



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS (MICROBIOLÓGICAS)

ORIENTACIÓN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA

**RECONOCIMIENTO DE SECUENCIAS PROTEÍNICAS
CONSERVADAS DEL VIRUS DEL DENGUE,
CANDIDATAS A INMUNÓGENOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LBM. ERÁNDENI LORENA MARTÍNEZ JIMÉNEZ

Asesora

D.C Rosa del Carmen Rocha Gracia

Co-asesor

D.C Miguel Antonio García Knight

Puebla, Pue. Enero 2017.

APOYOS

Institucionales

Este proyecto fue apoyado por el Dr. Miguel Antonio García Knight quien recibió apoyo por parte del programa de Repatriación del CONACYT (solicitud 264598).

Este proyecto fue apoyado por el fondo Newton Institutional Links otorgado al Prof. Arturo Reyes Sandoval de la Universidad de Oxford, Reino Unido.

Este proyecto fue apoyado por un apoyo especial de parte de la VIEP para el cumplimiento de la estancia laboral del Dr. Miguel Antonio García Knight y la colaboración Interinstitucional entre la BUAP, el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán y la Universidad de Oxford, Reino Unido.

AGRADECIMIENTOS

ÌNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Generalidades

Epidemiología

México

Michoacán

Respuesta inmune

Innata

Linfocitos T

ANTECEDENTES

Construcción del inmunógeno

Vacunas

JUSTIFICACIÓN

OBJETIVOS

Generales

Específicos

DIAGRAMA DE TRABAJO

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Aislamiento y almacenamiento de
muestras

Diagnóstico

Elispot

Bioinformática

Localización de péptidos *in situ*

Análisis de datos

RESULTADOS

DISCUSIÓN

PERSPECTIVAS

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
AD	Agente Diluyente
ADE	“Antibody dependent enhancement”
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosindifosfato
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATP	Adenosintrifosfato
BCIP/NBT	“5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium”
C	Cápside
°C	Grados Centígrados
CD4	Cúmulo de Diferenciación 4
CD8	Cúmulo de Diferenciación 8
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
CDMX	Ciudad de México
CHIKV	“ <i>Chikungunya Virus</i> ”
CICM	Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
CO ₂	Dióxido de Carbono
CYD-TDV	“ <i>Chimeric Yellow Fever–Dengue virus (DENV) -Tetravalent Dengue Vaccine</i> ”
DGE	Dirección General de Epidemiología
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato
DSFU	“ <i>Dengue Spot Forming Unit</i> ”
E	Envoltura
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EU	Estados Unidos
ELISPOT	“ <i>Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay</i> ”
FASTA	“ <i>The Fast Adaptive Shrinkage/ Thresholding Algorithm</i> ”
Fc	“ <i>Fragment crystallizable</i> ”
FcgR	“ <i>Fragment crystallizable gamma receptor</i> ”
FD	Fiebre por dengue
FHD	Fiebre Hemorrágica por Dengue
GSK	GlaxoSmithKline
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
ICUAP	Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
IFN	Interferon

IFN- γ	Interferon - Gamma
IFNAR	Receptor de Interferon α/β
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
INDRE	Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica
IR-9	<i>"Interferon Regulatory Factor"</i>
JAK	<i>"Janus Kinase"</i>
Kb	Kilo bases
LESPM	Laboratorio Estatal de Salud Pública
LMCyH	Laboratorio de Microbiología de la Comunidad y Hospitalaria
LT	Linfocito T
M	Molar
Mg	Magnesio
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
MUSCLE	<i>"Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation"</i>
MVA	<i>"Modified Vaccinia Ankara"</i>
NaCl	Cloruro de Sodio
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NIAID	Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas
NIH	Instituto Nacional de Salud
NK	<i>"Natural Killer"</i>
nm	nanómetros
NMRC	Centro Médico de Investigación de la Naval
NS	<i>"No structural"</i>
NTPasa	Nucleótido Trifosfatasa
ORF	<i>"Open Reading Frame"</i>
PAHO	<i>"Pan American Health Organization"</i>
pb	Pares de bases
PBMC	<i>"peripheral blood mononuclear cell"</i>
PBS	Buffer Fosfato Salino

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial Hidrógeno
PHA	Fitohemaglutinina
Pm	penicilina
prM	Precursor Proteína de Membrana
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
R10	Medio RPMI-1640 suplementado con 2mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 ug/ml estreptomina y 10% suero fetal bovino inactivado por calor
RE	Retículo Endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	<i>"Roswell Park Memorial Institute medium"</i>
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
Th	Linfocito T ayudador
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TWEEN	Polisorbato
U	unidades
ug/ml	Microgramos por mililitro
UK	<i>"United Kingdom"</i>
s	segundos
SCD	Síndrome de Choque por Dengue
SDS	Dodecilsulfato Sódico
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
Sm	Estreptomina
STAT	two Signal Transducer and Activator of Transcription
VFA	Virus de la Fiebre Amarilla
WRAIR	Instituto de Investigación Walter Reed Amy

INDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1: Organización del genoma del virus del dengue

Figura 2: Estructura del virión en sus diferentes estados y sus principales componentes.

Figura 3: Ciclo de replicación del virus del dengue.

Figura 4: Ciclo de transmisión del Dengue.

Figura 5: Incidencia del virus del Dengue a través de los años.

Figura 6: Co-circulación de los 4 serotipos más prevalentes en diferentes regiones de Latino América.

Figura 7: Incidencia y serotipos de casos del dengue reportados en la semana 38 del 2016.

Figura 8: Casos confirmados de Fiebre por dengue hasta la semana 38 del año 2016, por entidad federativa.

Antecedentes

Figura 9: Resultado del análisis bioinformático de las secuencias globales de dengue serotipos 1-4.

Figura 10: Características de los inmunógenos desarrollados.

Resultados

Figura 11: Estimación del grado de conservación entre la primera secuencia del inmunógeno (regiones de NS3-NS5) y alineamiento de las regiones de las secuencias del proteoma de VDEN 1-4 latinoamericanas.

Figura 12: Estimación del grado de conservación entre la primera secuencia del inmunógeno (regiones de NS3-NS5) y alineamiento de las regiones de las secuencias del proteoma de VDEN 1-4 latinoamericanas.

Figura 13: Comparación de respuesta celular hacia péptidos altamente conservados del virus del dengue entre diferentes grupos.

Figura 14: Magnitud de respuesta celular hacia péptidos altamente conservados del virus del dengue.

Figura 15: Respuesta celular hacia las regiones no estructurales del virus del dengue.

Figura 16: Estrategia de análisis para los ensayos de ELISPOT γ .

Figura 17: Respuesta de los pacientes DENV positivo a los subgrupos de péptidos correspondiente a NS3.

Figura 18: Respuesta de los pacientes DENV positivo a los subgrupos de péptidos correspondiente a NS4.

Figura 19: Respuesta de los pacientes DENV positivo a los subgrupos de péptidos correspondiente a NS5.

Figura 20: Análisis de ELISPOT IFN γ para determinar el péptido o los péptidos inmunodominantes de la proteína NS3.

Figura 21: Análisis de la secuencia del péptido inmunodominante de la proteína NS3.

Figura 22: Análisis de ELISPOT IFN γ para determinar el péptido o los péptidos inmunodominantes de la proteína NS4.

Figura 23: Análisis de ELISPOT IFN γ para determinar el péptido o los péptidos inmunodominantes de la proteína NS5.

Figura 24: Análisis de la secuencia del péptido inmunodominante de la proteína NS5.

Figura 25: Modelo de la proteína NS3 de DENV analizado en el programa UCSF Chimera.

Figura 26: Modelo de la proteína NS4 de DENV analizado en el programa UCSF Chimera.

Figura 27: Modelo de la proteína NS5 de DENV analizado en el programa UCSF Chimera.

INDICE DE TABLAS

Antecedentes

Tabla 1: Vacunas del dengue en desarrollo.

Tabla 2. Características de los pacientes.

Tabla 3. Resultados de la predicción de los péptidos DENV investigados

RESUMEN

El dengue es la enfermedad infecciosa transmitida por vector más diseminada del mundo, su agente causal es el virus del dengue. Cada año aumenta la población en riesgo debido a la urbanización y la expansión en el hábitat del mosquito *Aedes aegypti*. Hasta el momento no existe un tratamiento específico, el vector no se ha controlado y la vacuna líder es considerada como refuerzo ya que es eficaz en casos específicos y no contra todos los serotipos como preventiva. Por lo tanto el desarrollo de estrategias para realizar una vacuna efectiva contra la infección y las manifestaciones clínicas es importante. En este trabajo se estudió *in vitro* la respuesta celular de pacientes infectados con el virus del dengue hacia cuatro inmunógenos experimentales compuesto de secuencias altamente conservadas del genoma viral (VAC-A, B, C y D). Se realizó un análisis bioinformático para comparar la conservación de las secuencias que codifican los péptidos propuestos en VAC-A y VACB y las secuencias del genoma de dengue reportadas en países de Latinoamérica. La media global de conservación de VAC-A fue de 0.98 (DE= 0.08) y de VAC-B fue de 0.86 (DE= 0.2281), por lo que, como era de esperarse VAC-A resultó ser significativamente más conservada que VAC-B. Posteriormente, se analizó la respuesta de IFN- γ hacia los inmunógenos usando la técnica de ELISPOT, principalmente en pacientes cursando una infección aguda, provenientes del municipio de Lázaro Cárdenas, Michoacán, una zona endémica. Los pacientes se agruparon en 18 dengue positivos, 8 dengue negativos y 4 control. En una primera etapa se analizó la repuesta celular hacia los grupos de péptidos agrupados según la proteína no estructural a la que pertenece. Los pacientes dengue positivo tuvieron una repuesta positiva alta hacia los péptidos una media 216.7 unidades formadoras de spots dengue-específicas (DSFU)/ 10^6 células (desviación estándar [SD]=16.88-207.5) los pacientes dengue negativos con una media de 14.38 DSFU/ 10^6 células (SD= 16.84) y los pacientes control, la una media de 13.75 DSFU/ 10^6 células (SD= 21.36). La respuesta de los pacientes dengue positivos fue significativamente mayor a la de los pacientes dengue negativo (P=0.02) y a la del grupo control (P=0.04). En los pacientes que respondieron a uno o más grupos de péptidos (n=15[83.3%]) la magnitud de la respuesta hacia los subgrupos de péptidos fue significativamente mayor hacia la proteína NS3 con un media de 175.2 DSFU/ 10^6 células (SD= 328.9). NS4 con una media de 32.19 DSFU/ 10^6 células (SD= 88.26), y del grupo NS5 se obtuvo una respuesta global con una media de 66.56 32.19 DSFU/ 10^6 (SD= 184). Se observaron diferencias significativas entre las repuesta global de NS3 en comparación de NS4 y NS3 en comparación de NS5 (NS3 vs. NS4AB, P = 0.0005; NS4AB vs NS5= 0.5061; y NS3 vs NS5, P = 0.0060) Se realizó el análisis de los subgrupos de péptidos para identificar el subgrupo responsable de la respuesta (n=5(27.6%)), para identificar los péptidos son capaces de inducir la respuesta celular. Se realizó el análisis de los péptidos que conforman cada uno de los subgrupos con respuesta positiva. Mediante el análisis de los datos, se identificaron dos péptidos responsables de la respuesta, se puede determinar con certeza que dichos péptidos inducen respuesta ya que registraron respuestas altas. Se realizó la verificación de los datos mediante un análisis *in silico* usando la predicción de epítopes y el perfil de HLA de los pacientes. Los péptidos responsables de la respuesta son TPEGIIPALF de la proteína NS3 y lo restringe HLA-B*35:03 y QMAMTDTTPFGQQRVFKEKV y lo restringe HLA-C*08:01.Finalmente, se analizó la posición de los péptidos identificados dentro de la estructura de la proteína nativa.

INTRODUCCIÓN

Generalidades

El dengue es la enfermedad viral más diseminada transmitida por un vector. El vector primario es el mosquito del género *Aedes*, el cual prevalece en los trópicos y subtropicos y está muy relacionado con los hábitats humanos (Gloria-Soria *et al.*, 2014). El virus del dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae*, la cual está compuesta por varios patógenos del hombre que, además del DENV, incluyen el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la encefalitis de St. Louis, el virus de la encefalitis del Nilo Occidental, los virus de las encefalitis transmitidos por garrapata y el virus de la Hepatitis C. El DENV es un virus de clase IV, según la clasificación de Baltimore y como algunos virus de esta familia, es transmitido por un vector artrópodo; por lo tanto también se clasifica al DENV como un arbovirus (arthropod borne virus)(Norkin, 2010).

Debido a su impacto y prevalencia, el DENV es el arbovirus de más importancia médica en el mundo, causando alrededor de 100 millones de casos de dengue febril y 250,000 casos de dengue severo en el mundo (Norkin, 2010). Estas patologías pueden ser causadas por cualquiera de los 4 serotipos de DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4). Una infección provee inmunidad de por vida contra el serotipo infeccioso y protección cruzada contra los otros serotipos al menos por 2 años (van Panhuis *et al.*, 2014). Sin embargo, una infección secundaria con un serotipo heterólogo está relacionado con el aumento del riesgo de padecer las formas severas de dengue que pueden ser mortales (van Panhuis *et al.* 2014).

El genoma del dengue y la partícula viral

El DENV es un virus envuelto con cápside en forma de icosaedro, con un genoma de cadena sencilla de ARN de polaridad positiva de ~11 Kb (Rodríguez-Roche y Gould, 2013) que codifica para 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales (NS) en el siguiente orden: 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' (Y. Zhang *et al.*, 2003). Por fuera del marco de lectura del ARN genómico se encuentran las regiones 5' y 3' no codificantes. El extremo 5' posee una estructura de *cap* tipo I (m7GpppAmpN2) y carece de cola poliadenilada en su extremo 3' (Clyde *et al.* 2006). Este genoma se utiliza directamente

como ARNm, el cual posee un único marco de lectura abierto (ORF) que es traducido dando una poliproteína (Mamani, 2013). La poliproteína es glicosilada por glicosiltransferasas celulares y es adherida por una combinación de proteasas virales y del hospedero para la liberación de tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales (Kaufmann y Rossmann, 2011). Las proteínas no estructurales mejor caracterizadas son la NS3 y la NS5 ya que se unen con otras proteínas del virus como con proteínas del hospedero para formar el complejo de replicación. La NS3 tiene una combinación de actividades Helicasa/NTPasa, serin proteasa y ARN – trifosfatasa (Assenberg et al. 2009). La NS5 tiene dominios funcionales que incluyen una S-adenosil metiltransferasa y actividad de ARN polimerasa (Davidson, 2009). Las funciones de las proteínas NS1, NS2A, NS4A y NS4B no están determinadas del todo pero presuntivamente están implicadas en la replicación y el ensamblaje – maduración del virus y se ha encontrado que se une a NS3 y NS5 para, posiblemente regular su función (Assenberg *et al.* 2009). Las proteínas estructurales son la cápside (C), la cual se asocia con el ARN genómico para formar el centro de la nucleocápside, la proteína de envoltura (E) que está implicada en la unión con el receptor, fusión de membrana y ensamblaje viral y la proteína de pre-membrana (prM) que facilita el plegamiento y tráfico de la proteína E durante la biogénesis de la partícula viral (Figura 1).

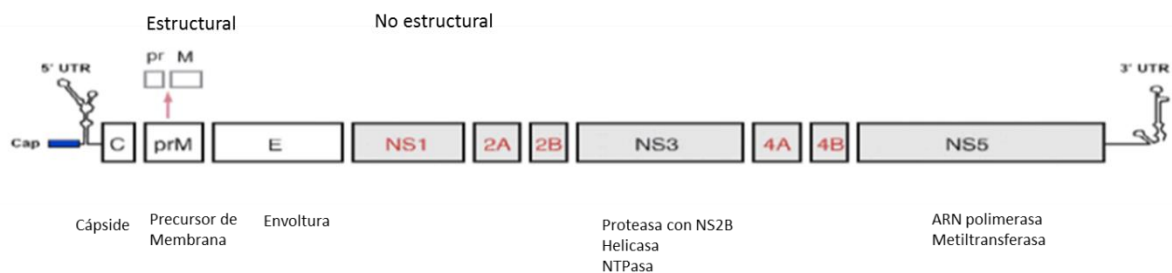


Figura 1: Organización del genoma del virus del dengue. Composición del genoma del virus de Dengue, que se traduce en una poliproteína que da origen a las 10 proteínas virales. La parte estructural la conforman las proteínas de la cápside (C), precursor de membrana (prM) y la envoltura (izquierda) y la parte no estructural las proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Modificado de Mamani 2013).

El virión del DENV es una partícula pequeña, esférica, de 30 a 35 nm de diámetro. Tres proteínas virales componen al virión: la proteína de envoltura (E), la proteína de Cápside (C)

y la proteína de membrana (M) (Mamani 2013). La superficie de las partículas virales está rodeada de una bicapa lipídica que contiene 180 copias tanto de la proteína de membrana (M) como de la proteína de envoltura (E), todas estas copias se encuentran insertadas en la envoltura a través de dos dominios transmembranales antiparalelos (Zhang *et al.*, 2003). El estado inmaduro del virión, se caracteriza por la presencia de proyecciones prominentes o picos, el cuál para su maduración sufre rearrreglos conformacionales de la glicoproteína E (Zhang *et al.* 2003). La proteína E se dispone formando homodímeros orientados “cabeza con cola” que se encuentran paralelos a la envoltura viral, por lo que la superficie del virión, en su estado maduro, es lisa (Mamani, 2013). En el interior del virión maduro se encuentra el núcleo de la glicocápside el cual contiene ARN genómico rodeado de múltiples copias de la proteína C, dicho núcleo se encuentra envuelto dentro de una bicapa lipídica derivada del retículo endoplásmico de la célula hospedera (Zhang *et al.*, 2003). En la figura 2 se muestra el virión en sus diferentes estadios para llegar al estado maduro ya que en este estado el virión es capaz de infectar otras células.

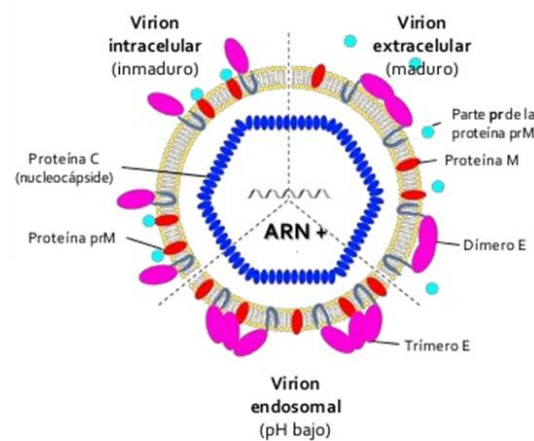


Figura 2: Estructura del virión en sus diferentes estados y sus principales componentes. Se muestra una caricatura de la partícula viral del virus del dengue y los cambios conformacionales que sufren las proteínas durante el proceso de maduración. A diferencia del virión maduro las partículas prM pueden fusionarse con las células en condiciones ácidas. La partícula viral se vuelve fusogénica una vez que madura en el endosoma ácido, se forma un trímero de glicoproteína E alterando las propiedades antigénicas. (Y. Zhang *et al.* 2003)

Ciclo replicativo de DENV

El mecanismo preciso de la entrada del virus del dengue a la célula no está bien dilucidado; sin embargo, muchos receptores putativos en humanos y mosquitos se han visto implicados

en la mediación de la entrada a diferentes tipos celulares, incluyendo el receptor a manosa y lectina tipo C (Zybert *et al.* 2010). Las primeras células blanco de la infección por DENV todavía son desconocidas; sin embargo, algunos estudios han identificado monocitos, macrófagos, células dendríticas (maduras e inmaduras), como posibles blancos de infección (Balsitis *et al.*, 2009). El DENV infecta las células vía endocitosis mediada por clatrina (Van Der Schaar *et al.*, 2008).

El ciclo comienza con la unión del virus a su receptor celular, seguido de la internalización de las partículas virales hasta un compartimento endocítico. La acidificación de la vesícula endocítica conlleva a un re-arreglo de la glicoproteína E lo cual permite la fusión de membranas y la liberación del ARN viral al citoplasma. Una vez liberado en el citoplasma celular, el genoma viral da inicio a los procesos de traducción y replicación (Figura 3) (Mamani, 2013).

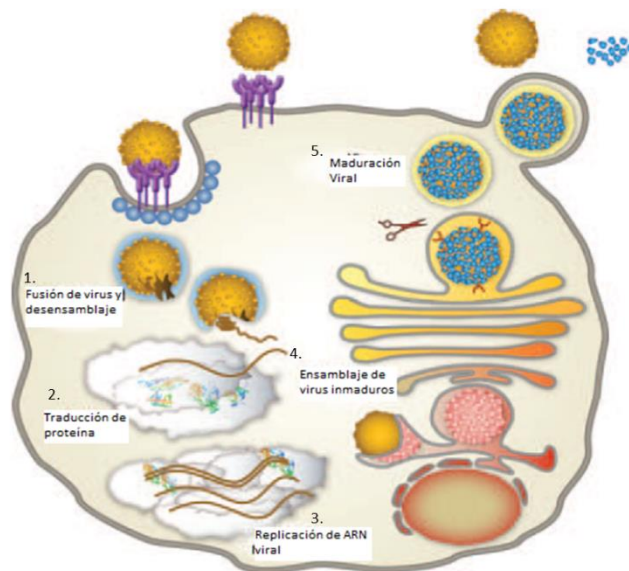


Figura 3: Esquema del ciclo de replicación del virus del dengue. 1. El virus del dengue se une al receptor en la célula blanco y el virión es internalizado vía endocitosis. Mediante la acidificación de las vesículas endocíticas, la glicoproteína E de la envoltura viral, sufre rearrreglos conformacionales que permiten la fusión entre la envoltura y la vesícula, mediante esta fusión el ARN viral es liberado en el citoplasma. 2. El ARN viral es traducido en el retículo endoplásmico (RE) para producir proteínas virales. 3. Nuevo ARN viral, proteínas virales y estructuras membranales son producidas en RE. 4. El ensamblaje de viriones inmaduros se realiza en el lumen del RE. 5. La unión del precursor de la proteína de membrana (prM) por la enzima furina del hospedero lleva a la maduración de los viriones los cuales son liberados por la célula, además, algunas proteínas virales son expresadas en la membrana celular o también son secretadas o incluso algunos viriones inmaduros son secretados (Modificado de Lauglin *et al.*, 2012).

La traducción y la replicación del genoma de los virus ARN positivos ocurren asociadas a estructuras membranosas (Miller *et al.*, 2008) y en particular en el caso de DENV estos procesos ocurren en estrecha asociación a membranas y vesículas derivadas del retículo endoplásmico (Mamani, 2013). Durante el proceso de traducción, las secuencias de translocación y de detenimiento de la translocación de la poliproteína determinan su topología en la membrana del retículo (Miller *et al.*, 2006).

La replicación de DENV induce el rearrreglo de la membrana celular del retículo endoplásmico a estructuras intracelulares especiales para la síntesis de proteínas virales y nuevo ARN viral y el ensamblaje de viriones inmaduros en el lumen del RE (Rothman, 2011). La maduración de los viriones implican un rearrreglo de la proteína E y así como la unión de prM por la enzima furina del hospedero (Rothman, 2011) (Lindenbach y Rice 2007). Una vez realizado este proceso se libera el virión completo al igual que partículas no-infecciosas inmaduras las cuales contienen el precursor de la proteína de membrana (prM)(Balsitis *et al.*, 2009). Adicionalmente, la proteína no estructural NS1 también es secretada por la célula hospedera y es expresada en su membrana plasmática. Los viriones maduros son liberados por la célula infectada los cuáles infectarán otra célula blanco comenzando un nuevo ciclo.

Transmisión

El dengue se transmite entre la población humana a través de las picaduras de los mosquitos hembra infectados (Figura 4). Muchas especies del género *Aedes*, de la familia de los culícidos, son conocidos por transmitir DENV, pero el principal vector es *Aedes aegypti* que es también el vector del virus de la fiebre amarilla (VFA); además, esta especie transmite otras arbovirosis, como el Chikungunya y el Zika, en el primer caso es causada por el virus de Chikungunya (CHICKV), un Alfavirus de la familia Togaviridae. El virus del Zika es un virus emergente perteneciente a la misma familia del dengue, causante de enfermedades neurológicas en neonatos (Dikhit *et al.*, 2016) Tanto Chikungunya como Zika tienen síntomas similares al dengue, que los hace difícil distinguir clínicamente (Mamani, 2013).

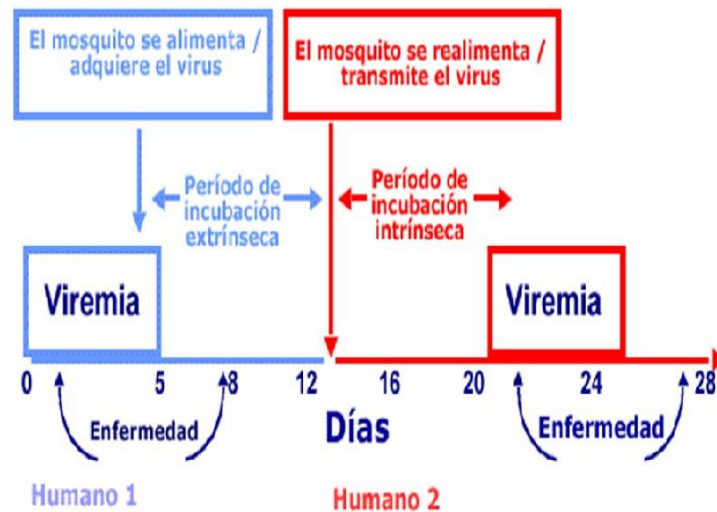


Figura 4: Ciclo de transmisión del Dengue. El ciclo de transmisión comienza cuando el mosquito se alimenta de una persona que se encuentra en el período de viremia, una vez que el mosquito ha adquirido el virus, el mosquito se realimenta de otro humano transmitiendo ahora el virus el cual comenzará su ciclo replicativo en un nuevo hospedero.

Cuadro clínico

La mayoría de los pacientes infectados con DENV cursan con una infección asintomática, aunque cuando es sintomática el virus puede manifestarse en un espectro de formas clínicas (de la Cruz-Hernández *et al.*, 2013), con evolución clínica impredecible. La mayoría de los pacientes se recuperan después de un curso de manifestaciones clínicas no severas y autolimitantes; sin embargo, una pequeña proporción de pacientes progresan a la enfermedad severa, caracterizada por extravasación plasmática con o sin hemorragia (World Health Organization, 2009). Los cambios en la epidemiología del dengue a través de los años ha llevado a la necesidad de reclasificar la enfermedad, anteriormente se agrupaba en tres categorías (World Health Organization, 2009): pacientes presentando fiebre indiferenciada, fiebre por dengue (FD), que podía evolucionar a las formas severas del dengue que se conocían como fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y síndrome de choque por dengue (SCD) (Dick *et al.*, 2012). Sin embargo, en situaciones clínicas junto con el aumento de manifestaciones de la forma severa, existían muchas dificultades en los

criterios para determinar si el paciente presentaba o no FHD. Actualmente la clasificación de la enfermedad es por niveles de severidad, así que se determina como dengue no severo con o señales de alarma y dengue severo, la cual es usada de forma práctica por los clínicos. Las manifestaciones severas de dengue están asociadas en su mayoría, pero no exclusivamente con infecciones secundarias heterotípicas de cualquiera de los 4 serotipos a consecuencia del incremento dependiente de anticuerpos o en su siglas en inglés ADE (Rodríguez-Roche y Gould, 2013), un fenómeno que se discutirá más adelante.

El dengue no severo sin signos de alarma es conocido comúnmente como fiebre quebranta huesos que se caracteriza por fiebre alta, jaqueca frontal, sarpullido, dolor en espalda y huesos, dolor retro-orbital, seguido de una variedad de síntomas clínicos como mialgia, artralgia, vómito y debilidad que dura hasta una semana, desde la primera exposición al virus. Manifestaciones hemorrágicas menores como petequias se han observado en algunos pacientes. Generalmente es autolimitada y muchos pacientes se recuperan sin complicaciones alrededor de 10 días después del curso de la enfermedad (Norkin, 2010). Sin embargo dentro del dengue no severo existe signos de alarma en los pacientes, en los cuales requieren observación e intervención médica, se caracteriza por presentar vómito persistente, pérdida de sangre en mucosas, dolor abdominal, acumulación de fluidos, incremento en hematocrito y con una rápida pérdida de plaquetas (World Health Organization, 2009).

El dengue severo es la forma más grave de la enfermedad y ocurre aproximadamente en un 5% de los casos de infección por dengue (Rodríguez-Roche y Gould, 2013). El período crítico empieza al momento de la disminución de la fiebre aunque las manifestaciones hemorrágicas pueden ocurrir 24 horas antes (Rodríguez-Roche y Gould, 2013). Los criterios que consideran para un dengue severo son: extravasación del plasma, siendo el evento fisiopatológico más significativo para la determinación de la severidad de la enfermedad, que puede llevar a SCD y acumulación de fluido con alteración respiratoria, hemorragia severa y falla orgánica severa (World Health Organization, 2009)

Durante este periodo crítico, el monitoreo clínico del paciente es esencial para poder detectar signos característicos de dengue severo. Algunos pacientes pueden progresar hacia SCD manifestando dolor abdominal intenso o dolor a la palpación, vómito persistente, pulso débil e hipotensión. Si el incremento de la permeabilidad vascular progresa a un colapso vascular, lo subsecuente es usualmente fatal como resultado de un SCD irreversible. Además de los cuadros clínicos previamente mencionados también se reconocen otras manifestaciones clínicas asociadas a la infección por DENV, por ejemplo: encefalitis, miocarditis, hepatitis, colecistitis, mielitis y colitis aguda (Wasay *et al.*, 2008).

Diagnóstico

Los exámenes sensibles y específicos de diagnóstico son muy importantes ya que no solo sirven para la confirmación de una infección por dengue, también se utilizan para estudios epidemiológicos, diagnóstico diferencial, detección temprana de casos severos, investigación académica, desarrollo de vacunas entre otros (World Health Organization, 2009). Los métodos de diagnóstico por laboratorio para la confirmación de dengue involucran pruebas de detección del virus, detección del ARN viral, del antígeno o el anticuerpo, por lo general son de gran ayuda al comienzo de los síntomas, mientras que exámenes que miden inmunoglobulinas son útiles entre los 4-6 días después del curso de la enfermedad. Una combinación de este tipo de ensayos puede mejorar tanto la sensibilidad como la especificidad del diagnóstico, distinguiendo al dengue de otras condiciones con signos clínicos y síntomas parecidos como la influenza (Laughlin *et al.*, 2012).

La respuesta a la infección varía según el estado inmunológico del paciente, en una primera infección el paciente desarrolla una respuesta primaria de anticuerpos caracterizada por un lento incremento de anticuerpos específicos. Los anticuerpos tipo IgM son el primer isotipo de inmunoglobulinas en aparecer y son detectables en los primeros días de la infección e incrementan hasta 2 semanas después de los síntomas y los niveles van bajando hasta ser indetectables después de los 2 o 3 meses de la infección. El segundo isotipo en aparecer es IgG, los niveles de esta inmunoglobulina son detectables en poca cantidad al final de la

primera semana de la enfermedad, y van incrementado lentamente y siguen siendo detectables después de meses e incluso de por vida (Alcon *et al.*, 2010).

En una infección secundaria, los títulos de anticuerpos aumentan rápidamente y reacciona de manera general a otros flavivirus. La inmunoglobulina dominante es la IgG, la cual se detecta a niveles altos, incluso en la fase aguda a diferencia de la IgM en esta tipo de infecciones que se encuentran en bajos niveles o incluso indetectables, esto es de gran ayuda para distinguir entre infecciones primarias y secundarias (Falconar *et al.*, 2006).

Muchas técnicas de diagnóstico por laboratorio han sido desarrolladas para el manejo del paciente y su control. La elección del método de diagnóstico dependerá del propósito para el cual se realice el examen (World Health Organization, 2009).

Sin embargo, aunque el dengue severo puede ser tratado con éxito con la administración temprana de fluidos y electrolitos, es importante distinguir los pacientes con dengue no severo que pudieran progresar hacia dengue severo o incluso llegar a choque, de la mayoría que se pudieran recuperar sin consecuencias, por lo que se siguen haciendo investigaciones intensivas para encontrar biomarcadores de etapa temprana que de manera confiable e inminente identifiquen si el paciente progresará a esta etapa (Srikiatkachorn y Green, 2009) por lo que dichas investigaciones se han centrado en factores que participan en mecanismos patológicos, como elementos del sistema de complemento, el sistema inmune innato, citocinas y componentes sanguíneos fácilmente medibles.

Tratamiento

En la actualidad no hay tratamientos específicos contra el virus del dengue, en la mayoría de los casos solo se utilizan paliativos para aminorar los síntomas de dengue no severo. El dengue severo, la mayoría de las veces es prevenible si existe un suministro adecuado y temprano de fluidos y cuidados de apoyo; sin embargo, hay una gran necesidad de tratamientos específicos sobre todo para los pacientes que presentan estados avanzados de la enfermedad. El mayor reto que enfrenta el desarrollo de fármacos es la falta de un animal inmunocompetente para replicar la patología del dengue como en humanos. La

evidencia de que el FHD y el SCD en humanos están asociados con altos títulos virales y periodos prolongados de viremia (Vaughn *et al.*, 2000) apoyan la utilidad clínica de las drogas antivirales. Fármacos para enfermedades crónicas como el flavivirus de la hepatitis C han sido propuestos como un posible tratamiento contra el dengue. Otras aproximaciones terapéuticas prometedoras incluyen drogas que actúan directamente en las funciones virales codificadas como ARN polimerasa, helicasa, proteasa y metiltransferasa, drogas que actúen sobre las funciones esenciales del hospedero para la replicación viral, y drogas donde el blanco sea la patología asociada con el dengue como la filtración vascular. Proteínas virales estructurales, como la glicoproteína E, pueden servir como blancos para drogas que bloqueen el receptor celular de unión y fusión (Laughlin *et al.*, 2012).

Investigaciones sobre el vector

A través de los años, el virus del dengue, se ha distribuido por diferentes zonas geográficas aumentando así los países endémicos y la cantidad de personas en riesgo, esto es gracias a la amplia distribución por la adaptación del vector a diversas condiciones climáticas. El vector principal, *Aedes*, de la cual dos especies, *A. aegypti*, *A. albopictus*, son competentes para reproducir y transmitir DENV entre los humanos. *A. aegypti* es una especie que vive preferencialmente en zonas urbanas, sin embargo *A. albopictus*, que es un mosquito peridoméstico con preferencia a los ambientes rurales, ha desplazado a *A. aegypti* en algunas partes de Asia y África (Benedict *et al.*, 2008).

Gracias a que la enfermedad causada por el DENV no tiene tratamiento alguno y hasta el momento no existe una vacuna totalmente eficiente, muchas de las investigaciones y estrategias para evitar la diseminación se enfocan en el estudio y control del vector. Varios aspectos de este vector, desde su ecología y comportamiento, hasta sus vías metabólicas y su respuesta inmune innata se han estudiado extensivamente (Laughlin *et al.*, 2012).

Los insecticidas ha desempeñado un papel fundamental para el control del vector sobre todo en los hábitats para las larvas; sin embargo, su uso es limitado ya que existen sitios en los que son difíciles de administrar como en el axis de las hojas o los huecos de los árboles

o de especial cuidado en zonas urbanas para evitar intoxicaciones (World Health Organization, 2009); además en la actualidad es necesario el entendimiento de cómo ha surgido y diseminado la resistencia a insecticidas. El análisis genómico de genes de detoxificación y el mapeo de regiones genéticas que controlan la resistencia en *A. aegypti* pueden ser potencialmente efectivos (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2008). El incremento en el entendimiento del sentido del olfato y la búsqueda del hospedero es clave para el desarrollo efectivo de trampas y repelentes. Estudios en la ecología, hábitos alimenticios, el apareamiento y la oviposición del mosquito respaldan el desarrollo de estrategias de control más efectivas, por ejemplo la implementación del programa “casa segura”, que promueve el uso de mosquiteros impregnados con insecticidas para reducir los mosquitos en las casas, así como el uso de trampas para evitar la oviposición, ayudan en el control del dengue en áreas endémicas (Rapley *et al.*, 2009). Además, estudios epidemiológicos en dichas áreas son esenciales para entender la temporada con mayor riesgo de infección, los cuales deben considerar aspectos multidisciplinarios como la prevalencia de la enfermedad, la abundancia del vector, su distribución y temporalidad, y la conducta humana (Laughlin *et al.*, 2012).

Las investigaciones en la ecología del vector no son las únicas que se encuentran en desarrollo, investigaciones en las interacciones del virus-vector han progresado rápidamente gracias a la secuenciación del genoma completo de *A. aegypti* en 2007 (Nene *et al.*, 2007). Dentro de dichos esfuerzos, para controlar el vector también se han incluido la identificación de genes que pueden ser usados para la generación de insectos transgénicos que potencialmente puedan prevenir la transmisión del dengue a humanos.

Epidemiología

El DENV causa un estimado de 390 millones de infecciones por año resultando en 96 millones de casos clínicos sintomáticos (van Panhuis *et al.*, 2014). Al menos 2.5 billones de personas que viven en áreas del mundo donde el dengue es endémico están en riesgo de contraer dengue o sus complicaciones severas. Epidemias repentinas, explosivas y repetidas causan alarma y estrés público afectando así los sistemas de salud. El control del dengue

es un gran reto por la escasez de terapias efectivas y vacunas. Además, el panorama epidemiológico del dengue ha empeorado con el establecimiento del vector principal *A. aegypti* en muchas otras áreas y la rápida expansión global de un vector secundario *A. albopictus* (Laughlin *et al.*,2012). A pesar de años de estudios, incluso los mecanismos de patogenia son pobremente entendidos (Laughlin *et al.*, 2012).

Las infecciones por dengue ocurren en más de 100 países en la región de Asia-Pacífico, América, el Medio Este y África, y los casos de infección continúan creciendo en el mundo. La Organización Mundial de la Salud reporta el incremento del número de casos de 2.2 millones en 2010 a 3.2 millones en 2015. Se estima que por año, 500 000 persona con dengue severo requieren hospitalización la gran mayoría niños y alrededor del 2.5% de los pacientes muere (World Health Organization, n.d.). La incidencia del dengue ha incrementado principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo; sin embargo, se ha expandido en nuevas áreas, la posibilidad de un brote de dengue en Europa existe, ya que en 2010 se reportó el primer caso de transmisión local en Francia y Croacia. El dengue continúa afectando países de Sudamérica principalmente Costa Rica, Honduras y México. En Asia, por ejemplo Singapur se ha reportado un incremento en casos después de un período grande de tiempo y han sufrido brotes en Laos (World Health Organization, n.d.). En América el dengue ha mostrado un patrón endemo-epidémico con brotes cada 3 a 5 años (Figura 5) (Dick *et al.*, 2012).

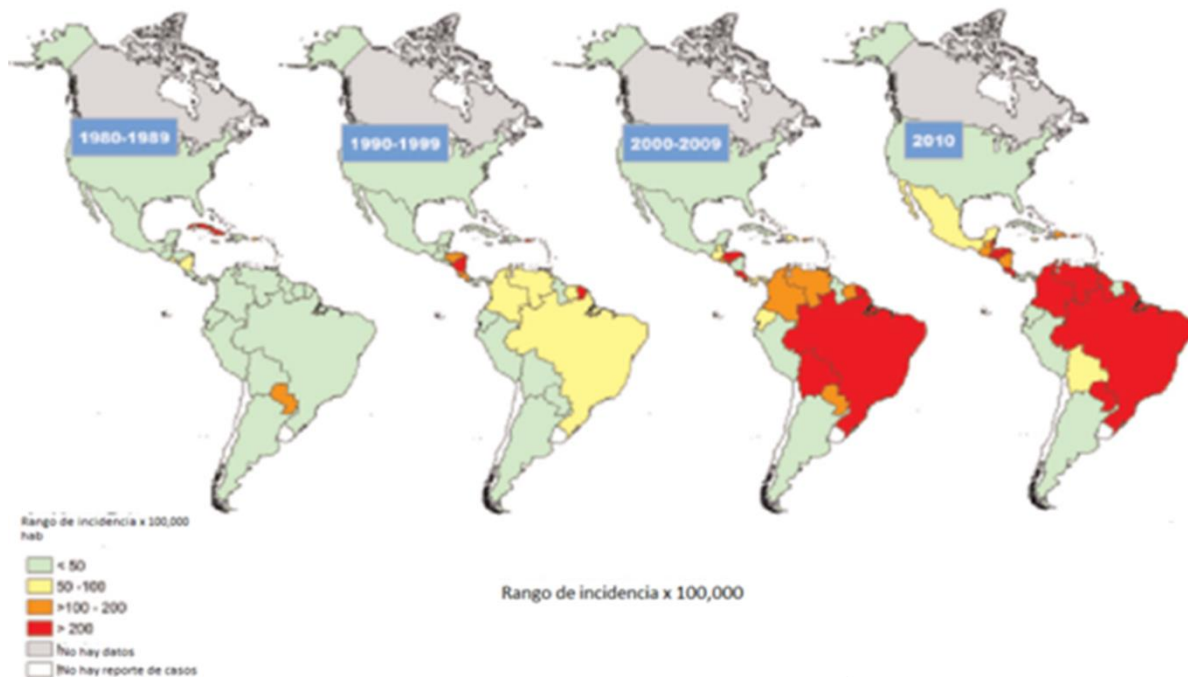


Figura 5: Incidencia del virus del Dengue a través de los años. Mapa del aumento de casos y de países afectados por el virus del a través de los años, desde la década de los 80's hasta la actual. Se observa un gran aumento en los países en dónde se reportaban casos y en países en dónde había pocos casos ha aumentado conforme a los años (Modificada de Brathwaite *et al.*, 2012).

Dengue en América

Análisis filogenéticos de los 4 serotipos del dengue y su principal vector, sugieren un origen de dicho vector en África que a causa del comercio y el traslado de esclavos llegó a América (Laughlin *et al.*, 2012). Gracias a este gran intercambio comercial, se ha incrementado en frecuencia y severidad en las últimas décadas afectando a más de la mitad de la población mundial (Gloria-Soria *et al.*, 2014).

En América, se han documentado brotes de DENV en la literatura médica y por la Organización Panamericana de Salud desde 1600 (Dick *et al.*, 2012). Los primeros brotes descritos se dieron en 1635 en Guadalupe y Martinica, y entre 1827 y 1828 en el Caribe envolviendo el golfo de México. Estos brotes originalmente se describieron cómo dengue, aunque las características clínicas de los casos sugieren que probablemente se trataba de Chikungunya. La historia sugiere que estos brotes fueron la introducción del virus de

Chikungunya a la región de América como consecuencia del traslado de esclavos Africanos (Dick *et al.*, 2012). Durante 1941-1942 el dengue se siguió expandiendo en las regiones y existe evidencia que en estos brotes se identificó la circulación del DENV-2 (Dick *et al.*, 2012). Durante los brotes de 1963-1964 se identificó el DENV-3 con origen Asiático (Scott B Halstead 2006) y en 1981 el DENV-4 fue introducido en las islas del Caribe y se expandió hacia el resto del Caribe, México, América Central y del Sur causando epidemias en países que tenían experiencia con los brotes de DENV-1 (Dick *et al.*, 2012).

En 1996, la PAHO aprobó el plan continental para el control *A. aegypti*; sin embargo, no se implementó completamente (Dick *et al.*, 2012). Durante 2000-2010 un incremento sin precedentes se reportó en América, circulando los 4 serotipos y registrando el mayor número de casos jamás reportado en esa década. Durante este periodo ocurrieron 2 pandemias Americanas una en 2002 y otra en 2010 (Figura 6) (Dick *et al.*, 2012).

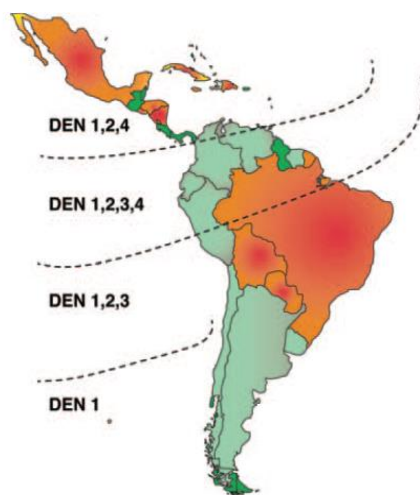


Figura 6: Co-circulación de los 4 serotipos más prevalentes en diferentes regiones de Latino América.

Circulación de los 4 serotipos del DENV en las diferentes regiones de Latinoamérica, en dónde la mayoría de los países circulan tres de los 4 serotipos. En verde se observan los países con menor incidencia de casos y en rojo aquellas que presenta el mayor número de casos (Modificada de Dick *et al.*, 2012). En 2013 se reportaron casos en Florida E.U. y 2015 se caracterizó por tener brotes alrededor del mundo, sólo en América se reportaron 2.35 millones de casos de los cuáles 10 200 casos fueron diagnosticados como dengue severo causando 1 181 muertes. Brasil en ese mismo año, reportó más de 1.5 millones de casos aproximadamente 3 veces más que en 2014, y la isla de Hawai fue afectada por un brote con 181 casos con transmisión en 2016.

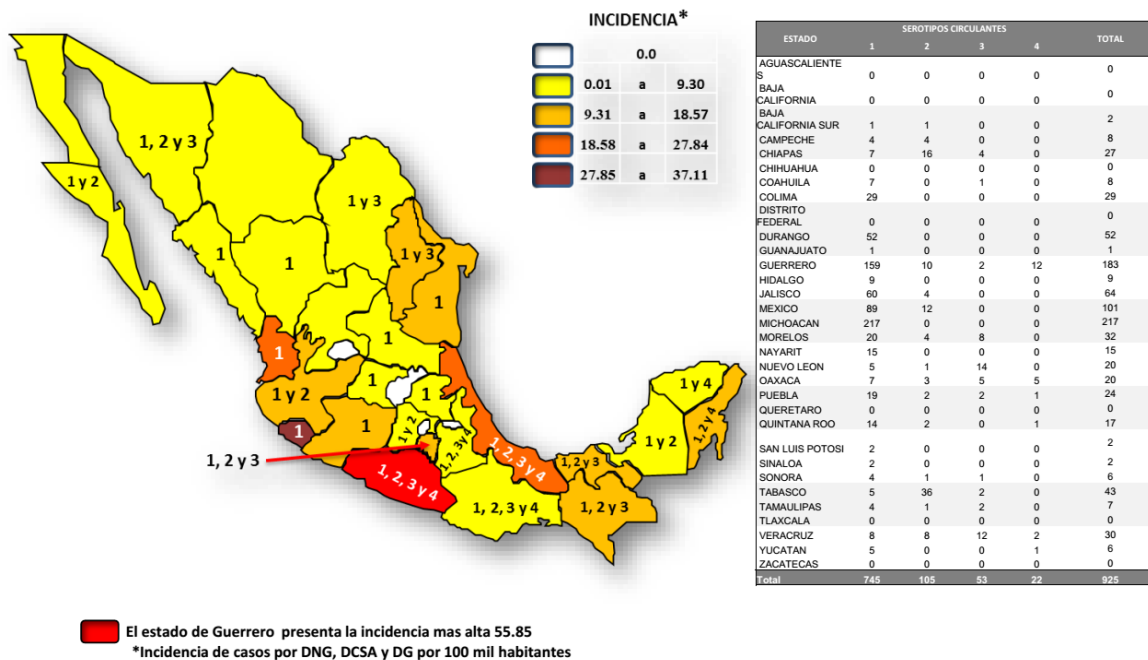
Dengue en México

En México el dengue es considerado, a nivel nacional, como un problema prioritario de Salud Pública. En 1995, México contaba con 15 estados con circulación viral; actualmente se tienen detectados 29. Desde el 2008 el Departamento para la Vigilancia Epidemiológica y Viroológica del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica(InDRE) implementó un nuevo algoritmo de diagnóstico del dengue que utiliza la Red de Laboratorios Estatales de Salud Pública, para favorecer la representatividad geográfica, la oportunidad, la sensibilidad y la especificidad de la información que se obtiene (Vázquez-Pichardo *et al.*, 2011).

La incidencia de FD en México ha incrementado de 1.7 casos por 100 000 habitantes en el 2000 a 43.3 casos por 100 000 habitantes en 2012 (Secretaría de Salud ,2008) (*Programa Nacional de Salud 2007-2012 Por Un México Sano : Construyendo Alianzas Para Una Mejor Salud* 2012). El crecimiento urbano, la migración humana, el cambio climático y alteración ecológica han facilitado la expansión de los vectores *A. aegypti* y *A. albopictus* (Laughlin *et al.*, 2012).

De acuerdo con reportes de la Secretaría de Salud de México, la FD en México sigue un patrón cíclico de aproximadamente 5 años por ciclo, caracterizado por un repentino y dramático incremento de casos, seguido de un periodo de decremento que resulta en pocos casos durante años. Al parecer este patrón tiene su origen en la introducción/reintroducción de nuevos serotipos entre la población (*Programa Nacional de Salud 2007-2012 Por Un México Sano : Construyendo Alianzas Para Una Mejor Salud* 2012).

En 2009 el país tuvo un brote importante de casi 250 000 casos que fueron reportados a la PAHO; en este brote los serotipos aislados predominantes fueron DENV-1, seguido de DENV-2; sin embargo, también los serotipos 3 y 4 fueron detectados (Dick *et al.*, 2012) .En la figura 7 se muestra la incidencia y los serotipos circulantes por entidad federativa así como el número de casos de dengue confirmados hasta las semana 38 de 2016.



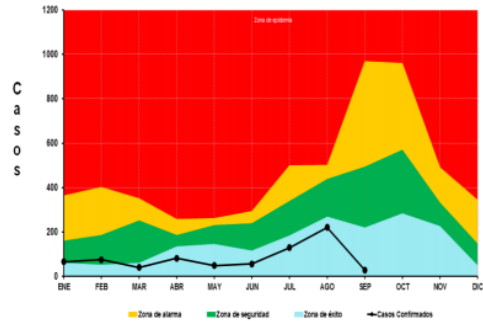
Fuente: SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue con información reportada por el InDRE hasta la semana 38.

Figura 7: Incidencia y serotipos de casos del dengue reportados en la semana 38 del 2016. Mapa del número de casos y serotipos reportados por el InDRE, por entidad federativa. Se muestran todos los estados y la CDMX con los casos confirmado y el serotipo prevalente, dónde se observa que el serotipo prevalente es el 1 y el estado de Guerrero presenta la incidencia más alta de 55.85 casos por cada 100 mil habitantes y con una circulación de los 4 serotipos de dengue (SINAVE, 2016).

Actualmente México cuenta con una Red de Laboratorios Estatales de Salud Pública (RLESP), conformada por 30 laboratorios, que realizan la confirmación del diagnóstico de dengue mediante el uso de técnicas inmunoenzimáticas para detección del antígeno viral NS1 y de anticuerpos IgM o de IgG, dependiendo del tiempo de evolución de la enfermedad cuando el paciente busca atención médica. Con el tamizaje de muestras positivas a proteína NS1 se optimiza el muestreo para la identificación de serotipos de dengue en las muestras en las que el virus está presente y se seleccionan muestras de todo el país (Vázquez-Pichardo *et al.*, 2011). Desde agosto del 2009 en el InDRE se implementó la técnica de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) para el diagnóstico de dengue; previamente se realizaba tipificación con PCR punto final (Vázquez-Pichardo *et al.*, 2011).

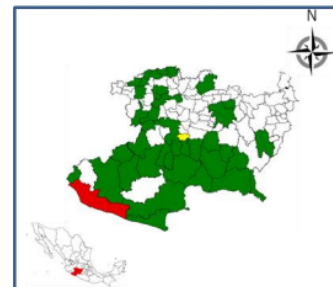
INDICADOR	2015* CIERRE	2015* SEMANA	2016 SEMANA
DNG*	1,639	1,055	755
DCSA*	N/A	N/A	38
DG*	N/A	N/A	7
DCSA + DG*	27	12	45
TOTAL CONFIRMADOS	1,666	1,067	800
DEFUNCIONES@	0	0	0
LETALIDAD&	0.00	0.00	0.00

*Para el año 2015 los casos de DNG equivalen a los casos de F y los casos de DCSA y DG equivalen a los casos de FHD
 & Por 100 casos de FHD para a 2015 y por 100 casos de DCSA + DG para el 2016.
 @Cierre preliminar 2015



MUNICIPIO	DNG		DCSA + DG		SEROTIPO
	CASOS	TASA	CASOS	TASA	
AQUILA MICH	29	116.58	7	28.14	
TARETAN	16	111.63	1	6.98	
RESTO	710	15.47	37	0.81	1
TOTAL	755	16.31	45	0.97	

*Municipios con las incidencias de Dengue más altas
 **Incidencia por 100 000 habitantes



Fuente: SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue con Información al 26 de septiembre 2016 y a la semana 38 -2015.

Figura 8: Casos confirmados de Fiebre por dengue hasta la semana 38 del año 2016, por entidad federativa. Número de casos reportados en el Estado de Michoacán en los años 2015 y 2016 y los casos por municipio dónde se muestran los municipios con mayor tasa de incidencia respecto a la población (SINAVE, 2016).

Respuesta inmune

Debido a que la mayoría de los casos de dengue son asintomáticos, se ha observado que una adecuada respuesta inmune puede llevar a la eliminación del virus de manera completa, indicando el papel crítico que juega la respuesta inmune para controlar la infección en etapas tempranas (Makhluf y Shresta, 2015). La base de la respuesta inmune del hospedero en una infección por dengue involucra: Anticuerpos neutralizantes contra proteínas virales y cascadas de respuesta inmune activadas por epítopes virales que son reconocidos por células T de memoria (Kurane *et al.*, 2011). Sin embargo, la respuesta inmune al dengue también es considerada determinante para la severidad de la enfermedad. Por ejemplo, estudios epidemiológicos han demostrado que la mayoría de los casos de dengue severos ocurren cuando hay una infección secundaria con un serotipo heterólogo, o en neonatos con IgG materna anti dengue que se han neutralizado (Laughlin

et al., 2012). Estos y otros ejemplos del papel tanto protector, como patogénico de la respuesta inmune al dengue se discuten en las siguientes secciones.

Respuesta inmune innata

Inmediatamente después de la infección, las células dendríticas, monocitos y macrófagos migran de la piel, el sitio del inicio de la infección, a los nódulos linfáticos, lo que facilita la diseminación del virus y la entrada a otras células susceptibles. El virus del dengue activa los receptores tipo Toll (TLR), preferentemente el receptor TLR3, localizado en los endosomas, reconociendo el ARN del virus del dengue el cuál activa una cascada de señalización que culminará en la activación del factor de transcripción NF- κ B y el promotor de IFN- β . Se ha demostrado que la activación de los TLR es beneficiosa en la infección con dengue ya que ayuda a contrarrestar la replicación; sin embargo, esta activación de las vías de señalización inflamatorias sugiere la participación de estos receptores en la patogénesis de la enfermedad (Makhluf y Shresta, 2015).

El IFN α/β secretados por células que se encuentra infectadas es señal para las células adyacentes de que existe una infección así como una respuesta celular antiviral autócrina (Green *et al.*, 2014). La vía de respuesta de IFN es de gran importancia ya que une tanto la respuesta inmune innata con la respuesta inmune adaptativa. El IFN α/β secretado por células infectadas con dengue desencadenan signos de alarma a las células adyacentes de que una infección está ocurriendo e inducir la respuesta antiviral. El IFN de este tipo, es un potente inhibidor del dengue (Green *et al.*, 2014). Una vez reconocido el IFN α/β por su receptor (IFNAR), activa la vía de señalización JAK/STAT (*"Janus kinase and two Signal Transducer and Activator of Transcription"*). Esta vía con lleva a la activación de moléculas adaptadoras, que resulta en la fosforilación y dimerización de varias moléculas transmisoras de señales y activadores de transcripción (STAT). Dentro de estos activadores de transcripción, se forma un complejo de señalización entre STAT1 y STAT2 con IR9 (*"interferon regulatory factor"*) y el factor 3 de estimulación del gen de interferón, este último factor es translocado al núcleo y se une a las moléculas de respuesta a interferón

que se encuentran en la región promotora de genes que se activan por IFN, el resultado final es la producción de numerosas proteínas antivirales y citocinas pro- inflamatorias. Otro factor presente en una infección por dengue es el NFκB, el cual al ser translocado al núcleo, permite la producción de pro-interleucina 1 y la activación de inflamosoma que resulta en la producción de interleucinas maduras como la 1 y la 18, ambas citocinas son muy importantes en la respuesta antiviral ya que reclutan células inmunes al sitio de la infección (Platanias, 2005). Sin embargo el virus ha evolucionado y desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedero por dos principales mecanismos, el secuestro y la alteración activa de la respuesta inmune innata. El dengue al manipular el metabolismo de la célula, se protege de la degradación de los lisosomas por medio de vesículas, el virus incluso ocupa vías propias de la célula como la autofagia para facilitar la replicación viral (Green *et al.*, 2014). La alteración de la respuesta inmune innata es realizada por las proteínas no estructurales que actúan directamente en componentes para la inducción y señalización de la vía de IFN α/β (Green *et al.*, 2014). Por lo tanto una respuesta adecuada de IFN es la pauta que conlleva a una respuesta adaptativa fuerte y efectiva, por lo que el entender los mecanismo por los cuales cada serotipo de dengue regula el sistema de IFN tipo I ayudará para el diseño de terapias antivirales efectivas así como en el diseño de modelos animales de estudio de la enfermedad ya que en la actualidad no existe un modelo animal adecuado para el estudio de la inmunopatogénesis de dengue (Makhluf y Shresta, 2015).

Respuesta adaptativa

Anticuerpos

Las personas que han cursado con una infección por dengue tienen anticuerpos detectables contra dengue durante décadas y se ha encontrado que existe una reacción cruzada con otros serotipos de dengue e incluso con otros flavivirus (Wahala y de Silva, 2011). Cuando el hospedero se enfrenta a una primera infección, comienza la producción de anticuerpos IgM alrededor de 4-5 días después de los períodos de fiebre, los cuales son cuantificables incluso 3 meses después del curso de la enfermedad. (Wahala y de Silva, 2011). Los

anticuerpos IgG aparecen varias semanas después de la infección y persisten durante años. La principal producción de estos anticuerpos es de tipo IgG1 e IgG3, y su desarrollo está relacionada principalmente con la generación de una respuesta celular mediada por linfocitos Th (T-helper) 1 (Koraka *et al.*, 2001).

Los anticuerpos producidos en infecciones por dengue, van dirigidos principalmente contra las proteínas estructurales (E, prM, C), y algunas proteínas no estructurales, particularmente NS1 la cual es secretada al medio extracelular (Valdés *et al.*, 2000). Es poco probable que los anticuerpos generados contra NS3 y NS5 participen en la severidad de la enfermedad por ser generados contra proteínas intracelulares y poco frecuentes (Wahala y de Silva, 2011).

Después de una primera infección los pacientes son susceptibles a contraer una segunda infección con un serotipo nuevo. Una característica de una infección secundaria es la producción acelerada de anticuerpos comparada con la primera infección, lo cual es debido a la estimulación de células B de memoria producidas en la primera infección. Los primeros anticuerpos en aparecer después de una infección secundaria neutralizaran de mejor manera a serotipos homólogos en comparación con serotipos heterólogos (Wahala y de Silva, 2011). Se ha observado que en segundas infecciones existe una mayor producción de anticuerpos contra prM y NS1 que en las primeras infecciones. Sin embargo, los anticuerpos contra NS1 son bastante singulares ya que en modelos murinos son protectores (Falgout *et al.*, 1990) pero existen reportes en los que dichos anticuerpos tienen reacción cruzada con antígenos propios en plaquetas y células endoteliales lo que sugiere un posible mecanismo de daño vascular en los casos de dengue severo (Tang *et al.*, 2015). Incluso se ha reportado que un cambio de algún aminoácido en la proteína NS1 está asociado a un incremento en la tasa de incidencia de FHD/SCD (Tang *et al.*, 2015).

Los anticuerpos son muy importantes para combatir la infección contra dengue ya que desempeñan dos funciones centrales en relación a la patogénesis de la enfermedad: la neutralización viral y la potenciación de la infección. Los anticuerpos logran neutralizar al virus de dengue cuando existe una buena afinidad mientras que en cantidades bajas de anticuerpos y en contextos de infecciones heterólogos, la infección puede verse aumentada

y la neutralización del virus es limitada (Moi *et al.*, 2016). Por ejemplo, los anticuerpos anti prM tienen reacción cruzada con los 4 serotipos de dengue por lo que su capacidad de neutralización se ve afectada (Dejnirattisai *et al.*, 2010). En el caso de los anticuerpos no neutralizantes contra prM, potencialmente promueven el fenómeno que se conoce como potenciación elevada por anticuerpos (ADE, por sus siglas en inglés *antibody dependent enhancement*) (Morens y Halstead 1990). Los anticuerpos anti-prM se encuentran incrementados en infecciones sintomáticas secundarias del dengue (Lai *et al.*, 2008) y constituyen una fracción grande del repertorio total de anticuerpos en FHD (Dejnirattisai *et al.*, 2010). En la mayoría de los casos, las partículas inmaduras del virus no son infecciosas; sin embargo, en presencia de anticuerpos anti- prM pueden convertirse en altamente infecciosas, esto es debido a que en infecciones secundarias con un serotipo diferente, dichos anticuerpos se unen a viriones y a partículas inmaduras indistintamente, provocando una reacción cruzada y aumentando la carga viral lo que resulta en el desarrollo de las formas severas de la enfermedad. (Laughlin *et al.*, 2012).

El ADE es una de las teorías principales para explicar la inmunopatogénesis del dengue. Las infecciones secundarias con un diferente serotipo y la presencia de bajos niveles de anticuerpos neutralizantes heterotípicos puede reducir la severidad de la enfermedad; sin embargo, en ausencia de anticuerpos neutralizantes los anticuerpos heterotípicos de reacción cruzada se unen a los receptores Fc de los fagocitos mononucleares formando complejos con el virus lo cual conlleva a una elevación de la eficiencia de la infección y por consiguiente un incremento en el número de fagocitos mononucleares infectados (Halstead *et al.*, 1983).

Una infección heteróloga no solo puede ser patogénica, si no que existe una producción de virus lo bastante alta para que los mosquitos adquieran la infección (Wahala y de Silva, 2011). Además de los serotipos de dengue circulantes, gracias a la diversidad genética, existen genotipos, que están distribuidos en diferentes zonas geográficas y se ha observado que tienen distinto potencial patogénico, esta puede ser una de las razones por las que exista diferencias en la neutralización por anticuerpos (Wahala y de Silva, 2011) esto se ha determinado mediante estudios *in vitro* con animales en dónde se logra estimar que dichos

anticuerpos neutralizantes presentan diferente actividad entre genotipos (Moi *et al.*, 2016). Por lo cual la terapéutica con anticuerpos monoclonales no sería muy recomendada; sin embargo, se han visto que mutaciones en la fracción Fc del anticuerpo elimina el ADE en ratones, indicando que cocteles de anticuerpos monoclonales pueden ser de ayuda (Beltramello *et al.*, 2010).

Inmunidad mediada por células

La inmunidad por células es importante para regular y eliminar al virus. Los linfocitos T son los principales componentes de la inmunidad antiviral mediada por células. Dentro de estos componentes las células CD4⁺ desempeñan un papel de reguladores de la respuesta inmune antiviral ya que proporcionan las citocinas para inducir los mecanismos efectores de los linfocitos T CD8⁺ y las células B (Henaó *et al.*, n.d.). El primer paso para la activación celular es el reconocimiento de péptidos específicos producidos por las proteínas virales que son presentados en contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) mediante las células presentadoras de antígeno. Una vez que se realizó la activación, los linfocitos proliferan e inician la producción de células requeridas para controlar la infección; los linfocitos que ya han sido activados en los órganos linfoides viajan al sitio de la infección para poder ejercer control sobre la replicación viral. Tanto los linfocitos T CD4⁺ como los CD8⁺ inducen una respuesta inflamatoria en el sitio de infección y es durante este proceso que más células efectoras llegan al sitio de la infección y existe un aumento en la liberación de citocinas proinflamatorias. Los LT CD4⁺ reconocen los péptidos virales en el contexto de MHC II y se diferencian en linfocitos ayudadores Th1 y Th2. Las células Th1 producen citocinas como la IL-2, TNF- α e IFN- γ , estas citocinas potencian la respuesta de tipo celular, mediante aquellos mecanismos efectores de macrófagos, células NK y particularmente los de LT CD8⁺. Mientras tanto las células Th2 potencian la inmunidad de tipo humoral mediante la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13. Un balance en la producción de estas citocinas es muy importante ya que tienen un papel muy importante tanto en la patogénesis como en la respuesta inmune, ya que un predominio de células Th1 se ha relacionado con la resistencia y/o resolución de infecciones virales. En el caso de las células CD8⁺, estas se multiplican de forma masiva, en respuesta a los antígenos que han

sido sintetizados de forma endógena presentados en forma de péptidos asociados a las MHC I en la membrana de la célula infectada. Los LT CD8+ sufren diferenciación a células citotóxicas gracias a las citocinas producidas por los CD4+ y/o señales generadas por las células infectadas. El control antiviral de los CD8 puede realizarse mediante mecanismos citolíticos directos o mediante la secreción de citocinas antivirales, una acción combinada de estos mecanismos, lleva al control óptimo de la infección. Una vez que se ha eliminado al virus, el sistema inmune regula la respuesta antiviral y comienza la producción de células de memoria específicas del virus.

El papel de los linfocitos T en la protección contra la infección de dengue se encuentra bien establecido, los linfocitos T CD8 pueden controlar la infección viral por varios mecanismos, el primero de ellos es mediante citotoxicidad y la producción de citocinas proinflamatorias como el IFN γ y TNF α , mientras que las células CD4 estimulan las respuestas de linfocitos B y CD8. Varios estudios demuestran que existe una protección de los linfocitos T (CD4 y CD8) frente a infecciones tanto homólogos y heterólogos, por ejemplo las células CD8 y CD4 específicas de una infección por dengue proliferan produciendo IFN γ y lisando las células que se encuentran infectadas indicando que estos linfocitos se producen y activan desde una infección primaria determinando que los linfocitos CD8 reconocen con mayor frecuencia las proteínas virales no estructurales NS3, NS4B y NS5, en comparación a las proteínas de la envoltura y la cápside siendo las proteínas de la NS3 el blanco principal para las células CD4 por lo cual la respuesta de células T contra dengue es benéfica e incluso es imprescindible para lograr una eficacia en una vacuna (Weiskopf y Sette, 2014). Los péptidos inmunodominantes de células T varía entre diferentes serotipos, durante la primera infección y entre la primera y segunda infección (Weiskopf *et al.*, 2014) por tanto la acción protectora de las células T se da tanto de manera natural como después de la vacunación (Tang *et al.*, 2015).

Se han obtenido resultados bastante favorables en el modelo murino deficientes en receptores de IFN, en los cuales se ha logrado reproducir el fenómeno de ADE, dando evidencia de la protección de los linfocitos T, debido a estas evidencias una vacuna contra

dengue que no induzca respuesta de células T sería peligrosa. Por tanto la mejor estrategia de vacunación es aquella que induce una respuesta a células T y una buena producción de anticuerpos maximizando con ello la eficacia y la seguridad (Tang *et al.*, 2015).

Los linfocitos T reconocen epítopes específicos del patógeno una vez que han sido procesados por una molécula específica de MHC, por tanto un epítoto desatará una respuesta en los individuos que expresen aquella molécula de MHC que fue capaz de unir el epítoto. Las moléculas de MHC son polimórficas existiendo una gran cantidad de variantes en el humano, cada variante se presenta en diferente frecuencia dependiendo de la raza y la localidad geográfica (Weiskopf y Sette, 2014).

Muchos alelos de HLA han sido relacionados con la protección o susceptibilidad a la infección por dengue, por ejemplo HLA A*24 se ha relacionado a la susceptibilidad a la enfermedad no sólo en infecciones secundarias incluso en las primarias, mientras que existen reportes en Brasil en los cuales relacionan HLA A*01 con la susceptibilidad a FHD en su población. Sin embargo en el caso de la población mexicana el HLA B*3501 no se encuentra relacionado con aquellos pacientes que cursan con la etapa febril de la enfermedad e incluso se han realizado estudios en los que se reportan que los genes de HLA A se encuentran relacionados con la FHD mientras que en el caso de los HLA B no existe relación alguna (Weiskopf *et al.*, 2013).

Un mejor entendimiento del mecanismo de inmunopatogénesis del dengue es crucial para el desarrollo de tratamientos y vacunas seguras para no potencializar la severidad de la enfermedad seguida de una infección natural (Laughlin *et al.*, 2012).

ANTECEDENTES

Vacunas

La necesidad de una vacuna para el control del dengue es urgente debido al incremento de casos y expansión de áreas endémicas. Se han realizado estudios para el desarrollo de vacunas para dengue por más de 7 décadas; sin embargo, hay muchos factores que han impedido y dificultado el desarrollo de dichas vacunas. Por ejemplo, el que no haya un modelo animal inmunocompetente que desarrolle una enfermedad similar a la de humanos

ha dificultado el entendimiento de la inmunopatología durante la infección. Además, el fenómeno del ADE genera la necesidad de una vacuna que al mismo tiempo proteja contra los 4 serotipos del dengue y la obligación de proceder con mucha cautela, ya que de no dar la inmunidad completa, es un factor que aumenta la progresión a dengue severo (Laughlin *et al.*, 2012). El virus del dengue presenta retos que dificultan la utilización con éxito la metodología de la vacunología de primera y segunda generación. Entre ellos se describen los siguientes:

- a) El virus del dengue es variable, particularmente en las proteínas estructurales de la superficie y la protección hacia un serotipo no previene la infección por los otros tres serotipos existentes. Por ello, todas las vacunas en desarrollo en la actualidad consisten en cuatro vacunas en una, o compuestos tetravalentes por lo que los desarrollos resultan complejos y caros.
- b) Cualquier protección incompleta hacia alguno de los serotipos puede resultar peligrosa ya que tiene el potencial de exacerbar la infección subsecuente por otro virus del dengue, con la consecuente posibilidad de sufrir dengue severo o hemorrágico.

Numerosos candidatos a vacunas del dengue están en desarrollo preclínico (Schmitz *et al.*, 2011) incluyendo vacunas de DNA (Beckett *et al.*, 2011), virus atenuados (Guzman *et al.*, 2010) (Maves *et al.*, 2011) y vacunas con vectores virales (Tabla 1). Sin embargo, la vacuna más avanzada en cuanto a su desarrollo clínico es la vacuna CYD-TDV Sanofi Pasteur.

Tabla 1: Vacunas del dengue en desarrollo.

Tipo de vacuna	Desarrollador	Fase estudio	Referencia
Atenuados	Sanofi Pasteur/Acambis	Fase 3	Guy y cols, 2011
Atenuados	GSK/WRAIR	Fase 2 (suspendida)	Sun y cols, 2009
Atenuados	NIAID, NIH	Fase1	Durbin y cols, 2011
Atenuados	Inviragen/CDC	Fase 1	Huang y cols, 2003
Subunidad	Merck/Hawaii Biotech	Fase 1	Clements y cols, 2010
DNA	NMRC	Fase 1	Beckett y cols, 2011

CDC, Centro de Control y Prevención de Enfermedades; GSK: GlaxoSmithKline; NIAID: Instituto Nacional de Alergias y enfermedades infecciosas; NIH: Instituto Nacional de Salud; NMRC: Centro Médico de Investigación de la Naval; WRAIR: Instituto de Investigación Walter Reed Amy (Modificada Laughlin et al.2012).

Entre 2012 y 2015 se publicaron los resultados de los ensayos clínicos de fase III de la vacuna CYD-TDV de Sanofi Pasteur realizados en Tailandia, cinco países de Asia y cinco países de América Latina (Hernández-Ávila y Santos-Preciado, 2016) y una publicación sobre un análisis integrado del seguimiento a largo plazo de los ensayos anteriores (Hernández-Ávila y Santos-Preciado, 2016). Los resultados en general muestran una eficacia parcial para proteger contra dengue (Hernández-Ávila y Santos-Preciado, 2016). Estos resultados se resumen en las siguientes conclusiones generales: se observó que existe una eficacia adecuada para los serotipos 3 y 4; sin embargo, para infecciones con el serotipo 1 la eficacia se ve reducida a comparación de los otros dos serotipos, pero en el caso del serotipo 2 se observó una eficacia nula en la protección de infecciones con este serotipo (Hernández-Ávila y Santos-Preciado, 2016). También se observa una eficacia menor en pacientes seronegativos a dengue al inicio de la vacunación, 83% de protección contra hospitalizaciones, 90% de protección en el desarrollo de formas severas de la enfermedad. Estos resultados se observaron a 25 meses de seguimiento (Villar *et al.*, 2014), y algo interesante es que en la población de niños menores de 9 años a los que se les aplicó la

vacuna, se detectó un aumento en las hospitalizaciones en un seguimiento de tres años (Hadinegoro *et al.*, 2015). Por todos los resultados obtenidos en los ensayos se puede observar que la vacuna CYD-TDV es efectiva y da protección en el caso de infecciones contra los serotipos de dengue 3 y 4, y confiere protección contra hospitalizaciones y el desarrollo de formas severas de la enfermedad en pacientes mayores de 9 años y aquella población que se ha enfrentado a una infección previa, por lo que se puede concluir que esta vacuna sirve como un refuerzo a la inmunización generada por una infección previa (Hernández-Ávila y Santos-Preciado 2016).

Debido a que no se consiguen los títulos de anticuerpos necesarios en una sola dosis y se requiere aplicar más de tres dosis de la vacuna en un periodo de 12 meses, nuevos candidatos a vacunas DENV están en desarrollo con el objetivo de conseguir respuesta inmune con un programa de inmunización que se dé en el transcurso de menos meses. Estos candidatos de nueva generación incluyen vacunas de DNA, vacunas de vectores recombinantes de adenovirus, replicones de alfavirus y vacunas de subunidades proteicas (Durbin y Whitehead, 2011).

Debido a lo anterior, un grupo del Instituto Jenner de la Universidad de Oxford, liderado por el Dr. Arturo Reyes Sandoval, quien tiene amplia experiencia en el estudio y desarrollo de vacunas, contra la malaria, y de vectores virales para vacunas (Reyes-Sandoval *et al.*, 2012), se encuentra desarrollando una vacuna que induzca respuestas hacia las partes más conservadas del virus del dengue, que estén presentes en los cuatro serotipos existentes. Para ello, desarrollaron un programa bioinformático llamado CONSERV (comunicación personal) que permite el análisis de secuencias de DNA y proteínas de patógenos que se encuentran disponibles en internet. El programa se encuentra actualmente en fase de registro por la Universidad de Oxford, con la finalidad de su publicación.

Mediante CONSERV, se realizó un análisis de las secuencias de dengue reportadas en bases de datos públicas (GenBank, EMBL-EBI, entre otras) de secuencias genómicas, con lo que

se detectaron las porciones más conservadas del virus, las cuales se utilizaron para crear un gen sintético que se clonó en vectores virales (comunicación personal), específicamente adenovirus y virus modificado de vaccinia Ankara (MVA) (Rollier *et al.*, 2011)

Las secuencias del virus del dengue utilizadas para el diseño de la vacuna son las partes no estructurales del virus NS2, NS3, NS4 y NS5. Las secuencias genéticas fueron expresadas por los adenovirus y MVA, cuando éstos infectan células, por lo que las proteínas producidas serán presentadas en forma de péptidos por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo I y II, estimulando de ésta manera las respuestas celulares de tipo CD4 y CD8.

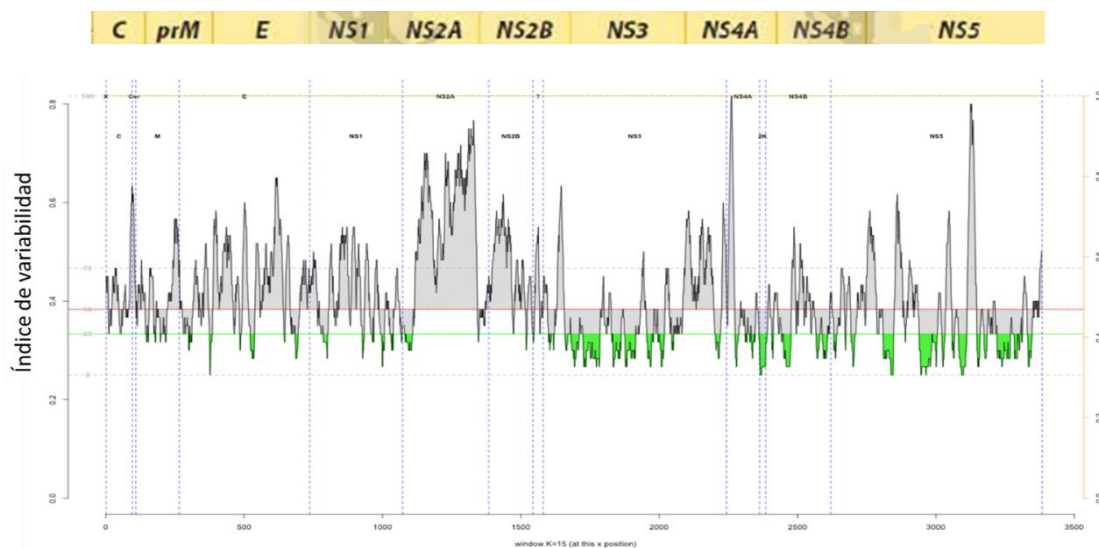


Figura 9: Resultado del análisis bioinformático de las secuencias globales de dengue serotipos 1-4. Se determinó que las regiones más conservadas estaban en los genes NS3-NS5. Estas regiones también son las que contienen más epítopes estimulantes de linfocitos T. Las regiones más conservadas fueron pegadas o concatenadas para formar un gen sintético en donde péptidos conservados de diversas regiones del genoma fueron unidos para generar inmunógenos recombinantes. Estos inmunógenos se usarán en vectores virales altamente inmunogénicos, como adenovirus y vaccinia Ankara modificado para inducir la respuesta inmune deseada.

A partir del análisis bioinformático se generaron 4 candidatos de inmunógenos denominados VAC-A, VAC-B, VAC-C y VAC-D. VAC-A es el de menor tamaño con 1232bp que codifican a 410 aa y se compone de las regiones más conservadas entre serotipos 1 a 4 y dentro de cada serotipo. VAC-B es más grande a comparación de VAC-A, con un tamaño de

4769 pb que codifican 1589 aa y comprende a VAC-A y las regiones conservadas en 3 y en 2 serotipos. VAC-C incluye VAC-B más epítopes con función biológica descrita en la literatura. Finalmente, VAC-D comprende a VAC-A-C más variantes de epítopes ya descritos en la literatura. Se realizó la alineación de los inmunógenos con las proteínas NS3-NS5 de dengue de la cepa de referencia que se encuentra en las bases de datos y se aprecia que las regiones que conforman al inmunógeno VAC-A son pequeñas y tienen componentes dispersos en las proteínas. También se observan inserciones con respecto al genoma de dengue, las cuales pertenecen a las variantes de epítopes pertenecientes al inmunógeno VAC-D (Figura 10).

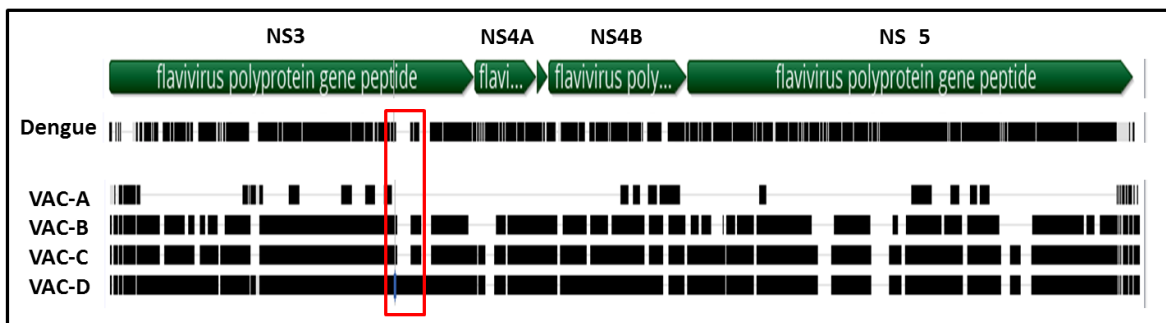


Figura 10: Características de los inmunógenos desarrollados. Alineamiento de los cuatro inmunógenos desarrollados nombrados VAC-A, VAC-B, VAC-C y VAC-D (abajo) con la cepa de referencia de dengue (en medio). El alineamiento se realizó únicamente con la parte del genoma correspondiente a las proteínas no estructurales NS3, NS4A, NS4B y NS5 (verde). Se muestran las diferencias entre cada inmunógeno dónde se observa que VAC-A es el más corto, de 1232bp. 410 a.a y se compone de las regiones más conservadas entre serotipos y dentro de cada serotipo. VAC-B es mucho más grande, 4769 pb y 1589 a.a y comprende a VAC-A y las regiones conservadas en 3 y en 2 serotipos. VAC-C incluye VAC-B más epítopes con función biológica descrita. VAC-D comprende a VAC-A-C más variantes de epítopes ya descritos. Abajo se muestra la alineación de los inmunógenos con las proteínas NS3-NS5 de dengue y se aprecia que VAC-A es pequeña **y compuesta** de componentes dispersos en las proteínas. También se puede apreciar inserciones con respecto al genoma de dengue, las cuales son las variantes de epítopes de VAC-D.

JUSTIFICACIÓN

El dengue es la principal enfermedad infecciosa diseminada por vector y representa un problema y reto de Salud Pública en el mundo y en nuestro país, debido a que en la actualidad sigue siendo una enfermedad epidémica potencialmente fatal; no existe ningún tratamiento específico, el control del vector resulta difícil y costoso y siguen ocurriendo muertes prevenibles, por lo que la aplicación de vacunas es una buena alternativa para la prevención y control de dicha enfermedad. Hasta el momento la mayoría de las vacunas en desarrollo y la CYD-TDV de Sanofi Pasteur, son vacunas que inducen una respuesta mediada por anticuerpos contra las partes variables del virus, la cual además de no haber mostrado efectividad contra los principales serotipos circulantes en nuestro país, presenta problemas de efectos no deseados. Debido a los problemas que se presentan en las vacunas que inducen una respuesta mediada por anticuerpos, se requiere el estudio de nuevos inmunógenos como candidatos para ofrecer una buena alternativa en el desarrollo de una vacuna efectiva y segura para posteriormente incidir sobre la prevención y el control de esta enfermedad. Una propuesta es crear inmunógenos de las partes conservadas entre los serotipos del virus que generen respuesta de linfocito T, de la cual surgen los siguientes cuestionamientos: ¿Se puede generar un inmunógeno que induzca una respuesta inmune hacia péptidos conservados?, ¿Se podrán evitar los efectos no deseados, respecto a las otras vacunas?, ¿Será una buena alternativa un inmunógeno que induce respuesta de linfocitos T?

Por lo anterior, en este trabajo, se estudió el reconocimiento inmunológico de antígenos del virus del Dengue, obtenido, desarrollado y propuesto por investigadores de la Universidad de Oxford como inmunógeno para ser usado como vacuna.

OBJETIVOS

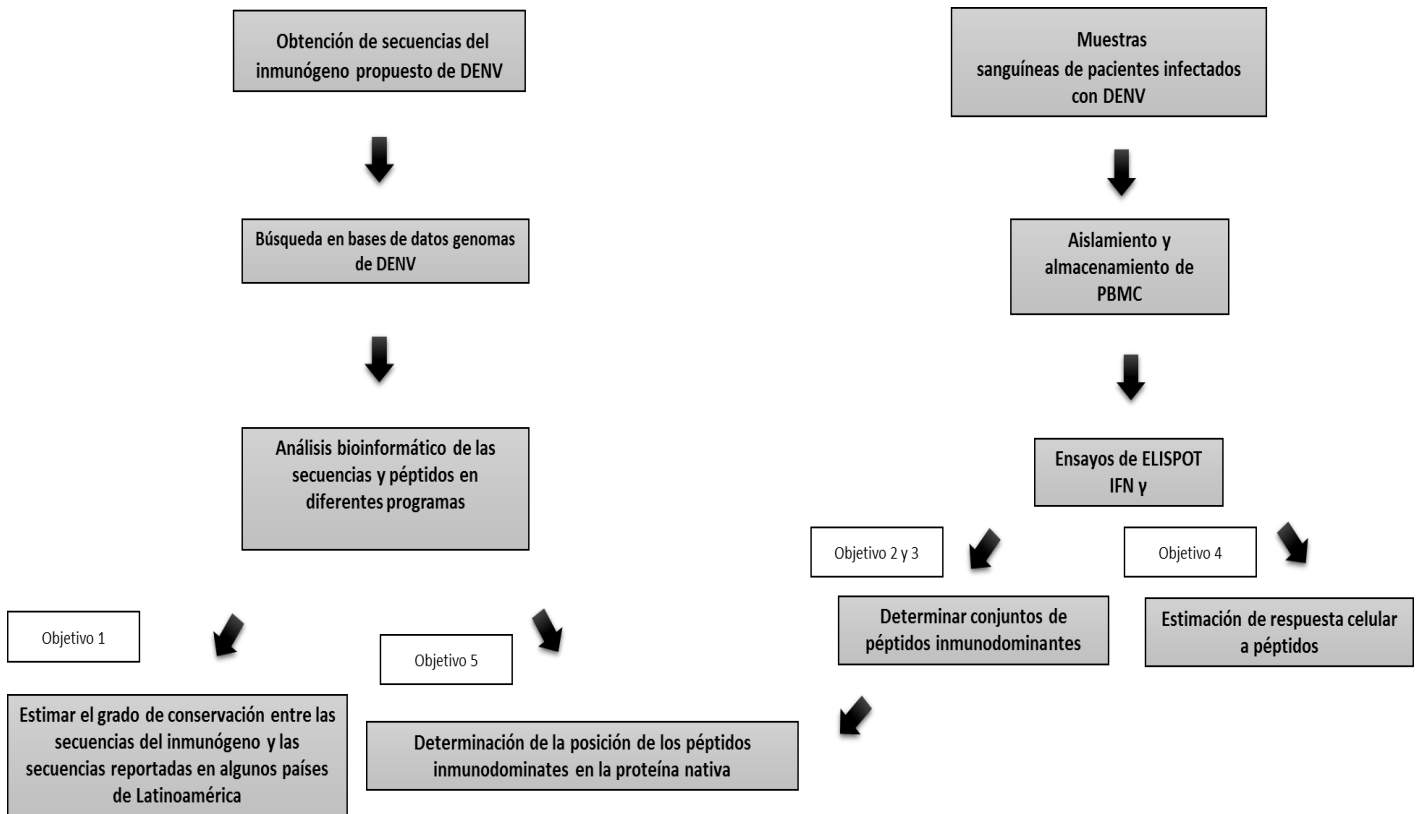
Objetivo General:

Estudiar en pacientes infectados con el virus de dengue, la respuesta inmune celular hacia un candidato a inmunógeno universal.

Objetivos específicos:

1. Estimar el grado de conservación de las secuencias que componen al inmunógeno con respecto a las secuencias de dengue reportadas en México mediante un análisis *in silico*.
2. Determinar el porcentaje de pacientes con una respuesta positiva de IFN- γ hacia el inmunógeno, en una muestra de pacientes infectados con dengue.
3. Comparar la magnitud de la respuesta de IFN- γ entre las diferentes regiones proteicas del inmunógeno.
4. Determinar conjuntos de péptidos inmunodominantes del inmunógeno en pacientes con respuesta positiva de IFN- γ .
5. Determinar mediante un análisis bioinformático la posición de los péptidos inmunodominantes en la proteína nativa.

DIAGRAMA DE TRABAJO



MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes:

Las muestras de pacientes fueron recolectadas en el municipio de Lázaro Cárdenas en el Estado de Michoacán de Octubre a Noviembre de 2015, gracias a la red de colaboración con el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán (LESPM). El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de ética del LESP (bitácora BEZ02, folio B2A2015F038). Se incluyeron pacientes mayores a 12 años, los cuales asistían a los Centros de Salud de Lázaro Cárdenas, “Guacamayas”, “la Orillita” y el Hospital General de Lázaro Cárdenas con cuadros febriles y diagnóstico probable de infección por dengue determinado por la presencia de uno o más signos característicos de la infección (determinado por el médico en turno). Además se incluyeron a pacientes con una prueba positiva para dengue mediante una prueba rápida para diagnóstico de dengue (SD BIOLINE Dengue Duo, Standard Diagnostics, Gyeonggi-do, República de Corea) la cual es una prueba serológica cualitativa para identificar la presencia del antígeno de dengue NS1 y anticuerpos para dengue de tipo IgG e IgM. A todos los pacientes se les dio a conocer el estudio en el que participarían mediante el consentimiento informado y a los pacientes menores de 18 años se les solicitó la autorización de sus padres o tutores. Se obtuvieron un total de 26 muestras de 26 pacientes, a las cuales posteriormente se les realizó las pruebas confirmatorias para dengue.

Obtención de muestras, procesamiento y almacenamiento.

La obtención, procesamiento y almacenamiento de las muestras fue realizado por el Dr. Miguel Antonio García Knight en las clínicas del Municipio de Lázaro Cárdenas, en el Estado de Michoacán, con las facilidades otorgadas por el LESP. De 15 a 20 ml de sangre periférica se recolectaron mediante venopunción en tubos con EDTA como anticoagulante. Además, se recolectaron 5 ml de sangre periférica en tubos sin anticoagulante para el diagnóstico serológico. La separación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se realizó mediante separación de gradiente por centrifugación con Lymphoprep (Axis Shield, Dundee, Escocia). En tubos tipo Falcon se alicuotaron 1 ml de Lymphoprep por cada ml de

sangre, cuidadosamente se adicionó la sangre recolectada y se centrifugó por 20 min a 1800 rpm. Con una pipeta Pasteur desechable se recolectó la capa de células mononucleares que se separó y depositó en la interfase y se transfirieron a un tubo nuevo. Las células se lavaron con aproximadamente 3 veces el volumen de células recuperadas de medio R0 (medio RPMI-1640 suplementado con 2 mM L-glutamina, 1X penicilina y estreptomicina) y se centrifugaron a 1800 rpm durante 10 min. El sobrenadante se desechó y se repitió el lavado para remover la mayoría de las plaquetas. Las células se resuspendieron en medio R10 (medio RPMI-1640 suplementado con 2mML-glutamina, solución 1X de penicilina y estreptomicina y 10% de suero fetal bovino inactivado por calor). La concentración celular se determinó mediante el método con hemocitómetro. Se realizó una mezcla de 10 ml de células con 10 ml de azul de tripano y se realizó el conteo. El número de células mononucleares por ml de sangre se determinó mediante la siguiente fórmula: el promedio de las células vivas en los cuadrantes $\times 10^4 \times 2$ multiplicado por la cantidad de ml en las que se encontraban resuspendidas. Las células se congelaron y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente fueron transportadas congeladas con refrigerantes del LESPM al LMCyH-CICM-ICUAP para su almacenaje a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido hasta su utilización.

Diagnóstico de dengue

El diagnóstico para la confirmación de dengue y serotipo se realizó en el LESPM, según los lineamientos del InDRE [DGE (Dirección General de Epidemiología) 2014] ., mediante pruebas serológicas inmunoenzimáticas de detección de NS1, IgM e IgG para el caso confirmatorio de dengue y para la determinación del serotipo mediante RT-PCR, las cuales se realizaron para todas las muestras incluidas en este estudio. La detección de NS1 se hace mediante un ensayo inmunoenzimático ELISA tipo sándwich con el kit comercial Platelia NS1 con el cual se detecta este antígeno cualitativamente en suero. La determinación de anticuerpos IgM e IgG en suero se realizó mediante un ensayo de ELISA tipo sándwich, en dónde los anticuerpos presentes, ya sea IgM o IgG, se unen a los anticuerpos anti-Ig adheridos a la superficie de la placa. Una mezcla de los cuatro serotipos del virus de dengue es usada para llevar a cabo la reacción, formándose así los conjugados de antígeno-

anticuerpos, los cuales mediante lavados y adicionando sustratos se detectaron a través de una reacción de colorimetría indicando la presencia o ausencia de dichos conjugados.

La RT-PCR múltiple en tiempo real se utiliza para la determinación del serotipo de dengue que causa la infección, este monitorea en cada ciclo el progreso de la amplificación de material genético. La detección de la amplificación de una secuencia específica es monitoreada mediante la captación de señales de fluorescencia emitida durante los ciclos de la PCR. El virus dengue, se encuentra en circulación en concentraciones detectables durante la fase aguda de la enfermedad (0-5 días) y esta característica hace que este ensayo sea utilizado únicamente durante esta fase y en muestras con resultados positivos a antígeno NS1 (DGE (Dirección General de Epidemiología) 2014).

Péptidos sintéticos

De la colaboración con el laboratorio del Dr. Arturo Reyes-Sandoval, de la Universidad de Oxford, se recibieron péptidos sintetizados liofilizados (179) correspondientes a las partes más conservadas entre los cuatro serotipos de dengue que se identificaron en las proteínas no estructurales NS3 (70 péptidos), NS4 (40 péptidos) y NS5 (69 péptidos), los cuales se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización. Cada péptido está formado por 20 aminoácidos con 10 aminoácidos de traslape con el siguiente péptido. Cada péptido liofilizado se resuspendió en Dimetilsulfóxido (DMSO). Se transfirieron 1.6 µl de cada péptido y se diluyeron en medio R0 (medio RPMI-1640 suplementado con 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina), para generar soluciones madre de un volumen total de 4ml con una concentración de 4 µg/ml de cada grupo de péptidos. Las alícuotas fueron almacenadas a -20 °C hasta su utilización. En los ensayos de ELISPOT los grupos de péptidos se utilizaron a una concentración de 2µg/ml dilución de 1:1.

Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay (ELISPOT)

El ensayo de ELISPOT se realizó con el kit de IFN γ Humano (Mabtech, Cincinatti, E.E.U.U.) según las instrucciones del kit. Las membranas de las placas de 96 pozos fueron permeadas con alcohol al 35%, se lavaron 4 veces con PBS, cubiertas con anticuerpo IFN γ de captura e incubadas toda la noche a -4°C. Después de la incubación las placas fueron lavadas 5 veces con PBS y bloqueadas con medio R10 (medio RPMI-1640 suplementado con 2mML-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomycin y 10% suero fetal bovino inactivado por calor) durante 3hrs a 37 °C con una atmósfera de CO $_2$ al 5%. Las células mononucleares de sangre periférica fueron descongeladas a 37 °C, lavadas en R0 y resuspendidas en 10 ml de medio R10. Se mantuvieron las células durante 2 horas a 37 °C con una atmósfera de CO $_2$ al 5% y posteriormente se transfirieron a la placa de 96 pozos para realizar el ensayo de ELISPOT donde se agregaron las células (2x10 5 células/ml por pozo) por duplicado, se estimularon con los grupos de péptidos correspondientes a las proteínas no estructurales de dengue (NS3 a NS5) a una concentración final de 2 μ g/ml o con DMSO como control negativo o fitohemaglutinina (PHA por sus siglas en inglés, 5 μ g/ml) como control positivo y las células se cultivaron en la placa a 37 °C con una atmósfera de CO $_2$ del 5% durante 15 a 20 horas. Después de la incubación se lavaron las placas 5 veces con WD (PBS-TWEEN $_{20}$ al 0.05%) y se agregó el anticuerpo de detección para IFN γ biotilinado diluido en AD (50 ml PBS adicionado con 0.25 g de Albumina Sérica Bovina) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de 5 lavados con WB el conjugado de estreptavidina fosfatasa alcalina 1:750 diluido en AD fue agregado para después incubarse durante 2 horas. Una vez terminada la incubación de 2 horas, las placas se lavaron 5 veces con WB y se adicionó BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium) sin diluirse y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente, los pozos fueron lavados varias veces directamente con agua de la llave y secados durante toda la noche. Los puntos fueron contados utilizando lector de ELISPOT.

Bioinformática

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas no estructurales NS3, NS4 y NS5 de los cuatro serotipos de dengue se obtuvieron de la base de datos Virus Variation de 3 países Latinoamericanos (Brasil, Colombia y México) con un total de 272 secuencias y las secuencias de los 4 inmunógenos fueron proporcionadas por la Universidad de Oxford en el formato; “The Fast Adaptive Shrinkage/ Thresholding Algorithm” (FASTA) por sus siglas en inglés, el cual fue utilizado para análisis posteriores. Varias herramientas bioinformáticas (software Geneious, Clustal W, MUSCLE) fueron utilizadas para determinar el porcentaje de homología entre las secuencias que componen al inmunógeno y las secuencias reportadas de los serotipos de dengue circulantes en los tres países de Latinoamérica. Las secuencias proteicas fueron alineadas y analizadas.

Extracción de ADN genómico

De la fracción de células compactas (principalmente eritrocitos y neutrófilos) que se obtuvo durante el protocolo de extracción de PBMC de sangre periférica descrito arriba, se realizó la extracción de ADN genómico. La extracción se hizo con 21 de las 26 muestras de pacientes, por el método de “Salting out” según el protocolo proporcionado por el Dr. Louis-Marie Yindom, del Departamento de Medicina de Nuffield de la Universidad de Oxford. Este método se basa en la precipitación de proteínas por salado, ya que en presencia de altas concentraciones de sal la solubilidad de las proteínas disminuye y terminan por precipitarse. Se transfirieron 5 ml de células compactas a un tubo tipo Falcon debidamente rotulado. Para lisar los eritrocitos, se resuspendieron las células por medio de vortéx, se adicionó buffer TE 20-5 pH 8.0 (agua destilada, solución alcalina EDTA 1M y Tris HCL 50 mM) hasta llenar el tubo; se mezcló por inversión, se dejó reposar en hielo durante 15 min y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min. Posteriormente el sobrenadante se desechó, y se resuspendió la pastilla vigorosamente por vórtex durante aproximadamente 60 segundos, se adicionó nuevamente el buffer TE 20-5 pH 8.0, se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min y se repitió el lavado hasta que la pastilla se observó de un color rosa o blanco. Para lisar los glóbulos blancos, después del último lavado la pastilla se resuspendió y se adicionaron 2 ml

del buffer TE 20-5 pH 8.0, más 100 µl de SDS al 20% y se mezcló por inversión. Se realizó la digestión proteica adicionando 20 µl por tubo de proteinasa K (10 mg/ml) mezclando suavemente por inversión y se incubó toda la noche en movimiento a 42 °C. Al siguiente día se retiraron las muestras de la incubadora y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se adicionaron 2.5 ml de acetato de amonio a 7.5 M, mezclando por inversión, se dejó reposar en hielo, se adicionaron 10 ml de alcohol absoluto frío y se invirtió el tubo varias veces para precipitar el complejo de ADN-amonio. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante se desechó cuidando de no remover la pastilla y se dejó secar en papel absorbente. Una vez seca la pastilla, se adicionó buffer TE 20-5 – NaCl pH 8.0 (TE 20-5 más NaCl a 0.2 M en agua destilada) se mezcló por vórtex durante 5 segundos, se volvió a suspender completamente el ADN en la incubadora con movimiento a 42° C y se dejó enfriar en hielo. El ADN se precipitó con 8 ml de etanol helado y se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos, el sobrenadante se desechó con mucho cuidado, se dejó secar la pastilla en papel absorbente hasta que el etanol se hubiera evaporado totalmente, se adicionaron 150 µl de buffer TE 20-1 (Agua destilada + Solución alcalina EDTA 1M + Tris HCL pH 8.0 50 mM) y finalmente se traspasó a tubos tipo Eppendorf de 1.5 ml debidamente rotulados y se incubaron a 58°C en termoblock para resuspender el ADN durante toda la noche. Al siguiente día se cuantificó la cantidad de ADN en Nanodrop y se almacenó a 4 °C.

PCR de los Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA).

De 0.5 a 4 µl de ADN extraído de las muestras, dependiendo de la concentración de ADN obtenido en el Nanodrop, se ocuparon para la amplificación por PCR, más 1.5 de oligonucleótidos, donados por el Dr. Louis-Marie Yindom de la Universidad de Oxford correspondientes a los oligonucleótidos delantero y reverso específicos para HLA-A, HLA-B y HLA-C, respectivamente, 2 µl de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), 5 µl de buffer 5X PrimeSTAR GXL (Mg²⁺ plus) y 0.5 µl de polimerasa PrimeSTAR GXL DNA se emplearon para realizar la mezcla. Se realizó la PCR con las siguientes condiciones: para HLA-A 35 ciclos a 98°C durante 10 s, 68 °C durante 3 min, y para HLA-B y HLA-C 35 ciclos a 98°C durante 10 s, 68 °C durante 4 min. Los amplificadores obtenidos se analizaron por electroforesis de gel

de agarosa al 1%. Los productos de PCR se enviaron al “Weatherall Institute of Molecular Medicine [WIMM]”, Oxford, England, UK, para su secuenciación y la tipificación de HLA con una resolución a cuatro dígitos.

Secuenciación y Tipificación de los Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA).

Cómo proyecto conjunto y colaboración con el Dr. Louis-Marie Yindom, del Departamento de Medicina de Nuffield de la Universidad de Oxford, se enviaron su laboratorio, una parte de los productos de PCR que se obtuvieron en el laboratorio de LMMyc de algunos de los pacientes reclutados para este trabajo, para la secuenciación de las muestras y la aplicación de técnicas para la tipificación de las moléculas de HLA de clase I. El Dr. Yindom amablemente nos proporcionó los datos que obtuvo de la tipificación y debido a la alta relevancia e importancia que tienen estos datos y que complementan los objetivos de esta tesis, se tomó la decisión de incluir y utilizar los datos generados para realizar un análisis más extenso que a continuación se presenta.

Predicción de unión de los epítopes a las moléculas de HLA de Clase I.

A todos los péptidos que se logró determinar cómo inmunodominantes se les realizó el análisis de predicción de unión a las moléculas de HLA de clase I. Un panel de 5 moléculas HLA A (*02:01,*24:02,*30:02,*03:01,*68:01), 4 moléculas de HLA B (*35:01,*07:02,*35:03,*48:01) y 6 moléculas de HLA C (*07:02, *02:02, *12:03, *16:01, *03:04, *08:01) pertenecientes a los pacientes diagnosticados con dengue, fueron seleccionados para realizar el análisis. Las predicciones de unión se realizaron con ayuda del sitio web “Immune Epitope Database and Analysis Resource” IEDB (www.iedb.org). Para cada grupo de alelos se seleccionó el péptido inmunodominante con una longitud de 10 aminoácidos.

Localización de péptidos

Una vez realizado el ensayo ELISPOT IFN γ para determinar los péptidos inmunodominantes, se realizó el análisis de las secuencias para localizar los epítopes en la proteína nativa. Se realizó el análisis sobre las secuencias aminoacídicas de la cepa de referencia de Dengue que se encuentra en el NCBI. Se obtuvieron las secuencias de las proteínas NS3, NS4 A y B y

NS5; cada una de las secuencias aminoacídicas se analizaron en programas de modelaje como I-TASSER (Yang *et al.*, 2015), y PHYRE² (Kelley *et al.*, 2015) para la obtención de la estructura, una vez obtenida la estructura se analizaron en el programa Chimera 1.10.2 para la búsqueda de los péptidos inmunodominantes.

Análisis de datos

Los resultados de ELISPOT se ingresaron en una base de datos de Microsoft Excel y se calculó la positividad de la siguiente manera: el promedio de puntos de los pozos en duplicado por cada grupo de péptidos menos el promedio de puntos de los pozos en duplicado que contiene el control negativo. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 7. Todos los datos son expresados como la mediana +/- la desviación estándar (SEM). Los resultados de los ensayos de ELISPOT se analizaron con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Un valor de P menor de 0.05 ($P < 0.05$) fue considerado como significativo.

RESULTADOS

Características de los pacientes reclutados

Este estudio se realizó con las muestras obtenidas de un total de 26 pacientes provenientes del municipio de Lázaro Cárdenas en el estado de Michoacán. Las características de los pacientes y los resultados de los diagnósticos realizados por el LESP de Michoacán se resumen en la Tabla 2. De los 26 pacientes, 14 (53%) eran del género femenino, 26 (100%) presentaron cuadro febril con una temperatura media de 38.5 °C (rango intercuartil [RI]= 38.0-39.0 °C). Se presentaron 2 hospitalizaciones (7.6%) y 1 caso de dengue grave (3.8%).

Todas las pruebas serológicas y moleculares de diagnóstico se aplicaron a las muestras de todos los pacientes. Un total de 18/26 (69.2%) de los pacientes resultaron dengue-positivos según alguna de las pruebas realizadas. De los pacientes positivos, 16 pacientes fueron IgG positivos (88.8%), 1 paciente fue NS1 positivo (5.5%), y 1 paciente fue IgM positivo (5.5%). El alto porcentaje de pacientes IgG positivos es un indicador de que la mayoría los pacientes ya habían cursado con una infección previa de dengue, lo cual es probable en una zona endémica como Lázaro Cárdenas, Michoacán.

La serotipificación por RT-PCR indicó que 5 pacientes estaban infectados por DENV-1. Dos de estos pacientes (40%) fueron IgG positivos, dos (40%) IgG/IgM negativos y uno (20%) IgG/NS1 positivo. En las 13 muestras IgG positivas restantes (72% del total de muestras) no se detectó por RT-PCR ácido nucleico viral.

Los resultados de secuenciación y tipificación de los genes MHC clase I también se muestran en la Tabla 2 en la cual se observa la caracterización de cada uno de los pacientes al que se le realizó la extracción de ADN. De los 26 pacientes solo estuvieron disponibles muestras para la extracción de ADN para 21 de ellos. Los resultados muestran que el alelo con mayor frecuencia en los pacientes reclutados en este estudio es el HLA-C* 07:02 presente en 7

(20%) pacientes, y en uno de ellos de manera homocigótica (AV0017). También se encontraron alelos, los cuales se han reportado que tienen relación con la protección hacia la infección por dengue, como el alelo B*35:01 (Loke *et al.*, 2001), y con la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad como el alelo A*24 (Malavige *et al.*, 2011). De manera interesante, para el caso de tres pacientes se obtuvieron alelos que no se encuentran reportados aún, uno para HLA-B (B* 15_N) y dos para HLA-C (C*15_N y *03_N). Estos datos de caracterización fueron utilizados para la predicción de unión con los epítopes inmunodominantes que se determinaron en los ensayos de ELISPOT IFN γ .

Tabla 2. Características de los pacientes.

Paciente	Género	Edad	Prueba rápida positiva	Días entre fiebre y toma	IgG Elisa	IgM Elisa	NS1 Elisa	Serotipo	Temp.° C *	Hosp	HLA A	HLA B	HLA C
AV001	F	22	Si	0	+	-	+	DENV-1	39.1	No	02:06; 31:01	35:01; 39:05	04:01; 07:02
AV002	F	69	Si	2	+	-	-	DENV-1	39	Si	02:01; 24:02	39:01; 52:01	03:03; 07:02
AV003	F	50	Si	1	+	-	-	-	37	No	30:02; 33:03	07:02; 27:05	02:02; 07:02
AV004	F	35	ND	6	-	-	-	DENV-1	37	No	ND	ND	ND
AV005	M	18	Si	1	+	-	-	DENV-1	38.9	ND	03:01; 30:02	27:01; 35:03	02:02; 12:03
AV006	F	38	Si	0	-	-	-	DENV-1	39.5	No	02:06; 24:02	40:02; 52:01	03:03; 15:02
AV007	M	29	Si	1	-	-	-	-	38.5	No	01:02; 03:01	40:02; 49:01	02:02; 15_N
AV008	M	23	Si	0	-	-	-	-	38	ND	02:05; 24:02	07:02; 44:03	07:02; 16:01
AV009	M	25	Si	3	+	-	-	-	37.5	No	02:01; 24:02	39:02; 45:01	03:04; 16:01
AV010	F	23	Si	0	+	-	-	-	38.5	No	ND	ND	ND
AV011	M	18	ND	88	-	-	-	-	38.8	No	ND	ND	ND
AV012	F	24	Si	1	+	-	-	-	39.5	No	ND	ND	ND
AV013	F	38	Si	1	+	-	-	-	38	No	ND	ND	ND
AV014	F	15	Si	1	+	-	-	-	38.5	No	03:01; 11:01	35:01, 55:01	01:02; 04:01
AV015	F	17	Si	1	+	+	-	-	38.5	No	02:02; 24:02	35:14; 58:01	03:02; 04:01
AV016	M	68	Si	0	+	-	-	-	38	Si	02:01; 68:01	07:02; 48:01	08:01; 16:01
AV017	M	19	Si	1	+	-	-	-	39.5	No	02:01; 30:02	35:01; 39:02	07:02; 07:02
AV018	F	25	Si	1	+	ND	-	-	38.5	No	02:01; 26:01	13:02; 35:01	04:01; 06:02
AV019	M	12	Si	1	+	-	-	-	38.2	No	03:01; 31:01	15_N; 40:02	03:04; 03_N
AV020	M	25	Si	2	-	-	ND	-	38.5	No	11:01; 31:01	14:01:35:12	04:01; 05:01
AV021	F	16	ND	2	-	-	-	-	39.1	No	24:02; 24:22	40:02; 40:02	03:04; 03_N
AV022	F	48	Si	2	+	-	-	-	38	No	02:11; 30:02	38:01:39:01	ND
AV023	M	16	ND	1	-	-	-	-	40	No	03:01; 68:03	07:02; 35:12	01:02; 07:02
AV024	M	11	ND	1	-	-	-	-	39	No	02:06; 11:01	35:01; 51:01	04:01; 08:10
AV025	F	28	Si	1	-	-	-	-	38.7	No	03:01; 24:02	40:02; 51:01	02:02; 07:02
AV026	M	15	Si	1	+	-	-	-	39	No	26:01; 31:01	15:15; 38:01	01:02; 12:03

F= Femenino M= Masculino ND= No determinado * Temperatura del paciente durante la evaluación clínica.

Grado de conservación entre las secuencias de los serotipos circulantes y las secuencias contenidas en los inmunógenos experimentales

Con el objetivo de estimar el grado de conservación de las secuencias que componen a los inmunógenos experimentales con respecto a las secuencias de dengue reportadas en México y la región, se analizaron un total de 272 secuencias de los cuatro serotipos circulantes. Mediante una búsqueda de la base de datos Virus Variation de NCBI (Brister *et al.* 2014) de genomas completos de DENV reportados de México, se encontraron un total de 129 secuencias de genomas completos. Sin embargo, sólo se encontraron representados 3 serotipos, DENV1, DENV2 y DENV3, y había un total de 3 genomas de DENV3. Por lo tanto, se incluyeron genomas de dengue reportados en Colombia y Brasil, ya que son países con un alto porcentaje de incidencia de dengue y para los cuales hay un número alto de genomas completos secuenciados, en particular de DENV 3 y DENV 4. Se obtuvieron genomas completos de los 4 serotipos de dengue, 95 genomas de Brasil y 59 genomas de Colombia.

Del total de 272 secuencias de genomas completos de los 4 serotipos de dengue de esta búsqueda bioinformática, se realizó la extracción de las secuencias correspondientes a las proteínas no estructurales NS3, NS4 A y B y NS5, a través del programa bioinformático Geneious (Kearse *et al.*, 2012). Una vez realizada la extracción se realizó la traducción para realizar el análisis de conservación en base a las secuencias de aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas junto con las secuencias de los 2 primeros inmunógenos propuestos, VAC-A y VAC-B. Se limitó el análisis a los inmunógenos VAC-A y VAC-B ya que están compuestas de secuencias conservadas contiguas de NS3 a NS5 sin secuencias repetidas. En comparación, las secuencias que componen VAC-C y VAC-D contienen secuencias repetidas (figura 10), lo cual dificulta el análisis de conservación por alineamiento.

En la figura 11 se resume el análisis de 274 posiciones de aminoácidos del inmunógeno alineados con secuencias de aminoácidos de aislados latinoamericanos. En el análisis de alineamiento de las secuencias se observó que VAC-A tiene en total 410 aminoácidos, sin embargo, solo se realizó el análisis de 274 posiciones de aminoácidos, ya que 136

aminoácidos pertenecen al péptido-señal, sitios de restricción, conectores para la clonación del gen sintético en el vector y dos secuencias repetidas (Figura 11 Panel B).

La media de identidad total fue de 0.98 (desviación estándar [DE]= 0.08). Para secuencias de NS3 fue de 0.96 (DE=0.09), para secuencias de NS4 fue de 0.97 (DE=0.08) y para secuencias de NS5 fue de 0.98 (DE= 0.05). No se observaron diferencias significativas en la identidad entre diferentes genes (NS3 vs. NS4B, $P = 0.35$; NS4B vs NS5=0.81; y NS3 vs NS5, $P = 0.18$; prueba de Mann-Whitney) (Figura 11PanelA).

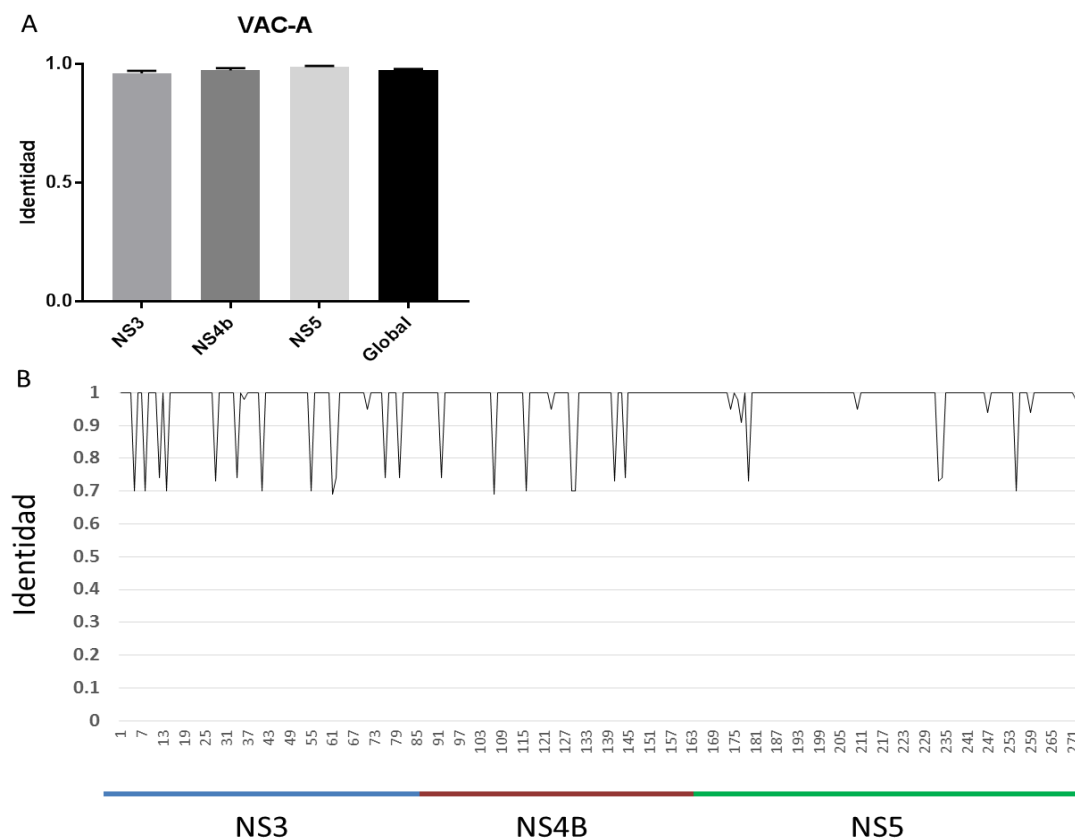


Figura 11: Estimación del grado de conservación entre la secuencia del inmunógeno VAC-A (regiones de NS3-NS5) y alineamiento de las regiones de las secuencias del proteoma de DENV 1-4 latinoamericanas. Se analizaron 274 posiciones aminoacídicas obteniendo los valores de identidad entre regiones de las secuencias reportadas y la secuencia que compone al inmunógeno. (Panel A) Porcentaje de identidad entre cada proteína no estructural (NS3-NS5) y el porcentaje global de la primera secuencia del inmunógeno (VAC-A). (Panel B) Valores de identidad de los sitios correspondientes a las tres proteínas (NS3-NS5), valor de 1 = 100% de identidad, valores menores se alejan del 100% de identidad.

Para estimar el grado de conservación de VAC-B, el segundo inmunógeno experimental, se analizaron 1480 posiciones de amino ácidos alineados con los genomas latinoamericanos. Como se esperaba, las secuencias de VAC-B son menos conservadas que VAC-A y por lo que se obtuvo un valor mínimo de conservación de 0.24 y una media de 0.86. No se observaron diferencias en cuanto a la identidad entre diferentes genes (Figura 12 Panel B). La media de identidad total fue 0.86 (DE= 0.2281), para secuencias de NS3 una media de 0.86 (DE=0.2225), para secuencias de NS4 una media de 0.83 (DE=0.24) y para secuencias de NS5 una media de 0.87 (DE=0.22). Se observaron diferencias significativas solo entre NS4AB y NS5 (NS3 vs. NS4AB, $P=0.06$; NS4AB vs NS5=0.02; y NS3 vs NS5, $P=0.64$; prueba de Mann-Whitney) (Figura 12 Panel B).

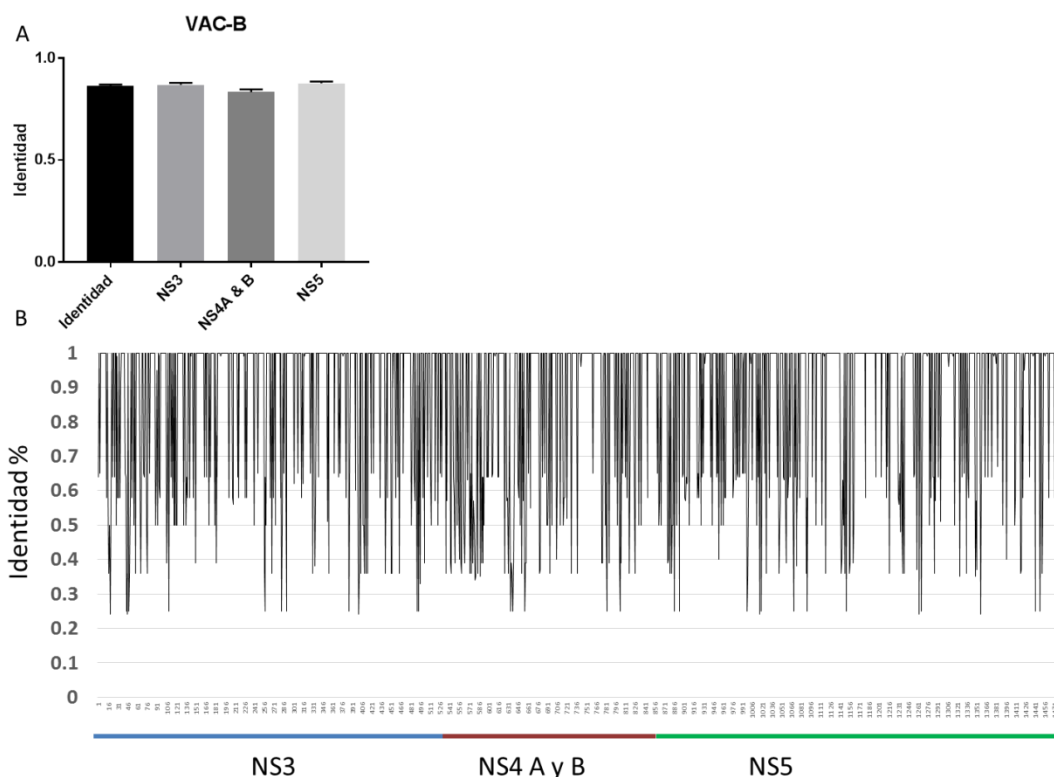


Figura 12: Estimación del grado de conservación entre el inmunógeno VAC-B (regiones de NS3-NS5) y las regiones correspondientes de las secuencias del proteoma de DENV 1-4 latinoamericanas. Se analizaron 1480 posiciones aminoacídicas obteniendo los valores de identidad entre regiones de las secuencias reportadas y la secuencia que compone al inmunógeno. (Panel A) Porcentaje de identidad entre cada proteína no estructural (NS3-NS5) y el porcentaje global del inmunógeno VAC-B. (Panel B) Valores de identidad de los sitios correspondientes a las tres proteínas (NS3-NS5), valor de 1 = 100% de identidad, valores menores se alejan del 100% de identidad.

Respuesta de IFN- γ de linfocitos T hacia conjuntos de péptidos de los inmunógenos experimentales en pacientes infectados con dengue y grupos control

La respuesta de IFN- γ , se evaluó mediante la técnica de ELISPOT, para medir la respuesta de células T dengue específica, para lo cual se estimularon las células mononucleares de sangre periférica con conjuntos de péptidos del inmunógeno experimental VAC-D (el cual comprende todo los péptidos incluidos en VAC- A, B y C) en los 18 pacientes diagnosticados como dengue positivos, así como en 8 pacientes diagnosticados como dengue negativos del grupo de pacientes de Lázaro Cárdenas (una zona endémica de dengue) y 4 pacientes sin una presunta infección previa de dengue y habitantes de una zona no endémica de dengue. El primer grupo control pacientes sin infección previa de dengue habitantes de zonas no endémicas tuvieron una respuesta no significativa hacia los inmunógenos. En el caso de los pacientes dengue positivos se observa una respuesta a 1 o más grupos de péptidos proteicos y en el caso de los pacientes dengue negativos que habitan en zonas endémicas se observó una respuesta basal a los grupos de péptidos proteicos. Del grupo de pacientes dengue positivos, la respuesta global (la suma de la respuesta hacia todos los péptidos) de IFN- γ tuvo una media 216.7 unidades formadoras de spots dengue-específicas (DSFU)/ 10^6 células (desviación estándar [SD]=16.88-207.5) Del grupo de pacientes dengue negativos, la respuesta media de IFN- γ fue de 14.38 DSFU/ 10^6 células (SD= 16.84) .Por último, para el grupo de pacientes control, la respuesta global de IFN- γ fue media 13.75 DSFU/ 10^6 células (SD= 21.36). La respuesta de los pacientes dengue positivos fue significativamente mayor a la de los pacientes dengue negativo (P=0.02) y a la del grupo control (P=0.04) (Figura 13).

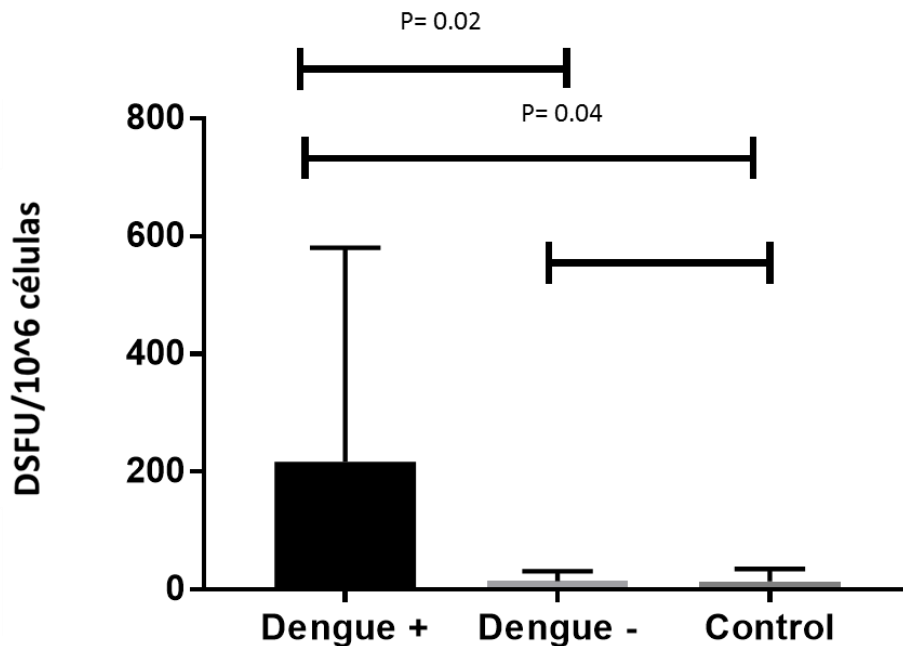


Figura 13: Comparación de respuesta celular hacia péptidos altamente conservados del virus del dengue entre diferentes grupos. Se muestra el análisis de la respuesta de 3 grupos de pacientes mediante ensayos de ELISPOT IFN- γ . Los pacientes dengue +, son el grupos de pacientes reclutados que fueron diagnosticados con dengue. Los pacientes dengue – son el grupo de pacientes reclutados que no tenía infección con dengue al momento de la muestra. El grupo control son pacientes que no han tenido una infección previa y que viven en zonas no endémicas de dengue. La barra representa la media de unidades formadoras de puntos dengue específicos (DSFU)/ 10^6 células por cada grupo de pacientes y los bigotes la desviación estándar.

De los resultados de los ensayos de IFN γ correspondientes a los pacientes dengue positivos, de los 18 pacientes diagnosticados con dengue, 15 (83.3%) tuvieron una respuesta positiva hacia 1 o más grupos de las proteínas NS (según el criterio de positividad [mínimo de 10 DFSU/ 10^6 células y dos veces el valor del control negativo]) y 3 (16.6%) pacientes no respondieron a ninguno (Figura 14).

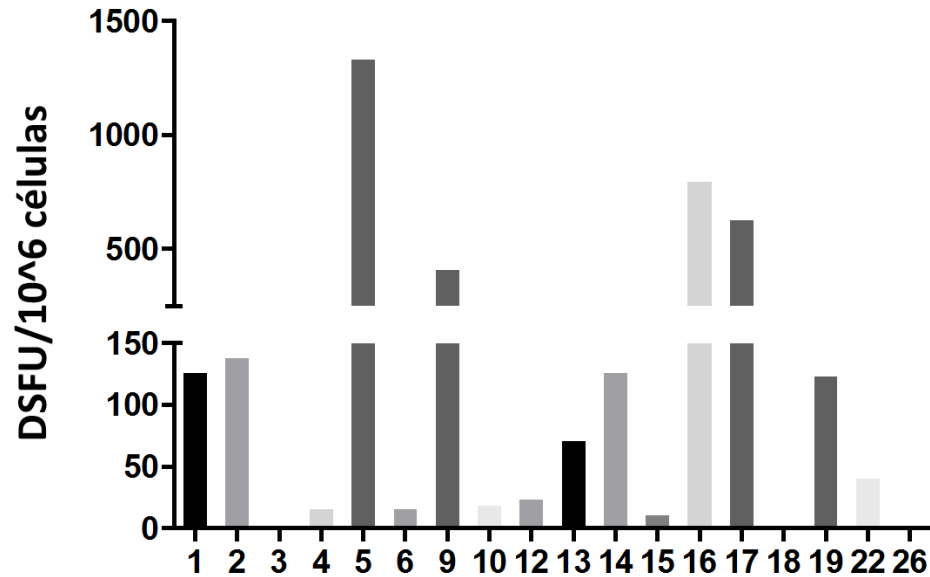


Figura 14: Respuesta celular total hacia el conjunto de péptidos que componen a VAC-D. Se muestra el análisis de la respuesta de los 18 pacientes dengue positivo mediante ensayos de ELISPOT IFN- γ . Se observa la suma del número de unidades formadoras de puntos dengue específicas (DSFU)/millón de células por cada paciente hacia péptidos de las proteínas NS3, NS4 y NS5. Los pacientes se encuentran numerados del 1 al 26, sin el prefijo AV0 para fines gráficos.

Después de realizar los ensayos de ELISPOT IFN γ de los 18 pacientes dengue positivos, se analizaron los datos obtenidos para determinar la respuesta celular a los grupos de péptidos que corresponde a las proteínas no estructurales del virus del dengue. Los resultados demostraron que 15 pacientes (83.3%) respondieron a 1 o más de los grupos de péptidos, con una inmunodominancia de respuesta celular hacia los péptidos que corresponden a la proteína no estructural 3 (NS3). Del grupo de NS3 la respuesta global (la suma de las respuestas de los pacientes dengue positivo hacia los péptidos de la proteína) tuvo una media de 175.2 DSFU/10⁶ células (SD= 328.9). En el caso del grupo de péptidos de NS4 se obtuvo una respuesta global con una media de 32.19 DSFU/10⁶ células (SD= 88.26), y del grupo NS5 se obtuvo una respuesta global con una media de 66.56 32.19 DSFU/10⁶ (SD= 184). Se observaron diferencias significativas entre las respuesta global de NS3 en comparación de NS4 y NS3 en comparación de NS5 (NS3 vs. NS4AB, P = 0.0005; NS4AB vs NS5= 0.5061; y NS3 vs NS5, P = 0.0060; prueba de Mann-Whitney) (Figura 15).

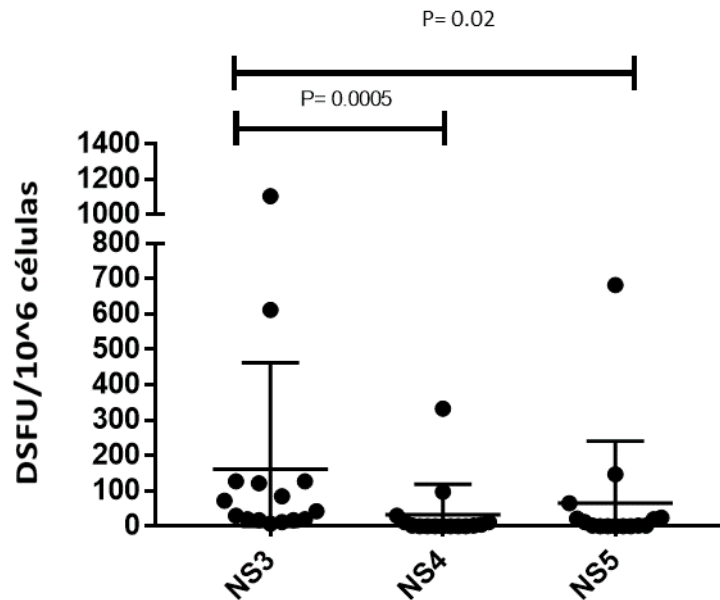


Figura 15: Magnitud de respuesta celular hacia las regiones no estructurales del virus del dengue. Gráfica de *caja* donde se muestra la magnitud de la respuesta de cada paciente dengue positivo hacia el grupo de péptidos de las proteínas NS. Las líneas horizontales representan la media de las unidades formadoras de spots dengue específicas (DSFU)/10⁶ células de cada grupo y los bigotes el error estándar. Prueba de Mann-Whitney.

Determinación de péptidos inmunodominantes- análisis de subgrupos de péptidos

Una vez realizados los primeros ensayos de ELISPOT IFN γ para determinar la magnitud de la respuesta de los pacientes dengue seropositivos hacia grupos de péptidos de las proteínas NS3, NS4A y B y NS5, se desarrolló una estrategia de análisis para identificar los péptidos individuales que estaban siendo reconocidas por las células T de los pacientes. El número de péptidos que pertenecen a (NS3=70 péptidos a NS4AB= 40 péptidos y a NS5=69 péptidos). Se dividieron en 12 subgrupos los péptidos para NS3 y NS5 y en 7 para NS4. Se utilizaron estos sub grupos de péptidos para volver a estimular las células mononucleares

del mismo paciente. Una vez obtenidos los resultados de este segundo análisis de ELISPOT IFN γ , se identificó el subgrupo de péptidos al que el paciente estaba respondiendo, y se dividió el subgrupo en proteínas individuales. Estos subgrupos contienen 6 péptidos cada uno, y se volvió a realizar el ensayo de ELISPOT, estimulando a las PBMC con los péptidos de manera individual; cada péptido consta de 20 aa de resolución que tienen un solapamiento de 10 aa con el siguiente péptido (Figura 16).

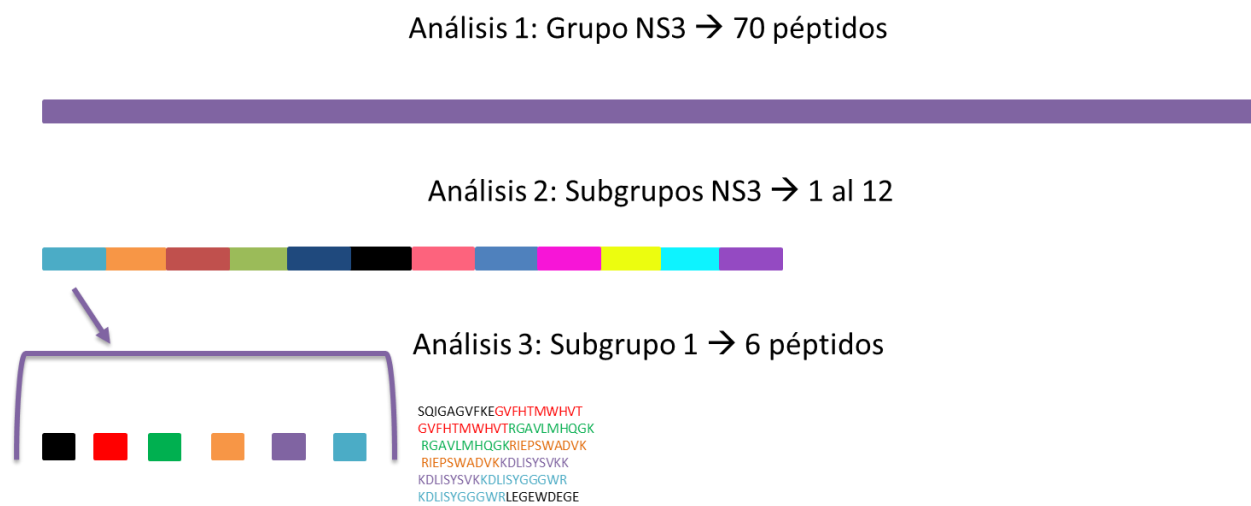


Figura 16: Estrategia de análisis para los ensayos de ELISPOT IFN γ . En este esquema se muestran los tres diferentes análisis que se realizaron con la técnica de ELISPOT. El ejemplo muestra el caso de NS3, que contiene un total de 70 péptidos que se utilizaron en el primer análisis global. Estos péptidos se dividieron en 12 subgrupos, 11 con 6 péptidos y 1 con 4 péptidos para el segundo análisis. Finalmente, los subgrupos que registraron respuesta positiva, se separaron para utilizar el péptido individual en el último análisis.

De los 18 pacientes dengue positivo, en el primer análisis se observó que 8 pacientes tuvieron una respuesta hacia la proteína NS3 según los criterios de positividad. Por lo tanto, el segundo análisis de ELISPOT de IFN γ se realizó con las células de esos 8 pacientes que fueron estimuladas por los subgrupos de péptidos para evaluar su respuesta. Los resultados mostraron que 6 de los 8 pacientes respondieron a uno o más subgrupos de péptidos. La mayoría de los pacientes muestran una respuesta hacia el mismo subgrupo de péptidos que corresponden a los subgrupos 4, 5, 6 y 7; sin embargo se observa una gran diferencia en la respuesta de 2 pacientes hacia el subgrupo 9 donde se obtuvo la máxima respuesta de 435

DSFU del paciente AV005. Sólo se muestran los resultados de los 6 pacientes que tuvieron respuesta favorable según los criterios de positividad. La respuesta máxima fue de 435 DSFU/10⁶ y la mínima de 20 DSFU/10⁶ (Figura 17).

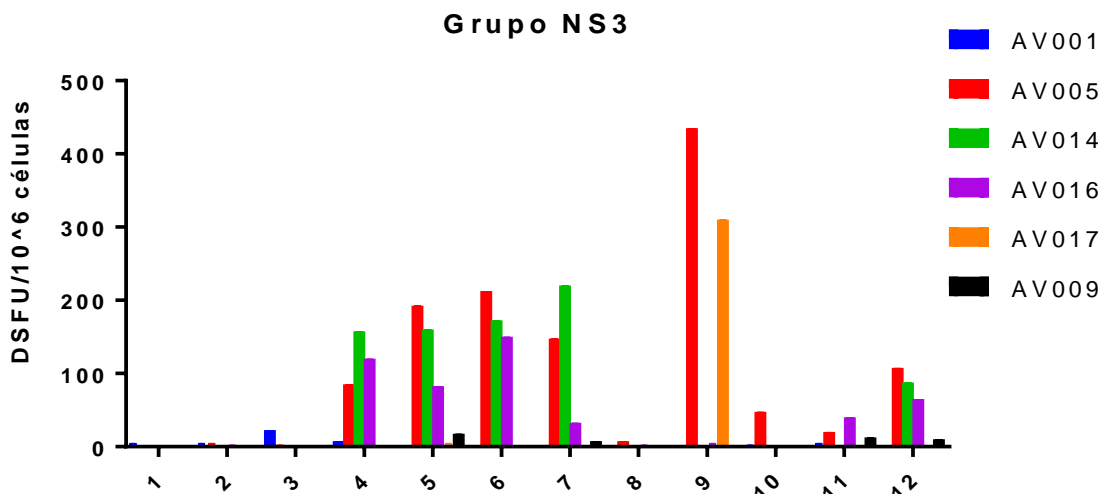


Figura 17: Respuesta de los pacientes DENV positivo a los subgrupos de péptidos correspondiente a NS3. Se muestra los resultados de los ensayos de ELISPOT dónde se determinó la respuesta de IFN- γ de los pacientes hacia los subgrupos de la proteína NS3. Los valores sólo se muestran para los 6 pacientes que respondieron favorablemente (según los criterios de positividad), de los 8 pacientes que se habían determinado en el análisis global.

De los 18 pacientes dengue positivos que mostraron respuesta en el primer análisis de ELISPOT IFN γ , solo 2 pacientes tuvieron una respuesta positiva hacia el grupo de NS4. Las células de estos pacientes fueron estimuladas con 7 subgrupos de péptidos de la proteína NS4 para evaluar su respuesta. Los resultados mostraron que el paciente AV005 presentó una respuesta favorable a los 7 subgrupos de péptidos mientras que el paciente AV009 mostró positividad para 3 de los 7 subgrupos. Los subgrupos dónde se observa mayor respuesta son los subgrupos 4 y 6 (Figura18).

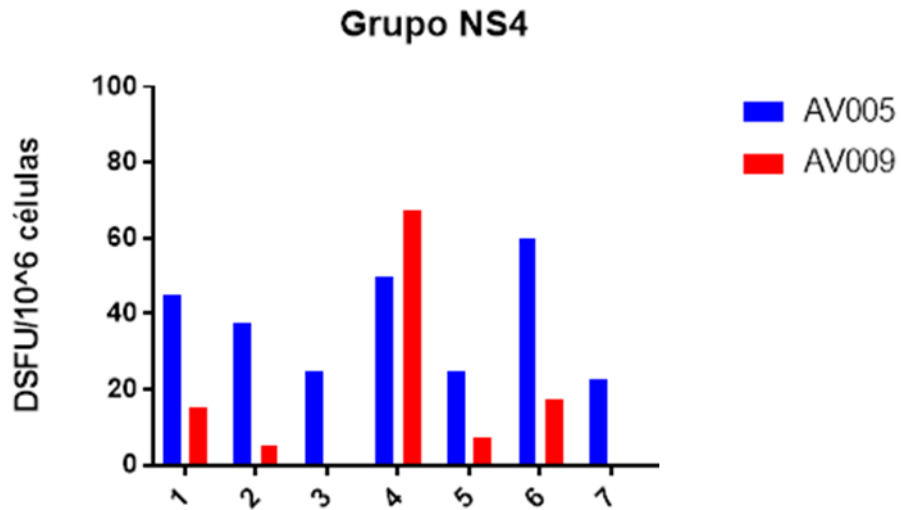


Figura 18: Respuesta de los pacientes DENV positivo a los subgrupos de péptidos correspondiente a NS4. Se muestra los resultados de los ensayos de ELISPOT dónde se analizaron una total de 7 subgrupos de péptidos. Se determinó la respuesta de IFN y de los 2 pacientes que tuvieron repuesta hacia los grupos de péptidos de la proteína NS4 según los criterios de positividad, los valores se encuentran expresados en DSFU/10⁶.

De los 18 pacientes dengue positivo que mostraron respuesta en el primer análisis de ELISPOT de IFN γ , 3 pacientes tuvieron una respuesta positiva hacia el grupo de NS5. Las células de estos pacientes fueron estimuladas con 12 subgrupos de péptidos de la proteína NS5 para evaluar su respuesta. Los resultados mostraron que en el paciente AV016 respondió favorablemente a los 12 subgrupos de péptidos, el paciente AV010 a 10 subgrupos, mientras que el paciente AV002 sólo mostró positividad para 1 de los 12 grupos. Los subgrupos hacia los que se observa la mayor respuesta fueron los subgrupos 5 y 7 con la mayor repuesta del paciente AV016 hacia el subgrupo 5 (Figura19).

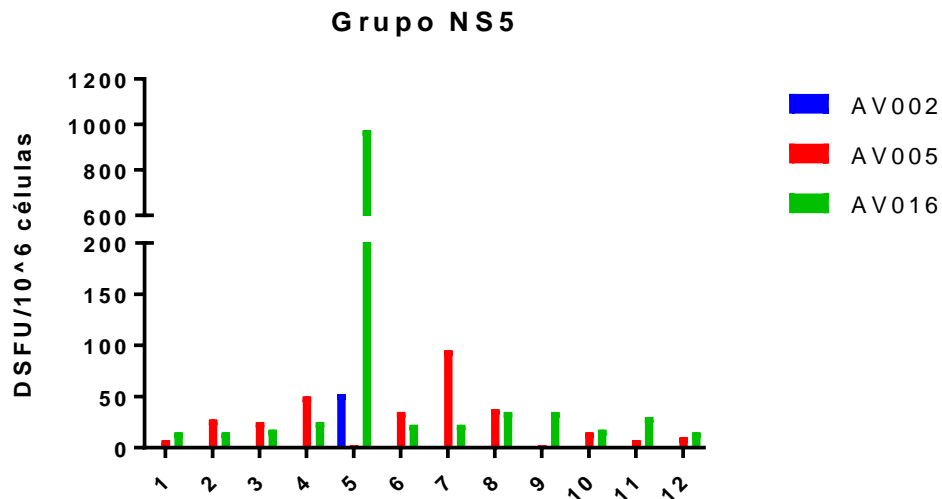


Figura 19: Respuesta de los pacientes DENV positivo a los subgrupos de péptidos correspondiente a NS5. Se muestra los resultados de los ensayos de ELSPOT IFN y dónde se determinó la respuesta celular de los pacientes hacia los subgrupos de la proteína NS5. 3 pacientes tuvieron repuesta hacia este grupo. El paciente AV016 respondió a todos los subgrupos de péptidos, el paciente AV005 a 10 de los 12 subgrupos mientras que el paciente AV02 a 1 subgrupo. El subgrupo 5 tiene la repuesta con mayor magnitud.

Determinación de péptidos inmunodominantes- análisis de péptidos individuales

Una vez realizado el segundo análisis mediante ensayos de ELISPOT IFN γ que determinó a cuál subgrupo de las proteínas respondieron los pacientes, se realizó el tercer análisis con ensayo de ELISPOT IFN γ para encontrar el o los péptidos inmunodominantes. Una vez determinados los subgrupos, que tuvieron mayor respuesta en el análisis anterior, se realizó la separación de péptidos que conforman ese subgrupo. Estos ensayos de ELISPOT IFN γ se limitaron a los pacientes con la mayor respuesta de IFN γ a los subgrupos de péptidos del análisis anterior, con el fin de incrementar la posibilidad de identificar con certeza péptidos inmunodominantes. Los pacientes con mayor respuesta fueron AV005, AV010, AV016 y AV017.

Los pacientes AV005 y AV017 respondieron favorablemente al subgrupo 9 de NS3. Interesantemente, se observa en este análisis la repuesta de los 2 pacientes hacia los mismos péptidos (Figura 20, Panel A). Al analizar la secuencia de aa que conforman los péptidos, se encontró una secuencia de 10 aa que comparten los péptidos TPEGIPTLF. Este

péptido ya se ha reportado en la literatura, como inductor de respuesta de células T (Piazza *et al.*, 2014).

El paciente AV010 fue el único paciente que tuvo respuesta hacia subgrupo 1 con una clara preferencia hacia el péptido 4 (Figura 20, Panel B) y en menor medida hacia el péptido 6. El paciente AV0016 mostró respuesta positiva para todos los péptidos que conforman el subgrupo 11 lo cual indica que existe más de 1 péptido capaz de estimular la respuesta de células T (Figura 20, Panel C).

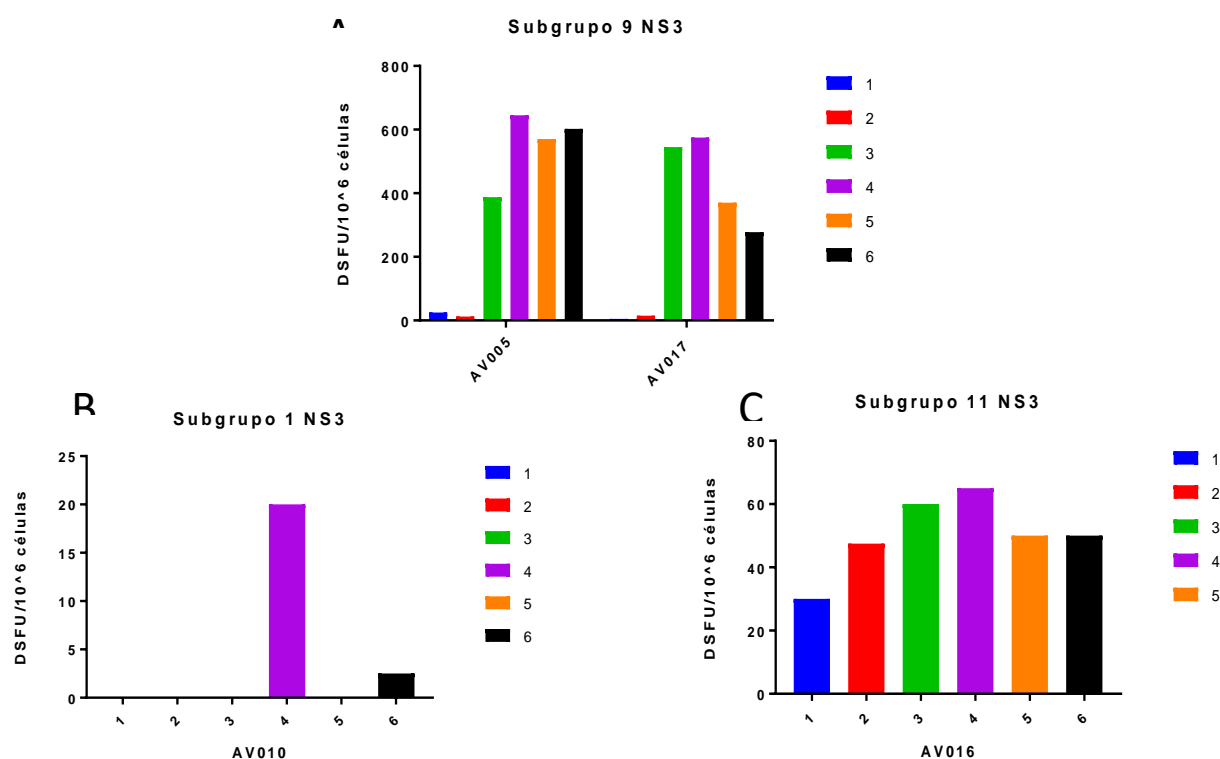


Figura 20: Análisis de ELISPOT IFN γ para determinar el péptido o los péptidos inmunodominantes de la proteína NS3. Se muestran los resultados de las células de los pacientes que respondieron a los péptidos del subgrupo de NS3. Los pacientes AV005 y AV017 respondieron a los mismos péptidos (3, 4, 5 y 6) del subgrupo 9 (Panel A). El paciente AV010 muestra una respuesta hacia un péptido determinado del subgrupo 1, el péptido 3 (Panel B). El paciente AV016 tuvo respuesta positiva para los 6 péptidos que conforman el subgrupo 11 (Panel C).

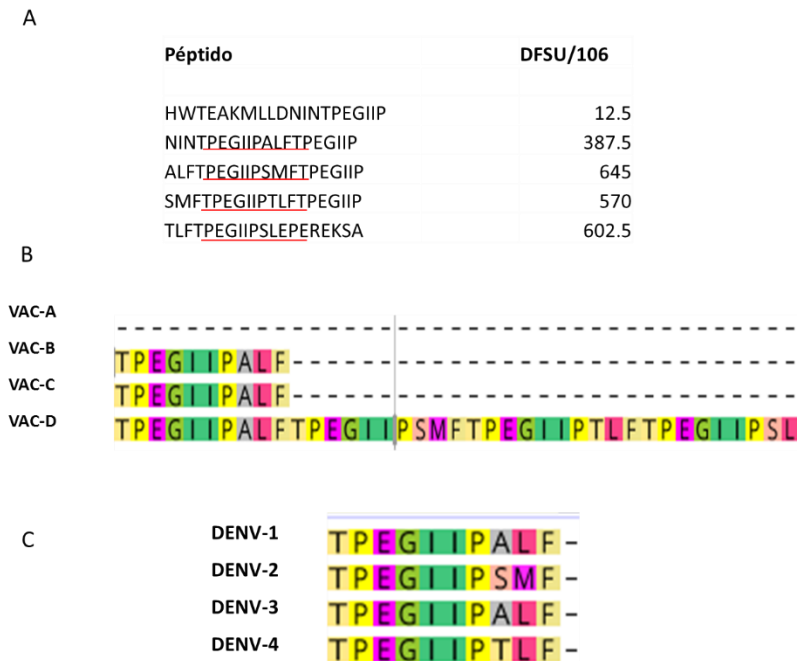


Figura 21: Análisis de la secuencia del péptido inmunodominante de la proteína NS3. Se muestra la secuencia de los péptidos de la proteína NS3 que indujeron respuesta celular, se observa una secuencia conservada entre ellos (Panel A). Se realizó la búsqueda del péptido en las 4 secuencias de los inmunógenos, el cual se encuentra en tres de los cuatro inmunógenos (Panel B). Se realizó la búsqueda del péptido en las secuencias de referencia de dengue de los cuatro serotipos y se observó que el péptido se encuentra en los 4 serotipos, en el DENV1 y DENV3 se encuentra conservado ya que tiene la misma secuencia y un cambio en una posición aminoácídica en los serotipos DENV2 y DENV4 (Panel C).

De la misma manera, se realizó el tercer análisis para los pacientes que respondieron a los subgrupos de la proteína NS4. El paciente AV009 fue el único que respondió a los péptidos del subgrupo 4 de la proteína NS4, de los 6 péptidos que lo conforman, hubo respuesta a 4 de ellos, 3 de los péptidos son consecutivos, pero debido a las diferencias entre la magnitud de respuesta, indica que probablemente se traten de péptidos diferentes y/o que se encuentren en la parte central de la secuencia (Figura 21, Panel A). El paciente AV005 respondió al subgrupo 5 de la proteína NS4, en 5 de los 6 péptidos hubo respuesta favorable y de igual forma que en el caso anterior podría tratarse de diferentes péptidos que indiquen respuesta celular (Figura 21, Panel B).

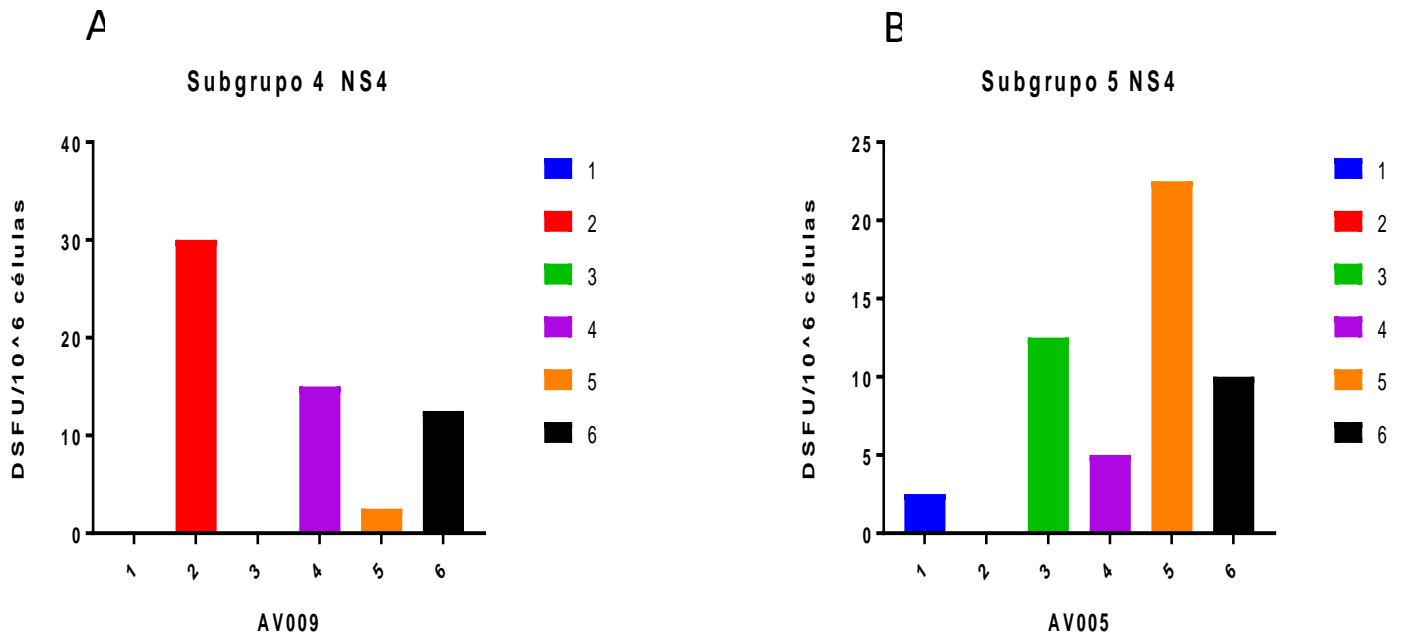


Figura 22: Análisis de ELISPOT IFN γ para determinar el péptido o los péptidos inmunodominantes de la proteína NS4. Se muestran los resultados de las células de los pacientes que respondieron a los péptidos del subgrupo de NS4. El paciente AV005 respondió positivamente a los péptidos 3, 5 y 6 del subgrupo 5, con una inmunodominancia al péptido 5. El paciente AV009 respondió positivamente al subgrupo 4, péptidos 2, 4 y 6 con una inmunodominancia hacia el péptido 5.

Por último, se realizó el tercer análisis para los pacientes que respondieron a los subgrupos de la proteína NS5. El paciente AV016 respondió a los péptidos del subgrupo 5 de la proteína NS5, respondiendo a los 6 péptidos que lo conforman, pero hubo una respuesta preferente al péptido 3 (Figura 23, Panel A). El paciente AV005 respondió al subgrupo 7 de la proteína NS5, respondiendo a los 6 péptidos, con respuesta preferente al péptido 1 (Figura 23, Panel A).

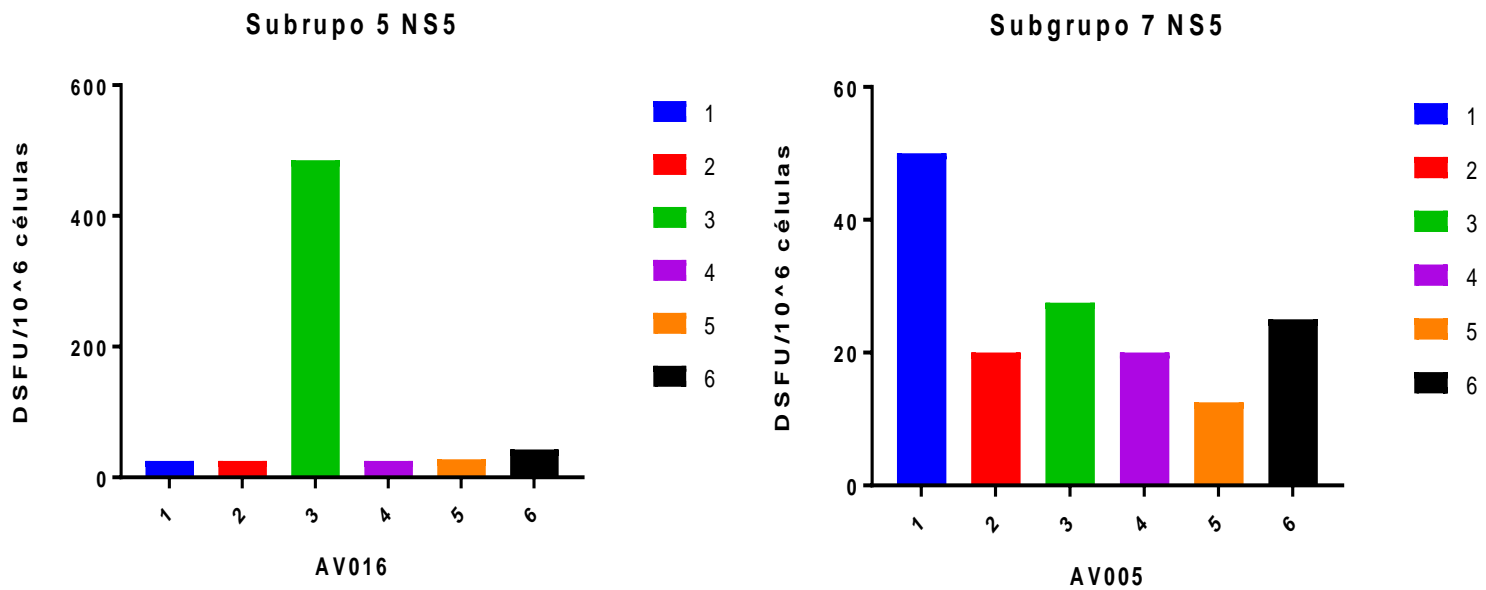


Figura 23: Análisis de ELISPOT IFN γ para determinar el péptido o los péptidos inmunodominantes de la proteína NS5. Se muestran los resultados de las células de los pacientes que respondieron a los péptidos del subgrupo de NS5. El paciente AV016 respondió positivamente a todos los péptidos del subgrupo 5, con una inmunodominancia al péptido 3. El paciente AV005 respondió positivamente a todos los péptidos del subgrupo 7, con una inmunodominancia hacia el péptido 1.

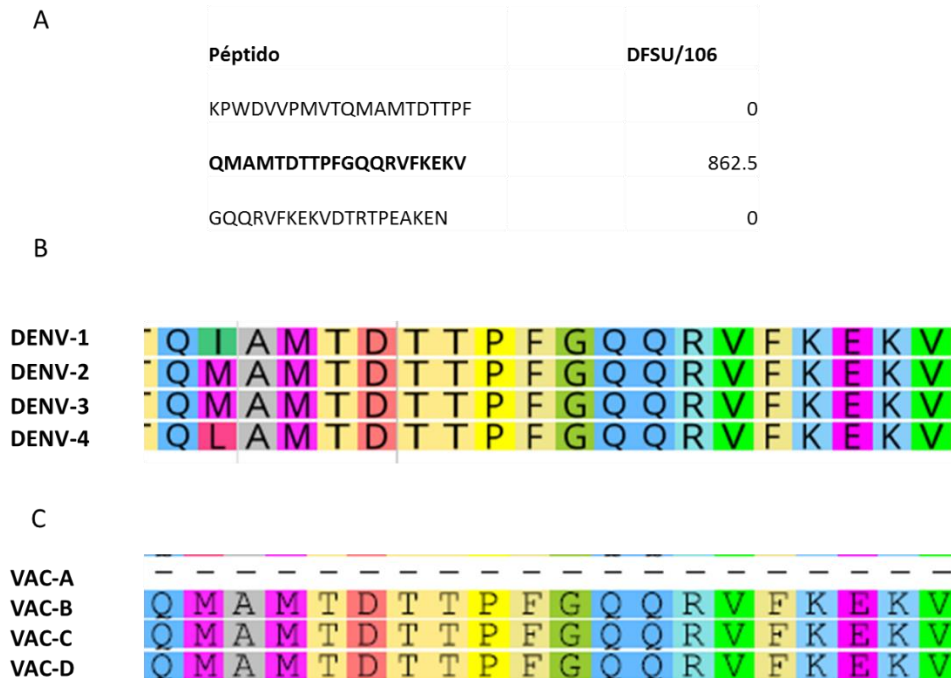


Figura 24: Análisis de la secuencia del péptido inmunodominante de la proteína NS5. Se muestra la secuencia del péptido de la proteína NS5 que indujeron respuesta celular, se observa una secuencia conservada entre ellos (Panel A). Se realizó la búsqueda del péptido en las cuatro secuencias de los inmunógenos, el cual se encuentra en tres de los cuatro inmunógenos (Panel B). Se realizó la búsqueda del péptido en las secuencias de referencia de dengue de los cuatro serotipos y se observó que el péptido se encuentra en los 4 serotipos, en el DENV2 y DENV3 se encuentra conservado ya que tiene la misma secuencia y un cambio en una posición aminoácídica en los serotipos DENV1 y DENV4 (Panel C).

Identificación de los péptidos inmunodominantes en relación a la restricción con las moléculas de HLA de clase I de los pacientes infectados

Una vez analizados los resultados de los ensayos de ELISPOT IFN γ , se lograron determinar los péptidos inmunodominantes para 4 pacientes, AV005, AV009, AV016 y AV017 los cuáles respondieron a diferentes péptidos pertenecientes a uno o más proteínas no estructurales, y solo en el caso de los pacientes AV005 y AV017 respondieron al mismo péptido. Una vez determinada la secuencia del péptido, se realizó la predicción de unión de los dichos péptidos con las moléculas de HLA de clase I que se lograron tipificar de los pacientes reclutados, esta predicción se realizó con los métodos de la base de datos del IEDB. En la tabla 3 se muestran los resultados del análisis de predicción dónde se expresa el rango percentil el cuál es el puntaje del péptido que arroja el programa con uno o varios métodos

de predicción, en dónde más bajo sea el puntaje es un indicador de que el péptido tiene una alta afinidad a la molécula de HLA.

Tabla 3. Resultados de la predicción de los péptidos DENV investigados

Paciente	Restricción HLA Clase I	Proteína	Péptido	Secuencia	Rango Percentil
AV005	HLA-B*35:03	NS3	ALFTPEGIIPSMFTPEGIIP	TPEGIIPTLF	1.7
AV005	HLA-A*03:01	NS5	EFEALGFLNEDHWFSRENSL	FLNEDHWFSR	12.6
AV005	HLA-A*03:01	NS5	SGVEGEGHLKGLGYILRDISK	GLHKLGYILR	2.35
AV005	HLA-B*35:03	NS5	TAGWDTRITEDDLHNEEKIL	DDLHNEEKIL	12.95
AV005	HLA-A*03:01	NS4	AIDLDPYDPKFEKQLGQV	DLDPIPYDPK	3.75
AV005	HLA-C*02:02	NS4	LLMRTTWAVLLMRTTWALCE	MRTTWAVLLM	0.4
AV009	HLA-C*03:04	NS3	KTVVWFVPSIKAGNDIANCLR	KAGNDIANCL	6.7
AV009	HLA-A*24:02	NS4	PLLALGCYSQVNPLTLTAAV	CYSQVNPLTL	0.3
AV009	HLA-C*03:04	NS4	LLLITHYAIIGPGLQAKATR	YAIIGPGLQA	1.8
AV009	HLA-A*02:01	NS4	EAQRRTAAGIMKNPTVDGIM	AAGIMKNPTV	7.15
AV016	HLA-A*68:01	NS3	RNNQILEENMDVEIWTKEGE	ENMDVEIWTK	0.55
AV016	HLA-C*08:01	NS5	QMAMTDTPFGQQRVFKEKV	QMAMTDTPF	1.4
AV017	HLA-B*35:01	NS3	ALFTPEGIIPSMFTPEGIIP	TPEGIIPTLF	0.6

Modelo tridimensional de las proteínas No estructurales para la determinación de los péptidos inmunodominantes en la proteína nativa

Cuando se obtuvieron los resultados de la predicción de unión de los péptidos a las moléculas de HLA de clase I, se realizó la búsqueda de los modelos tridimensionales de las proteínas no estructurales para analizar el sitio donde se encuentran los péptidos que en este estudio se determinaron como inmunodominantes. Todos los modelos fueron analizados en el programa UCSF Chimera 1.10.2 (Pettersen *et al.*, 2004) La figura 25 corresponde al modelo de la proteína NS3, la cual se obtuvo con el programa I-TASSER (Yang *et al.*, 2015) y PHYRE² (Kelley *et al.*, 2015) en la cual se muestran 3 péptidos inmunodominantes analizados, los cuáles se encuentran en la secuencia de esta proteína sin ningún cambio en los aminoácidos. El péptido TPEGIIPTLF, al cual respondieron 2 pacientes, se encuentra en la posición 501 a 510, el cual ya ha sido reportado en la literatura. El péptido KAGNDIANCL se encuentra en la posición 367 a 376 al cual respondió 1 paciente y el péptido ENMDVEIWTK que se encuentra en la posición 576 a 585 con respuesta por parte de 1 paciente.



Figura 25: Modelo de la proteína NS3 de DENV analizado en el programa UCSF Chimera. Se muestran las posiciones de los péptidos en la estructura nativa a los cuáles las células de pacientes infectados con dengue tuvieron respuesta determinada como positiva mediante los ensayos de ELISPOT IFN γ . Se muestra el péptido TPEGIPTLF (magenta), se encuentra en la posición 501 a 510, al cual respondieron 2 pacientes y que ya ha sido reportado por otros grupos. Se muestra el péptido KAGNDIANCL (morado) que se encuentra en la posición 367 a 376 al cual respondió 1 paciente y el péptido ENMDVEIWTK (gris) que se encuentra en la posición 576 a 585 con respuesta de 1 paciente.

La figura 26 corresponde al modelo de la proteína NS4A y NS4B respectivamente, las cuales se obtuvieron con el programa PHYRE² y que se muestran 3 péptidos inmunodominantes analizados, 1 para NS4A y otro para NS4B, los cuáles muestran en la secuencia de 1 a 2 cambios de aminoácidos. El péptido AAGIMKNPKPTV que se encuentra en la proteína NS4A, al cual respondió 1 paciente se encuentra de la posición 10 a 16. En la proteína NS4B, se encuentran los 1 péptidos DLDPIPYDPK se encuentra de la posición 155 a 164 al cual respondió 1 paciente y MRTTWAVLLM que se encontró de manera parcial sin ningún cambio en la secuencia de los aminoácidos en la posición 185 a la 191 con respuesta por parte de 1 paciente.

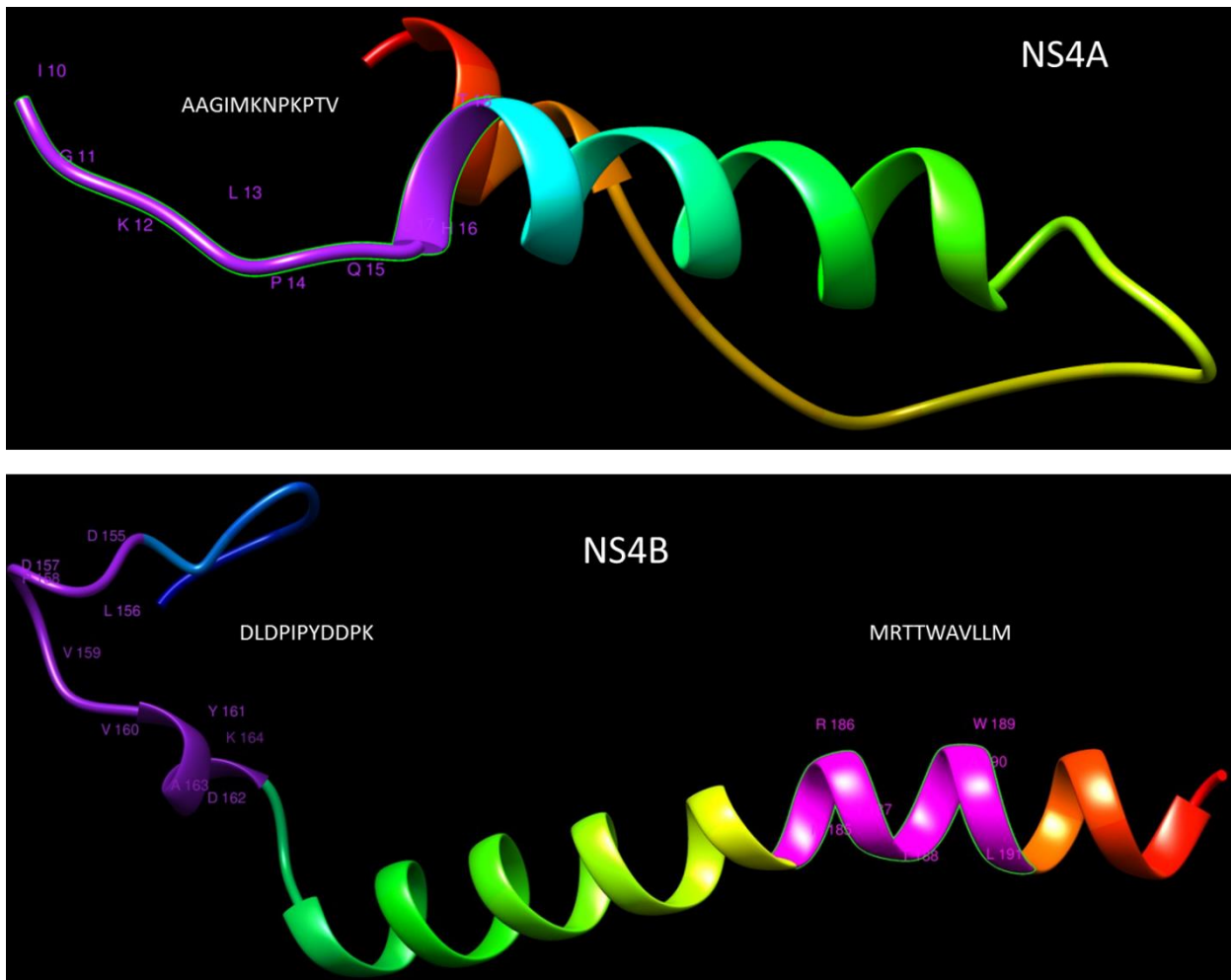


Figura 26: Modelo de la proteína NS4 de DENV analizado en el programa UCSF Chimera. Se muestran las posiciones de los péptidos en la estructura nativa a los cuáles las células de pacientes infectados con dengue tuvieron respuesta determinada como positiva mediante los ensayos de ELISPOT IFN γ . El péptido AAGIMKNPKPTV (morado) que se encuentra en la proteína NS4A, al cual respondió 1 paciente se encuentra de la posición 10 a 16. Los péptidos DLDPIPYDDPK (morado) que se encuentra de la posición 155 a 164 al cual respondió 1 paciente y MRTTWAVLLM (magenta) que se encontró de manera parcial sin ningún cambio en la secuencia de los aminoácidos de la posición 185 a la 191 con respuesta por parte de 1 paciente, se encuentran ubicados en la proteína NS4B.

La figura 27 corresponde al modelo de la proteína NS5, la cual se obtuvo con el programa PHYRE ², en la cual se muestran 3 péptidos inmunodominantes analizados, los cuáles se encuentran en la secuencia de esta proteína sin ningún cambio en los aminoácidos. El péptido FLNEDHWFSR, al cual respondió 1 paciente se encuentra de la posición 490 a 499. El péptido GLHKLGYILR se encuentra en la posición 510 a 519 al cual respondió 1 paciente y el péptido QMAMTDTPF que se encuentra en la posición 339 a 348 con respuesta por parte de 1 paciente.

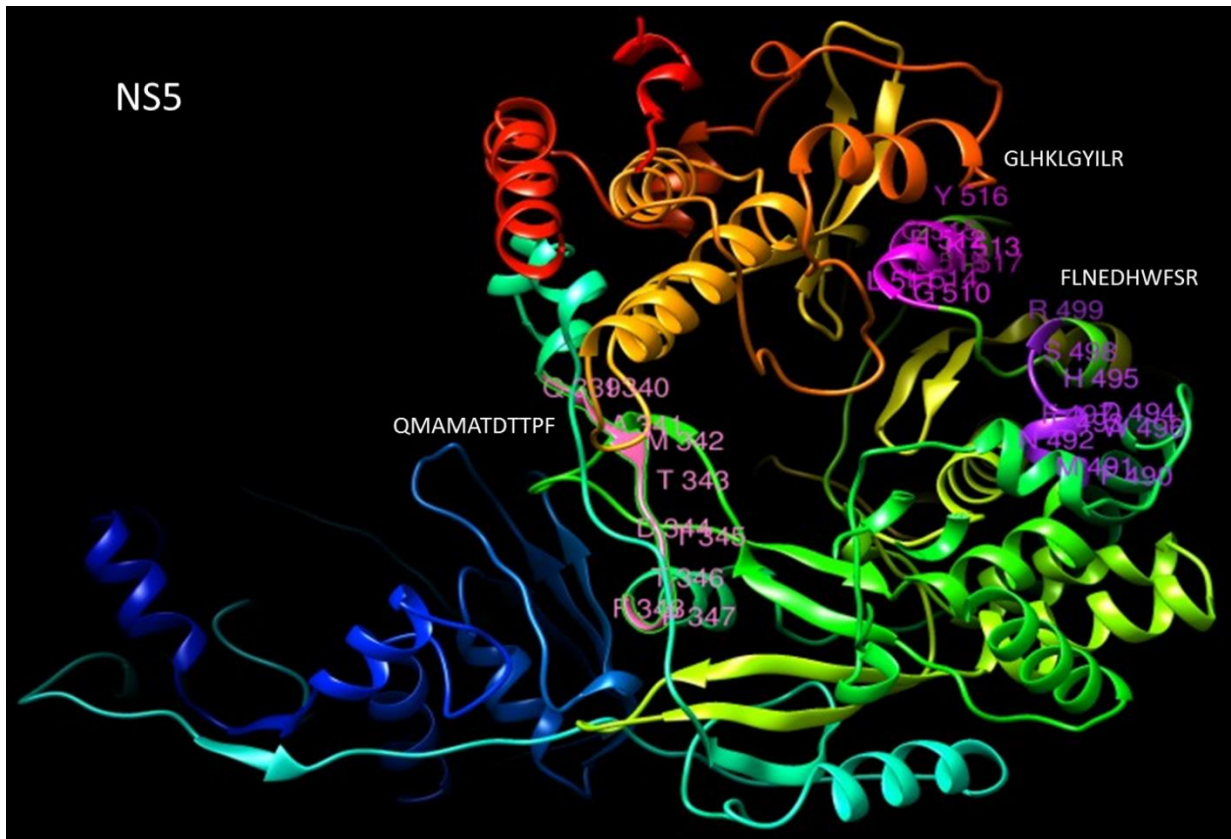


Figura 27: Modelo de la proteína NS5 de DENV analizado en el programa UCSF Chimera. Se muestran las posiciones de los péptidos en la estructura nativa a los cuáles las células de pacientes infectados con dengue tuvieron respuesta determinada como positiva mediante los ensayos de ELISPOT IFN γ . El péptido FLNEDHWFSR (morado), al cual respondió 1 paciente se encuentra de la posición 490 a 499. El péptido GLHKLGYILR (magenta) se encuentra en la posición 510 a 519 al cual respondió 1 paciente y el péptido QMAMATDTPF (rosa) se encuentra en la posición 339 a 348 con respuesta por parte de 1 paciente.

DISCUSIÓN

Debido a la complejidad de la patogénesis de la enfermedad por dengue, las múltiples manifestaciones clínicas que presenta, la falta de un tratamiento específico y que la respuesta inmunológica no se encuentra descrita del todo aún, se han realizado grandes esfuerzos por prevenir la infección por dengue mediante el desarrollo de una vacuna. En la actualidad la vacuna líder de Sanofi Pasteur, ha sido mencionada por algunos autores como una vacuna de refuerzo en lugar de una vacuna de prevención, debido a que se observan resultados no favorables en personas que no han presentado una infección previa por dengue (Hernández-Ávila y Santos-Preciado, 2016). Esta es una de las razones por las cuales el desarrollo de diferentes estrategias para la elaboración de una vacuna para el dengue sigue siendo de gran importancia. Tomando en cuenta estas consideraciones, en este trabajo se analiza el desarrollo de una estrategia para la realización de un candidato a inmunógeno universal. En estudios previos por parte del grupo del Dr. Arturo Reyes-Sandoval, se realizó un análisis para identificar las partes conservadas a lo largo del genoma de los cuatro serotipos de dengue reportados en el mundo. Estas regiones conservadas se encontraban principalmente en los genes NS del genoma de dengue, en particular en los genes NS3, NS4 A y B y NS5, por lo que se elaboraron cuatro propuestas de inmunógenos experimentales VAC A-D, los cuales difieren en el grado de conservación de las secuencias génicas que contienen.

Este trabajo se centró en analizar la respuesta celular de pacientes infectados con dengue a los inmunógenos propuestos. De las muestras obtenidas de los pacientes reclutados, se les realizó el diagnóstico confirmatorio mediante pruebas serológicas y pruebas de diagnóstico de biología molecular. La mayoría de los pacientes tuvieron una respuesta positiva a IgG lo que sugiere que los pacientes cursaban con una segunda infección de dengue (Secretaría de Salud, 2015). Por razones ajenas, que no se han podido precisar, no fue posible obtener todos los resultados de la serotipificación de las muestras a partir del ensayo de RT-PCR. Sólo se logró la amplificación de ácido nucleico viral para 5 pacientes que tenían infección con DENV 1. Es posible que la causa de los resultados negativos en el

diagnóstico molecular se deba a que el paciente cursaba con una infección secundaria y la carga viral del paciente posiblemente sea menor que el de una infección primaria, por lo que la detección del ARN viral se vea afectada (DGE (Dirección General de Epidemiología) 2014). Sin embargo debido a los reportes del SINAVE, el serotipo circulante en el año de la toma de muestras en el municipio de Lázaro Cárdenas fue el DENV 1, por lo que se puede inferir que la mayoría de los pacientes estaban infectados con este serotipo.

Uno de los objetivos de esta tesis fue estimar el grado de conservación de las secuencias que componen al inmunógeno con respecto a las secuencias de dengue reportadas en México mediante un análisis *in silico*. Primero se realizó el alineamiento entre los cuatro inmunógenos propuestos para analizar las similitudes y diferencias entre ellos. Se realizó un análisis más extenso con los inmunógenos VAC-A y VAC-B. VAC-A contiene las regiones más conservadas entre los serotipos. VAC-B a pesar de contener los péptidos de VAC-A, también contiene péptidos conservados intra e interserotipo en 2 y 3 serotipos por lo que el grado de conservación es menor. Posteriormente se analizaron VAC-A y VAC-B con las secuencias de genomas completos de dengue reportados.

No se observaron diferencias significativas entre genes en cuanto al grado de conservación, lo que demostró que las regiones no estructurales que componen los al inmunógenos propuesto tienen un alto grado de conservación entre los 4 serotipos.

Se ha reportado, que hay alrededor del 70% de identidad entre los aminoácidos de los 4 serotipos (Rotham 2011) y diversos estudios, además de los estudios realizados por el laboratorio del Prof. Reyes-Sandoval, han determinado que las partes más conservadas dentro del genoma viral del dengue corresponden a las proteínas no estructurales, principalmente a las proteínas NS3 y NS5, las cuales están implicadas en procesos de replicación viral (Weiskopf y Sette, 2014). Múltiples estudios se han realizado para encontrar epítopes que estimulen la repuesta de células T tanto en dengue como en otros virus y microorganismos (Weiskopf *et al.*, 2015), (Pedro *et al.*, 2016). Interesantemente, muchos de los epítopes de células T caracterizados, particularmente células T CD8 positivas, se encuentran justamente en las regiones altamente conservadas entre serotipos, como en

los genes NS3 y NS5 (Rothman, 2011). En este trabajo, se utilizaron células mononucleares de sangre periférica de pacientes mexicanos infectados, durante la fase aguda, con dengue para medir la respuesta de IFN γ y hacia los inmunógenos experimentales y determinar si hay un reconocimiento de estas secuencias conservadas posterior a una infección natural. Se compararon pacientes dengue positivos, dengue negativos y pacientes controles. Se observó que la respuesta inmune fue positiva en 83.3% de los pacientes diagnosticados con dengue con una respuesta mediana de 216.7 DFSU/10⁶ células. A comparación, tanto en los pacientes dengue negativos habitantes de zonas endémicas y pacientes sin infección previa habitantes de zonas no endémicas, se observaron respuesta significativamente menores de IFN- γ . No obstante, se observó que en una respuesta mínima positiva en los pacientes dengue negativos de la zona endémica, según los criterios positividad de la respuesta dengue específica. Esta respuesta probablemente se deba a que los pacientes ya se hayan enfrentado a una infección previa con dengue y se esté midiendo la respuesta de memoria de estos pacientes.

En los ensayos de ELISPOT de IFN γ , en donde únicamente se trabajaron con las muestras de pacientes dengue positivos, se observó que la mayoría de los pacientes respondieron hacia péptidos de las proteínas NS3 y en menor medida a los contenidos en NS5 y NS4. Esto tiene relevancia ya que un gran número de los epítopes caracterizados que son reconocidos por las células T se encuentran en la proteína NS3 (Rothman, 2011). La respuesta de células T se ha identificado que desempeña un papel muy importante en la resolución de las infecciones virales y en el caso específico de dengue, varios estudios recientes sugieren que los anticuerpos neutralizantes contra dengue no son suficientes para una vacuna eficaz y que la respuesta de linfocitos T CD 8 tiene un papel muy importante en la protección natural (Weiskopf *et al.*, 2015). Se ha demostrado que los linfocitos CD8 reconocen con mayor frecuencia a epítopes de las proteínas NS3, NS4B y NS5, mientras que los linfocitos T CD4 reconocen preferentemente a las proteínas de la cápside, envoltura y NS3 (Weiskopf y Sette, 2014). Sin embargo, en el ensayo de ELISPOT de IFN γ de los 18 pacientes que fueron diagnosticados como dengue positivo, 3 de ellos no presentaron respuesta positiva hacia

ninguno de los grupos de péptidos de las proteínas y sus controles positivos muestran una alta magnitud de respuesta.

En el análisis de sub grupos de péptidos, dónde se analizó la respuesta hacia subgrupo 9 de la proteína NS3, se encontró que tanto el paciente AV005 como el paciente AV017 respondieron a los mismos sub grupos de péptidos. Se analizaron las secuencias de los péptidos y se observó que dichos péptidos comparten una secuencia aminoácidica en común de 10 aa, TPEGIIPTLF, por lo que se determinó que la respuesta fue a ese péptido en particular. El péptido ya se encuentra reportado previamente en otros trabajos, Piazza y cols. en 2014, evaluaron la producción de IFN y de las células estimuladas por los epítopes determinados el algoritmo de predicción, para determinar el tamaño óptimo del epítope dónde encontraron el mismo péptido TPEGIIPTLF ,a la secuencia óptima también le realizaron la predicción de unión con HLA (Piazza , 2014) (Weiskopf *et al.*, 2013). Una parte fundamental que también se debe considerar acerca de la respuesta al péptido TPEGIIPTLF, es el reconocimiento de los epítopes por las moléculas de HLA del paciente. La moléculas de HLA de clase I de los pacientes AV005 y AV017 están estrechamente relacionadas, ya que para el paciente AV005, la molécula que restringe al péptido TPEGIIPTLF es la molécula HLA B* 35:03 y para el caso del paciente AV017 es la molécula HLA B* 35:01. Se ha observado que este haplotipo no tiene relación con el desarrollo de fiebre por dengue en pacientes mexicanos (Loke *et al.*, 2001). Esto tiene relevancia ya que algunos haplotipos, principalmente de HLA A se encuentran relacionado con la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad en sus forma severas (Malavige *et al.*, 2011).

Los pacientes AV010, AV016 también presentaron respuesta hacía los subgrupos 1 y 11 respectivamente de péptidos de la proteína NS3, sin embargo lo péptidos que generaron respuesta no se encontraron reportados en la literatura. Al tener una repuesta muy baja y sólo un paciente con respuesta es necesario realizar más ensayos con diferentes pacientes para determinarlos como probables epítopes.

Se realizaron los ensayos de ELISPOTIFN γ para determinar la respuesta de los pacientes a los subgrupos de la proteína NS4. Sólo 2 pacientes tuvieron respuesta AV009 a subgrupo 4 y AV005 al subgrupo 5 y se lograron determinar los péptidos que inducen repuesta, sin embargo se obtuvieron respuesta positivas con una magnitud muy baja, por lo que la determinación de los péptidos se hizo de manera parcial ya que se requieren de más ensayos y de pacientes que responda a esos péptidos y determinarlos como epítopes capaces de inducir respuesta celular. Se realizaron los ensayos de ELISPOTIFN γ para determinar la respuesta de los pacientes a los subgrupos de la proteína NS5. Sólo 2 pacientes tuvieron respuesta AV016 a subgrupo 5 y AV005 al subgrupo 7 y se lograron determinar los péptidos que inducen repuesta, para el caso de del paciente AV016 tuvo una respuesta muy alta hacia el péptido QMAMTDTPFGQQRVFKEKV, el cual , si bien no está reportado en la literatura, pude ser considerado como un epítope capaz de inducir una respuesta celular ya que la magnitud de la respuesta es alta y también seleccionado en las predicciones de la unión entre epítopes y el HLA, sin embargo para el paciente AV005 se obtuvieron respuesta positivas bajas, por lo que la determinación de los péptidos se hizo de manera parcial ya que se requieren de más ensayos y de pacientes que responda a esos péptidos y determinarlos como epítopes capaces de inducir respuesta celular. Para el paciente AV016, la molécula que restringe este péptido, según el análisis predictivo es la HLA-C*08:01. El paciente AV016 tiene El HLA-A*68:01, que se ha relacionado en el reconocimiento de epítopes de la proteína NS5 (Weiskopf *et al.*, 2015). Es importante mencionar que el paciente AV005 tuvo respuesta hacia todos los grupos de las proteínas no estructurales, por lo que su genética este influyendo de manera positiva en el reconocimiento de estos epítopes. Los dos epítopes capaces de inducir respuesta se encuentran en el inmunógeno VAC-B, por lo que a pesar de que VAC-A tiene las secuencias más conservadas, no es reconocido por todos los pacientes, mientras que VAC B, que incluye a VAC-A podría maximizar las probabilidades de que más personas reconozcan al inmunógenos. Sin embargo se necesitan más ensayo para determinar si VAC.B podría ser el inmunógeno universal ya que si otros pacientes no reconocen los epítopes que se encuentran en él, podría generar una respuesta cruzada en una infección con otro serotipo.

En el análisis estructural se encontraron los péptidos en la proteína nativa, los cuáles se encuentran muy conservados, lo que indica que dichos péptidos se encuentran en un sitio con una función importante, ensayos de mutaciones puntuales sobre esas regiones darán un mayor conocimiento acerca de la función de esa región proteica.

CONCLUSIONES

- Se estandarizó la técnica de aislamiento y almacenamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).
- Se estandarizó la técnica de ELISPOT IFN γ .
- Se estandarizó la técnica de "Salting out" para la extracción de DNA de células eucariontes.
- No se encontraron diferencias significativas entre las secuencias del inmunógeno propuesto y las secuencias de genomas de dengue reportados en algunos países de Latinoamérica.
- Se logró determinar la magnitud de respuesta celular en pacientes dengue positivos hacia los péptidos de las proteínas no estructurales: NS3, NS4 y NS5.
- Se observó que la mayoría de los pacientes respondieron a los péptidos de la proteína NS3, por lo que una gran cantidad de péptidos que inducen respuesta celular se encuentran en esa región.
- Se determinó la respuesta hacia los subgrupos de péptidos de cada uno de los grupos de las proteínas NS.
- Se logró determinar el péptido específico al cual responden las células de los pacientes infectados con DENV en aquellos pacientes que mostraron una respuesta alta hacia los subgrupos de péptidos de las proteínas no estructurales.

PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos de ELISPOT IFN γ de las células de los pacientes con respuesta media y baja hacia cualquiera de las proteínas no estructurales hasta la identificación de péptidos individuales.
- Obtener un número de muestras más amplio y que contengan los 4 serotipos de DENV.
- Obtener muestras de pacientes menores de 11 años que se encuentren en zonas endémicas de DENV.
- Realizar ensayos de ELISPOT IFN γ en pacientes con los otros serotipos de DENV.
- Comprobar la secuencia óptima que compone al epítoto que está siendo reconocido.
- Caracterizar la población de células que responden al inmunógeno por medio de Citometría de Flujo.
- Cuantificar la población de células T, CD4 y CD8 productoras de citocinas, posterior a la estimulación con el inmunógeno universal.
- Realizar análisis de asociación con HLA.

ANEXOS

Anexo 1. Estudio epidemiológico de los pacientes reclutados

Anver:

SISTEMA NACIONAL DE SALUD
ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE CASO DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTOR

I. DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE.

No. de afiliación o expediente: _____ Folio de Caso: _____

Nombre: _____ RFC: _____ CURP: _____

Apellido paterno _____ Apellido materno _____ Nombre (s) _____

DATOS DEL NACIMIENTO: Fecha de nacimiento: ____/____/____ Estado de nacimiento: _____ Municipio de nacimiento: _____

Sexo: M F Edad: Años Meses Días

RESIDENCIA ACTUAL

Domicilio _____

Calle y Núm. _____ Colonia _____

Estado _____ Jurisdicción _____ Municipio _____

Localidad _____ Teléfono (s) _____

Entre: Calle: _____ y calle: _____ C.P. _____

LUGAR LABORAL

Domicilio _____

Calle y Núm. _____ Colonia _____ Estado _____

Municipio _____ Localidad _____ Teléfono _____

¿Habla lengua indígena? Sí No Desconoce ¿Cual? _____ ¿Es indígena? Sí No Ignorado:

II. DATOS DE LA UNIDAD NOTIFICANTE

Estado _____ Jurisdicción _____ Municipio _____

Localidad _____ Institución _____ Clave de la Unidad _____

Nombre de la Unidad _____ Delegación _____

FECHA DE SOLICITUD DE ATENCIÓN: ____/____/____ FECHA DE PRIMER CONTACTO CON LOS SERVICIOS DE SALUD COMO CASO PROBABLE DE DENGUE CON SIGNOS DE ALARMA O GRAVE: ____/____/____

FECHA DE INICIO DE ESTUDIO: ____/____/____ FECHA DE NOTIFICACIÓN A LA JURISDICCIÓN: ____/____/____

FECHA DE NOTIFICACIÓN AL ESTADO: ____/____/____ FECHA DE NOTIFICACIÓN A LA DGE: ____/____/____ FECHA DE TERMINACIÓN DEL ESTUDIO: ____/____/____

DIAGNÓSTICO PROBABLE: _____ DIAGNÓSTICO FINAL: _____

III. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

HA SALIDO DE SU LUGAR DE RESIDENCIA EN LAS ÚLTIMAS TRES SEMANAS: Sí No *En caso de respuesta afirmativa, especifique a dónde:*

País _____ Estado/Provincia: _____ Jurisdicción: _____ Ciudad/Municipio: _____

País _____ Estado/Provincia: _____ Jurisdicción: _____ Ciudad/Municipio: _____

País _____ Estado/Provincia: _____ Jurisdicción: _____ Ciudad/Municipio: _____

PROCEDENCIA DE LA INFECCIÓN: De la jurisdicción De otra jurisdicción dentro del estado De otro estado (foráneo) De otro país (importado)

CONTACTO CON ANIMALES: MOSCO CHINCHE GARRAPATA OTRO _____

EXISTEN ENFERMOS SIMILARES EN LA LOCALIDAD: Sí No HA RECIBIDO TRANSFUSIONES SANGUÍNEAS: Sí No

ANTECEDENTES DE MUERTES INUSUALES DE ANIMALES: Sí No EQUINO AVE OTRO _____

IV. CUADRO CLÍNICO (Sí = 1, No = 2, Ignorados = 9)

Fecha de inicio de signos y síntomas: ____/____/____

Fiebre Fecha de inicio de la fiebre ____/____/____ Temperatura _____ °C

Cefalea <input type="checkbox"/>	Dolor abdominal <input type="checkbox"/>	Alteraciones cardíacas <input type="checkbox"/>	Letargo <input type="checkbox"/>
Mialgias <input type="checkbox"/>	Lipotimia <input type="checkbox"/>	Nódulos <input type="checkbox"/>	Choque <input type="checkbox"/>
Atrialgias leves o moderadas <input type="checkbox"/>	Diarrea <input type="checkbox"/>	Úlceras <input type="checkbox"/>	Petequias <input type="checkbox"/>
Polartralgias severas* <input type="checkbox"/>	Conjuntivitis <input type="checkbox"/>	Lesión de membranas mucosas <input type="checkbox"/>	Equimosis <input type="checkbox"/>
Artritis <input type="checkbox"/>	Congestión nasal <input type="checkbox"/>	Ictericia <input type="checkbox"/>	Hematomas <input type="checkbox"/>
Dolor de espalda <input type="checkbox"/>	Tos <input type="checkbox"/>	Irritabilidad <input type="checkbox"/>	Tomiquete positivo <input type="checkbox"/>
Dolor retroocular <input type="checkbox"/>	Faringitis <input type="checkbox"/>	Rigidez de nuca <input type="checkbox"/>	Ascitis <input type="checkbox"/>
Exantema <input type="checkbox"/>	Hepatomegalia <input type="checkbox"/>	Estupor <input type="checkbox"/>	Derrame pleural <input type="checkbox"/>
Prurito <input type="checkbox"/>	Esplenomegalia <input type="checkbox"/>	Desorientación <input type="checkbox"/>	Edema <input type="checkbox"/>
Vómito <input type="checkbox"/>	Alteraciones del gusto <input type="checkbox"/>	Tembor <input type="checkbox"/>	Piel moteada <input type="checkbox"/>
Náuseas <input type="checkbox"/>	Adenomegalias <input type="checkbox"/>	Convulsiones <input type="checkbox"/>	Gingivorragia <input type="checkbox"/>
Diáforesis <input type="checkbox"/>	Induración <input type="checkbox"/>	Debilidad muscular <input type="checkbox"/>	Epistaxis <input type="checkbox"/>
Escalofríos <input type="checkbox"/>	Inflamación de párpado <input type="checkbox"/>	Parálisis <input type="checkbox"/>	Hematemesis <input type="checkbox"/>
Fotofobia <input type="checkbox"/>	Disnea <input type="checkbox"/>	Otitis <input type="checkbox"/>	Melena <input type="checkbox"/>
* Incapacitantes	Otros _____		

MANEJO: Hospitalario Ambulatorio FECHA DE INGRESO ____/____/____

NOMBRE DE LA UNIDAD TRATANTE: _____ CLUES: _____

Clave de la Unidad: _____

Institución: _____

Diagnóstico inicial hospitalario: _____

Servicio de atención:

Urgencias médicas Terapia intensiva

Medicina interna Gineco Obstetricia

Pediatría Otros, especifique: _____

Terapia intermedia

COMORBILIDAD Y/O OTRAS CONDICIONES:

Trastornos hemorrágicos Diabetes Hipertensión Enf. ulcero péptica Enf. Renal

Inmunosupresión Cirrosis hepática Embarazo Semanas de gestación Fecha última regla ____/____/____

Otros: Especifique: _____

V. EVOLUCIÓN EN EL HOSPITAL

ESTABLE GRAVE MEJORÍA

SEGUIMIENTO HEMATOLOGICO

En caso de haber datos de escape de líquidos o hemorragias, realizar*:

Fecha: ___/___/___ Hto: ___% Hb: ___ gr x 100ml. Plaquetas: ___ x10³ Albúmina: ___ g/dl Leucocitos: ___ x10³ Linfocitos: ___ x10³
Fecha: ___/___/___ Hto: ___% Hb: ___ gr x 100ml. Plaquetas: ___ x10³ Albúmina: ___ g/dl Leucocitos: ___ x10³ Linfocitos: ___ x10³
Fecha: ___/___/___ Hto: ___% Hb: ___ gr x 100ml. Plaquetas: ___ x10³ Albúmina: ___ g/dl Leucocitos: ___ x10³ Linfocitos: ___ x10³
Fecha: ___/___/___ Hto: ___% Hb: ___ gr x 100ml. Plaquetas: ___ x10³ Albúmina: ___ g/dl Leucocitos: ___ x10³ Linfocitos: ___ x10³

*Repetirías de acuerdo a la evolución del enfermo

Líquido cefalorraquídeo con aspecto de agua de roca: SI No Bilirubina directa ___ mg/dL Bilirubina total ___ mg/dL
Dx-HL ___ U/L ALT ___ U/L AST ___ U/L

ESTUDIOS DE GABINETE:

Fecha de ultrasonido: ___/___/___ Fecha de radiografía: ___/___/___
Líquido perivisceral y / o en cavidad abdominal Líquido en cavidad torácica Megacolon Megaesófago

DATOS DE EGRESO Fecha de egreso: ___/___/___ Alta por Mejoría: Alta voluntaria: Defunción: Fecha de defunción: ___/___/___
Día Mes Año Día Mes Año

Folio de certificado de defunción: _____ Fecha de Dictaminación: ___/___/___ Dictamen: _____

VI. ESTUDIO DE LABORATORIO:

Se tomó muestra para laboratorio: SI No

Dengue

Fecha toma: ___/___/___

Fecha de recepción: ___/___/___ Folio de Laboratorio Dengue: _____

Fecha resultado: ___/___/___

Resultado: NS1 ELISA IgM ELISA IgG PCR-Tiempo Real Otra ()

Resultado: + - Ind + - Ind + - Ind Serotipo: 1 2 3 4 Neg

Muestra rechazada: Causa: Lipémica: Hemolizada: Muestra Insuficiente: Dias de tránsito: Otra: _____ Fecha de rechazo: ___/___/___

Laboratorio donde se procesó la muestra: _____ Nombre de quien capturo el resultado: _____

Chikungunya

Fecha toma: ___/___/___

Fecha de recepción: ___/___/___ Folio de Laboratorio Chikungunya: _____

Fecha resultado: ___/___/___

Resultado: ELISA IgM PCR-Tiempo Real MAC - ELISA

Resultado: + - Ind + - Ind + - Ind

Muestra rechazada: Causa: Lipémica: Hemolizada: Muestra Insuficiente: Dias de tránsito: Otra: _____ Fecha de rechazo: ___/___/___

Laboratorio donde se procesó la muestra: _____ Nombre de quien capturo el resultado: _____

ZIKA

Fecha toma: ___/___/___

Fecha de recepción: ___/___/___ Folio de Laboratorio ZIKA: _____

Fecha resultado: ___/___/___

Resultado: PCR-Tiempo Real Resultado: + -

Muestra rechazada: Causa: Lipémica: Hemolizada: Muestra Insuficiente: Dias de tránsito: Otra: _____ Fecha de rechazo: ___/___/___

Laboratorio donde se procesó la muestra: _____ Nombre de quien capturo el resultado: _____

Paludismo:

Gota Gruesa: ___/___/___ Fechas: Toma: ___/___/___ Resultado: ___/___/___ + -

Especie: Paludismo por: Vivax Falciparum

Muestra rechazada: Causa: Lipémica: Hemolizada: Muestra Insuficiente: Dias de tránsito:

Leishmaniasis:

Impronta: ___/___/___ Fechas: Toma: ___/___/___ Resultado: ___/___/___ + -

Serología: ___/___/___ Fechas: Toma: ___/___/___ Resultado: ___/___/___ + -

Muestra rechazada: Causa: Lipémica: Hemolizada: Muestra Insuficiente: Dias de tránsito:

Tripanosomiasis:

Dx parasitológico: ___/___/___ Fechas: Toma: ___/___/___ Resultado: ___/___/___ + -

Serología: ___/___/___ Fechas: Toma: ___/___/___ Resultado: ___/___/___ + -

Muestra rechazada: Causa: Lipémica: Hemolizada: Muestra Insuficiente: Dias de tránsito:

Rickettsiosis:

Serología: ___/___/___ Fechas: Toma: ___/___/___ Resultado: ___/___/___ + -

Titulación: _____

Muestra rechazada: Causa: Lipémica: Hemolizada: Muestra Insuficiente: Dias de tránsito:

Virus del O. Nilo

Plasma o Suero Fechas: 1a Toma: ___/___/___ Resultado: ___/___/___ + -

Suero Fechas: 2da Toma: ___/___/___ Resultado: ___/___/___ + -

LCR Fechas: Toma: ___/___/___ Resultado: ___/___/___ + -

Biopsia Fechas: Toma: ___/___/___ Resultado: ___/___/___ + -

Muestra rechazada: Causa: Lipémica: Hemolizada: Muestra Insuficiente: Dias de tránsito:

Otro padecimiento: Especificar: _____ Fecha de Resultado: ___/___/___ + -

Laboratorio donde se procesó la muestra: _____

VII. ESTUDIO DE CASOS SIMILARES

NOMBRE	DOMICILIO	EDAD	SEXO		CASO
			M	F	

VIII. OBSERVACIONES

NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN LLENÓ EL FORMATO NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN AUTORIZÓ

Nota: Las fechas se pondrán en el siguiente orden: día/mes/año

Anexo 2. Formato de consentimiento informado para los pacientes reclutados

DENV VAC

Forma de consentimiento informado (adulto)

La respuesta inmune celular hacia el dengue

A través de la presente yo, _____ (nombre), doy constancia de que se me ha explicado de que se trata el proyecto de investigación, que he entendido lo que se me ha leído al respecto y que mis dudas han sido resueltas satisfactoriamente. Estoy consciente de que si en cualquier momento cambio de opinión y decido salirme del estudio, tengo la libertad de hacerlo sin repercusión alguna.

Favor de marcar la opción relevante

- Acepto participar en el estudio**
- Acepto que mis muestras se almacenen**
- Acepto que mis muestras se exporten**

Firma de participante: _____ **Fecha:** _____

Nombre del participante: _____ **Hora:** _____

(Mayúsculas)

Consto que he seguido los procedimientos específicos del estudio para obtener el consentimiento informado del participante

Firma del designado/investigador: _____ **Fecha:**

Nombre del designado/investigador: _____ **Hora:**

(Mayúsculas)

Solo aplica si el participante no puede leer o escribir:

Por medio de la presente hago constar que fui testigo* de que la información en relación al proyecto de investigación fue explicado de manera clara y que al parecer fue comprendida por el participante y que el consentimiento informado fue otorgado por éste de manera libre y voluntaria

Firma del testigo: _____ **Fecha:**

Nombre del testigo: _____ **Hora:**

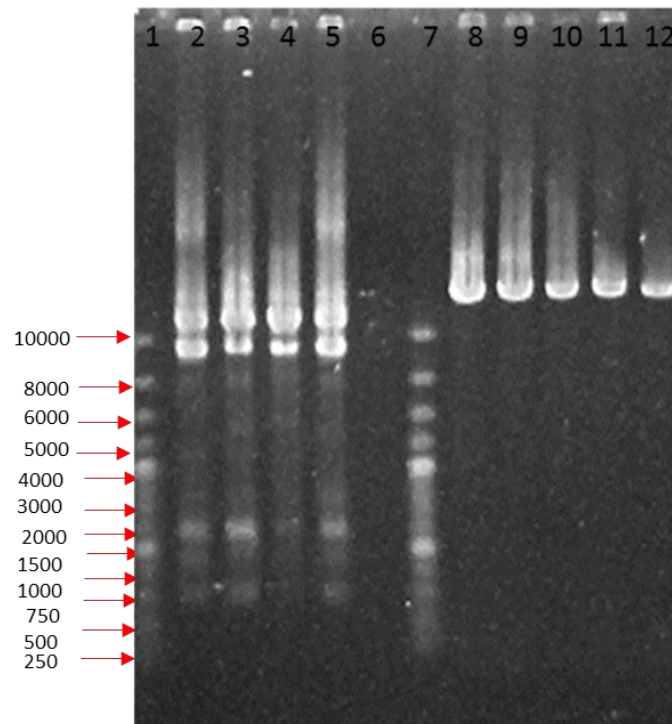
(Mayúsculas)

*Un testigo es una persona sin afiliación al proyecto o un profesional de salud que no participa en el estudio

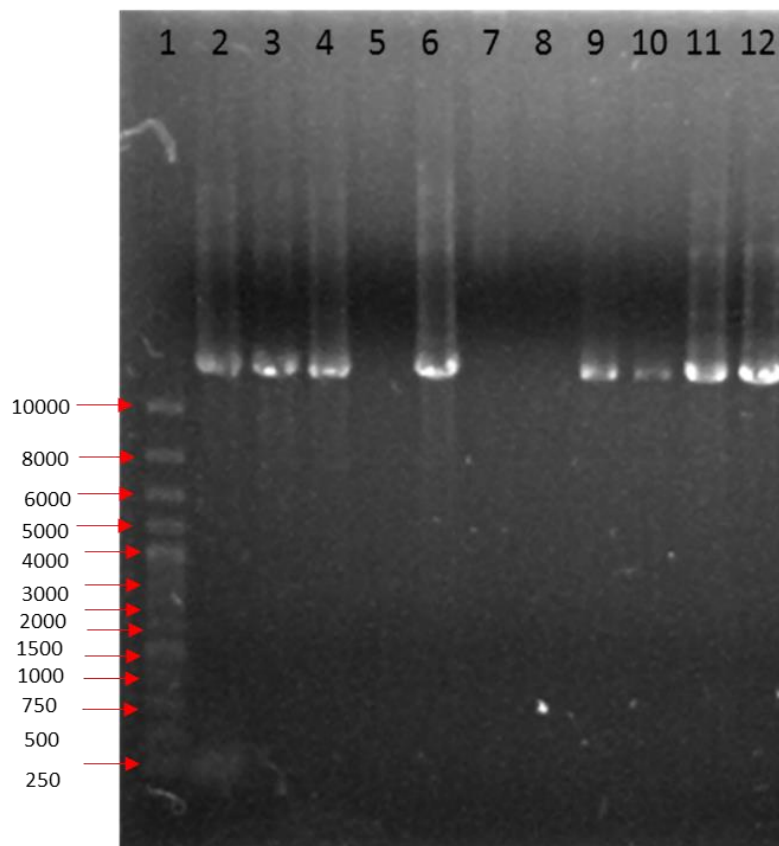
Huella digital del participante si éste no puede escribir:

Anexo. 3 Análisis molecular de HLA clase I

Para poder realizar una caracterización del perfil genético de los participantes en el estudio La amplificación específica de los genes de HLA A, B y C se obtuvo por PCR los productos esperados con un peso molecular de aproximadamente 2000 Kb fueron analizados por electroforesis de gel de agarosa Figura 13.



Gel de electroforesis HLA A y B. Se muestran los productos de PCR de HLA A y B de los pacientes reclutados (1 al 5) mediante una electroforesis de gel de agarosa al 1%. Carriles 1 y 7: Marcador de peso molecular 1 kb. Carriles 2 al 6: productos de PCR para HLA-A pacientes del 1 al 5 respectivamente.



Gel de electroforesis HLA- C. Se muestran los productos de PCR de HLA-C de los pacientes reclutados (17 al 26) mediante una electroforesis de gel de agarosa al 1%. Carril: Marcador de peso molecular 1 kb. Carriles 2 al 12: productos de PCR para HLA-A pacientes del 17 al 26 respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcon S et al. 2010. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during Acute Phase of Disease in Patient Experiencing Primary or Secondary Infection." *Am J. Trop. Med. Hyg.* 83 (3): 690–95. doi:10.1128/JCM.40.2.376.
- Assenberg, René, Eloise Mastrangelo, Thomas S Walter, Anil Verma, Mario Milani, Raymond J Owens, David I Stuart, Jonathan M Grimes, and Erika J Mancini. 2009. "Crystal Structure of a Novel Conformational State of the Flavivirus NS3 Protein: Implications for Polyprotein Processing and Viral Replication." *Journal of Virology* 83 (24): 12895–906. doi:10.1128/JVI.00942-09.
- Balsitis, Scott J., Josefina Coloma, Glenda Castro, Aracely Alava, Diana Flores, James H. McKerrow, P. Robert Beatty, and Eva Harris. 2009. "Tropism of Dengue Virus in Mice and Humans Defined by Viral Nonstructural Protein 3-Specific Immunostaining." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80 (3): 416–24. doi:80/3/416 [pii].
- Beckett, Charmagne G., Jeffrey Tjaden, Timothy Burgess, Janine R. Danko, Cindy Tamminga, Monika Simmons, Shuenn Jue Wu, et al. 2011. "Evaluation of a Prototype Dengue-1 DNA Vaccine in a Phase 1 Clinical Trial." *Vaccine* 29 (5): 960–68. doi:10.1016/j.vaccine.2010.11.050.
- Beltramello, Martina, Katherine L. Williams, Cameron P. Simmons, Annalisa Macagno, Luca Simonelli, Nguyen Than Ha Quyen, Soila Sukupolvi-Petty, et al. 2010. "The Human Immune Response to Dengue Virus Is Dominated by Highly Cross-Reactive Antibodies Endowed with Neutralizing and Enhancing Activity." *Cell Host and Microbe* 8 (3): 271–83. doi:10.1016/j.chom.2010.08.007.
- Benedict, Mark Q, Rebecca S Levine, William A Hawley, and L Philip. 2008. "NIH Public Access" 7 (1): 76–85.
- Brister, J. Rodney, Yiming Bao, Sergey A. Zhdanov, Yuri Ostapchuck, Vyacheslav Chetvernin, Boris Kiryutin, Leonid Zaslavsky, Michael Kimelman, and Tatiana A. Tatusova. 2014. "Virus Variation Resource - Recent Updates and Future Directions." *Nucleic Acids Research* 42 (D1):

660–65. doi:10.1093/nar/gkt1268.

- Clyde, Karen, Jennifer L Kyle, and Eva Harris. 2006. “Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis.” *Journal of Virology* 80 (23): 11418–31. doi:10.1128/JVI.01257-06.
- Davidson, Andrew D. 2009. “Chapter 2 New Insights into Flavivirus Nonstructural Protein 5.” *Advances in Virus Research*. doi:10.1016/S0065-3527(09)74002-3.
- Dejnirattisai, Wanwisa, Amonrat Jumnainsong, Naruthai Onsirisakul, Patricia Fitton, Sirijitt Vasanawathana, Wannee Limpitikul, Chunya Puttikhunt, et al. 2010. “Cross-Reacting Antibodies Enhance Dengue Virus Infection in Humans.” *Science (New York, N.Y.)*. doi:10.1126/science.1185181.
- DGE (Dirección General de Epidemiología). 2014. “Lineamientos Para La Vigilancia Epidemiológica de Dengue Por Laboratorio.” *Instituto de Diagnóstico Y Referencia Epidemiológicos*, 1–81.
- Dick, Olivia Brathwaite, José L. San Martín, Romeo H. Montoya, Jorge Del Diego, Betzana Zambrano, and Gustavo H. Dayan. 2012. “Review: The History of Dengue Outbreaks in the Americas.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87 (4): 584–93. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0770.
- Dikhit, Manas R., Md. Yousuf Ansari, Vijaymahantesh, Kalyani, Rani Mansuri, Bikash R. Sahoo, Budheswar Dehury, et al. 2016. “Computational Prediction and Analysis of Potential Antigenic CTL Epitopes in Zika Virus: A First Step towards Vaccine Development.” *Infection, Genetics and Evolution* 45. Elsevier B.V.: 187–97. doi:10.1016/j.meegid.2016.08.037.
- Durbin, Anna P., and Stephen S. Whitehead. 2011. “Next-Generation Dengue Vaccines: Novel Strategies Currently under Development.” *Viruses* 3 (10): 1800–1814. doi:10.3390/v3101800.
- Falconar, A. K I, Elsa De Plata, and C. M E Romero-Vivas. 2006. “Altered Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Immunoglobulin M (IgM)/IgG Optical Density Ratios Can Correctly Classify All Primary or Secondary Dengue Virus Infections 1 Day after the Onset of Symptoms, When All of the Viruses Can Be Isolated.” *Clinical and Vaccine Immunology* 13 (9):

1044–51. doi:10.1128/CVI.00105-06.

Falgout, B, M Bray, J J Schlesinger, and C J Lai. 1990. "Immunization of Mice with Recombinant Vaccinia Virus Expressing Authentic Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Protects against Lethal Dengue Virus Encephalitis." *Journal of Virology* 64 (9): 4356–63.

Gloria-Soria, Andrea, Julia E. Brown, Vicki Kramer, Melissa Hardstone Yoshimizu, and Jeffrey R. Powell. 2014. "Origin of the Dengue Fever Mosquito, *Aedes Aegypti*, in California." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (7). doi:10.1371/journal.pntd.0003029.

Green, Angela M., P. Robert Beatty, Alexandros Hadjilaou, and Eva Harris. 2014. "Innate Immunity to Dengue Virus Infection and Subversion of Antiviral Responses." *Journal of Molecular Biology* 426 (6). Elsevier Ltd: 1148–60. doi:10.1016/j.jmb.2013.11.023.

Guzman, Maria G., Scott B. Halstead, Harvey Artsob, Philippe Buchy, Jeremy Farrar, Duane J. Gubler, Elizabeth Hunsperger, et al. 2010. "Dengue: A Continuing Global Threat." *Nature Reviews Microbiology* 8 (12). Nature Publishing Group: S7–16. doi:10.1038/nrmicro2460.

Hadinegoro, Sri Rezeki, Jose Luis Arredondo-García, Maria Rosario Capeding, Carmen Deseda, Tawee Chotpitayasunondh, Reynaldo Dietze, H.I. Hj Muhammad Ismail, et al. 2015. "Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease." *New England Journal of Medicine*, 150727090428004. doi:10.1056/NEJMoa1506223.

Halstead, S. B., S. Rohanasuphot, and N. Sangkawibha. 1983. "Original Antigenic Sin in Dengue." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32 (1): 154–56. doi:10.1073/pnas.1306333110.

Halstead, Scott B. 2006. "Dengue in the Americas and Southeast Asia: Do They Differ?" *Revista Panamericana de Salud Publica = Pan American Journal of Public Health* 20 (6): 407–15. doi:10.1590/S1020-49892006001100007.

Henao, Jorge Alejandro. Bedoya, Victoria Ines y Rugeles, Maria Teresa. n.d. "Inmunología E Infección Viral." In . Biogenesis.

Hernández-ávila, Mauricio, and José Ignacio Santos-preciado. 2016. "Análisis

de La Evidencia Sobre Eficacia Y Seguridad de La Vacuna de Dengue CYD-TDV Y Su Potencial Registro E Implementación En El Programa de Vacunación Universal de México” 58 (1): 71–83.

Kaufmann, Bärbel, and Michael G. Rossmann. 2011. “Molecular Mechanisms Involved in the Early Steps of Flavivirus Cell Entry.” *Microbes and Infection* 13 (1): 1–9. doi:10.1016/j.micinf.2010.09.005.

Kearse, Matthew, Richard Moir, Amy Wilson, Steven Stones-Havas, Matthew Cheung, Shane Sturrock, Simon Buxton, et al. 2012. “Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data.” *Bioinformatics* 28 (12): 1647–49. doi:10.1093/bioinformatics/bts199.

Kelley, Lawrence A, Stefans Mezulis, Christopher M Yates, Mark N Wass, and Michael J E Sternberg. 2015. “The Phyre2 Web Portal for Protein Modeling , Prediction and Analysis.” *Nature Protocols* 10 (6). Nature Publishing Group: 845–58. doi:10.1038/nprot.2015-053.

Koraka, P, C Suharti, T E Setiati, A T A Mairuhu, C E Hack, M Juffrie, J Sutaryo, G M Van Der Meer, J Groen, and A D M E Osterhaus. 2001. “Kinetics of Dengue Virus-Specific Serum Immunoglobulin Classes and Subclasses Correlate with Clinical Outcome of Infection Kinetics of Dengue Virus-Specific Serum Immunoglobulin Classes and Subclasses Correlate with Clinical Outcome of Infection” 39 (12): 4332–38. doi:10.1128/JCM.39.12.4332.

Kurane, Ichiro, Takaji Matsutani, Ryuji Suzuki, Tomohiko Takasaki, Siripen Kalayanarooj, Sharone Green, Alan L. Rothman, and Francis a. Ennis. 2011. “T-Cell Responses to Dengue Virus in Humans.” *Tropical Medicine and Health* 39 (4SUPPLEMENT): S45–51. doi:10.2149/tmh.2011-S09.

Lai, Chih-Yun, Wen-Yang Tsai, Su-Ru Lin, Chuan-Liang Kao, Hsien-Ping Hu, Chwan-Chuen King, Han-Chung Wu, Gwong-Jen Chang, and Wei-Kung Wang. 2008. “Antibodies to Envelope Glycoprotein of Dengue Virus during the Natural Course of Infection Are Predominantly Cross-Reactive and Recognize Epitopes Containing Highly Conserved Residues at the Fusion Loop of Domain II.” *Journal of Virology* 82 (13): 6631–43. doi:10.1128/JVI.00316-08.

- Laughlin, Catherine A., David M. Morens, M. Cristina Cassetti, Adriana Costero-Saint Denis, Jose Luis San Martin, Stephen S. Whitehead, and Anthony S. Fauci. 2012. "Dengue Research Opportunities in the Americas." *Journal of Infectious Diseases* 206 (7): 1121–27. doi:10.1093/infdis/jis351.
- Lindenbach, Brett D, and Charles M Rice. 2007. "Flaviviridae: The Viruses and Their Replication." *Fields Virology*, 1101–51. doi:10.1016/0038-092X(88)90131-4.
- Loke, H, D B Bethell, C X Phuong, M Dung, J Schneider, N J White, N P Day, J Farrar, and a V Hill. 2001. "Strong HLA Class I - Restricted T Cell Responses in Dengue Hemorrhagic Fever: A Double-Edged Sword?" *J Infect Dis* 184 (11): 1369–73. doi:10.1086/324320.
- Makhluf, Huda, and Sujan Shresta. 2015. "Innate Antiviral Immunity against Dengue Virus" 35 (3): 253–60.
- Malavige, Gathsaurie Neelika, Tim Rostron, Lochana T. Rohanachandra, S. D. Jayaratne, Neluka Fernando, Aruna Dharshan de Silva, Malaka Liyanage, and Graham Ogg. 2011. "HLA Class I and Class II Associations in Dengue Viral Infections in a Sri Lankan Population." *PLoS ONE* 6 (6): 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0020581.
- Mamani, Enrique. 2013. "Identificación de Genotipos Y Linajes de Los Cuatro Serotipos Del Virus Dengue En El Perú Durante Los Años," 98.
- Maves, Ryan C., Roger M Castillo Oré, Kevin R. Porter, and Tadeusz J. Kochel. 2011. "Immunogenicity and Protective Efficacy of a Psoralen-Inactivated Dengue-1 Virus Vaccine Candidate in Aotus Nancymae Monkeys." *Vaccine* 29 (15): 2691–96. doi:10.1016/j.vaccine.2011.01.077.
- Miller, Joanna L, Barend J. M deWet, Luisa Martinez-Pomares, Catherine M Radcliffe, Raymond a Dwek, Pauline M Rudd, and Siamon Gordon. 2008. "The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages." *PLoS Pathogens* 4 (2): 11. doi:10.1371/journal.ppat.0040017.
- Miller, Sven, Sandra Sparacio, and Ralf Bartenschlager. 2006. "Subcellular Localization and Membrane Topology of the Dengue Virus Type 2 Non-Structural Protein 4B." *Journal of Biological Chemistry* 281 (13): 8854–63.

doi:10.1074/jbc.M512697200.

Moi, Meng Ling, Tomohiko Takasaki, and Ichiro Kurane. 2016. "Human Antibody Response to Dengue Virus : Implications for Dengue Vaccine Design." *Tropical Medicine and Health*. Tropical Medicine and Health, 1–6. doi:10.1186/s41182-016-0004-y.

Morens, D. M., and S. B. Halstead. 1990. "Measurement of Antibody-Dependent Infection Enhancement of Four Dengue Virus Serotypes by Monoclonal and Polyclonal Antibodies." *Journal of General Virology* 71 (12): 2909–14. doi:10.1099/0022-1317-71-12-2909.

Nene, Vishvanath, Jennifer R Wortman, Daniel Lawson, Brian Haas, Chinnappa Kodira, Zhijian Jake Tu, Brendan Loftus, et al. 2007. "A Major Arbovirus Vector," no. June.

Norkin, L.C. 2010. "Chapter 7: Flaviviruses." In *Virology: Molecular Biology and Pathogenesis*.

Pedro, A, Derin B Keskin, Rebecca E Hussey, Dana Gabuzda, Ellis L Reinherz Elicitation, Citable Link, Pedro A Reche, et al. 2016. "Elicitation from Virus-Naive Individuals of Cytotoxic T Lymphocytes Directed Against Conserved HIV-1 Epitopes The Harvard Community Has Made This Article Openly Available . Directed against Conserved HIV-1 Epitopes." doi:10.1186/1476-9433-5-1.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. "UCSF Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *J Comput Chem*. Oct;25(13): 1605–12.

Piazza, P, D Campbell, and E Marques. 2014. "Dengue Virus-Infected Human Dendritic Cells Reveal Hierarchies of Naturally Expressed Novel NS3 CD8 T Cell Epitopes," 696–702. doi:10.1111/cei.12373.

Platanias, Leonidas C. 2005. "Mechanisms of Type-I- and Type-II-Interferon-Mediated Signalling." *Nature Reviews. Immunology* 5 (5): 375–86. doi:10.1038/nri1604.

Programa Nacional de Salud 2007-2012 Por Un México Sano : Construyendo Alianzas Para Una Mejor Salud. 2012.

Rapley, L P, P H Johnson, Craig R Williams, R M Silcock, M Larkman, Sharron A

Long, Richard C Russell, and Scott A Ritchie. 2009. "A Lethal Ovitrap-Based Mass for Dengue Control in Australia: II. Impact on Trapping Scheme Populations of the Mosquito *Aedes Aegypti*." *Medical and Veterinary Entomology* 23: 303–16.

Reyes-Sandoval, Arturo, Christine S Rollier, Anita Milicic, Karolis Bauza, Matthew G Cottingham, Choon-Kit Tang, Matthew D Dicks, et al. 2012. "Mixed Vector Immunization with Recombinant Adenovirus and MVA Can Improve Vaccine Efficacy While Decreasing Antivector Immunity." *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (8). Nature Publishing Group: 1633–47. doi:10.1038/mt.2012.25.

Rodenhuis-Zybert, Izabela A., Jan Wilschut, and Jolanda M. Smit. 2010. "Dengue Virus Life Cycle: Viral and Host Factors Modulating Infectivity." *Cellular and Molecular Life Sciences* 67 (16): 2773–86. doi:10.1007/s00018-010-0357-z.

Rodriguez-Roche, Rosmari, and Ernest A. Gould. 2013. "Understanding the Dengue Viruses and Progress towards Their Control." *BioMed Research International* 2013. doi:10.1155/2013/690835.

Rollier, Christine S., Arturo Reyes-Sandoval, Matthew G. Cottingham, Katie Ewer, and Adrian V S Hill. 2011. "Viral Vectors as Vaccine Platforms: Deployment in Sight." *Current Opinion in Immunology* 23 (3): 377–82. doi:10.1016/j.coi.2011.03.006.

Rothman, Alan L. 2011. "Immunity to Dengue Virus: A Tale of Original Antigenic Sin and Tropical Cytokine Storms." *Nature Reviews. Immunology* 11 (8): 532–43. doi:10.1038/nri3014.

Saavedra-Rodriguez, Karla, Clare Strode, Adriana Flores Suarez, Ildefonso Fernandez Salas, Hilary Ranson, Janet Hemingway, and William C. Black IV. 2008. "Quantitative Trait Loci Mapping of Genome Regions Controlling Permethrin Resistance in the Mosquito *Aedes Aegypti*." *Genetics* 180 (2): 1137–52. doi:10.1534/genetics.108.087924.

Schmitz Julia., John T. Roehrig, and Joachim Hombach. 2011. "Next Generation Dengue Vaccines: A Review of the Preclinical Development." *Vaccine* 33 (50). Elsevier Ltd: 7091–99. doi:10.1016/j.vaccine.2015.09.053.

- Secretaría de Salud. 2008. "Manejo Del Dengue No Grave Y El Dengue Grave." *Guía de Práctica Clínica*.
- Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, Dirección General de Epidemiología, and DGA InDRE. 2015. "Panorama Epidemiológico de Fiebre Por Dengue Y Fiebre Hemorrágica Por Dengue." http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMA_2015/Pano_dengue_sem_38_2015.pdf.
- Srikiatkachorn, Anon, and Sharone Green. 2009. "Markers of Dengue Disease Severity." *Current Topics in Microbiology and Immunology*. doi:10.1007/978-3-642-02215-9-6.
- Tang, William W., Rajvir Grewal, and Sujana Shrestha. 2015. "Influence of Antibodies and T Cells on Dengue Disease Outcome: Insights from Interferon Receptor-Deficient Mouse Models." *Current Opinion in Virology* 13. Elsevier B.V.: 61–66. doi:10.1016/j.coviro.2015.04.007.
- Valdés, K, M Alvarez, M Pupo, S Vázquez, R Rodríguez, and M G Guzmán. 2000. "Human Dengue Antibodies against Structural and Nonstructural Proteins." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7 (5): 856–57. doi:10.1128/CDLI.7.5.856-857.2000.
- Van Der Schaar, Hilde M., Michael J. Rust, Chen, Heidi Van Der Ende-Metselaar, Jan Wilschut, Xiaowei Zhuang, and Jolanda M. Smit. 2008. "Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells." *PLoS Pathogens* 4 (12). doi:10.1371/journal.ppat.1000244.
- van Panhuis, Willem G., Sangwon Hyun, Kayleigh Blaney, Ernesto T A Marques, Giovanini E. Coelho, João Bosco Siqueira, Ryan Tibshirani, Jarbas B. da Silva, and Roni Rosenfeld. 2014. "Risk of Dengue for Tourists and Teams during the World Cup 2014 in Brazil." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (7). doi:10.1371/journal.pntd.0003063.
- Vaughn, David W, Sharone Green, Siripen Kalayanarooj, Bruce L Innis, Suchitra Nimmannitya, Saroj Suntayakorn, Timothy P Endy, Boonyos Raengsakulrach, Alan L Rothman, and Francis A Ennis. 2000. "Dengue Viremia Titer , Antibody Response Pattern , and Virus Serotype Correlate with Disease Severity." *The Journal of Infectious Diseases*, no. 1: 2–9.

- Vázquez-Pichardo, Mauricio, Claudia Rosales-Jiménez, Alma Núñez-León, Pilar Rivera-Osorio, Sergio De La Cruz-Hernández, Adriana Ruiz-López, Silvia González-Mateos, et al. 2011. "Serotipos de Dengue En México Durante 2009 Y 2010." *Bol Med Hosp Infant Mex* 68 (2): 103–10. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462011000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
- Villar, Luis, Gustavo Horacio Dayan, José Luis Arredondo-García, Doris Maribel Rivera, Rivaldo Cunha, Carmen Deseda, Humberto Reynales, et al. 2014. "Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America." *New England Journal of Medicine* 372 (2): 141103114505002. doi:10.1056/NEJMoa1411037.
- Wahala, Wahala M P B, and Aravinda M. de Silva. 2011. "The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection." *Viruses* 3 (12): 2374–95. doi:10.3390/v3122374.
- Wasay, Mohammad, Roomasa Channa, Maliha Jumani, Ghulam Shabbir, Muhammad Azeemuddin, and Afia Zafar. 2008. "Encephalitis and Myelitis Associated with Dengue Viral Infection. Clinical and Neuroimaging Features." *Clinical Neurology and Neurosurgery* 110 (6): 635–40. doi:10.1016/j.clineuro.2008.03.011.
- Weiskopf, Daniela, Michael a Angelo, Derek J Bangs, John Sidney, Sinu Paul, Bjoern Peters, Aruna D de Silva, et al. 2015. "The Human CD8+ T Cell Responses Induced by a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Are Directed against Highly Conserved Epitopes." *Journal of Virology* 89 (1): 120–28. doi:10.1128/JVI.02129-14.
- Weiskopf, Daniela, Michael A Angelo, Elzinandes L De Azeredo, John Sidney, Jason A Greenbaum, Anira N Fernando, Anne Broadwater, et al. 2013. "Comprehensive Analysis of Dengue Virus-Specific Responses Supports an HLA-Linked Protective Role for CD8 + T Cells." doi:10.1073/pnas.1305227110.
- Weiskopf, Daniela, Michael a Angelo, John Sidney, Bjoern Peters, Sujan Shresta, and Alessandro Sette. 2014. "Immunodominance Changes as a Function of the Infecting Dengue Virus Serotype and Primary versus Secondary Infection." *Journal of Virology* 88 (19): 11383–94. doi:10.1128/JVI.01108-14.

Weiskopf, Daniela, and Alessandro Sette. 2014. "T-Cell Immunity to Infection with Dengue Virus in Humans." *Frontiers in Immunology* 5 (MAR): 1–6. doi:10.3389/fimmu.2014.00093.

World Health Organization. n.d. "Dengue and Severe Dengue." <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.

———. 2009. "Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention, and Control." *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*, x, 147. doi:WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1.

Yang, Jianyi, Renxiang Yan, Ambrish Roy, Dong Xu, Jonathan Poisson, and Yang Zhang. 2015. "The I-TASSER Suite : Protein Structure and Function Prediction." *Nature Publishing Group* 12 (1). Nature Publishing Group: 7–8. doi:10.1038/nmeth.3213.

Zhang, Wei, Paul R Chipman, Jeroen Corver, Peter R Johnson, Ying Zhang, Suchetana Mukhopadhyay, Timothy S Baker, James H Strauss, Michael G Rossmann, and Richard J Kuhn. 2003. "Visualization of Membrane Protein Domains by Cryo-Electron Microscopy of Dengue Virus." *Nature Structural Biology* 10 (11): 907–12. doi:10.1038/nsb990.

Zhang, Ying, Jeroen Corver, Paul R. Chipman, Wei Zhang, Sergei V. Pletnev, Dagmar Sedlak, Timothy S. Baker, James H. Strauss, Richard J. Kuhn, and Michael G. Rossmann. 2003. "Structures of Immature Flavivirus Particles." *EMBO Journal* 22 (11): 2604–13. doi:10.1093/emboj/cdg270.