero J. A., Hotzel H., Aguilar L., Lima C. y Sachse K. 2011. Expresión in vitro en *Escherichia coli*, de un fragmento del gen vlha5.02 de la principal familia de hemaglutininas de *Mycoplasma gallisepticum*. Rev. Salud Anim. 32-37
- Antuñano J. L. F. y Mota J. 2000. Desarrollo de agentes inmunizantes contra el dengue. Rev Panam Salud Pública.287-292
- Aquino Z. L. M., Zolezzi del R. A. y Dantés G. H. El. 1995. Diagnóstico del Dengue en México: Actualidad y perspectivas. Salud Pública Mex.21-28
- Banchereau, J. et al., 2000 Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol, 2000. 18: p. 767-811.
- Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Elsevier Sciences. 411-421
- Bartl S. D. Baltimore y Weissman L. I. 1994. Molecular evolution of the vertebrate immunesystem. Proc.Nati.Acad.Sci.10769-70
- Beltrán L. S. A. 2006. Obtención de un vehículo de vacunación a partir de una biblioteca de anticuerpos de tiburón. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.1-126

- Bollati M. et al. 2010. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res.*125-48
- Bowley R. D., Jones M. T., Burton R. D y Lerner A. R. 2009. Libraries against libraries for combinatorial selection of replicating antigen–antibody pairs.*PNAS.*1380-85
- Brandler S. et al. 2010. Pediatric measles vaccine expressing a denge tetravalent antigen elicits neutralizing antibodies against all four Dengue viruses. *Vaccine.*6730-39
- Buxbaum E. 2010. *Biophysical Chemistry of Proteins: An Introduction to Laboratory Methods.* 1a Edición. Springer. 510 pp
- Catteau A. et al. 2003. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *J Gen Virol.*81-93
- Chávez H. J. et al. 2010. Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. *Biologicals.*613-618
- Cline J., Braman J. y Hogrefe H. H. 1996. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research.* 3546–3551
- Crill, W. D. y Roehrig, J. T. 2001. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol.*7769-7773
- Davila L. A. 2009. Desarrollo de un Método de detección para VIH-1 por medio de hemoaglutinación con fragmentos de anticuerpo de tiburón. Tesis de

Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.1-71

Deffar K. et al. 2009. Nanobodies the new concept in antibody engineering. African Journal of Biotechnology.2645-52

Díaz J. F. et al. 2006 Dengue Virus Circulation and Evolution in Mexico: A Phylogenetic Perspective.760-773

Dooley H., M. Flajnik y Porter A. 2003. Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. Molecular Immunology.25-33

Dooley H y Flajnik M. 2005. Shark immunity bites back: Affinity maturation and memory response in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. European Journal of Immunology.936-45

Drake A. W., D. G. Myszka y Klakamp S. L. 2004. Characterizing high-affinity antigen/antibody complexes by kinetic- and equilibrium-based methods. Anal Biochem.35-43

Eckert K., A. y Kunkel T., A. 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermusaquaticus* DNA polymerase. Nucl. Acids Res. 3739–3744

Ferrari A. et al. 2007. Immunobiological role of llama heavy-chain antibodies against a bacterial beta-lactamase. Vet Immunol Immunopathol.173-82

Fonseca B. A. et al. 1991. Flavivirus typespecific antigens produced from fusions of a portion of the E protein gene with the *Escherichia coli* TRPE gene. Am J Trop Med Hyg.500-508

- Gil et. al. 2009. Viremia and antibody response in green monkey (*Chlorocebus aethiops sabaeus*) infected with dengue virus type 2: a potential model for vaccine testing. *Microbiol Immunol.*1-8
- Greenberg A. et al. 1995. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversifications in sharks. *Nature.*168-173
- Gómez D. H. y Tapia C. R. 1995. El Dengue en México: Situación epidemiológica reciente. *Gac. Méd .de Méx* 131, 237-240
- Goodsell S. D. 2008. Molecule of the month: Dengue virus. *RCSB Protein.*1-2
- Gubler D. J. 1999. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 480-496
- Gibbons R. V. y Vaughn D. W. 2009. Dengue: an escalating problem. *Br. Med. J.* 1563-1566.
- Gupta A. y Chaudhary K. V. 2006. Bifunctional recombinant fusion proteins for rapid detection of antibodies to both HIV-1 and HIV-2 in whole blood. *BMC Biotechnology.*1-12
- Gurukumar K.R. et al. 2009. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virology Journal.*1-8
- Guy B. et al. 2008. Cell-mediated immunity induced by chimeric tetravalent dengue vaccine in naive or flavivirus-primed subjects. *Vaccine.* 5712-21
- Halstead S. B. y O'Rourke E. J. 1977. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature.*739-41

- Halstead S. B. y Marchette N. J. 2003. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. *Am J Trop Med Hyg.*5-11
- Hanley A. K. y Weaver C. S. *Frontiers in Dengue Virus Research.* 2010 Horizon Scientific Press.35-53
- Henderson K. A. et al. 2007. Structure of an IgNAR-AMA1 Complex: Targeting a conserved hydrophobic cleft broadens malarial strain recognition. *Structure Elsevier.*1452-66
- Hombach J. et al. 2007. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. *Rev Panam Salud Pub.* 254-260
- Holliger P. y Hudson J. P. 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology.*1126-36
- Hu D. et al. 2011. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. *Virology Journal.*1-4
- Kanesa-athan N. et al. 2001. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur)in human volunteers. *Vaccine.*3197-3188
- Kerns E. H. y Di. L. 2003. *Drug Discovery Today.* Elsevier. 316-323
- Kim Y. M., S. M. Yang y Kim G. T. 2009. Expression of Dengue Virus E Glycoprotein Domain III in Non-nicotine Transgenic Tobacco Plants. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.*725-730

- King C. C. et al. 2008. Comparative analysis of full genomic sequences among different genotypes of dengue virus type 3. *Virology Journal*. 1-13
- Kourí Gustavo. 2006. El dengue, un problema creciente de salud en las Américas. *Pan Am J Public Health*. 143-145
- Kou Z., et al. 2008. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol*. 134-146.
- Krebs J. E., Goldstein E. S y Kilpatrick S.T. 2012. *Lewin's essential Gene*. 3ra Edición, Jones y Bartlett Publishers. 830 pp
- Kretz et al. 2007. In vivo targeting of antigens to human dendritic cells through DC-SIGN elicits stimulatory immune responses and inhibits tumor growth in grafted mouse models. *J. Immunother*. 715-26
- Kubach, J. et al. 2005 Dendritic cells: sentinels of immunity and tolerance. *Int J Hematol*, 2005.197-203.
- Kumagai K. y Tsumoto K. 2011. Antigen-Antibody Binding. *Encyclopedia of life sciences*. 1-7
- Liu J. et al. 2007 Selection of cholera toxin specific IgNAR single-domain antibodies from a naïve shark library. *Molecular Immunology*. 1775-83
- Leitmeyer K. C. et al. 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*. 4738-47
- Lindenbach B., H. Thiel y Rice C. *Flavivirus: 2007. The virus and their replication: Fields Virology*. 1101-52

- Low G.H J. 2011. The Early Clinical Features of Dengue in Adults: Challenges for Early Clinical Diagnosis. *Negl Trop Dis* 1-9
- Lugo P. H. F., Laniado R. y Licea N. A. 2009. Elaboración de un método diagnóstico para *Mycobacterium tuberculosis* por hemoagluinación usando anticuerpos de tiburón *Heterodonthus francisci*. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Maguiña V. C. et al. 2005. Dengue clásico y hemorrágico: Una enfermedad reemergente y emergente en el Perú. *Rev Med Hered.* 120-140
- Marovich M., et al. 2001. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 219-224
- Martin, J. S. L. et al. 2010. The Epidemiology of Dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 128-135
- Matsui K. et al. 2009. Characterization of dengue complex-reactive epitopes on dengue 3 virus envelope protein domain III. *Virology* 384, 16-20.
- Mayer M. R. et. al. 2004. Expression of human proteins at the Southeast Collaboratory for Structural Genomics. *J Struct Funct Genomics.* 159–165
- Murrell S., Wu C. S. y Butler M. 2011. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnology Advances.* 239-247
- Novagen. 2006. pET System Manual. 10a Edición. U.S.-Canadá- Alemania-Reino Unido.
- Nuttall S. et al. 2004. Selection and affinity maturation of IgNAR variable domains targeting *Plasmodium falciparum* AMA1. *Proteins.* 187-197

- Olivares Q., J. F. 2012. Neutralización de la enzima esfingomelinasa-D de la araña *Loxosceles reclusa*, utilizando un fragmento de dominio sencillo tipo vNAR del tiburón *Heterodontus Francisci*. Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.1-76
- O'Hagan D. T. 2007. New Generation Vaccine Adjuvants. Novartis Vaccines and Diagnostics.1-7
- PAHO/WHO. 200. Definiciones de caso: Dengue y Leptospirosis. Boletín Epidemiológico.
- Peeling W. R, et al.2010. Evaluation of diagnostic tests: dengue. Nat Rev Microbiol. 30-38
- Pan American Health Organization. 2011. Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country: Number of Reported Cases of Dengue and Figures for 2011 Epidemiological Week / EW 27. Country reports to PAHO
- Quiroga C. A. L. 2010. Optimización del cultivo de Escherichia coli para la producción de cutinasas recombinantes. Tesis Ingenierría Civil en Biotecnología. Universidad de Chile. 1-113
- Raviprakash K. et al. 2008. A tetravalent dengue vaccine based on a complex adenovirus vector provides significant protection in rhesus monkeys against all four serotypes of dengue virus. J Virol. 6927-34
- Saerens D., L. Huang, K. Bonroy y Muyldermans S. 2008. Antibody Fragments as Probe in Biosensor Development. Sensors. 4669-86
- Samsa M. et al. 2005. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. PLoS Pathog.

- Sandberg J. K. y Glas R. 2001. Antigen Processing. Encyclopedia of life sciences. Nat. Pub. Group. 1-6
- Schneider J. y Droll D. 2001. A timeline for Dengue in the Americas to december 31, 2000 and noted first occurrences. PAHO
- Shao C. y Zhang J. 2008. The Expression and Characterization of a Bifunctional Protein in *E. coli* for Autologous Erythrocyte Agglutination Test. Cellular y Molecular Immunology.299-306
- Shin U. S. 1991. Chimeric antibody: Potential applications for drug delivery and immunotherapy. Biotherapy.43-53
- Shimizu H., et al. 2001. Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. J. Virol. 13512-13521.
- Shortman K., H. M. Lahoud y Caminschi I. 2009. Improving vaccines by targeting antigens to dendritic cells. Experimental and Molecular Medicine.61-66 (2009)
- Shu Y. P. et al. 2003. Comparison of Capture Immunoglobulin M (IgM) and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Nonstructural Protein NS1 Serotype-Specific IgG ELISA for Differentiation of Primary and Secondary Dengue Virus Infections. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 622-630
- Simmons M. et al. 1998. Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice. Am J Trop Med Hyg.655-62

- Smith W. A. et al. 2010. Update on Dengue: Epidemiology, Virus Evolution, Antiviral Drugs, and Vaccine Development. *Curr Infect Dis Rep.*157-164
- Srivastava A. K., J. R. Putnak, R. L. Warren y Hoke CH. 1995. Mice immunized with a dengue type 2 virus E and NS1 fusion protein made in *Escherichia coli* are protected against lethal dengue virus infection. *Vaccine.*1251-8
- Steinman R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 271-96
- Streltsov V. A., J. A. Carmichael y Nuttall S.D. 2005. Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early-developmental isotype. *Protein Sci.* 2901-2909
- Sun W. et al. 2003. Vaccination of human volunteers with monovalent and tetravalent live-attenuated Dengue vaccine candidates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*24-31
- Tajima S., T. Takasaki y Kurane Ichiro. 2011. Restoration of replication-defective dengue type 1 virus bearing mutations in the N-terminal cytoplasmic portion of NS4A by additional mutations in NS4B. *Arch Virol.*63-69 (2011)
- Tillman et al. 2000. Adenoviral Vectors Targeted to CD40 Enhance the Efficacy of Dendritic Cell-based Vaccination against Human Papillomavirus 16-induced Tumor Cells in a Murine Model. *Cancer Res.*5456-63
- Vargas P. C. E. 2012. Obtención de fragmentos vNAR de anticuerpos del tiburón *Heterodontus Francisci* con afinidad por IL-8 humana. Tesis de Maestría

- en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.1-76 (2012)
- Vázquez P. M. et al. 2006. Is liver damage dependent on the serotype of dengue virus? - A study in Mexico. *Dengue Bulletin WHO*.114-120
- Vázquez P. M. et al. 2011. Dengue serotypes in Mexico during 2009-2010. *Bol Med Hosp Infant Mex*.103-110
- Wang H. et al. 2000.Rapid antibody responses by low-dose, single-step, dendritic cell-targeted immunization. *PNAS*.847-852
- Webster P.D, Farrar J. y Rowland-Jones S. 2009. Progress towards a dengue vaccine *Lancet Infect Dis*. 678-87
- Wei H. et al. 2009. Immunity in Mice Cells via CD11c Molecules Induces Potent Antitumor Targeted Delivery of Tumor Antigens to Activated Dendritic. *Clin Cancer Res*.4612-21(2009)
- Wesolowski J. 2009. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol*.157-174
- Wilson K. y Walker J. 2000. *Principles & Techniques of Practical Biochemistry*. 5ta. Edition. Cambridge University Press. 791 pp.
- Whitehead, S. S., J. E. Blaney, A. P. Durbin y Murphy B. R.2007. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol*.518-528
- Wichmann O. et al. 2007. Severe Dengue Virus Infection in Travelers: Risk Factors and Laboratory Indicators. *J Inf Dis*.1089-96

- World Health Organization. 2009. Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and control.1-160
- World Health Organization. 2011. Guidelines on the Quality, Safety and Efficacy of Dengue Tetravalent Vaccines (Live, Attenuated).1-86
- Zambrano-Mora B. M. 2010. Revisión: Estado actual de las vacunas contra el Dengue. Perspectivas. Rev Biomed. 97-211
- Zheng A., M. Umashankar y Kielian M. 2010. In Vitro and In Vivo Studies Identify Important Features of Dengue Virus pr-E Protein Interactions. PLoS Pathogens.1-12

ANEXOS

I. Tabla de casos de Dengue reportados en América hasta la semana 44 del 2012

País o subregión	Semana ^a	Cinico	Casos de D y DS ^b reportados			Serotipo ^d	Dengue Severo ^e	Resumen por Subregión				
			Tasa de Incidencia ^c	Lab. Confirm.	Tasa de Incidencia ^c			Muertes	Poplación X 1000	Dengue	DSevero	Muertes
									(SD/D) x100			
Número de reporte de casos de Dengue (D) y Dengue Severo (DS) en América, por país: Figuras del 2012 (semana anotada para cada país)												
Semana epidemiológica/EW 44 (Actualizado 22 Noviembre 2012)												
Norte América												
Canada	44	0	0	0	DEN	0	0	0	0	0		
Estados Unidos ^a	44	95	0.03	95	DEN	0	0	313085	95	0		
Subtotal		95		95		0	0					
Centro América y México												
Belize	35	1,421	441.30	88	27.33	DEN	6	0	322	0.42		
Costa Rica	44	15,101	330.94	2,246	46.22	DEN1,2,3	33	0	4,563	0.22		
El Salvador	44	41,429	647.63	12,328	192.72	DEN 1,2,3,4	723	5	6,397	1.75		
Guatemala	44	7,936	67.90	1,354	11.59	DEN 1,2	42	16	11,667	0.53		
Honduras	42	11,816	140.92	4	0.05	DEN 1,2	2,103	2	8,365	17.80		
México	44	135,126	122.15	39,730	35.92	DEN 1,2,3,4	13,772	52	110,619	10.19		
Nicaragua	42	19,639	377.09	3,351	64.34	DEN 1,3	23	1	5,208	0.00		
Panamá	44	974	27.38	757	21.28	DEN 1,2,3	5	0	3,557	0.51		
Subtotal		233,442	154.87	59,858			16,707	76	150,738	7.16		
Andina												
Bolivia	42	37,029	380.68	6,299	64.76	DEN 2	2,011	37	9,727	5.43		
Colombia	44	44,651	194.65	5,510	24.02	DEN 1,3,4	1,199	43	22,939	2.69		
Ecuador	41	18,985	141.67	140	1.04	DEN 1,2,4	278	23	13,408	0.00		
Peru	44	19,360	65.59	1,047	3.55	DEN 1,2,3,4	149	22	29,515	0.77		
Venezuela	40	33,924	119.52	0	0.00	DEN 1,2,3,4	1,325	0	28,384	3.91		
Subtotal		153,959	148.08	12,996			4,962	125	103,973	3.22		
Cono Sur												
Argentina	44	2,043	5.10	226	0.56	DEN 2,3	0	0	40,091	0.00		
Brasil	42	561,765	293.39	110,135	57.52	DEN 1,2,3,4	3,662	236	191,461	0.65		
Chile ^b	36	25	0.55	25	0.55	DEN	0	0	4,537	0.00		
Paraguay ^d	44	33,786	506.31	2,463	36.91	DEN 2,4	119	69	6,673	0.35		
Uruguay	44	0	0.00	0	0.00	DEN	0	0	3,385	0.00		
Subtotal		597,639	242.78	112,849			3,781	305	246,167	0.63		
Caribe Hispano												
Cuba ^f	0	0	0.00	0	0.00	DEN	0	0	11,254	...		
República Dominicana	44	6,315	74.34	830	9.77	DEN 2	110	30	8,495	1.74		
Puerto Rico	42	7,068	189.43	2,919	76.34	DEN 1,2,3,4	25	6	3,726	0.35		
Subtotal		13,373	56.97	3,749			135	36	23,475	1.01		

Caribe inglés y Francés*										
Islas Virgenes Americanas	33	0	0	0.00	0	DEN	0	0	0	0.00
Anguilla ^a	28	7	53.85	DEN 4	0	DEN 4	0	0	13	0.00
Antigua y Barbuda ^a	12	10	11.24	DEN	0	DEN	0	0	89	0.00
Aruba	0	0	0.00	DEN	0	DEN	0	0	102	0.00
Bahamas ^a	11	3	0.88	DEN	0	DEN	0	0	342	0.00
Barbados ^a	38	912	335.29	DEN 1,2,4	4	DEN 1,2,4	1	272	0.44	0.11
Bermuda ^a	16	0	0.00	DEN	0	DEN	0	65	0.00	0.00
Islas Virgenes Británicas ^a	28	12	50.00	DEN	0	DEN	0	24	0.00	0.00
Islas Cayman ^a	44	53	115.22	DEN 1	0	DEN 1	0	46	0.00	0.00
Curacao ^a	8	117	82.39	DEN	0	DEN	0	142	0.00	0.00
Dominica ^a	24	3	4.23	DEN 1	0	DEN 1	0	71	0.00	0.00
Guiana Francesa	35	662	321.44	DEN 1,2,4	0	DEN 1,2,4	0	206	0.00	0.00
Granada ^a	24	68	61.82	DEN	0	DEN	0	110	0.00	0.00
Guadalupe	38	824	204.98	DEN 1	5	DEN 1	0	402	0.00	0.00
Guyana	44	2,189	286.89	DEN 1,2,4	20	DEN 1,2,4	0	763	0.91	0.00
Haiti	34	240	1.85	DEN	0	DEN	0	13,000	0.00	0.00
Jamaica ^a	37	663	23.50	DEN	27	DEN	0	2,821	4.07	0.00
Marinique	39	911	229.47	DEN 1	0	DEN 1	0	397	0.00	0.00
Montserrat ^a	16	0	0.00	DEN	0	DEN	0	5	0.00	0.00
Antillas Holandesas	12	121	53.78	DEN	0	DEN	0	225	0.00	0.00
St. Bartolome	35	32	355.56	DEN	2	DEN	0	9	0.00	0.00
TOTAL	1,006,292	184.43	192,267		25,843		552	545,636	0.05	
Subtotal	7,784	36.57	2,720		258		10	21,283	3.31	0.13
St. Kitts y Nevis ^a	11	2	4.06	DEN 4	0	DEN 4	0	49	0.00	0.00
St. Lucia	32	10	6.13	DEN	0	DEN	0	163	0.00	0.00
St. Martin	24	59	159.46	DEN	0	DEN	0	37	0.00	0.00
St. Vincent y las Granadín	36	91	85.85	DEN	4	DEN	0	106	4.40	0.00
Suriname	35	781	180.37	DEN 1,2,4	186	DEN 1,2,4	9	433	25.35	1.15
Trinidad y Tobago ^a	20	0	0.00	DEN	0	DEN	0	1,358	0.00	0.00
Islas Turcas y Caicos ^a	20	14	42.42	DEN	0	DEN	0	33	0.00	0.00

^a Semana Epidemiológica para la que se dispone de información
^b Casos de Dengue + Dengue Severo
^c Incidencia / 100,000 pop. (para dato)
^d Sero tipos circulantes

* Figuras desde el Caribe Inglés previsto por el CAREC
** Población en riesgo
*** Importado

CFR = Tasa de letalidad del Dengue
SD/D = SD/D proporción %
Fuente: Reportes de países a la PAHO.

^e Casos de DS y complicado
^f Sin reportes
^g Casos solamente confirmados
^h Casos de la Isla de Pascua

ⁱ Datos finales reportados

II.

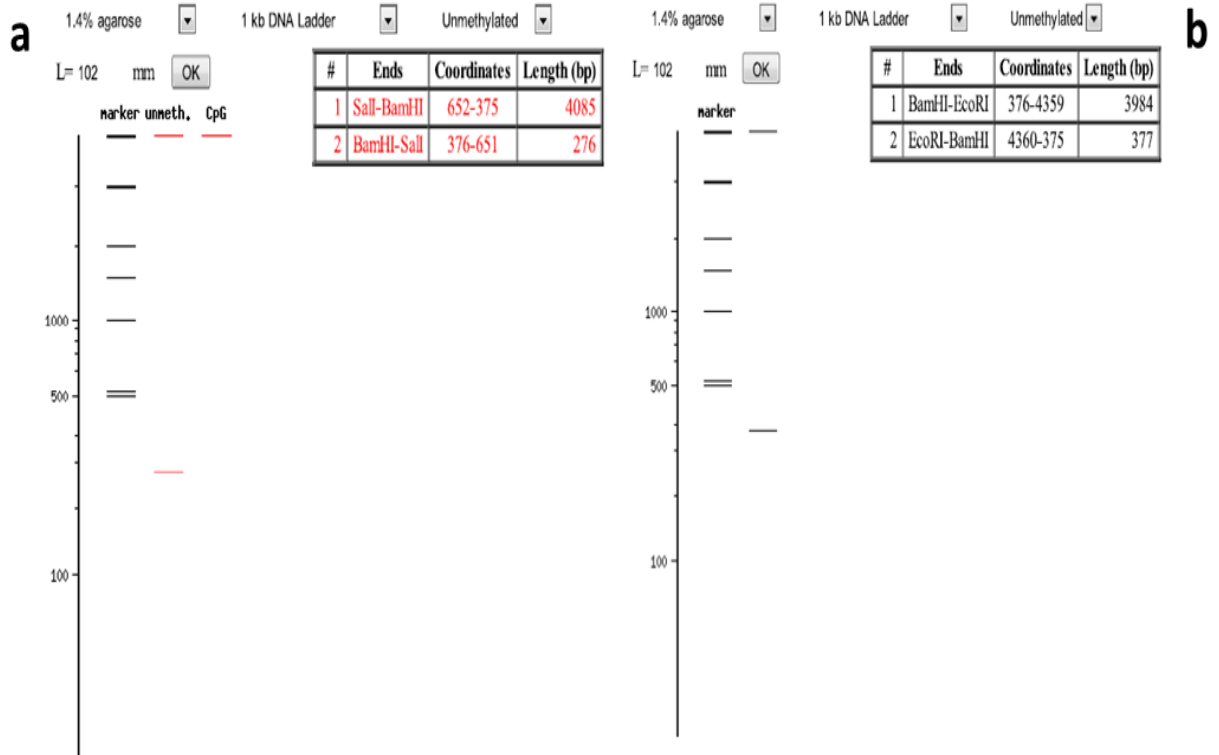


Figura 23. Digestiones teóricas del vector pBR322. a) Se muestra las dos bandas producto de una doble digestión con BamHI- Sall en ADN no metilado (**unmeth**). Se muestra el producto de del corte con las mismas enzimas en ADN metilado (CpG). **b)** Se meustra las bandas obtenidas por el corte con las enzimas EcoRI-BamHI. Realizadas en el programa NEBcutter V2.0 New englandTM.

IV

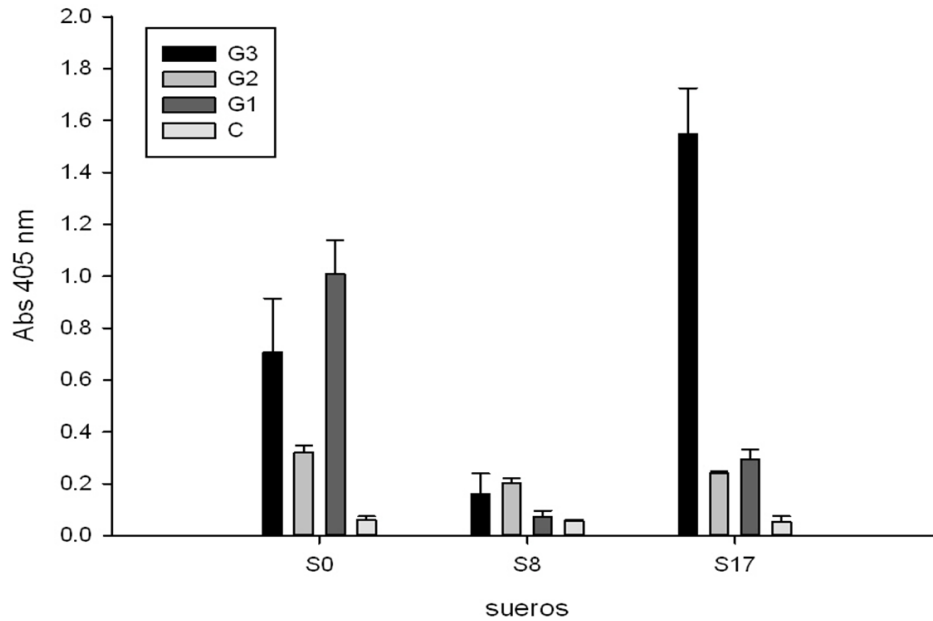


Figura 25. ELISA de reconocimiento de IgG-anti vNAR G4. Se observa la respuesta de tres sueros de ratone para cada grupo inoculo al confrontarlo con un extracto bacteriano que contiene el anticuerpo vNAR G4 expresado. S0= suero del día 0 antes de la inoculación, S8=sueros del día 8 post-inoculación, S17= sueros del día 17 post-inoculación usados para los ensayos de hemoaglutinación, G3= sueros pertenecientes al grupo control inoculado con PBS, G2= sueros pertenecientes al grupo inoculado con la proteína DIII, G1= sueros pertenecientes al grupo inoculado con la proteína quimérica GD, C= control usado para la ELISA. Las barras indican la desviación estándar (n=3).