



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Lorch, Matías Sebastián

Producción de antígenos recombinantes y su empleo en métodos serológicos para la detección de infecciones flavivirales de importancia regional



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Lorch, M. S. (2020). *Producción de antígenos recombinantes y su empleo en métodos serológicos para la detección de infecciones flavivirales de importancia regional. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes* <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2665>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Producción de antígenos recombinantes y su empleo en métodos serológicos para la detección de infecciones flavivirales de importancia regional

TESIS DOCTORAL

Matías Sebastián Lorch

mati.lorch@gmail.com

Resumen

Los arbovirus son un grupo diverso de virus que se mantienen en la naturaleza a través de la transmisión entre hospedadores susceptibles, mediante ciertas especies de artrópodos hematófagos.

Se han convertido en un importante problema de salud mundial en las últimas cuatro décadas, debido a que tienen la capacidad de infectar múltiples hospedadores y colonizar nuevos vectores y hospedadores vertebrados a través de mutaciones adaptativas, pudiendo además aumentar su virulencia y potencial epidémico.

Dentro de los arbovirus más relevantes encontramos a los virus pertenecientes al género *Flavivirus*, un género de virus que forma parte de la familia *Flaviviridae*. Son virus envueltos que poseen una nucleocápside con simetría icosaédrica, y cuyo material genético reside en una única cadena de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb de longitud. Estos virus son los causantes de numerosas enfermedades en animales y humanos generando graves problemas de salud pública alrededor del mundo, siendo los más conocidos los virus de la fiebre amarilla, dengue,

Zika, *West Nile* y el virus encefalitis de *Saint Louis* que ha tenido relevancia en América.

En base a este panorama, donde las enfermedades transmitidas por vectores constituyen una causa importante de muerte, enfermedad e inequidad en la salud, el progreso continuo en herramientas de vigilancia epidemiológica y en sistemas de diagnóstico son una contribución importante para la salud pública. De esta manera, el objetivo de este trabajo fue desarrollar herramientas moleculares que den lugar al desarrollo de ensayos de diagnóstico para flavivirus, basadas en la detección de la respuesta inmune en pacientes.

En esta tesis de doctorado se realizó la producción en bacterias y caracterización inmunológica de distintos antígenos basados en las secuencias completas de la proteína NS1 de los flavivirus Dengue, Fiebre Amarilla, Zika, *West Nile* y encefalitis de *Saint Luis*. Adicionalmente se llevó a cabo el desarrollo de antígenos recombinantes con diseño

racional, mediante una estrategia de predicción bioinformática de regiones de NS1 que presentan alta probabilidad teórica de formar epítopes lineales para células B.

A fin de establecer la utilidad de los antígenos generados, se llevó a cabo la evaluación del desempeño diagnóstico en el formato de *test* de ELISA indirecto. Para ello se emplearon muestras de sueros humanos negativos y positivos para distintos flavivirus, obteniéndose resultados satisfactorios.

Los valores de sensibilidad y especificidad determinados son comparables con los valores obtenidos en otros trabajos con ensayos de ELISA basados en proteínas o partículas virales enteras.

Los resultados alcanzados en el presente trabajo de investigación son promisorios y sientan las bases para el diseño de nuevos ensayos de diagnóstico basados en los antígenos producidos.



Universidad Nacional de Quilmes

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
LABORATORIO DE VIRUS EMERGENTES**

Producción de antígenos recombinantes y su empleo en métodos serológicos para la detección de infecciones flavivirales de importancia regional

Lic. Matías Sebastián Lorch

Directora: Dra. Sandra E. Goñi
Co-director: Dr. Mario E. Lozano

Tesis presentada para optar por el título de
Doctor en Ciencia y Tecnología de la
Universidad Nacional de Quilmes

- 2020 -



El trabajo de tesis “Producción de antígenos recombinantes y su empleo en métodos serológicos para la detección de infecciones flavivirales de importancia regional” fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Sandra E. Goñi y la Codirección del Dr. Mario E. Lozano, en el Laboratorio de Virus Emergentes (LVE), en el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes, para optar por el título de Doctor en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes.

~ Agradecimientos Académicos ~

A las instituciones que financiaron este trabajo a través de becas y subsidios, o colaboraron en la realización de este trabajo:

Universidad Nacional de Quilmes, **UNQ**.

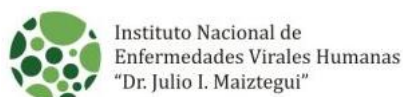
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, **CONICET**.

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, **ANPCyT**.

Red Temática en Virosis Emergentes, **ViroRed - CYTED**

Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas, **ANLIS - INEVH**

Universidad Nacional de Córdoba, **UNC**.



~ Glosario ~

ADN: Ácido desoxiribonucleico	VLPs: <i>Virus-Like Particles</i>
ADNc: ADN complementario	WB: <i>Western Blotting</i>
ARN: Ácido ribonucleico	WNV: <i>West Nile Virus</i>
BCB: <i>Buffer Carbonato-Bicarbonato</i>	YFV: <i>Yellow Fever Virus</i>
BU: <i>Buffer Urea</i>	ZIKV: <i>Zika Virus</i>
BVDV: Virus de la D iarrea V iral B ovina	
CHIKV: <i>Chikungunya Virus</i>	
CI: Cuerpos de Inclusión	
CO: <i>Cut Off value</i>	
CR: Complejo de Replicación	
CSFV: Classical Swine Fever Virus	
DENV: Dengue Virus	
E. coli: <i>Escherichia coli</i>	
EIE: Enzimo-Inmuno Ensayo	
ELISA: <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	
GFP: <i>Green Fluorescent Protein</i>	
HRP: <i>Horseradish Peroxidase</i>	
HT: <i>His Tag</i>	
IPTG: Isopropil-tio- α -D-galactpiranósido	
ISFV: <i>Insect-specific flaviviruses group</i>	
JEV: <i>Japanese Encephalitis Virus</i>	
mAb: <i>monoclonal Antibody</i>	
MBFV: <i>Mosquito-borne flavivirus group</i>	
MVEV: <i>Murray Valley Encephalitis Virus</i>	
NKFV: <i>No known vector flaviviruses group</i>	
NS1: <i>Nonstructural protein 1</i>	
NS1-HT: NS1 fusionada al <i>His Tag</i>	
NT: Neutralización	
OMS: Organización Mundial de la Salud	
ORF: <i>Open Reading Frame</i>	
PCR: <i>Polymerase Chain Reaction</i>	
PI: Post Infección	
RDT: <i>Rapid Diagnostic Test</i>	
RE: Retículo Endoplasmático	
SLEV: <i>Saint Louis Encephalitis Virus</i>	
TBEV: <i>Tick-borne Encephalitis Virus</i>	
TBFV: <i>Tick-borne flavivirus group</i>	
UTR: <i>Untranslated Region</i>	

~ Índice ~

Sección I - Introducción

1.1 Arbovirus	3
1.2 Género <i>Flavivirus</i>	4
1.2.1 Familia y clasificación	4
1.2.2 Partícula viral	7
1.2.3 Genoma viral	8
1.2.4 Traducción y procesamiento	9
1.2.5 Proteínas virales	10
Capside (C)	10
Membrana (prM/M)	10
Envoltura (E)	11
Proteínas no estructurales de membrana	12
NS3	13
NS5	14
1.2.6 Ciclo de infección viral	14
Entrada a la célula	14
Replicación del genoma	15
Ensamblado y maduración	16
1.2.7 Proteína no estructural (NS1)	18
Expresión, procesamiento y oligómeros	20
Participación en la replicación viral	22
Interacción con el sistema inmune	22
1.3 Especies virales	24
1.3.1 Virus de la Encefalitis de <i>Saint Louis</i>	24
Epidemiología	24
Ciclos de transmisión	26
Manifestaciones clínicas	27
1.3.2 Virus <i>West Nile</i>	28
Epidemiología	28
Ciclos de transmisión	29
Manifestaciones clínicas	29
1.3.3 Virus Dengue	30
Epidemiología	30
Ciclos de transmisión	32
Manifestaciones clínicas	32
1.3.4 Virus de la Fiebre Amarilla	33
Epidemiología	33
Ciclos de transmisión	34
Manifestaciones clínicas	34

1.3.5 Virus Zika	35
Epidemiología	35
Ciclos de transmisión	35
Manifestaciones clínicas	36
1.4 Diagnóstico de flavivirus	36
1.4.1 Métodos de diagnóstico directos	36
Aislamiento viral	37
Detección de RNA	38
Detección de antígenos virales	38
1.4.2 Métodos de diagnóstico indirectos	40
MAC-ELISA	41
ELISA indirecto	41
ELISA de bloqueo de epítopes	42
PNRT	43
1.5 Flavivirus en la región: la vigilancia y el diagnóstico como herramientas centrales	44

Sección II - Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis	49
2.2 Objetivo general	49
2.3 Objetivos específicos	49

Sección III - Materiales y Métodos

3.1 Herramientas Bioinformáticas	53
3.1.1 Alineamientos de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas	53
3.1.2 Manejo de secuencias nucleotídicas y diseño de estrategias de clonado	53
3.1.3 Diseño de <i>primers</i>	54
3.1.4 Determinación de las propiedades bioquímicas de las proteínas	54
3.1.5 Perfil de hidrofobicidad	54
3.1.6 Predicciones de epítopes para células B	55
3.2 Herramientas de Biología Molecular	55
3.2.1 Cepas Bacterianas	55
3.2.2 Cepas Virales	56
3.2.3 Vectores de clonado	56
pGem-T	56
pZErO	57
pUC57	57
3.2.4 Cultivos bacterianos	58
3.2.5 Bacterias electrocompetentes	58
3.2.6 Purificación de ARN y síntesis de ADN complementario	58
3.2.7 Amplificación de ADN mediante PCR	59
3.2.8 Extracción de ADN plasmídico	59
3.2.9 Electroforesis de ácidos nucleicos	59

3.2.10 Digestiones Enzimáticas	60
3.2.11 Purificación de moléculas de ADN	60
3.2.12 Ligaciones	61
3.2.13 Electroporación y plaqueo	61
3.2.14 Selección de clones positivos	61
PCR de colonias	61
<i>Eckardt</i>	62
Perfil de digestión	62
3.3 Expresión de proteínas	62
3.3.1 Vectores de expresión	63
pET-22b(+)	63
pET-28a(+)	63
3.3.2 Ensayos de inducción y optimización de la expresión en bacterias	63
3.3.3 Escalado de los ensayos de expresión	64
3.3.4 Electroforesis de proteínas	65
3.4 Purificación de proteínas	65
3.4.1 Ruptura celular	65
3.4.2 Solubilización de cuerpos de inclusión	66
3.4.3 Cromatografía de afinidad	66
3.4.4 Replegado	67
3.4.5 Cuantificación de proteínas	68
3.5 Ensayos y Métodos inmunológicos	68
3.5.1 Inmunodetección (<i>Western Blotting</i>)	68
3.5.2 Enzimo-inmuno Ensayo (EIE)	69
3.5.3 Sueros humanos	70
3.5.4 Inmunización de ratones	70
3.5.5 Caracterización de los sueros producidos	71
3.5.6 Producción de anticuerpos monoclonales en ratón	72
 Sección IV - Resultados y Discusión - Parte I	
4.1 Análisis Bioinformático	75
4.1.1 Propiedades Bioquímicas y perfil de hidrofobicidad	75
4.1.2 Predicciones de epítopes para células B	78
4.2 Clonado Molecular de los ORFs y Epítopes de NS1	79
4.2.1 Diseño de primers	79
4.2.2 Construcción de los plásmidos de expresión de las proteínas	
NS1 de SLEV, WNV, YFV, DENV-1 y ZIKV	81
Síntesis del ADNc y amplificación del ORF de NS1 _{SLEV} y NS1 _{YFV}	83
Clonado del ORF de NS1 _{SLEV} y NS1 _{YFV} en el vector pGem-T	83
Transferencia del inserto NS1 _{SLEV} en pGem-T al vector pZErO	84
Transferencia de la secuencia de NS1 _{SLEV} al vector de expresión pET-22b	85

Transferencia de la secuencia de NS1 _{YFV} al vector de expresión pET-28a	86
Síntesis química de los plásmidos de expresión que contienen las secuencias de NS1 _{WNV} , NS1 _{DENV-1} y NS1 _{ZIKV}	87
4.2.3 Diseño y clonados del plásmido que contiene regiones inmunogénicas de NS1 _{SLEV} (EPS _{SLEV})	88
4.2.4 Diseño del plásmido que contiene sitios inmunogénicos comunes en los flavivirus (EPS _{Flavis})	92
4.3 Producción de las Proteínas Recombinantes	93
4.3.1 Ensayos de inducción de la expresión en bacterias	93
4.3.2 Escalado de los ensayos de expresión	97
4.3.3 Purificación	99
4.3.4 Eliminación de las condiciones desnaturalizantes	105
 Sección V - Resultados y Discusión - Parte II	
5.1 Ensayos Inmunológicos	109
5.1.1 Diseño y optimización del ensayo de ELISA utilizando los antígenos de SLEV y WNV	109
5.1.2 Caracterización mediante Western Blotting o ELISA de los antígenos generados	112
5.1.3 Inmunización de ratones y caracterización de los sueros producidos	116
5.1.4 Generación de anticuerpos monoclonales	119
5.1.5 Análisis del ensayo de ELISA indirecto empleando muestras de suero humanas	120
 Sección VI - Conclusiones y Perspectivas	
6. Conclusiones y Perspectivas	129
 Sección VII - Anexos	
7. Anexos	139
 Sección VIII - Referencias Bibliográficas	
8. Referencias Bibliográficas	153
 Sección IX - Agradecimientos	
9. Agradecimientos	173

Sección I

Introducción

1.1 Arbovirus

Los arbovirus son un grupo diverso de virus que se mantienen en la naturaleza a través de la transmisión entre hospedadores susceptibles, mediante ciertas especies de artrópodos hematófagos (mosquitos, garrapatas o moscas de arena); de ahí su nombre del inglés “*arthropod-borne viruses*” (virus transmitidos por artrópodos) (Darwish *et al.*, 1985). Tras la ingestión de sangre por parte de estos vectores de un hospedador infectado, los virus se multiplican dentro de los tejidos del artrópodo, particularmente en las glándulas salivales, y luego se transmiten a los humanos u otros vertebrados durante la picadura. La mayoría de las enfermedades causadas por arbovirus son zoonosis, es decir, son principalmente infecciones de vertebrados distintos a los humanos, que pueden causar infecciones accidentales en los humanos. La principal excepción a esta regla es el virus dengue, ya que los humanos son el principal hospedador y el paso a través de éstos es esencial para mantener el ciclo de transmisión del virus (Arredondo-García *et al.*, 2016).

Hay más de 500 arbovirus reconocidos en todo el mundo; de estos, aproximadamente 150 están implicados en enfermedades humanas. Algunos infectan a los humanos solo ocasionalmente o causan una enfermedad febril leve, mientras que otros son de gran importancia médica y pueden causar fiebre encefalítica, hemorrágica, defectos de nacimiento y grandes epidemias con una mortalidad considerable (Venter, 2018, Young *et al.*, 2014).

Los arbovirus se han convertido en un importante problema de salud mundial en las últimas cuatro décadas, debido a que tienen la capacidad de infectar múltiples hospedadores y colonizar nuevos vectores y hospedadores vertebrados a través de mutaciones adaptativas, pudiendo además aumentar su virulencia y potencial epidémico. Además de esta complejidad se encuentran, entre otros factores, la globalización (mayor movimiento de humanos, animales, productos y patógenos), cambios ambientales naturales y antropogénicos (clima, uso de la tierra, cría de animales), cambios demográficos (crecimiento de la población, migración y urbanización), y el cambio de un ciclo selvático a urbano (y viceversa), todo lo cual aumenta el riesgo y la imprevisibilidad de las enfermedades epidémicas por arbovirus (Musso *et al.*, 2018).

La mayoría de los arbovirus que causan enfermedades humanas pertenecen a tres familias principales: *Togaviridae* (género *Alphavirus*), *Flaviviridae* (género *Flavivirus*) y *Bunyaviridae* (generos *Bunyavirus*, *Orthobunyavirus*, *Nairovirus* y *Phlebovirus*). Los flavivirus son el grupo médico más importante, y las infecciones causadas por los virus de la fiebre amarilla (YFV, por *yellow fever virus*), Dengue (DENV, por dengue virus) y Zika (ZIKV, por Zika virus), son lo suficientemente frecuentes como para ser de interés mundial. Otros, como *tick-borne encephalitis virus* (TBEV), *Saint Louis encephalitis virus* (SLEV, por su sigla en

inglés) y *West Nile virus* (WNV, por su sigla en inglés), suelen estar restringidos a regiones geográficas específicas (Sukhralia *et al.*, 2018).

1.2 Género *Flavivirus*

1.2.1 Familia y clasificación

El primer virus humano se descubrió hace más de un siglo cuando, en 1901, Walter Reed confirmó la teoría, propuesta por el científico cubano Carlos Finlay, de que la fiebre amarilla se transmitía a los humanos a través de los mosquitos y que el agente infeccioso podía transferirse experimentalmente a través del suero filtrado de un individuo infectado. Actualmente, el virus de la fiebre amarilla es el miembro más representativo de la familia *Flaviviridae* (del latín *flavus*, "amarillo"), una gran familia de virus envueltos con genoma de ARN de cadena positiva (Lindenbach *et al.*, 2013).

Si tenemos en cuenta la cantidad de especies virales de una misma familia que tienen la capacidad de infectar humanos, la familia *Flaviviridae* ocupa el tercer lugar, detrás de *Bunyaviridae* y *Papillomaviridae* (**Figura 1**). La misma, está formada por cuatro géneros, *Hepacivirus*, *Pestivirus*, *Pegivirus* y *Flavivirus*. Dentro de los *Hepacivirus* podemos destacar al causante de la Hepatitis C en humanos; entre los *Pestivirus*, que afectan animales de la familia de los bóvidos, se encuentran los virus de la diarrea bovina (BVDV, por *bovine viral diarrhea virus*) y la peste porcina clásica (CSFV, por *classical swine fever virus*); mientras que el género *Pegivirus*, clasificado recientemente, contiene una serie de virus que afectan mamíferos y hasta el momento han sido poco caracterizados (Simmonds *et al.*, 2017, Stapleton *et al.*, 2011).

En base a los determinantes antigénicos que posee la proteína de envoltura y que son conservados entre los flavivirus, éstos fueron originalmente agrupados mediante reacciones cruzadas obtenidas en pruebas serológicas. Basándose en estos cruces, los flavivirus fueron divididos en seis complejos antigénicos o serológicos que reúnen las principales características biológicas y epidemiológicas de los virus. Para este trabajo, se destacan los complejos antigénicos del virus de la encefalitis Japonesa (JEV, por *japanese encephalitis virus*) que contiene a JEV, SLEV y WNV, entre otros; el complejo del virus Spondweni que contiene al virus del Zika; y los complejos del virus Dengue y del virus de la fiebre amarilla (Calisher *et al.*, 1989).

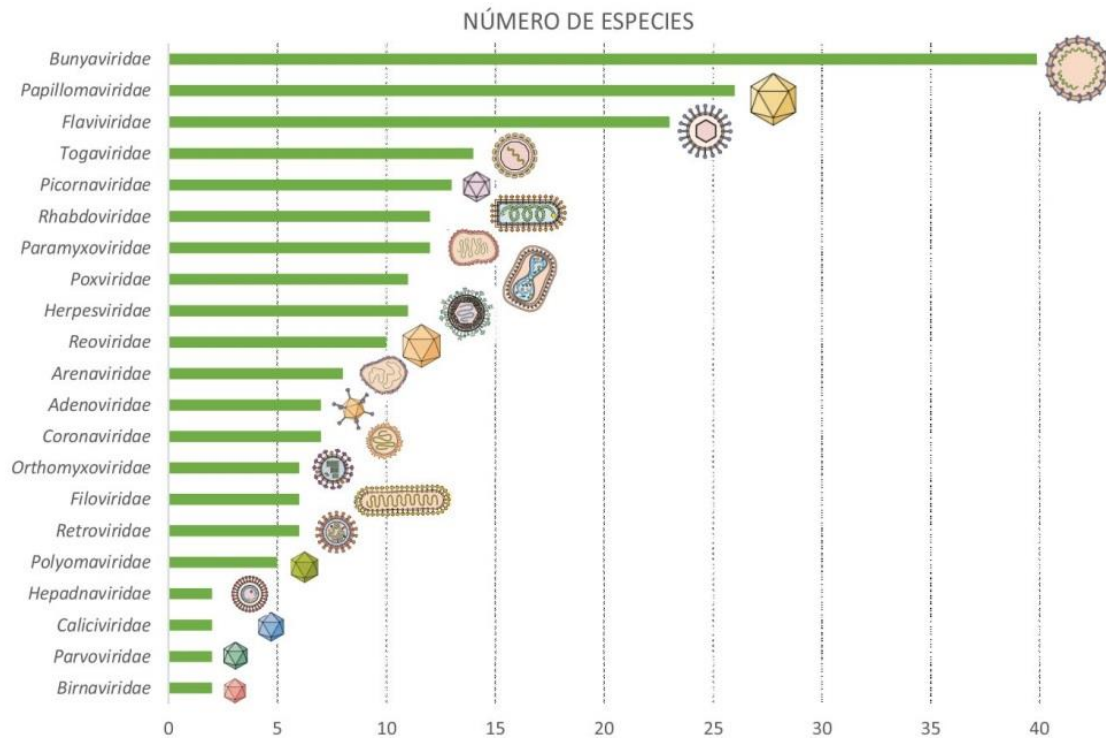


Figura 1. Abundancia de virus humanos por familia. El histograma muestra en el eje horizontal las diferentes familias virales y en el eje vertical el número de especies infecciosas para humanos. Modificado de Woolhouse *et al.*, 2012.

Por otro lado, los flavivirus pueden dividirse en cuatro grupos ecológicos: el grupo transmitido por mosquitos (MBFV, por *mosquito-borne flavivirus group*), el grupo transmitido por garrapatas (TBFV, por *tick-borne flavivirus group*), el grupo específico de vertebrados (NKFV, por *no known vector viruses*), y los que han sido aislados de insectos (ISFV, por *insect-specific flaviviruses*) (**Figura 2**) (Villordo *et al.*, 2016).

Los grupos que presentan mayor impacto en la salud humana son principalmente el MBFV, seguido por el TBFV. Asimismo, dentro del primer grupo podemos encontrar una subdivisión de acuerdo a la especie de mosquito que actúa como vector en la transmisión de estos virus: los grupos que son transmitidos a través de mosquitos *Aedes* y los que lo hacen mediante diferentes especies de *Culex* (**Figura 2**).

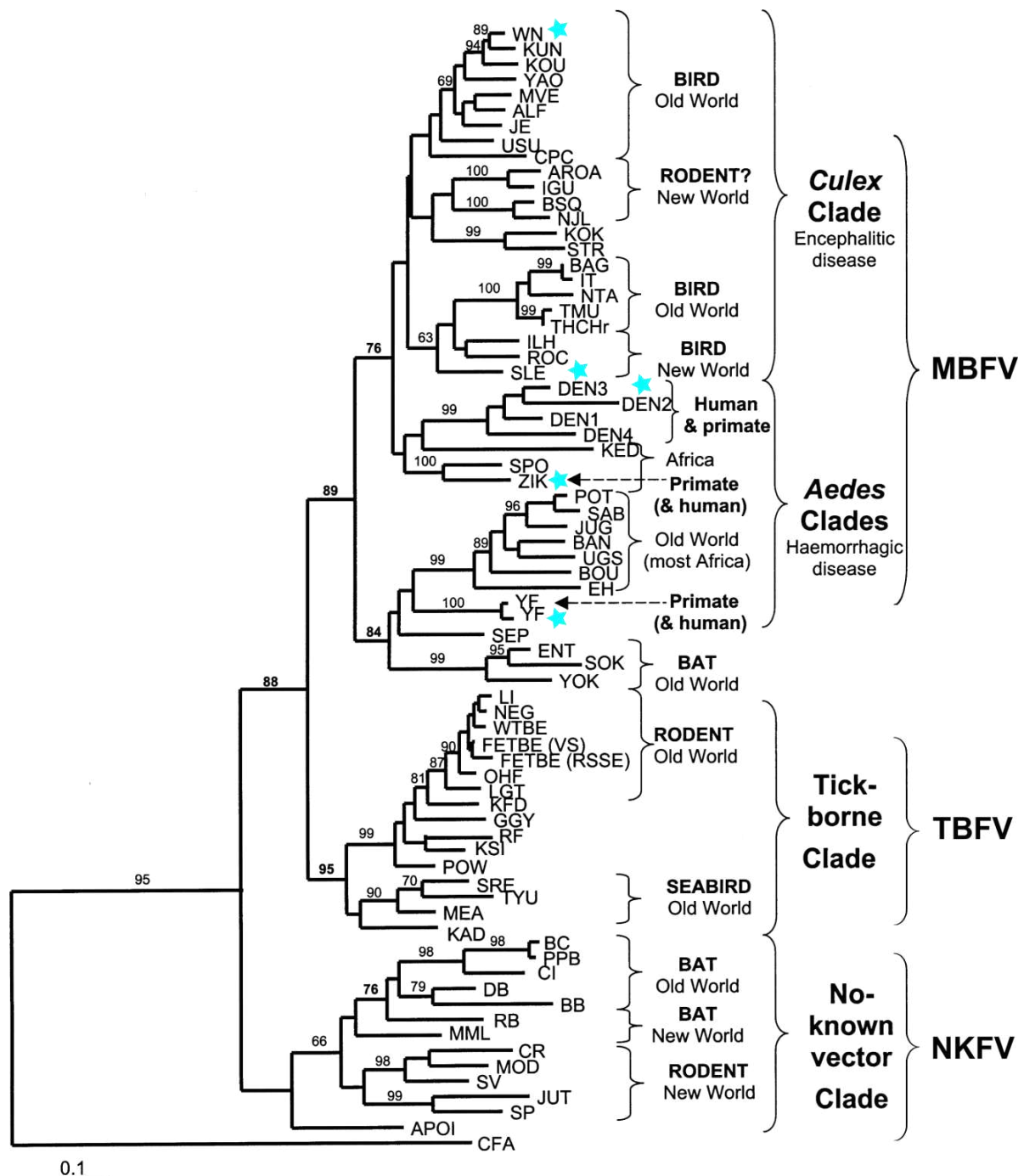


Figura 2. Árbol filogenético del género *Flavivirus*. Filogenia basada en la secuencia del gen de NS5. Se destacan los principales vectores y hospedadores vertebrados de los virus contenidos en cada clado. Con una estrella azul se resaltan los 5 virus relevantes para este trabajo: WNV, SLEV, DENV, ZIKV y YFV. Tomado de Gaunt *et al.*, 2001.

Los síntomas clínicos causados por los MBFV se clasifican principalmente en tres categorías distintas: enfermedad sistémica febril, encefalitis o fiebre hemorrágica. Sin embargo, el espectro clínico causado por estos virus es muy amplio, pudiendo también originar sólo infecciones subclínicas. Los virus encefalíticos generalmente se transmiten por

vectores *Culex* e infectan hospedadores aviáres, mientras que los virus causantes de fiebre hemorrágica generalmente se transmiten por el vector *Aedes* e infectan hospedadores mamíferos (Gaunt *et al.*, 2001).

La enfermedad sistémica febril es el síndrome más frecuente en las arbovirosis. Suele estar asociado a dolor de cabeza, malestar general, vómitos o náuseas y dolor retro-ocular, manifestaciones observadas muy comúnmente en los cuadros clínicos asociados a las infecciones causadas por DENV. La segunda afectación más frecuente es la meningitis aséptica, encefalitis o meningoencefalitis. Los flavivirus que poseen un marcado neurotropismo, se agrupan mayoritariamente en el complejo de la encefalitis japonesa, que incluye a WNV, JEV, *Murray Valley encephalitis virus* (MVEV) y SLEV.

Otra de las manifestaciones clínicas son las fiebres hemorrágicas, las cuales comprenden enfermedades epidémicas con alta tasa de letalidad, si bien el cuadro clínico puede variar dependiendo de la enfermedad específica, la respuesta individual y virulencia del agente involucrado. En general, se caracteriza por la aparición de un cuadro de aproximadamente 3 días de duración, seguido de un período de remisión corto que desencadena en la aparición del síndrome hemorrágico y un compromiso general severo. Los virus asociados a esta manifestación clínica son DEN e YF (Pierson & Diamond, 2013).

En la mayoría de las instancias, los humanos son considerados hospedadores finales debido a que la viremia desarrollada es insuficiente para infectar eficientemente otros artrópodos y, por lo tanto, no contribuyen a los ciclos de transmisión arboviral (como SLEV y WNV). Sin embargo, DENV, YFV y ZIKV causan viremia suficiente en humanos para permitir la transmisión directamente entre humanos a través de mosquitos *Aedes* en ciclos urbanos (Valderrama *et al.*, 2017).

1.2.2 Partícula viral

Los flavivirus comparten una estructura viral común y se encuentran bien caracterizadas (Kaufmann & Rossmann, 2011). El virión maduro es una partícula esférica envuelta con un diámetro aproximado de 40-60 nm. La capa más externa del virión está conformada por unidades repetitivas (180 copias) de la glicoproteína de la envoltura (E) en combinación con la proteína de membrana (M) (**Figura 3**). La superficie posee una simetría icosaédrica y consta de 30 subunidades, cada una de ellas formada por tres dímeros de E y la proteína prM. El dominio DII de la proteína E es importante para la interacción y fusión con la membrana de la célula hospedadora y se expone después de la maduración de la forma inmadura de M (prM) (Barrows *et al.*, 2018).

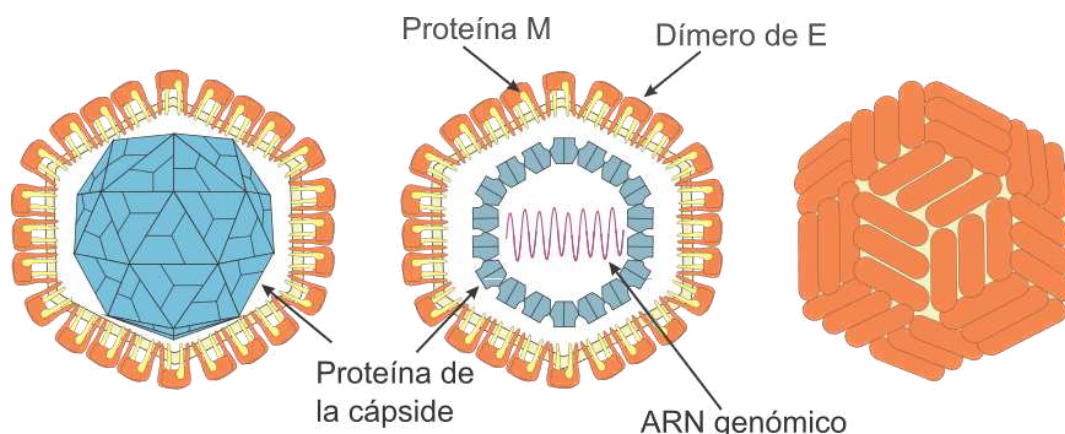


Figura 3. Esquema de la partícula viral. Representación del virión flaviviral donde se muestran las proteínas que lo componen y la localización del material genético. La proteína E (color naranja) es la mayoritaria en la superficie viral encontrándose asociada a la proteína M (color amarillo). La proteína C forma la cápside icosaédrica (color azul).

1.2.3 Genoma viral

El genoma de los flavivirus es de ARN simple cadena de polaridad positiva, de aproximadamente 11 kb de longitud. Su organización comprende un marco de lectura abierto (ORF, por *Open Reading Frame*) que cubre la mayor parte de la molécula y dos regiones no codificantes localizadas en las extremidades 5' y 3' de la cadena nucleotídica. Este ORF codifica para una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos, que a través del procesamiento proteolítico da origen a diez péptidos individuales. La región no codificante localizada en el 5' (5'UTR, por 5' *untranslated region*), de unos 100 nucleótidos aproximadamente, posee tres estructuras secundarias, dos *stem loops* y un *harpin*. El *stem loop* A es el más conservado entre los miembros del género y participa en el paso de traducción del genoma. La porción equivalente localizada en el extremo 3' (3'UTR, por 3' *untranslated region*) abarca entre 400 a 700 nucleótidos, carece de la cola de nucleósidos de adenosina (poly-A), y contiene varias secuencias conservadas específicas, las cuales funcionarían como promotor de síntesis en la cadena negativa, intermediaria en la replicación viral (**Figura 4.A**) (Barrows *et al.*, 2018, Gebhard *et al.*, 2011). Ambas regiones contienen múltiples señales involucradas en la circularización del genoma y empaquetamiento viral. Las regiones de circularización CS (por, *complementary sequences*) y AUR (por, *upstream AUG región*) se muestran en la **Figura 4.A** (Paranjape & Harris, 2009, Villordo & Gamarnik, 2009). La porción genómica donde se encuentran los genes que codifican las proteínas estructurales (proteínas C, prM y E) ocupa el 25% del ORF en la porción 5', mientras que el 75% restante del genoma codifica las proteínas no estructurales

(NS, por *non structural*), con el siguiente orden: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5 (Figura 4.B).

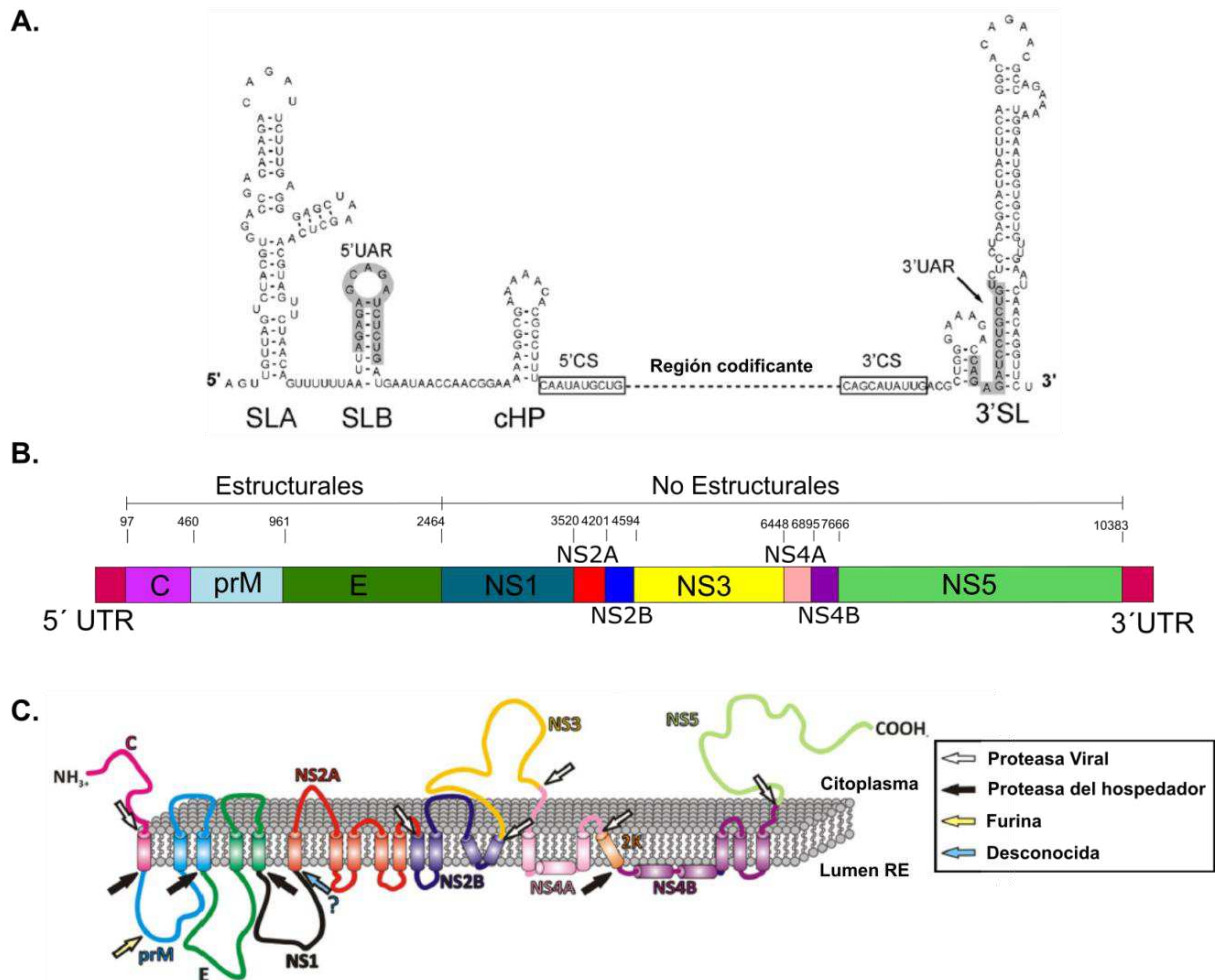


Figura 4. Organización genómica de los flavivirus. A. Estructuras secundarias de las regiones no codificantes. Se muestran las regiones no codificantes 5' y 3' de DENV2. En la región 5'UTR se muestran los *stem loop* A y B (SLA y SLB) y el *harping* de la región de la cápside (cHP). En la región 3'UTR se muestra el 3' *stem loop* (3'SL). En ambas regiones se muestran las secuencias complementarias para la circularización: 5'-3' UAR y 5'-3' CS. Tomado de Villordo & Gamarnik, 2009. **B. Estructura del genoma de un flavivirus.** La barra horizontal representa el genoma Flaviviral, teniendo en cuenta las regiones no codificantes (5'UTR y 3'UTR), así como el ORF. En primer lugar se observan las tres proteínas estructurales (cápside C, prM y envoltura E); y las siete proteínas no estructurales (NS1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B y 5). En la parte superior se indican las posiciones nucleotídicas donde la poliproteína es procesada para dar lugar a cada proteína por separado. **C. Topología de la poliproteína en la membrana del RE y enzimas involucradas en el procesamiento.** Las flechas coloreadas señalan los lugares de corte y la enzima encargada de la proteólisis. Modificado de Assenberg *et al.*, 2009.

1.2.4 Traducción y procesamiento

Se postulan dos alternativas para el inicio de la traducción. Por un lado, es posible que la iniciación de la traducción comience en el citosol, y que el ribosoma se detenga cuando el

dominio transmembrana, en el extremo C de la proteína de la cápside inmadura, emerge del túnel de salida del ribosoma, y todo el complejo sea translocado a la membrana del retículo endoplásmico (RE). Una visión alternativa es que el genoma flaviviral se recluta en el RE e inicia la traducción utilizando ribosomas asociados al RE (Barrows *et al.*, 2018).

Tras la traducción como un único marco de lectura abierto, la poliproteína es fragmentada tanto por proteasas del hospedador como proteasas virales. La presencia de múltiples dominios transmembrana determina si las proteínas individuales se ubican en el lado citoplásmico o luminal de la membrana del retículo endoplásmico (**Figura 4.C**). Las proteínas prM, E y NS1 están localizadas en el lado luminal del RE. Aquí, la peptidasa señal del hospedador escinde la poliproteína en el N-terminal de estas proteínas. Las proteínas de la cápside, NS3 y NS5 están ubicadas en el lado citoplásmico de la membrana, mientras que las proteínas NS2A, NS2B, NS4A y NS4B se encuentran en la membrana del RE. El extremo N de NS2B, NS3, NS4A y NS5 es proteolizado por la proteasa NS2B-NS3 viral. La enzima involucrada en la escisión de la unión NS1/NS2A aún no está determinada (Lindenbach *et al.*, 2013).

1.2.5 Proteínas virales

Proteínas estructurales

Cápside (C)

La proteína de la cápside es el primer gen codificado por la poliproteína, produciendo una proteína citosólica de ~11 kDa. La proteína C naciente contiene una cola hidrófoba en el C-terminal que sirve como un péptido señal para la traslocación al RE de prM. Este anclaje es escindido en dos pasos, primero por la proteasa viral NS2B-NS3 y luego por la peptidasa señal del hospedador (Lindenbach *et al.*, 2013). La función principal de la proteína de la cápside es formar el complejo ribonucleoproteico con el ARN viral. En los extremos amino y carboxilo se concentran residuos básicos que permiten la interacción con el material genético, y en la porción central se encuentra un núcleo hidrofóbico que facilita la interacción de ésta con la membrana celular, favoreciendo el armado del virión (Ma *et al.*, 2004).

Membrana (prM/M)

El precursor de la glicoproteína M, prM (~26 kD), se traslada al RE a través de una secuencia señal proporcionada por la cola hidrofóbica de C. Sin embargo, la proteólisis mediante la peptidasa señal se retrasa hasta que la proteasa viral genera la forma madura de C en el lado citosólico de la membrana. Este mecanismo de proteólisis secuencial sirve para retrasar el procesamiento estructural de proteínas hasta que la serina proteasa viral se haya acumulado y la replicación esté en marcha, lo que limita la liberación de partículas

virales vacías, inmunógenicas pero no infecciosas, en una etapa temprana de la infección (Oliveira *et al.*, 2017).

La proteína prM es una de las tres glicoproteínas virales (junto con la envoltura y la proteína NS1). La región N-terminal contiene de uno a tres sitios de N-glicosilación y seis residuos de cisteína conservados, los cuales se encuentran formando puentes disulfuro. La proteína prM se pliega rápidamente y ayuda en el correcto plegado de la proteína de envoltura. La acidez de los compartimentos del trans-Golgi induce un reordenamiento global en prM que expone el sitio de proteólisis por furinas, permitiendo la generación de la forma madura M (8 kDa). Después de la escisión, el péptido pr no se disocia inmediatamente de la partícula viral, sino que se requiere la exposición al pH neutro del espacio extracelular para liberar pr y permitir la maduración del virión compatible con la fusión. Este retraso evita que las partículas virales escindidas sufran una fusión prematura de las membranas dentro del Golgi (Sanchez-San Martín *et al.*, 2009, Stadler *et al.*, 1997).

Envoltura (E)

La proteína estructural restante es la de envoltura (E), pesa aproximadamente 53 kDa y se encuentra formando dímeros en el virión (**Figura 5.A**). Es una glicoproteína que posee 6 puentes disulfuro, y al ser la proteína principal de la superficie de los viriones es el blanco de la mayoría de los anticuerpos neutralizantes generados por el sistema inmune (Lin *et al.*, 2012). Cada monómero de proteína E se compone de tres dominios: DI, es el dominio central formado por un barril de ocho hojas β ; DII, un dominio largo encargado de la dimerización, posee una estructura similar a un dedo que se proyecta a lo largo de la superficie del virus; y DIII, que mantiene una estructura similar a la inmunoglobulina y posee sitios de unión para proteínas celulares (Rey *et al.*, 1995) (**Figura 5.B y C**).

El péptido de fusión está ubicado en la punta del dominio DII y se encuentra formado por una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos conservada entre todos los flavivirus. Éste permanece cubierto por el péptido pr o enterrado en un sobre hidrofóbico formado por DI y DIII del monómero hasta que se activa para insertarse en la membrana celular. Debido a que se cree DIII que está involucrado en la unión al receptor, es un objetivo importante para los anticuerpos neutralizantes (Luca *et al.*, 2013).

La unión de E a un receptor celular de membrana, probablemente mediante DIII, conduce a la captación endosomal. La reducción de pH en los endosomas tardíos después de la endocitosis de las partículas virales desencadena un cambio conformacional en la proteína E que conduce a la fusión entre las membranas viral y endosomal. Probablemente, este cambio se desencadene debido a la protonación de uno o más residuos de histidinas (Harrison, 2008). El cambio conformacional resulta en la disociación de los dímeros de E en la superficie del virión, y en la exposición del dominio de fusión en el extremo del DII. Este

dominio interactúa posteriormente con la membrana endosomal adyacente, y la E monomérica se reasocia como un trímero, lo cual desencadena la fusión de la membrana y la formación de un poro de fusión (Modis *et al.*, 2004).

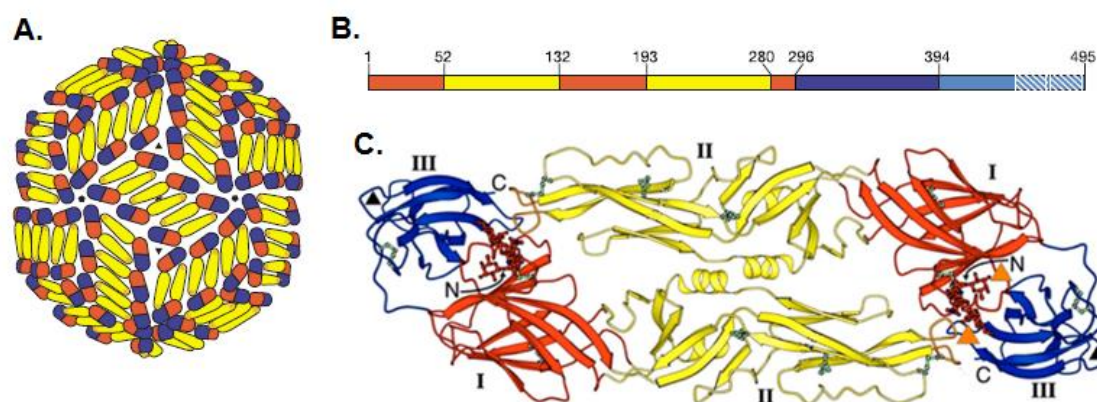


Figura 5. Estructura de la proteína de Envoltura. A. Posicionamiento de los dímeros de E en la superficie del virión. Esquema de la superficie del virión, donde se detectan 90 dímeros de la proteína E en simetría icosaédrica. B. Secuencia primaria de la proteína E. La secuencia del dominio I se muestra coloreado de rojo, la secuencia del dominio II en amarillo y la secuencia del dominio III de azul. C. Representación del dímoro de proteína E. Se pueden observar los tres dominios de cada proteína: en rojo el DI, en amarillo el DII y en azul el DIII. Se destacan los extremos amino y carboxilo (indicados como N y C). Los triángulos naranjas marcan la posición de las histidinas de los dominios I y III, mientras que los triángulos negros la posición del péptido que interacciona con el receptor. Modificado de Harrison, 2008 y Modis *et al.*, 2004.

Proteínas no estructurales

Inicialmente, se creyó que las proteínas NS (NS, por *no structural*) participaban solamente en la replicación viral, como parte del complejo de replicación (CR). Hoy se conoce que la mayoría son multifuncionales. Las proteínas NS1, NS3 y NS5 son las de mayor tamaño, y también las más conservadas entre los flavivirus, mientras que las restantes (NS2A, NS2B, NS4A y NS4B) son relativamente pequeñas e hidrofóbicas (Lindenbach *et al.*, 2013).

En la **Figura 4.C** se representa la ubicación de la poliproteína en ambos lados de la membrana del retículo endoplásmico, así como también las proteasas encargadas de procesar a la misma y dar lugar a las proteínas individuales.

Proteínas no estructurales de membrana: NS2A, NS2B, NS4A y NS4B

Los flavivirus expresan cuatro pequeñas proteínas hidrofóbicas multifuncionales con dos, tres o cuatro regiones que atraviesan la membrana. Las proteínas NS2A, NS2B, NS4A y NS4B están involucradas en una variedad de funciones a lo largo de la infección viral, desde el ensamblaje, la replicación del genoma viral, hasta la inhibición del sistema inmunitario del hospedador. Las cuatro proteínas hidrofóbicas se localizan conjuntamente con el ARN y

otros componentes del complejo de replicación, y por lo tanto se ha podido observar su intervención en la replicación del ARN viral (Welsch *et al.*, 2009). Además de esto, se ha demostrado que están involucradas en la inhibición del sistema inmune, específicamente mediante el bloqueo de la señalización de IFN de tipo 1 (Chen *et al.*, 2017). Presentan además tienen funciones adicionales y diversas a lo largo del ciclo de vida del virus.

Es así que NS2A es una proteína de 22 kDa que se encuentra involucrada en el ensamblaje del virión y se ha demostrado, para DENV y WNV, que puede inhibir la cascada de señalización del interferón (IFN) involucrada en la muerte celular programada (Chen *et al.*, 2017). La función principal de la proteína NS2B de 14 kDa es como cofactor de la actividad proteasa, encontrándose asociada a la membrana del RE y combinándose con el dominio proteasa presente en el C-terminal de NS3, sirviendo como cofactor y como anclaje a membrana (Assenberg *et al.*, 2009, Sampath & Padmanabhan, 2009). La proteína NS4A de 16 kDa se ha implicado en la reorganización de las membranas de la célula huésped a través de la formación de oligómeros capaces de inducir curvatura de la membrana del RE, dando lugar a vesículas en las cuales se posiciona el CR (Gillespie *et al.*, 2010, Welsch *et al.*, 2009). Además, NS4A muestra asociación con los miembros del complejo de replicación y, por lo tanto, tendría un papel en la replicación del ARN viral. La proteína NS4B de 29 kDa también se ha relacionado con la proliferación de membrana y al igual que las otras proteínas co-localiza con el CR. Se ha demostrado que tanto NS4A como NS4B activan la respuesta al aumento de proteínas desplegadas, lo cual potencia la inhibición de la señalización antiviral (Ambrose & Mackenzie, 2011).

NS3

Es una proteína citoplasmática de 70 kDa de peso molecular, que tiene la capacidad de asociarse a membrana por medio de la interacción con NS2B. Posee dos dominios funcionales distintos, necesarios para el procesamiento de la poliproteína y la replicación del ARN. El C-terminal de NS3 posee actividad helicasa y nucleósido trifosfatasa (NTPasa), esenciales para la replicación del genoma viral. Participa separando la cadena naciente del molde, y acondicionando el extremo 5' del ARN para que pueda ser agregado el *cap* por NS5 (Preugschat *et al.*, 1996). El N-terminal de la proteína posee el dominio catalítico de la serina proteasa NS2B-3, la cual tiene afinidad por regiones de aminoácidos básicos encontradas en las uniones de NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4B/NS5. Además, proteasa participa en la maduración de la proteína de la cápside (Preugschat *et al.*, 1990).

Se distribuye ampliamente por toda la célula, particularmente en asociación con la membrana del RE. Se ha demostrado que NS3 co-localiza con el ARN y otras proteínas no estructurales implicadas en la formación del complejo de replicación.

Por otro lado, se encontró que la serina proteasa NS2B-3 de DENV también puede regular negativamente la activación de IFN de tipo I en células dendríticas humanas, aunque no se han identificado los posibles sustratos (Chen *et al.*, 2017).

NS5

Es la proteína viral más grande, una proteína multifuncional de ~100 kDa, que es la más conservada entre los flavivirus. Contiene el dominio ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp, por *RNA dependent RNA polymerase*) en los dos tercios del C-terminal y su papel en la replicación del ARN viral ha sido confirmado por numerosos estudios, incluida la co-localización de NS5 con ARN de doble cadena y otras proteínas no estructurales implicadas en la formación del complejo de replicación flaviviral (Davidson, 2009, Kumar *et al.*, 2013). Este dominio contiene un sitio activo de GDD conservado entre flavivirus, que es crítico para la función (Davidson, 2009, Kim *et al.*, 2007).

El tercio restante de NS5, correspondiente a la región N-terminal, posee actividad S-adenosil metionina metiltransferasa (MTasa) la cual participa en el agregado de la capucha en el extremo 5' del ARN, formado por un nucleótido de guanina metilado, necesario para la estabilidad del ARN mensajero y la unión con el ribosoma durante la traducción (Egloff *et al.*, 2002, L. Liu *et al.*, 2010).

1.2.6 Ciclo de infección viral

Entrada a la célula

La infección en humanos se inicia, tanto para vectores mosquitos como para garrapatas, a través de la picadura de uno de estos artrópodos infectados. El virus ingresa atravesando la piel mediante la saliva del insecto. Luego de la entrada del virus al hospedador, la ronda inicial de replicación viral se da en las células dendríticas de la piel. Estas células infectadas viajan hacia los nódulos linfáticos locales, donde ocurre una segunda ronda de replicación, dando lugar a la etapa de viremia, donde el virus entra en la circulación y se disemina por los órganos internos. En la mayoría de las infecciones por flavivirus, los monocitos y los macrófagos son las principales células blanco para infección y replicación. Sin embargo, otras células como linfocitos B y T, hepatocitos, células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos también tienen este potencial (Kaufmann & Rossmann, 2011). Para el caso de WNV se ha demostrado que tanto neuronas como macrófagos son importantes células blanco (Ceccaldi *et al.*, 2004).

El virus ingresa a la célula por el mecanismo conocido como endocitosis mediada por receptor, donde la proteína viral de reconocimiento y adsorción a la célula es la de envoltura. Existen varios elementos de anclaje de baja afinidad que facilitan la unión proteína E-célula,

y que ayudan a concentrar las partículas virales sobre la superficie celular. Entre ellos se encuentran el heparán sulfato, receptores de lipoproteínas y algunos glicosfingolípidos (Smit *et al.*, 2011). Varios receptores de mayor afinidad han sido caracterizados para flavivirus, entre ellos, el receptor de lectina tipo C, DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3 (ICAM3)-Grabbing Non-integrin*), presente en las células dendríticas derivadas de monocitos; el receptor de manosa, presente en macrófagos humanos; proteínas de choque térmico; lamininas y $\alpha_v\beta_3$ integrinas (Kaufmann & Rossmann, 2011).

Se observó que las partículas de virus opsonizadas con concentraciones subneutralizantes de inmunoglobulinas muestran una mejor unión e infección de las células que expresan receptores Fc, e incrementa la infectividad de partículas virales en donde prM no ha sido completamente proteolizada. Se especula que este tipo de infección es relevante en los casos de dengue hemorrágico, que ocurre con más frecuencia en personas previamente expuestas a otros serotipos de DENV (Rothman, 2011).

Después de la captura por los receptores apropiados, los flavivirus se internalizan por endocitosis. Una vez formada la vesícula endocítica, el pH ácido del endosoma genera cambios estructurales en la proteína E provocando la fusión de las membranas endosoma-virión, con la posterior liberación de la ribonucleocápside al citoplasma. La fusión de las membranas víricas y del hospedador se produce durante la maduración del endosoma, aunque el compartimento exacto que desencadena este evento difiere entre las cepas y las especies de flavivirus. En el ambiente ácido, los dímeros de proteína E se disocian y experimentan un cambio conformacional irreversible para convertirse en trímeros fusogénicos. El péptido de fusión, previamente enterrado en la interfaz del homodímero E, se expone y se inserta en la membrana endosomal (Smit *et al.*, 2011). Una vez que la cápside llega al citoplasma se produce el desnudamiento viral y la liberación del genoma.

Replicación del genoma

Luego del desnudamiento viral, comienza el proceso de replicación. Este último, ocurre en vesículas formadas en la cara citosólica del RE, e implica la síntesis de una cadena complementaria negativa que sirve como molde para la síntesis de las moléculas de cadena positiva (Welsch *et al.*, 2009).

La traducción del genoma viral entrante proporciona las proteínas virales no estructurales necesarias para la replicación de ARN. Éstas, junto con proteínas del hospedador, componen el CR que se ensambla en el extremo 3' del ARN genómico de cadena positiva (Apte-Sengupta *et al.*, 2014). Todas las proteínas no estructurales forman parte del CR, ya sea aportando alguna actividad enzimática, como NS3 y NS5, o desempeñando un papel

estructural, ayudando a anclar el complejo de replicación en la membrana (**Figura 6**) (Brinton, 2014).

La ciclación del genoma mediante interacciones entre los extremo 3'-5' es necesaria para la síntesis de ARN de cadena negativa. El bajo nivel de genomas disponibles al principio de la replicación da como resultado que las moléculas de ARN de sentido positivo cambien entre una forma lineal para la traducción y una forma cíclica para la síntesis de ARN (Gebhard *et al.*, 2011, Villordo & Gamarnik, 2009).

El CR transcribe ARN de cadena negativa del ARN de cadena positiva, produciendo una forma replicativa de ARN de doble cadena. Esta replicación inicial ocurre cercana a las 3 hs post infección (pi). Una vez que se genera el ARN de sentido negativo, ésta actúa como plantilla para la replicación del ARN de sentido positivo. Luego de 24 hs pi, comienza la fase exponencial de la síntesis del genoma, donde múltiples ARN se copian simultáneamente desde una única plantilla de cadena negativa, a medida que se forma una nueva hebra positiva, el ARN desplaza la hebra antigua (Lindenbach & Rice, 1999, Lindenbach & Rice, 1997). A lo largo del ciclo de vida del virus, el ARN de cadena negativa se encuentra en menor cantidad en comparación con el ARN de cadena positiva, que funciona como ARN mensajero para la traducción y también se empaqueta para producir nuevas partículas virales.

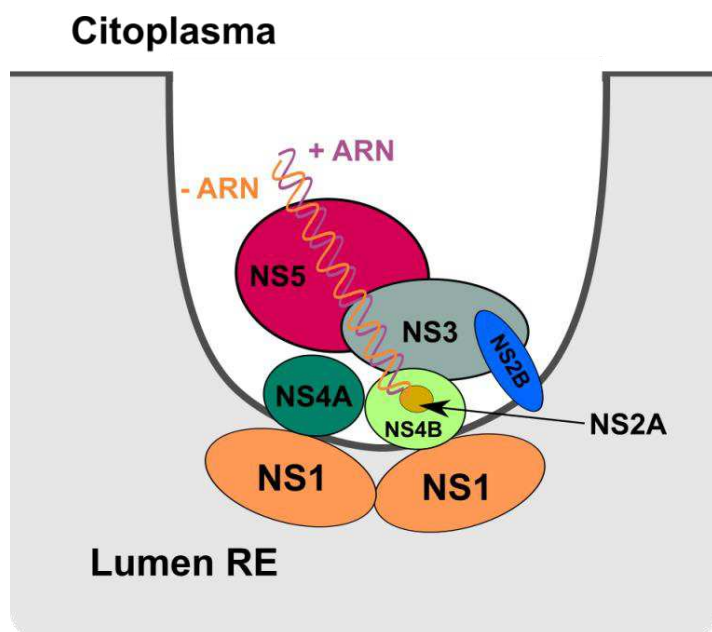


Figura 6. Esquema complejo de replicación. Se representa el complejo de replicación estructurado en la membrana del RE. La proteína NS1 forma dímeros en el RE, pero interacciona con el complejo de replicación en el lado opuesto de la membrana. Las siete proteínas no estructurales, junto con proteínas huésped (no mostradas), forman el complejo de replicación. En un primer momento, se produce una hebra de polaridad negativa que luego servirá como molde para las cadenas positivas. Modificado de Shi, 2014.

Ensamblado y maduración

Una vez replicados, los nuevos genomas salen de las vesículas que contienen los CR a través de un poro, después de lo cual se pueden replicar, traducir o ensamblar en viriones.

El ARN que sale del poro se une a la cara cargada de la proteína C que se encuentra asociada, por su cara hidrofóbica, al lado citoplásmico de la membrana del RE (Welsch *et al.*, 2009). El ensamblado del virión comienza cuando la proteína C asociada al genoma interacciona con las proteínas E y prM que se encuentran en la membrana, lo cual desencadena la brotación de viriones inmaduros hacia el interior del RE. Posteriormente, estos viriones son transportados a través de la vía secretoria, donde los polisacáridos de E y prM son modificados. La presencia del péptido pr en la formación inicial del virión es necesaria para proteger a la proteína E de desencadenar la fusión de la membrana dentro del entorno de bajo pH de la vía secretoria. Después de que la porción N-terminal de prM se escinde en el compartimento trans-Golgi por una furina celular, la proteína E experimenta un cambio conformacional, rotación y reordenamiento que da lugar a la formación de los 90 dímeros antiparalelos que crean la cobertura proteica con simetría icosaédrica en el lado externo de la envoltura viral (Sanchez-San Martín *et al.*, 2009, Zai *et al.*, 2013). Los viriones maduros se transportan a la membrana plasmática en vesículas y se liberan por exocitosis. La liberación de viriones maduros suele comenzar entre las 8 y las 10 hs pi, dependiendo de la especie viral, llegando a un máximo cercano a las 24 hs pi (Brinton, 2014).

Durante el proceso de exocitosis, las células infectadas, secretan una mezcla de partículas maduras, inmaduras o incompletas. Algunas de estas partículas pueden estar formadas por la bicapa lipídica conteniendo E y M pero carecen de la nucleocápside; y otras pueden no estar totalmente maduras, conteniendo en su superficie prM. Se sabe que la proteólisis de prM no es totalmente eficiente y la cantidad viriones conteniendo prM es diferente entre los flavivirus; mientras que se han descrito altos números de partículas que contienen prM para WNV y DENV, esta característica se observa mucho menos en TBEV (Heinz *et al.*, 1994, Zybert *et al.*, 2008).

Un resumen del ciclo viral se representa en la **Figura 7**.

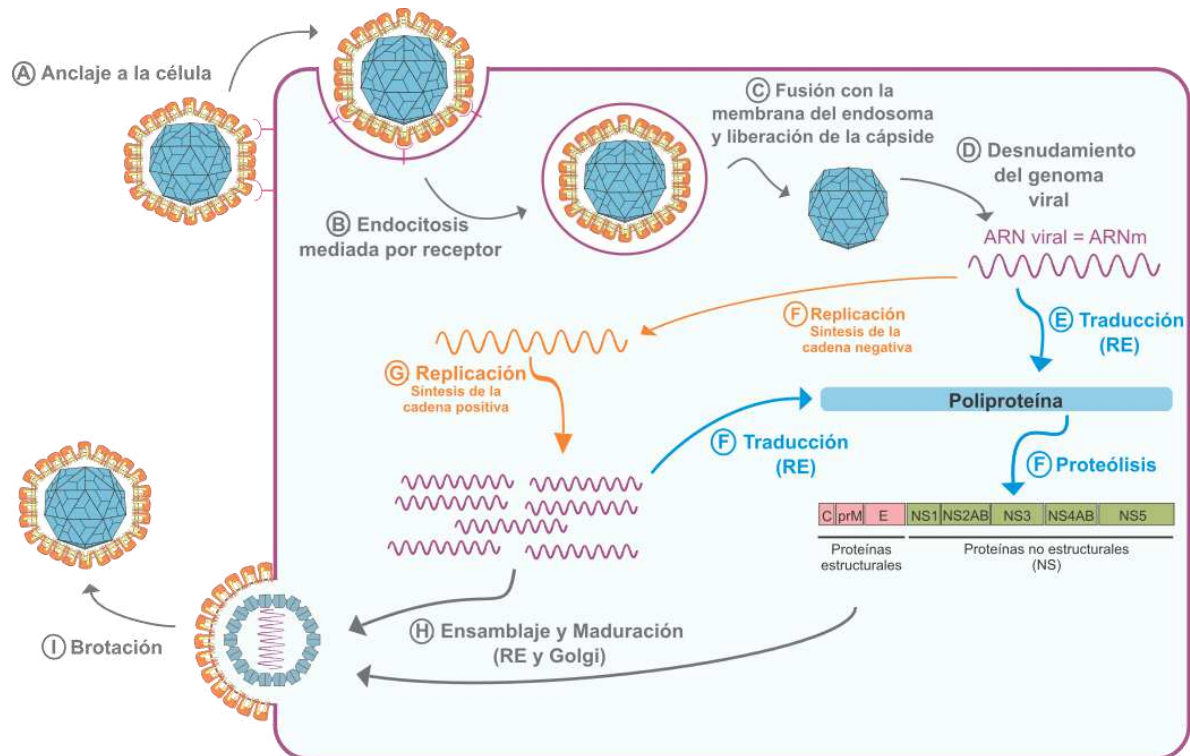


Figura 7. Ciclo de infección viral. Los flavivirus ingresan a las células a través de la vía endocítica mediada por receptor y se fusionan con las membranas endosómicas de la célula dependiendo del pH. La replicación y el ensamblaje se produce en membranas derivadas del retículo endoplásmico (RE). A partir del genoma viral entrante (polaridad positiva), se produce la traducción de las proteínas y la síntesis de la cadena de ARN negativa que servirá como molde para nuevas cadenas positivas. El tránsito de viriones inmaduros a través de los compartimentos levemente ácidos del Golgi hasta la vía secretoria da como resultado un cambio dependiente del pH en la disposición de las proteínas E en la superficie de las partículas víricas. Las proteínas E en los viriones inmaduros a un pH ácido se colocan planas contra la superficie del virión en un patrón en espiga. La proteína prM permanece asociada con la partícula del virus. En esta conformación, prM puede ser escindida por la serina proteasa celular furina. La liberación del virión de las células en el medio extracelular más neutro da como resultado la disociación de la porción "pr" de prM y la formación de un virión maduro.

1.2.7 Proteína no estructural 1 (NS1)

El antígeno soluble fijador del complemento (SCF, de *soluble complement fixing*) fue identificado por primera vez en 1970, en suero y extractos de cerebros de ratones infectados con DENV (Brandt *et al.*, 1970a, Brandt *et al.*, 1970b), y posteriormente fue encontrado en la sangre de pacientes infectados con dengue (Young *et al.*, 2000). El antígeno SCF también se denominó gp48, según su peso molecular determinado por SDS-PAGE (Smith & Wright, 1985). En 1985, cambió su nombre a NS1 luego de que la secuenciación del genoma de YFV colocó el gen que codifica esta proteína como la primera de las proteínas no estructurales (Rice *et al.*, 1985).

La secuencia de los genes NS1 se encuentra altamente conservada entre los flavivirus, abarcando una longitud de 1056 nucleótidos y codificando un polipéptido de 352 aminoácidos, arrojando un peso molecular de entre 46 y 55 kDa, dependiendo de su estado de glicosilación (**Figura 8**). Pueden identificarse múltiples formas oligoméricas que se encuentran en diferentes ubicaciones celulares: ya sea asociada a la membrana celular (mNS1), compartimientos vesiculares dentro de la célula o en la superficie celular; y en una forma secretada rica en lípidos (sNS1). Se la ha implicado en una amplia gama de funciones durante la infección por flavivirus, incluida la realización de una función crítica en la replicación del ARN, así como la activación y la inhibición del sistema inmunitario del hospedador (Flamand, 2015).

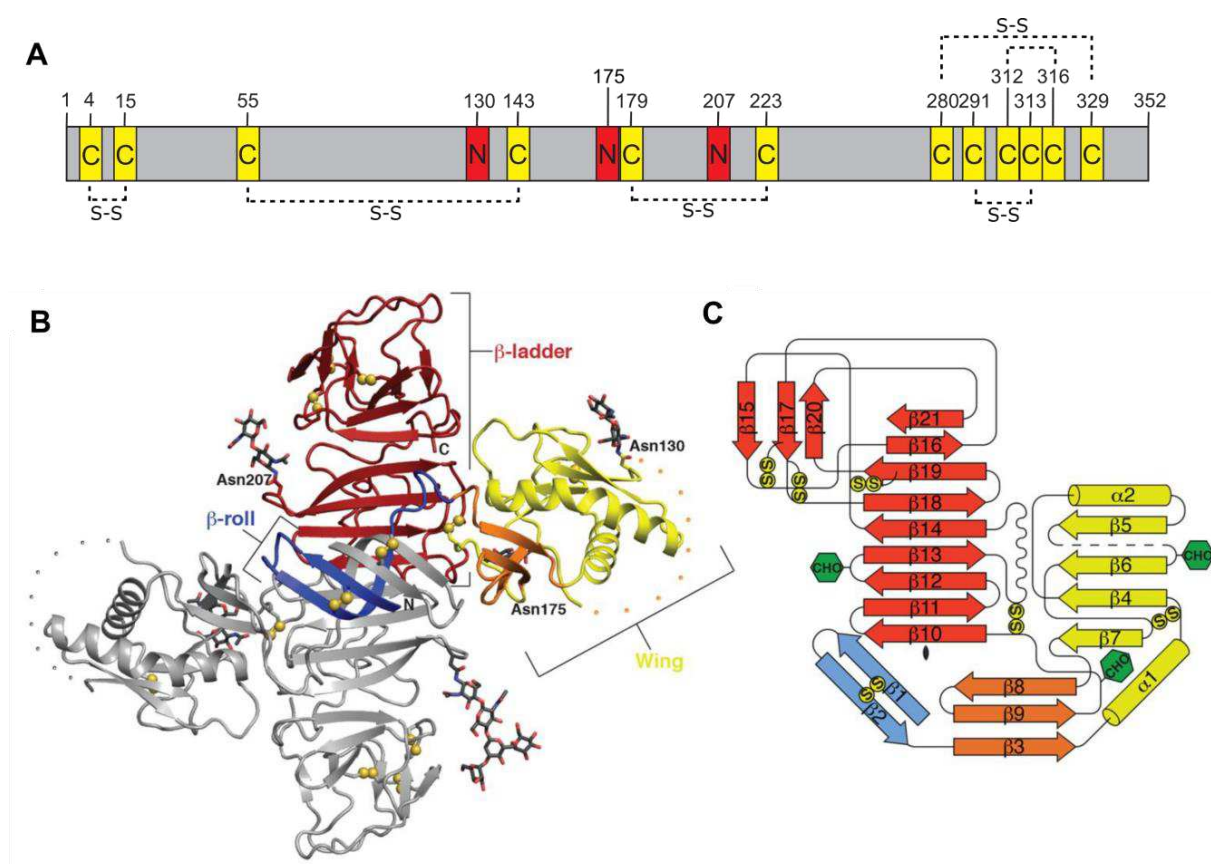


Figura 8. Estructura primaria, secundaria y terciaria de NS1. A. Sitios de glicosilación y puentes disulfuro. El rectángulo del esquema representa la proteína NS1 de 352 aminoácidos. Se señala la posición de los residuos de cisteína (rectángulos amarillos) y se indican las interacciones para formar los 6 puentes disulfuro (S-S). Se indican con recuadros rojos marcados con N los sitios de las asparaginas glicosiladas (Akey *et al.*, 2014b). **B. Estructura cristalográfica del dímero de NS1.** Dímero NS1 con una subunidad en gris y la otra coloreada por dominio (β -roll azul, wing amarilla con subdominio conector naranja, escalera β central roja). Los disulfuros se muestran como esferas amarillas y los sitios de N-glicosilación en negro. Una región desordenada se indica con líneas de puntos. **C. Diagrama topológico del monómero de NS1.** Se representan los dominios, manteniendo los colores, los puentes disulfuro y los sitios de glicosilación. Tomado de Akey *et al.*, 2014a.

Expresión, procesamiento y oligómeros

Durante la traducción de la poliproteína viral, NS1 es translocada al interior del RE mediante una secuencia señal (hidrofóbica) que se localiza en los últimos 24 aminoácidos de la proteína E precedente (**Figura 9, Paso 1**). De esta forma, NS1 se escinde de E en el extremo N por la peptidasa señal del hospedador, y de NS2A en el extremo C por una proteasa celular no identificada. La proteólisis en el extremo carboxilo se da en una secuencia muy conservada entre los flavivirus que corresponde al péptido L/M-V-X-S-X-V-X-A (da Fonseca *et al.*, 2017). El monómero de NS1 contiene 12 residuos de cisteína altamente conservados que forman 6 enlaces disulfuro intramoleculares. La disposición de estos enlaces disulfuro se encuentra resuelta para varios flavivirus (Akey *et al.*, 2014b), con los residuos de cisteína vinculados como se muestra en la **Figura 8.A**. Al menos tres de estos enlaces disulfuro son críticos para el correcto plegamiento de NS1 y posterior maduración, secreción y oligomerización (Wallis *et al.*, 2004).

Después de la traducción y la proteólisis, NS1 es glicosilada en múltiples sitios mediante la adición de carbohidratos con alto contenido de manosa (**Figura 9, Paso 2**). El número de sitios de glicosilación varía según la especie flaviviral. Los virus DEN, YF y JE contienen 2 sitios conservados (residuos de asparagina en las posiciones 130 y 207), mientras que WNV, MVEV y SLEV contienen 3 sitios (un sitio adicional de asparagina en la posición 175) (**Figura 8.A**) (Muller & Young, 2013, Somnuk *et al.*, 2011).

Los monómeros glicosilados de NS1 dimerizan rápidamente, adquiriendo una naturaleza parcialmente hidrofóbica que le permite la asociación a la membrana del RE (**Figura 9, Paso 3**). Estos dímeros son resistentes a los detergentes pero sensibles al calor y al pH ácido (Gutsche *et al.*, 2011).

Se demostró que el dímero NS1 conforma una estructura tipo "escalera" de 18 hojas β centrales (**Figura 8.B**). Cada monómero tiene tres dominios distintos: un dominio de dimerización β -roll corto (aminoácidos 1-29); un dominio "wing" (aminoácidos 30-180) que contiene los sitios de glicosilación y una mezcla de hélices α y hojas β ; y el tercer dominio es una hoja β continua (aminoácidos 181-352). Este último dominio, forma la estructura de la "escalera" central dentro del dímero, cada monómero contribuye con 9 cadenas. El β -roll y una región de conexión dentro del dominio "wing" forman una superficie hidrófoba (**Figura 8.C**) (Akey *et al.*, 2014a).

Después de la dimerización, NS1 cubre tres destinos distintos: los sitios de replicación viral dentro de la célula, la superficie celular y el espacio extracelular. La mayor parte de la NS1 que se mantiene dentro de la célula se encuentra localizada, conjuntamente con las otras proteínas no estructurales y el ARN viral, en las vesículas del RE donde la replicación se lleva a cabo (**Figura 9, Paso 4**); mientras que una pequeña porción es transportada a la membrana externa de las células infectadas (**Figura 9, Paso 5**) (Akey *et al.*, 2014a).

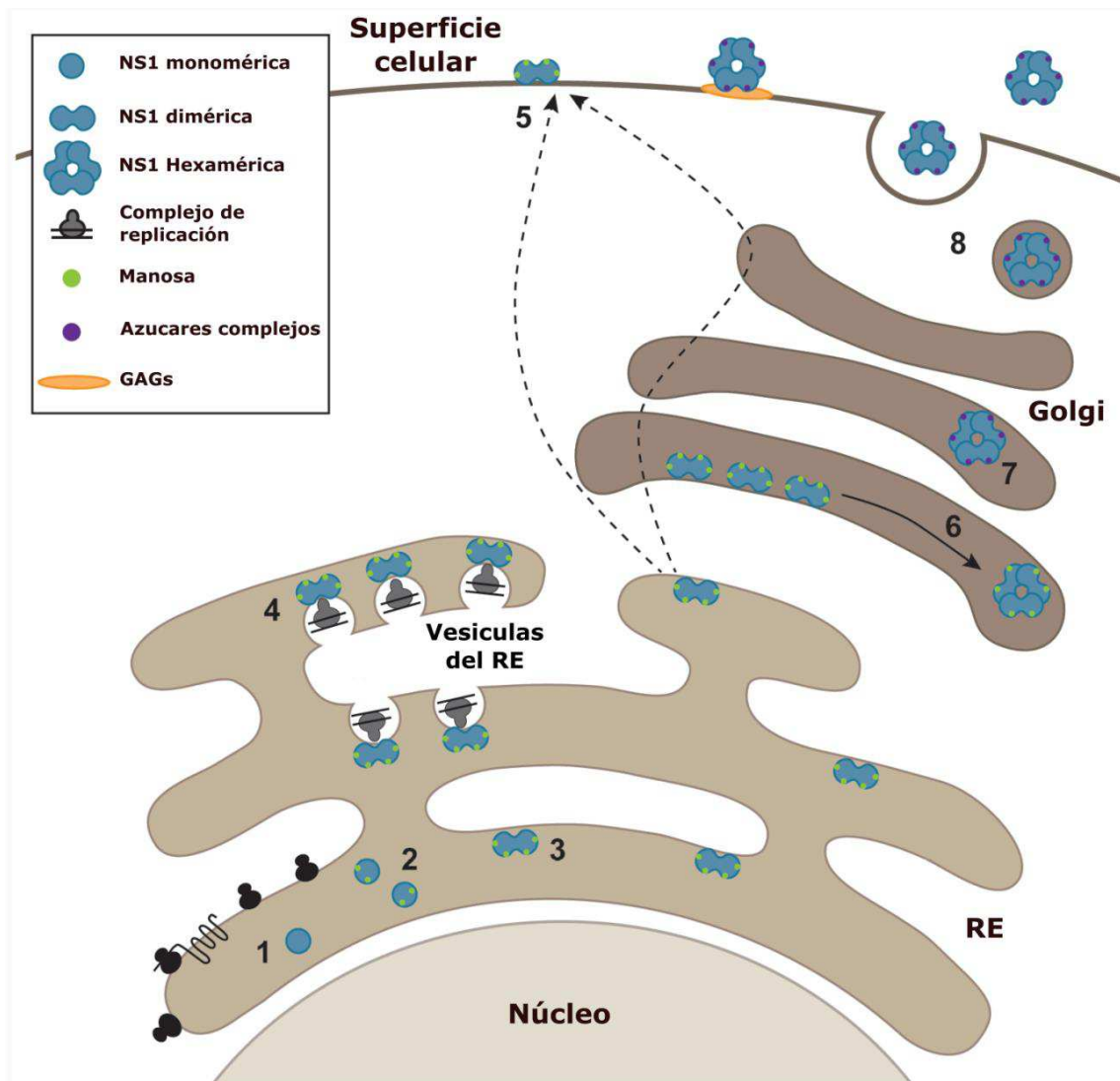


Figura 9. Tráfico NS1 dentro de la célula. Durante la traducción, NS1 se dirige al RE gracias a la presencia de una secuencia señal en el extremo C de la proteína E precedente. NS1 se escinde de los genes E y NS2A adyacentes que forman un monómero (**Paso 1**) que se modifica mediante la adición de carbohidratos con alto contenido de manosa en 2 o 3 sitios, dependiendo del flavivirus (**Paso 2**). Después de la glicosilación, NS1 se dimeriza rápidamente y se asocia con la membrana (**Paso 3**) debido a una naturaleza hidrófoba adquirida. Luego es enviada a tres ubicaciones distintas en las células infectadas. Se envía al sitio de replicación de ARN en vesículas, donde se asocia con otros componentes del complejo de replicación viral (**Paso 4**). NS1 asociado a la membrana también es enviado a la superficie celular por una vía aún no identificada (**Paso 5**). Parte de las NS1 son enviadas a través del Golgi, donde los dímeros se asocian para formar un hexámero soluble (**Paso 6**). Aquí, los carbohidratos ricos en manosa se procesan a azúcares más complejos (**Paso 7**), y el hexámero soluble se secreta posteriormente al medio extracelular (**Paso 8**), donde puede unirse a las células infectadas y no infectadas mediante asociación con glicosaminoglicanos (GAGs). Modificado de Muller & Young, 2013.

Una vez dimerizado, un subconjunto de NS1 se envía al Golgi, donde tres dímeros se asocian para formar un hexámero soluble. Durante el paso a través del Golgi, los carbohidratos son modificados a azúcares más complejos, y posteriormente el hexámero se

secreta (**Figura 9, Pasos 6 y 7**) (Muller & Young, 2013). Se ha detectado que el hexámero de NS1 secretado se une a glicosaminoglicanos (GAG) en la superficie de distintos tipos celulares infectados y no infectados, desde donde puede ser internalizada por endocitosis y se acumula en endosomas tardíos (**Figura 9, Paso 8**). Tanto la función de los hexámeros en superficie de células no infectadas, como la de los acumulados en endosomas aún no está clara, pero podrían favorecer la infección con el virus homólogo. Estudios de microscopía electrónica y modelado 3D demostraron que el hexámero posee una estructura tipo barril con un interior hidrofóbico rico en lípidos (Gutsche *et al.*, 2011).

Se ha demostrado la existencia de una versión alternativa de mayor tamaño que NS1, llamada NS1', la cual es detectada en pacientes durante la infección con virus del grupo antigénico del virus de la encefalitis japonesa. Esta proteína se genera por el corrimiento del marco de lectura ribosomal, el cual permite la incorporación a NS1 de los primeros 52 aminoácidos que corresponden a NS2A. En un trabajo publicado de Melian y colaboradores (Melian *et al.*, 2010), se propuso que NS1' podría tener importancia en el desarrollo de encefalitis en mamíferos infectados, ya que los virus defectivos en ésta ven disminuida su capacidad de invasión al sistema nervioso central.

Participación en la replicación viral

Si bien la función exacta de NS1 en el ciclo de replicación viral sigue sin ser dilucidada, muchos estudios han identificado que NS1 desempeña un papel esencial en la replicación del ARN viral (Youn *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que NS1 co-localiza con el ARN doble cadena, intermediario de la replicación viral (Mackenzie *et al.*, 1996). Sin embargo, dada la ubicación de NS1 en el lumen de la membrana vesicular derivada del RE, se encuentra físicamente separada de la maquinaria de replicación viral y, por lo tanto, es poco probable que contribuya a la replicación del ARN directamente (**Figura 6**). Más bien, se ha sugerido que junto con las proteínas virales transmembrana puede cumplir una función estructural, ayudando a anclar el complejo de replicación a la membrana. Interacciones entre NS1 y NS4A y NS4B han podido ser detectadas, lo cual aporta sostén a ésta teoría (Youn *et al.*, 2012).

Interacción con el sistema inmune

La interacción entre NS1 y el sistema inmunitario del hospedador es conocida ya que, desde su identificación inicial, NS1 se describe como un antígeno soluble fijador del complemento (Brandt *et al.*, 1970a). Esta proteína tiene la capacidad de unirse a varios componentes diferentes de la ruta de fijación del complemento, así como a otras proteínas reguladoras de la célula, ya sea para activar o inhibir el sistema inmunitario del hospedador (Agrawal *et al.*, 2017).

La interacción de mNS1 o sNS1 con anticuerpos α -NS1 lleva a la formación de complejos inmunes los cuales median la activación del complemento por la vía clásica, produciendo la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b-9) y la lisis celular. Este tipo de activación juega un papel clave en el aumento de la patología de la enfermedad observado en infecciones secundarias (Watterson *et al.*, 2016).

Se ha observado que NS1 interactúa directamente con moléculas que forman parte del sistema del complemento, específicamente con el factor H, un regulador de la vía alternativa. Esta interacción conduce a una reducción en la formación de complejos de ataque de membrana en las células y, por lo tanto, protege a las células infectadas de la lisis celular mediada por el complemento. Por otro lado, se encontró que NS1 se une directamente al factor inhibitorio del complemento sp40, que inhibe la formación del complejo de ataque a la membrana. Se propuso que la unión de NS1 produce una reducción en la circulación de sp40 libre y por lo tanto un aumento en la formación de C5b-9 en el suero de pacientes infectados (Watterson *et al.*, 2016).

Mediante análisis de co-precipitación se identificó que sNS1 de DENV puede unirse a la proteína C4 del complemento. Se encontró que esta interacción promueve la proteólisis de C4 a C4a y C4b a través del reclutamiento de una proteasa específica del complemento. Este mecanismo limita la cantidad de C4 disponible y, por lo tanto, protege al virus de la neutralización (Avirutnan *et al.*, 2010).

Además del papel en la ruta del complemento, NS1 también se ha implicado en la inhibición de la señalización de TLR3. Sugiriendo que una inhibición de TLR3 puede contribuir a la patogenicidad viral (Crook *et al.*, 2014).

Si bien NS1 posee una notable diversidad de interacciones con varios componentes de la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador, muchas de estas interacciones son específicas de los distintos flavivirus, sugiriendo que pueden haber desarrollado estrategias divergente para utilizar esta proteína secretada y unida a la superficie celular (Muller & Young, 2013).

Por otro lado, NS1 tendría un efecto sobre el sistema inmune de los mosquitos vectores. La NS1 circulante en la sangre puede ser adquirida por los mosquitos junto con los viriones cuando éstos se alimentan de un hospedador virémico. Un estudio reveló que la NS1 incorporada podría ayudar a los virus a superar la barrera inmunológica intestinal. La proteína NS1 inhibe dos mecanismos antivíricos importantes de mosquitos: la producción de ROS y la vía JAK-STAT, aumentando la efectividad de infección. En consecuencia, la abundante secreción de NS1 puede ser un rasgo evolutivo desarrollado por los flavivirus para adaptarse a múltiples hospedadores (Liu *et al.*, 2016).

La proteína NS1 es secretada por células infectadas por flavivirus, y las formas solubles pueden detectarse en el torrente sanguíneo desde el primer día después de la aparición de

los síntomas hasta el día 9, momento en que se completa la fase clínica de la enfermedad. En una infección secundaria, los complejos inmunes formados por NS1 y los anticuerpos aumentan rápidamente a través de una respuesta inmune de memoria, por lo que el antígeno rara vez se encuentra a los 5-7 días después del inicio de los síntomas (Amorim *et al.*, 2014). Tanto las formas diméricas como hexaméricas de NS1, que se encuentran en la superficie celular y el suero, son altamente inmunogénicas y correlacionan con la severidad de la enfermedad. En el caso de pacientes infectados con DENV, los niveles de proteína soluble han demostrado ser mayor en aquellos con dengue grave que los que poseían la variante más leve de la enfermedad (Paranavitane *et al.*, 2014).

La proteína NS1 se ha explorado previamente como un candidato a vacuna, y tanto la proteína recombinante NS1 como las vacunas de ADN son altamente inmunogénicas y protectoras en modelos de ratones. Sin embargo, no se ha investigado el papel de la inmunidad aportada por los anticuerpos contra NS1 en la protección por vacunación en humanos (Costa *et al.*, 2007, Sharma *et al.*, 2019, Tafuku *et al.*, 2011).

1.3 Especies Virales

1.3.1 Virus de la Encefalitis de Saint Louis

Epidemiología

El virus de la encefalitis de *St. Louis* es un miembro del complejo serológico de la encefalitis japonesa, con lo cual pertenece al grupo de MBFV, específicamente del clado *Culex*, y capaz de causar una enfermedad neurológica grave en los seres humanos. Este virus fue aislado de una suspensión de cerebro de un paciente fallecido y se describió por primera vez en 1933, luego de una gran epidemia de encefalitis en la ciudad de *St. Louis*, Missouri, Estados Unidos (más de mil casos y 225 muertes). A partir de ese momento, este virus ha sido una de las principales causas de epidemias de encefalitis por arbovirus, reportándose alrededor de 5 mil casos desde 1964, hasta la introducción del WNV en el año 1999. La mayor epidemia se dio en el año 1975 en donde se observaron casi 2000 casos en 31 estados norteamericanos. Otros brotes menores se dieron en 1990 con 222 casos, 1995 y 2001 con 70 casos. Como ocurre con muchos arbovirus, estos brotes se producen durante los meses de verano. La actividad intermitente del virus hace que la población humana sea inmunológicamente susceptible, permitiendo así la re-introducción del virus y la ocurrencia de brotes, especialmente en niños y adultos jóvenes (Pierson & Diamond, 2013).

Hasta el año 2005, en el resto de América sólo se habían reportado casos aislados en humanos, sin registros de brotes, reflejando un comportamiento diferente al reportado en Estados Unidos (Spinsanti, 2009). Hay evidencia serológica de actividad viral en muchos

países, algunos de los cuales no tienen registro de aislamientos como Uruguay, Colombia, Venezuela, El Salvador e islas del Caribe. Por otro lado, SLEV fue aislado de humanos en Argentina, Brasil y Panamá, de aves en Brasil, Jamaica, México y Panamá y de artrópodos en Argentina, Brasil, Ecuador, Guatemala, Jamaica, México, Panamá y Trinidad (Reisen, 2003).

El SLEV, en Argentina, es endémico. Acorde con datos serológicos, este virus se distribuye tanto en las provincias subtropicales del norte como en las más frías del sur. La mayor actividad se encuentra especialmente en las zonas subtropicales (Misiones, Chaco, Formosa, Tucumán) y templadas (Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Mendoza, Santa Fe y Santiago del Estero) (**Figura 10.A**). Los períodos de mayor actividad viral se concentran en la temporada estival (meses de febrero y marzo), comenzando la circulación en los meses de noviembre-diciembre (primavera) (Díaz *et al.*, 2008a).

En nuestro país se han aislado un total de 12 cepas desde el año 1963 hasta el 2005. Las fuentes de aislamiento son variadas y abarcan mosquitos (8 cepas), roedores (2 cepas) y humanos (2 cepas), colectadas de diferentes provincias. Las primeras dos cepas aisladas en nuestro país corresponden al año 1963, durante un estudio realizado con sueros humanos de la epidemia de Fiebre Hemorrágica Argentina, que fueron negativos para el virus Junín y que demostraron conversión serológica para el SLEV (Spinsanti *et al.*, 2008). Las dos cepas aisladas de roedores corresponden a los años 1966 y 1967, recuperadas de orina de *Calomys musculinus* (cepa CbaAn9124) y de un *pool* de bazo y cerebro de *Mus musculus* (cepa CbaAn9275). Estos roedores fueron capturados en una zona con pantanos que presentan abundantes aves acuáticas, al sur de la provincia de Córdoba (Spinsanti *et al.*, 2008). Años después, entre 1978-1984, otras 6 cepas fueron recuperadas de mosquitos en la provincia de Santa Fe (Sabattini *et al.*, 1998).

En el año 2002, y desde 1984 sin casos reportados, SLEV re-emerge en Argentina. El primer caso es detectado en la ciudad de Córdoba, coincidentemente con un pico de abundancia de mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Spinsanti & Basquiera, 2003). Luego de dos años donde no se detectó actividad, en el verano del año 2005, ocurre en Córdoba el primer brote de infección por SLEV en Argentina y en Sudamérica. Fueron confirmados 47 casos, de los cuales 9 fueron fatales, correspondiendo 8 de ellos a personas mayores de 50 años. Los pacientes presentaron signos y síntomas que involucraron al sistema nervioso central, incluyendo cefalea, depresión sensorial, desorientación, temblores y cambios en el nivel de conciencia. Además se detectó una asociación entre el aumento de la edad y la severidad de la enfermedad (Díaz *et al.*, 2006). Se analizaron *pooles* de mosquitos locales, lográndose identificar y aislar dos cepas de SLEV, nombradas como CbaAr-4005 y 4006.

En el otoño del 2010, se registraron casos de encefalitis por SLEV en las provincias de Buenos Aires y Córdoba, dándose el primer brote en la ciudad de Buenos Aires con 47

casos sospechosos y 13 confirmados (Ministerio de Salud, 2010, Seijo *et al.*, 2011). Posteriormente, en el 2011 y 2015 se dieron pequeños brotes en las ciudades de San Juan, donde se notificaron 83 casos y se confirmaron 10 (Fabbri *et al.*, 2011); y en la ciudad de Pergamino (Buenos Aires) con 5 casos confirmados, uno de ellos fallecido (Ministerio de Salud, 2015). Desde el inicio de la temporada 2020/2021 se han notificado 13 casos sospechosos de Encefalitis de *Saint Louis* en la provincia de Córdoba pero ninguno ha sido confirmado (Ministerio de Salud, 2020).

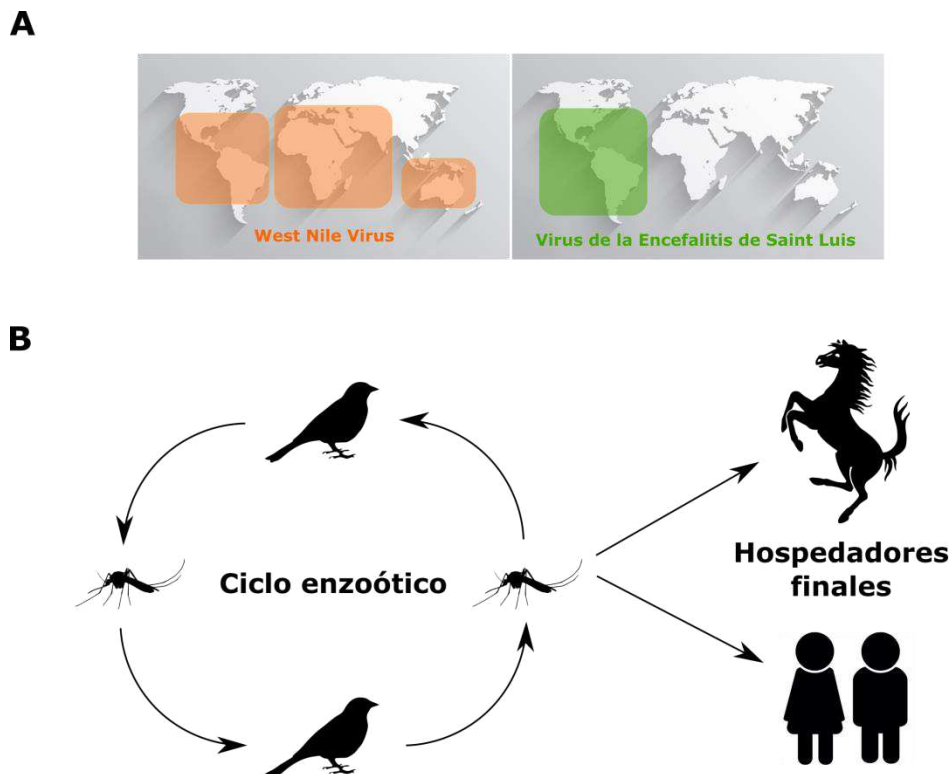


Figura 10. Distribución y ecología de los flavivirus SLEV y WNV. A. Distribución geográfica. Representación esquemática de la distribución geográfica de los flavivirus relevantes para este trabajo. **B. Ciclo de transmisión.** Ciclo de transmisión característico de los virus SLE y WN. Se mantienen en la naturaleza en un ciclo de transmisión enzoótico entre mosquitos y aves. Muchas especies de vertebrados, incluidos los humanos, forman parte únicamente como hospedadores finales, ya que la viremia de bajo nivel resultante no permite infección de nuevos vectores para continuar el ciclo de transmisión.

Ciclos de transmisión

En Argentina los ciclos de transmisión de SLEV se encuentran descriptos. Se han detectado anticuerpos contra SLEV en mamíferos domésticos como caballos, vacas, ovejas y cabras, cumpliendo un rol dentro del ciclo de transmisión como hospedadores terminales. En cuanto a las aves silvestres que actúan como hospedadores enzoóticos de SLEV, se encontraron distintas especies de palomas, horneros, gorriones, jilgueros, tordos y otras aves de áreas residenciales, observando entonces que vectores y hospedadores

amplificadores se encuentran cercanos a la vivienda y a otros sitios con actividad humana (Díaz *et al.*, 2008a). Los pasos de la transmisión estarían integrados por mosquitos *Culex quinquefasciatus* y *Culex interfor* los cuales también formarían parte de la red de transmisión en períodos epidémicos. Otras especies de mosquitos (*Aedes aegypti*, *Aedes albifasciatus*, *Aedes scapularis*, *Anopheles albitarsis*, *Culex apicinus*, *Psorophora spp.*) se han detectado infectadas por el SLEV durante periodos enzoóticos (Díaz *et al.*, 2008a) (**Figura 10.B**).

La infección en las aves usualmente no causa enfermedad aparente, pero si genera viremias de suficiente magnitud como para infectar mosquitos vectores. Cuando se reúnen todas las condiciones que favorecen la transmisión viral (amplificación rápida, acumulativa y con progresivo incremento en el número de infectados, vectores infectivos y hospedadores), puede ocurrir la infección accidental de humanos y otros mamíferos (hospedadores terminales). El hombre y los mamíferos domésticos son excluidos del ciclo básico de transmisión a causa de que los títulos de viremia son insuficientes para infectar mosquitos vectores (Reisen, 2003).

Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas por la infección con SLEV pueden agruparse en tres síndromes: i) encefalitis (incluyendo meningoencefalitis y encefalomielitis): fiebre alta, nivel alterado de conciencia y disfunción neurológica, ii) meningitis: fiebre y rigidez de nuca, y iii) cefalea febril: asociada a vómitos, náuseas, sin signos meníngeos ni alteraciones neurológicas (Pierson & Diamond, 2013).

El período de incubación de la enfermedad varía entre 4-21 días. El inicio se caracteriza por malestar general, fiebre, escalofríos, cefalea, anorexia, náuseas, mialgias, dolor de garganta o tos, seguido (al cabo de 1-4 días) de la aparición de los signos neurológicos o meníngeos. El 80% de las infecciones por SLEV, especialmente en jóvenes o adultos jóvenes, no producen enfermedad clínica, y los individuos infectados raramente experimentan más que un malestar general de corta duración con recuperación espontánea. La severidad de la enfermedad se incrementa con la edad, siendo las personas mayores de 60 años las que tienen la mayor frecuencia de encefalitis (Davis *et al.*, 2008).

En las infecciones por SLEV, menos de 1% de los casos desarrollan manifestaciones clínicas. Las infecciones graves están marcadas por un inicio abrupto caracterizado por cefalea, fiebre elevada, mareos, náuseas y malestar general. La mayoría de los pacientes se recuperan espontáneamente sin embargo algunos desarrollan signos de infección del sistema nervioso central incluyendo rigidez de nuca, confusión, desorientación, temblores, estupor hasta llegar incluso al coma. Aproximadamente el 90% de los adultos mayores que adquieren la enfermedad desarrollan encefalitis. La letalidad oscila entre el 5 y 15% aumentando con la edad (Davis *et al.*, 2008).

1.3.2 West Nile Virus

Epidemiología

El virus de WN integra el complejo antigénico de la encefalitis japonesa, compartiendo características antigénicas y epidemiológicas con el resto de los virus del grupo. A diferencia de SLEV, presenta síntomas y cuadros neurológicos de mayor severidad en caballos. Fue aislado por primera vez a partir del suero de una mujer que presentó síndrome febril, residente del distrito West Nile en Uganda en 1937. Su circulación ha sido descripta en África, Europa, Asia y Oceanía, encontrándose ciclos naturales entre el mosquito *Culex spp.* y aves, e incluso provocando epizootias (caballos y otros vertebrados) y epidemias en Europa, siendo la última, y más importante, en el año 2018 (Haussig *et al.*, 2018). La primera epidemia registrada en América ocurrió en Nueva York en 1999, causando casos fatales de humanos, aves y equinos (Hayes *et al.*, 2005). El virus se expandió rápidamente hacia 4 estados en el mismo año y luego a los 50 estados que conforman Estados Unidos en los años subsiguientes. Desde entonces el virus continuó su expansión afectando desde la región central de Canadá hasta América del Sur (Gubler, 2007).

Estudios sobre la ecología del virus señalan que el mosquito *Culex pipiens* es el vector dominante en las zonas urbanas de Norteamérica. Estos mosquitos producen un cambio en sus preferencias alimenticias (de ave a humano), luego de la época de verano, coincidiendo con la migración de su hospedador principal, el tordo americano (Kilpatrick *et al.*, 2006).

En el año 2001 el WNV se había propagado hacia el sur, probablemente por aves migratorias, llegando hasta las Islas del Caribe, y en 2002 se reportaron infecciones en caballos y aves en República Dominicana y México. Para el 2003, el virus se había dispersado al resto de las islas del Caribe y Centroamérica, y, en 2004 a Colombia y Venezuela (Barrera *et al.*, 2008, Komar & Clark, 2006). En 2009 se reporta por primera vez evidencia serológica confirmada de actividad de WNV en equinos en Brasil (Pauvolid-Corrêa *et al.*, 2011). En 2018 se aisló por primera vez en Brasil el virus a partir de un equino muerto con síntomas neurológicos (Martins *et al.*, 2019) (**Figura 10.A**).

El primer reporte de actividad en Argentina es del año 2006, causando la muerte de tres caballos en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos. A partir de estos casos se logró aislar y caracterizar tres cepas del virus (ArEq001, ArEq002 y ArEq003). Estudios siguientes ubicaron estas tres cepas en un clado juntos con cepas Norteamericanas, mostrando 98-99% de identidad con la cepa de Nueva York (1999) (Morales *et al.*, 2006). Posteriormente, se reportó la detección de anticuerpos específicos en muestras de suero obtenidas en 2005 de pájaros residentes de las provincias de Córdoba, Chaco y Tucumán (Diaz *et al.*, 2008b), marcando posiblemente su introducción al país.

En abril del 2010 se reportó la enfermedad neurológica, y posterior sacrificio, de un equino en la provincia de Córdoba. El análisis de una porción de la secuencia de la proteína E de la cepa denominada ArEq004, al igual que las cepas argentinas previamente caracterizadas ArEq001 y ArEq003, presenta las mutaciones características del genotipo dominante de virus WN que circula en América del Norte, América Central y el Caribe (Fabbri *et al.*, 2012a).

Si bien son pocos los datos disponibles respecto a la actividad de WNV en humanos, al igual que SLEV, se han registrado casos especialmente en las provincias templadas y subtropicales (Córdoba, Entre Ríos, Chaco, Formosa y Buenos Aires) (Artsob *et al.*, 2009). Ninguno de estos casos fue producto de una situación de brote, ya que al parecer este virus no presenta en nuestro país el comportamiento epidémico que tiene en los Estados Unidos, caracterizándose por una marcada actividad enzoótica, amplia distribución geográfica y baja patogenicidad para aves, equinos y humanos (May *et al.*, 2011). Desde el inicio de la temporada 2020/2021 se han notificado casos sospechosos de Fiebre del Nilo Occidental en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Chaco y Corrientes. Todos los casos se encuentran aún en estudio (Ministerio de Salud, 2020).

Ciclos de transmisión

El virus WN se mantiene en la naturaleza a través de la transmisión entre aves y mosquitos, quienes constituyen el ciclo de transmisión enzoótico (**Figura 10.B**). A pesar que ha sido aislado de mosquitos pertenecientes a 12 géneros diferentes, los mosquitos del género *Culex* son los vectores más importantes involucrados en su transmisión, mantenimiento y amplificación (Peña *et al.*, 2005). Las aves del orden *Passeriformes* (gorriones, tordos) son las más susceptibles, desarrollando los más altos niveles de viremia y diseminando altas cantidades de virus en fluidos oral y cloacal, mientras que en otras aves, la viremia y diseminación son generalmente más restringidas.

Se ha demostrado un amplio rango de hospedadores finales, infectando al menos 30 especies diferentes de mamíferos y reptiles, entre los que se encuentran equinos, caimanes, perros, lobos, ovejas, llamas y alpacas; sin embargo, unos pocos animales presentan sintomatología clínica (Peña *et al.*, 2005).

Manifestaciones clínicas

Al igual que para SLEV, la mayoría de las infecciones con WNV son sub-clínicas. Posee un período de incubación de 2-14 días y los síntomas más comunes de la infección incluyen fiebre, mialgias, artralgias, fatiga, migraña y dolores gastrointestinales. Si bien WNV es el agente causante de la fiebre del Nilo occidental, solamente 1 de cada 150 casos desarrollan la forma más severa y potencialmente letal de la enfermedad. Los síntomas como parálisis,

meningitis, encefalitis y complicaciones en la visión marcan la progresión hacia la forma neuroinvasiva de la infección (Donadieu *et al.*, 2013). Se ha demostrado que, al igual que para las infecciones con SLEV, el aumento de la edad aumenta el riesgo de la infección severa, siendo 20 veces mayor en pacientes que superan los 50 años (Diamond, 2009).

1.3.3 Virus Dengue

Epidemiología

La fiebre del dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores más común en humanos, con más de 50 millones de casos en regiones tropicales y subtropicales cada año, aunque la mayoría de las infecciones suelen ser asintomáticas. El registro más antiguo proviene de China y data de 992 años antes de cristo. A finales del siglo XIX y principios del XX el virus se encontraba extendido en los trópicos y subtrópicos, detectándose casos en América, desde Estados Unidos hasta Chile y Argentina (**Figura 11.A**) (Holmes & Twiddy, 2003). Una importante epidemia se dio en nuestro país, los primeros meses del año 1916, con 15,000 casos reportados en la provincia de Entre Ríos (Avilés *et al.*, 1999).

En la década de 1940, la Organización Panamericana de la Salud establece un plan para la erradicación del vector *Aedes*, reduciendo significativamente la cantidad de casos y brotes. De esta manera, entre 1950 y 1970, solo se registraron dos principales epidemias en países que no habían erradicado el vector (Jamaica, Puerto Rico, Venezuela y Haití). El deterioro de los programas de control durante la década de los sesenta condujo a la reintroducción y expansión de la distribución geográfica del mosquito, y a los brotes subsiguientes causados por diferentes serotipos de dengue en varios países de la región. El virus Dengue comenzó a causar brotes en países que habían estado libres de dengue durante décadas o no habían experimentado la enfermedad, como Bolivia (1987), Paraguay (1988), Ecuador (1988) y Perú (1990). Por otro lado, se incrementó la cantidad de los casos más graves de dengue: en Cuba se da la primer epidemia de fiebre hemorrágica por dengue (FHD) reportada en la región (1981) (Brathwaite Dick *et al.*, 2012).

En las siguientes décadas, se reportó un aumento sin precedentes en el número de casos en las Américas, produciéndose epidemias importantes en el año 2002 (un millón de casos), que afectó principalmente a Brasil, Colombia, Venezuela y países de centro América; y 2010 (más de 1,7 millones de casos), reportándose la peor epidemia de dengue en la historia de Colombia y Honduras, y afectando también a Brasil, Venezuela y países del Caribe (Brathwaite Dick *et al.*, 2012). Durante el año 2019 el dengue en las Américas ha alcanzado el mayor número de casos registrados en la historia, con más de 3 millones de casos, incluyendo 22.127 casos graves y más de 1500 muertes (Organización Panamericana de la Salud, 2019a). Hasta mediados del año 2020 se registraron más de 1,5

millones de casos sospechosos de dengue, de los cuales fueron confirmados más de 700 mil casos (Organización Panamericana de la Salud, 2020).

A



B

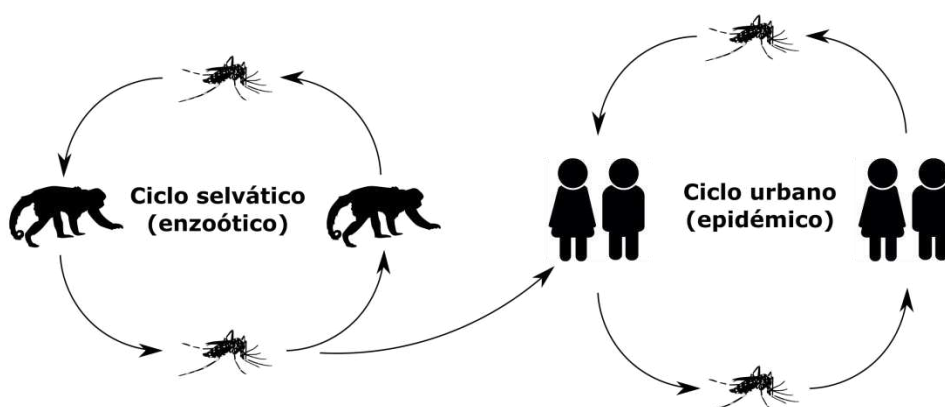


Figura 11. Distribución y ecología de los flavivirus DENV, YFV y ZIKV. A. Distribución geográfica. Representación esquemática de la distribución geográfica de los flavivirus relevantes para este trabajo. **B. Ciclo de transmisión.** Ciclo de transmisión de los virus DEN, YF y ZIK. Se mantienen en la naturaleza en un ciclo de transmisión selvático entre mosquitos y monos. La infección en humanos da como resultado una viremia suficientemente alta para apoyar la infección de nuevos mosquitos y constituir un ciclo de transmisión urbano

La re-emergencia del DENV se detectó en nuestro país en el año 1997 (Avilés *et al.*, 1999), y a partir de dicho momento se registraron brotes epidémicos que afectaron a gran cantidad de provincias del norte de Argentina, con registro de circulación de los cuatro serotipos conocidos. En el año 2009 ocurrió en Argentina un gran brote epidémico que afectó a 14 provincias, principalmente del norte aunque también alcanzó a la ciudad de Buenos Aires, y donde se notificaron más de 25.000 casos (Tittarelli *et al.*, 2014). Sin embargo, durante fines del 2015 e inicio del 2016, otro importante brote epidémico de dengue se registró en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero, Tucumán, Catamarca y La Rioja. En los primeros 4 meses del 2016 en Argentina se notificaron 63.952 casos con sospecha de dengue (incluyendo probables, confirmados, descartados y en estudio). De ellos, 32.985 corresponden a casos confirmados autóctonos distribuidos en 15 jurisdicciones del país (Ministerio de Salud, 2016).

Hasta mediados del 2020 se notificaron al Sistema de Vigilancia de Salud Argentino más de 70 mil casos sospechosos de dengue. El total de fallecidos con pruebas positivas para Dengue es de 25 y se encuentran en estudio 13 casos. Hasta el momento, se registró la presencia de 3 serotipos circulantes: DEN-1 (71%), DEN-4 (27%) y DEN-2 (2%). El número acumulado de notificaciones hasta el momento para la temporada 2019/2020 es entre 7,5 y 9 veces más que lo notificado en las temporadas 2018/2019 y 2017/2018, respectivamente, para el mismo período epidemiológico (Organización Panamericana de la Salud, 2020).

Ciclos de transmisión

El DENV circula en la naturaleza llevando adelante dos ciclos de transmisión distintos vectorizados por los mosquitos de la especie *Aedes* (*Aedes albopictus* o *Aedes aegypti*). La infección por DENV en humanos da como resultado una viremia suficientemente alta como para continuar con la infección de nuevos mosquitos, por lo que los ciclos de transmisión de DENV no requieren un hospedador amplificador enzoótico. Este virus también puede replicarse en un ciclo selvático, se cree que las cepas endémicas/epidémicas evolucionaron a partir de cepas selváticas de Asia o África. Si bien estos ciclos selváticos no se encuentran completamente estudiados, se conoce que mantienen cepas selváticas que no se encuentran adaptadas a infectar humanos (**Figura 11.B**) (Pierson & Diamond, 2013, Weaver & Barrett, 2004).

Manifestaciones clínicas

Los cuatro serotipos son capaces de producir infección asintomática (ocurre en la mayoría de los casos), enfermedad febril y cuadros severos que pueden conducir a la muerte. La forma clásica de la enfermedad (generalmente en adultos jóvenes), se presenta con fiebre alta, cefalea, mialgia, dolor de huesos, rigidez en las articulaciones, erupciones y pequeñas manifestaciones hemorrágicas. La recuperación es completa y sin secuelas. La forma grave (Dengue grave) puede incluir fiebre hemorrágica y el síndrome de *shock* por dengue. Si bien es menos frecuente (se dan en menos del 5% de los casos), es una forma mucho más severa y puede ser mortal. El dengue grave puede ser producido por cualquiera de los tipos virales, pero se produce con más frecuencia en personas que padecieron dengue por un serotipo y posteriormente se infectan con un serotipo diferente. El período de incubación en humanos es de 5 a 7 días, la viremia comienza antes de la aparición de los síntomas y continúa 5-6 días desde el inicio de los síntomas. Los síntomas suelen durar alrededor de 7 días (Narvaez *et al.*, 2011, Pierson & Diamond, 2013).

1.3.4 Virus de la Fiebre Amarilla

Epidemiología

El virus de la Fiebre Amarilla es el más representativo de la familia *Flaviviridae*; su nombre proviene del aspecto que presentan las personas afectadas, producto de la ictericia producida por el daño hepático que pone en evidencia el tropismo selectivo de este virus por el hígado.

Originario de África, YFV fue importado a Europa y América como consecuencia del comercio de esclavos entre estos continentes (**Figura 11.A**). En el hemisferio occidental, tuvo la primera epidemia registrada en Yucatán en 1648. El agente causal de la enfermedad se aisló por primera vez en 1927 de una paciente de Ghana, esta cepa (Asibi YFV) todavía es ampliamente utilizada. En la década de 1930, Max Theiler y sus colegas produjeron una cepa de vacuna viva atenuada, designada 17D, que se atenuó para la enfermedad viscerotrópica en monos y humanos, pero se mantuvo inmunogénica. La vacuna contra YFV utilizada hoy deriva de la cepa 17D original, y Theiler recibió el Premio Nobel por su investigación en 1951. A pesar de la presencia de una vacuna eficaz, se estima que YFV continúa afectando a más de 200,000 personas anualmente en las regiones tropicales de África, América del Sur y América Central (Gardner & Ryman, 2010).

La última epidemia de fiebre amarilla urbana documentada en las Américas ocurrió en 1928 en Río de Janeiro, Brasil. Aunque ha habido informes de casos esporádicos en residentes de áreas urbanas en Brasil (1942), Trinidad (1954) y Bolivia (1999) (Gardner & Ryman, 2010, Monath & Vasconcelos, 2015). Después de no detectarse circulación por casi 40 años, a partir de 2007 comienza un aumento del registro de epizootias de fiebre amarilla, conjuntamente con ocurrencia de casos humanos en Brasil. En 2008, YFV regresó a Paraguay, causando un grupo de casos de fiebre amarilla urbanos en Asunción y otros casos con exposición selvática. En el período 2007-2009 se documentó la reemergencia en Argentina. Durante el verano del año 2007 e inicio del 2009, se registró una epizootia en monos aulladores *A. carayá* y *A. guariba* en las provincias de Corrientes y Misiones y se aisló e identificó YFV en muestras de monos muertos, en 8 casos humanos (uno de ellos fatal) y en mosquitos del género *Sabethes* (Fabbri *et al.*, 2012b, Goenaga *et al.*, 2012, Holzmann *et al.*, 2010, Morales *et al.*, 2008).

En diciembre de 2016, se declaró un brote de fiebre amarilla en Brasil, entre 2016 y 2018 se confirmaron 1800 casos humanos y 570 muertes. Entre 2015 y 2018, Colombia, Perú, Bolivia, Suriname, Ecuador y Guyana Francesa han reportado casos de epizootia y de YFV selvática (Possas *et al.*, 2018).

Ciclos de transmisión

Para el virus de la fiebre amarilla, el ciclo de transmisión en la naturaleza incluye una fase selvática de elevada importancia en las Américas. Este ciclo involucra la circulación entre varias especies de primates no humanos (géneros *Alouatta*, *Cebus* y *Callithrix*), y mosquitos que habitan en los árboles del género *Haemagogus*, el principal vector selvático para YFV en las Américas, específicamente *Haemagogus janthinomys* y *Haemagogus spegazzini*, los cuáles habitan la selva tropical. Los mosquitos *Sabethes chloropterus* ocupan un rol secundario. Los humanos son frecuentemente infectados cuando son picados por mosquitos que previamente se han alimentado de un primate infectado u otro reservorio. De esta forma, los humanos sirven como hospedadores virémicos amplificadores para la transmisión entre humanos a través del mosquito *Aedes aegypti* (fiebre amarilla urbana) **(Figura 11.B)** (Chippaux & Chippaux, 2018, Hamrick *et al.*, 2017).

Manifestaciones clínicas

La presentación de la enfermedad de la fiebre amarilla varía desde una infección subclínica hasta una enfermedad sistémica que incluye fiebre, ictericia, hemorragia e insuficiencia renal. La viremia alcanza su punto máximo 2 a 3 días después de la infección, y los pacientes con casos fatales tienen una duración más prolongada de la viremia que los sobrevivientes (Gardner & Ryman, 2010).

Se describen tres fases de la fiebre amarilla. El primero, ocurre dentro de los 3 a 6 días desde la inoculación del virus por parte del mosquito, durante el cual el virus está presente en la sangre. Se caracteriza por fiebre, malestar general, mialgia generalizada, náuseas, vómitos y mareos, suele durar 3 días y corresponde al pico de viremia. Durante esta fase, los individuos son infecciosos para los mosquitos. La segunda fase se caracteriza por una mejoría de los síntomas, incluida una reducción de la fiebre. Algunas personas infectadas se recuperan en esta fase sin desarrollar ictericia. La tercera fase ocurre en aproximadamente el 15% de los casos y se caracteriza por el retorno y el aumento de la gravedad de los síntomas, fiebre, vómitos, dolor gástrico e ictericia. Esta etapa se asocia con la replicación de YFV en el hígado, la ausencia de viremia y los anticuerpos α -YFV en el suero. A medida que avanza el tiempo, la infección grave por YFV se convierte en una fiebre hemorrágica caracterizada por hepatitis severa, insuficiencia renal, hemorragia, *shock* e insuficiencia multiorgánica. Aproximadamente el 15% de las personas que se infectan desarrollan una enfermedad visceral grave, y en este grupo hay una tasa de letalidad entre el 20% y el 50%. La infancia y la edad avanzada se asocian con una mayor gravedad y letalidad (Barnett, 2007, Pierson & Diamond, 2013).

1.3.5 Virus Zika

Epidemiología

El virus se descubrió accidentalmente en el bosque Zika (Uganda) en 1947, en el curso de la vigilancia sobre fiebre amarilla selvática en primates, y se describió por primera vez en humanos en 1952 en Uganda y Tanzania (Rodríguez-Morales, 2015).

Durante los 60 años posteriores a su descubrimiento, ZIKV siguió siendo un patógeno muy poco conocido, limitado a áreas de África y Asia, y con baja patogenicidad en humanos. En 2007, sin embargo, ZIKV emergió causando un brote de enfermedad febril en las islas Yap en los Estados Federados de Micronesia, donde se identificaron 185 casos, caracterizados por erupción cutánea, conjuntivitis y artralgia. La propagación de ZIKV en toda Oceanía continuó a finales de 2013, causando un estimado de 30 mil casos en la Polinesia Francesa. Durante esta etapa, se detectó una mayor incidencia de síndrome de Guillain Barré y otras complicaciones neurológicas graves, lo permitió la asociación con la infección por ZIKV. En 2014 se expandió al resto de las islas del pacífico (Nueva Caledonia, Islas Cook, Vanuatu, Islas Salomon e Isla de Pascua). En Mayo de 2015, se confirma el primer caso de ZIKV en el continente Americano, más precisamente en Salvador de Bahía (Brasil), y en los meses siguientes es detectado en Colombia, Ecuador, Suriname, Venezuela y Paraguay. El virus se expandió rápidamente por el continente, y para 2017, 48 países (o territorios) de América ya habían reportado casos autóctonos confirmados (**Figura 11.A**) (Chen & Hamer, 2016, Tellechea *et al.*, 2018, Waggoner & Pinsky, 2016). Posteriormente se observó una reducción significativa de la transmisión en los siguientes años (Organización Panamericana de la Salud, 2020).

En 2016 se detectó por primera vez en nuestro país el ZIKV, documentándose un brote en la provincia de Tucumán con 25 casos confirmados, y un caso autóctono de transmisión sexual en la provincia de Córdoba. En el año 2017, se notificaron nuevos brotes en tres provincias del norte del país (Salta, Formosa y Chaco) y el primer caso de síndrome congénito asociado al virus Zika (Tellechea *et al.*, 2018). Hasta mediado del año 2020 se notificaron cuatro casos con sospecha de infección por virus de Zika en el embarazo en Tucumán y en Jujuy, y dos casos de Síndrome Congénito con sospecha de asociación con ZIKV en Jujuy. En todos los casos, el diagnóstico por laboratorio se encuentra en estudio (Ministerio de Salud, 2020).

Ciclo de transmisión

El modo principal de transmisión de ZIKV a los humanos es a través de la picadura de los mosquitos de las especies de *Aedes*, principalmente *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Se cree que el virus posee un ciclo selvático similar al de YFV, y pudo demostrarse que los primates

funcionan como reservorio y que la transmisión a monos *rhesus* es dada a través de la mordedura del mosquito *Ae. aegypti* infectado (**Figura 11.B**). Existen otros medios de transmisión independientes del vector, los cuales incluyen la transmisión materno-fetal, la transmisión sexual y la transmisión a través de transfusión sanguínea (Balkhair *et al.*, 2016, Waggoner & Pinsky, 2016).

Manifestaciones clínicas

El Zika es predominantemente una enfermedad leve o asintomática, que rara vez requiere hospitalización. La presentación clínica de los pacientes con infección aguda por ZIKV suele incluir una combinación de fiebre, cefalea, dolor retro orbital, conjuntivitis, erupción maculopapular, mialgias y/o artralgias. La duración de los síntomas es generalmente de 2 a 7 días, pero la erupción y las artralgias pueden durar dos semanas o más. Las manifestaciones clínicas cambiaron desde el gran brote de la Polinesia Francesa en 2013-2014, cuando se informaron complicaciones neurológicas graves, seguidas de un aumento de las malformaciones congénitas graves en la emergencia en Brasil en 2015. Hacia final de 2016, trece países en todo el mundo habían reportado un aumento en la incidencia de casos de síndrome de Guillain Barré luego de una infección reciente por ZIKV, mientras que la prevalencia de microcefalia en fetos y recién nacidos aumentó notablemente durante 2015-2016 en Brasil, especialmente en la región noreste, donde se informó por primera vez la presencia del virus. Estos descubrimientos llevan a Zika a ser el primer flavivirus en tener efectos teratogénicos y estar asociado a anomalías congénitas (Al-Abdely, 2016, Balkhair *et al.*, 2016, Calvet *et al.*, 2016).

1.4 Diagnóstico de Flavivirus

El diagnóstico de infecciones por flavivirus puede realizarse de manera directa o indirecta. Los parámetros que definen las metodologías a utilizar están dados por el tipo de muestra disponible y los días que han transcurrido desde el inicio de los síntomas.

1.4.1 Métodos de diagnóstico directos

Los métodos directos son aplicados en etapas tempranas, y tendrán la capacidad de identificar al agente infeccioso. Pueden emplearse técnicas de aislamiento viral, detección del genoma viral, así como detección de antígenos. Los flavivirus encefalíticos replican en el huésped y alcanzan un pico del título en la sangre del paciente antes del inicio de los síntomas. El virus se detecta en la sangre hasta aproximadamente 3 días del inicio de los síntomas. Para el caso de DENV, YFV y ZIKV el título de virus en la sangre del paciente

coincide con el inicio de los síntomas, es posible detectarlo en sangre hasta aproximadamente 5 días del inicio de los síntomas y luego disminuye rápidamente por la aparición de los anticuerpos (**Figura 12**) (De Filette *et al.*, 2012, Organización Panamericana de la Salud, 2019b).

Aislamiento viral

El aislamiento viral es la prueba que proporciona el resultado más específico, pudiendo realizarse por inoculación intracerebral en ratones lactantes o en cultivo celular; sin embargo, por su complejidad metodológica así como requerimientos de infraestructura, es poco utilizado como método diagnóstico de rutina, y se recomienda únicamente para estudios de investigación o caracterización complementaria a la vigilancia en salud pública (Muller *et al.*, 2017, Sambri *et al.*, 2013).

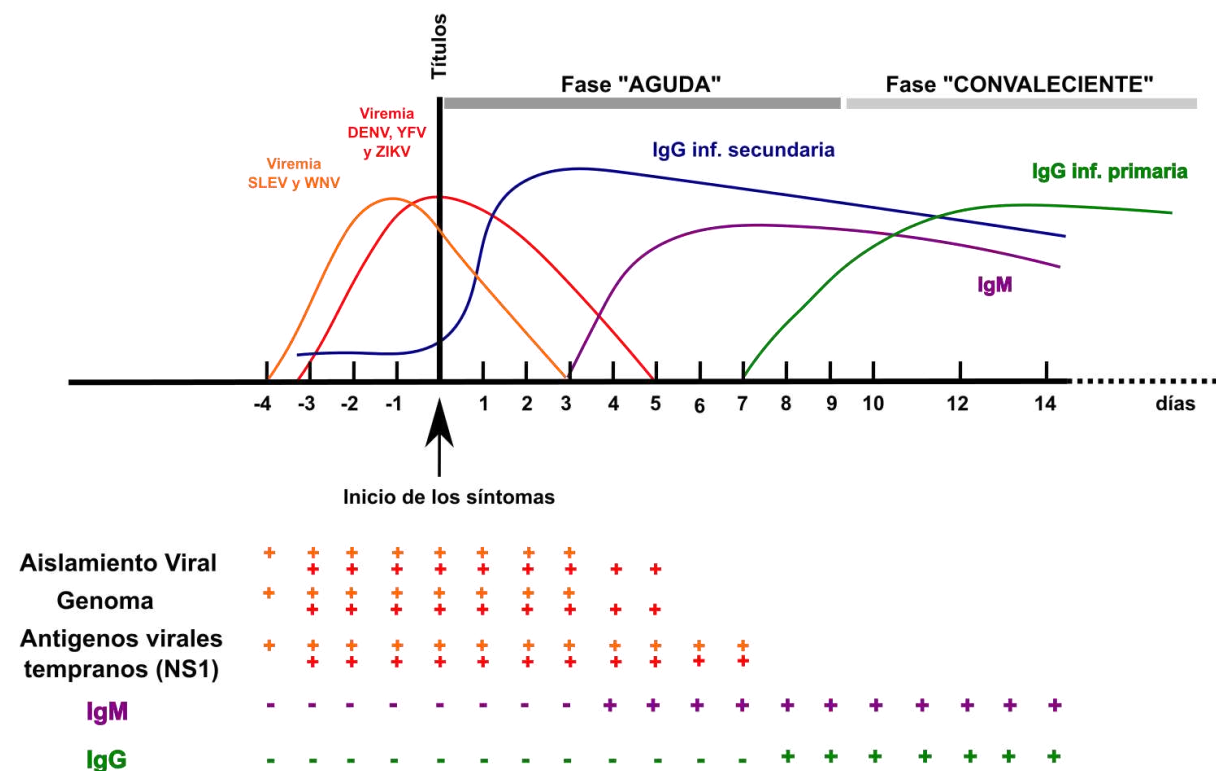


Figura 12. Cinética de genoma viral, antígenos y anticuerpos en la infección flaviviral. El eje x muestra los días de curso de una infección por flavivirus. La etapa de viremia tiene lugar durante la fase aguda de la infección y tiene su máximo con el inicio de los síntomas (día 0) para los virus DEN, YF y ZIK o antes del inicio de los síntomas para los virus encefalíticos. En la fase convaleciente se detectan los máximos de la producción de anticuerpos IgM (curva violeta) e IgG (curva verde). Además, se indica la aparición temprana de IgG en el caso de una infección secundaria (curva azul). En la parte inferior del esquema se indican con signos positivos las técnicas de detección viral (directa o indirecta) que pueden ser empleadas en el curso de la infección. Basado en Adamo & Contigiani, 2010.

Detección de ARN

Durante estos primeros 5 días (fase aguda, período virémico) es posible realizar la detección del ARN viral a partir de una muestra de suero mediante técnicas moleculares como la transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, del inglés *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) convencional o en tiempo real. Existen métodos comerciales disponibles de PCR en tiempo real para WNV, DENV, Chikungunya virus (CHIKV) y JEV, sin embargo, la mayoría de los métodos desarrollados siguen siendo técnicas caseras que ofrecen resultados óptimos de sensibilidad y especificidad dependiendo la región geográfica donde se los utilice y los virus o cepas circulantes (Domingo *et al.*, 2012, Drosten *et al.*, 2002, Eiden *et al.*, 2010, Reddy *et al.*, 2012, Yeh *et al.*, 2010). Los resultados de PCR positivos confirman el diagnóstico, aunque han de ser complementadas con los resultados procedentes de los métodos serológicos, dada la corta viremia que caracteriza a la mayoría de las infecciones producidas por este grupo de virus (Negredo Antón *et al.*, 2013). Aunque los métodos basados en PCR son rápidos y precisos, requieren un laboratorio con equipo especializado y personal capacitado para realizar el análisis. Estas condiciones no siempre son una opción en los sitios donde estos virus son endémicos (Muller *et al.*, 2017).

Detección de antígenos virales

Algunas proteínas virales que se encuentran al inicio de la infección, como NS1, pueden ser detectadas mediante ensayo de ELISA (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*) de captura de antígeno hasta 9 días después de iniciados los síntomas (**Figura 13.A**). Sin embargo, y considerando que se trata de proteínas producidas en una fase temprana de la infección, la mayor probabilidad de detección será entre los primeros 3 a 5 días tras el establecimiento de los síntomas (Lima *et al.*, 2010, Röltgen *et al.*, 2018).

Una limitación de la detección de antígenos para pacientes que experimentan una infección secundaria es el rápido aumento de los anticuerpos de memoria durante la fase aguda de la enfermedad. Estos anticuerpos secuestran los antígenos en complejos inmunes que no pueden detectarse fácilmente en los ensayos de captura. En consecuencia, la cinética de la detección de antígenos en el curso de la enfermedad durante las infecciones secundarias es más corta que la de las infecciones primarias (Muller *et al.*, 2017).

La detección de NS1 en la sangre de paciente se describió por primera vez en el año 2000 (Young *et al.*, 2000). A partir de ello, se han desarrollado comercialmente ensayos de captura de NS1 en formato ELISA y en formato de inmunocromatografía. El desarrollo comercial de NS1 como herramienta de diagnóstico ha revolucionado el diagnóstico de flavivirus, ya que ha proporcionado ensayos simples y con una tecnología que proporciona alta sensibilidad y especificidad (Peeling *et al.*, 2018).

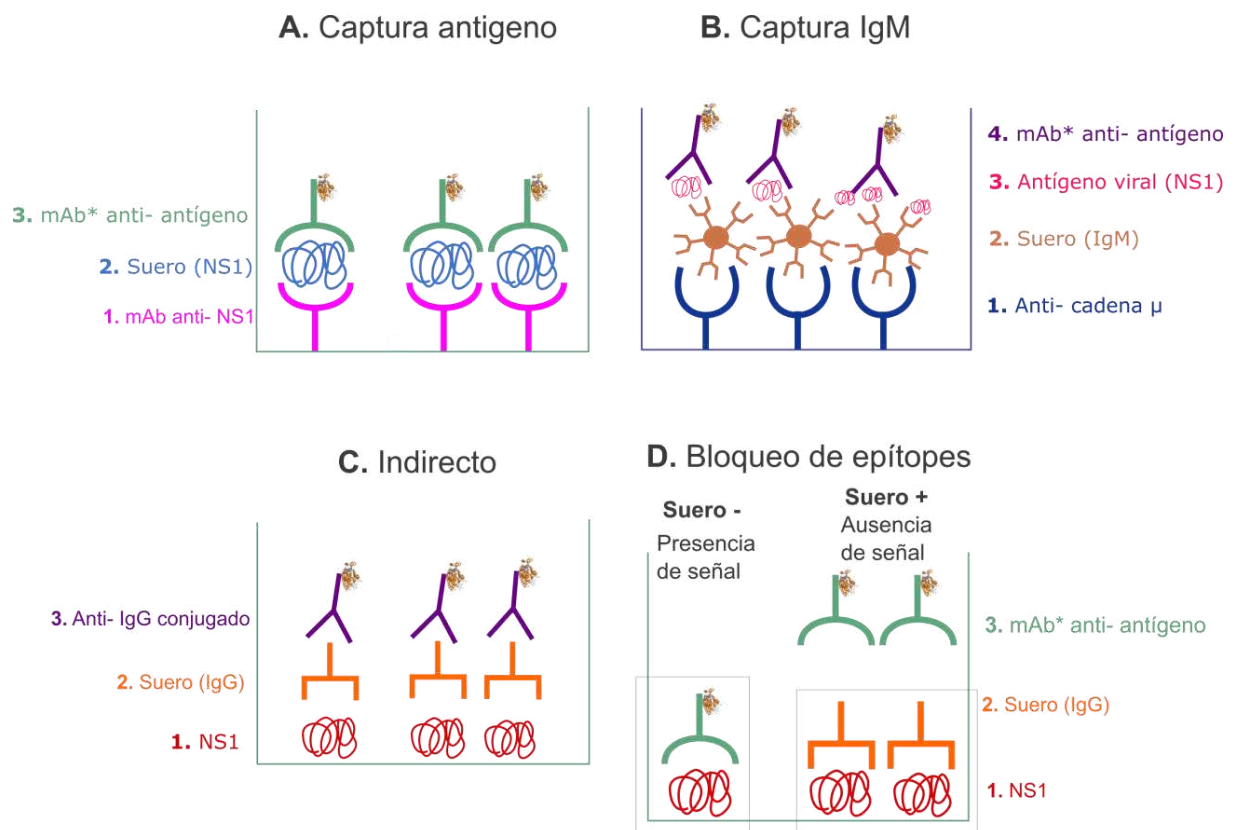


Figura 13. Diferentes esquemas de ensayos de ELISA. **A. Captura de antígeno.** Permite reconocer diferencialmente la proteína NS1, capturada del suero del paciente, mediante la utilización de un mAb específico para cada especie viral. **B. Captura de IgM o MAC-ELISA.** Propone capturar del suero las IgM totales del paciente y luego del agregado del antígeno, éste es detectado con un mAb específico. **C. Indirecto.** El antígeno viral se encuentra fijado a la placa, lo cual permite la captura de las IgG específicas del suero, que luego son detectadas con un anticuerpo α -IgG. **D. Bloqueo de epítopes.** Resulta sumamente útil en vigilancia epidemiológica, ya que permite el empleo de sueros de diferentes hospedadores sin la necesidad de contar con un anticuerpo anti-especie distinto para cada uno.

La detección del antígeno NS1 se utiliza si han transcurrido menos de cinco días desde el momento de la aparición de los síntomas y se puede llevar a cabo con bastante rapidez y a un costo menor que otros métodos como el aislamiento viral o la RT-PCR. De esta forma, existen algunos *kits* de diagnóstico *in house* para distintos flavivirus los cuales se basan en la detección de NS1 en humanos u otros mamíferos, y mosquitos (Ding *et al.*, 2011, Hirota *et al.*, 2012, Qiu *et al.*, 2009, Ryan *et al.*, 2003); y *kits* de diagnóstico comerciales para el virus Dengue pertenecientes a las empresas PanBio Diagnostics (Australia) y Biorad Laboratories (Francia) como los más difundidos. Para el caso de los *kit* comerciales, la mayoría de las evaluaciones indican una sensibilidad moderadamente alta y una especificidad muy alta (> 95%), dependiendo de la especificidad del anticuerpo monoclonal utilizado. También hay pruebas de que la sensibilidad del antígeno NS1 es más alta en infecciones primarias (> 90%) que en infecciones secundarias (60% - 80%) (Chan *et al.*, 2017). Estos *kits*, si bien

poseen una muy buena sensibilidad y especificidad (Lima *et al.*, 2010, Paronavitane *et al.*, 2014, Shenoy *et al.*, 2014), se ven afectados en su sensibilidad dependiendo de la región geográfica de donde se los utilice (Guzman *et al.*, 2010, Yohan *et al.*, 2017).

Si bien un resultado positivo de las técnicas directas confirma la infección, un resultado negativo no es suficiente para descartar un caso sospechoso y debe estudiarse una muestra de suero tomada durante la convalecencia o seroconversión por métodos de diagnóstico indirectos o serológicos (Sambri *et al.*, 2013).

1.4.2 Métodos de diagnóstico indirectos

Debido a las dificultades que presentan los métodos directos, principalmente producto de que el período de viremia es muy corto o que se requiere de la manipulación de virus en recintos de bioseguridad alta, el diagnóstico en humanos depende casi exclusivamente de métodos indirectos. De esta forma, los ensayos serológicos se constituyen como el principal método empleado, permitiendo detectar la presencia de respuesta al agente infeccioso.

La proteína NS1, conjuntamente con las proteínas virales E y prM, es un objetivo principal de la respuesta de anticuerpos en la infección por flavivirus (Wahala & de Silva, 2011). A diferencia de lo que sucede con el antígeno NS1, no se han observado diferencias en los títulos de anticuerpos α -NS1 entre pacientes con infecciones de distintas severidades (Sharma *et al.*, 2019).

La muestra más adecuada para hacer el diagnóstico serológico es el suero, aunque en ocasiones se puede realizar sobre muestra de plasma. Dado el tropismo neurológico de alguno de estos virus (complejo del JEV), la detección de anticuerpos en líquido cefalorraquídeo (LCR) es una herramienta aplicable para confirmar la infección (Adamo & Contigiani, 2010).

En el caso de las infecciones por flavivirus, los anticuerpos IgM aumentan a niveles detectables durante la fase aguda de la enfermedad (**Figura 12**), y son en general marcadores de una infección primaria. En algunos pacientes se detectan cuando aparecen los síntomas, pero en la mayoría aparecen después de los cuatro a seis días posteriores al inicio de los síntomas. La duración de los anticuerpos IgM varía según las infecciones por distintos flavivirus, en general pueden persistir por 60-90 días, aunque se han detectado por mucho más tiempo. Para el caso de individuos vacunados contra YFV, pueden persistir luego de 3 - 4 años (Gibney *et al.*, 2012). En el caso de las infecciones por WNV, estudios realizados evidenciaron que las IgM pueden permanecer en el suero por más de 150 días (Busch *et al.*, 2008), mientras que para SLEV, los anticuerpos IgM pueden persistir en suero hasta un año luego del inicio de los síntomas (Spinsanti *et al.*, 2011).

Los anticuerpos IgG aparecen después de los IgM en las infecciones primarias por cualquier flavivirus (infección en un individuo sin experiencia previa con flavivirus) y persisten de por vida. En las infecciones secundarias se detectan en los primeros días de la infección y con un título mayor (**Figura 12**) (Busch *et al.*, 2008).

Los flavivirus muestran un alto grado de reactividad cruzada, sin embargo la respuesta α -NS1 ha demostrado ser una de las más específicas cuando se intentó diferenciar sueros inmunes de WNV y SLEV (Oceguera *et al.*, 2007). Por otro lado, se demostró que los anticuerpos α -NS1, independientemente del isotipo, tienen una alta reactividad cruzada dentro del complejo del DENV pero una reactividad cruzada baja entre el DENV y los virus YF y WN (Chao *et al.*, 2015). Además, se han detectado en NS1 sitios antigénicos específicos para diferenciar DENV de ZIKV (Stettler *et al.*, 2016).

MAC-ELISA

La determinación de anticuerpos específicos es el método más utilizado para el diagnóstico de estas infecciones. Para el análisis de infecciones recientes se utiliza la técnica de enzimoimmunoensayo de captura de IgM (MAC-ELISA, por la sigla en inglés de *Immunoglobulin M antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay*). Esta técnica consiste en la captura de IgM del suero mediante un anticuerpo α -IgM inmovilizado, seguido de la adición de un antígeno viral y la detección de éste con un anticuerpo monoclonal (mAb, del inglés *monoclonal antibody*) marcado (**Figura 13.B**). El antígeno viral es producido en cerebro de ratón infectado, aunque el uso de antígenos recombinantes específicos, como los epítopes ubicados en la proteína E, las partículas similares a virus de prM y E, las proteínas NS1, 3 y 5 se han propuesto con resultados prometedores para mejorar la estandarización de la preparación del antígeno y reducir los costos de estos ensayos (Hukkanen *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2009).

Se acepta que la detección de una respuesta de IgM es un signo de una posible infección por flavivirus que necesita ser confirmada por otros criterios de laboratorio. Para ello, la técnica de MAC-ELISA suele combinarse con la detección de IgG mediante ELISA indirecto. La seroconversión de anticuerpos IgM o IgG, en muestras de sueros pareadas (período agudo-convaleciente), es el estándar para confirmar serológicamente una infección (Sambri *et al.*, 2013).

ELISA indirecto

La detección de respuesta IgG es un indicador de una infección pasada, o de vacunación según el caso, siendo el marcador de aplicación para estudios de seroprevalencia. La detección mediante ELISA es ampliamente utilizada para la determinación del estado inmunológico en pacientes sospechosos o en poblaciones asintomáticas.

Una limitación importante de estas pruebas es su especificidad clínica restringida debido a reacciones cruzadas entre flavivirus. Por este motivo, se recomienda que la detección de IgG se realice en combinación con el MAC-ELISA en todos los casos sospechosos de infección (Adamo & Contigiani, 2010). En estos casos, y como se mencionó previamente, la confirmación se verifica con la seroconversión de IgM o IgG específica en muestras pareadas (Negredo Antón *et al.*, 2013).

Actualmente, se comercializan *kits* para el diagnóstico basados en la detección de anticuerpos para los flavivirus WN, DEN, YF y JE pertenecientes a las empresas EuroImmun, Focus y PanBio/Alere. Los valores de especificidad y sensibilidad informados para las técnicas de ELISA de IgG más utilizadas son de 92% a 93% y de 95 a 98%, respectivamente. Estos ensayos se encuentran diseñados utilizando extractos de células infectadas, antígeno viral inactivado, proteínas purificadas, partículas virales purificadas o antígenos recombinantes (**Figura 13.C**). El uso de antígenos recombinantes es la aproximación más adecuada para conseguir minimizar las reactividades heterólogas, aunque no las evita totalmente (Negredo Antón *et al.*, 2013). Se carece sin embargo de métodos comerciales para otros flavivirus, para los cuales se realizan reactivos y antígenos caseros que no han llegado a comercializarse por falta de estudios de validación, o variaciones en sensibilidad y especificidad entre diferentes cepas virales (Chao *et al.*, 2015, Lemos *et al.*, 2013, Purdy *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2015).

Por otro lado, existe una variante del ELISA indirecto, llamada ELISA de afinidad, que permite estimar el curso temporal de la infección. Dos métodos de ELISA disponibles comercialmente (Focus Diagnostics y Euroimmun) evalúan la afinidad de la respuesta inmune de IgG durante la enfermedad. En los sueros obtenidos dentro de los primeros 30 días después del inicio de la infección, la afinidad de los anticuerpos IgG fue inferior al 40%, mientras que un índice de afinidad superior al 60% se correlaciona con infecciones que tuvieron lugar al menos 180 días antes (Amaro *et al.*, 2019).

ELISA de bloqueo de epítopes

Una variante técnica de los ELISA para la identificación de IgG es el llamado "ELISA de bloqueo de epítopes". Este ELISA mide la capacidad de los anticuerpos presentes en los sueros para bloquear la unión de un anticuerpo monoclonal o un suero policlonal a la proteína NS1, la proteína E o las partículas virales presentes en extractos celulares de células infectadas (**Figura 13.D**). La ventaja del método es que es independiente de la especie y se desarrolló originalmente para estudios de diagnóstico y prevalencia en animales, permitiendo detectar anticuerpos de flavivirus en varias especies de mamíferos domésticos y aves (Blitvich *et al.*, 2003a, Blitvich *et al.*, 2003b, De Filette *et al.*, 2012). Se

han desarrollado ensayos de ELISA de bloqueo basados en la proteína NS1 que permiten la diferenciación de casos de WNV y JEV en equinos (Kitai *et al.*, 2007).

PRNT

La prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT, por la sigla en inglés de *Plaque Reduction Neutralization Test*) es la prueba más específica (*Gold standard*) que se emplea para realizar la diferenciación de los arbovirus, y es empleada en general para confirmar resultados obtenidos por las técnicas serológicas menos específicas. En este ensayo es necesario conformar un panel con los virus relacionados. Los anticuerpos neutralizantes, dirigidos contra antígenos superficiales de los virus (glicoproteínas de la envoltura o antígenos de la cápside), alcanzan su máximo título entre los 7-10 días después del comienzo de la enfermedad y persisten usualmente toda la vida. De esta forma, se llega a la confirmación serológica mediante la demostración del aumento de estos anticuerpos (diferencia de cuatro veces el título) entre el suero obtenido del paciente en fase aguda y en fase convaleciente de la infección (seroconversión). La presencia de títulos altos de anticuerpos cuando se dispone de una sola muestra puede ser significativa si el tipo infección no es común en la región, y particularmente si las encuestas serológicas demuestran baja o nula prevalencia de anticuerpos contra otros arbovirus que circulen en la población (Adamo & Contigiani, 2010).

Los ensayos de PRNT requieren instalaciones específicas de cultivo celular, controles estandarizados y personal bien entrenado para obtener resultados reproducibles. Estas necesidades específicas para la realización del ensayo de PRNT, lo confinan a los laboratorios de referencia, lo que puede crear un cuello de botella de diagnóstico en situaciones de brote. El tiempo para la interpretación final de los resultados, que generalmente es de 4 a 7 días, retrasa el diagnóstico y no se adapta de la mejor manera a la toma de decisiones durante la respuesta a un brote (Domingo *et al.*, 2018).

La problemática en el diagnóstico de los flavivirus es la reactividad cruzada que presentan los anticuerpos (tanto IgM como IgG) derivada de los epítopes comunes entre distintos virus, serotipos y variantes. Así, una elevada reactividad cruzada ocurre entre virus relacionados (como son los flavivirus) y la identificación del agente infeccioso puede ser dificultosa y depende de la técnica utilizada, así como también de la historia de la infección y del estado inmune del hospedador. Este panorama se ve ampliamente agravado en aquellas regiones donde la circulación de múltiples especies flavivirales ha sido evidenciada.

Una infección primaria con un flavivirus desarrolla una respuesta al virus infectante que puede ser identificada por PRNT. Durante la fase convaleciente de algunos pacientes puede observarse una leve reactividad cruzada que desaparece o disminuye con el tiempo. Sin embargo, cuando el diagnóstico se realiza en muestras de individuos de áreas donde

circulan varios flavivirus, las infecciones secuenciales y/o múltiples son comunes, y la posibilidad de identificar el agente etiológico depende de la capacidad del ensayo para distinguir entre flavivirus antigénicamente relacionados. En estos casos (una persona que posee una historia previa de infección por flavivirus), hay una respuesta caracterizada por un incremento rápido de la IgG y se observa una mayor reactividad cruzada entre virus relacionados (Spinsanti *et al.*, 2011).

Las reacciones serológicas cruzadas deben ser resueltas por titulación comparativa por PRNT con una batería de flavivirus circulantes en la región (por ejemplo, para Argentina: SLEV, WNV, DENV1-4, ZIKV y YFV), y aun así los resultados de infecciones secundarias son de difícil interpretación.

1.4.3 Flavivirus en la región: la vigilancia y el diagnóstico como herramientas centrales

Si observamos la situación actual acerca de la emergencia y re-emergencia de flavivirus en Latinoamérica, podemos ver que es una problemática que se ha complejizado mucho en los últimos años. El escenario epidemiológico atravesado entre los años 2015 y 2018 mostró un aumento en el número de casos, y en la cantidad de localidades afectadas por brotes de dengue en Argentina, la introducción del virus Zika al continente, reportándose casos autóctonos en casi toda América, y la re-emergencia del virus de la fiebre amarilla, causando brotes con más de 500 muertes en Brasil. Esta situación, sumada al constante flujo de viajeros que se dirigen desde y hacia zonas con distinta circulación viral, ha revolucionado el mapa de las virosis arbovirales en el continente americano, poniendo en evidencia la necesidad de contar con herramientas de vigilancia epidemiológica y de diagnóstico confiables y accesibles para todos los países.

Es necesario destacar que para el ensayo de PRNT se emplean como antígenos los virus enteros obtenidos en cultivo celular, lo cual pone en evidencia varias dificultades adicionales: i) la escasa especificidad obtenida en un ensayo donde las proteínas mayoritarias provocan la reactividad cruzada al enmascarar la detección de las proteínas minoritarias (potencialmente diferenciales para cada especie viral); ii) el riesgo biológico que implica la manipulación de virus nocivos para los humanos, aun cuando se cuenten con condiciones de bioseguridad adecuadas; iii) la imposibilidad de producir antígenos para virus o cepas virales que aún no se han detectado en la región, pero que circulan en países limítrofes o cercanos al nuestro (como el virus Rocío en Brasil), debido a la inconveniencia de introducir nuevos agentes infecciosos en nuestro país, con el consecuente riesgo de sesgar el diagnóstico.

De esta manera se pone en evidencia la necesidad de disponer de técnicas específicas para el diagnóstico y la vigilancia que reduzcan el tiempo, la complejidad y el costo que insume la prueba de PRNT.

Actualmente, se tiende al establecimiento de *tests* de diagnóstico rápido (RDT) que puedan proveer diagnósticos más cerca del paciente, en el punto de atención (*Point of Care*, POC) en áreas endémicas. Estos se realizan fuera del laboratorio central, próximos al paciente, con material y equipamiento fácilmente transportable, con resultados disponibles en minutos o en horas. No necesitan personal especialmente entrenado para su realización ni para su interpretación. Las técnicas inmunocromatográficas, también llamadas de flujo lateral, se consideran dentro de los ensayos POC y han sido utilizadas exitosamente para la detección de varios arbovirus en muestras clínicas, saliva u orina (García-Bermejo *et al.*, 2017). Es así que la generación de antígenos que puedan ser utilizados en estas técnicas y ayuden a mejorar los parámetros de especificidad y sensibilidad se vuelve relevante en el contexto de optimización de estos ensayos.

Como puede verse entonces, la proteína NS1 se presenta como un antígeno alternativo a la proteína de la envoltura o el virus entero que tradicionalmente se ha empleado en los ensayos serológicos de diagnóstico, generando diversos inconvenientes en la diferenciación del agente infeccioso debido a la reactividad cruzada que se genera.

Sección II

Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

La producción en forma recombinante de la proteína NS1 de los flavivirus así como sus regiones de mayor inmunogenicidad permite su utilización como antígeno, constituyéndose como herramientas de suma utilidad para el desarrollo de ensayos serológicos que permitan detectar anticuerpos específicos generados ante infecciones flavivirales.

2.2 Objetivo General

Este proyecto se enmarca en la realización de estudios básicos y aplicados sobre la biología molecular de los flavivirus en humanos. A partir de los mismos, se plantea ampliar el conocimiento sobre su naturaleza, y llevar adelante el diseño, la generación y posterior optimización de herramientas moleculares que den lugar al desarrollo de ensayos de diagnóstico para flavivirus basados en la detección de la respuesta inmune en pacientes.

2.3 Objetivos Específicos

- ❖ Predecir las regiones de mayor inmunogenicidad y/o variabilidad en la proteína estructural número 1 (NS1) de los virus SLE, WN, DEN-1, ZIK y YF.
- ❖ Producir en forma recombinante y purificar las proteínas NS1 de SLEV, WNV, DENV-1, ZIKV y YFV, ya sea de forma completa o en porciones en función de la predicción de epítopes inmunogénicos.
- ❖ Caracterizar inmunológicamente los antígenos generados mediante su detección con sueros humanos y su uso como inmunógeno en un modelo murino.
- ❖ Postular a los antígenos recombinantes producidos como base esencial en el desarrollo de un método de detección serológico.
- ❖ Optimizar las condiciones del ensayo de ELISA y realizar pruebas de factibilidad.

Sección III

Materiales y Métodos

En la presente sección, se enumerarán las diferentes técnicas de biología celular y molecular y los insumos empleados a lo largo del trabajo.

Los cultivos bacterianos fueron procesados en un flujo laminar Telstar Clase II (Modelo AV-100, España).

En todos los casos se usaron reactivos químicos de grado analítico. Las esterilizaciones de los diferentes reactivos e insumos fueron realizadas teniendo en cuenta las recomendaciones de los fabricantes. En general, la esterilización por calor húmedo fue realizada en autoclave SMI AVX 90.E (Francia) a 1 atmósfera de sobrepresión y 121 °C, mientras que la filtración se realizó con filtros de 0,22 µm estériles (JET BIOFIL, China).

El agua destilada empleada en la preparación de diversos reactivos fue obtenida con el equipo FIGMAY F.M. 4 (Argentina), mientras que la deionización se realizó con EASYpure RF (Thermo Scientific Barnstead, EE.UU).

Para los distintos protocolos se utilizaron las siguientes centrifugas refrigeradas, dependiendo de los volúmenes a manipular. Para volúmenes de hasta 1,5 ml se utilizó la centrifuga Eppendorf 5415R; para volúmenes no mayores a 50 ml se utilizó la centrifuga Sigma 3-18KS; y para volúmenes mayores a 50 ml la centrifuga Avanti J-26XP de Beckman Coulter.

3.1 Herramientas Bioinformáticas

3.1.1 Alineamientos de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas

Para el análisis de las secuencias y realización de alineamientos se utilizó el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2013, Thompson *et al.*, 1994). Los parámetros usados para generar los alineamientos múltiples fueron los que el programa posee por defecto (DNA *Weight Matrix*: IUB; *Gap Opening Penalty* =15; *Gap Extension Penalty* = 6,66 para el caso de secuencias nucleotídicas y *Protein Weight Matrix*: Gonnet; *Gap Opening Penalty* =10; *Gap Extension Penalty* = 0,1 para el caso de secuencias aminoacídicas).

Las secuencias de los genomas de las cepas virales para el diseño de *primers* se obtuvieron del *Genbank* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.1.2 Manejo de secuencias nucleotídicas y diseño de estrategias de clonado

El manejo *in silico* de las secuencias nucleotídicas se realizó mediante el uso del programa *Clone Manager*, diseñado por la empresa Sci-Ed Software (<http://www.scied.com>). Este programa nos permite simular clonados moleculares y digestiones enzimáticas o buscar marcos abiertos de lectura, así como también obtener mapas gráficos de las

secuencias en donde se indican cada uno de los elementos (genes, sitios de enzimas restricción, ORFs, etc.) De la misma manera, el manejo rápido de secuencias y la posibilidad de editarlas facilita el diseño de *primers* y su posterior verificación mediante la simulación de la amplificación por PCR (por su nombre en inglés, *Polymerase Chain Reaction*).

3.1.3 Diseño de *primers*

Utilizando el alineamiento de las secuencias nucleotídicas de las cepas virales seleccionadas, se diseñaron *primers* que permiten amplificar específicamente el marco abierto de lectura de la proteína NS1 mediante la técnica de PCR. Para el caso de las cepas en las cuales los sitios de inicio y fin de la proteína no se encuentran caracterizados, éstos se determinaron por homología con otras cepas o virus de la familia. Se tuvieron en cuenta los requerimientos que rigen para el diseño de *primers*: composición de GC entre 50-60%; evitar la formación de estructuras por apareamiento de bases dentro del mismo *primer* y entre pares (dímeros), especialmente en el extremo 3'; adecuada temperatura de hibridación; siempre que sea posible conservar una purina en el extremo 3', entre otros. Para el agregado de sitios de restricción se tuvo en cuenta que las secuencias flanqueantes a los mismos fueran las recomendadas por los fabricantes para una mejor condición de corte.

3.1.4 Determinación de las propiedades bioquímicas de las proteínas

A partir de los datos de secuencia aminoacídica, fueron calculados diferentes parámetros bioquímicos empleando la herramienta *ProtParam*, alojada en el *ExPASy Proteomics Server* (www.expasy.org) (Artimo *et al.*, 2012). Los parámetros calculados fueron: número de aminoácidos, peso molecular, pl teórico, coeficiente de extinción y absorbancia.

3.1.5 Perfil de hidrofobicidad

El perfil de hidrofobicidad fue calculado mediante el uso de la escala de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle, en el *ExPASy Proteomics Server* (www.expasy.ch, *Primary Structure Analysis, ProtScan*). Las ventanas utilizadas para realizar este análisis abarcaron 9 u 11 residuos. En la misma, los valores negativos indican una menor hidrofobicidad (**Arg**:-4.500, **Lys**:-3.900, **Asn**:-3.500, **Asp**:-3.500, **Glu**:-3.500, **Gln**:-3.500, **His**:-3.200, **Pro**:-1.600, **Tyr**:-1.300, **Trp**:-0.900, **Ser**:-0.800, **Thr**:-0.700, **Gly**:-0.400), mientras que los valores positivos indican una mayor hidrofobicidad (**Ile**:4.500, **Val**:4.200, **Leu**:3.800, **Phe**:2.800, **Cys**:2.500,

Met:1.900, **Ala:**1.800). Las regiones por encima de 0 son consideradas hidrofóbicas, mientras que por debajo de este valor, son hidrofílicas.

3.1.6 Predicciones de epítopes para células B

Para determinar cuáles son los sitios antigénicos dominantes de las proteínas NS1 utilizadas, se analizaron las secuencias de las cepas empleadas en el servidor de predicción de epítopes para células B perteneciente a *IEDB Analysis Resource* (http://tools.immuneepitope.org/main/html/bcell_tools.html). Para ello se utilizó la herramienta de predicción de epítopes lineales para células B y el método *Bepipred Linear Epitope Prediction*, desarrollado por Larsen y colaboradores (Larsen *et al.*, 2006). Los parámetros para el análisis fueron los provistos por la aplicación. Para este análisis se tuvieron en cuenta solo las secuencias obtenidas que tuvieran al menos ocho residuos aminoácidos.

3.2 Herramientas de Biología Molecular

3.2.1 Cepas Bacterianas

En los experimentos de clonado y manipulación de genes se usó la cepa **TOP10** de *Escherichia coli* (*E. coli*).

Esta cepa posee alta eficiencia de transformación, otorga estabilidad a los plásmidos, y en caso de que los plásmidos posean los elementos para α -complementación, permite la identificación de colonias recombinantes a través de la diferenciación en blancas y azules. Posee resistencia al antibiótico estreptomicina.

Genotipo: *mcrA*, $\Delta(mrr^- hsdRMS^- mcrBC)$, $\Phi 80lacZ(\Delta l)M15$, $\Delta lacX74$, *deoR*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(ara-leu)7697$, *galU*, *galK*, *rpsL(SmR)*, *endA1*, *nupG*. (Casadaban & Cohen, 1980).

Para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizaron las siguientes cepas de *E. coli*:

BL21 (DE3)

Posee una copia cromosomal de la T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*. Esta cepa es adecuada para la producción de proteínas clonadas en vectores de expresión bajo el promotor T7. Es deficiente en las proteasas Lon y OmpT, facilitando la expresión de proteínas heterólogas.

Genotipo: *F- ompT hsdSB(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3) (Wood, 1966).

BL21 (DE3) Rosetta

Cepa derivada de BL21 y diseñada para mejorar la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones de baja frecuencia de uso en *E. coli*. Rosetta posee ARNt para los codones AUA, AGG, AGA, CUA, CCC y GGA en un plásmido resistente al antibiótico cloranfenicol.

Genotipo: F⁻ ompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm (DE3) pRARE (CamR).

3.2.2 Cepas Virales

Se utilizaron cinco cepas para la amplificación de los productos de interés mediante PCR o síntesis química de las secuencias nucleotídicas de NS1.

Para el virus SLE, se utilizó la cepa CbaAr-4005, aislada de mosquitos *Culex quinquefasciatus* en la provincia de Córdoba, durante el brote epidémico ocurrido en el año 2005. Ésta se encuentra descrita en Diaz *et al.* 2006 y su número de acceso del *GeneBank* para la secuencia genómica completa es FJ753286 (Diaz *et al.*, 2011).

Para WNV, se utilizó la cepa argentina ArEq001 aislada de caballos y secuenciada por Morales y colaboradores (Morales *et al.* 2006). El número de acceso para la secuencia de genoma completo en el *GeneBank* es GQ379160.

Para YFV, la secuencia de NS1 se amplificó a partir de cepa vacunal 17D (Stamaril®). Esta cepa se encuentra completamente secuenciada y se puede acceder a partir del número de acceso NC_002031 (Stock *et al.*, 2012).

En el caso de DENV-1 se utilizó la secuencia de una cepa aislada en Hawái en 1944 (número de acceso KM204119). Esta es la cepa de referencia para DENV-1 determinada por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Estas cepas fueron seleccionadas para agilizar el proceso de evaluación regulatoria para los ensayos que buscan licencia (Añez *et al.*, 2016).

La cepa seleccionada de ZIKV corresponde a la cepa epidémica del 2015 que circula de forma autóctona en Brasil. La cepa ZikaSPH2015 se encuentra completamente secuenciada y su número de acceso es KU321639 (Cunha *et al.*, 2016).

3.2.3 Vectores de clonado

pGem-T

El clonado de los diferentes insertos se diseñó inicialmente en el vector pGem-T Easy® (Promega), ya que posee una timidina protruyente en los dos extremos 3', permitiendo incrementar la eficiencia en la ligación del vector con productos de PCR, especialmente con los productos generados por polimerasas que dejan una desoxiadenosina protruyente en los extremos 5', como es el caso de la Taq ADN polimerasa. Además, este vector cuenta con la

ventaja de poseer un sistema de complementación α , lo que permite seleccionar los clones recombinantes a través de la presencia o ausencia de color mediante el agregado del compuesto X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), ampliamente usado como indicador de bacterias transformadas que han captado al vector con el inserto. Se utilizan para este fin células de *E. coli* que no pueden producir la enzima β -galactosidasa. Una vez transformadas, las bacterias que portan el plásmido sin inserto son capaces de producir la enzima β -galactosidasa y pueden por tanto hidrolizar el X-gal presente en el medio, tornándose sus colonias de color azul. Las bacterias que han sido transformadas con un vector con inserto, el cual interrumpe el marco abierto de lectura (ORF, por *Open Reading Frame*) del fragmento α , no pueden procesar X-gal y permanecen con su coloración blanca natural.

El vector posee sitios de reconocimiento para los *primers* universales T7 y SP6 que permiten la secuenciación del inserto clonado, así como un gen de resistencia al antibiótico ampicilina para su selección.

pZErO

El vector pZErO® (Thermo Fisher Scientific) permite la selección directa de los recombinantes positivos mediante la disrupción del gen letal *ccdB*. Este gen letal se encuentra fusionado al extremo carboxi-terminal de LacZ α , corriente abajo del promotor Lac y del operador Lac, por lo cual se expresa constitutivamente en las cepas bacterianas que no expresen el represor lacIq. La proteína CcdB es una potente inhibidora de la ADN-girasa bacteriana (Topoisomerasa II), la cual cataliza el super-enrollamiento positivo del ADN, dependiente del ATP. Los clones recombinantes escapan a la muerte celular porque el fragmento de ADN se inserta de tal manera que interrumpe el marco de lectura de CcdB. Esta estrategia de clonado reduce drásticamente la cantidad de colonias no recombinantes obtenidas.

El vector también posee sitios de reconocimiento para los *primers* universales T7 y SP6 que permiten la secuenciación del inserto clonado, así como un gen de resistencia al antibiótico kanamicina para la selección positiva de recombinantes.

pUC57

El vector pUC57 es un vector de alto número de copias que posee resistencia al antibiótico ampicilina. En este caso, fue utilizado como vector que contiene las construcciones sintéticas.

3.2.4 Cultivos bacterianos

Los cultivos bacterianos se hicieron en medio Luria-Bertani líquido (LB, 5g Extracto de levadura; 10g Triptona; 10g NaCl; H₂O hasta llevar a 1 l) (Luria & Burrous, 1957), adicionando los antibióticos correspondientes para cada caso. Las soluciones madres de los antibióticos se preparan 1000X, para ampicilina la preparación es 100mg/ml en agua; para kanamicina, 50mg/ml en agua; y para cloranfenicol 34mg/ml en etanol. Para los cultivos en placa se agregó agar microbiológico, al 1,5% final. La preparación debe ser esterilizada por autoclavado, previamente al agregado de los antibióticos.

3.2.5 Bacterias electrocompetentes

La transformación de bacterias se llevó a cabo mediante electroporación. La preparación de células bacterianas electrocompetentes se realizó empleando medio de cultivo LB que carece de NaCl. El proceso comienza inoculando este medio de cultivo (500 ml) con bacterias crecidas previamente durante la noche en medio LB con NaCl, y se lo incubaba a 37 °C hasta que se alcance una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0,6 unidades. A partir de este punto todo el proceso se realiza en forma refrigerada. Las bacterias se centrifugan a 5000 xg y se lavan tres veces con agua bidestilada estéril. Se realiza un lavado con glicerol 10% y finalmente el *pellet* se resuspende en 1 ml de glicerol, dividiéndose en fracciones de 100 µl en tubos pre-enfriados estériles, almacenándose a -80 °C.

3.2.6 Purificación de ARN y síntesis de ADN complementario

El ARN del virus SLE, obtenido a partir del lisado de células infectadas, fue provisto por el Laboratorio de Arbovirus y Arenavirus del Instituto de Virología “Dr. Vanella” de la Universidad Nacional de Córdoba. Para ello, un cultivo confluyente de células C636 se infectó con las cepas virales siguiendo los procedimientos estándar llevados a cabo en el laboratorio.

Para el caso del virus de la fiebre amarilla, el genoma se obtuvo a partir del contenido de una dosis de la vacuna Stamaril®.

En ambos casos el material genético fue extraído utilizando el comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen).

El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado por la técnica de transcripción reversa siguiendo las instrucciones del fabricante (SuperScript III, Thermo Fisher Scientific), utilizando hexámeros al azar como *primers*, así como también los *primers* específicos diseñados en este trabajo. En todas las reacciones se empleó el 20% del volumen en el que se eluyó el ARN viral con los *kits* de purificación.

3.2.7 Amplificación de ADN mediante PCR

Las amplificaciones de ADN utilizadas en los pasos de clonado se realizaron en un volumen total de 10 o 20 μ l, utilizando las siguientes concentraciones finales de los reactivos: 1X *Buffer* correspondiente, 1,5 mM $MgCl_2$; 0,2 mM dNTPs; 1 μ M de cada *primer*, 1% DMSO y 0,05 U totales de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq ADN pol, PB-L). En todos los casos el molde representó el 10% del volumen final.

En los distintos casos, se optimizaron las condiciones de reacción, modificando las concentraciones finales de $MgCl_2$ o DMSO. Por otro lado, también se modificó la temperatura de hibridación, así como los tiempos de los distintos pasos del ciclado. El ciclado básico, comienza con una desnaturalización de 94 °C durante 2 min, y luego 35 ciclos que constan de 3 pasos: 94 °C durante 20 segundos, pegado de los oligonucleótidos a una temperatura que varía entre los 45 °C y los 65 °C durante 20 segundos, y por último la extensión a 72 °C considerando que la enzima incorpora aproximadamente 1000 pares de bases por minuto en promedio. El último paso es una extensión final también a 72 °C durante 6 minutos, de manera tal que todos aquellos fragmentos que no estén completos puedan completarse.

En todos los casos se realizó un negativo de la reacción en donde en lugar del molde de ADN se colocó el mismo volumen de agua.

3.2.8 Extracción de ADN plasmídico

Las extracciones plasmídicas se realizaron en forma de minipreparación (miniprep), aplicando la técnica estándar de lisis alcalina (*Solución I*: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM [pH 8,0], EDTA 10 mM; *Solución II*: NaOH 0,2 N, SDS (Dodecilsulfato sódico) 1% (preparada en el momento); *Solución III*: Acetato de K 5 M [pH 4,8]) (Sambrook *et al.*, 1989). El rendimiento y la calidad de las mismas fueron constatados mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8%.

3.2.9 Electroforesis de ácidos nucleicos

Para verificar la presencia e integridad de los ácidos nucleicos en diferentes experimentos, se llevaron a cabo electroforesis (Bio-rad) en geles de agarosa (LE-Agarose 1200, Genbiotech), con *buffer* TAE 1 X (Tris base 0,04 M, Ácido Acético Glacial 1,14 ml/l; EDTA pH 8, 1 mM). Teniendo en cuenta el tamaño de los fragmentos de ADN a separar, se seleccionó el porcentaje deseado para confeccionar el gel de agarosa, siendo mayor el porcentaje a medida que los fragmentos son más pequeños. El método de tinción de ácidos nucleicos usado en nuestro laboratorio es el de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, solución

madre 20000 X, 10 mg/ml). La visualización de los geles se realizó mediante exposición a luz UV (Transiluminator 4000, Stratagene) y la captura de imágenes con un *software* de Kodak. Por otro lado, todas las corridas electroforéticas fueron realizadas con un patrón de peso molecular (PM) de la marca Productos Bio-Lógicos (PB-L), para determinar el tamaño de los fragmentos lineales en las muestras sometidas a análisis.

3.2.10 Digestiones Enzimáticas

Las digestiones con enzimas de restricción (New England Biolabs, Promega, Thermo Fisher Scientific) se realizaron utilizando 2 U finales en las incubaciones durante toda la noche. Se respetaron las recomendaciones del fabricante, utilizando los *buffers* óptimos para cada una de ellas en cada caso. Las digestiones se finalizaron por inactivación de la enzima mediante calor (80°C durante 10 minutos). Cuando fue necesario hacer digestiones dobles en condiciones de reacción incompatibles, las mismas se realizaron de manera secuencial, con una precipitación alcohólica intermedia (ver **3.2.11 Purificación de moléculas de ADN**).

En general, todas las digestiones fueron realizadas en un volumen final de 10 µl, e incubadas a 37 °C.

3.2.11 Purificación de moléculas de ADN

La purificación de fragmentos de ADN que se encuentran en solución, fue llevada a cabo mediante precipitaciones alcohólicas, o utilizando PEG 8000. En el caso de las precipitaciones alcohólicas se llevó el volumen de la muestra a una concentración final de acetato de sodio de 0,3 M y se adicionaron 3 volúmenes de etanol absoluto. Luego de una incubación de 1 hora a -80°C, se centrifugó a 12.000 xg por 15 minutos y se retiró el sobrenadante. El precipitado fue lavado con etanol 70% y resuspendido en las condiciones adecuadas para la siguiente reacción.

En las precipitaciones por PEG 8000 se agregó un volumen de este reactivo (PEG 8000 13% p/v, NaCl 4 M) a la muestra y se incubó por 20 minutos en hielo. Luego de este tiempo se centrifugó a velocidad máxima en microcentrífuga por 15 minutos a 4 °C; se realizaron dos lavados con etanol 75% y se resuspendió en las condiciones adecuadas para la siguiente reacción.

Para la recuperación de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó un método de adsorción del ADN a la matriz de una columna (Gel Extraction, PB-L o QIAquick Gel Extraction Kit, QuiaGen).

3.2.12 Ligaciones

Las reacciones de ligación de los fragmentos de ADN lineal a los vectores fueron realizadas con la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Fermentas), utilizando 1 U por reacción e incubando a 22°C por 2 horas o a 4°C durante toda la noche.

3.2.13 Electroporación y plaqueo

Se utilizó un equipo *E. coli pulser* (Biorad), con una proporción de aproximadamente 5 ng del producto de ligación en 100 µl de bacterias electrocompetentes. Se siguieron protocolos estándar de electroporación (cubeta de electroporación de 2 mm, 25 µF de capacitancia, 2.2 kV de diferencia de potencial y 200 Ω de resistencia). Luego de la electroporación las bacterias fueron incubadas por 1 hora a 37°C en medio líquido LB sin antibiótico. Posteriormente se sembraron en placas de Petri con LB sólido y el antibiótico adecuado.

Además, en el caso de que el sistema utilizado permita utilizar el ensayo de α-complementación es posible discriminar entre los clones transformados con plásmidos sin inserto (α-complementación positiva) de los clones transformados con plásmidos que contienen un inserto foráneo (α-complementación negativa). Para ello, el medio de cultivo se adicionó con el inductor IPTG (Isopropil-tio-α-D-galactósido) y con el reactivo cromogénico, X-gal (5-Br-4-Cl-3-indolil-α-D-galactósido). Así, a las cajas de Petri ya preparadas conteniendo LB sólido con el antibiótico adecuado, se les agregó 40 µl de una solución de X-gal en dimetilformamida (20 mg/ml) y 4 µl de una solución acuosa de IPTG (200 mg/ml).

3.2.14 Selección de clones positivos

PCR de colonias

Mediante un palillo estéril se tomó una muestra de las colonias obtenidas luego de la transformación, y se realizaron estrías en una nueva placa. A partir de estas estrías, se tomó una muestra para ser analizada en grupos de 5 (*pools*), y se colocó en microtubos estériles de 0,5 ml conteniendo 10 µl de H₂O destilada. Estas muestras fueron llevadas a 100 °C durante 10 minutos y luego centrifugadas a velocidad máxima en microcentrífuga durante 5 minutos. La reacción de amplificación se realizó utilizando 1 µl del sobrenadante como molde en 10 µl de volumen final de mezcla de reacción, empleando en ocasiones *primers* específicos, universales (**Tabla 1**) o combinaciones de los mismos.

Los *pools* que presentaron amplificación del fragmento de interés fueron analizados individualmente en una nueva reacción de PCR, permitiendo así seleccionar las colonias positivas individualmente.

Nombre	Secuencia (5'-3')
M13F	gTAAACgACggCCAgT
M13R	gCggATAACAATTTACACAgg
SP6	ATTTAggTgACACTATAg
T7	AATACgACTCACTATAg
T7 Promoter	TAATACgACTCACTATAggg
T7 terminator	gCTAgTTATTgCTCAgCgg

Tabla 1. Listado de *primers* universales utilizados en diferentes reacciones de secuenciación así como de identificación de clones positivos.

Eckardt

Mediante un palillo estéril se tomó una muestra de la estría de la UFC de interés, y se colocó en microtubos estériles de 0,5 ml. Se le agregaron 16 µl por tubo de *Buffer* de Lisis (40 volúmenes solución II miniprep, 11 volúmenes de agua, 9 volúmenes del *buffer* de siembra Azul de Boromofenol que contiene *Bromophenol Blue* 0,5% y Glicerol 50% en TAE 1X). Luego se le adicionaron 3 µl de la Solución III de miniprep y se centrifugaron cuatro minutos a velocidad máxima en microcentrífuga. El sobrenadante obtenido se sembró en un gel de agarosa al 0,8%. Para detectar la presencia de clones recombinantes que posean el inserto de interés se analizó el retardo en la electroforesis en comparación con el plásmido de clonado sin inserto.

Perfil de digestión

Los plásmidos que presuntamente contienen el inserto de interés fueron analizados mediante mapa de restricción. Para ello, se los trató con enzimas de restricción específicas para producir fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Los fragmentos de restricción se separan mediante electroforesis en geles de agarosa, y esto proporciona un patrón de bandas que diferencia al plásmido sin inserto y a los plásmidos con insertos incorrectos.

La identidad de los clones seleccionados fue confirmada mediante secuenciación automática (Macrogen, Korea), ya sea con *primers* universales (**Tabla 1**) o *primers* específicos.

3.3 Expresión de Proteínas

La expresión de una proteína recombinante en un huésped bacteriano como *E. coli* resulta de gran utilidad, debido a la practicidad de manipulación del mismo, y a los bajos costos de producción que ofrece. Si bien las proteínas expresadas poseen distintas modificaciones post-traduccionales a las que sufrirían en un huésped eucariota, el producto

obtenido es utilizable en la producción de anticuerpos, ya sea contra epítopes secuenciales o conformacionales que no involucren residuos glicosilados o con otro tipo de modificación post-traduccionales exclusivas de células eucariotas.

3.3.1 Vectores de expresión

pET-22b(+)

El vector pET-22b(+) (Novagen) fue el seleccionado para generar algunas de las proteínas recombinantes. Éste posee una región promotora reconocida por la T7 ARN polimerasa, de manera que cuando esta proteína es expresada desde el cromosoma bacteriano, se genera la expresión de la proteína codificada en el vector. Además posee una secuencia de 6 residuos de histidina que permite su fusión por el C-terminal del inserto clonado. Permite la fusión con una señal de transporte a periplasma desde el extremo N, aunque ésta no fue utilizada en el proyecto debido a que reduce el nivel de expresión de la proteína de interés. También posee sitios de reconocimiento para los *primers* universales T7 promotor y T7 terminador que permiten la secuenciación del inserto clonado, así como un gen de resistencia al antibiótico ampicilina para la selección positiva de recombinantes

pET-28a(+)

Al igual que pET-22b, éste vector posee la región promotora reconocida por la T7 ARN polimerasa permitiendo la expresión de la proteína codificada en el vector. El vector pET-28 permite la fusión con secuencias correspondientes a 6 histidinas en ambos extremos (extremo 5' y 3') del inserto clonado. A diferencia del pET-22 este plásmido posee resistencia al antibiótico kanamicina.

3.3.2 Ensayos de inducción y optimización de la expresión en bacterias

Se inocularon 5 ml de medio LB conteniendo el antibiótico correspondiente con las bacterias conteniendo los plásmidos recombinantes y se incubaron toda la noche a 37 °C en agitador orbital a 200 rpm. A partir de ese cultivo madre se inocularon 10 ml de medio LB realizando diluciones 1/50 y bajo las mismas condiciones de incubación. La mitad del cultivo se indujo con IPTG, mientras que la otra mitad se mantuvo como control sin inducir. El momento de la inducción, definido por la medida de la DO_{600 nm}, la concentración de IPTG utilizada, tiempos y temperaturas de expresión fueron evaluados. Por otro lado se verificó la posibilidad de utilizar lactosa en lugar del inductor IPTG. Las condiciones estándar de los ensayos se basaron según lo detallado en Das *et al.*, 2009, en donde la inducción se realiza con 1 mM de IPTG cuando el cultivo alcanza las 0,6 unidades de DO_{600 nm}. Una vez

realizada la inducción, se realiza la incubación del cultivo por un lapso de cuatro horas, y todo el proceso se realiza a 37°C con agitación constante de 200 rpm. Todas las medidas de absorbancia, a una longitud de onda de 600 nm, se realizaron con el espectrofotómetro Smartspec 3000 (Bio-Rad). Para el análisis mediante SDS-PAGE se tomaron alícuotas de cada cultivo correspondiente a 0,2 unidades de DO_{600nm} de manera de sembrar siempre la misma cantidad de células.

3.3.3 Escalado de los ensayos de expresión

Una vez determinadas las condiciones óptimas de expresión se ensayaron dos opciones de escalado, por un lado realizadas en Erlenmeyer y por el otro realizadas a nivel fermentador.

Para los cultivos en Erlenmeyer, 100 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente se inocularon con 2 ml de un cultivo crecido durante la noche. La etapa de crecimiento y la etapa de inducción se llevaron a cabo con el cultivo a 37 °C y 200 rpm. Cuando la DO_{600} del cultivo llegó a 0,6 unidades, las células fueron inducidas con IPTG y se dejaron el tiempo correspondiente para la expresión de la proteína recombinante. Finalmente, las células fueron cosechadas para su ruptura.

Por otro lado, se realizaron ensayos preliminares a escala fermentador. Para ello, se utilizó un biorreactor de 5 L de capacidad máxima (Bioflo 3, New Brunswick-Scientific), en las condiciones estándar de cultivo. El fermentador, conteniendo LB con el antibiótico correspondiente, se inoculó con el 2% de su volumen de un cultivo de *E. coli* recombinante (previamente incubado ON a 37 °C y 200 rpm). Durante la etapa de crecimiento y la etapa de inducción, el cultivo se lleva a cabo a 37 °C. El nivel de espuma se controló mediante el agregado de antiespumante al medio y el nivel de oxígeno disuelto se reguló mediante el control de agitación. Los parámetros del fermentador se midieron con los accesorios necesarios para la medida y el control automático de pH (Mettler Toledo) y monitoreo de O_2 disuelto de tipo polarográfico (Mettler Toledo). Las medidas del contenido en O_2 y en CO_2 de los gases de salida fueron realizadas mediante un detector de tipo paramagnético y de un detector infrarrojo (Servomex, UK), respectivamente. Se tomaron volúmenes de 15 ml de muestra del biorreactor, de los cuales 10 ml se usaron para medir biomasa (peso seco), y el resto se centrifugará a 5000 g (10 min, a 4°C). Las diferentes fases recuperadas se guardaron a -20°C para la realización de la determinación de producto generado mediante SDS-PAGE. Las células obtenidas, luego del tiempo de expresión fueron cosechadas para su ruptura.

3.3.4 Electroforesis de proteínas

La expresión proteica fue corroborada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% o 15%. Se utilizó el sistema de *buffer* Tris-Glicina (25 mM Tris base; 250 mM Glicina pH 8,3; 0,1% SDS) en el equipo *Mini PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad). Las muestras, correspondientes a 0,2 unidades de DO_{600nm} y provenientes de los cultivos bacterianos, fueron centrifugadas durante 1 minuto a velocidad máxima en una microcentrífuga (Centrifuge 5415-R, Eppendorf). Al precipitado obtenido se le agregaron 5 µl de *buffer* de siembra (4X: 200 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,4% Bromophenol Blue; 40% Glicerol; 8% SDS; 400 mM DTT) y se completó a 20 µl con H₂O, llevando a 100°C durante 10 minutos. Luego se realizó una nueva centrifugación a velocidad máxima por 5 minutos. El volumen total fue analizado mediante la electroforesis. El revelado de los geles se realizó con la solución de tinción (0,25% p/v *Coomasie brilliant blue R-250*; 45% v/v Etanol; 10% v/v Ácido acético glacial) a temperatura ambiente durante una hora. Para desteñir los geles se empleó una solución de destinción con 30% etanol y 10% de ácido acético glacial.

En todas las electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE se utilizaron marcadores de peso molecular *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific). Si bien las condiciones de corrida utilizadas pueden variar según el tamaño de las proteínas a resolver, en general fueron a 25 mA constantes por 40 minutos.

Todas las soluciones corresponden al sistema Laemmli y fueron preparadas según los protocolos descriptos en Sambrook *et al.*, 1989.

3.4 Purificación de Proteínas

3.4.1 Ruptura celular

Se realizaron dos variantes de ruptura celular dependiendo del volumen de cultivo inicial. En el caso de los cultivos provenientes de Erlenmeyer, generalmente no mayores a 100 ml, la ruptura se realizó mediante ultrasonido. Para ello, las bacterias se cosechan (10 minutos a velocidad máxima) y se resuspenden en 15 ml de *buffer* de ruptura (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 5 mM Imidazol, pH 8). En el protocolo de sonicado (Vibra Cell VCX 130 PB, Sonics) la muestra es sometida a 8 ciclos que constan de 1 minuto encendido (300 joules de energía entregada) y 3 minutos apagado.

Para el caso del cultivo proveniente del fermentador (3,5 litros), la ruptura se realizó mediante el uso de la prensa de French (FA-032, Thermo Electron Corporation) y para ello el volumen total del cultivo se centrifugó y las bacterias se resuspendieron en 40 ml de *buffer* de ruptura. Estos 40 ml fueron divididos en dos fracciones idénticas, y cada una de las mismas fue sometida a 4 ciclos de ruptura a una presión de 1000 psi.

Posteriormente a la ruptura, las muestras se centrifugaron a velocidad máxima durante 15 minutos a fin de separar la fase soluble de la insoluble. Ambas fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE.

Tanto los procesos de ruptura como las centrifugaciones se realizan en frío para evitar desnaturalización por aumento de la temperatura y proteólisis.

3.4.2 Solubilización de cuerpos de inclusión

Luego de la ruptura, la fase insoluble fue separada del sobrenadante mediante centrifugación. El sobrenadante se encuentra formado por las proteínas solubles en *buffer* de ruptura y se guarda para su análisis mediante SDS-PAGE. La fase insoluble contiene restos celulares y los cuerpos de inclusión formados por la proteína recombinante. El proceso de solubilización de los cuerpos de inclusión se realiza utilizando el *buffer* A desnaturalizante (fosfato de sodio 20 mM, 8 M urea, 0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,4) que contiene el agente caotrópico urea. La fase insoluble se resuspende en 15 ml *buffer* A y se incuba a 4 °C durante toda la noche con agitación. Posteriormente, se centrifuga en frío durante 15 minutos y se colecta el sobrenadante conteniendo las proteínas solubilizadas para su análisis por SDS-PAGE o para su purificación.

3.4.3 Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad se basa en la unión reversible de una proteína a un ligando unido a una matriz. El ligando puede unirse de manera directa a la proteína de interés o a través de un marca molecular que se encuentre ligada a la proteína. La cromatografía de afinidad es, en general, la técnica de purificación más robusta y puede ser el único paso requerido para lograr un grado de pureza adecuado, dependiendo de la aplicación que se le quiera dar a la proteína de interés (Ritchie & Carbajal, 2012).

El proceso de purificación de las distintas variantes de NS1 completas se realizó mediante el sistema de FPLC automatizado *ÄKTA Prime Plus* (GE Healthcare). La purificación mediante esta tecnología permite el análisis a tiempo real del proceso gracias a que el *software* asociado al equipo va construyendo un cromatograma en base a valores de conductividad, pH y absorbancia a 280 nm de los volúmenes eluidos de la columna de purificación. Así, es de esperar que un pico a 280 nm de en la curva del cromatograma esté directamente relacionado con la elución proteica.

Las columnas utilizadas en el equipo son las columnas HisTrap FF (1 ml, GE Healthcare). En éstas, el ligando es el Ni⁺² inmovilizado en la matriz de sefarosa, mientras que la interacción se produce a partir de las secuencias de 6 histidinas fusionadas a las proteínas.

Para este tipo de cromatografía se elución se realiza a través del agregado de un competidor, en este caso imidazol (Sigma-Aldrich).

El lavado inicial y el equilibrado de la columna se realizan con un flujo de 1 ml/min y constan de 5 volúmenes de columna (VC) de H₂O y 10 VC de *buffer* A desnaturalizante. Los 15 ml de muestra, proveniente de los cuerpos de inclusión solubilizados, son filtrados con filtro de jeringa de 0,45 µm (JET BIOFIL) y posteriormente son inyectados en la columna, a un flujo de 0,5 ml/min, utilizando *buffer* A desnaturalizante. Se realizan dos inyecciones de 7,5 ml cada una. Luego de un lavado de 10 VC con *buffer* A desnaturalizante, se realiza la elución con 10 VC de *buffer* B desnaturalizante (fosfato de sodio 20 mM, 8 M urea, 0,5 M NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4). Finalmente, la columna se lava con 10 VC de H₂O, 10 VC de etanol y se almacena a temperatura ambiente. Todas la etapas del proceso se realizan a un flujo de 1ml/min, menos etapa de inyección de la muestra que se produce a 0,5 ml/min, para favorecer la interacción proteína-matriz.

Para la purificación de las proteínas constituidas por las regiones inmunogénicas de NS1 (EPS_{SLEV} y EPS_{flavis}), se realizó una variante al protocolo utilizado para las versiones de NS1 completas. Luego de la inyección de la muestra (15 ml) y del lavado con *buffer* A desnaturalizante (10 VC), se realiza un gradiente de 30 ml a 0,5 ml/min en donde se intercambia el *buffer* A desnaturalizante por *buffer* A nativo (misma composición, sin urea). Luego las proteínas son eluidas con 10 VC de *buffer* B nativo. De esta manera se obtienen las proteínas en un *buffer* que no posee el agente caotrópico.

Se tomaron muestras de todos los pasos del proceso para su análisis mediante SDS-PAGE. Todas las soluciones que se utilizan en el ÄKTA Prime Plus deben ser previamente filtradas con filtros Whatman no estériles de 0,45 µm (GE Healthcare).

3.4.4 Replegado

Un proceso de eliminación de las condiciones desnaturalizantes fue diseñado para posibilitar el trabajo con las proteínas en *buffer* nativo. Una fracción de proteína NS1 purificada bajo condiciones desnaturalizantes fue sometida a un proceso de disminución de la concentración de urea mediante dilución. Para ello, haciendo uso del FPLC ÄKTA Prime se le adicionó *buffer* A nativo a un flujo de 0,1 ml/min de manera de diluir la muestra 10 veces. El proceso se realiza en agitación continua y en hielo. Finalmente, el volumen obtenido se concentra al volumen con un concentrador de tubo cónico (Merck Millipore) con membrana de tamaño de corte de 3 kDa.

Este protocolo fue adaptado de procesos existentes para otras proteínas insolubles generadas en bacterias (Amorim *et al.*, 2010, Singh *et al.*, 2015, Yamaguchi & Miyazaki, 2014).

3.4.5 Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método de Bradford, el cual consiste en una medición colorimétrica de la cantidad de proteína soluble. Para esto, se realiza una dilución 1/5 del reactivo de Bradford (Bio-Rad) y se filtra utilizando papel Whatman. En una poli cubeta de 96 pocillos se colocan 200 μ l del reactivo diluido, a los que se agregan 10 μ l de muestra. Luego de incubar 15 minutos a temperatura ambiente se procede a la medición de absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro Cytation 5 (BioTek). Para que la medición pueda ser cuantitativa, la misma debe contrastarse con una curva de calibración. Esta es construida a partir de diluciones seriadas de un *stock* de una proteína patrón de concentración conocida, como por ejemplo albúmina bovina 1 mg/ml.

3.5 Ensayos y Métodos Inmunológicos

3.5.1 Inmunodetección (Western Blotting)

Una vez realizada la electroforesis gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), empleando en esta oportunidad el marcador de peso molecular *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific), se procede a la transferencia sobre una membrana de PVDF (Amersham Hybond, GE Healthcare) previamente activada en metanol absoluto durante 10 minutos, utilizando el equipo de transferencia semi-seca de Bio-Rad (Trans-Blot SD, Semi-dry Transfer Cell). Finalizada la transferencia se realizó una tinción del gel con la solución de *Coomassie Blue*, con el objeto de verificar la eficiencia del proceso. La membrana luego fue bloqueada en *buffer* fosfato salino (PBS) 1X (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 3,63 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O; 0,24 g KH₂PO₄; pH 7,4) conteniendo 1% de caseína, durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo primario, 1% caseína y 0,1% *Tween 20* en PBS 1X por 1 hora a 37°C, con agitación suave. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó con 0,1% *Tween 20* en PBS 1X, por una hora a 37°C y agitación suave. Entre cada paso se hicieron lavados de 20 minutos con PBS 1X, a temperatura ambiente y agitación suave.

Los anticuerpos primarios empleados en este trabajo fueron de tres tipos. Por un lado, se empleó como antisuero específico de SLEV el líquido ascítico (dilución de uso 1/640) generado en ratones mediante la inyección del virus 78V-6507, proporcionado por el Laboratorio de Arbovirus y Arenavirus del Instituto de Virología “Dr. Vanella” de la Universidad Nacional de Córdoba. Los líquidos ascíticos se preparan inyectando al animal con una dosis viral determinada, y al cabo de 15 o 20 días se le inyectan células de sarcoma 180, las cuales le produce ascitis para luego extraer ese líquido que tiene los anticuerpos (Tikasingh *et al.*, 1966). También, se utilizó el anticuerpo primario que reconoce a la cola de

6 histidinas, el cual es un suero policlonal hecho en conejo (dilución de uso 1/1000), adquirido comercialmente (*Santa Cruz Biotechnology*). Por otro lado, se usaron muestras de pacientes humanos infectados con flavivirus (dilución de uso 1/200).

Los anticuerpos secundarios se encuentra asociado a peroxidasa de rábano picante (HRP, por *horseradish peroxidase*), por lo que las membranas fueron reveladas utilizando el reactivo Bio-Lumina (PB-L) sobre placas radiográficas (ORTHO CP-GU, AGFAU), en el HypercassetteTM (GE Healthcare). Los anticuerpos α -ratón (dilución de uso 1/2500) y α -conejo (dilución de uso 1/10000) pertenecen a la marca Santa Cruz Biotechnology, mientras que el anticuerpo α -humano (dilución de uso 1/2000) pertenece a la marca abcam.

3.5.2 Enzimo-inmuno Ensayo (EIE)

Para llevar a cabo el análisis de los sueros humanos se realizó un EIE indirecto. Para ello, se sensibilizó una policubeta plástica (ExtraGene) de 96 pocillos planos con 50 μ l de una solución 20 μ g/ml de las proteínas NS1 purificadas en *buffer* Carbonato-Bicarbonato (0,1 M, pH 9) y 6,4 M urea. Luego de incubar durante toda la noche a 4 °C, se realizaron 3 lavados con 50 μ l de Solución de Lavado (PBS conteniendo 0,3 M NaCl y 0,2% Tween 20, pH 7,2) y se agregaron 50 μ l de los sueros a evaluar diluidos en Solución de Dilución (Solución de Lavado con 1% p/v de caseína). Se incubó durante 1:30 horas a 37°C, realizando 3 lavados al finalizar el tiempo. Luego se agregó 50 μ l (dilución 1/2000) del conjugado comercial de conejo α -IgG de humano conjugado a HRP (abcam, Código ab6759) en solución diluyente y se incubó durante 1 hora a 37°C. Luego de la etapa de lavado, se agregó a cada pocillo 50 μ l de la solución de revelado ABTS (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en oscuridad, se detuvo mediante el agregado de 50 μ l de una solución 1% SDS y se procedió a determinar la absorbancia a 405 nm en el lector Cytation 5 (BioTek).

Al momento de realizar el análisis estadístico, las curvas ROC se generaron con el complemento XLSTAT de Microsoft Excel con el fin de determinar el punto de corte en el que se alcanza la sensibilidad y especificidad más alta, y evaluar la capacidad discriminativa de cada ensayo (Cerdeira & Cifuentes, 2012).

Los parámetros sensibilidad y especificidad se calcularon de la siguiente manera:

Sensibilidad = $VP/(VP+FN)$, Especificidad = $VN/(FP+VN)$.

En donde VP es Verdadero Positivo, FP es Falso Positivo, VN es Verdadero Negativo y FN es falso Negativo.

3.5.3 Sueros humanos

Todos los sueros humanos fueron provistos por el Laboratorio de Arbovirus y Arenavirus del Instituto de Virología "Dr. Vanella" (InViV) de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC) o el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" (INEVH) perteneciente a la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS). En ambos casos fueron registrados y aprobados por el Comité de Ética de cada una de las entidades. Los sueros positivos para SLEV pertenecen a individuos con diagnóstico clínico de encefalitis que se infectaron durante el brote registrado en Córdoba, Argentina, durante 2005. El diagnóstico de laboratorio se realizó mediante MAC-ELISA para la detección de anticuerpos específicos de IgM y se confirmó mediante la prueba de neutralización mediante la reducción de unidades formadoras de placa, lo que demuestra la seroconversión entre dos muestras pareadas. Todos los sueros se tomaron de individuos con infecciones primarias, y todos resultaron negativos para los virus del Dengue y *West Nile*. Los sueros positivos al WNV se seleccionaron de un panel de sueros recolectados en diferentes hospitales de salud pública en la ciudad de Córdoba (años 2009-2010), involucrados en diferentes encuestas serológicas. Los anticuerpos fueron detectados por PRNT en una sola muestra, con títulos de anticuerpos neutralizantes entre 1:10 y 1:160. Estos sueros fueron negativos para SLEV y Dengue. Los sueros humanos negativos no mostraron reactividad a SLEV, WNV u otros Flavivirus cuando se analizaron mediante PRNT.

3.5.4 Inmunización de ratones

Ratones Balb/C machos de 6 semanas (5 por grupo) fueron inmunizados con 250 µl de adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich) conteniendo 50 µg de proteína recombinante NS1. Los refuerzos se dieron los días 28 y 42, en las mismas condiciones que la inmunización inicial. Todas las aplicaciones se hicieron por vía subcutánea en la región posterior del lomo del animal. Los días 1, 28, 40 y 60 se tomaron muestras de sangre para realizar el seguimiento de la respuesta humoral (**Figura 14**). La sangre se extrajo mediante una incisión distal en la cola y se colectó mediante capilares heparinizados. Una vez extraída fue centrifugada a 5000 g durante 15 minutos para separar el suero y éstos fueron conservados a -20 °C hasta su posterior análisis.

Los protocolos empleados en animales para este trabajo se encuentran aprobados bajo la resolución N° 3/16 de la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-UNQ).

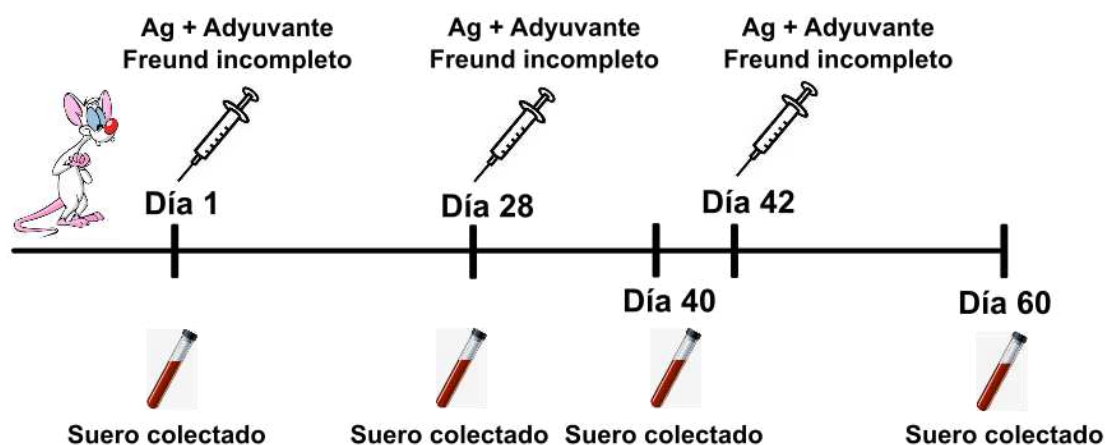


Figura 14: Esquema del protocolo de inmunización. Se esquematiza el protocolo de inmunización de ratones, el cual cuenta con una primera inmunización (día 1) y dos refuerzos los días 28 y 42, respectivamente. Todas las inmunizaciones se realizaron de manera sub cutánea con adyuvante incompleto de Freund. El seguimiento del procedimiento se hace a partir del suero obtenido en los días 1 (pre-inmune), 28, 40 y 60.

3.5.5 Caracterización de los sueros producidos

Para determinar la reactividad de los sueros generados en ratones estos fueron analizados mediante ELISA indirecto. Placas de 96 pocillos (ExtraGene) se recubrieron con 50 μ l de una solución 20 μ g/ml de NS1 previamente purificada, durante toda la noche a 4 °C. Luego de tres lavados con solución de lavado, estas fueron bloqueadas con PBS con caseína al 1% a 37 °C durante 1 h. A continuación se lavaron las placas tres veces con solución de lavado y se adicionaron 50 μ l de los sueros obtenidos, diluidos 1/100 en *buffer* de lavado con caseína al 1%. Se incubaron a 37 °C durante 1 h y luego los anticuerpos unidos se detectaron utilizando suero α -ratón conjugada con HRP (Santa Cruz Biotechnology) en *buffer* de dilución (dilución 1/800) a 37 °C durante 1 h. Finalmente las placas se revelaron TMB (BD Biosciences), la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad, se detuvo mediante el agregado de 50 μ l de una solución 9 N de H₂SO₄ y se procedió a determinar la absorbancia a 450 nm en el lector Cytation 5 (BioTek).

Los títulos de anticuerpos generados, se determinaron a partir de diluciones $\frac{1}{2}$ seriadas (inicial 1/800) y el valor de corte se calculó utilizando los sueros pre-inmunes (promedio + 2 * desvío estándar). El título de anticuerpos, se definió la última dilución de suero que da reacción positiva; tomando como reacción positiva los valores que superan el valor de corte (CO, por *cut off value*). Cada muestra de suero se analizó por triplicado y las diferencias estadísticas se establecieron independientemente dentro de cada grupo, de acuerdo con una prueba no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis).

Con el fin de determinar la reactividad debida a la cola de 6 histidinas, se calculó el título contra una proteína no relacionada, que también la poseía. Para ello se utilizó GFP (*Green Fluorescent Protein*) expresada en bacterias y purificada bajo las mismas condiciones y con el *HisTag*.

3.5.6 Producción de anticuerpos monoclonales en ratón

Se emplearon los ratones Balb/c inoculados como se describe en la sección anterior (**3.5.4 Inmunización de ratones**). Posteriormente a la última inmunización, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los bazo para obtener esplenocitos empleando protocolos descritos previamente (Yokoyama *et al.*, 2013). Tanto los esplenocitos como las células de mieloma SP2/0 Ag14 (ATCC) se lavaron tres veces con medio DMEM por separado y luego se combinaron en un mismo tubo en una relación 2:1 respectivamente. Se centrifugaron, se descartó el sobrenadante, las células se resuspendieron y se mantuvieron a 37 °C durante el resto del protocolo. Se les agregó 1 ml de Polietilenglicol 1500 (Roche Diagnostics) a lo largo de un minuto con agitación y luego se continuó agregando un total de 20 ml de DMEM a lo largo de 5 minutos. Las células se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 xg , se incubaron durante 5 minutos a 37 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en DMEM suplementado con suero fetal bovino 10%, BM Condimed H1 10% (Roche Diagnostics) y HAT 1X (Invitrogen). Las células se distribuyeron en placas de 96 pocillos y se incuban a 37 °C durante alrededor de 10 días hasta la aparición de hibridomas (Yokoyama *et al.*, 2013).

Los sobrenadantes de los pocillos se deben analizar por ELISA para detectar IgG anti NS1. Aquellos pocillos que resultaran positivos por ELISA, deben expandirse transfiriéndolos a placas de 12 pocillos, amplificándose luego dos veces por dilución limitante. Los clones seleccionados se expanden inicialmente en DMEM suplementado con suero fetal bovino 10%, BM Condimed H1 10 % (Roche Diagnostics) y HT 1X (Invitrogen) y gradualmente adaptados a DMEM suplementado con suero fetal bovino 10%. Para la producción de los anticuerpos correspondientes, los clones seleccionados se inoculan por vía intraperitoneal a ratones Balb/c (tratados 15 días antes con 500 μl de adyuvante incompleto de Freund) en una concentración de 5×10^6 células/ratón (Yokoyama *et al.*, 2013). El fluido ascítico se colecta a los 15 días, se analiza por ELISA y se somete a purificación de IgG.

Sección IV

Resultados y Discusión

Parte I

4.1 Análisis Bioinformático

4.1.1 Propiedades Bioquímicas y perfil de hidrofobicidad

Los parámetros físicos y químicos calculados para las proteínas recombinantes NS1 se muestran en la **Tabla 2**. Los mismos, constituyen una importante herramienta al momento de diseñar estrategias de expresión y purificación de las proteínas en diferentes sistemas. Para su cálculo a partir de datos de secuencia aminoacídica, se empleó la herramienta *ProtParam*, alojada en el *ExPASy Proteomics Server*. Las secuencias utilizadas son las obtenidas a partir de la simulación de la expresión *in silico* de los ORFs clonados en los plásmidos de expresión. Es así que las secuencias presentan la información de los ORFs originales de NS1, la metionina en el N-terminal y las histidinas correspondientes a la cola aportada por el plásmido. Las proteínas NS1 recombinantes se denominan NS1-HT (HT, por *His Tag*), indicando la especie viral en el subíndice.

En la **Figura 1 del Anexo** se muestra la secuencia aminoacídica de todas las proteínas recombinantes producidas, indicando cada uno de los elementos agregados (histidinas, conectores, etc.).

	NS1-HT _{SLEV}	NS1-HT _{WNV}	NS1-HT _{DENV-1}	NS1-HT _{ZIKV}	NS1-HT _{YFV}	EPS _{SLEV}	EPS _{Flavis}
Número de aminoácidos	361	361	381	381	384	187	101
Peso Molecular (kDa)	41,1646	40,9180	43,2151	43,4310	43,2224	20,1323	11,2196
pi teórico	6.54	5.98	6.74	6.82	6.38	9.78	9.16
Coefficiente de extinción 280 nm (M ⁻¹ cm ⁻¹) (cisteínas oxidadas)	88640	80160	102160	93680	81650	18575	No contiene Trp, Tyr ni Cys
Coefficiente de extinción 280 nm (M ⁻¹ cm ⁻¹) (cisteínas reducidas)	87890	79410	101410	92930	80900	18450	No contiene Trp, Tyr ni Cys
Absorbancia 280 nm de 1 g/l	2.140	1.949	2.352	2.147	1.880	0.918	-

Tabla 2. Propiedades bioquímicas de las proteínas NS1 recombinantes. Resumen de las propiedades bioquímicas de las proteínas recombinantes generadas en este trabajo, calculadas con *ProtParam* (www.expasy.org). Se indican el Número de aminoácidos, el Peso Molecular (kDa), el Pi teórico, el Coeficiente de extinción 280 nm (M⁻¹cm⁻¹, cisteínas oxidadas), el Coeficiente de extinción 280 nm (M⁻¹cm⁻¹, cisteínas reducidas), y la Absorbancia 280 nm de 1g/l.

De esta manera, contamos con los valores teóricos de peso molecular de cada una de las proteínas generadas, lo cual resulta importante al momento de identificar los productos proteicos de sobre-expresión en los geles de poliacrilamida. Por un lado, podemos detectar que la NS1-HT de SLEV y de WNV, que se encuentran clonadas en el vector pET-22b, poseen un peso aproximado a 41 kDa, mientras que las NS1-HT de DENV, ZIKV y YFV poseen un peso aproximado de 43 kDa y se encuentran clonadas en el vector pET-28a. La diferencia radica en que el vector pET-28a aporta secuencias de 6 histidinas en ambos extremos, mientras que el vector pET-22b solo en el extremo carboxilo. Por otro lado, las construcciones de secuencias que representan las regiones de mayor inmunogenicidad predichas bioinformáticamente (epítopes) poseen una extensión mucho menor que las versiones completas y un peso teórico de 20 kDa (EPS_{SLE}) y 11 kDa (EPS_{flavis}). Cabe destacar que estos pesos moleculares están calculados a partir de la secuencia aminoacídica y no tiene en cuenta las posibles modificaciones postraduccionales, por lo que estos valores pueden verse levemente alterados al momento de observar las bandas en un gel de poliacrilamida.

Esta herramienta bioinformática nos permite calcular el punto isoeléctrico (pI) de cada una de las proteínas generadas, lo cual nos da la referencia del pH de trabajo, de manera tal que evitemos la precipitación, manteniendo la estabilidad. Observando la tabla podemos ver que las proteínas NS1-HT completas poseen pI entre 6 y 7, lo cual es ligeramente menor al pH fisiológico, mientras que las versiones más cortas poseen un pI más básico, entre 8 y 9. De esta forma, podremos emplear *buffers* que tengan un pH fisiológico (7,4) sin afectar la estabilidad de las proteínas.

El coeficiente de extinción indica cuánta luz puede absorber una proteína a una determinada longitud de onda. Este parámetro se convierte en una herramienta importante al momento de la purificación de la proteína, mediante el seguimiento por espectrofotometría a 280 nm.

Mediante el uso del *ExPASy Proteomics Server*, se obtuvo el perfil de hidrofobicidad para las proteínas NS1 usadas en el trabajo. Estos perfiles son muy similares entre sí, por lo que en la **Figura 15.A** se indica solamente el de la proteína NS1_{SLEV} (cepa CbaAr-4005). Al observar los perfiles generados, puede verse que en casi toda su extensión esta proteína es ligeramente hidrofílica, remarcando que en las regiones comprendidas entre los aminoácidos de las posiciones 95-115, 250-270 y el extremo 3' (posiciones 330-352) se encuentran las zonas con valores máximos de hidrofiliidad. Otra región que posee un valor diferencial se ve entre los residuos 25 a 40. Por otro lado, en la región comprendida entre los aminoácidos 230 y 250 se encuentra la zona más hidrofóbica de la proteína, posiblemente involucrada en la formación de los multímeros o la interacción con la

membrana del RE en el complejo de replicación, aunque las regiones involucradas en estas interacciones no se han determinado con certeza aún.

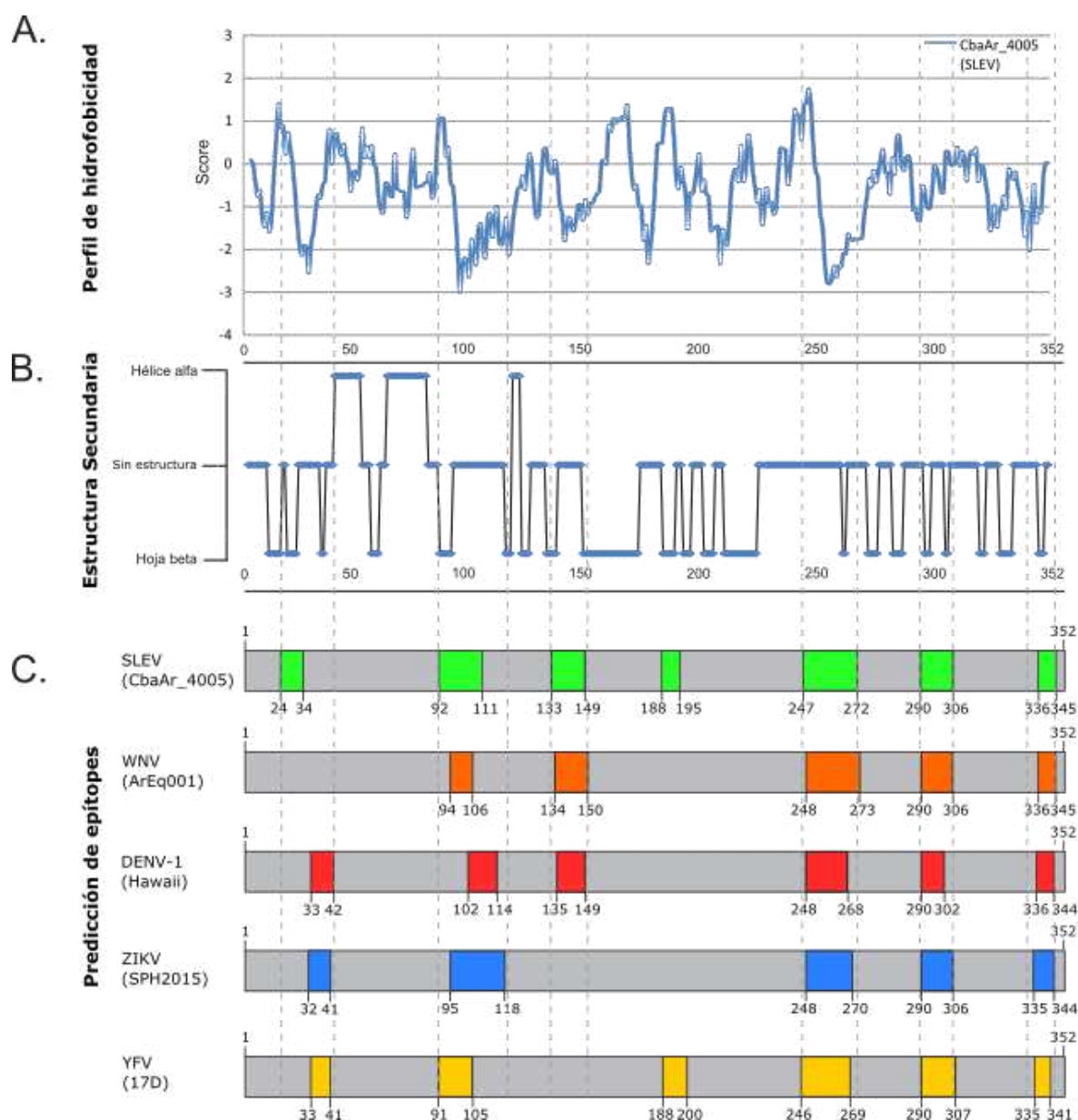


Figura 15. Análisis bioinformático. **A. Perfil de hidrofobicidad.** Los valores negativos indican una menor hidrofobicidad, mientras que los valores positivos indican una mayor hidrofobicidad. Los perfiles son similares para las cinco proteínas NS1, por lo que solo se muestra el perfil de la proteína NS1_{SLEV} (CbaAr-4005). **B. Estructura secundaria.** Estructura secundaria de NS1 descrita en Akey *et al.* 2014a. **C. Predicción de epítopes para células B.** La barra horizontal gris representa la proteína NS1 de cada uno de los virus y se indican las posiciones de los epítopes predichos por la herramienta *Bepipred Linear Epitope Prediction* del servidor *IEDB Analysis Resource*. Las líneas punteadas indican la posición de los distintos epítopes con respecto a las regiones más hidrofílicas.

4.1.2 Predicciones de epítopes para células B

Una de las perspectivas que surgen de este trabajo es la generación de un ensayo inmunológico que permita llevar a cabo el diagnóstico diferencial de Flavivirus, basado en la detección de anticuerpos contra la proteína NS1. Como alternativa a las versiones de NS1-HT completas que podrían continuar presentando una elevada reactividad cruzada debido al alto grado de homología entre estas proteínas, planteamos el diseño de una construcción que contenga únicamente las regiones de mayor inmunogenicidad (EPS_{SLEV}), la cual podría dar lugar a una detección diferencial de virus relacionados. Por otro lado, pensando en los diversos formatos de ensayos serológicos que hacen uso de anticuerpos monoclonales (ELISA de captura de antígeno, bloqueo de epítopes, etc.) planteamos el diseño de la construcción EPS_{Flavis}, la cual pretende ser utilizada para el desarrollo de anticuerpos monoclonales que reconozcan NS1s de cualquiera de estos Flavivirus.

Debido a que no se han descrito regiones inmunogénicamente dominantes para las proteínas NS1 de todos los flavivirus de interés y específicamente para SLEV, se realizó una predicción de epítopes lineales para células B con la herramienta *Bepipred Linear Epitope Prediction* del servidor *IEDB Analysis Resource*. Para este análisis se tuvieron en cuenta solo las secuencias obtenidas que tuvieran al menos ocho residuos aminoacídicos. Es importante destacar que sólo se realiza la búsqueda de epítopes de células B, ya que como se dijo previamente, los ensayos están focalizados en la detección de la respuesta inmune humoral. En la **Figura 2 del Anexo** se muestra un alineamiento de las secuencias empleadas y se marcan los epítopes encontrados en cada una.

Tal como se esperaba, en la **Figura 15.C** puede verse que muchos de los epítopes predichos se superponen entre sí. En principio, resultaría interesante realizar ensayos de expresión de estos epítopes para alguna de las proteínas y analizar su reactividad en comparación con las versiones completas de sí mismas y con respecto a las proteínas completas de otros virus. Es así que se llevó adelante el diseño de la construcción que contiene las regiones inmunogénicas de SLEV (EPS_{SLEV}).

Incorporando la estructura secundaria, descrita por Akey *et al.* (Akey *et al.*, 2014) (**Figura 15.B**), y el perfil de hidrofobicidad de la **Figura 15.A**, podemos observar que la mayor parte de las regiones predichas como epítopes se encuentran en las secciones más hidrofílicas de las proteínas, coincidiendo con secciones de poca estructura u hojas beta. Este resultado evidencia que los epítopes para células B se encontrarían en la superficie del antígeno, expuestos al solvente. Por otro lado, las hélices alfa se encuentran en regiones principalmente hidrofóbicas, posicionándose en el interior de la estructura de la proteína y debido a ellos no cuentan con epítopes detectados por anticuerpos.

Muchos de los epítopes predichos se superponen total o parcialmente con los caracterizados de manera experimental en bibliografía, lo cual fortalece nuestros resultados obtenidos de manera bioinformática. Si realizamos una comparación con un trabajo realizado sobre la proteína NS1 de WNV, podemos observar que cuatro de las cinco secuencias detectadas en nuestro trabajo coinciden con las detectadas por Sun *et al.* (Sun *et al.* 2012a). La única secuencia obtenida que no fue detectada por Sun es la que se encuentra entre las posiciones 94-106, lo cual probablemente se deba a las distintas cepas empleadas en los trabajos. Si bien resulta interesante realizar el análisis con aquellos epítopes que coinciden con los ya descritos todos serán tenidos en cuenta para los diseños de las distintas construcciones. De igual manera, se observan resultados similares si se comparan secuencias inmunogénicas descritas para DENV-1 por Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2010). En este trabajo se caracterizan las seis regiones que detectamos bioinformáticamente, y se determina que las secuencias se conservan dentro del grupo antigénico de los virus Dengue y que éstas difieren cuando se las compara con las de otros virus del género. En este sentido, resulta relevante indagar en las regiones que den lugar a la diferenciación de Dengue con las especies flavivirales encefalíticas como WNV y SLEV.

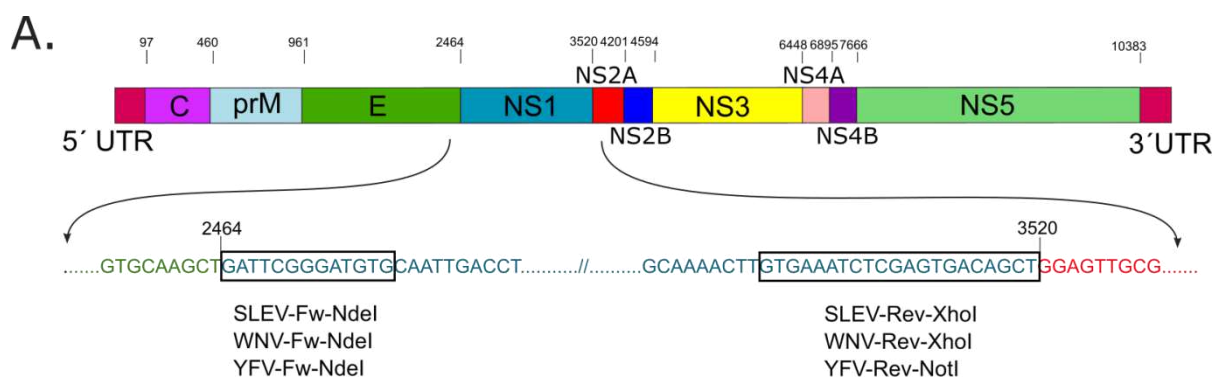
Por otro lado, un dato importante que surge de los anteriores trabajos y de otros en los que se realiza la búsqueda de epítopes para células B, es que la secuencia comprendida entre las posiciones 335 y 346 parece ser una región inmunogénica para todos los flavivirus (Chen *et al.*, 2010, Freire *et al.*, 2017, Hua *et al.*, 2014, Sun *et al.*, 2012a). Esta secuencia será relevante al momento del diseño de la construcción EPS_{Flavis}.

Una secuencia que no fue incluida en los análisis realizados en nuestro trabajo es la secuencia diferencial de NS1'. Esta secuencia es específica de los virus encefalíticos y podría ser una herramienta para explorar la respuesta de anticuerpos entre éstos virus y DENV o YFV.

4.2 Clonado Molecular de los ORFs y Epítopes de NS1

4.2.1 Diseño de primers

Para llevar a cabo la amplificación de la región codificante de NS1, en primer término se realizó el alineamiento de las secuencias de interés, diseñándose a partir del mismo, tres pares de *primers* (**Figura 16.B**). Cada par está diseñado para amplificar la secuencia de NS1 de los virus SLE, WN y YF, y su secuencia es complementaria a los extremos de la secuencia nucleotídica de NS1. A estos *primers* además se les incorporó en sus extremos sitios para enzimas de restricción, los cuales brindan la posibilidad de un clonado direccionado en el vector de expresión seleccionado.



B.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Descripción
SLEV-Fw-NdeI	<u>GGGAATTCcatatgGATTCTGGGATGTGC</u>	Específico para el extremo 3' de NS1 _{SLEV} , contiene el sitio <u>NdeI</u> .
SLEV-Rev-XhoI	<u>GGCctcgagAGCTGTCACCCTTGATTTAC</u>	Específico para el extremo 5' de NS1 _{SLEV} , contiene el sitio <u>XhoI</u> .
WNV-Fw-NdeI	<u>GGGAATTCcatatgGACACTGGGTGTGC</u>	Específico para el extremo 3' de NS1 _{WNV} , contiene el sitio <u>NdeI</u> .
WNV-Rev-XhoI	<u>GGCctcgagAGCATTCACTTGACTGCAC</u>	Específico para el extremo 5' de NS1 _{WNV} , contiene el sitio <u>XhoI</u> .
YFV-Fw-NdeI	<u>CGCcatatgGATCAAGGATGCG</u>	Específico para el extremo 3' de NS1 _{YFV} , contiene el sitio <u>NdeI</u> .
YFV-Rev-NotI	<u>TTgcggccgcAGCTGTAAACCAG</u>	Específico para el extremo 5' de NS1 _{YFV} , contiene el sitio <u>NotI</u> .

Figura 16. Localización y secuencia de los primers diseñados. **A.** Localización de los primers en el genoma de SLEV. En la figura se detallan las zonas genómicas donde hibridan los primers diseñados para la amplificación los ORFs de NS1. Las letras verdes refieren a la secuencia nucleotídica de E, mientras que en azul se muestran las de NS1 y en rojo la de NS2a. El recuadro negro señala la zona específica del ORF de NS1 que hibrida con los primers. De la misma manera se diseñaron los primers para las secuencias de WNV y YFV. **B.** Secuencia y características de los primers específicos para NS1 de los virus SLE, WN y YF. Los sitios para enzimas de restricción se indican en minúscula.

El sitio *NdeI*, que se encuentra en todos los primers forward, aporta el triplete ATG de inicio de la traducción que NS1 no posee originalmente, ya que se encuentra incluida dentro del ORF de la poliproteína viral. El sitio de restricción del primer reverso se agregó teniendo en cuenta el vector de destino. Para el caso de las secuencias de NS1_{SLEV} y NS1_{WNV} se les adicionó el sitio de *XhoI*, necesario para la transferencia del inserto al vector pET-22b y su fusión a la secuencia de seis histidinas en el extremo carboxilo. Para la secuencia de NS1_{YFV}, fue necesario el agregado del sitio para la enzima de restricción *NotI*, lo cual permitió el clonado direccionado en el vector de expresión pET-28a.

Tanto el diseño de primers como las distintas construcciones recombinantes se analizaron previamente *in silico* haciendo uso del programa *Clone Manager*. En la **Figura 16.A** se muestra la localización de los primers en el genoma viral.

4.2.2 Construcción de los plásmidos de expresión de las proteínas NS1 de SLEV, WNV, YFV, DENV-1 y ZIKV

Una vez analizadas bioinformáticamente las secuencias y diseñados los cebadores, se procedió a la amplificación de los ORF de NS1_{SLEV} y NS1_{YFV} y su transferencia al vector de expresión. Los pasos de amplificación por PCR y clonados realizados se detallan en las próximas secciones, mientras que un diagrama completo de la estrategia se muestra en la **Figura 17**.

Por otro lado, al no contar con el material genético de WNV, DENV-1 y ZIKV para la amplificación de la secuencia de NS1, éstas se generaron por síntesis química y se adquirieron directamente en los plásmidos de expresión, contando además con los codones optimizados para su expresión en células bacterianas.

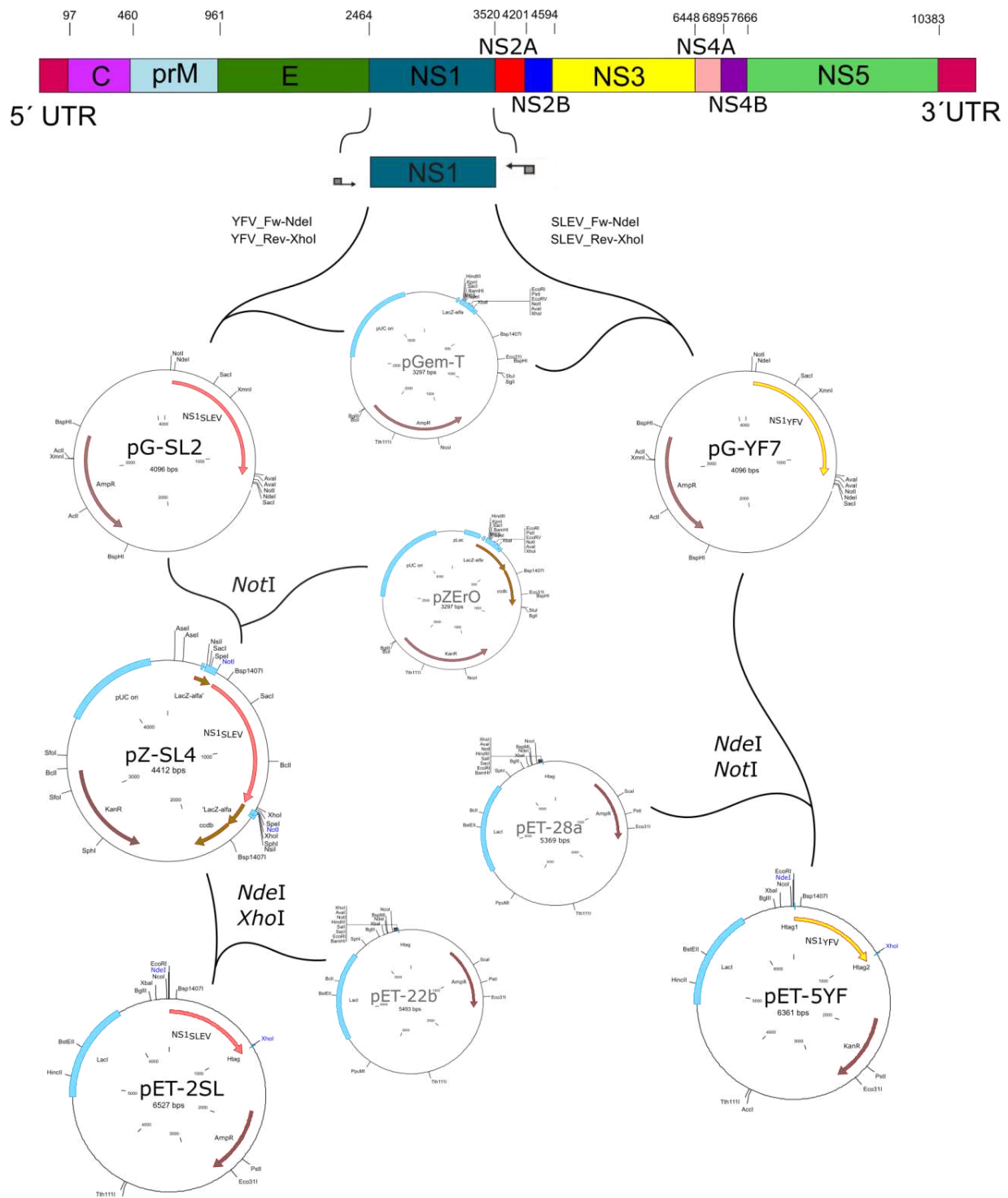


Figura 17. Esquema de los diferentes clonados del ORF de NS1 de SLEV y YFV. Representación de los pasos de amplificación y clonado realizados. El marco abierto de lectura del gen NS1 es señalado en color azul, y en cada uno de sus extremos los *primers* utilizados para la amplificación mediante la técnica de PCR. Junto a las flechas, se señalan las diferentes endonucleasas de restricción utilizadas para la generación de las construcciones plasmídicas. Se muestran los pasos de clonados intermedios (pG-SL2, pZ-SL4 y pG-YF7) y las construcciones finales (pET-2SL y pET-5YF), así como también los vectores de partida (pGem-T, pZErO, pET-22b y pET-28a).

Síntesis del ADNc y amplificación del ORF de NS1_{SLEV} y NS1_{YFV}

El ARN viral fue obtenido a partir de células C636 infectadas con SLEV o WNV, y de la vacuna Stamaril® para YFV. La reacción de síntesis de ADNc fue llevada a cabo utilizando la polimerasa SuperScript III y hexámeros al azar como cebadores.

Sobre los ADNc generados, se realizaron las PCRs con los *primers* específicos diseñados para cada uno de los virus. El tamaño esperado para el producto de amplificación abarca 1056 pb, correspondientes a la secuencia de NS1 y 20-25 nucleótidos que contienen los sitios de restricción, por lo que éste tendría un tamaño, en el gel de agarosa, levemente mayor a las mil pares de bases. Como se observa en la **Figura 18.A** se obtuvo amplificación para los virus SLE y YF (calles 1 y 2), mientras que para WNV no fue posible detectar la banda de amplificación correspondiente a NS1. Se ensayaron distintos protocolos para la síntesis del ADNc, utilizando hexámeros o los cebadores específicos, y se cambiaron las condiciones de amplificación pero en ningún caso se logró la obtención de la secuencia de NS1_{WNV}.

Los fragmentos generados mostraron el tamaño deseado (1077 y 1079 pb respectivamente), y fueron purificados a partir del gel de agarosa, para su posterior inserción en un vector de clonado.

Clonado del ORF de NS1_{SLEV} y NS1_{YFV} en el vector pGem-T

Los fragmentos purificados que contienen las regiones codificantes de NS1_{SLEV} y NS1_{YFV}, fueron ligados al vector de clonado pGem-T *Easy*. El producto de esta ligación fue transformado en bacterias TOP10 y las colonias blancas obtenidas fueron analizadas mediante Eckardt o PCR de colonias. En la **Figura 18.B** se muestra el estudio de un clon positivo para cada uno de los fragmentos amplificados. Los clones, denominados pG-SL2 para NS1_{SLEV} y pG-YF7 para NS1_{YFV}, fueron analizados mediante digestiones con enzimas de restricción. Las enzimas *NdeI* y *XhoI* o *NdeI* y *NotI* son las ubicadas en los extremos de los dos insertos, por lo que se espera que en ambos clones se libere un fragmento correspondiente a la secuencia de NS1 y otro correspondiente al esqueleto del vector (cercano a 3000 pb). Una vez verificado el patrón de digestión se seleccionaron estas colonias para continuar con el proceso de clonado.

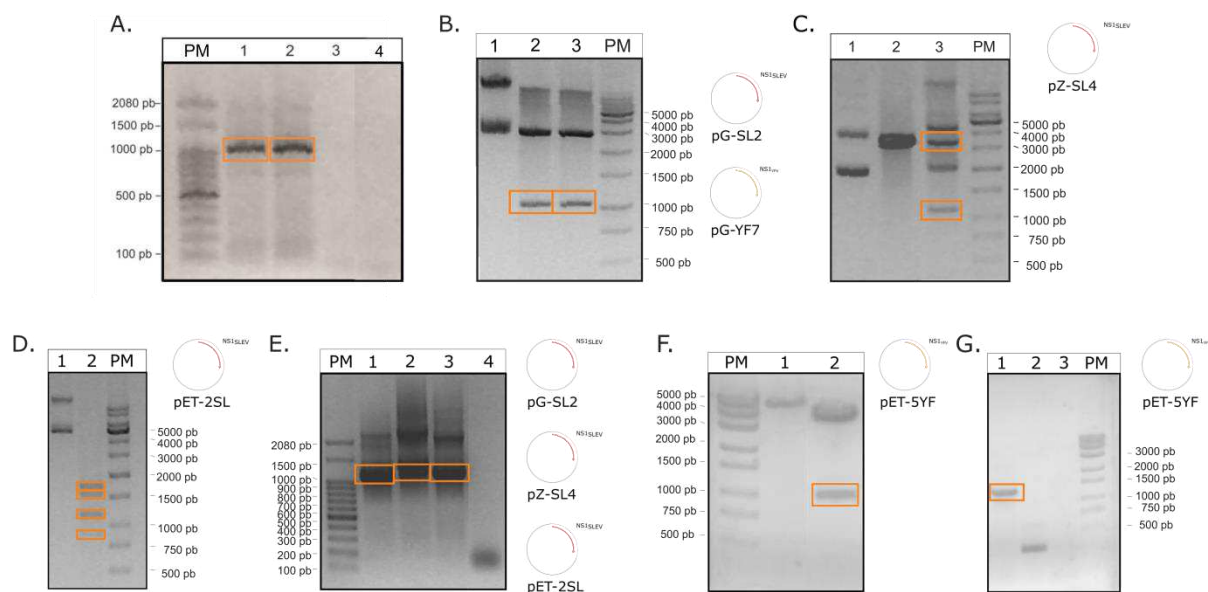


Figura 18. Construcción de los plásmidos que contienen los ORF de NS1 de SLEV y YFV. Visualización de electroforesis en gel de agarosa. En todos los casos con un recuadro naranja se indican los fragmentos de interés. En la parte A, PM es el marcador de peso molecular de 100 pb, mientras que en el resto de las partes el PM es el marcador de peso molecular de 1000 pb (PB-L). **A.** Amplificación por PCR realizadas sobre el ADNc de SLEV, WNV y YFV con diferentes *primers* específicos. Calle 1: SLEV SLEV_Start-NdeI y SLEV_End-XhoI; calle 2: YFV YFV-Fw-NdeI y YFV-Rev-NotI; calle 3: WNV WNV-Fw-NdeI y WNV_Rev-XhoI; y calle 4: negativo (H₂O). **B.** Digestiones enzimáticas de los clones pG-SL2 con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, y pG-YF7 con las enzimas *NdeI* y *NotI*. Calle 1: pG-SL2 sin digerir; calles 2 y 3: pG-SL2 y pG-YF7 digeridos, respectivamente. **C.** Digestión enzimática del clon pZ-SL4. Calle 1: pZErO sin digerir; calle 2: pZErO digerido con *NotI*; calles 3: pZ-SL4 digerido con *NotI*. **D.** Digestiones enzimáticas del clon pET-2SL con la enzima *AfaI*. Calles 1 y 2: pET-2SL sin digerir y digerido respectivamente. **E.** Amplificación por PCR (*primers* SLEV-Fw-NdeI y SLEV-Rev-XhoI) de los clones pG-SL2, pZ-SL4 y pET-2SL. Calles 1, 2 y 3: pG-SL2, pZ-SL4 y pET-2SL como molde de PCR, respectivamente; calle 4: control negativo. **F.** Digestión enzimática del clon pET-5YF con las enzimas *NotI* y *NdeI*. Calle 1: vector pET-28a digerido con las enzimas *NotI* y *NdeI*; calle 2: clon pET-5YF digerido con las enzimas *NotI* y *NdeI*. **G.** Amplificación por PCR (*primers* T7 prom y T7 ter) del clon pET-5YF. Calle 1: pET-5YF como molde de PCR; calle 2: plásmido pET-28a como molde de PCR; y calle 3: control negativo.

Transferencia del inserto NS1_{SLEV} en pGem-T al vector pZErO

En primer término, se planteó una estrategia de transferencia directa del inserto NS1_{SLEV} desde el vector de clonado al vector de expresión pET-22b, haciendo uso de las enzimas *NdeI* y *XhoI* insertadas mediante los *primers* en los extremos de NS1. Debido a que no fue posible lograr un rendimiento eficiente en la purificación del inserto obtenido mediante digestión, se llevó a cabo la ligación en el vector pET-22b sin paso intermedio de purificación. Esto generó únicamente clones que contenían el vector de clonado original religado, ya que no podían ser eliminados debido a que ambos plásmidos (origen y destino) comparten la resistencia al antibiótico ampicilina. Para evitar que se generen estas

construcciones, se planteó un paso intermedio de clonado en el vector pZErO que posee resistencia al antibiótico kanamicina.

Para este clonado, pG-SL2 debe ser digerido con la enzima *NotI*, la cual está localizada muy cerca a ambos extremos del inserto. Luego, el inserto liberado es clonado en el sitio *NotI* que se encuentra en el sitio de clonado múltiple del vector pZErO. De esta forma, se obtuvieron clones del tamaño esperado, de los cuales se muestra el análisis de uno de ellos. Este nuevo clon se nombró pZ-SL4, y fue analizado a través de digestiones enzimáticas.

En la **Figura 18.C** se muestran los resultados obtenidos de la digestión del clon con la enzima *NotI*. El sitio de corte está formado por ocho nucleótidos (5'-GCGGCCGC-3'), y se encuentra dos veces en los clones recombinantes, generando así un fragmento de 1115 bp, el cual contiene al inserto, y otro de 3297 pb que abarca el esqueleto del vector. Las bandas obtenidas en la digestión concuerdan con lo esperado, pudiendo observarse en la **Figura 18.C** la correspondiente liberación de inserto. Además de los fragmentos esperados, pueden verse otras dos bandas de aproximadamente 4000 pb y 2000 pb. Las mismas, coinciden con la movilidad electroforética del clon recombinante sin digerir.

El clon mostró los productos de digestión esperados así como los de amplificaciones por PCR. Finalmente, la secuenciación confirmó la identidad del inserto.

A partir de estos resultados, se continuó con el clon pZ-SL4 para realizar la transferencia del inserto al vector pET-22b.

Transferencia de la secuencia de NS1_{SLEV} al vector de expresión pET-22b

Como último paso de clonado del inserto NS1_{SLEV} se empleará al vector de expresión pET-22b. Para esta estrategia se procedió a utilizar los sitios para enzimas de restricción que se agregaron en los *primers*, con el propósito de generar un clonado direccionado en este vector. Como se describió previamente, el inserto posee en el extremo 5' secuencia para la enzima *NdeI*, y en el extremo 3' se encuentra un sitio para la enzima *XhoI*, permitiendo la fusión con el marco de lectura de la cola de histidinas.

De este clonado se obtuvieron colonias conteniendo plásmidos recombinantes, los cuales fueron analizados por PCR y patrones de digestiones enzimáticas. De los clones obtenidos se seleccionó el clon pET-2SL, el cual demostró la identidad nucleotídica correcta por todas las técnicas utilizadas.

En la **Figura 18.D** se muestran los resultados obtenidos para la digestión con la enzima *AfaI*, la cual posee un sitio de corte frecuente formado por los nucleótidos 5'-GTAC-3'. En los clones que contienen el inserto correcto se encuentran cinco sitios de corte para esta enzima, los cuales generan fragmentos de 1760 pb, 1567 pb, 1133 pb, 891 pb y 36 pb. La visualización mediante la electroforesis en gel de agarosa mostró los fragmentos esperados,

detectándose principalmente las bandas de 1760 pb, 1567 pb, 1133 pb y 891 pb, mientras que el fragmento de 36 pb no se logra observar en el gel.

Finalmente, se realizó un análisis por PCR de los clones obtenidos en pGem-T, pZErO, pET-22b para el inserto de NS1_{SLEV}. Para esta amplificación se utilizaron los *primers* específicos para SLEV, *Fw-NdeI* y *Rev-XhoI*. En la **Figura 18.E** se muestra la movilidad electroforética de los productos de las reacciones de PCR, observándose que en todas las calles correspondientes a los clones se identifica un producto de aproximadamente 1000 pb coincidente con la amplificación del inserto. Además es posible observar otras bandas de mayor tamaño, probablemente producto de hibridación inespecífica de los *primers* sobre los plásmidos recombinantes, y quizás también sobre el genoma bacteriano que puede ser co-purificado en cantidades traza.

El clon pET-2SL fue secuenciado. Al realizar la síntesis proteica *in silico*, puede verse que el péptido generado por el plásmido se encuentra fusionado a la cola de histidinas y posee mutaciones con respecto a la secuencia de NS1 obtenida en el *Genbank*. Las posiciones que generaron cambios en las secuencias aminoacídicas con respecto a la secuencia empleada fueron: 21 (V_{CbaAr-4005}→M_{pET-2SL}), 95 (K_{CbaAr-4005}→E_{pET-2SL}) y 165 (T_{CbaAr-4005}→M_{pET-2SL}). Únicamente el cambio en la posición 21 es conservativo, ya que la naturaleza de los aminoácidos que cambian es similar (valina por metionina). Sin embargo, en la posición 95 se cambia un aminoácido cargado positivamente (lisina) por uno cargado negativamente (glutámico), mientras que en la posición 165 se cambia un aminoácido polar (treonina) por uno apolar (metionina), siendo ambos cambios no conservativos. La secuencia, conteniendo las mutaciones, fue analizada mediante la herramienta *ProtParam* determinándose que los parámetros no difieren de los obtenidos con la secuencia nativa (datos no mostrados). De todas maneras, no es posible predecir el impacto que estos cambios puedan provocar en la estructura de la proteína. Asimismo, es importante destacar, que en este caso, al realizar la expresión con el objetivo de emplear estas proteínas en ensayos inmunológicos, no son cambios de gran relevancia y no impactan sobre la secuencia de los epítopes predichos mediante bioinformática. Un caso opuesto sería si necesitásemos llevar adelante ensayos de actividad o estructura, donde cada uno de los residuos aminoacídicos ocupa un rol de gran importancia en el contexto de la estructura proteica.

Una vez que estos análisis confirmaron la identidad del clon pET-2SL, se procedió a realizar los ensayos de expresión en bacterias.

Transferencia de la secuencia de NS1_{YFV} al vector de expresión pET-28a

Para la expresión de la secuencia de NS1_{YFV} se decidió utilizar el plásmido pET-28a, el cual posee un gen de resistencia a kanamicina y permite la fusión del ORF de interés a secuencias de seis histidinas en los extremos amino y carboxilo. A partir de plásmido pG-

YF7, que contiene la secuencia de NS1_{YFV}, se realizó la liberación haciendo uso de los sitios para las enzimas *NdeI* y *NotI* y permitiendo el clonado direccionado. Como resultado se obtuvieron colonias con plásmidos recombinantes que fueron analizados para verificar la correcta inserción de la secuencia.

En la **Figura 18** se muestran los resultados de la caracterización molecular del clon pET-5YF, el cual fue seleccionado para continuar con los ensayos de expresión. El análisis mediante enzimas de restricción se expone en la **Figura 18.F**, donde el clon recombinante se digirió utilizando las enzimas de los extremos el inserto y se verifica la liberación de un fragmento de 1000 pb y otro que corresponde al esqueleto del vector. En la **Figura 18.G** se muestra el análisis por PCR utilizando los *primers* universales que flanquean al sitio de clonado múltiple, amplificando el fragmento de interés de poco más de mil pares de bases. Como control se muestra el fragmento de 300 pb producto de la amplificación en un plásmido pET-28a sin inserto.

El clon pET-5YF fue seleccionado y secuenciado. La proteína generada por el plásmido se encuentra fusionada a una cola de seis histidinas en cada uno de sus extremos y posee solo una mutación con respecto a la secuencia de NS1 de la cepa 17D obtenida en el *Genbank*. La posición que se encontró mutada fue la 340 (A_{17D} → T_{pET-5YF}), este cambio implica el paso de un aminoácido no polar (Alanina) a uno polar (Treonina).

Síntesis química de los plásmidos de expresión que contienen las secuencias de NS1_{WNV}, NS1_{DENV-1} y NS1_{ZIKV}

En el caso de WNV, no fue posible amplificar por PCR el fragmento de interés. Se sintetizaron ADNc con diferentes estrategias, pero ninguna de ellas resultó exitosa, ya que no se obtuvieron los productos de amplificación esperados al realizar las PCRs con *primers* específicos de WNV.

Por esto, se adquirió la construcción realizada por síntesis química del ORF en el vector de expresión pET-22b, utilizando la secuencia de NS1 codificada en la cepa ArEq001. En este caso, se realizó la optimización de los codones para su expresión en bacterias *E. coli*. La secuencia de NS1 se encuentra fusionada a una cola de histidinas en el extremo carboxilo. El clon recombinante fue denominado pET-WN y la proteína recombinante NS1-HT_{WNV}.

De la misma manera se obtuvieron los plásmidos de expresión para las secuencias de NS1 de ZIKV y DENV-1. En ambos casos se utilizó el plásmido pET-28a como vector de destino, y los codones se optimizaron para su producción en bacterias. Para Dengue se seleccionó la secuencia correspondiente a la cepa de referencia de la OMS, Hawái aislada en 1944, y para Zika la cepa aislada de Brasil en el 2015. En ambos casos los ORF se encuentran fusionados a una cola de histidinas en los extremos amino y carboxilo. Los

clones recombinantes se denominaron pET-DEN1 y pET-ZIK, y las proteínas recombinantes NS1-HT_{DENV-1} y NS1-HT_{ZIKV} respectivamente.

Finalmente, se obtuvieron plásmidos de expresión para las proteínas NS1 de cinco flavivirus. Todas las secuencias se clonaron en vectores de la familia pET, algunas de ellas fueron optimizadas para la expresión en bacterias (NS1-HT_{WNV}, NS1-HT_{DENV-1} y NS1-HT_{ZIKV}), mientras que en otras se mantuvo la secuencia original (NS1-HT_{SLEV} y NS1-HT_{YFV}). De acuerdo a lo reportado, el vector pET ya ha sido utilizado para el clonado de NS1 en distintos trabajos con resultados satisfactorios (Amorim *et al.*, 2010, de Oliveira *et al.*, 2014), mientras que se han empleado secuencias nativas o con codones optimizados para la expresión en bacterias obteniéndose rendimientos similares (Das *et al.*, 2009, Yohan *et al.*, 2017). En estos trabajos, las proteínas han sido generadas exitosamente en bacterias, manteniendo sus regiones inmunogénicas, y por tanto resultando posible su utilización en el desarrollo de ensayos de diagnóstico o vacunas, así como también su implementación en la inmunización de ratones en protocolos de generación de anticuerpos monoclonales.

4.2.3 Diseño y clonados del plásmido que contiene regiones inmunogénicas de NS1_{SLEV} (EPS_{SLEV})

Con el objetivo de detectar secuencias inmunogénicas que permitan la diferenciación de dos virus muy relacionados como son SLE y WN, se diseñó una construcción basada en la identificación de las mismas a través de la predicción bioinformática realizada sobre NS1_{SLEV}.

Estrategias similares fueron utilizadas para el desarrollo de proteínas multiepítopos utilizadas para el diagnóstico de distintos flavivirus (Dengue, Tembusu y TBE) y bacterias (AnandaRao *et al.*, 2005, Han *et al.*, 2016, Volpina *et al.*, 2005). Las construcciones diseñadas para detectar flavivirus, en general están constituidas con secuencias de las proteínas NS1, NS3 o E, separadas por un tripéptido de glicinas o TGS a modo de conector entre los diferentes epítopos (Anandarao *et al.*, 2006, Thakur *et al.*, 2010). Estas construcciones permiten eliminar secuencias conservadas entre distintos virus, las cuales contribuyen a la reactividad cruzada y dificultan el diagnóstico específico.

Posición en NS1	Secuencia aminoacídica
24-34	VEKWKSDYKY
92-111	DPKYYKRAPRRLKKLEDEL
135-153	VDGPETKECPTANRAWNSF
188-195	IKGDRAVH
238-256	ESEMIIPVTLGGPKSHHNK
250-267	PKSHHNKRTGYHTQTKGP
290-307	HCGNRGASLRTTTASGKL
336-343	TKDGCWYGMEIRPVKEEEA

Tabla 3. Secuencias para la construcción de EPS_{SLEV}. Secuencias aminoacídica utilizadas para la construcción de la proteína recombinante EPS_{SLEV} y la posición en la secuencia aminoacídica de NS1.

De esta forma, para el diseño de nuestra construcción se seleccionaron las ocho secuencias aminoacídicas dentro de la proteína NS1 de SLEV, que fueron identificadas como regiones inmunogénicas haciendo uso de herramientas bioinformáticas (**Tabla 3**). Estas regiones poseen una longitud de entre 8 y 19 aminoácidos y sus secuencias no se encuentran completamente conservadas (**Figura 15**), la homología varía entre 46% - 67% cuando se analizan contra las secuencias de los otros virus trabajados. Se detectan los más altos niveles de homología (67%) entre NS1_{SLEV} y NS1_{WNV}, los más bajos (46%) entre NS1_{SLEV} y NS1_{YFV} y valores intermedios entre NS1_{SLEV} y NS1_{DENV} (53%) o NS1_{YFV} (56%).

Se diseñó una construcción sintética que contiene las secuencias nucleotídicas de estas regiones, adicionando una secuencia de tres glicinas como separador. Se incorporaron los sitios de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, en los extremos 5' y 3' respectivamente, los cuales permiten un clonado direccionado en el plásmido de expresión pET-28a. Adicionalmente, los sitios de las enzimas *Sac*I y *Kpn*I fueron incorporados para poder contar con la posibilidad de quitar alguna de las secuencias o formar distintas combinaciones, de manera de analizar variantes de estas proteínas multiepitópes, pudiendo así identificar alguna con mayor eficacia en la especificidad. La secuencia completa posee 441 pares de bases y una vez clonada en el plásmido pET-28a codifica para una proteína de 187 aminoácidos que posee la cola de seis histidinas en ambos extremos. En la **Figura 19** se muestra el diseño y un resumen de los pasos de clonado realizados para lograr la construcción del plásmido de expresión pET-EPS_{SLEV}.

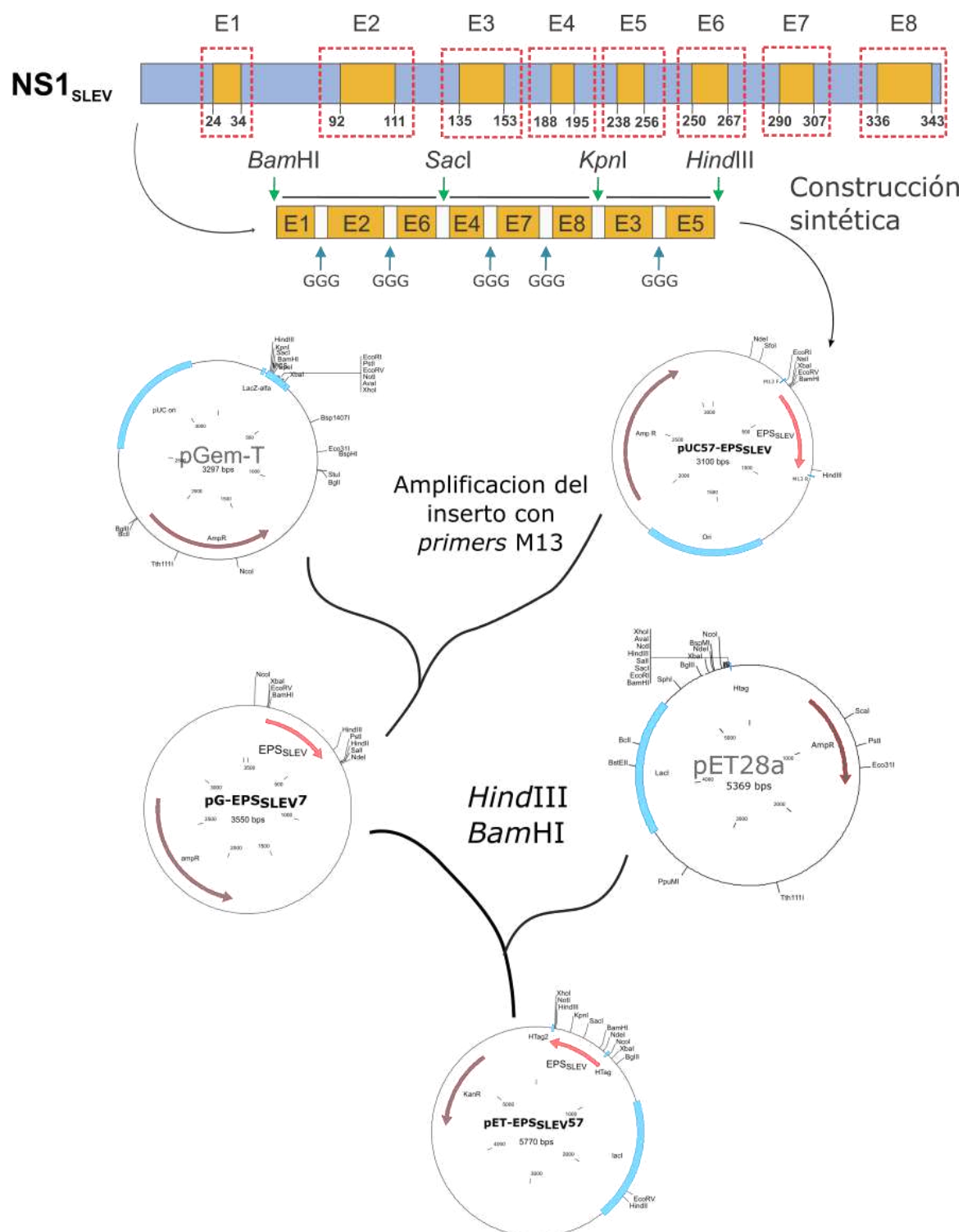


Figura 19. Diseño y clonados del constructo de epítopes de SLEV (EPS_{SLEV}). Los epítopes obtenidos de la predicción bioinformática se señalan dentro de la secuencia de NS1_{SLEV}. Estos se utilizaron para diseñar la construcción sintética que luego fue transferida al vector de expresión pET-22b. Se indican los sitios de corte para enzimas de restricción que permiten distintas combinaciones de epítopes y las secuencias de tres glicinas que funcionan como conectores. Se representan los pasos de clonado para lograr la construcción final (pET-EPS_{SLEV}57).

La secuencia sintética se adquirió en el plásmido pUC-57. Los intentos de realizar el clonado directo al vector pET-28a fueron infructuosos, por lo que se optó por utilizar al vector pGem-T como paso intermedio de clonado. Para ello, la secuencia de EPS_{SLEV} fue amplificada por PCR utilizando los cebadores universales M13 *forward* y M13 *reverse*, que se encuentran flanqueando al sitio de clonado múltiple del plásmido pUC-57. El producto de PCR se ligó al vector pGem-T y se obtuvieron colonias conteniendo plásmidos recombinantes, los cuales fueron analizados por digestiones enzimáticas. En la **Figura 20.A** se muestra el análisis del plásmido que contenía el inserto correcto, pG-EPS_{SLEV}7. El análisis se realizó por digestión enzimática con las enzimas incorporadas en el extremo del fragmento. Como se observa en la imagen, para la verificación del inserto se espera la liberación de un fragmento de aproximadamente 450 pb.

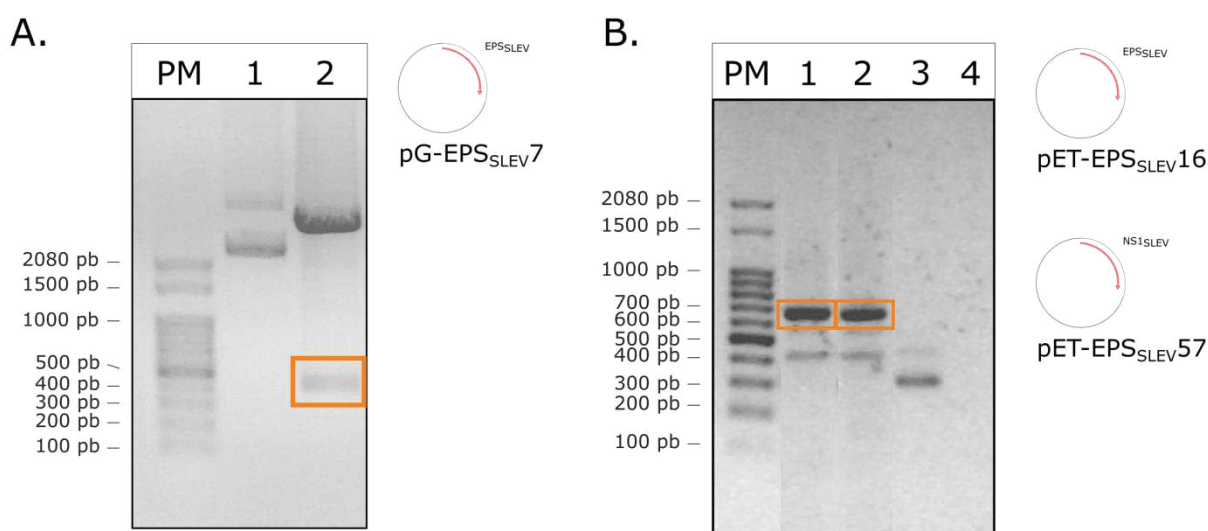


Figura 20: Construcción del plásmido que contiene las regiones inmunogénicas de NS1_{SLEV} **A.** Visualización de la electroforesis en gel de agarosa de la digestión enzimática del clon pG-EPS_{SLEV}7 con las enzimas *Hind*III y *Bam*HI. Calle 1: plásmido pG-EPS_{SLEV}7 sin digerir; calle 2: plásmido pG-EPS_{SLEV}7 digerido. PM: marcador de peso molecular de 100 pb. **B.** Visualización de la electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR (*primers* T7 *prom* y T7 *ter*) de los clones pET-EPS_{SLEV} 16 y 57. Calles 1 y 2: pET-EPS_{SLEV} 16 y 57 como molde de PCR, respectivamente; calle 3: plásmido pET28a como molde de PCR; y calle 4: control negativo. PM: marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L).

Posteriormente, la secuencia se extrajo del plásmido pG-EPS_{SLEV}7 utilizando las enzimas *Bam*HI y *Hind*III y se clonó en el vector de expresión pET-28a. De esta manera se obtuvieron clones recombinantes que fueron analizados por PCR y digestiones enzimáticas. Los clones denominados pET-EPS_{SLEV} 16 y 57, fueron los que tuvieron resultados satisfactorios, y en la **Figura 20.B** se muestra el análisis por PCR. La reacción de PCR se realizó usando los *primers* universales T7 *prom* y T7 *ter*, los cuales se encuentran

flanqueando el sitio de clonado múltiple del vector pET-28a. Así, se espera encontrar una banda de amplificación de 650 pares de bases, correspondiente al inserto correctamente ubicado. Ambos plásmidos fueron positivos para los distintos análisis.

Los dos clones fueron secuenciados, verificando que las dos secuencias eran idénticas a la original, no poseían mutaciones. Por esto, se decidió seleccionar a uno de ellos, el clon pET-EPS_{SLEV}57, para continuar con los pasos de expresión y purificación de la proteína recombinante.

4.2.4 Diseño del plásmido que contiene sitios inmunogénicos comunes en los flavivirus (EPS_{Flavis})

Al igual que lo realizado para diseñar la construcción EPS_{SLEV}, se utilizaron las secuencias obtenidas por predicción bioinformática para diseñar la construcción EPS_{Flavis}. En este caso, se seleccionaron cinco secuencias correspondientes a los aminoácidos comprendidos entre las posiciones 335 y 346 de cada una de las cinco cepas virales usadas en el trabajo. Cada una de las secuencias se encuentra separada por un tri-péptido de glicinas y se adicionaron los sitios de enzimas de restricción para insertarlo en el plásmido de expresión.

Al estar compuesta por secuencias inmunogénicas pertenecientes a los cinco virus planteados en este trabajo, se espera que la proteína generada pueda ser detectada indistintamente por suero de pacientes infectados por flavivirus. De esta manera, se espera poder utilizar el antígeno diseñado en un protocolo de inmunización de animales y de generación de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos generados tendrían la capacidad de detectar la proteína NS1 de distintos flavivirus y podrían ser utilizados en los formatos de ELISA de captura de antígeno, captura de IgM o bloqueo de epítopes, tal como se muestra en los esquemas de la **Figura 13**.

La construcción recombinante se adquirió en el vector de expresión pET-28a. La secuencia completa posee 216 pares de bases y una vez clonada en el plásmido pET-28a codifica para una proteína de 101 aminoácidos que posee una cola de seis histidinas en ambos extremos. El diseño de esta construcción se muestra en la **Figura 21**.

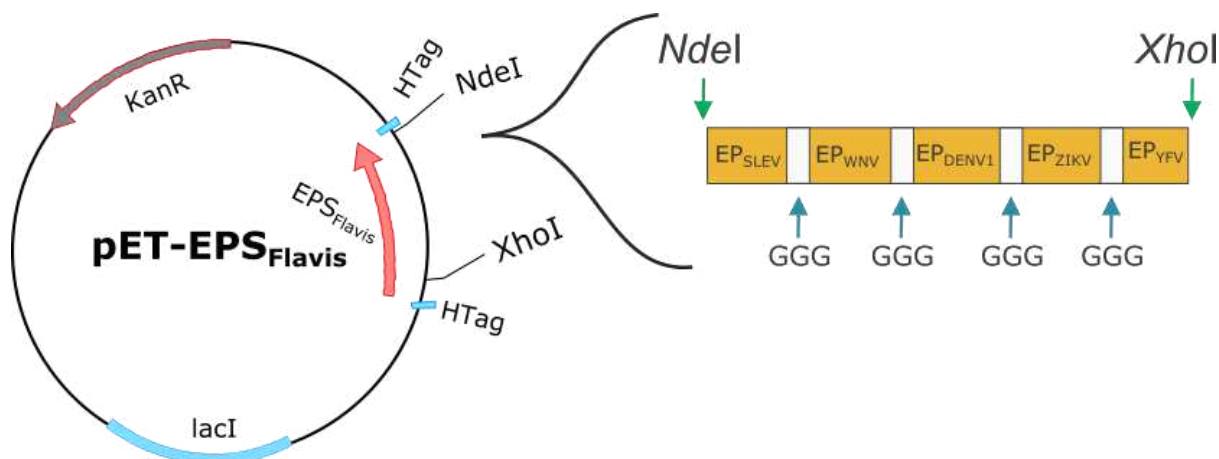


Figura 21. Diseño del constructo de epítopos de flavivirus (EPS_{Flaviv}). El epítopo comprendido entre las posiciones 335 y 346 de cada una de las cepas virales del trabajo, se utilizó para diseñar una construcción sintética que luego fue transferida al vector de expresión pET-22b. Se indican los sitios de corte para enzimas de restricción y las secuencias de tres glicinas que funcionan como conectores. Dentro del vector la proteína se encuentra fusionada a dos colas de seis histidinas.

En la **Figura 1 del Anexo** se muestra la secuencia aminoacídica de las proteínas recombinantes producidas, indicando cada uno de los elementos agregados.

4.3 Producción de las Proteínas Recombinantes

4.3.1 Ensayos de inducción de la expresión en bacterias

En este trabajo hemos empleado el sistema de expresión bacteriana para la producción de la proteína NS1 de distintos Flavivirus. Este sistema de expresión es el comúnmente empleado para la producción de proteínas recombinantes que no requieran modificaciones postraduccionales específicas para su función, como es el caso de la detección de epítopos secuenciales. Estos organismos son simples de manipular y es posible llevar adelante una optimización en un corto período de tiempo. Esta circunstancia da lugar a la rápida identificación de varias condiciones de crecimiento e inducción para la producción a escala media. Muchos genes eucariotas no se pueden expresar de manera eficiente en *E. coli* debido a la diferencia en la frecuencia de uso de codones (*codon bias*). Ante esto, es posible “adaptar” las construcciones plasmídicas, como por ejemplo, llevar adelante la síntesis química de las mismas con los codones optimizados para la expresión en bacterias, o bien utilizado plásmidos que complementan los tRNA bacterianos.

Una vez que se confirmó la integridad e identidad de los clones recombinantes, los mismos fueron transferidos a las cepas de expresión de *E. coli*. En el caso de los plásmidos pET-2SL y pET-5YF se usó la cepa BL21 (DE3) Rosetta y los cultivos se mantuvieron en todo momento con el antibiótico cloranfenicol y el correspondiente para cada plásmido de

expresión. En cambio, para el resto de las construcciones se utilizó la cepa BL21 (DE3) y solo se agregó el antibiótico necesario para mantener los plásmidos de expresión. El procedimiento de expresión se realizó en las condiciones estándar obtenidas de bibliografía, las cuales se detallan en la **sección 3.3.2 de Materiales y Métodos**. La inducción se realizó utilizando 1 mM IPTG, cuando el cultivo alcanzó las 0,6 unidades de $DO_{600\text{ nm}}$. El proceso de expresión se extendió durante 4 horas en las que la temperatura se mantuvo constante en 37°C. Luego de esto, las bacterias fueron colectadas en alícuotas de 0,2 unidades de $DO_{600\text{ nm}}$ y congeladas para su posterior análisis, luego de llevar adelante la precipitación de las mismas.

Las muestras obtenidas fueron procesadas y analizadas por SDS-PAGE. Este análisis permitió visualizar la expresión de las proteínas recombinantes y en la **Figura 22** se muestran los resultados obtenidos a partir de estos ensayos. De esta forma, la figura muestra las bandas de sobreexpresión de los clones pET-2SL (NS1-HT_{SLEV} de 41 kDa) y pET-WN (NS1-HT_{SLEV} de 41 kDa). Además, se agregó un control positivo de expresión conteniendo la proteína poliedrina de Baculovirus clonada en el vector de expresión pET-22b (pET-PolH), para el cual se observa una banda coincidente con 35 kDa de peso molecular; y un control negativo de expresión formado por el plásmido pET-22b vacío. Por otro lado, se pueden observar las bandas correspondientes a la expresión de los clones pET-DEN1 (NS1_{DENV1} de 43 kDa), pET-EPS_{SLEV}57 (EPS_{SLEV} de 20 kDa), pET-5YF (NS1_{YFV} de 43 kDa), pET-ZIK (NS1_{ZIKV} de 43 kDa) y pET-EPS_{Flavis} (EPS_{Flavis} de 11 kDa). Para todos los casos se muestra el extracto de los cultivos sin inductor, en los que no se observan las bandas de sobreexpresión.

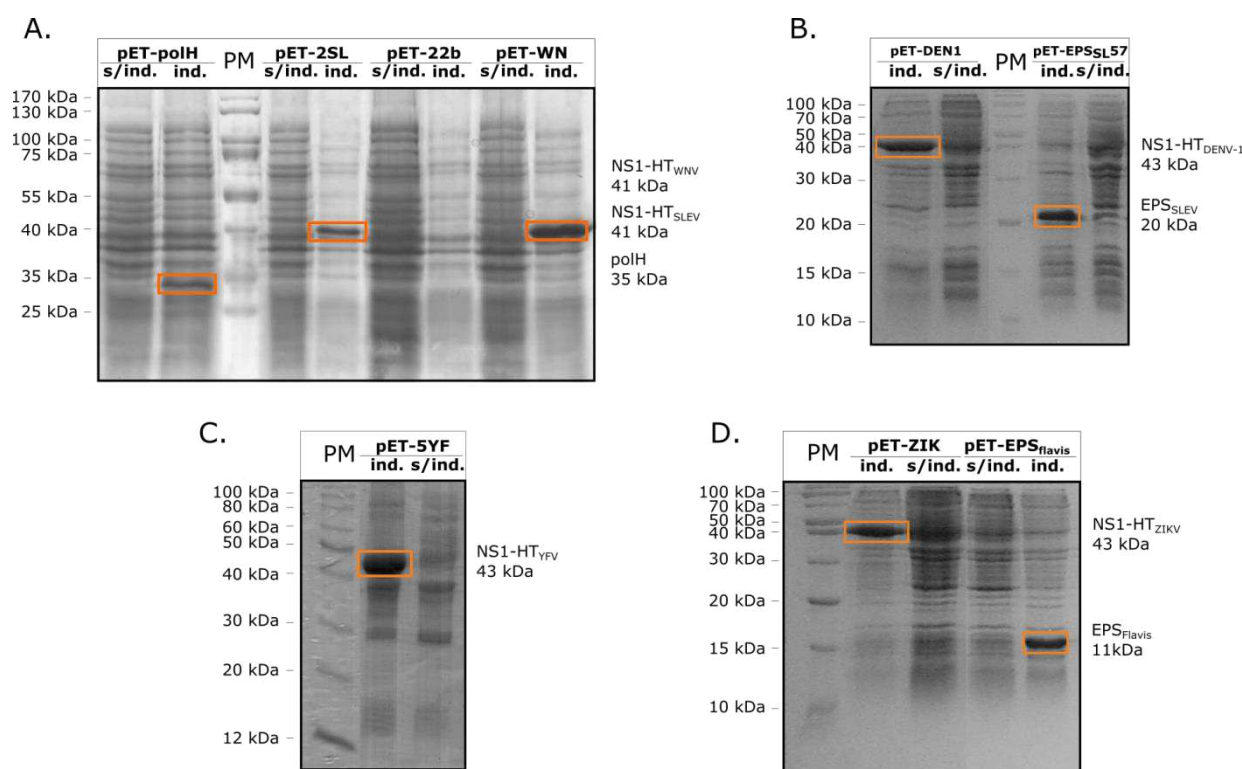


Figura 22. Expresión de las distintas proteínas recombinantes. Visualización de electroforesis en gel de poliacrilamida de los ensayos de expresión de los clones recombinantes. En todos los casos pueden observarse los extractos de cultivos inducidos (ind.) y sin inducir (s/ind.), marcador de peso molecular de proteínas (PM) (Thermo Fisher Scientific), señalándose las bandas de interés con cajas naranjas. **A.** Perfil proteico obtenido a partir de la inducción de los clones pET-2SL y pET-WN, empleando como control positivo de la expresión al plásmido pET-polH (SDS-PAGE 12%). **B.** Expresión de los clones pET-DEN y pET-EPS_{SL57} (SDS-PAGE 15%). **C.** Expresión del clon pET-5YF (SDS-PAGE 12%). **D.** Expresión de los clones pET-ZIK y pET-EPS_{Flavis} (SDS-PAGE 15%).

Una vez verificada la expresión de todas las variantes se procedió a llevar adelante la optimización de este ensayo, con el objeto de identificar la combinación de parámetros que conduzcan al aumento de la cantidad de proteína producida. Por tanto, se analizaron distintos inductores y tiempos de inducción. Como primera alternativa se disminuyó la concentración del inductor IPTG, empleando al vector pET-WNV. Para este ensayo se utilizó 50 μ M, una concentración 20 veces menor que la estándar, y los resultados se pueden observar en la **Figura 23.A**. En esta condición, se incubaron sendos cultivos inducidos durante cuatro horas y toda la noche, pudiéndose observar que a las 4 horas el nivel de expresión es menor en el caso del IPTG 50 μ M comparado con el de 1 mM IPTG en el mismo tiempo, el cual es alcanzado cuando se incubaba durante toda la noche. Los mismos resultados se obtuvieron con las expresiones de los otros clones (datos no mostrados).

Este ensayo sugiere que utilizar IPTG 50 μ M durante toda la noche sería una alternativa viable para producir las proteínas recombinantes sin perder rendimiento.

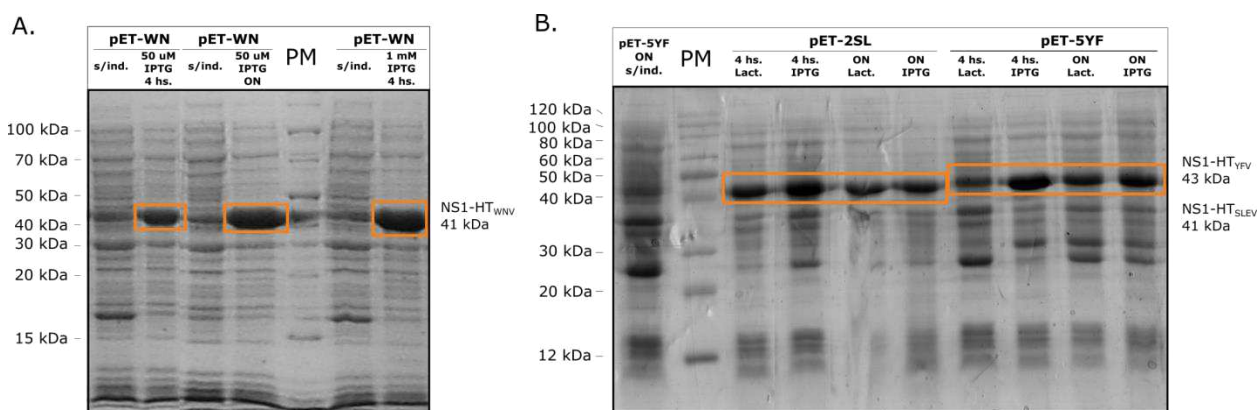


Figura 23. Optimización de la expresión. Visualización de la electroforesis en gel de poliácridamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 12%). **A.** Ensayo de inducción con IPTG de distintas concentraciones y distintos tiempos de expresión. Se muestran los extractos bacterianos correspondientes al clon pET-WN inducido con 1 mM IPTG durante 4 horas e inducido con 50 μM IPTG durante 4 horas y durante toda la noche (ON, *over night*). En todos los casos se muestran los mismos cultivos sin inductor (s/ind.). **B.** Ensayo de inducción con IPTG y Lactosa y distintos tiempos de expresión. Se muestran, para las bacterias conteniendo los plásmidos pET-2SL y pET-5YF, las proteínas obtenidas luego de la inducción con 1 mM IPTG o lactosa 1% durante 4 horas o toda la noche (ON). Las cajas naranjas indican las bandas correspondientes a NS1-HT_{SLEV} y NS1-HT_{YFV}. Como control negativo se muestra el clon pET-5YF sin inductor. PM: marcador de peso molecular de proteínas (Thermo Fisher Scientific).

Otra variable analizada es la utilización de lactosa como inductor. En este caso se reemplazó el IPTG por lactosa 1% y se analizó la expresión en cuatro horas y toda la noche. En la **Figura 23.B** se muestran los resultados producto de estos cambios para en los clones pET-2SL y pET-5YF. Por un lado, podemos ver que en el control sin inductor no se observa la banda de sobreexpresión, mientras que la cantidad de proteína sobreexpresada es similar para las dos variantes recombinantes, independientemente de las condiciones planteadas. Si se comparan los productos proteicos a las cuatro horas de expresión, la banda generada con 1 mM IPTG es visiblemente mayor que la generada con 1% lactosa para los dos clones. Cuando se analizan las bandas de sobreexpresión generadas durante toda la noche la banda correspondiente a la inducción con lactosa es similar a la producida con IPTG.

Sabiendo que la lactosa, a diferencia del IPTG, funciona como fuente de carbono se procedió a medir la $DO_{600\text{ nm}}$ para estimar el crecimiento de cada cultivo. En la **Tabla 4** podemos ver los valores obtenidos, destacando que en todos los casos se observa que el cultivo inducido con lactosa se encuentra con mayor densidad óptica al momento de la cosecha. Este dato es importante al analizar la expresión realizada durante toda la noche. Si bien las bandas de sobreexpresión son similares para ambos inductores, el cultivo que contiene lactosa posee casi el doble de cantidad de células, indicando que la cantidad de proteína recombinante en el cultivo es mayor.

Este resultado nos indica que el IPTG es más eficiente para la producción proteica en tiempos cortos. Sin embargo, la utilización de lactosa nos permite obtener las mismas cantidades de proteína de una manera más económica cuando los cultivos se mantienen toda la noche.

DO _{600 nm}	pET-5YF	pET-2SL
IPTG 1 mM - 4 hs.	1,6	2,7
Lactosa 1% - 4 hs.	7,50	15,28
Control s/inductor - 4 hs.	1,5	3
IPTG 1 mM - ON	4	6,87
Lactosa 1% - ON	8,87	14,32
Control s/inductor - ON	4,15	5,89

Tabla 4. Comparación de la densidad óptica a 600 nm en los cultivos inducidos con IPTG o lactosa. Se muestran las densidades ópticas obtenidas en cultivos de pET-2SL y pET-5YF, inducidos con IPTG 1 M o Lactosa 1% durante 4 horas o toda la noche (ON).

En resumen, se identificaron varias condiciones en donde es posible producir las proteínas recombinantes. Se obtuvieron las condiciones estándar, inducción con 1 mM IPTG agregado cuando el cultivo alcanza las 0,6 unidades de DO_{600 nm} y expresión durante 4 horas a 37 °C. Este protocolo puede ser modificado ya sea con el agregado de una menor cantidad de IPTG, 50 µM, o con el agregado de 1% de lactosa y el aumento del tiempo de expresión a 16 horas.

Una vez determinadas estas condiciones, los protocolos de expresión se realizaron en Erlenmeyers de 250 ml, con un volumen de 100 ml de cultivo.

Utilizando estas condiciones se obtienen aproximadamente 20 mg de proteína por cada litro de cultivo bacteriano. Este rendimiento se encuentra entre los valores reportados para la expresión de la NS1 flaviviral en bacterias, el cual ronda entre los 10 y los 30 mg/l (Yohan *et al.*, 2017). Alternativamente, se encuentra reportada la expresión en otros sistemas, como levaduras en el cual se expresa NS1 a 70 mg/l, o sistemas de baculovirus y células de mamíferos, pero con menores rendimientos (Das *et al.*, 2009).

4.3.2 Escalado de los ensayos de expresión

Con el propósito de explorar las posibilidades de aumentar la cantidad de proteína producida, se procedió al escalado de los volúmenes de cultivo manejados. Para ello, se contó con la colaboración del laboratorio de Bioprocesos, dirigido por la Dra. Lorena Rojas, que cuenta con una amplia experiencia en estas metodologías.

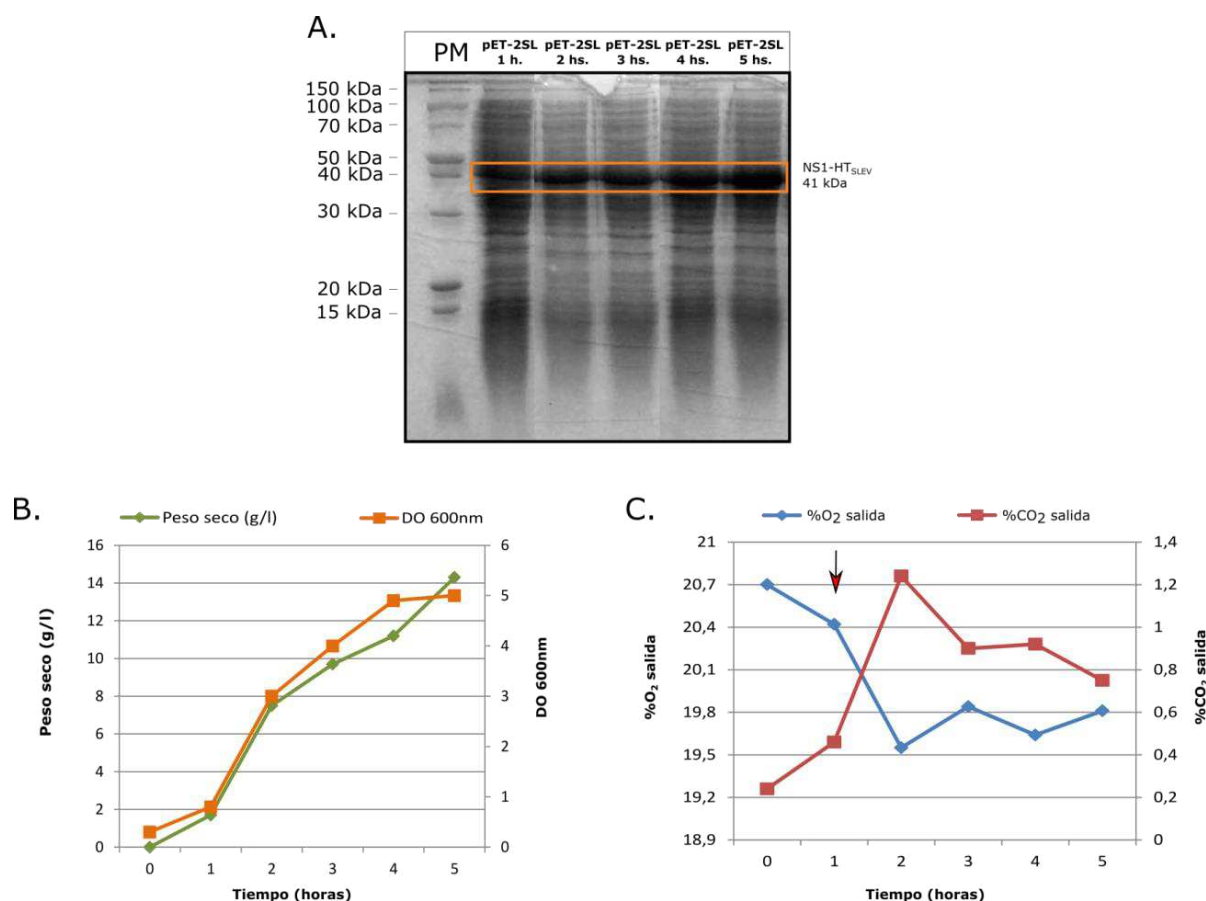


Figura 24. Ensayo de expresión en fermentador del clon pET-2SL. **A.** Visualización de la electroforesis en gel de poliacrilamida del ensayo de expresión en fermentador. Se muestran los extractos correspondientes a 1, 2, 3, 4 y 5 horas de cultivo del clon pET-2SL. El momento de inducción es luego de la primera hora. La caja naranja señala las bandas correspondientes a NS1-HT_{SLEV}. PM: marcador de peso molecular de proteínas (Thermo Fisher Scientific). **B.** Determinación del crecimiento bacteriano durante el cultivo. Se emplearon dos métodos de medición, por un lado la determinación de densidad óptica y por otro la obtención del peso seco de las células. Se indica con una flecha el momento de la inducción. **C.** Seguimiento de la salida de gases, %O₂ y %CO₂. El %O₂ de entrada se midió en 20,93. Se indica con una flecha el momento de la inducción.

Los ensayos de escalado se realizaron utilizando la proteína NS1-HT_{SLEV} y la producción se realizó en un biorreactor de 5 litros. Para ello, 3,5 litros de medio Luria Bertani se inocularon con 2% de su volumen de un cultivo de *E. coli* que posee el plásmido recombinante de interés. La etapa de crecimiento se realizó a 37 °C y, a la hora de iniciado el cultivo, éste se indujo con 1 mM de IPTG. La etapa de expresión se realizó a 37 °C durante 4 hs. Durante todas las etapas del proceso se monitoreó el O₂ disuelto, el pH y la concentración de O₂ y CO₂ de los gases de salida y la biomasa, así como también la presencia de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE. La cantidad de proteína recombinante obtenida por litro de cultivo fue similar a la obtenida en los ensayos a pequeña escala: ~ 20 mg/l de cultivo bacteriano. La visualización del proteoma de las bacterias obtenidas a cada hora se muestra en la **Figura 24.A**, mientras que la cinética del crecimiento bacteriano se muestra en la **Figura 24.B**.

La determinación de los gases de salida arrojó los resultados mostrados en la **Figura 24.C**, el O_2 de entrada fue medido en 20,93%. Se observa como el % O_2 salida va disminuyendo durante la etapa de crecimiento, mientras que el % CO_2 salida aumenta producto del aumento del metabolismo. Posteriormente, al momento de inducción, se observan cambios en las mediciones producto de la disminución de la velocidad de crecimiento, afectada por el IPTG. Finalmente, a las 5 horas de cultivo, los nutrientes se agotan lo que lleva a la disminución del metabolismo y el aumento del % O_2 de salida y la disminución del % CO_2 de salida.

4.3.3 Purificación

Posteriormente a la obtención de los cultivos bacterianos, las células se cosechan y se someten a un proceso de ruptura celular para lograr la liberación de las proteínas.

Se realizaron dos variantes de ruptura celular dependiendo del volumen de cultivo inicial. En el caso de los cultivos provenientes de Erlenmeyer, generalmente no mayores a 100 ml, se empleó el método de ultrasonido. Posteriormente a este proceso, las muestras se centrifugaron a fin de separar la fase soluble de la insoluble y ambas fracciones se analizan por SDS-PAGE. En la **Figura 25.A** se muestran los perfiles obtenidos para los casos de los plásmidos pET-2SL y pET-ZIK. Para ambos se sembraron las células sin romper y las fracciones soluble e insoluble luego de la ruptura. El proteoma de las bacterias se detecta en la fase soluble, mientras que las proteínas recombinantes generadas, se encuentran en su totalidad en la fase insoluble. Si bien toda la proteína de interés se encuentra formando cuerpos de inclusión, estos también están constituidos por otras proteínas bacterianas que son arrastradas a la fase insoluble.

Es muy común que durante la sobreexpresión de genes heterólogos en *E. coli*, particularmente cuando son de origen animal, las proteínas expresadas tiendan a precipitar formando cuerpos de inclusión. Aunque la actividad biológica de la proteína en este estado se ve afectada, algunos estudios muestran que las proteínas insolubles pueden usarse con éxito para producir anticuerpos policlonales (Calabria *et al.*, 2019, Viranaicken *et al.*, 2017). Además, los cuerpos de inclusión pueden representar algunas ventajas ya que son menos vulnerables a la degradación y pueden permanecer más tiempo en los tejidos, evitando su eliminación rápida, lo que, en teoría, podría requerir menos refuerzos o incluso la necesidad de usar adyuvantes. Esta particularidad, también presenta una ventaja durante la etapa de purificación, obteniéndose mejores rendimientos y niveles de purificación comparando con otras proteínas solubles (Das *et al.*, 2007, Lemos *et al.*, 2013).

En el caso que se requiera producir las proteínas en su forma nativa, es necesario emplear sistemas de expresión eucariotas. Se encuentra reportada la producción de NS1 en

lavaduras y en células Vero en las cuales se mantiene tanto el plegamiento nativo como el patrón de glicosilaciones (Allonso *et al.*, 2019, Viranaicken *et al.*, 2018). Alternativamente, se ha producido a la proteína NS1 de Dengue en plantas (*Nicotiana benthamiana*), y aunque si bien se produce en grandes cantidades, los protocolos de purificación presentan una mayor complejidad (Marques *et al.*, 2019).

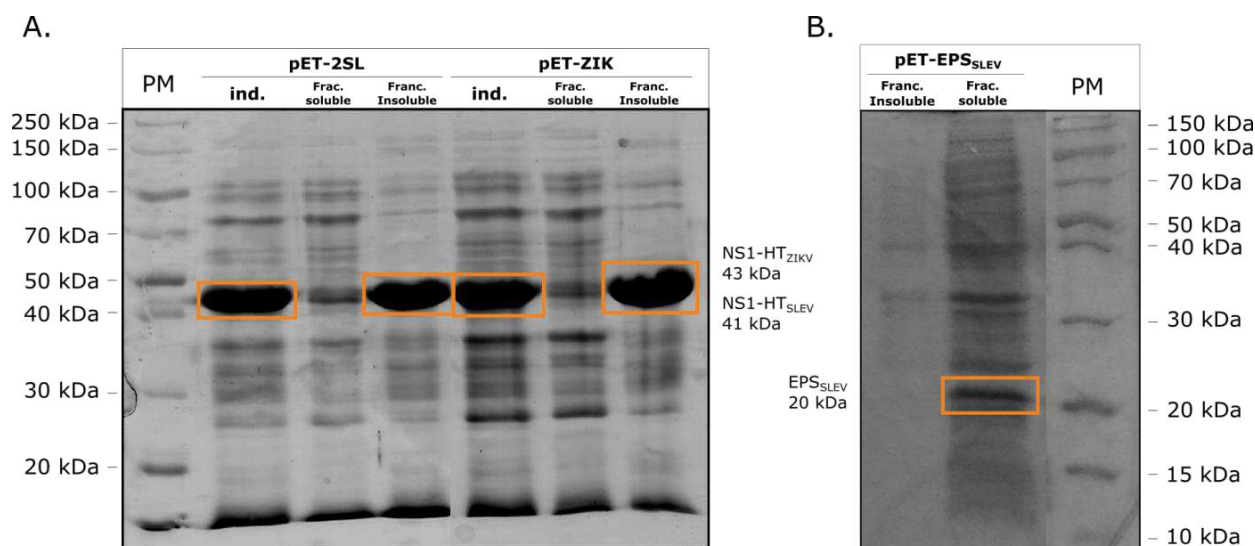


Figura 25. Ruptura celular mediante sonicatedo. Visualización de la electroforesis en gel de poliacrilamida de la ruptura por sonicatedo de: **A.** Clones pET-2SL y pET-ZIK. Se realizó la corrida en un SDS-PAGE 12%, donde se muestran los extractos inducidos (ind.) previos a la ruptura, y las fracciones obtenidas por centrifugación luego de la ruptura. Para ambos clones se muestra la fracción soluble (Frac. Soluble) y la fracción insoluble (Frac. Insoluble); y **B.** Clon pET-EPS_{SLEV}. Se muestra la fracción soluble e insoluble y se señala la banda correspondiente a EPS_{SLEV} (20kDa). PM: marcador de peso molecular de proteínas (Thermo Fisher Scientific).

Las proteínas contenidas en los cuerpos de inclusión no se encuentran en la conformación nativa, sin embargo poseen una mayor capacidad inmunogénica cuando son utilizadas en ensayos de inmunización de animales. Si bien pueden conservar algunos epítopos conformacionales, el interés en estos antígenos radica en que mantienen sus epítopos secuenciales y estos pueden ser detectados por los anticuerpos presentes en el suero. Varios de estos epítopos lineales han sido descritos para la proteína NS1 de distintos flavivirus y se ha determinado su capacidad de ser detectados por el sistema inmune (Chen *et al.*, 2010). De esta manera, se han podido caracterizar epítopos secuenciales que permitirían la diferenciación de los virus Dengue y Zika, si bien las secuencias de los epítopos tienen alta homología las diferencias se encuentran en las secuencias flanqueantes lo cual cambiaría la afinidad del anticuerpo (Freire *et al.*, 2017). Por otro lado, también se han podido caracterizar una secuencia inmunogénica entre las posiciones 227 y 232 de NS1, la cual se encuentra completamente conservada dentro del

complejo del JEV y permitiría la diferenciación con los virus de Dengue (Hua *et al.*, 2014). Esta secuencia no ha sido detectada en nuestro trabajo ya que posee una longitud menor a la definida en nuestros experimentos, de todas maneras resulta interesante tenerla en cuenta para futuras construcciones que estén orientadas a diferenciar Dengue de otros flavivirus. Los epítopes lineales en NS1 del virus *West Nile* han sido completamente caracterizados producto de varios trabajos, pudiendo encontrarse algunos epítopes virus-específicos que llevaron a plantearse como base de ensayos de diagnóstico y otros que poseen reacción cruzada con virus relacionados (Sun *et al.*, 2011, Sun *et al.*, 2012a, Sun *et al.*, 2012b).

A diferencia de lo que se observaba con las versiones de NS1-HT completa, las construcciones conteniendo los sitios inmunogénicos generan la proteína de manera soluble. Probablemente, esto se deba al pequeño tamaño que poseen las proteínas generadas, lo cual le permite lograr un plegamiento adecuado que favorece su solubilidad, y que las secuencias que la compone se caracterizan por ser hidrofílicas. En la **Figura 25.B**, luego de la ruptura, se puede observar que el proteoma de la bacteria se encuentra en la fase soluble y en la misma fracción la totalidad de la proteína de interés, EPS_{SLEV}. Una pequeña cantidad de proteínas se detectan en la fase insoluble, las cuales probablemente sean proteínas bacterianas asociadas a los cuerpos de inclusión o provengan de bacterias sin romper.

En el caso de los cultivos provenientes del fermentador, debido a su volumen, no pueden ser sometidos a ruptura por sonicación. Por ello, se optimizó el proceso de ruptura celular mediante el uso de la prensa de French. Si bien la ruptura se produce por un efecto físico distinto a la sonicación, este equipo es ampliamente utilizado para la homogenización de cultivos bacterianos y es igualmente eficiente. De esta manera es posible separar por centrifugación ambas fases y continuar con el proceso de purificación.

Una vez obtenidas las fases, se recupera la fracción insoluble y las proteínas formando cuerpos de inclusión deben ser solubilizadas haciendo uso del *buffer* A desnaturizante, el cual contiene el agente caotrópico urea. En este momento, la muestra se encuentra en condiciones para continuar con el proceso de purificación a través del equipo *ÄKTA Prime Plus* y las columnas cromatográficas HisTrap FF. Es muy importante obtener las proteínas con un alto grado de purificación para realizar los estudios posteriores, para ello se hizo uso de la posibilidad que brindan los vectores pET-22b y pET-28a de obtener las proteínas recombinantes fusionadas a una secuencia de seis histidinas. Esta cola de histidinas permite la purificación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de pseudoafinidad a níquel.

El proceso de purificación de las distintas variantes de NS1 completas se inicia con la inyección de la muestra en la columna en dos fracciones de 7,5 ml cada una, registrándose

un aumento en los valores de absorbancia a 280 nm y constituyendo los dos primeros picos en el cromatograma (**Figura 26.A**). Esto se debe a la presencia de otras proteínas en el extracto que, dado que no tienen la secuencia de histidinas necesarias para la interacción, pasan a través de la matriz cromatográfica sin ser retenidas (volumen muerto). Seguidamente, se realiza el lavado utilizando el *buffer* A desnaturalizante para eliminar el pegado inespecífico. La elución se lleva a cabo haciendo uso del *buffer* B desnaturalizante, el cual contiene 500 mM Imidazol. Esta etapa permite detectar el aumento de absorbancia a 280 nm correspondiente al despegado de la columna de la proteína de interés (**Figura 26.A**).

La **Figura 26.B** corresponde al ensayo de SDS-PAGE conteniendo las fracciones colectadas durante el proceso cromatográfico. Dentro de la etapa de inyección de la muestra podemos observar la presencia de proteínas colectadas que no interaccionan con la columna, mientras que durante la etapa de elución aparece la proteína de 41 kDa que corresponde a NS1-HT_{WNV}. Finalmente, las fracciones conteniendo la proteína de interés son unificadas y congeladas para su posterior uso.

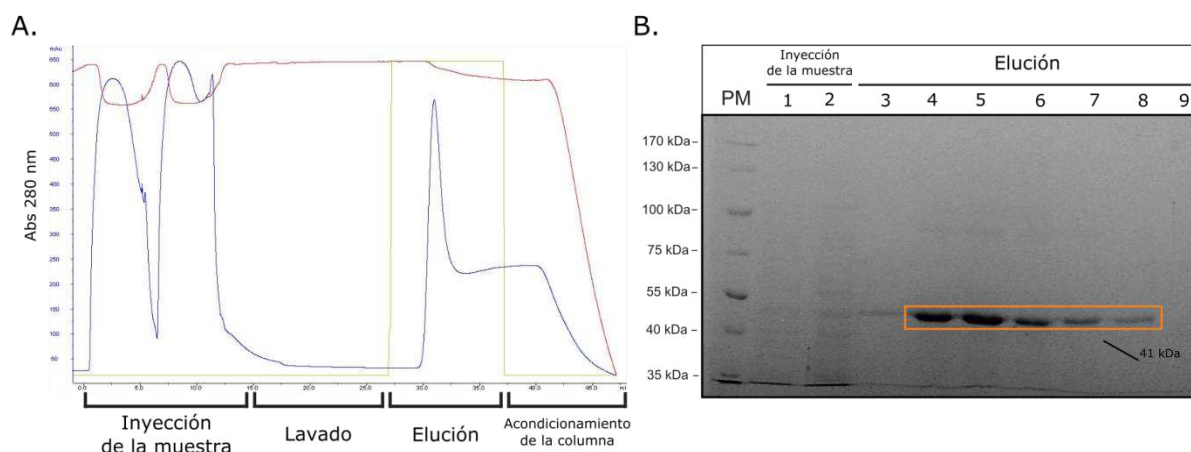


Figura 26. Seguimiento y análisis del proceso de purificación. A. Cromatograma obtenido durante al proceso de purificación de NS1-HT_{WNV} recombinante. En azul de muestra la absorbancia a 280 nm, en rojo la conductividad y en verde la proporción de buffer de elución, todo en función del volumen de corrida. Se señalan las etapas principales, inyección de la muestra, lavado para eliminar pegado inespecífico, elución y reconstitución de la columna. **B.** Visualización de la electroforesis en gel de poliacrilamida del ensayo purificación. Se realizó la corrida en un SDS-PAGE 12%. Se muestran fracciones obtenidas durante la inyección de la muestra (calles 1 y 2) y fracciones colectadas durante la elución (calles 3 a 9). La flecha señala las bandas correspondientes a NS1-HT_{WNV} (41 kDa). PM: marcador de peso molecular de proteínas Thermo Fisher Scientific).

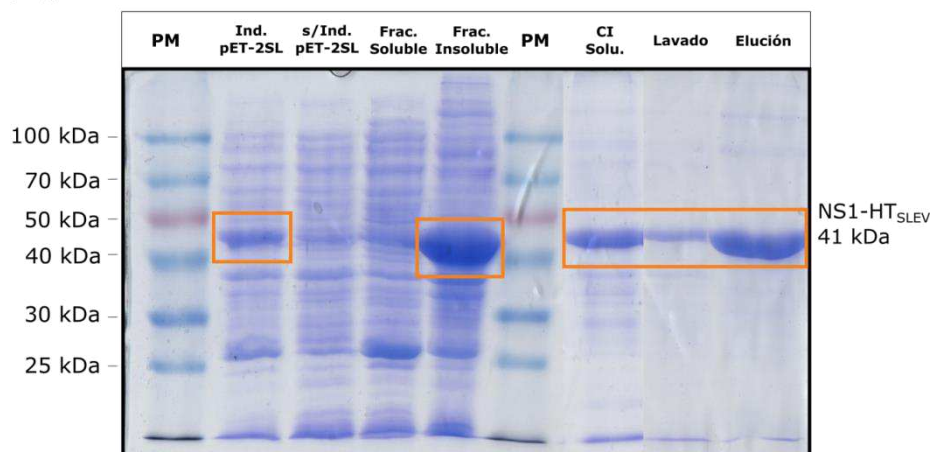
Para el caso de las construcciones conteniendo los sitios inmunogénicos, el proceso de purificación es ligeramente diferente debido a que al momento de la ruptura celular se encuentran en la fase soluble. En un primer intento de purificación se inyectó de forma directa la fase soluble a la columna. Esto no fue satisfactorio debido a que las proteínas no

quedaban retenidas en la matriz y eran eluidas con el volumen muerto. Si bien estas proteínas generadas son solubles, es posible que posean un plegamiento que no permite que la secuencia de seis histidinas quede accesible para interaccionar con la columna. Debido a esto, se decidió realizar la ruptura por sonication en el *buffer* A desnaturalizante, y de esta manera obtener las proteínas solubles completamente desplegadas. Luego, se procedió a verificar la interacción con la columna, continuando así con el proceso de purificación.

La fase soluble en *buffer* A desnaturalizante se inyecta en la columna y se realiza el lavado utilizando el mismo *buffer*, en un proceso similar al utilizado para las versiones de NS1-HT completas. A continuación, este *buffer* se intercambia gradualmente por *buffer* A nativo (es decir, sin urea), de manera de lograr el replegado de las proteínas dentro de la columna. Durante la etapa de elución se emplea el *buffer* B nativo, obteniéndose de forma purificada las proteínas constituidas por los sitios inmunogénicos de NS1.

La **Figura 27** muestra un resumen de todas las etapas de producción y purificación de las proteínas NS1-HT_{SLEV} y NS1-HT_{WNV}. Se pueden visualizar la banda de expresión diferencial entre los cultivos inducidos y no inducidos, la separación de fases (soluble e insoluble) luego del proceso de ruptura, la solubilización de los cuerpos de inclusión que luego serán inyectados en la columna, y las fracciones correspondientes al lavado y elución del proceso cromatográfico.

A.



B.

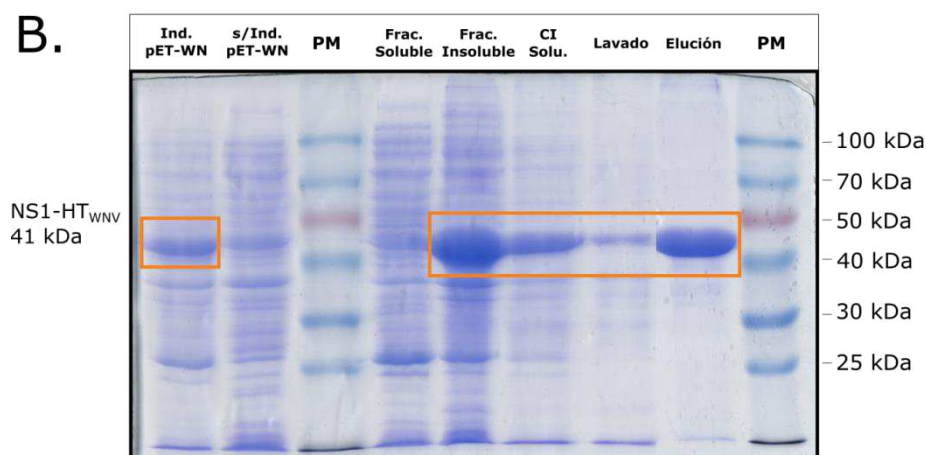


Figura 27. Etapas de producción de las proteínas recombinantes NS1-HT_{SLEV} y NS1-HT_{WNV}. Visualización en gel de poliacrilamida de las etapas expresión, solubilización y purificación de las proteínas recombinantes generadas. Se muestran los extractos de los cultivos inducidos (ind.), sin inducir (s/ind.), fracción soluble y fracción insoluble, cuerpos de inclusión solubilizados (CI solu.), y fracciones del lavado y elución del proceso de purificación. Los recuadros señalan las bandas correspondientes a NS1-HT_{SLEV} y NS1-HT_{WNV}. PM: marcador de peso molecular de proteínas (Thermo Fisher Scientific). **A.** Fracciones correspondientes al plásmido pET-2SL y la proteína NS1-HT_{SLEV} (SDS-PAGE 12%). **B.** Fracciones correspondientes al plásmido pET-WN y la proteína NS1-HT_{WNV} (SDS-PAGE 12%).

Los parámetros de purificación de cada etapa del proceso de producción de las proteínas recombinantes se muestran en la **Tabla 5**. Estos valores son estimados para todas las proteínas producidas y muestran que las mismas son obtenidas en un nivel alto de pureza (95%). Prácticamente, es posible recuperar casi toda la proteína producida en el cultivo, la liberada en el paso de ruptura y luego de la solubilización de los cuerpos de inclusión. El paso cromatográfico es en donde se pierde mayor rendimiento debido a la proteína que se despegue de la columna durante el paso de lavado, como se puede observar en la **Figura 27**.

Luego de todo el proceso, se obtienen 10 ml que contienen a cualquiera de las proteínas recombinantes de forma purificada. Las concentraciones, medidas por el método de Bradford, rondan entre los 200 y los 300 µg/ml para las versiones de NS1-HT completas, y entre los 100 y los 200 µg/ml para las versiones pequeñas conformadas por los sitios inmunogénicos.

	Pureza (NS1-HT/Proteína total)	Factor de purificación	Rendimiento
Lisado de cultivo bacteriano	20%	0,0	100%
Separación fases y solubilización	60%	3,0	99%
Purificación por columna de pseudofinidat a Níquel	95%	4,8	85%

Tabla 5. Parámetros de purificación. Se muestran los parámetros que permiten el seguimiento de la purificación. Los valores son similares para el proceso de purificación de todas las proteínas recombinantes producidas.

4.3.4 Eliminación de las condiciones desnaturalizantes

Si bien no llegó a ser utilizado en este trabajo, se diseñó un protocolo de replegado para posibilitar el trabajo con las proteínas en *buffer* nativo. Los detalles se encuentran en la **sección 3.4.4 Replegado** y consta del agregado de *buffer* nativo de manera muy lenta para lograr la dilución paulatina del agente desnaturalizante. Posteriormente, se le adicionó un paso de concentración mediante un concentrador de tubo cónico para adecuar a las concentraciones de trabajo. La necesidad de contar con los antígenos en soluciones no desnaturalizantes radica en que, para los diseños de ELISA en donde el antígeno se incubaba sobre anticuerpos ya adheridos en la placa, la urea (o el cloruro de guanidinio) impide la interacción antígeno-anticuerpo.

Sección V

Resultados y Discusión

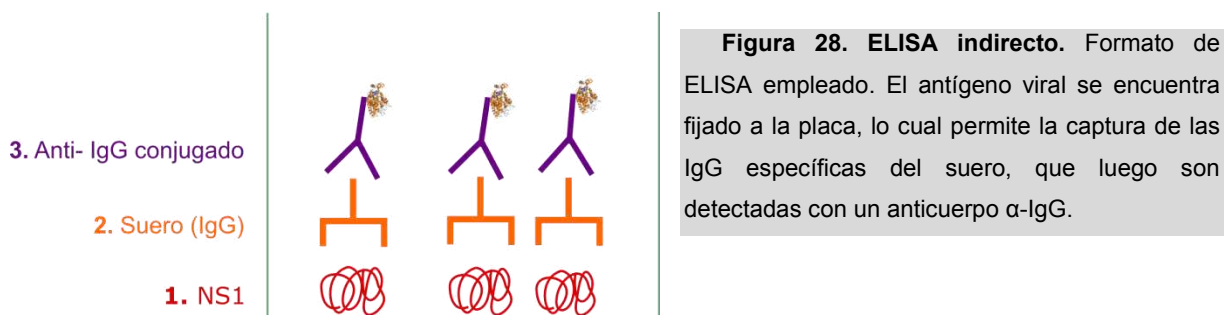
Parte II

5.1 Ensayos Inmunológicos

Esta sección está constituida por las pruebas de factibilidad necesarias para la potencial utilización de las proteínas recombinantes producidas como antígenos en ensayos de diagnóstico de flavivirus. Comprende la caracterización inmunológica de las mismas, así como el diseño y optimización de un ensayo de ELISA indirecto empleando los antígenos NS1_{SLEV} y NS1_{WNV} utilizando muestras de sueros humanos positivos y negativos.

5.1.1 Diseño y optimización del ensayo de ELISA utilizando los antígenos de SLEV y WNV

Las proteínas recombinantes purificadas fueron empleadas en la evaluación de un método serológico que pueda dar lugar al desarrollo de un ensayo de diagnóstico. El formato seleccionado es el de ELISA indirecto, el cual permite la detección de anticuerpos IgG séricos (**Figura 28**). Los antígenos producidos en este trabajo se adaptan fácilmente a su empleo en este formato de ELISA, por ello lo empleamos como una primera aproximación que nos permite caracterizar los antígenos generados. Posteriormente, para su uso en otros formatos, en donde los antígenos deban ser incubados sobre anticuerpos ya adheridos en la placa (como el formato MAC-ELISA), los antígenos deben ser renaturalizados. Este paso resulta esencial ya que, el agente coatrópico presente en el *buffer* empleado para purificar las proteínas en condiciones desnaturalizantes, desestabiliza la estructura de los anticuerpos, impidiendo las interacciones de afinidad.



Si bien el formato de MAC-ELISA es el método más utilizado para diagnosticar las infecciones recientes, la detección de IgG mediante ELISA indirecto es importante para determinar infecciones pasadas (o vacunación en otros casos), lo que lo convierte en una herramienta central en estudios de seroprevalencia. Por otro lado, estos dos ensayos suelen usarse combinados a fin de reducir los resultados erróneos producto de las reacciones cruzadas entre flavivirus (Negredo Antón *et al.*, 2013). Por último, específicamente en este

trabajo resulta fundamental emplear el formato seleccionado ya que, de esta forma, es posible analizar la potencialidad de estos antígenos recombinantes y su reconocimiento por parte de las IgGs originadas en una infección flaviviral.

La utilización de antígenos recombinantes es una de las alternativas planteadas en bibliografía para conseguir incrementar la especificidad de este tipo de ensayos, ya que al emplear virus completo se presentan altas tasa de reactividad cruzada. En este caso, los antígenos producidos se encuentran en forma desnaturalizada por lo que la detección se dará a partir de los epítopes secuenciales presentes en la proteína. Como se señaló en las secciones anteriores este tipo de epítopes son relevantes durante la infección, ya que son reconocidos por el sistema inmune y varias de estas secuencias han sido descritas en la NS1 de distintos flavivirus.

Las distintas variables del ensayo deben ser optimizadas de manera tal que se incremente la señal obtenida para el caso de los sueros positivos y se disminuyan los valores para los casos sin suero, o con sueros no reactivos. En primer término, se comenzó analizando las condiciones del *buffer* de adhesión a la placa. El antígeno, originalmente producido de manera insoluble, se encuentra solubilizado en un *buffer* conteniendo 8 M urea (BU). Debido a esto, a la hora realizar la dilución con el *buffer* carbonato-bicarbonato (BCB), la concentración de urea disminuye drásticamente, dejando de aportar el ambiente necesario para que las proteínas no formen agregados insolubles. Este efecto hace que disminuya la cantidad de proteínas adherida a cada pocillo y que las cantidades no sean homogéneas entre ellos, generando valores de absorbancia inconsistentes en los ensayos realizados.

La alternativa planteada es realizar una dilución previa con la solución conteniendo urea 8 M y luego llevar a la concentración final con el *buffer* carbonato-bicarbonato, de manera de producir una disminución menor del agente caotrópico. De esta manera, se probaron cuatro condiciones distintas, en donde se varió la relación BU/BCB, comenzando con 50% BU/50% BCB hasta 90% BU/10% BCB. Para la puesta a punto de utilizaron los antígenos de SLEV y WNV en una concentración de 20 µg/ml, y se usó un suero humano positivo para cada uno de ellos. Los resultados de este ensayo se muestran en la **Figura 29**. En la condición que contiene 50% urea se detecta la menor medida de absorbancia, probablemente debido a la precipitación de las proteínas y el menor pegado en la placa. Las condiciones 60% y 80% BU las que poseen las mayores mediciones de señal. En la condición 90% urea se detecta otra disminución de señal, producto de poca proporción de BCB (10%) lo que podría desfavorecer las condiciones para el pegado de las proteínas.

La condición de 80% BU/20% BCB fue seleccionada para continuar los ensayos ya que es la que posee las mediciones de absorbancia más altas para los sueros utilizados.

Calculando la composición final del *buffer* en esta condición, obtenemos que el *buffer* carbonato-bicarbonato posee 6,4 M de urea.

Si fuera necesaria una mayor optimización del pegado de la proteína podría ser analizado el comportamiento de la misma cuando se utilizan concentraciones de BU entre 60% y 80%. Con esta variante podría lograrse algún cambio en los valores máximos de absorbancia, sin embargo esto no fue explorado en el trabajo, aunque es esperable que no afecte la sensibilidad del ensayo.

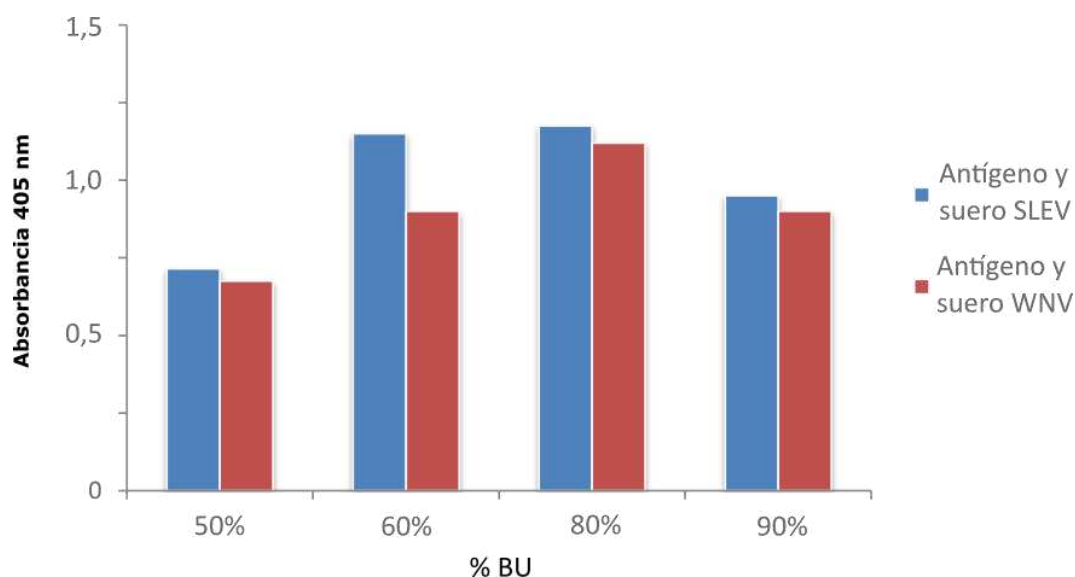


Figura 29: Optimización de las condiciones de adhesión de la proteína a la placa de 96 pocillos. En el formato de ELISA indirecto, se analizaron distintas proporciones en la combinación de *buffer* carbonato-bicarbonato (BCB) y *buffer* urea (BU) al momento de diluir las proteínas y ser pegadas a la placa. Se probaron cuatro condiciones en donde la composición final del *buffer* contenía 50%, 60%, 80% y 90% BU y el porcentaje complementario de BCB. En todos los casos la concentración de antígeno fue 20 µg/ml. Los antígenos NS1 de SLEV y WNV fueron analizados contra un suero específico para cada uno (dil 1/100).

Otra variable a optimizar es la concentración de proteína que se coloca por pocillo. Para ello se realizó un ensayo con tres concentraciones distintas del antígeno NS1-HT_{SLEV}. En este caso, se tuvieron en cuenta las condiciones del *buffer* de pegado obtenidas y se colocaron 50 µl por pocillo conteniendo 10, 20, 30 µg/ml de proteína. Estas condiciones fueron analizadas con un suero humano positivo para SLEV, el cual fue colocado en una dilución 1/100 en la primera columna y luego se los diluyó de forma seriada ½ en las siguientes columnas. Los resultados se muestran en la **Figura 30**. Al momento de la selección se tuvo en cuenta que se lograra la mayor medición de absorbancia y que se mantuviera una progresión lógica de los valores obtenidos con las diluciones seriadas. Como se puede observar, la señal obtenida con 20 y 30 µg/ml es similar por lo que se decidió continuar con la condición de menor cantidad de proteína. La señal obtenida con 10

$\mu\text{g/ml}$ es menor que para las otras dos. Para las tres condiciones la disminución de la señal producto de las diluciones seriadas coincide con lo esperado. Este resultado corrobora que las condiciones de pegado determinadas logran una adhesión homogénea de la proteína en los pocillos.

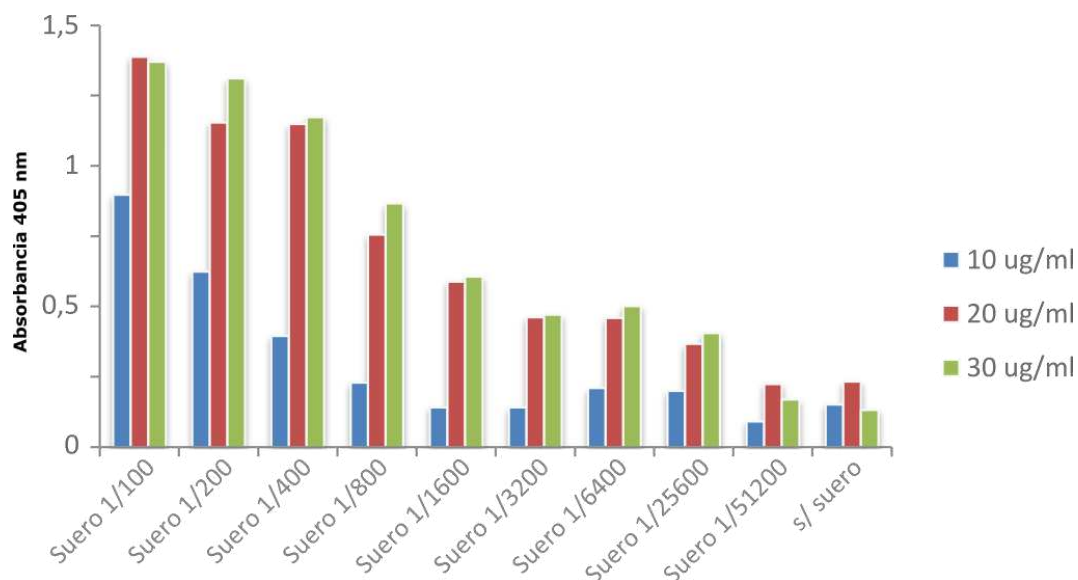


Figura 30: Optimización de la concentración de proteína en la placa y dilución del suero. En el formato de ELISA indirecto, se analizaron distintas concentraciones de proteína para el pegado a la placa. El antígeno NS1-HT_{SLEV} se utilizó en tres concentraciones, 10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$. Se utilizó un suero humano positivo para SLEV, el cual fue aplicado en diluciones seriadas.

La última variable analizada es la dilución del anticuerpo secundario α -humano. Para ello, se realizó un ensayo utilizando las condiciones óptimas determinadas y variando la concentración de anticuerpo secundario. Las diluciones analizadas fueron 1/1000, 1/2000, 1/3000 y 1/4000. La mejor condición fue la que obtuvo mayores mediciones de absorbancia para los controles positivos y menores para los negativos. La condición seleccionada fue dilución 1/2000 del anticuerpo secundario (datos no mostrados).

5.1.2 Caracterización mediante Western Blotting o ELISA de los antígenos generados

Mediante la técnica de *Western Blotting* se confirmó la identidad y se caracterizó la reactividad de las proteínas producidas.

En primer lugar, se verificó la identidad de las proteínas generadas a partir de la reactividad aportada por la secuencia de seis histidinas. Para ello se utilizó un suero policlonal α -HisTag, el cual pudo detectar todas las proteínas producidas (**Figura 31.A**). Esto resulta coherente con el hecho de que cada una de ellas haya podido ser purificada mediante columna de pseudoafinidad. A pesar de que en los SDS-PAGE se observen

nuestras proteínas de interés con un alto grado de purificación (sin proteínas accesorias), en los ensayos de *Western Blotting* se obtuvo señal para proteínas de menor tamaño en casi todos los casos. El origen de estos fragmentos probablemente corresponda a la degradación o la expresión incompleta de las proteínas, los cuales se encuentran en muy baja cantidad y solo pueden ser detectados con la sensibilidad de los anticuerpos usados. Si bien estos fragmentos podrían ser separados mediante cromatografía de exclusión molecular, su presencia no afectaría al desarrollo de ensayos serológicos. Si sería interesante poder indagar en la identidad de estos fragmentos a fin de conocer y ampliar las condiciones en las cuales se expresa esta proteína en este sistema.

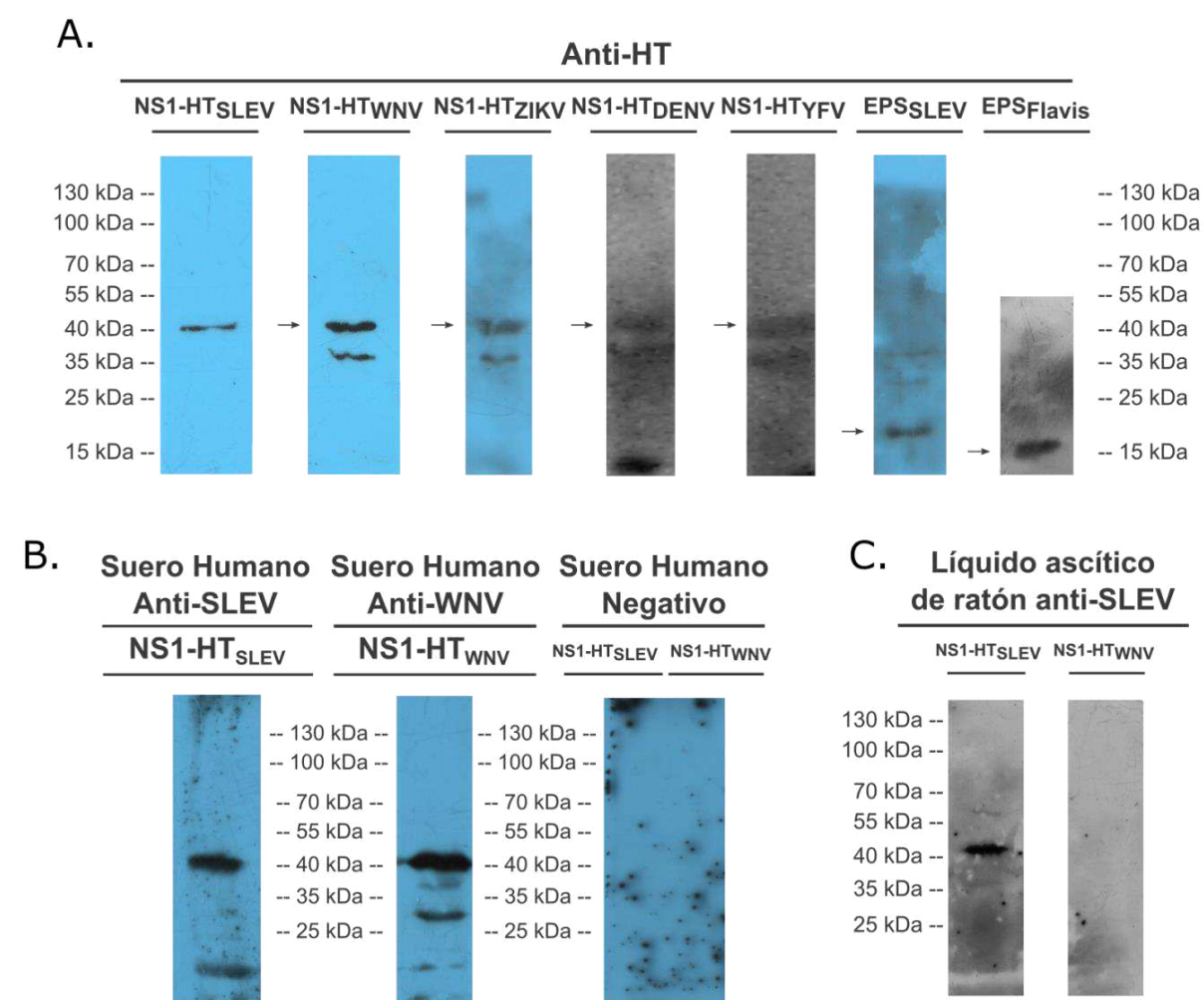


Figura 31. Detección mediante *Western Blotting* de las proteínas recombinantes. A. Membranas de WB en las que fueron transferidas todas las proteínas recombinantes y detectadas con un suero α -HisTag. **B.** Membranas de WB en las que fueron transferidas las proteínas NS1-HT_{SLEV} y NS1-HT_{WNV}, y detectadas con sueros humanos específicos contra SLEV, WNV y un suero humano negativo. **C.** Membranas de WB en las que fueron transferidas las proteínas NS1-HT_{SLEV} y NS1-HT_{WNV}, y detectadas con un líquido ascítico de ratón inoculado con la cepa 78V-6507 del virus SLEV.

En segundo lugar, se emplearon muestras de sueros de pacientes infectados con SLEV o WNV para determinar la reactividad de las proteínas generadas frente a anticuerpos α -NS1 (**Figura 31.B**). Se ha podido detectar la proteína NS1-HT_{SLEV} utilizando el suero de un paciente SLEV (panel izquierdo) y la proteína NS1-HT_{WNV} con un suero del paciente WNV (panel central). Como se ve en la **Figura 31.B**, los anticuerpos α -NS1 presentes en los sueros reconocieron las proteínas recombinantes, generando bandas intensas de 41 kDa. Bandas de menor tamaño también fueron reconocidas por el suero humano positivo, probablemente debido a la degradación de las proteínas o interacciones no específicas. El suero de un individuo que no presenta evidencias de haber sido expuesto a los virus se usó como control negativo y no mostró reactividad a las proteínas recombinantes (panel derecho).

Si bien ambos sueros humanos fueron capaces de reconocer a los antígenos cruzados en la dilución utilizada para este experimento (no mostrado), esto se debió a que el suero empleado se encontraba en concentraciones altas habiéndose usado diluciones 1/200 para cada uno. Respecto a esto, se encuentra reportado que la proteína NS1 es capaz de diferenciar ambos sueros con esta técnica cuando se emplean las diluciones adecuadas. Según lo publicado por Ocegüera y colaboradores (Ocegüera *et al.*, 2007) la proteína NS1 es un marcador que permite diferenciar infecciones de DENV, WNV y SLEV en humanos y aves. En diluciones mayores de suero se hace uso de las diferentes afinidades por la proteína específica y la heteróloga para lograr una diferenciación. Posteriormente verificaremos este punto al momento de trabajar con los sueros producidos en ratones.

Utilizando un líquido ascítico generado en ratones inoculando una cepa del virus SLE, se logró la detección diferencial de la proteína NS1-HT_{SLEV} y NS1-HT_{WNV}. Como es posible observar en la **Figura 31.C**, utilizando la misma dilución de líquido ascítico, la proteína NS1-HT_{SLEV} es detectada mientras que la proteína NS1-HT_{WNV} no lo es, evidenciando la posibilidad de una identificación diferencial.

Si bien NS1-HT_{SLEV} y NS1-HT_{WNV} pudieron ser caracterizadas usando sueros humanos mediante *Western Blotting*, la disponibilidad de volúmenes adecuados para este ensayo de los sueros para otros *Flavivirus* es mucho menor. Debido a esto se decidió que la determinación de la identidad de NS1 de YFV, DENV-1 y ZIKV se realice mediante un ensayo de ELISA indirecto para IgG. Para ello, cada proteína se utilizó para sensibilizar pocillos de una placa de 96 y cada uno fue analizado contra uno (o dos) sueros positivos para ese antígeno y otro negativo para *Flavivirus*. El ensayo se realizó según lo descrito en la sección anterior, y los resultados se muestran en la **Figura 32**. Para el antígeno NS1-HT_{YFV} se usó como positivo un suero humano obtenido a partir de un individuo infectado con YFV y otro suero de un individuo vacunado contra el mismo virus, mientras que para NS1-

HT_{DENV-1} y NS1-HT_{ZIKV} se usaron sueros humanos provenientes de personas infectadas con esos virus. Para los tres casos, se utilizó el mismo suero humano negativo para Flavivirus.

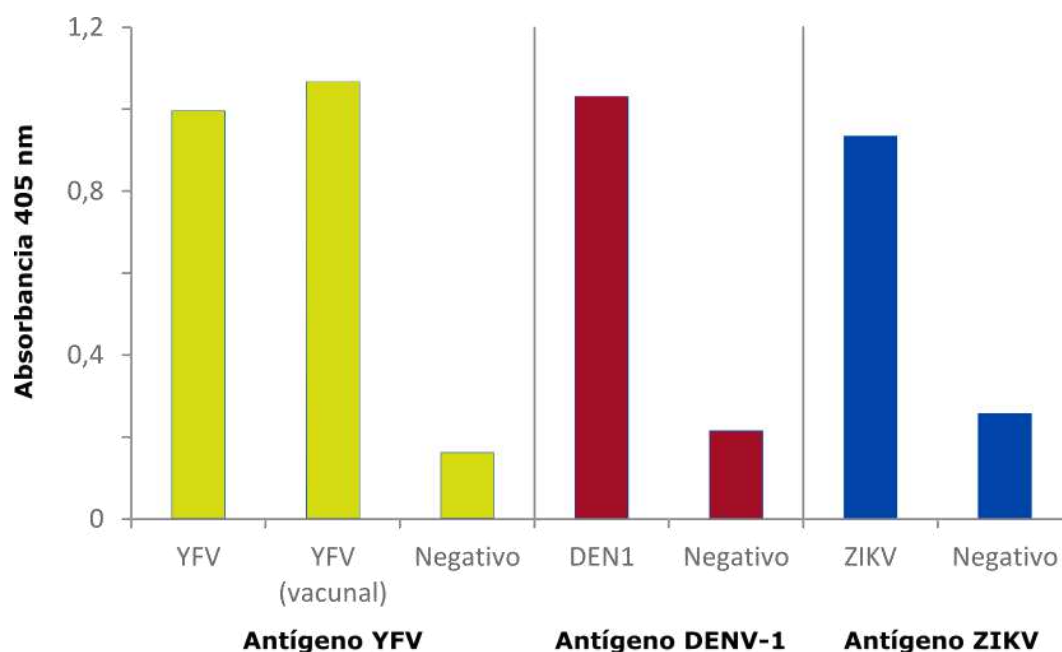


Figura 32: Detección de los antígenos de YFV, DENV-1 y ZIKV mediante ELISA indirecto. La placa de 96 wells se sensibilizó con los tres antígenos por separado y cada uno de ellos fue analizado contra sueros humanos positivos para cada virus y un suero negativo para Flavivirus.

Como puede observarse, el suero negativo generó una señal muy baja al reaccionar con los tres antígenos, mientras que los sueros positivos reaccionaron fuertemente contra los antígenos correspondientes. En todos los casos la señal obtenida en los positivos es entre 4 y 6 veces mayor que la obtenida en el negativo. En el caso de YFV la respuesta obtenida con el suero de paciente infectado y el suero de paciente vacunado es muy similar, verificando que en los individuos vacunados se producen anticuerpos α -NS1, como fue descrito por Nascimento y colaboradores en 2018 (Nascimento *et al.*, 2018). En un futuro sería interesante plantear un ensayo con una mayor cantidad de sueros para determinar si existe alguna diferencia en la respuesta IgG α -NS1 generada en individuos vacunados o infectados, ya que no se encuentran trabajos publicados sobre esta temática (Domingo *et al.*, 2018). Asimismo, sería interesante también poder observar la cinética de estos anticuerpos α -NS1 a través del tiempo, así como poder generar un antígeno recombinante que permita únicamente identificar infecciones naturales por este Flavivirus.

5.1.3 Inmunización de ratones y caracterización de los sueros producidos

Para la obtención de suero policlonal α -NS1 se inyectaron 50 μ g de proteína purificada con adyuvante incompleto de Freund en ratones Balb/C. Se realizaron dos refuerzos y se tomaron muestras de suero de ratón a los 0, 28, 40 y 60 días, las cuales se analizaron mediante un enzoinmunoensayo. Para cuantificar la respuesta generada se diseñó y optimizó un ELISA indirecto utilizando las proteínas purificadas. La inmunización se realizó usando los antígenos NS1-HT_{SLEV}, NS1-HT_{WNV} y NS1-HT_{ZIKV}, y la cinética de la respuesta IgG inducida se muestra en la **Figura 33**. Cada una de las respuestas fue analizada contra su antígeno homólogo y tal como se observa en la figura, los sueros pre-inmunes (obtenidos antes de la primera inmunización) no muestran reactividad alguna por los antígenos virales (día 1). La reactividad aumenta después del primer y segundo refuerzo (días 28 y 42, respectivamente) alcanzando el valor máximo al final del protocolo en el día 60.

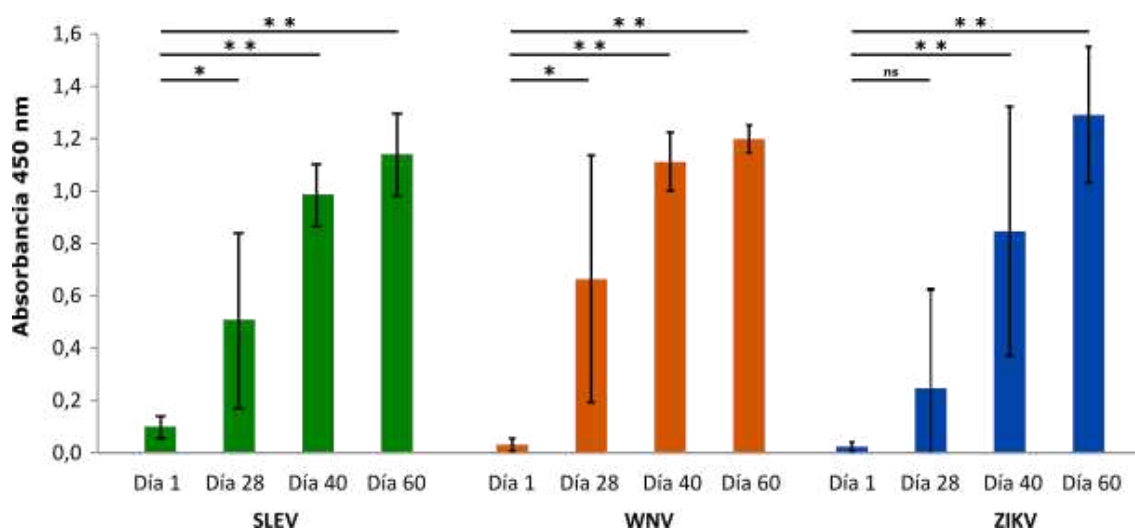


Tabla 33. Producción de sueros α -NS1 de SLEV, WNV y ZIKV. Detección de IgG contra NS1-HT de SLEV, WNV y ZIKV mediante ELISA indirecto. Cada suero producido se analizó contra la proteína que se utilizó para inmunizar. Se analizaron muestras antes de inmunizar (día 1) y después de inmunizar y de cada uno de los refuerzos (días 28, 40 y 60). Cada barra representa el promedio de los ratones utilizados $\pm$ el desvío estándar. Las diferencias estadísticas se establecieron independientemente dentro de cada grupo, de acuerdo con una prueba no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y ns = no significativo.

Una vez verificada la reactividad de los sueros producidos, se procedió a determinar los títulos contra el antígeno homólogo y contra antígenos heterólogos.

El ensayo se llevó a cabo en las mismas condiciones que el ELISA indirecto previamente diseñado. Para ello los sueros, se sembraron a partir de diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ (inicial 1/800) y el valor de corte (CO) se calculó utilizando los sueros pre-inmunes (promedio + 2 * desvío

estándar). El título de anticuerpos se definió a partir de la última dilución de suero que revela reacción positiva, tomando como tal los valores que superan el CO.

En el ensayo de ELISA indirecto los sueros producidos con las proteínas de SLEV y WNV se evaluaron contra los antígenos de SLEV, WNV, EPS_{SLEV} y una proteína heteróloga fusionada al *tag* de histidinas (GFP-HT). Los títulos obtenidos se detallan en la **Tabla 6**. Al comparar la reactividad cruzada entre las proteínas NS1 de SLEV y WNV, se observó que los sueros de ambos grupos de ratones mostraron reactividad contra los dos antígenos, aunque el título contra la proteína homóloga fue mayor que el obtenido con el antígeno heterólogo.

La construcción EPS_{SLEV}, la cual contiene los epítopes seleccionados mediante inmunobioinformática de NS1-HT_{SLEV}, fue utilizada para analizar los sueros generados. El suero α -NS1_{SLEV} reveló una mayor sensibilidad que el suero α -NS1_{WNV}, lo cual evidencia su potencialidad en el diseño realizado. Por otro lado la reactividad del suero α -NS1_{SLEV} fue menor contra EPS_{SLEV} que contra la versión completa de NS1-HT_{SLEV}. Este resultado era esperado ya que la construcción recombinante solo posee ocho epítopes detectados bioinformáticamente e inevitablemente deberían existir otros que no se encuentran incluidos. La capacidad de diferenciación observada coincide con los datos obtenidos en distintos trabajos, en donde este tipo de construcciones recombinantes son muy útiles a la hora de diseñar ensayos de diagnóstico (Lin *et al.*, 2012, Tripathi *et al.*, 2007a, Tripathi *et al.*, 2007b). Estos resultados sugieren su posible utilización como base de un ensayo de diagnóstico, donde resulta interesante poder sumar otros epítopes que den lugar a aumentar la sensibilidad y especificidad de esta construcción con respecto a WNV.

Adicionalmente, se midió la reactividad contra GFP que se encuentra marcada con el *tag* de hexahistidinas (GFP-HT). Ambos sueros alcanzaron un título de 1/1600, lo que sugiere que los anticuerpos dirigidos a la etiqueta de histidinas podrían explicar parte de la reactividad cruzada obtenida.

	Proteína en placa			
	NS1-HT _{SLEV}	NS1-HT _{WNV}	EPS _{SLEV}	GFP-HT
Suero ratones inmunizados con NS1-HT _{SLEV}	1/25600	1/1600	1/6400	1/1600
Suero ratones inmunizados con NS1-HT _{WNV}	1/3200	1/102400	1/800	1/1600

Tabla 6. Título de anticuerpos obtenidos para los sueros α -NS1_{SLEV} y α -NS1_{WNV}. Se muestran los títulos obtenidos para cada suero contra varias de las proteínas recombinantes generadas y contra GFP-HT. Los títulos fueron obtenidos mediante ELISA indirecto y el valor de corte se calculó mediante los sueros pre-inmunes.

Aunque no es posible encontrar descripciones en la bibliografía acerca de las diferencias en las respuestas inmunogénicas provocadas por las proteínas NS1_{SLEV} y NS1_{WNV}, en estos

ensayos hemos obtenido una gran diferencia entre los títulos determinados para ambas proteínas contra su antígeno homólogo. En el caso de NS1_{SLEV} el título es de 1/25600, mientras que para NS1_{WNV} el título es de 1/102400. Esto sugeriría que los epítopes en NS1_{WNV} son más inmunogénicos que los que se encuentran en NS1_{SLEV} y dan lugar a una respuesta más reactiva de anticuerpos. Si bien estas dos proteínas poseen alta homología, cercana al 70%, existe la posibilidad que las diferencias en secuencias que constituyen epítopes sean relevantes a la hora de ser detectadas por el sistema inmune. Este último resultado plantea la posibilidad de analizar en un trabajo futuro el diseño de una construcción que contenga una secuencia multiepítope de WNV (EPS_{WNV}). Al ser esta proteína más inmunogénica no se vería afectada significativamente su sensibilidad y brindaría la posibilidad de seleccionar epítopes específicos que la diferencien de NS1_{SLEV} u otros flavivirus. Asimismo, si vemos la interacción de los sueros generados con las distintas proteínas, es posible identificar que el suero para WNV es 30 veces más afín por su proteína específica que por las heterólogas, mientras que para el suero de SLEV se observa una afinidad 16 veces mayor para la proteína específica que para el antígeno heterólogo. Esta diferencia en la afinidad refuerza lo indicado anteriormente respecto al potencial inmunogénico de NS1 de WNV.

Los resultados obtenidos mediante ELISA indirecto fueron verificados mediante *Western Blotting* (**Figura 34**). Para este experimento, los anticuerpos α -NS1_{SLEV} y α -NS1_{WNV} se diluyeron dentro del rango de diferenciación obtenido por ELISA, 1/10000 para suero α -NS1_{SLEV} y 1/64000 para suero α -NS1_{WNV} y fueron usados para detectar los dos antígenos, empleados en las mismas cantidades. Los resultados concuerdan con los obtenidos por ELISA, pudiéndose visualizar que los sueros diferencian entre los dos antígenos cuando son usados a la dilución adecuada.

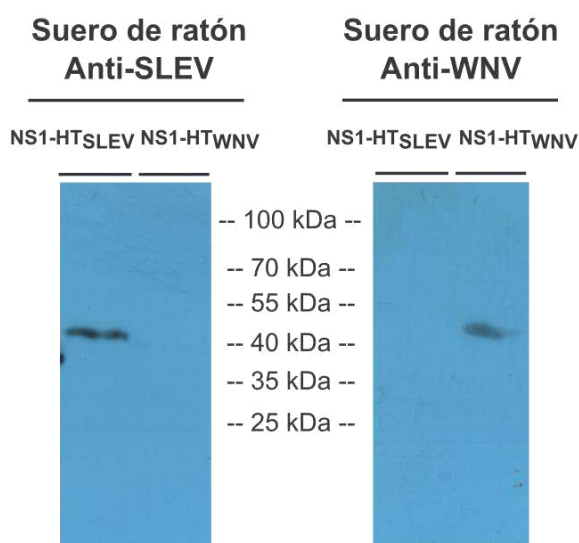


Figura 34. Diferenciación mediante *Western Blotting* de las proteínas recombinantes utilizando los sueros generados en ratones. Membranas de WB en las que fueron transferidas las proteínas NS1_{SLEV} y NS1_{WNV}. La membrana de la izquierda fue incubada con el suero α -NS1_{SLEV} (dilución 1/10000) y la membrana de la derecha fue incubada con el suero α -NS1_{WNV} (dilución 1/64000) para distinguir entre los dos antígenos.

Al igual que con lo realizado para los sueros de SLEV y WNV, el suero producido con la proteína de Zika fue usado para determinar los títulos contra las proteínas de flavivirus relacionados (**Tabla 7**), en este caso la comparación se realizó con las proteínas NS1 de ZIKV, WNV, DENV y la proteína GFP-HT. El título obtenido para la proteína NS1-HT_{ZIKV} es mayor que los obtenidos con las proteínas de WNV y DENV-1. Mostrando que los epítopes diferenciales son relevantes a la hora de la generación de anticuerpos específicos.

De forma similar a lo que sucedía con los otros sueros generados, el suero α -NS1_{ZIKV} genera una respuesta baja contra la proteína heteróloga fusionada al *his tag*, explicando en parte la reactividad cruzada detectada.

Comparando los títulos obtenidos con las tres proteínas usadas en los protocolos de inmunización vemos que la respuesta para NS1-HT_{ZIKV} es similar a la obtenida con NS1-HT_{SLEV}, y que estas dos generaron una respuesta menor a la producida por NS1-HT_{WNV}.

	Proteína en placa			
	NS1-HT _{ZIKV}	NS1-HT _{WNV}	NS1-HT _{DENV-1}	GFP-HT
Suero ratones inmunizados con NS1-HT _{ZIKV}	1/25600	1/800	1/1600	1/800

Tabla 7. Título de anticuerpos obtenidos para los sueros α -NS1_{ZIKV}. Se muestran los títulos obtenidos para el suero α -NS1_{ZIKV} contra NS1-HT_{ZIKV}, NS1-HT_{WNV} y NS1-HT_{DENV-1}. Los títulos fueron obtenidos mediante ELISA indirecto y el valor de corte se calculó mediante los sueros pre-inmunes.

Estos ensayos fueron publicados en Lorch *et al.* (2019). Similares resultados se detectaron para NS1 de Dengue virus (Yohan *et al.*, 2017) y posteriormente NS1 de JEV (Choi *et al.*, 2019). En todos los casos distintas proteínas NS1 fueron expresadas de forma recombinante en bacterias y los productos purificados retuvieron las características inmunogénicas de la proteína nativa, demostrando que son aptas para su utilización en ensayos de diagnóstico.

5.1.4 Generación de anticuerpos monoclonales

Como se ha descripto anteriormente para algunos formatos de ensayos de ELISA es importante contar con anticuerpos específicos contra NS1. Debido a esto nos planteamos la posibilidad de llevar a delante un protocolo de generación de anticuerpos monoclonales. Para ello se emplearon los ratones inmunizados con las distintas proteínas NS1, se les extrajo el bazo a cada uno de ellos y los esplenocitos obtenidos se fusionaron con una línea celular de mieloma. Este protocolo fue repetido múltiples veces, realizando modificaciones que den lugar a un resultado exitoso, pero en ninguno de los casos fue posible encontrar células viables luego de la fusión. Además de conocer la gran dificultad que conlleva la

realización de este desarrollo, es posible pensar que los reactivos empleados no reunían la calidad deseada, lo cual imposibilitó la fusión o la sobrevivencia de las células. Debido al extenso tiempo que implica la compra y recepción de nuevos reactivos, sumado a la necesidad de realizar nuevamente los protocolos de inmunización, no fue posible seguir adelante con esta línea de trabajo.

5.1.5 Análisis del ensayo de ELISA indirecto empleando muestras de suero humanas

Utilizando las condiciones optimizadas del ELISA indirecto se procedió a llevar a cabo el ensayo empleando muestras de suero humano determinadas como positivo o negativo para flavivirus mediante la técnica de neutralización. Para esta prueba de factibilidad, el análisis se realizó incluyendo 16 sueros negativos para flavivirus, 14 sueros positivos para SLEV, un suero positivo para WNV, 3 sueros positivos para DENV, y 5 sueros que dieron resultados positivos para dos flavivirus (4 sueros positivos para SLEV/WNV y un suero positivo para SLEV/DENV). En la **Tabla 8** se encuentran numerados los 39 sueros y se detalla el diagnóstico obtenido por NT para cada uno. Los sueros humanos positivos fueron provistos por el Laboratorio de Arbovirus y Arenavirus del InViV, mientras que los sueros negativos pertenecen al Laboratorio de Virología e Inmunología de la UNQ.

Sueros		Resultado de PRNT			ELISA <i>in house</i>	
	Nº	SLEV	WNV	DENV	NS1-HT _{SLEV}	NS1-HT _{WNV}
Negativos	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-
SLEV	17	+	-	-	+	-
	18	+	-	-	+	-
	19	+	-	-	+	-
	20	+	-	-	+	-
	21	+	-	-	+	-
	22	+	-	-	-	-
	23	+	-	-	-	-
	24	+	-	-	-	-
	25	+	-	-	-	-
	26	+	-	-	+	-
	27	+	-	-	+	-
	28	+	-	-	+	+
WNV	29	+	-	-	+	
	30	+	-	-	+	
	31	-	+	-	-	+
	32	-	-	+	-	-
DENV	33	-	-	+	-	-
	34	-	-	+	-	-
Positivos para más de un Flavi	35	+	-	+	+	+
	36	+	+	-	+	+
	37	+	+	-	+	+
	38	+	+	-	+	+
	39	+	+	-	+	+

Tabla 8. Referencias de los sueros empleados. Se muestran cada uno de los sueros empleados con su resultado obtenido mediante PRNT y con los ELISA usando los antígenos NS1 de SLEV y WNV. (+) indica resultados positivos. (-) indica resultados negativos.

Los resultados de los ensayos de ELISA indirecto empleando los antígenos NS1-HT_{SLEV} y NS1-HT_{WNV} se muestran en la **Figura 35**. Para ambos antígenos se analizaron las mismas 39 muestras, y en el gráfico pueden verse los valores de absorbancia obtenidos para cada una de ellas.

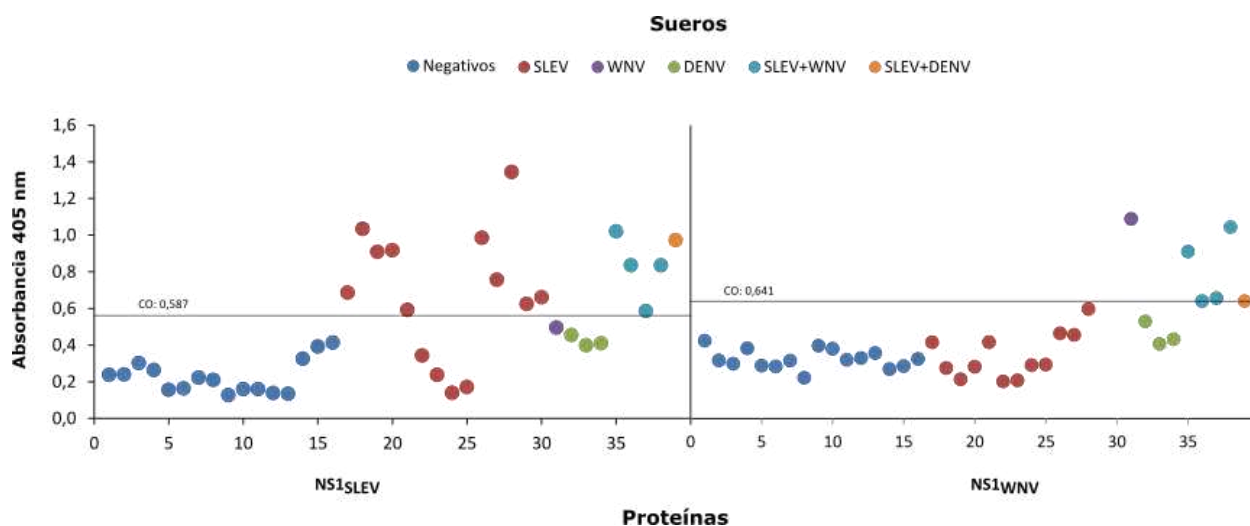


Figura 35: Absorbancias obtenidas con el ensayo de ELISA usando los antígenos NS1-HT_{SLEV} y NS1-HT_{WNV} y muestras de suero humano. El color de cada muestra corresponde a si es negativa o positiva para alguno de los virus. Se indicó el valor de corte (CO) determinado para cada ensayo.

Como paso siguiente se procedió a la determinación del valor de corte, el cual es el valor de absorbancia que permite clasificar a los resultados como positivos o negativos. Es decir, las muestras que presenten absorbancias menores al valor de CO serán consideradas negativas y las muestras que presenten valores mayores serán consideradas positivas. Debido a esto, el valor de corte debe ser calculado de tal manera que se minimicen tanto los resultados falsos positivos como los falsos negativos. Se han propuesto varios métodos estándar para encontrar los valores de corte óptimos, y todos requieren muestras de individuos negativos, en algunos casos también positivos, para calcular el valor que discriminará mejor. La estrategia más comúnmente utilizada es la que tiene en cuenta el promedio de las muestras negativas y el desvío estándar de éstas, en donde el valor de CO se determina sumando una cierta cantidad de veces (en general dos o tres) el desvío estándar al promedio calculado. Las veces que se suma el desvío estándar depende de la necesidad de lograr mayor especificidad o sensibilidad en el ensayo.

En este trabajo el valor de corte óptimo se determinara de manera estadística, mediante la construcción de curvas ROC para cada uno de los ensayos (**Figura 36**). Estas curvas permiten determinar los parámetros de sensibilidad y especificidad para todos los posibles valores de corte. Este valor será óptimo cuando la suma de los parámetros observados sea máxima. De esta manera, el valor de corte óptimo refleja el rendimiento óptimo de

sensibilidad y especificidad de la prueba. Todos los parámetros obtenidos se resumen en la **Tabla 9**, mientras que el valor de corte puede verse graficado también en la **Figura 35**. En la **Tabla 8** se encuentra agregado el resultado (positivo o negativo) para cada muestra teniendo en cuenta el valor de corte determinado para cada ELISA *in house*.

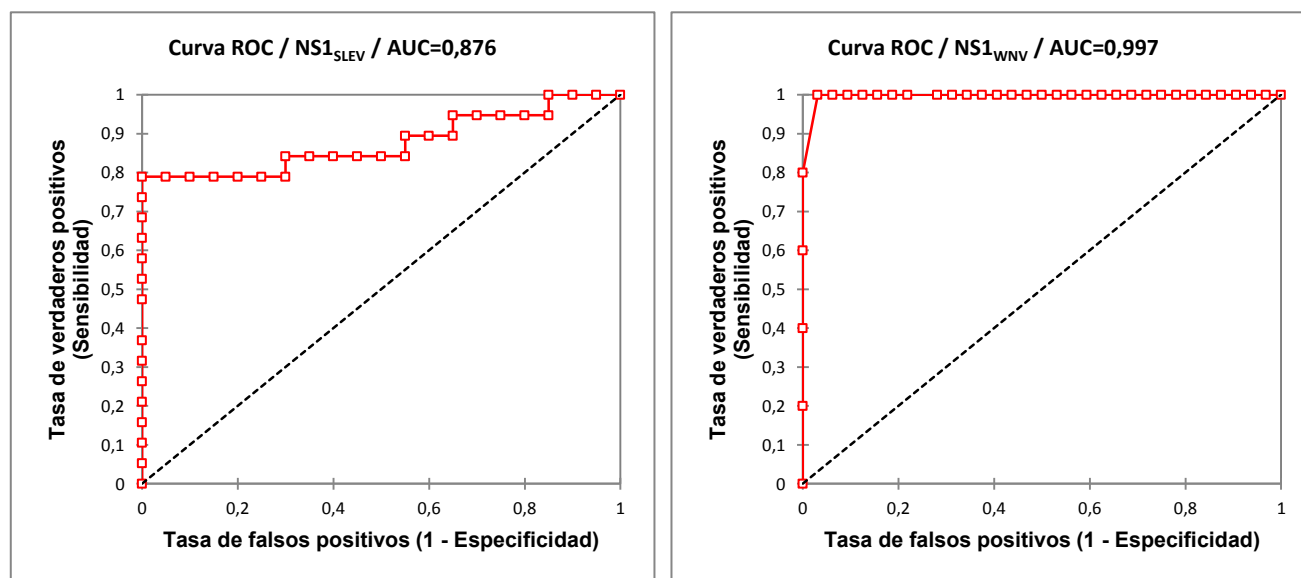


Figura 36: Curvas ROC generada para cada ensayo. En rojo se ven las curvas correspondientes para cada proteína recombinante y en una línea punteada negra se puede observar el límite de no discriminación del ensayo. AUC es el área bajo la curva.

Para el ensayo realizado empleando la proteína NS1-HT_{SLEV} el valor de corte óptimo fue 0,587. En este caso se obtiene una especificidad del 100%, ya que ninguna de las muestras negativas quedó por sobre del valor de corte. De esta manera, es importante destacar que las muestras positivas para DENV y la muestra positiva para WNV tuvieron absorbancias menores al valor de corte, verificando que este antígeno posee la capacidad de diferenciarlos de SLEV tal como se había observado en el caso de los sueros generados en ratones. De acuerdo a publicaciones que se han dedicado a verificar los *kits* comerciales en distintas condiciones se puede ver que, en general, estos poseen una especificidad alta que se encuentra entre 90 y 100%. Los ensayos de ELISA de captura del antígeno NS1 son los que poseen especificidades cercanas al 100%, mientras que los de captura de anticuerpos (IgG o IgM) poseen especificidades cercanas al 90% (Blacksell *et al.*, 2006, García-Bermejo *et al.*, 2017).

	NS1-HT _{SLEV}	NS1-HT _{WNV}
Cantidad de muestras	39	39
Valor de corte óptimo (abs)	0,587	0,641
Sensibilidad	78,9%	100%
Especificidad	100%	96,9%
Falsos Positivos	0	1
Falsos Negativos	4	0
Área bajo la curva	0,876	0,997

Tabla 9: Resumen de los parámetros obtenidos para cada ensayo. Se indica el valor de corte obtenido mediante las curvas ROC, los parámetros de sensibilidad y especificidad correspondientes a ese valor de corte, la cantidad de falsos negativos y falsos positivos por ensayo y el área bajo la curva ROC.

La sensibilidad obtenida fue de 78,9%, producto de que cuatro muestras positivas para SLEV tuvieron absorbancias menores al valor de corte. Aunque todas las muestras corresponden a la fase convaleciente de la infección, no poseemos los datos exactos del momento de la toma de la muestra, por lo que podría ser posible que éstas correspondan a etapas tempranas de la fase convaleciente y que aún no posean los anticuerpos IgG suficientes para poder ser clasificadas como positivas en este ensayo.

En cuanto a las absorbancias de las muestras positivas podemos ver que tienen una gran dispersión, algunas de ellas con valores cercanos o mayores a 1, mientras que otras arrojan absorbancias que rondan las 0,6 unidades. Estas últimas son las que se deben tener en cuenta para futuros análisis, ya que se encuentran cerca del valor de corte y producto de la variabilidad inter-ensayo podrían situarse por debajo de la línea de corte y calificar como falsos negativos. Para próximos ensayos sería muy útil contar con muestras que posean distintos niveles de respuestas en la técnica de neutralización para poder establecer cómo se comportan con nuestros antígenos muestras con títulos bajos y títulos altos.

Si bien el valor de sensibilidad obtenido es bajo, no se encuentra muy alejado de los valores típicos de sensibilidad de los *kits* de diagnóstico de captura de anticuerpos para flavivirus, en los cuales ronda el 80-95% (García-Bermejo *et al.*, 2017). Es importante aclarar que los valores de sensibilidad y especificidad en este tipo de ensayo se ven generalmente afectados dependiendo de la región geográfica donde se aplique el ensayo, debido a la variabilidad de cepas, otros virus circulantes así como personas vacunadas (Pal *et al.*, 2015). Es por ello que la generación de antígenos a partir de cepas geográficamente específicas debería ayudar a optimizar la precisión del diagnóstico.

Comparando los resultados obtenidos en los ensayos con NS1_{SLEV} con los reportados en una publicación de nuestro laboratorio empleando NS5_{SLEV} como antígeno (Simari *et al.*, 2019), podemos observar que para ambas proteínas no estructurales existen muestras

positivas por NT que no son reconocidas en los ensayos diseñados. Como se explica en la publicación, en estos casos es interesante contar con los títulos de anticuerpos obtenidos por NT para poder explicar los resultados negativos observados. El valor de sensibilidad obtenido con NS5_{SLEV} (84%) es similar al logrado con el ensayo diseñado en este trabajo. En cuanto al análisis con sueros pertenecientes a otros flavivirus, ninguno de los sueros positivos para DENV, YFV, ZIKV o WNV resultó positivo en el ensayo con NS5_{SLEV}, resultado similar al obtenido en nuestro ensayo, donde ninguna de las muestras de DENV y WNV fueron reconocidas.

Para el ensayo realizado empleando la proteína NS1-HT_{WNV} el valor de corte óptimo fue 0,641. Aunque la cantidad de muestras positivas es poca (5), con este valor de corte, el ensayo las detectó a todas, llevando la sensibilidad al 100%. Al igual que como sucedió con el antígeno NS1-HT_{SLEV} algunas muestras positivas obtuvieron valores muy cercanos a la línea de corte, lo cual vuelve a plantear la necesidad para futuros ensayos de conocer los títulos de estas muestras en la neutralización y detectar si la respuesta también había sido baja por ese método.

Se encuentra reportado que cuando las infecciones logran títulos virales altos es posible que se den resultados cruzados entre distintos flavivirus en los ensayos comerciales de detección de anticuerpos y de antígenos (Kim *et al.*, 2018, Tan *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con nuestro ensayo, ninguna de las muestras correspondientes a SLEV y WNV fue considerada positiva con NS1-HT_{WNV}, solo la muestra positiva para SLEV/DENV se encontró sobre la línea de corte. Debido a esto, la especificidad obtenida fue casi del 97%. Como se dijo anteriormente la especificidad de los ensayos comerciales suele ser alta, especialmente los del formato ELISA, mientras que los de formato inmunocromatografía es levemente menor (Blacksell *et al.*, 2006, García-Bermejo *et al.*, 2017).

El área bajo la curva (AUC) es un parámetro muy utilizado en las curvas ROC y se calcula para describir el rendimiento de la NS1 como biomarcador. El AUC refleja el potencial que presenta un ensayo para discriminar muestras con presencia o ausencia del agente infeccioso, cuanto más cercano a 1 sea el valor, mayor es la capacidad de discernir los positivos de los negativos (Cerdeira & Cifuentes, 2012). Comparando los valores obtenidos para el ensayo con NS1-HT_{SLEV} (AUC=0,876) y para el ensayo NS1-HT_{WNV} (AUC=0,997) podemos ver que el correspondiente a WNV ha resultado más adecuado. Esta diferencia se debe a la baja en la sensibilidad obtenida producto que algunas muestras correspondientes a SLEV han quedado por debajo de la línea de corte. Sin embargo, para realizar análisis más concreto de estos valores los distintos ELISA deben ser realizados con una mayor cantidad de muestras, esto nos permitirá obtener valores más precisos de la efectividad de cada uno de estos ensayos.

En resumen, se analizaron los antígenos NS1 de SLEV y WNV en el formato ELISA indirecto contra 39 muestras de sueros humanos conteniendo 16 sueros negativos y 23 positivos entre los que se encontraban sueros positivos para SLEV, WNV y DENV. Se determinó el valor de corte para cada ensayo y a partir de éste se calcularon los parámetros de sensibilidad y especificidad para ambas proteínas. En el caso de NS1_{SLEV} se obtuvo una sensibilidad del 78,9% y una especificidad del 100%, mientras que para NS1_{WNV} la sensibilidad fue del 100% y la especificidad del 96,9%.

Los ensayos serológicos realizados en este trabajo se realizaron con el fin verificar la funcionalidad de las proteínas producidas en un método de detección de anticuerpos α -NS1 de flavivirus, pudiendo observar resultados satisfactorios para las dos proteínas ensayadas. Debido a que se trata de los ensayos de caracterización y factibilidad necesarios, se requieren nuevas pruebas empleando paneles de sueros completamente caracterizados para dar lugar a los ensayos de validación.

Algunas características de los paneles de suero a utilizar deben ser: mayor cantidad de muestras, contener muestras de distintos flavivirus y de distintas etapas de la infección, contar con muestras que hayan reaccionado con títulos fuertes y débiles en la prueba de neutralización para así determinar si esta característica se mantiene en los ELISAs desarrollados y poder estimar cual es el límite de detección. Por último se deberían analizar la especificidad frente a otras arbovirosis febriles como Chikungunya y Mayaro, ya que son enfermedades que circulan en el continente y se suele pedir un diagnóstico diferencial en el que es importante que no haya reacción cruzada.

Los resultados obtenidos respaldan la necesidad de continuar con los ensayos de validación para el formato de ELISA indirecto, pero también la posibilidad de utilizar estos antígenos en otros formatos de diagnóstico.

Sección VI

Conclusiones y Perspectivas

6. Conclusiones y Perspectivas

La OMS estima que una sexta parte de las enfermedades y discapacidades sufridas en todo el mundo se debe a enfermedades transmitidas por vectores, con más de la mitad de la población mundial actualmente en riesgo. Cada año, más de mil millones de personas se infectan y más de un millón de personas mueren a causa de enfermedades transmitidas por vectores, como malaria, dengue, leishmania y Chagas, entre otras (Campbell-Lendrum *et al.*, 2015).

Las enfermedades transmitidas por vectores tienen impactos socioeconómicos amplios, aumentan las inequidades en salud y actúan como un freno para el desarrollo socioeconómico. La incidencia de estas enfermedades se acentúa cuando la desigualdad social se profundiza. Por ejemplo, la tasa de mortalidad *per cápita* de las enfermedades transmitidas por vectores es casi 300 veces mayor en los países en desarrollo que en las regiones desarrolladas, tanto porque las enfermedades transmitidas por vectores son más comunes en los climas tropicales de muchos países en desarrollo, como también por los bajos niveles de desarrollo socioeconómico y cobertura de los servicios de salud en estas áreas (Bavia *et al.*, 2020, Campbell-Lendrum *et al.*, 2015).

Por otro lado, las enfermedades transmitidas por vectores se encuentran entre las enfermedades mejor estudiadas asociadas con el cambio climático, debido a su gran tasa de enfermedad, su ocurrencia generalizada y su alta sensibilidad a los factores climáticos. Las conexiones más simples son a través de la temperatura, que afectan las tasas de picadura, supervivencia y reproducción de los vectores así como a las tasas de supervivencia y desarrollo de los patógenos que transportan. Las precipitaciones también ejercen una influencia muy fuerte, con un mayor impacto en el caso de enfermedades transmitidas por vectores que tienen etapas de desarrollo acuático (como los mosquitos), pero también, a través de la humedad, en enfermedades transmitidas por vectores sin tales etapas, como garrapatas o moscas de arena (Campbell-Lendrum *et al.*, 2015). Un claro ejemplo del impacto reciente del cambio climático es como se ha favorecido el asentamiento de los mosquitos del género *Aedes* en regiones templadas luego de su introducción, principalmente debido a condiciones invernales favorables y temperaturas anuales más altas. Es así que el cambio climático futuro podría sostener su establecimiento en latitudes más altas y potenciales nichos ecológicos los cuales el mosquito aún no ha llenado (Ryan *et al.*, 2018).

Esta problemática se suma a factores antropogénicos, que abarcan aspectos de la población humana susceptible, como son vivienda inadecuada, falta de provisión de agua potable, incorrecta disposición de la basura domiciliaria, falta de educación sanitaria,

pobreza, falta de insumos, personal sanitario insuficiente, incorrecta vigilancia epidemiológica y falta de políticas sanitarias (Bavia *et al.*, 2020).

En resumen, el cambio climático, el comercio internacional y los viajes son factores clave para promover la propagación de insectos portadores de enfermedades a partes cada vez más amplias del mundo. Es por ello que cada vez más humanos están expuestos a infecciones virales como el dengue, Zika, chikungunya, *West Nile* y fiebre amarilla, enfermedades para muchas de las cuales, todavía no hay vacunas específicas o agentes antivirales.

De esta manera, se ha producido la introducción en nuestro continente de enfermedades como chikungunya y Zika en el año 2015, ambas transmitidas por mosquitos del género *Aedes*. Desde el año 2016 el virus de la fiebre amarilla se ha transmitido a niveles alarmantes en Brasil, extendiéndose al sur del país y acercándose a los países vecinos. Así mismo, la detección del virus Mayaro en Haití, Brasil, Perú, y luego en Ecuador durante el 2019, constituye un desafío adicional en el ya complicado escenario de las enfermedades arbovirales en la región y tiene implicaciones en la adaptación de los algoritmos de vigilancia de laboratorio. En los últimos años, se ha dado un incremento de la caracterización de diversos arbovirus, debido en parte, a una mejora en las técnicas de detección y a un incremento en la preocupación y el estudio de estos agentes virales que presentan una gran importancia sanitaria a nivel mundial.

En base a todo este panorama, el progreso continuo en el control de las enfermedades transmitidas por vectores, el desarrollo de herramientas de vigilancia epidemiológica y el establecimiento de sistemas de diagnóstico, se presentan como una contribución importante a la salud, el desarrollo y la seguridad mundiales.

De esta manera, el objetivo de este trabajo fue desarrollar herramientas moleculares para sentar las bases del desarrollo de pruebas de diagnóstico eficientes, eficaces y económicas. Específicamente, hemos trabajado en la caracterización de los antígenos a partir de un ensayo que permita detectar anticuerpos circulantes α -NS1 de flavivirus en suero de pacientes. Para ello, se llevaron a cabo los pasos necesarios para obtener en plásmidos bacterianos las versiones completas de las proteínas NS1 de SLEV, WNV, YFV, DENV-1 y ZIKV, empleando cepas regionales o de referencia. Adicionalmente se llevó a cabo el desarrollo de antígenos recombinantes con diseño racional, mediante una estrategia de predicción de regiones de NS1 que presentan alta probabilidad teórica de formar epítopes lineales para células B. Dichas regiones fueron utilizadas para el diseño de dos proteínas multiepítopes, EPS_{SLEV} y EPS_{Flavis}, las cuales codifican dentro de su secuencia a los potenciales epítopes lineales para células B obtenidos mediante el uso de herramientas bioinformáticas. Tomando en cuenta la evidencia reportada en la literatura a partir del ensayo de varias proteínas multiepitópicas, consideramos que las mayores ventajas del uso

de proteínas multiepitópicas recombinantes son (AnandaRao *et al.*, 2005, Han *et al.*, 2016, Thakur *et al.*, 2010): (i) incremento de la probabilidad de unión de los anticuerpos α -NS1 con los epítopes contenidos en una sola secuencia de proteína, de esta manera se reforzaría la sensibilidad diagnóstica; (ii) la unión de los anticuerpos se espera sea mucho más específica puesto que las secuencias epitópicas empleadas en su construcción pasaron por filtros *in silico* al momento de la predicción bioinformática; y (iii) las proteínas se emplean desnaturalizadas, por lo tanto, se facilitarían los procesos de producción y purificación.

Teniendo en cuenta las ventajas de las construcciones multiepitope, consideramos que podría ser importante explorar en futuros trabajos la posibilidad de generar otras construcciones que abarquen zonas inmunógenas relevantes de diferentes proteínas no estructurales, como podrían ser NS3 y NS5. De esta forma, es posible producir antígenos que presenten las regiones específicas para cada virus, pudiendo capturar el amplio espectro de inmunoglobulinas de tipo G producidas en una infección por Flavivirus.

Tanto las versiones de NS1 completas como las construcciones multiepitopes fueron expresadas en *E. coli* a pequeña y mediana escala. Para el procesamiento de las proteínas recombinantes generadas, se diseñó y optimizó un protocolo de ruptura por ultrasonido y un protocolo de purificación en condiciones desnaturalizantes mediante cromatografía de pseudoafinidad. De esta manera todas las versiones pudieron ser obtenidas en concentraciones entre 100 y 300 $\mu\text{g/ml}$ dependiendo la proteína y con niveles de pureza mayores al 95%.

Por otro lado se llevó a cabo la caracterización inmunológica, mediante las técnicas de *Western Blotting* o ELISA, de las proteínas generadas. Todas las versiones de NS1 fueron reconocidas por anticuerpos dirigidos contra la cola de histidina y por sueros humanos positivos para cada uno de los flavivirus estudiados.

En esta tesis también se muestran los resultados correspondientes al análisis de la inmunogenicidad de los antígenos NS1 de SLEV, WNV y ZIKV. Ésta fue verificada en un protocolo de inmunización en ratones y la reactividad de los sueros generados fue analizada mediante ELISA indirecto, detectándose distintos niveles de título al reaccionar contra el antígeno homólogo u heterólogo.

De la misma manera, empleando los sueros producidos en ratones, se determinó que la construcción EPS_{SLEV} respondió de manera diferencial a los sueros generados con las proteínas NS1_{SLEV} y NS1_{WNV} , mostrando su posible capacidad de diferenciar las dos infecciones al ser usado como base de un ensayo de diagnóstico.

La construcción multiepitope $\text{EPS}_{\text{Flavis}}$, que contiene secuencias inmunogénicas pertenecientes a los cinco virus planteados en este trabajo y fue desarrollada con el objetivo de generar anticuerpos monoclonales capaces de detectar la proteína NS1 de distintos flavivirus y emplearlos en distintos formatos de ELISA, no pudo ser utilizada en esta tesis.

Se realizaron varios intentos de generación de líneas productoras de anticuerpos inmortalizadas a partir de bazo de ratón inmunizado pero todos fueron infructuosos. Por falta de tiempo, el protocolo no pudo ser continuado, esperando poder avanzar con este antígeno en futuros proyectos. Por ello, se plantea repetir los protocolos de inmunización de ratones con la proteína y la posterior generación de anticuerpos monoclonales para la detección de las proteínas NS1 de los distintos flavivirus. El mayor interés en esta construcción radica en la oportunidad de combinar los antígenos NS1 generados con anticuerpos monoclonales específicos para NS1 que puedan ser empleados en el formato de ELISA de bloqueo de epítopes, un esquema muy versátil que permite realizar la vigilancia o el monitoreo epidemiológico de virus en múltiples hospedadores, así como también en los formatos de detección de antígeno o captura de IgM. Una estrategia similar, empleando una construcción multiepítope, ha sido llevada a cabo por Kim *et al.*, 2018, permitiendo también el desarrollo de una inmunocromatografía de captura de anticuerpos IgG/IgM para Zika.

La evaluación del desempeño diagnóstico de estos antígenos fue realizada en el formato de *test* de ELISA indirecto. Para ello se diseñó y optimizó un ensayo de ELISA para los antígenos NS1_{SLEV} y NS1_{WNV}. Las pruebas de factibilidad fueron realizadas empleando sueros humanos negativos y positivos para distintos flavivirus, obteniéndose resultados satisfactorios. Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos con los *ensayos* (78-100% de sensibilidad y 96-100% de especificidad) son comparables con los valores obtenidos en otros trabajos con los ensayos de ELISA basados en proteínas o partículas virales enteras (80-95% de sensibilidad y 90-100% especificidad) (García-Bermejo & de Ory, 2017). Aunque, es necesario resaltar que la cantidad de muestras de suero de pacientes con diagnóstico confirmado para flavivirus empleadas para evaluar las proteínas NS1 fue únicamente de 23; una cantidad baja como para obtener resultados concluyentes.

Los resultados alcanzados en el presente trabajo de investigación son promisorios, sentando las bases para el diseño de diferentes ensayos de diagnóstico basados en los antígenos producidos. Se requieren estudios de validación diagnóstica empleando muestras de suero de poblaciones muestrales más grandes, incluyendo diferentes flavivirus u arbovirus de sintomatología similar. Esto nos permitirá no solo la validación del formato ELISA indirecto, sino también la posibilidad de utilizar estos antígenos en otros formatos de diagnóstico.

Cabe destacar que, como se evidencia durante la pandemia de COVID-19 o de Dengue en los últimos años, contar con herramientas de diagnóstico rápido de casos permite identificar, aislar y tratar los pacientes afectados y así contribuir a la mitigación de la propagación y expansión de la enfermedad.

Avanzando en este sentido, con el propósito de desarrollar un *test* de diagnóstico rápido (RDT), que pueda estar accesible y sea aplicable en el punto de atención de pacientes

(“*point-of-care*” - POC) en áreas endémicas, la aplicación diagnóstica de estas proteínas recombinantes será evaluada, en estudios posteriores, en otros formatos de sero-diagnóstico del tipo ELISA, y en formatos más simples y de menor costo, como son las tiras de inmunocromatografía. Estas últimas son de especial interés con el propósito de desarrollar una prueba diagnóstica que pueda ser dispuesto en los POC. Prototipos de RDT para uso en POC han sido desarrollados y evaluados principalmente para Dengue, Zika y Chikungunya (Blacksell *et al.*, 2006, Bosch *et al.*, 2017, Negredo Antón *et al.*, 2013).

Entre los múltiples formatos para las técnicas inmunocromatográficas, también se utiliza el de la detección de anticuerpos IgM e IgG. Es así que, el suero humano pasa a través de una membrana de nitrocelulosa o nylon donde tiene lugar la reacción. El antígeno NS1 debe ser inmovilizado en la membrana de reacción, en donde se unen a éste los anticuerpos específicos presentes en el suero. Al colocarse la proteína directamente sobre la membrana, sin que haya previamente anticuerpos inmovilizados, la urea presente en el *buffer* no afectaría el ensayo y podría ser usada perfectamente. Para otros formatos en donde el antígeno se coloque sobre anticuerpos ya adheridos, debería usarse la proteína en *buffer* nativos, para ello se diseñó y se puso a prueba un protocolo de replegado/cambio de *buffer* que se describe en la sección **3.4.4 Replegado** de Materiales y Métodos. Posteriormente a la interacción antígeno-anticuerpo específico, ésta es detectada por el conjugado (antisuero para el isotipo objetivo) que contiene oro coloidal y que cambia de color en presencia de anticuerpos. Por lo general, también se incluye una zona de control para garantizar que la reacción se haya realizado con éxito. Para este tipo de técnicas los resultados se obtienen en 15-30 minutos.

Otro formato de ELISA en el que es posible aplicar los antígenos generados es el ELISA de afinidad, el cual es utilizado para discriminar infecciones recientes o pasadas. Este ensayo posee la estructura del ELISA indirecto pero se le adiciona un paso de lavado con urea luego del agregado del suero humano, permitiendo que los anticuerpos con menos afinidad se liberen y los más afines queden retenidos. De esta manera, es posible determinar la afinidad (como porcentaje) realizando un cálculo entre el resultado obtenido con el suero con y sin lavado con urea. Al principio de la infección, los anticuerpos tienen poca afinidad por los antígenos; esto aumenta gradualmente durante las semanas y meses posteriores debido al proceso inmunológico de maduración de afinidad. Este formato es especialmente útil para diferenciar infecciones recientes y pasadas con flavivirus relacionados como son Dengue, Zika y *West Nile* (Furuya *et al.*, 2019, Tsai *et al.*, 2018) o para descartar infecciones pasadas producto de vacunación con YFV, JEV o TBEV (Negredo Antón *et al.*, 2013).

En cuanto a la construcción multiepitope EPS_{SLEV}, se pudo verificar que es detectada con distintas intensidades por los sueros generados en ratones con las proteínas NS1-HT_{SLEV} y

NS1-HT_{WNV}. Es sumamente necesario determinar su reactividad frente a sueros humanos infectados y de esta manera verificar su capacidad real con el motivo de proponerla como base de un ensayo de diagnóstico que potencialmente podría diferenciar infecciones por SLEV y WNV. De la misma manera se detectó una pérdida de sensibilidad cuando se la compara con el antígeno NS1-HT_{SLEV}, estas diferencias deberían ser analizadas más en profundidad para poder determinar si afectarían su capacidad de ser usada en diagnóstico. Teniendo en cuenta los resultados de esos futuros ensayos, los epítopes conformantes de la proteína recombinante EPS_{SLEV} pueden ser evaluados de manera individual, junto con otros epítopes candidatos potenciales (derivados de aproximaciones de inmunoinformática y/o confirmados experimentalmente como epítopes inmunodominantes), para estimar su valor diagnóstico y de esta manera poder construir proteínas multiepitópicas optimizadas con una combinación más eficiente de secuencias.

Como se mencionó anteriormente, este tipo de construcciones son capaces de mejorar la sensibilidad y especialmente la especificidad de los ensayos de diagnósticos por lo que sería importante explorar el diseño de nuevas construcciones multiepitope para los otros virus trabajados. Para continuar con esta idea, y teniendo en cuenta el resultado que sugiere que la proteína NS1_{WNV} podría tener una mayor inmunogenicidad, creemos que se debería analizar la posibilidad de diseñar una construcción que contenga una secuencia multiepitope de WNV (EPS_{WNV}). Al ser esta proteína más inmunogénica no se vería afectada significativamente su sensibilidad y brindaría la posibilidad de seleccionar epítopes específicos que la diferencien de NS1_{SLEV} u otros flavivirus.

Como se describió en la introducción varios autores han explorado la posibilidad de emplear a la proteína NS1 como candidato a vacuna. Para avanzar en ese sentido, hemos procedido a clonar la secuencia de NS1_{SLEV} en un plásmido que contiene la proteína Z del virus Junín, esta proteína posee la capacidad de auto ensamblarse en partículas similares a virus (VLPs) que permiten la vehiculización de antígenos en su superficie. Este plásmido ha sido desarrollado en nuestro laboratorio y probado con distintos antígenos virales y proteínas modelo (Borio *et al.* 2012). Actualmente NS1 es uno de esos antígenos, habiéndose podido lograr la expresión en células y la generación de las primeras partículas con NS1 (datos no publicados).

En conjunto, los resultados globales del presente trabajo de investigación muestran el diseño integral desde la estrategia de producción de proteínas recombinantes a ser empleadas como antígenos hasta la optimización preliminar en un formato que permite estudiar la factibilidad del uso de estos. Es así que todas estas herramientas quedan disponibles para que su aplicación en diferentes soportes tecnológicos o esquemas de enzimoimmunoensayos que requieran ser estudiados en profundidad.

Asimismo, resulta evidente la necesidad de estrechar aún más los lazos de colaboración entre los centros académicos y los centros de referencia de diagnóstico, donde los intercambios de muestras, los espacios de formación y las instancias de ampliación del conocimiento sean prácticas cotidianas y, en definitiva, permitan optimizar el empleo de estas herramientas moleculares en el marco real de las aplicaciones diagnósticas.

Sección VII

Anexos

7. Anexos

Se utilizaron cinco cepas virales para la obtención de las distintas secuencias de las proteínas NS1.

Para el virus SLE, se utilizó la cepa CbaAr-4005, aislada durante el brote epidémico ocurrido en el año 2005. Su número de acceso para la secuencia genómica completa es FJ753286.

Para WNV, se utilizó la cepa argentina ArEq001 aislada de caballos. El número de acceso para la secuencia de genoma completo en el *GeneBank* es GQ379160.

Para YFV, la secuencia de NS1 se amplificó a partir de cepa vacunal 17D (Stamaril®). Se puede acceder a la secuencia completa de esta cepa a partir del número de acceso NC_002031.

En el caso de DENV-1 se utilizó la secuencia de una cepa aislada en Hawái en 1944 (número de acceso KM204119).

La cepa seleccionada de ZIKV corresponde a la cepa epidémica del 2015 que circula de forma autóctona en Brasil. La cepa ZikaSPH2015 se encuentra completamente secuenciada y su número de acceso es KU321639.

Usando estas secuencias nucleotídicas se llevaron a cabo los diseños de las distintas construcciones recombinantes que se emplearon para producir cada uno de los antígenos del trabajo. En la **Figura 1** del anexo se muestra la secuencia aminoacídica de cada una de las proteínas recombinantes producidas. Además, se indican los elementos agregados a las construcciones: las secuencias de seis histidinas, los conectores formados por tres glicinas y los sitios de enzimas de restricción.

NS1-HT_{SLV} (361 aminoácidos)
 MDSGCAIDLQRELKCGGIFVYNDVEKWKSDYKYFPLTPTGLARVIQEAHANGICGIRSTSRLEHLMWESIQKELNAIFEDNEIDLSSVVVQEDPK
 YYKRAPRLKKLEDELNYGKKWGTLMFEPKLGNNTFVVDGPETKECPTANRAWNSFKVEDFGFGMVFTRLWLTIREENTTECDSAIIGTAIKGD
 RAVHSDLSYWIESKKNGTWQLERAVMGEVKSCTWPEHTLWGDGVIESEMIIPVTLGGPKSHHNKRTGYHTQTKGPNWSEGEITLDFDYCPGTTVTV
 TEHCGNRGASLRTTTASGKLVTDWCCRSCLPPLRYTTKDGCGWYGMETRPVKEEEAKLVKSRVTALFHHHHHH

NS1-HT_{MSV} (361 aminoácidos)
 MDTGCAIDISRLQELRCSSGVFIHNDVEAWMDRYKYYPETPQGLAKIIQKAHKEGVCGLRSVSRLEHQMWAEVVKDELNTLLKENGVDLSVVVEKQEG
 MYKSAPKRLTATTEKLEIGWKAWGKSILFAPELANNTFVVDGPETKECPTQNRANNSLEVEDFGFGLTSTRMFLKARESNTTECDSKIIGTAVKNN
 LAIHSDLSYWIESRLNDTWKLERAVLGEVKSCTWPEHTLWGDGILESDLIIPVTLAGPRSNHNRPGYKTONQGPNDGVRVEIDFDYCPGTTVT
 SESCGHRGPATRTTTESGKLITDCCRSCTLPPLRYQTDSCGWYGMETRPQRHDEKTLVQSQVNALEHHHHHH

NS1-HT_{DSMV1} (381 aminoácidos)
 MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMDSGCVINWKGRELKCGSGIFVTNEVHTWTEQYKQADSPKRLSAAIGKAWEEGVCGRSATRLNIMWKQISNEL
 NHILLENDMKFTVVVGDSGILAQGKKMIGPQPMHESKWSWGKAKIIGADVQNTTFIIDGPNTPECPDDQRAWNIWEVEDYGFQIFTTNIWLKL
 RDSYTOVQCDPRIMSAAIKDSKAVHADMGYWIESEKNETWKLARASFIEVKTCTVWPKSHTLWNGVLESEMIIPKIYGGPISQHNYRPGYFTQTAGP
 WHLGKLELDFDLCEGTTVVVDHCGNRGPSLRTTTGTGKIIHEWCCRSCTLPPLRFKGEDGCGWYGMETRPVKDKENLVKSLVSALEHHHHHH

NS1-HT_{SLV} (381 aminoácidos)
 MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMDVGCSDVFSKKECTRCGTGVFYNDVEAWDRYKHPDSPRRLAAAVKQAWEDGICGISSVSRMENIMWRSVEGEL
 NAILLENGVQLTVVVGSVKNPMWRGPQLPVVNLPHGWKAWGKSHFVRAAKTNNFVVDGDTLKECPLKRAWNSFLVEDHGFVFTSVNLKV
 REDYSLECDPAVIGTAVKGKEAVHSDLYWIESEKNDTWRLKRAHLIEMKTCEWPKSHTLWTDGIESDLIIPKSLAGPLSHHNTREGYRTQMKGP
 WHSEELIRFEECPGTKVHVEETCGTRGPSLRSTTASGRVIEEWCCRECTMPPLSFRANDGCGWYGMETRPKEPESNLVRSMTALFHHHHHH

NS1-HT_{VFV} (384 aminoácidos)
 MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMDGCAINFGKRELKCGSGIFIRDSDDWLNKYSYYPEDFVKLASIVKAGFEEGKCGLSYDSEHEMWRRADEI
 NAIPELENEVDISVVVQDPKNVYQRTGTHFFSRIRDGLQYGWKTWGNLVFSFGAKNGSFIIDGKSRECFESNRVWNSPQIEEFGTGVFTTRVYMDA
 VPEYITDCDGSILGAAYNGKKSANGSPTFWMSHEVNGTWMIHTLEALDYKECEWPLTHTIGTSVEESRMFMPRSIGGPVSSHNIIPGYKVOTNSP
 WMQVPLEVVKREACPGTSVLIIDGNCDDGRGKSTRSTTDSCKVPEWCCRSCTMPFVSFSGSDGCGYFMEIRPRKTHESHLVRSWVTAATAALEHHHHHH

EPS_{SLV} (187 aminoácidos) BamHI KpnI HindIII SacI
 MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQOMGRGSDVEKWKSDYKYEGGDPKYKRAPRLKKLEDELGGCPKSHHNKRTGYHTQTKGPELIKGDRA
 VPEEGCGNRGASLRTTTASGKLEGGRPVKEEEARGTFDGPETKECPTANRAWNSGGCESEMIIPVTLGGPKSHHNKLAALALEHHHHHH

EPS_{FLAVIS} (101 aminoácidos)
 MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMIRPVKDEENLVGGIRPLKEEENLVGGIRPVKEEEAKIVGGIRPQRHDEKTLVGGIRPRKEPESNLVLEH
 HHHHH

Figura 1. Secuencias aminoacídica de todas la proteínas generadas. Se muestran las secuencias de las proteínas recombinantes producidas. En todos los casos la secuencia correspondiente al ORF de NS1 de los distintos virus se encuentra coloreada, y la secuencia en negro corresponde a aminoácidos aportados por el plásmido. Con cajas negras se destacan las secuencias de seis histidinas; con cajas azules las secuencias de tres glicinas, conectoras de los distintos epítopes; y con cajas verdes los sitios de corte de enzimas de restricción.

En la **Figura 2 del Anexo** se muestra el alineamiento de las secuencias proteicas de NS1 empleadas para la predicción bioinformática de epítopes, indicándose con diferentes colores los fragmentos seleccionados para continuar trabajando en la construcción de antígenos recombinantes.

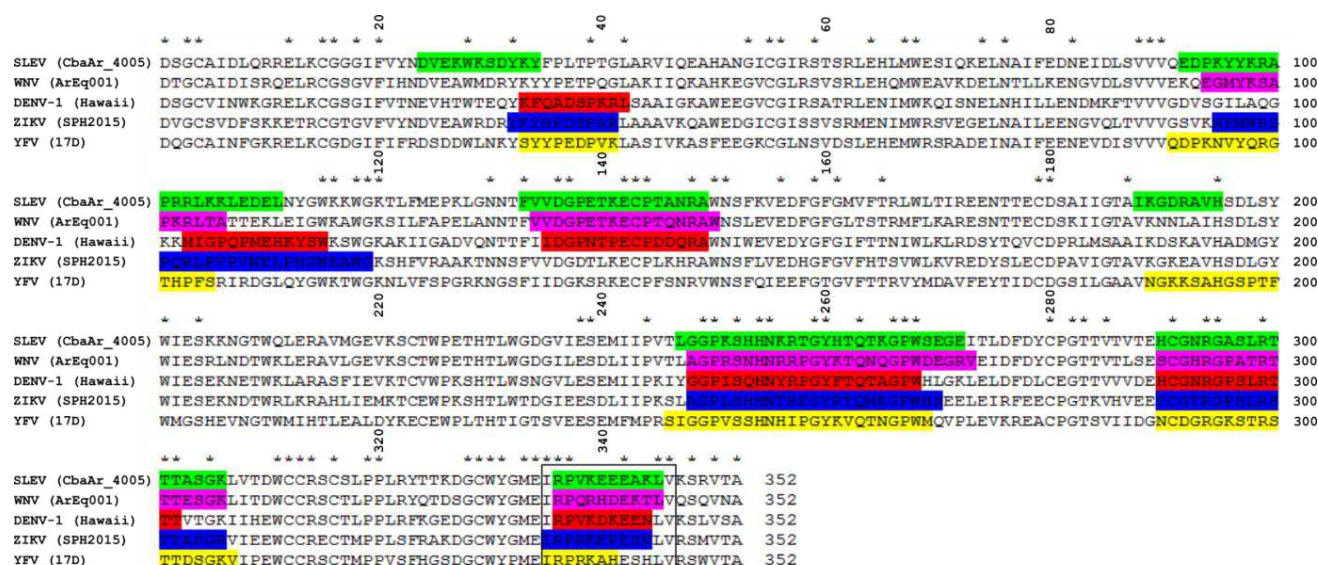
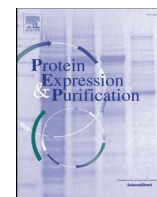


Figura 2. Predicción de epítopes. Se muestra un alineamiento de las secuencias de NS1 usadas en el trabajo. Con asteriscos se marcan las posiciones conservadas entre todas las secuencias. Se encuentran coloreadas las secuencias que corresponden a epítopes encontrados por predicción bioinformática y con un recuadro negro las secuencias comprendidas entre los aminoácidos 335-346 empleados para el diseño de EPS_{Flaviv}.

A continuación se adjunta la publicación que surgió a partir de esta tesis y contiene parte de los experimentos que en ésta se describen.

El trabajo se titula *“Production of recombinant NS1 protein and its possible use in encephalitic flavivirus differential diagnosis”* y fue publicado en la revista *Protein Expression and Purification* en el año 2019.



Production of recombinant NS1 protein and its possible use in encephalitic flavivirus differential diagnosis

Matías Sebastián Lorch^a, María Soledad Collado^a, Marcelo Horacio Argüelles^b,
Rosana Paola Rota^a, Lorena Ivana Spinsanti^c, Mario Enrique Lozano^a, Sandra Elizabeth Goñi^{a,*}

^a Área de Virosis Emergentes y Zoonóticas (AVEZ), Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular (LIGBCM), Departamento de Ciencia y Tecnología (DCyT), Universidad Nacional de Quilmes (UNQ), Roque Sáenz Peña 352, B1876BXD, Bernal, Buenos Aires, Argentina

^b Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV), Departamento de Ciencia y Tecnología (DCyT), Universidad Nacional de Quilmes (UNQ), Roque Sáenz Peña 352, B1876BXD, Bernal, Buenos Aires, Argentina

^c Laboratorio de Arnavirus y Arbovirus, Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC), Enfermera Gordillo Gómez S/N., 5016, Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Saint Louis Encephalitis virus
West Nile virus
NS1
Recombinant protein
Serological diagnosis

ABSTRACT

Saint Louis encephalitis virus (SLEV) and West Nile virus (WNV) are two of the major causes of arboviral encephalitis in the Americas. The co-circulation of related flaviviruses in the Americas and prior vaccination against flaviviruses pose problems to the diagnostic specificity of serological assays due to the development of cross-reactive antibodies. An accurate diagnosis method capable of differentiating these related viruses is needed. NS1 is a glycosylated, nonstructural protein, of about 46 kDa which has a highly conserved structure. Anti-NS1 antibodies can be detected within 4–8 days after the initial exposure and NS1 is the least cross-reactive of the flaviviral antigens. This study was aimed to generate SLEV and WNV NS1 recombinant proteins for the development of a flavivirus diagnostic test. Local Argentinian isolates were used as the source of NS1 gene cloning, expression, and purification. The protein was expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies and further purified by metal-chelating affinity chromatography (IMAC) under denaturing conditions. Human sera from SLEV and WNV positive cases showed reactivity to the recombinant NS1 proteins by western blot. The unfolded NS1 proteins were also used as immunogens. The polyclonal antibodies elicited in immunized mice recognized the two recombinant proteins with differential reactivity.

1. Introduction

Saint Louis encephalitis virus (SLEV) and West Nile virus (WNV) (genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*), are positive-sense RNA viruses with a 30- to 35-nm icosahedral core surrounded by a lipid bilayer envelope. The genome is composed of ten genes coding for three structural proteins (C, M, and E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, and NS5) [1,2].

SLEV is the major representative of the Japanese encephalitis serocomplex in the Americas. Since the first identification of SLEV in St. Louis, Missouri, in 1933, it has caused more than 50 outbreaks and numerous epidemics in the United States, and was one of the major causes of arboviral encephalitis until the introduction of West Nile virus in 1999 [3,4]. Although SLEV has been known to occur in Argentina and Brazil since the 1960s, human cases of SLEV infection have only been reported sporadically. The first confirmed outbreak of SLEV

outside North America was reported in 2005 in Argentina, where 47 confirmed clinical cases of SLEV infection, including nine fatalities, were reported in Córdoba province [5]. Since 2005, small outbreaks and sporadic cases have been reported in this country [6,7].

WNV is currently the most widely distributed of the encephalitic flaviviruses. First isolated in Uganda in 1937, WNV circulation has been described in Africa, Europe, Asia, and America. Since its introduction in 1999 in New York, it has rapidly dispersed throughout the Americas, affecting people from the central region of Canada to South America [1]. The first report of the introduction of WNV in Argentina was in January 2005, when the virus was detected in birds [8]. After this, evidence of the circulation of the virus in horses was reported in 2006 and 2010 [9].

Diagnosis of human Flavivirus cases is rarely accomplished by isolating the virus or antigen detection, since viremia levels may be very low or absent by the time the clinical manifestations appear [10]. For

* Corresponding author.

E-mail address: sandra.goni@unq.edu.ar (S.E. Goñi).

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.08.008>

Received 13 March 2018; Received in revised form 16 July 2018; Accepted 14 August 2018

Available online 17 August 2018

1046-5928/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

this reason, it depends almost exclusively on indirect methods. Thus, serological tests are established as the primary method for flaviviral diagnosis, making it possible to detect IgM or IgG from sera or cerebrospinal fluid (CSF) 4–8 days after the onset of symptoms [11,12].

The gold-standard serological method for detecting immune responses is the Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT), which can detect specific viral neutralizing antibodies (NTAb) and differentiate between closely related members of the genus *Flavivirus*. The PRNT is a very laborious technique that takes at least a week and requires appropriately timed sampling of acute and convalescent sera. Also, the handling of the live virus requires skilled personnel, and Biosafety level (BSL)-3 facilities that are not commonly available in most clinical settings. The procedure for the antigen preparation is time-consuming, and the biological risk limits the use of viruses that do not circulate in the region [12,13].

Many commercial and in-house serological tests have been developed to diagnose flavivirus infections [14–18], but the co-circulation of related flaviviruses in the Americas and prior vaccination against flaviviruses, like Yellow Fever, pose problems to the diagnostic specificity of serological assays due to the development of cross-reactive antibodies [12]. In South America, in addition to WNV and SLEV, flaviviruses that should also be considered when testing patients' sera include Dengue 1–4, Zika, Yellow Fever, Ilheus, Bussuquara and Rocio [19–22]. In many cases, this complexity leads to an indeterminate detection of the infecting etiology, concluding the diagnosis as probable SLEV/WNV.

NS1 protein is a highly conserved nonstructural protein that contains nearly 352 amino acid residues (depending on viral species) and shows a molecular weight that depends on post-translational glycosylations (46 kDa approximately) [23]. NS1 also appears to have a role in immune evasion, as it has been shown to attenuate complement activation [24]. While a large amount of NS1 remains in the infected cell, it is also actively secreted as a hexameric form at relatively high levels. During the acute phase of infection, both forms are demonstrated to be immunogenic and stimulate a non-neutralizing antibody response [12]. NS1 is an early diagnostic marker, as a high NS1 level circulates in the acute phase and can be detected in the sera of patients with primary and secondary infections, up to the 9th day after the onset of symptoms [25,26]. Anti-NS1 IgM antibodies can be detected within 4–7 days after the initial exposure and may persist more than one year. In comparison, anti-NS1 IgG is reliably detected eight days after the onset of symptoms [13]. It has also been reported that NS1 is the least cross-reactive of the flaviviral antigens and has the most specific reactivity when attempts are made to differentiate WNV from SLEV immune sera [27].

We describe the production of recombinant NS1 proteins from SLEV and WNV using local Argentinian isolates as the source of NS1 gene sequences. The method used in this study might be suitable for producing NS1 proteins from strains of other geographical regions or other related viruses with no or minimal modification. The recombinant NS1 proteins retain their immunological properties and can potentially be used in the development of an NS1 antigen-based flavivirus diagnostic method, and this would be pan-specific or Japanese Encephalitis Virus serocomplex specific diagnostic method.

2. Materials and methods

2.1. Viral strains, RNA extraction, and reverse transcription

The SLEV epidemic strain (CbaAr-4005) was isolated from *Cx. Quinquifasciatus* mosquitoes collected during the human encephalitis outbreak in 2005 [28]. Viral stocks were obtained by inoculating monolayers of VERO cells in 75 cm² tissue culture flasks with virus diluted 1:10 in Eagle's minimum essential medium (MEM) containing 2% fetal bovine serum (FBS). Cells and supernatant were then harvested when 75% cytopathic effects were observed. Cell debris were

removed by centrifugation and the viral supernatant was aliquoted and stored at -80°C , according to Diaz et al., (2006) [28].

Vero cell supernatant was used for viral RNA extraction using the commercial QIAamp viral RNA MiniSpin Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Extracted RNA was reverse-transcribed into cDNA using SuperScript III (Invitrogen) and random hexamers.

The WNV strain ArEq-001, whose sequence was used for the synthesis of NS1, was isolated from horses and sequenced by Morales et al. in 2006 [9].

2.2. Primers design and generation of PCR products

The SLEV strain CbaAr-4005 (GeneBank accession number FJ753286) was used as the source for the gene-specific sequence. The SLEV NS1 primers were designed to incorporate the restriction sites *NdeI* and *XhoI* followed by the specific gene sequence according to the corresponding SLEV strain. The PCR product was generated using the virus cDNA as template and the corresponding pair of primers. PCR amplification was performed using Pfu DNA Polymerase (Promega) using typical PCR conditions as follows: after an initial denaturation step at 94°C for 2 min, the reaction was amplified for 35 cycles. Each cycle consisted of a denaturation step at 94°C for 20 s, annealing at 50°C for 20 s, extension at 72°C for 1 min and a final extension step at 72°C for 6 min, followed by storage at 4°C . PCR products were then purified from 0.8% (w/v) agarose gel using QIAquick gel extraction kit (Qiagen).

2.3. Construction of the recombinant expression plasmid

The expression vector pET-22 b (+), a His-Tag (HT) fusion vector, was used to generate the expression clones of NS1-HT fusion proteins of SLEV and WNV. In the first place, the generated PCR product was subcloned in the pGEM-T (Promega) vector following the manufacturer's instructions. The pGEM-T vector with the NS1 full-length nucleotide sequence of SLEV and the expression vector pET-22 b (+) (Novagen) were double digested by *NdeI* and *XhoI* restriction endonucleases (Thermo Fisher Scientific), gel purified and ligated. The ligation mixture was transformed into electrocompetent *E. coli* Top 10 cells, and bacterial colonies were analyzed by plasmid DNA isolation and restriction digestion fragment mapping and sequenced using T7 promoter and T7 terminator universal primers.

The NS1 full-length nucleotide sequence of WNV strain ArEq-001 (GeneBank accession number GQ379160) was codon optimized for *E. coli* expression and chemically synthesized by Epoch Life Science Inc., USA. The restriction sites *NdeI* and *XhoI* were incorporated, and the sequence was cloned in pET-22 b (+).

2.4. Bacterial strains, culture, and DNA transformation

Electrocompetent TOP10 *E. coli* cells were used to generate the recombinant plasmids. The expression of recombinant proteins was conducted using *E. coli* Rosetta (DE3) strain cells. Transformation of DNA into *E. coli* competent cells was performed using the electroporation method (Gene Pulser, Bio-Rad) followed by 1 h recovery at 37°C in Luria Bertani (LB) medium. The transformants were spread onto LB agar plates containing the corresponding antibiotic.

Recombinant bacterial colonies were analyzed by plasmid DNA isolation and restriction digestion fragment mapping, and sequencing using the plasmid corresponding universal primers.

2.5. Expression of the NS1-HT proteins

A single bacterial colony was inoculated in 10 ml LB medium with 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin and 34 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol and allowed to grow overnight with shaking at 37°C . The overnight culture was then diluted (1:50) in fresh 500 ml LB medium containing the antibiotics and

grown at 37 °C until an OD₆₀₀ nm of 0.6 was reached. Induction was initiated by adding 1 mM final concentration of isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) and bacterial culture was incubated for 5 h with shaking at 37 °C. Bacterial culture was harvested by centrifugation at $5,000 \times g$ for 20 min at 4 °C and stored at –20 °C until use. Total protein fractions from induced and uninduced cultures were then subjected to vertical SDS-PAGE using the Laemmli system under reducing conditions [29].

2.6. Obtaining the recombinant protein from the insoluble fraction

Recombinant fusion proteins were purified from cells under denaturing condition. Cell pellets were resuspended in bacterial lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 5 mM Imidazole, pH 8.0) and incubated on ice for 30 min. Cells were then homogenized using sonication, 8 cycles of 1 min ON (300 J) and 3 min OFF. The cell lysate was clarified by centrifugation at $28,000 \times g$ for 20 min at 4 °C, and the supernatant containing total soluble proteins was discarded. The pellet containing the inclusion bodies was solubilized in denaturing buffer A (8 M urea, 20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazole, pH 7.4) for 2 h at room temperature with gentle shaking. Solubilized denatured NS1-HT proteins were separated from insoluble materials by centrifugation at $28,000 \times g$ for 30 min at 4 °C.

2.7. Purification of NS1-HT proteins by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) under denaturing conditions

Solubilized fusion proteins were filtered using 0.4 μ m filters and then purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using a His-Trap HP column (GE Healthcare) and ÄKTA prime Plus chromatography system (GE Healthcare).

All chromatography experiments were performed at 4 °C. The sample was injected by the sample pump (flow rate 0.5 mL/min) onto a His-Trap HP column charged with Ni²⁺. The column was then washed using 10 column volumes of buffer A (flow rate 1 mL/min) to facilitate removal of non-binding proteins. The recombinant fusion protein was then eluted (flow rate 1 mL/min) from the column using buffer B (8 M urea, 20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 500 mM Imidazole, pH 7.4). The eluted fractions were analyzed by reducing SDS-PAGE as described above to check the purity, and protein concentration was estimated as total protein using Bradford Protein Assay (Bio-Rad).

2.8. Western blotting analysis

Characterization of NS1-HT proteins was performed using western blotting analysis. Total cell protein and IMAC eluted fractions containing NS1-HT protein were separated by SDS-PAGE using the Laemmli system under reducing conditions (12% polyacrylamide separating gel), and electroblotted onto PVDF Blotting membrane (GE Healthcare) in Tris-Glycine buffer containing 20% (v/v) methanol using Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). The membrane was blocked using 1% (w/v) casein and 0.02% (v/v) Tween-20 in PBS for overnight at 4 °C, to avoid non-specific binding of the antibodies.

The western blotting assay was performed by incubation of the membrane with the diluted primary antibody in blocking buffer at 37 °C for 1 h and followed by 1 h incubation at 37 °C with the diluted HRP-conjugated secondary antibody. Between steps, the membrane was washed three times with PBS for 5 min. Finally, the membrane was washed with PBS, and enhanced chemiluminescence-based detection was performed to visualize the binding. Two different western blotting assays were performed. One assay was used to detect the presence of NS1 employing a serum of a primary flavivirus infection as primary antibody and HRP-conjugated anti-human IgG (Santa Cruz Biotechnology) as secondary antibody. The other assay was directed to the His-Tag, employing a rabbit polyclonal anti-His serum (anti-HT; Santa Cruz Biotechnology) as primary antibody and HRP-conjugated

anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) as secondary antibody.

All human sera were registered and approved by the Ethics Committee of National Clinical Health of National University of Córdoba, Córdoba Province, Argentina (Resolution N°112/12). The SLEV-positive sera belong to individuals with clinical diagnosis of encephalitis that became infected during the outbreak registered in Córdoba, Argentina, during 2005 [5]. The laboratory diagnosis was performed by MAC-ELISA for detection of IgM specific antibodies and confirmed by neutralization test by reduction of plaque forming units (PRNT), demonstrating seroconversion between two paired samples. All sera were taken from individuals with primary infections, and all of them resulted negative for Dengue and West Nile viruses.

The WNV positive sera were selected from a panel of sera collected in different public health hospitals in the city of Córdoba (years 2009–2010), involved in different serological surveys. Antibodies were detected by PRNT in a single sample, with neutralizing antibody titers between 1:10 and 1:160. These sera were negative for SLEV and Dengue [30]. The negative human serum did not show reactivity to SLEV, WNV or Dengue when was analyzed by PRNT.

2.9. Mice immunization using NS1-HT proteins and antibody measurement using ELISA

Two groups of 5 Balb/C mice aged 6 weeks were immunized subcutaneously with NS1-HT proteins (50 μ g) in the presence of Complete Freund's Adjuvant (Sigma-Aldrich) on day one in 250 μ l of a total volume of PBS. Booster immunizations with the same antigen but with Incomplete Freund's Adjuvant, administered subcutaneously, were performed twice on days 28 and 42. Blood samples were collected before immunization (day 1) and on days 40 and 60 (after immunization) for analysis of antibody levels. The sera were separated by centrifugation and then stored.

The immunization protocol was approved by the IACUC of the Universidad Nacional de Quilmes (N° 3/16).

The antibody measurement was performed by indirect ELISA. For the detection, 96 wells ELISA plate were coated with 50 μ l of 20 μ g/ml NS1-HT diluted in carbonate/bicarbonate buffer (0.1 M, pH 9) containing 6 M urea to keep the recombinant protein solubilized, and incubated overnight at 4 °C. After washing three times with PBS, the coated plates were blocked with 50 μ l per well of blocking solution (1% (w/v) casein in PBS) for 1 h at 37 °C. Blocking solution was discarded by tapping the plate and 50 μ l of mice sera, diluted 1:200 in dilution buffer (PBS, 1% (w/v) casein, 0.2% Tween-20, 0.3 M NaCl), was added per well and incubated for 1 h at 37 °C. Bound specific antibodies were detected using 50 μ l per well of a secondary antibody HRP-conjugated anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology), diluted 1:200 in dilution buffer. After three-time washing with PBS, 50 μ l of TMB Substrate Reagent Set (BD Biosciences) was added to each well. Following 15 min of incubation at room temperature, the reaction was stopped with 50 μ l of a 9 N H₂SO₄ solution. Absorbance was read at 450 nm using a Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek). Antibody titer was obtained by serial dilution, and the cut-off value was calculated using the pre-immune sera. Each serum sample was screened in triplicate wells, and convalescent-phase sera from confirmed SLEV or WNV encephalitis patients was used as a positive control in each case.

Sera titers were also calculated with an unrelated His-Tagged protein (His-Tagged Green Fluorescent Protein, GFP-HT) to measure the cross-reactivity due to the hexahistidine-tag, and this ELISA assay was carried out in the same denaturing conditions.

3. Results

3.1. Generation of the NS1 expression vector

The NS1_{SLEV} gene was amplified from the cDNA using PCR employing the corresponding forward (5'-GGGAATTCATATGGATTCGG

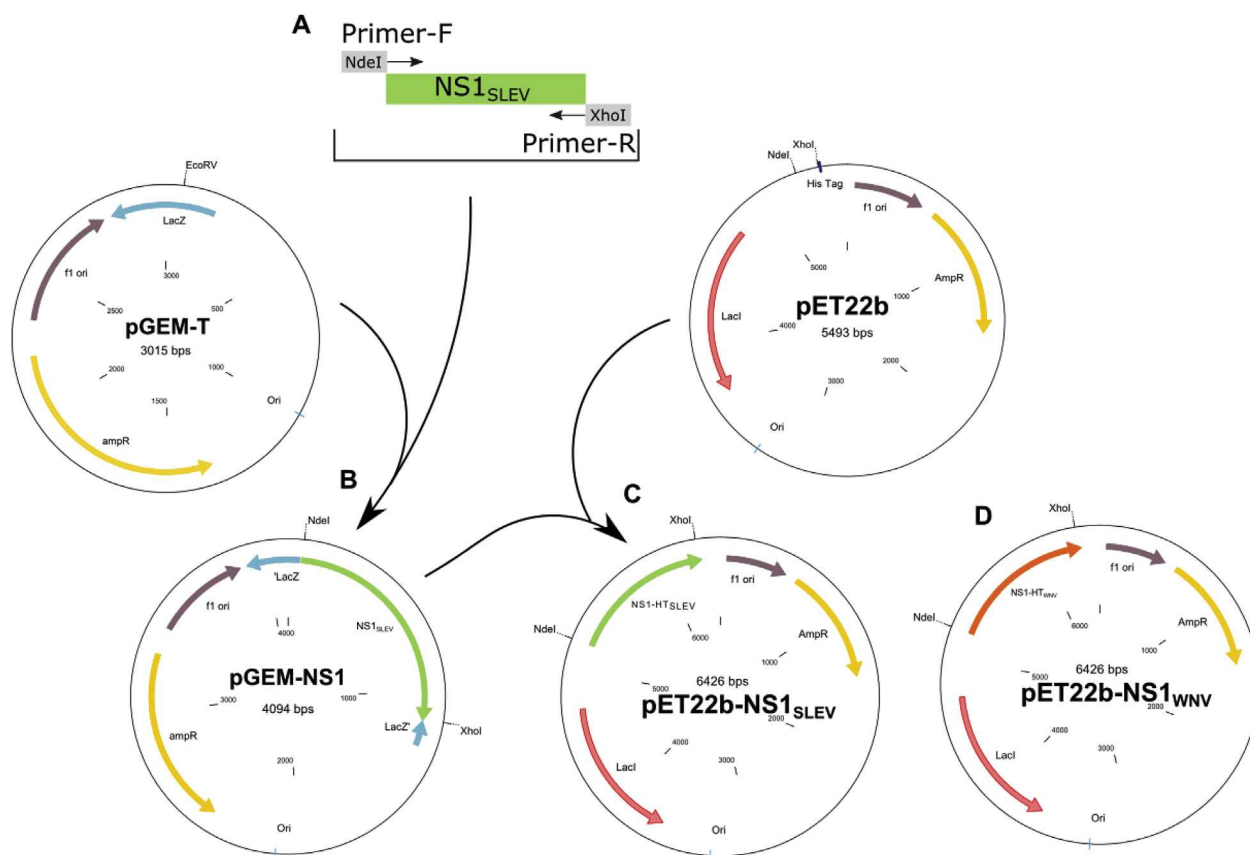


Fig. 1. Schematic workflow of the construction of the recombinant expression vector containing the NS1 coding sequence. A) NS1 gene was amplified from the SLEV cDNA using the designed primers. B) The PCR product was subcloned into pGEM-T to generate pGEM-NS1. C) pGEM-NS1 was double digested by *NdeI* and *XhoI* endonucleases and the NS1 sequence was transferred to the *NdeI* and *XhoI* sites in pET22b to generate pET22b-NS1 expression vector. D) The NS1 nucleotide sequence of WNV was chemically synthesized and cloned into pET-22 b.

GATGTGC-3', the underlined sequence shows the *NdeI* restriction site) and reverse (5'-GGCCTCGAGAGCTGTCACCTTGATTTCAC-3', the underlined sequence shows the *XhoI* restriction site) primers. After the amplification reaction, the 1079 pb NS1 gene sequence was obtained with the flanking sequences corresponding to the *NdeI* and *XhoI* restriction sites. The generated product was subcloned into the pGEM-T vector and then transferred to the corresponding restriction sites of the pET22-b (+) expression vector. The NS1_{WNV} nucleotide sequence was chemically synthesized and directly cloned into pET-22 b (+). The cloned genes in the recombinant plasmids were verified by sequencing. An overview of the cloning strategy is presented in Fig. 1.

3.2. Production and purification of the recombinant fusion protein NS1-HT

Recombinant expression plasmids containing the confirmed sequences of NS1 genes of the two viruses were transformed into *E. coli* Rosetta (DE3) strain. After 5 h of induction, the total protein profile was analyzed by reducing SDS-PAGE. This analysis showed that the NS1 clones were expressing the recombinant proteins with the expected molecular mass of approximately 41 kDa. Fig. 2A contains the production of NS1_{SLEV} recombinant protein and Fig. 2B the production of NS1_{WNV} recombinant protein. As can be seen in Fig. 2, no over-expression was observed in uninduced culture. Following complete bacterial cell lysis of the *E. coli* Rosetta (DE3) strain containing the pET22b-NS1_{SLEV} or pET22b-NS1_{WNV}, the insoluble and soluble protein fractions were also analyzed by reducing SDS-PAGE. The recombinants NS1 can be found in the insoluble fraction (Fig. 2). Purification of recombinant NS1-HT_{SLEV} (Fig. 2A) and NS1-HT_{WNV} (Fig. 2B) using IMAC revealed a single band of 41 kDa in the eluate fraction. The identity of purified proteins was confirmed by western blotting with anti-histidine

polyclonal serum (Fig. 3A). A smaller sized band was detected in NS1_{WNV} probably due to degradation or incomplete protein expression. The average yield of recombinant proteins produced in the bacterial expression system described was 2 mg of purified NS1-HT fusion protein per 100 mL of bacterial culture. The purity of the recombinant proteins was estimated to be greater than 90%.

3.3. Preserved antigenicity of the recombinant NS1 proteins

Western blotting was performed to confirm the identity and characterize the reactivity of the recombinant proteins towards anti-NS1 antibodies in patient's serum. We could detect the NS1-HT_{SLEV} protein using an SLEV patient's serum and the NS1-HT_{WNV} protein with a WNV patient serum. As seen in Fig. 3B, the anti-NS1 antibodies present in sera recognized the recombinant proteins, generating strong bands of 41 kDa. Both human sera recognized the heterologous antigens in the dilution used for this experiment (not shown). Smaller sized bands were also recognized by the positive human serum probably due to protein degradation or nonspecific serum interactions. Serum from an individual which has not been exposed to the viruses was used as negative control and did not show reactivity to the recombinant proteins.

3.4. Immunogenicity of recombinant NS1 protein in Balb/c mice

To measure the production of anti-NS1 IgG antibodies by immunized mice, indirect ELISA was performed using sera collected at days 1, 40, and 60 sera, and both groups of mice sera were tested against the two recombinant NS1 proteins (Fig. 4). When comparing cross-reactivity between the two proteins, we observed that the sera of both groups exhibited reactivity against the two antigens, although the

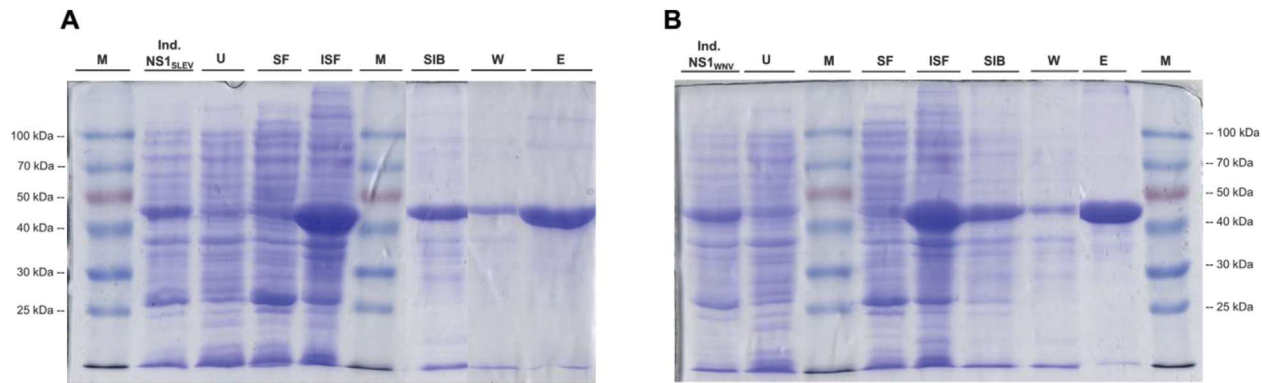


Fig. 2. Reducing SDS-PAGE analysis of recombinant SLEV and WNV NS1 protein expression and purification using IMAC. Panel A) contains the purification steps of NS1_{SLEV} recombinant protein and panel B) the purification steps of NS1_{WNV} recombinant protein. Total cell protein profile of induced (Ind. NS1_{SLEV} or Ind. NS1_{WNV}) and uninduced cultures (U), soluble (SF) and insoluble (ISF) protein fractions, protein profile of solubilized inclusion bodies (SIB) loaded into IMAC column, wash fraction (W), eluate fraction (E) containing the corresponding purified protein. M: molecular weight marker (Blue Plus[®] Protein Marker, TransGen Biotech). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

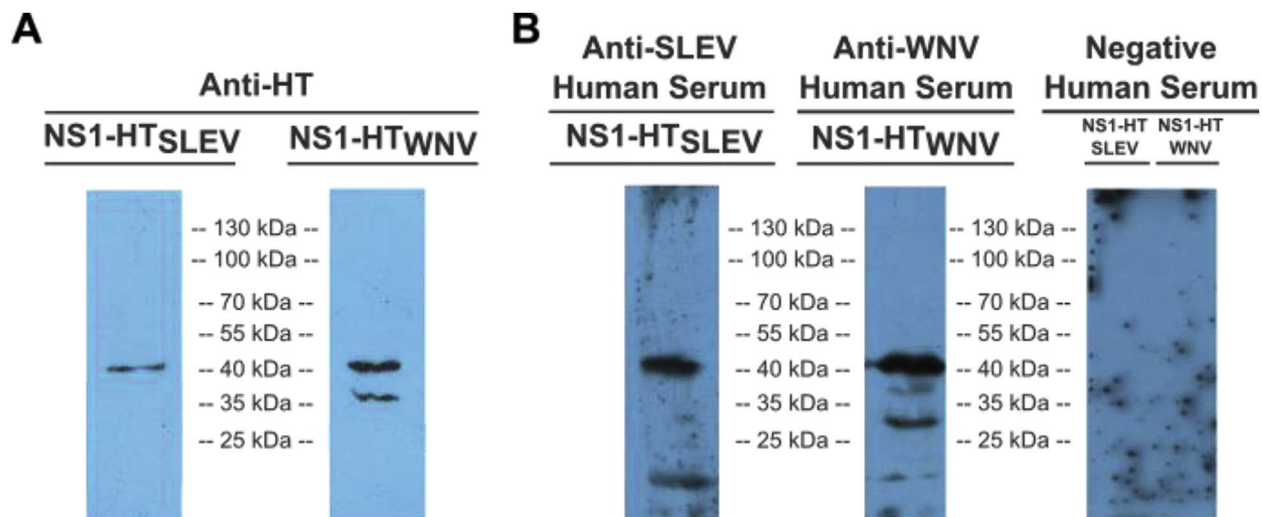


Fig. 3. Western blot analysis of purified NS1-HT_{SLEV} and NS1-HT_{WNV}. A) The membranes were probed with rabbit anti-His Tag polyclonal serum. B) The membranes were probed with SLEV or WNV positive human sera or a negative human serum.

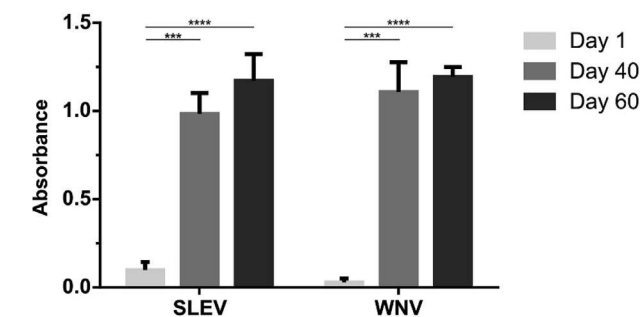


Fig. 4. Comparison of mice sera reactivity against the recombinant NS1 proteins before (day 1) and after immunization (days 40 and 60). Two groups of BALB/c mice were immunized twice with NS1_{SLEV} (SLEV) and NS1_{WNV} (WNV) and the antibodies against recombinant proteins were detected by indirect ELISA. Each bar represents the mean $\pm$ SD. Statistical differences were established, independently within each group, according to a non-parametric test (Dunn's multiple comparisons tests). *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$.

titer against the homologous protein was significantly higher than against the heterologous antigen (Table 1). The reactivity against an unrelated hexahistidine-tagged protein (GFP-HT) was tested, and both sera reached a 1:1600 titer suggesting that antibodies directed to the

Table 1
Titer of antibodies obtained in each group against the two recombinant proteins and an unrelated His-Tagged protein. The cut-off value was calculated using the pre-immune sera.

	Protein in plate		
	NS1-HT _{SLEV}	NS1-HT _{WNV}	GFP-HT
Sera of group 1 (immunized with NS1 _{SLEV})	1:25600	1:1600	1:1600
Sera of group 2 (immunized with NS1 _{WNV})	1:3200	1:102400	1:1600

His-Tag might explain part of the cross-reactivity.

The ability of the mouse anti-NS1_{SLEV} and anti-NS1_{WNV} antibodies to distinguish between the two antigens was tested in western blot (Fig. 5). For this experiment, a dilution in the differentiation range obtained by ELISA was selected, 1:10000 for anti-NS1_{SLEV} serum and 1:64000 for anti-NS1_{WNV} serum. The results agree with those obtained by ELISA, showing that the sera can differentiate the two antigens at an appropriate high dilution.

4. Discussion

SLEV and WNV are two relevant flaviviruses for the Americas. SLEV has caused more than 50 outbreaks and epidemics in North America

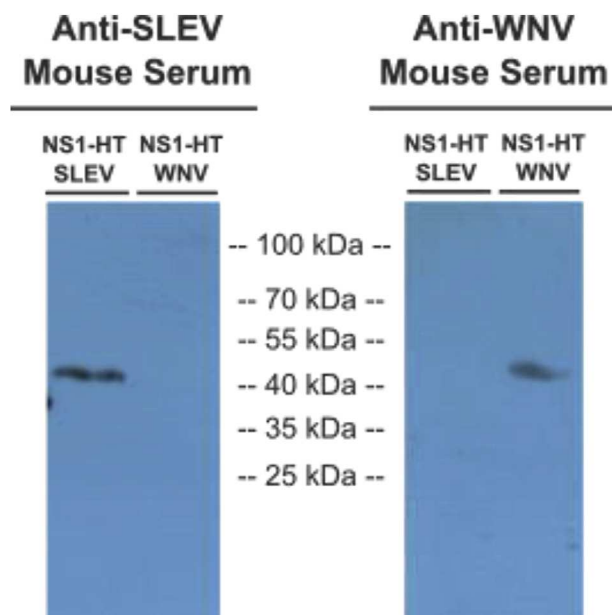


Fig. 5. Western blot of NS1-HT_{SLEV} and NS1-HT_{WNV}. The membrane on the left was probed with mouse anti-NS1_{SLEV} serum (dilution 1:10000), and the membrane on the right was probed with mouse anti-NS1_{WNV} serum (dilution 1:64000) to distinguish between the two antigens.

until the introduction of WNV in 1999 and has reemerged in South America in the last decades causing outbreaks in Argentina and Brazil [4]. WNV has its origin in Africa but is the most widely distributed of the encephalitic flaviviruses and cases have been detected from Canada to South America [1].

The diagnosis of infectious diseases is one of the leading public health problems in Latin American countries. Having epidemiological data that represent, as accurately as possible, the infection rate in a region has a direct impact on the planning and decisions adopted by health organisms. For these reasons, it is fundamental to have access to diagnostic methods that fit the technology available in a region.

Specific antibody detection remains the most widely used approach for the diagnosis of flavivirus infection. The main weakness that limits the clinical relevance of serological methods is the broad antigenic cross-reactivity that exists among all flaviviruses [31]. The antigenic similarities among flaviviruses lead to extensive cross-reactivity, especially for secondary infections (natural sequential infections by the same or a different flavivirus), and this cross-reactivity complicates diagnosis in regions in which different flavivirus species co-circulate. In Argentina, the evidence of these difficulties has been observed in different serological surveys and diagnosis of clinical cases in humans. As reported by Tauro et al. (2012) [32], 48% of the horse sera analyzed by PRNT in their study contained antibodies for both viruses (SLEV + WNV), and the criterion of a titer difference of > four-fold is insufficient to diagnose the etiological agent [32]. Recently, a study in monkeys in the Northeastern region of Argentina indicated the co-circulation of seven flaviviruses, and in 42% of flavivirus positive sera it was not possible to identify which virus/viruses the animals had been exposed [22].

There are numerous commercially available assays to identify the serological response to Dengue, Yellow Fever, Japanese encephalitis and West Nile virus [33]. However, commercial methods are lacking for many others viruses. In the case of SLEV, attempts have been made to achieve a correct differentiation from other flaviviruses in human cases and infected mosquitoes [34,35], but none of these assays are in widespread use.

Many serological tests have been developed to diagnose flavivirus infections, based on the detection of viral antigens or the immune

response, IgM and IgG. The NS1 antigen is usually the target of choice since it is a soluble antigen that is found abundantly during infection. In this case, also, the tests typically generate specific results, with very low levels of cross-reactivity between the different flaviviruses [33].

Several factors were reported to negatively influence serological tests, such as the type of infection (primary vs. secondary), geographical origins of samples and viral serotypes [36,37]. Generating antigens from geographical specific strains should assist in optimizing the diagnostic accuracy [38].

We report here the production and purification of recombinant NS1 proteins from SLEV and WNV isolates for the development of flavivirus diagnostic tests. Two Argentinian isolates were used as the source of the NS1 gene cloning, expression, and purification in a bacterial expression system.

Several reports have also proposed achieving NS1 expression using bacterial cells since prokaryotic systems are easy to manipulate and express high levels of recombinant proteins [38–40]. The drawback of these methods is that the expressed antigen is prone to problems of protein stability and tends to appear as insoluble aggregates known as inclusion bodies. Nevertheless, this condition still may be advantageous due to the very high levels of enriched protein produced [41]. Refolding protocols must be used to produce NS1 with a native-like protein conformation, preserving conformation and antigenic determinants of the natural virus protein, not present in the denatured form of the antigen [39,42]. However, these protocols are time-consuming and sometimes very inefficient.

In our work, the strategy was to use the denatured NS1-HT proteins as an immunogen. Antibodies obtained with the denatured recombinant protein would only recognize linear epitopes in the natural antigen, but it has been reported that linear epitopes present in NS1 protein are immunodominant [43], and the least cross-reactive between SLEV and WNV [27].

The epitopes characterized by Sun et al. [43] were indicated in a multiple amino acid sequence alignment of NS1 proteins from the strains used in this work (Fig. S1). The alignment showed that the sequences corresponding to those epitopes are not identical between the used strains, indicating that the polyclonal antibodies induced in the mice immunization could differentiate the NS1 from SLEV and WNV, supporting the results obtained in ELISA and western blot.

In this study, NS1 genes have been successfully cloned into a His-Tag fusion vector pET22-b (Novagen). The cloned recombinant proteins were over-expressed in the *E. coli* system with a His-Tag at the C-terminal end. The expressed proteins were present in the insoluble phase hence it was purified under denaturing conditions using one-step affinity chromatography. SDS-PAGE analysis showed that the proteins were 90% pure and the yield was about 20 mg of purified protein from 1 L of bacterial culture.

Western blot assay showed that the recombinant NS1-HT proteins reacted with anti-His tag antibodies and SLEV and WNV positive serum samples. Results showed smaller sized bands, probably due to incomplete protein expression or degradation of the NS1 protein. For a higher yield of protein devoid of degradation products or truncated proteins, an additional purification step could be used to separate recombinant proteins by molecular size (e.g., size exclusion chromatography).

The produced recombinant NS1 proteins were then used as antigens in a mouse immunization protocol. The serum samples showed the presence of anti-NS1 antibodies, demonstrating that the recombinant antigens possess immunogenic activity, and also suggesting the possible usefulness in diagnostic assays. The titers of mice sera, determined by indirect ELISA, showed that both recombinant proteins were detected with differential reactivity. Besides, the ability to distinguish between the two antigens was also verified by western blot.

These antigens could be used either for indirect ELISA to detect serum antibodies or for the generation of monoclonal antibodies that could recognize secreted NS1 present in the sera of infected SLEV or

WNV patients, enabling the development of a specific NS1 antigen capture test for early and accurate detection of acute infections in suspected flavivirus cases.

Thus it is concluded that we have generated and characterized recombinant NS1 antigens from SLEV and WNV strains isolated in Argentina. The recombinant proteins were able to generate antibodies specific to NS1 proteins and could be potentially used in the development of NS1 diagnostic tests.

Acknowledgments

We would like to thank the collaboration of the Universidad Nacional de Quilmes and Universidad Nacional de Córdoba, as well as the BID project PICT 2014 N°2104 and Florencio Fiorini Foundation; given that they were the pillars that allowed the realization of our research and the development of this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.08.008>.

References

- [1] F.J. May, C.T. Davis, R.B. Tesh, A.D. Barrett, Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas, *J. Virol.* 85 (2011) 2964–2974.
- [2] F.J. May, L. Li, S. Zhang, H. Guzman, D.W. Beasley, R.B. Tesh, S. Higgs, P. Raj, R. Bueno Jr., Y. Randle, L. Chandler, A.D. Barrett, Genetic variation of St. Louis encephalitis virus, *J. Gen. Virol.* 89 (2008) 1901–1910.
- [3] W.K. Reisen, H.D. Lothrop, S.S. Wheeler, M. Kennsington, A. Gutierrez, Y. Fang, S. Garcia, B. Lothrop, Persistent West Nile virus transmission and the apparent displacement St. Louis encephalitis virus in southeastern California, *J. Med. Entomol.* 45 (2008) 494–508 2003–2006.
- [4] A. Kopp, T.R. Gillespie, D. Hobelsberger, A. Estrada, J.M. Harper, R.A. Miller, I. Eckerle, M.A. Muller, L. Podsiadlowski, F.H. Leendertz, C. Drosten, S. Junglen, Provenance and geographic spread of St. Louis encephalitis virus, *mBio* 4 (2013) e00322–00313.
- [5] L.I. Spinsanti, L.A. Diaz, N. Glatstein, S. Arselan, M.A. Morales, A.A. Farias, C. Fabbri, J.J. Aguilar, V. Re, M. Frias, W.R. Almiron, E. Hunsperger, M. Siirin, A.T. Da Rosa, R.B. Tesh, D. Enria, M. Contigiani, Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005, *J. Clin. Virol.: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 42 (2008) 27–33.
- [6] A. Seijo, A.M. Morales, G. Poustis, Y. Romer, E. Efron, G. Vilora, S. Lloveras, S. Giamperetti, T. Puente, J. Monroig, V. Luppo, D. Enria, Outbreak of St. Louis encephalitis in the metropolitan Buenos Aires area, *Medicina* 71 (2011) 211–217.
- [7] C. Fabbri, A.M. Morales, V. Luppo, F. Cappato Berger, B. Balanito, M. Manrique, F. Fierro, S. Goenaga, D. Enria, S. Levis, Brote de Encefalitis de San Luis en la Provincia de San Juan, *Rev. Argent. Microbiol.* 1 (2011) 89.
- [8] L.A. Diaz, N. Komar, A. Visintin, M.J. Dantur Juri, M. Stein, R. Lobo Allende, L. Spinsanti, B. Konigheim, J. Aguilar, M. Laurito, W.R. Almiron, M. Contigiani, West Nile virus in birds, Argentina, *Emerg. Infect. Dis.* 14 (2008) 689–691.
- [9] M.A. Morales, M. Barrandeguy, C. Fabbri, J.B. Garcia, A. Vissani, K. Trono, G. Gutierrez, S. Pigretti, H. Menchaca, N. Garrido, N. Taylor, F. Fernandez, S. Levis, D. Enria, West Nile virus isolation from equines in Argentina, *Emerg. Infect. Dis.* 12 (2006) 1559–1561 2006.
- [10] M.P. Busch, S.H. Kleinman, L.H. Tobler, H.T. Kamel, P.J. Norris, I. Walsh, J.L. Matud, H.E. Prince, R.S. Lanciotti, D.J. Wright, J.M. Linnen, S. Caglioti, Virus and antibody dynamics in acute west Nile virus infection, *J. Infect. Dis.* 198 (2008) 984–993.
- [11] G. Kuno, Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans, *Adv. Virus Res.* 61 (2003) 3–65.
- [12] J. Hobson-Peters, Approaches for the development of rapid serological assays for surveillance and diagnosis of infections caused by zoonotic flaviviruses of the Japanese encephalitis virus serocomplex, *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 (2012) 379738.
- [13] M. De Filette, S. Ulbert, M. Diamond, N.N. Sanders, Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination, *Vet. Res. (Paris)* 43 (2012) 16.
- [14] D.Y. Chao, J.U. Galula, W.F. Shen, B.S. Davis, G.J. Chang, Nonstructural protein 1-specific immunoglobulin M and G antibody capture enzyme-linked immunosorbent assays in diagnosis of flaviviral infections in humans, *J. Clin. Microbiol.* 53 (2015) 557–566.
- [15] R. Lima Mda, R.M. Nogueira, A.M. Filippis, P.C. Nunes, C.S. Sousa, M.H. Silva, F.B. Santos, A simple heat dissociation method increases significantly the ELISA detection sensitivity of the nonstructural-1 glycoprotein in patients infected with DENV type-4, *J. Virol. Meth.* 204 (2014) 105–108.
- [16] R. Lima Mda, R.M. Nogueira, H.G. Schatzmayr, F.B. dos Santos, Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil, *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (2010) e738.
- [17] A.C. Felix, C.M. Romano, C. Centrone Cde, C.L. Rodrigues, L. Villas-Boas, E.S. Araujo, A.M. de Matos, K.I. Carvalho, C.M. Martelli, E.G. Kallas, C.S. Pannuti, J.E. Levi, Low sensitivity of NS1 protein tests evidenced during a dengue type 2 virus outbreak in Santos, Brazil, in 2010, *Clin. Vaccine Immunol.: CVI* 19 (2012) 1972–1976.
- [18] A.C. Felix, N.C.S. Souza, W.M. Figueiredo, A.A. Costa, M. Inenami, R.M.G. da Silva, J.E. Levi, C.S. Pannuti, C.M. Romano, Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection, *J. Med. Virol.* 89 (2017) 1477–1479.
- [19] N. Attar, ZIKA virus circulates in new regions, *Nat. Rev. Microbiol.* 14 (2016) 62–62.
- [20] M.L.G.d. Figueiredo, L.T.M. Figueiredo, Review on infections of the central nervous system by St. Louis encephalitis, Rocio and west Nile flaviviruses in Brazil, 2004–2014, *Adv. Microbiol.* 04 (2014) 955–961.
- [21] B.M. Forshey, C. Guevara, V.A. Laguna-Torres, M. Cespedes, J. Vargas, A. Gianella, E. Vallejo, C. Madrid, N. Aguayo, E. Gotuzzo, V. Suarez, A.M. Morales, L. Beingolea, N. Reyes, J. Perez, M. Negrete, C. Rocha, A.C. Morrison, K.L. Russell, P.J. Blair, J.G. Olson, T.J. Kochel, N.F.S.W. Group, Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000–2007, *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (2010) e787.
- [22] M.A. Morales, C.M. Fabbri, G.E. Zunino, M.M. Kowalewski, V.C. Luppo, D.A. Enria, S.C. Levis, G.E. Calderon, Detection of the mosquito-borne flaviviruses, West Nile, dengue, Saint Louis encephalitis, Ilheus, Bussuquara, and Yellow fever in free-ranging black howlers (*Alouatta caraya*) of northeastern Argentina, *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (2017) e0005351.
- [23] D. Watterson, N. Modhiran, P.R. Young, The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design, *Antivir. Res.* 130 (2016) 7–18.
- [24] P. Avirutnan, A. Fuchs, R.E. Hauhart, P. Somnuk, S. Youn, M.S. Diamond, J.P. Atkinson, Antagonism of the complement component C4 by flavivirus non-structural protein NS1, *J. Exp. Med.* 207 (2010) 793–806.
- [25] B. Shenoy, A. Menon, S. Biradar, Diagnostic utility of dengue NS1 antigen, *Pediatr. Infect. Dis.* 6 (2014) 110–113.
- [26] J. Macdonald, J. Tonry, R.A. Hall, B. Williams, G. Palacios, M.S. Ashok, O. Jabado, D. Clark, R.B. Tesh, T. Briese, W.I. Lipkin, NS1 protein secretion during the acute phase of West Nile virus infection, *J. Virol.* 79 (2005) 13924–13933.
- [27] L.F. Ocegueda, P.J. Patiris, R.E. Chiles, M.P. Busch, L.H. Tobler, C.V. Hanson, Flavivirus serology by western blot analysis (NS1, prM y E), *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77 (2007) 159–163.
- [28] L.A. Diaz, V. Re, W.R. Almiron, A. Farias, A. Vazquez, M.P. Sanchez-Seco, J. Aguilar, L. Spinsanti, B. Konigheim, A. Visintin, J. Garcia, M.A. Morales, A. Tenorio, M. Contigiani, Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005, *Emerg. Infect. Dis.* 12 (2006) 1752–1754.
- [29] T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982.
- [30] L. Spinsanti, C. Vergara Cid, M. Contigiani, Relevancia en salud pública de Flavivirus neurotrópicos concurrentes endémicos y emergentes en Córdoba, *Bol. Asoc. Argent. Microbiol.* 198 (2012) 7–9.
- [31] V. Sambri, M.R. Capobianchi, F. Cavrini, R. Charrel, O. Donoso-Mantke, C. Escadafal, L. Franco, P. Gaibani, E.A. Gould, M. Niedrig, A. Papa, A. Pierro, G. Rossini, A. Sanchini, A. Tenorio, S. Varani, A. Vazquez, C. Vocale, H. Zeller, Diagnosis of west Nile virus human infections: overview and proposal of diagnostic protocols considering the results of external quality assessment studies, *Viruses* 5 (2013) 2329–2348.
- [32] L.B. Tauro, B. Marino, L.A. Diaz, E. Lucca, D. Gallozo, L. Spinsanti, M. Contigiani, Serological Detection of St. Louis Encephalitis Virus and West Nile Virus in Equines from Santa Fe, Argentina vol. 107, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2012, pp. 553–556.
- [33] A.I. Negro Anton, F. de Ory Manchon, M.P. Sanchez-Seco Farinas, L. Franco Narvaez, M.I. Gegundez Camara, J.M. Navarro Mari, A. Tenorio Matanzo, Microbiological diagnosis of emerging arboviral and rodent borne diseases, *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 33 (2015) 197–205.
- [34] J. Ryan, K. Davé, E. Emmerich, B. Fernández, M. Turrel, J. Johnson, K. Gottfried, K. Burkhalter, A. Kerst, A. Hunt, R. Wirta, R. Nasci, Wicking assays for the rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viral antigens in mosquitoes (Diptera Culicidae), *J. Med. Entomol.* 40 (2003) 95–99.
- [35] D.E. Purdy, A.J. Noga, G.J. Chang, Noninfectious recombinant antigen for detection of St. Louis encephalitis virus-specific antibodies in serum by enzyme-linked immunosorbent assay, *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004) 4709–4717.
- [36] J.P. Ledermann, M.A. Lorono-Pino, C. Ellis, K.D. Saxton-Shaw, B.J. Blitvich, B.J. Beaty, R.A. Bowen, A.M. Powers, Evaluation of widely used diagnostic tests to detect West Nile virus infections in horses previously infected with St. Louis encephalitis virus or dengue virus type 2, *Clin. Vaccine Immunol.: CVI* 18 (2011) 580–587.
- [37] D.A. Martin, A. Noga, O. Kosoy, A.J. Johnson, L.R. Petersen, R.S. Lanciotti, Evaluation of a diagnostic algorithm using immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate human West Nile Virus and St. Louis Encephalitis virus infections during the 2002 West Nile Virus epidemic in the United States, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11 (2004) 1130–1133.
- [38] B. Yohan, P. Wardhani, Aryati, H. Trimarsanto, R.T. Sasmono, Production of recombinant dengue non-structural 1 (NS1) proteins from clinical virus isolates, *Protein Expression and Purification* 129 (2017) 53–59.
- [39] D. Das, S. Mongkolaungkoon, M.R. Suresh, Super induction of dengue virus NS1 protein in *E. coli*, *Protein Expression and Purification* 66 (2009) 66–72.
- [40] G. Lemos, I. Guillén, J.R. Fernández, T. Díaz, A.B. Colarte, M.E. Fernández de Cossio, Expression and purification of a full-length recombinant NS1 protein from a

- dengue 2 serotype viral isolate, *Biotechnol. Appl.* 30 (2013) 187–193.
- [41] H. Yamaguchi, M. Miyazaki, Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies, *Biomolecules* 4 (2014) 235–251.
- [42] J.H. Amorim, B.F. Porchia, A. Balan, R.C. Cavalcante, S.M. da Costa, A.M. de Barcelos Alves, L.C. de Souza Ferreira, Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein, *J. Virol Meth.* 167 (2010) 186–192.
- [43] E.C. Sun, J. Zhao, N.H. Liu, T. Yang, J.N. Ma, H.W. Geng, L.F. Wang, Y.L. Qin, Z.G. Bu, Y.H. Yang, R.A. Lunt, L.F. Wang, D.L. Wu, Comprehensive mapping of West Nile virus (WNV)- and Japanese encephalitis virus serocomplex-specific linear B-cell epitopes from WNV non-structural protein 1, *J. Gen. Virol.* 93 (2012) 50–60.

Sección VIII

Referencias Bibliográficas

8. Referencias Bibliográficas

- Adamo, M. P. & Contigiani, M. (2010) *Manual de Virología Médica y Diagnóstico Viroológico*, 3ra Edición. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.
- Agrawal, P., Nawadkar, R., Ojha, H., Kumar, J. & Sahu, A. (2017) Complement evasion strategies of viruses: An overview. *Front. Microbiol.* **8**(JUN), 1–19. doi:10.3389/fmicb.2017.01117
- Akey, D. L., Brown, W. C., Dutta, S., Konwerski, J. & Jose, J. (2014a) Flavivirus NS1 crystal structures reveal a surface for membrane association and regions of interaction with the immune system. *Science*. **343**(6173), 1–31. doi:10.1126/science.1247749.Flavivirus
- Akey, D. L., Brown, W. C., Dutta, S., Konwerski, J., Jose, J., Jurkiw, T. J., DelProposto, J., et al. (2014b) Flavivirus NS1 Structures Reveal Surfaces for Associations with Membranes and the Immune System. *Science*. **343**(6173), 881–885. doi:10.1126/science.1247749
- Al-Abdely, H. M. (2016) ZIKA: An emerging teratogenic virus. *Saudi Med. J.* **37**(8), 831–833. doi:10.15537/smj.2016.8.15676
- Allonso, D., Pereira, I. B., Alves, A. M., Kurtenbach, E. & Mohana-Borges, R. (2019) Expression of soluble, glycosylated and correctly folded dengue virus NS1 protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **162**(April), 9–17. Elsevier. doi:10.1016/j.pep.2019.05.003
- Amaro, F., Sánchez-Seco, M. P., Vázquez, A., Alves, M. J., Zé-Zé, L., Luz, M. T., Minguito, T., et al. (2019) The Application and Interpretation of IgG Avidity and IgA ELISA Tests to Characterize Zika Virus Infections. *Viruses* **11**(2), 179. doi:10.3390/v11020179
- Ambrose, R. L. & Mackenzie, J. M. (2011) West Nile Virus Differentially Modulates the Unfolded Protein Response To Facilitate Replication and Immune Evasion. *J. Virol.* **85**(6), 2723–2732. doi:10.1128/JVI.02050-10
- Amorim, J. H., Porchia, B. F. M. M., Balan, A., Cavalcante, R. C. M., Costa, S. M. da, Barcelos Alves, A. M. de & Souza Ferreira, L. C. de. (2010) Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *J. Virol. Methods* **167**(2), 186–92. doi:10.1016/j.jviromet.2010.04.003
- Amorim, J. H., Alves, R. P. D. S., Boscardin, S. B. & Ferreira, L. C. D. S. (2014) The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits. *Virus Res.* 1–8. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.virusres.2014.01.001
- AnandaRao, R., Swaminathan, S., Fernando, S., Jana, A. M. & Khanna, N. (2005) A custom-designed recombinant multiepitope protein as a dengue diagnostic reagent. *Protein Expr. Purif.* **41**(1), 136–47. doi:10.1016/j.pep.2005.01.009
- Anandarao, R., Swaminathan, S., Fernando, S., Jana, A. M. & Khanna, N. (2006) Recombinant Multiepitope Protein for Early Detection of Dengue Infections. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**(1), 59–67.
- Añez, G., Heisey, D. A., Volkova, E. & Rios, M. (2016) Complete Genome Sequences of Dengue Virus Type 1 to 4 Strains Used for the Development of CBER / FDA RNA Reference Reagents. *Am. Soc. Microbiol.* **4**(1), 4–5. doi:10.1128/genomeA.01583-15.Copyright
- Apte-Sengupta, S., Sirohi, D. & Kuhn, R. J. (2014) Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Curr. Opin. Virol.* **9**, 134–142. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.coviro.2014.09.020

- Arredondo-García, J. L., Méndez-Herrera, A. & Medina-Cortina, H. (2016) Arbovirus en Latinoamérica. *Acta Pediatr Mex* **37**(2), 111–131.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., Castro, E. De, Duvaud, S., et al. (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gks400
- Artsob, H., Gubler, D. J., Enria, D. A., Morales, M. A., Pupo, M., Bunning, M. L. & Dudley, J. P. (2009) West Nile virus in the new world: Trends in the spread and proliferation of West Nile virus in the western Hemisphere. *Zoonoses Public Health* **56**(6–7), 357–369. doi:10.1111/j.1863-2378.2008.01207.x
- Assenberg, R., Mastrangelo, E., Walter, T. S., Verma, A., Milani, M., Owens, R. J., Stuart, D. I., et al. (2009) Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *J. Virol.* **83**(24), 12895–906. doi:10.1128/JVI.00942-09
- Avilés, G., Rangeón, G., Vorndam, V., Briones, A., Baroni, P., Enria, D. & Sabattini, M. S. (1999) Dengue Reemergence in Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* **5**(4), 575–578. doi:10.3201/eid0504.990424
- Avirutnan, P., Fuchs, A., Hauhart, R. E., Somnuk, P., Youn, S., Diamond, M. S. & Atkinson, J. P. (2010) Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J. Exp. Med.* **207**(4), 793–806. doi:10.1084/jem.20092545
- Balkhair, A., Al-Maamari, K., Ba Alawi, F. & Al-Adawi, B. (2016) Zika virus: A roar after years of whispering. *Oman Med. J.* **31**(2), 87–88. doi:10.5001/omj.2016.18
- Barnett, E. D. (2007) Yellow Fever: Epidemiology and Prevention. *Clin. Infect. Dis.* **44**(6), 850–856. doi:10.1086/511869
- Barrera, R., Hunsperger, E., Muñoz-Jordan, J. L., Amador, M., Díaz, A., Smith, J., Besoff, K., et al. (2008) First isolation of West Nile virus in the Caribbean. *Am J Trop Med Hyg.* doi:78/4/666 [pii]
- Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K. C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S. C., Schott-Lerner, G., et al. (2018) Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem. Rev.* **118**(8), 4448–4482. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00719
- Bavia, L., Melanda, F. N., Arruda, T. B. de, Mosimann, A. L. P., Silveira, G. F., Aoki, M. N., Kuczera, D., et al. (2020) Epidemiological study on dengue in southern Brazil under the perspective of climate and poverty. *Sci. Rep.* **10**(1), 2127. doi:10.1038/s41598-020-58542-1
- Blacksell, S. D., Newton, P. N., Bell, D., Kelley, J., Mammen, M. P., Vaughn, D. W., Wuthiekanun, V., et al. (2006) The Comparative Accuracy of 8 Commercial Rapid Immunochromatographic Assays for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection. *Clin. Infect. Dis.* **42**(8), 1127–1134. doi:10.1086/501358
- Blitvich, B. J., Bowen, R. A., Marlenee, N. L., Hall, R. A., Bunning, M. L. & Beaty, B. J. (2003a) Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of West Nile Virus Antibodies in Domestic Mammals. *J. Clin. Microbiol.* **41**(6), 2676–2679. doi:10.1128/JCM.41.6.2676-2679.2003
- Blitvich, B. J., Marlenee, N. L., Hall, R. A., Calisher, C. H., Bowen, R. A., Roehrig, J. T., Komar, N., et al. (2003b) Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Detection of Serum

- Antibodies to West Nile Virus in Multiple Avian Species. *J. Clin. Microbiol.* **41**(3), 1041–1047. doi:10.1128/JCM.41.3.1041-1047.2003
- Borio, C. S., Bilen, M. F., Argüelles, M. H., Goñi, S. E., Iserte, J. A., Glikmann, G. & Lozano, M. E. (2012) Antigen vehiculization particles based on the Z protein of Junin virus. *BMC Biotechnol.* **12**. doi:10.1186/1472-6750-12-80
- Brandt, W. E., Cardiff, R. D. & Russell, P. K. (1970a) Dengue virions and antigens in brain and serum of infected mice. *J. Virol.* **6**(4), 500–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=376149&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bosch, I., Puig, H. de, Hiley, M., Carré-Camps, M., Perdomo-Celis, F., Narváez, C. F., Salgado, D. M., et al. (2017b) Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and zika virus in patient serum. *Sci. Transl. Med.* **9**(409), eaan1589. doi:10.1126/scitranslmed.aan1589
- Brandt, W. E., Chiewsilp, D., Harris, d I & Russell, P. K. (1970) Partial purification and characterization of a dengue virus soluble complement-fixing antigen. *J. Immunol.* **105**(0), 1565–1568.
- Brathwaite Dick, O., San Martín, J. L., Diego, J. del, Montoya, R. H., Dayan, G. H. & Zambrano, B. (2012) The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **87**(4), 584–593. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0770
- Brinton, M. a. (2014) Replication cycle and molecular biology of the west nile virus. *Viruses* **6**(1), 13–53. doi:10.3390/v6010013
- Busch, M. P., Kleinman, S. H., Tobler, L. H., Kamel, H. T., Norris, P. J., Walsh, I., Matud, J. L., et al. (2008) Virus and Antibody Dynamics in Acute West Nile Virus Infection. *J. Infect. Dis.* **198**(7), 984–993. doi:10.1086/591467
- Calabria, P. A. L., Shimokawa-Falcao, L. H. A. L., Colombini, M., Moura-da-Silva, A. M., Barbaro, K. C., Faquim-Mauro, E. L. & Magalhaes, G. S. (2019) Design and production of a recombinant hybrid toxin to raise protective antibodies against loxosceles spider venom. *Toxins (Basel)*. **11**(2), 1–20. doi:10.3390/toxins11020108
- Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G. & Brandt, W. E. (1989) Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J. Gen. Virol.* **70** (Pt 1), 37–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2543738>
- Calvet, G. A., Santos, F. B. Dos & Sequeira, P. C. (2016) Zika virus infection: Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **29**(5), 459–466. doi:10.1097/QCO.0000000000000301
- Campbell-Lendrum, D., Manga, L., Bagayoko, M. & Sommerfeld, J. (2015) Climate change and vector-borne diseases: What are the implications for public health research and policy? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **370**(1665), 1–8. doi:10.1098/rstb.2013.0552
- Casadaban, M. J. & Cohen, S. N. (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* doi:10.1016/0022-2836(80)90283-1
- Ceccaldi, P. E., Lucas, M. & Despres, P. (2004) New insights on the neuropathogenicity of West Nile virus. *FEMS Microbiol. Lett.* **233**(1), 1–6. doi:10.1016/j.femsle.2004.01.035

- Cerda, J. & Cifuentes, L. (2012) Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Rev. Chil. infectología* **29**(2), 138–141. doi:10.4067/S0716-10182012000200003
- Chan, H. B. Y., How, C. H. & Ng, C. W. M. (2017) Definitive tests for dengue fever: When and which should I use? *Singapore Med. J.* **58**(11), 632–635. doi:10.11622/smedj.2017100
- Chao, D.-Y. Y., Galula, J. U., Shen, W.-F. F., Davis, B. S., Chang, G.-J. J. J., Galul, J. U., Shen, W.-F. F., et al. (2015) Nonstructural protein 1-specific immunoglobulin m and g antibody capture enzyme-linked immunosorbent assays in diagnosis of flaviviral infections in humans. *J. Clin. Microbiol.* **53**(2), 557–66. doi:10.1128/JCM.02735-14
- Chen, L. H. & Hamer, D. H. (2016) Zika Virus: Rapid spread in the western hemisphere. *Ann. Intern. Med.* **164**(9), 613–615. doi:10.7326/M16-0150
- Chen, S., Wu, Z., Wang, M. & Cheng, A. (2017) Innate immune evasion mediated by flaviviridae non-structural proteins. *Viruses* **9**(10), 1–19. doi:10.3390/v9100291
- Chen, Y., Pan, Y., Guo, Y., Qiu, L., Ding, X. & Che, X. (2010) Comprehensive mapping of immunodominant and conserved serotype- and group-specific B-cell epitopes of nonstructural protein 1 from dengue virus type 1. *Virology* **398**(2), 290–298. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.virol.2009.12.010
- Chippaux, J. P. & Chippaux, A. (2018) Yellow fever in Africa and the Americas: A historical and epidemiological perspective. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **24**(1), 1–14. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. doi:10.1186/s40409-018-0162-y
- Choi, J., Eom, H. & Kim, H. Y. (2019) Non-structural protein 1 from Japanese encephalitis virus expressed in *E. coli* retains its molecular weight and immunogenicity. *Protein Expr. Purif.* 105548. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.pep.2019.105548
- Costa, S. M., Azevedo, a S., Paes, M. V, Sarges, F. S., Freire, M. S. & Alves, a M. B. (2007) DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology* **358**(2), 413–23. doi:10.1016/j.virol.2006.08.052
- Crook, K. R., Miller-Kittrell, M., Morrison, C. R. & Scholle, F. (2014) Modulation of innate immune signaling by the secreted form of the West Nile virus NS1 glycoprotein. *Virology* **458–459**, 172–182. Elsevier. doi:10.1016/j.virol.2014.04.036
- Cunha, M. S., Alves, L., Rocco, M., Maeda, Y., Silva, G., Nogueira, J. S., Souza, P. De, et al. (2016) First complete genome sequence of the Zika virus released. *Genome Announc.* **4**(2), 1–2. doi:10.1128/genomeA.00032-16.Copyright
- Darwish, M., Gorman, B. & Kalunda, M. (1985) *Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases. World Heal. Organ. - Tech. Rep. Ser.*, Vol. NO. 719.
- Das, D., Jacobs, F., Feldmann, H., Jones, S. M. & Suresh, M. R. (2007) Differential expression of the Ebola virus GP(1,2) protein and its fragments in *E. coli*. *Protein Expr. Purif.* **54**(1), 117–25. doi:10.1016/j.pep.2007.02.004
- Das, D., Mongkolaunkoon, S. & Suresh, M. R. (2009) Super induction of dengue virus NS1 protein in *E. coli*. *Protein Expr. Purif.* **66**(1), 66–72. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.pep.2009.02.003
- Davidson, A. D. (2009) *Chapter 2 New Insights into Flavivirus Nonstructural Protein 5. Adv. Virus*

- Res., 1st ed., Vol. 74. Elsevier Inc. doi:10.1016/S0065-3527(09)74002-3
- Davis, L., Beckham, J. & Tyler, K. (2008) North American encephalitic arboviruses. *Neurol. Clin.* **26**(3). doi:10.1016/j.ncl.2008.03.012.North
- Diamond, M. (2009) Progress on the development of therapeutics against West Nile virus. *Antiviral Res.* **83**(3), 214–227. doi:10.1016/j.antiviral.2009.05.006.Progress
- Diaz, L., Ré, V. & Almirón, W. (2006) Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. *Emerg. Infect. Dis.* **12**(11), 2005–2007. Retrieved from <http://journal.9med.net/qikan/article.php?id=224154>
- Diaz, L., Almirón, W., Re, V., Konigheim, B., Farías, A. A., Spinsanti, L., Aguilar, J., et al. (2008a) Vigilancia epidemiológica de Flavivirus (Arbovirus) y sus posibles vectores y hospedadores asociados en la ciudad de Córdoba. *Fund A Roemmers* **19**, 159.
- Diaz, L., Komar, N. & Visintin, A. (2008b) West Nile virus in birds, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* **14**(4), 2006–2008. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2570931/>
- Diaz, L. A., Nemeth, N. M., Bowen, R. a, Almiron, W. R. & Contigiani, M. S. (2011) Comparison of argentinean saint louis encephalitis virus non-epidemic and epidemic strain infections in an avian model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**(5), e1177. doi:10.1371/journal.pntd.0001177
- Ding, X., Hu, D., Chen, Y., Di, B., Jin, G., Pan, Y., Qiu, L., et al. (2011) Full serotype- and group-specific NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assay for rapid differential diagnosis of dengue virus infection. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**(3), 430–434. doi:10.1128/CVI.00462-10
- Domingo, C., Patel, P., Yillah, J., Weidmann, M., Méndez, J. A., Nakouné, E. R. & Niedrig, M. (2012) Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.01799-12
- Domingo, C., Charrel, R. N., Schmidt-Chanasit, J., Zeller, H. & Reusken, C. (2018) Yellow fever in the diagnostics laboratory review-article. *Emerg. Microbes Infect.* **7**(1). Springer US. doi:10.1038/s41426-018-0128-8
- Donadieu, E., Bahuon, C., Lowenski, S., Zientara, S., Couplier, M. & Lecollinet, S. (2013) Differential Virulence and Pathogenesis of West Nile Viruses. *Viruses* **5**(11), 2856–2880. doi:10.3390/v5112856
- Drosten, C., Götting, S., Schilling, S., Asper, M., Panning, M., Schmitz, H. & Günther, S. (2002) Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.40.7.2323-2330.2002
- Egloff, M.-P., Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J.-L. & Canard, B. (2002) An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J.* **21**(11), 2757–68. doi:10.1093/emboj/21.11.2757
- Eiden, M., Vina-Rodriguez, A., Hoffmann, B., Ziegler, U. & Groschup, M. H. (2010) Two new real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineages 1 and 2 West Nile virus strains. *J. Vet. Diagnostic Investig.* doi:10.1177/104063871002200515
- Fabbri, Morales, Luppo, Berger, Salanitro, Manrique, Fierro, et al. (2011) Brote De Encefalitis De San

- Luis En La Provincia De San Juan, Argentina, 2011. *Rev. Argent. Microbiol.* **43**(1), 89.
- Fabbri, C. M., Morales, M. A., Garcia, J., Luppo, V. C. & Levis, S. (2012a) Análisis filogenético de una cepa de virus West Nile caracterizada de un equino con sintomatología neurológica de la provincia de Córdoba, Argentina.
- Fabbri, C., Rossi, G. C., Dueñas, J. C. R., Garcia, J. B., Levis, S., Calderon, G., Gardenal, C. N., et al. (2012b) Isolation of Yellow Fever Virus from Mosquitoes in Misiones Province, Argentina. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **12**(11), 986–993. doi:10.1089/vbz.2011.0730
- Filette, M. De, Ulbert, S., Diamond, M. S. & Sanders, N. N. (2012) Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet. Res.* **43**(1), 16. BioMed Central Ltd. doi:10.1186/1297-9716-43-16
- Flamand, M. (2015) The flavivirus NS1 protein's mysteries unveiled? *BioEssays* **37**(5), 472–472. doi:10.1002/bies.201500029
- Fonseca, N. J. da, Lima Afonso, M. Q., Pedersolli, N. G., Oliveira, L. C. de, Andrade, D. S. & Bleicher, L. (2017) Sequence, structure and function relationships in flaviviruses as assessed by evolutive aspects of its conserved non-structural protein domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **492**(4), 565–571. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.041
- Freire, M. C. L. C., Pol-Fachin, L., Coêlho, D. F., Viana, I. F. T., Magalhães, T., Cordeiro, M. T., Fischer, N., et al. (2017) Mapping Putative B-Cell Zika Virus NS1 Epitopes Provides Molecular Basis for Anti-NS1 Antibody Discrimination between Zika and Dengue Viruses. *ACS Omega* **2**(7), 3913–3920. doi:10.1021/acsomega.7b00608
- Furuya, A. K., Hunt, D., George, K. St., Dupuis, A. P., Kramer, L. D., Shi, P.-Y. & Wong, S. (2019) Use of the immunoglobulin G avidity assay to differentiate between recent Zika and past dengue virus infections. *Clin. Sci.* CS20180874. doi:10.1042/CS20180874
- García-Bermejo, I. & Ory, F. de. (2017) Rapid diagnosis in serology. *Enfermedades Infecc. y Microbiol. Clin. (English ed.)* **35**(4), 246–254. doi:10.1016/j.eimce.2016.12.001
- Gardner, C. L. & Ryman, K. D. (2010) Yellow fever: A reemerging threat. *Clin. Lab. Med.* **30**(1), 237–260. doi:10.1016/j.cll.2010.01.001
- Gaunt, M. W., Sall, A. A., Lamballerie, X. de, Gould, E. A., Falconar, A. K. I. & Dzhivanian, T. I. (2001) Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J. Gen. Virol.* **82**(8), 1867–1876. doi:10.1099/0022-1317-82-8-1867
- Gebhard, L. G., Filomatori, C. V. & Gamarnik, A. V. (2011) Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses* **3**(9), 1739–1756. doi:10.3390/v3091739
- Gibney, K. B., Edupuganti, S., Panella, A. J., Kosoy, O. I., Delorey, M. J., Lanciotti, R. S., Mulligan, M. J., et al. (2012) Detection of anti-yellow fever virus immunoglobulin M antibodies at 3–4 years following yellow fever vaccination. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **87**(6), 1112–1115. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0182
- Gillespie, L. K., Hoenen, A., Morgan, G. & Mackenzie, J. M. (2010) The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *J. Virol.* **84**(20), 10438–47. doi:10.1128/JVI.00986-10
- Gubler, D. (2007) The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. *Clin. Infect.*

- Dis.* **45**, 1039–1046. doi:10.1086/521911
- Gutsche, I., Coulibaly, F., Voss, J. E., Salmon, J., d'Alayer, J., Ermonval, M., Larquet, E., et al. (2011) Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**(19), 8003–8. doi:10.1073/pnas.1017338108
- Guzman, M. G., Jaenisch, T., Gaczkowski, R., Hang, V. T. T., Sekaran, S. D., Kroeger, A., Vazquez, S., et al. (2010) Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**(8), 2–11. doi:10.1371/journal.pntd.0000811
- Hamrick, P. N., Aldighieri, S., Machado, G., Leonel, D. G., Vilca, L. M., Uriona, S. & Schneider, M. C. (2017) Geographic patterns and environmental factors associated with human yellow fever presence in the Americas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**(9), 1–27. doi:10.1371/journal.pntd.0005897
- Han, K., Zhao, D., Liu, Y., Huang, X., Yang, J., Liu, Q., An, F., et al. (2016) Design and evaluation of a polytope construct with multiple B and T epitopes against Tembusu virus infection in ducks. *Res. Vet. Sci.* **104**, 174–180. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.rvsc.2015.09.011
- Harrison, S. C. (2008) The pH sensor for flavivirus membrane fusion. *J. Cell Biol.* **183**(2), 177–9. doi:10.1083/jcb.200809175
- Haussig, J. M., Young, J. J., Gossner, C. M., Mezei, E., Bella, A., Sirbu, A., Pervanidou, D., et al. (2018) Early start of the west Nile fever transmission season 2018 in Europe. *Eurosurveillance*. doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.32.1800428
- Hayes, E. B., Komar, N., Nasci, R. S., Montgomery, S. P., O'Leary, D. R. & Campbell, G. L. (2005) Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg. Infect. Dis.* doi:10.3201/eid1108.050289a
- Heinz, F. X., Stiasny, K., Auer, G. P., Holzmann, H., Allison, S. L., Mandl, C. W. & Kunz, C. (1994) Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology*. doi:10.1006/viro.1994.1013
- Hirota, J., Shimoji, Y. & Shimizu, S. (2012) New Sensitive Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using a Monoclonal Antibody against Nonstructural Protein 1 of West Nile Virus NY99. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**(2), 277–83. doi:10.1128/CVI.05382-11
- Holmes, E. C. & Twiddy, S. S. (2003) The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect. Genet. Evol.* **3**(1), 19–28. doi:10.1016/S1567-1348(03)00004-2
- Holzmann, I., Agostini, I., Areta, J. I., Ferreyra, H., Beldomenico, P. & Bitetti, M. S. di. (2010) Impact of yellow fever outbreaks on two howler monkey species (*Alouatta guariba clamitans* and *A. caraya*) in Misiones, Argentina. *Am. J. Primatol.* **72**(6), 475–480. doi:10.1002/ajp.20796
- Hua, R.-H., Liu, L.-K., Huo, H., Li, Y.-N., Guo, L.-P., Wang, X.-L., Qin, C.-F., et al. (2014) Comprehensive mapping of a novel NS1 epitope conserved in flaviviruses within the Japanese encephalitis virus serocomplex. *Virus Res.* 1–7. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.virusres.2014.03.001
- Hukkanen, R. R., Liggitt, H. D., Kelley, S. T., Grant, R., Anderson, D., Beaty, B. J., Marlenee, N. L., et al. (2006) Comparison of commercially available and novel west Nile virus immunoassays for detection of seroconversion in pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*). *Comp. Med.*
- Kaufmann, B. & Rossmann, M. (2011) Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus

- cell entry. *Microbes Infect.* **13**(1), 1–9. doi:10.1016/j.micinf.2010.09.005. Molecular
- Kilpatrick, A. M., Kramer, L. D., Jones, M. J., Marra, P. P. & Daszak, P. (2006) West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. *PLoS Biol.* doi:10.1371/journal.pbio.0040082
- Kim, Y. G., Yoo, J. S., Kim, J. H., Kim, C. M. & Oh, J. W. (2007) Biochemical characterization of a recombinant Japanese encephalitis virus RNA-dependent RNA polymerase. *BMC Mol. Biol.* **8**, 1–12. doi:10.1186/1471-2199-8-59
- Kim, Y. H., Lee, J., Kim, Y. E., Chong, C. K., Pinchemel, Y., Reisdörfer, F., Coelho, J. B., et al. (2018) Development of a rapid diagnostic test kit to detect IgG/IgM antibody against Zika virus using monoclonal antibodies to the envelope and non-structural protein 1 of the virus. *Korean J. Parasitol.* **56**(1), 61–70. doi:10.3347/kjp.2018.56.1.61
- Kitai, Y., Shoda, M., Kondo, T. & Konishi, E. (2007) Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate West Nile virus from Japanese encephalitis virus infections in equine sera. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**(8), 1024–1031. doi:10.1128/CVI.00051-07
- Komar, N. & Clark, G. G. (2006) West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Rev. Panam. Salud Pública.* doi:10.1590/S1020-49892006000200006
- Kumar, A., Buhler, S., Selisko, B., Davidson, A., Mulder, K., Canard, B., Miller, S., et al. (2013) Nuclear Localization of Dengue Virus Nonstructural Protein 5 Does Not Strictly Correlate with Efficient Viral RNA Replication and Inhibition of Type I Interferon Signaling. *J. Virol.* **87**(8), 4545–4557. doi:10.1128/JVI.03083-12
- Larsen, J. E. P., Lund, O. & Nielsen, M. (2006) Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res.* **2**, 2. doi:10.1186/1745-7580-2-2
- Lemos, G., Guillén, I., Fernández, J. R., Díaz, T. & Colarte, A. B. (2013) Expression and purification of a full-length recombinant NS1 protein from a dengue 2 serotype viral isolate (October 1999), *Biotecnología Aplicada*, 30:187-193.
- Lima, M. D. R. Q., Nogueira, R. M. R., Schatzmayr, H. G. & Santos, F. B. dos. (2010) Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**(7), e738. doi:10.1371/journal.pntd.0000738
- Lin, H.-E., Tsai, W.-Y., Liu, I.-J., Li, P.-C., Liao, M.-Y., Tsai, J.-J., Wu, Y.-C., et al. (2012) Analysis of epitopes on dengue virus envelope protein recognized by monoclonal antibodies and polyclonal human sera by a high throughput assay. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**(1), e1447. doi:10.1371/journal.pntd.0001447
- Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (1997) trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J. Virol.* **71**(12), 9608–9617. Retrieved from <http://jvi.asm.org/content/71/12/9608.short>
- Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (1999) Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J. Virol.* **73**(6), 4611–21. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=112502&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lindenbach, B. D., Murray, C. L., Thiel, H. & Rice, C. M. (2013) Flaviviridae. In: *Fields Virology* (D. M.

- Knipe & P. M. Howley, eds.), Sixth Edit., 712–746. Lippincott Williams & Wilkins.
- Liu, L., Dong, H., Chen, H., Zhang, J., Ling, H. & Li, Z. (2010) Flavivirus RNA cap methyltransferase: structure, function, and inhibition. *Front. Biol. (Beijing)*. **5**(4), 286–303. doi:10.1007/s11515-010-0660-y.Flavivirus
- Liu, J., Liu, Y., Nie, K., Du, S., Qiu, J., Pang, X., Wang, P., et al. (2016) Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. *Nat. Microbiol.* **1**(9), 1–11. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.87
- Lorch, M. S., Collado, M. S., Argüelles, M. H., Rota, R. P., Spinsanti, L. I., Lozano, M. E. & Goñi, S. E. (2019) Production of recombinant NS1 protein and its possible use in encephalitic flavivirus differential diagnosis. *Protein Expr. Purif.* **153**(March 2018), 18–25. Elsevier. doi:10.1016/j.pep.2018.08.008
- Luca, V. C., Nelson, C. a & Fremont, D. H. (2013) Structure of the St. Louis encephalitis virus postfusion envelope trimer. *J. Virol.* **87**(2), 818–28. doi:10.1128/JVI.01950-12
- Luria, S. E. & Burrous, J. W. (1957) Hybridization between Escherichia coli and Shigella. *J. Bacteriol.* **74**(4), 461–476.
- Ma, L., Jones, C. T., Groesch, T. D., Kuhn, R. J. & Post, C. B. (2004) Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**(10), 3414–3419. doi:10.1073/pnas.0305892101
- Mackenzie, J. M., Jones, M. K. & Young, P. R. (1996) Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication. *Virology* **220**(1), 232–240. doi:10.1006/viro.1996.0307
- Marques, L. É., Silva, B. B., Dutra, R. A. F., Florean, E. O. P., Menassa, R. & Guedes, M. I. F. (2019) Transient expression of dengue virus NS1 antigen in Nicotiana benthamiana for use as a diagnostic antigen. *Front. Plant Sci.* doi:10.3389/fpls.2019.01674
- Martins, L. C., Silva, E. V. P. da, Casseb, L. M. N., Silva, S. P. da, Cruz, A. C. R., Pantoja, J. A. de S., Medeiros, D. B. de A., et al. (2019) First isolation of West Nile virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **114**(July), 1–19. doi:10.1590/0074-02760180332
- May, F. J., Davis, C. T., Tesh, R. B. & Barrett, A. D. T. (2011) Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J. Virol.* **85**(6), 2964–74. doi:10.1128/JVI.01963-10
- Melian, E. B., Hinzman, E., Nagasaki, T., Firth, A. E., Wills, N. M., Nouwens, A. S., Blitvich, B. J., et al. (2010) NS1' of flaviviruses in the Japanese encephalitis virus serogroup is a product of ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness. *J. Virol.* **84**(3), 1641–7. doi:10.1128/JVI.01979-09
- Ministerio de Salud. (2010) Virus de la Encefalitis de St. Louis (SLE) CABA - Buenos Aires - Córdoba **Alerta 2**. Retrieved from http://www.msal.gob.ar/images/stories/alertas_epidemiologia/2010/alerta_2_st_luis_26-3-2010.pdf
- Ministerio de Salud. (2015) Brote de Encefalitis de San Luis en Pergamino **Alerta 2**. Retrieved from <http://www.msal.gob.ar/images/stories/epidemiologia/alertas-2015/24-04-2015-alerta-casos->

- encefalitis-san-luis.pdf
- Ministerio de Salud. (2016) *Boletín integrado de Vigilancia.*, Vol. 309. Retrieved from <http://www.msal.gob.ar/images/stories/boletines/Boletin-Integrado-De-Vigilancia-N309-SE19.pdf>
- Ministerio de Salud. (2020) *Boletín integrado de Vigilancia.*, Vol. 510. Retrieved from https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv_510_se_34.pdf
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. & Harrison, S. C. (2004) Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* **427**(6972), 313–9. doi:10.1038/nature02165
- Monath, T. P. & Vasconcelos, P. F. C. (2015) Yellow fever. *J. Clin. Virol.* **64**, 160–173. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.jcv.2014.08.030
- Morales, M. A., Barrandeguy, M., Fabbri, C., Garcia, J. B., Vissani, A., Trono, K., Gutierrez, G., et al. (2006) West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* **12**(10), 1559–1561. doi:10.3201/eid1210.060852
- Morales, M., Fabbri, C., Roginsky, S., Rinas, M., Resnek, R., Carvalho, A., Ambrosio, E., et al. (2008) Aislamiento e identificación molecular del Virus de la Fiebre Amarilla (FA) en Alouatta Caraya y humanos de Argentina, 2007- 2008. *Rev. Argent. Microbiol* **40**(1), 57M Morale, C Fabbri, S Roginsky, M Rinas, R Resne.
- Muller, D. A. & Young, P. R. (2013) The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* **98**(2), 192–208. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.antiviral.2013.03.008
- Muller, D. A., Depelsenaire, A. C. I. & Young, P. R. (2017) Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J. Infect. Dis.* **215**(suppl_2), S89–S95. doi:10.1093/infdis/jiw649
- Musso, D., Rodriguez-Morales, A. J., Levi, J. E., Cao-Lormeau, V. M. & Gubler, D. J. (2018) Unexpected outbreaks of arbovirus infections: lessons learned from the Pacific and tropical America. *Lancet Infect. Dis.* **18**(11), e355–e361. doi:10.1016/S1473-3099(18)30269-X
- Narvaez, F., Gutierrez, G., Pérez, M. A., Elizondo, D., Nuñez, A., Balmaseda, A. & Harris, E. (2011) Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of dengue disease severity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**(11), 1–8. doi:10.1371/journal.pntd.0001397
- Nascimento, E. J. M., George, J. K., Velasco, M., Bonaparte, M. I., Zheng, L., DiazGranados, C. A., Marques, E. T. A., et al. (2018) Development of an anti-dengue NS1 IgG ELISA to evaluate exposure to dengue virus. *J. Virol. Methods* **257**(February), 48–57. Elsevier. doi:10.1016/j.jviromet.2018.03.007
- Negredo Antón, A. I., Ory Manchón, F. De, Sánchez-Seco Fariña, M. P., Franco Narváez, L., Gegúndez Cámara, M. I., M., N. M. J. & Tenorio Matanzo, A. (2013) Diagnostico microbiológico de arbovirosis y robovirosis emergentes. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **33**(xx), 1–9. doi:10.1016/j.eimc.2013.07.011
- Oceguera, L., Patiris, P. & Chiles, R. (2007) Flavivirus serology by Western blot analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **77**(1), 159–163. Retrieved from <http://www.ajtmh.org/content/77/1/159.short>
- Oliveira, D. de, Carlos Marques, L., Silva, B. da, Málaga, S., Almeida, L. de, Oliveira, T. & Florindo Guedes, M. (2014) Cloning and expression of the NS1 protein of dengue virus in a prokaryotic system. *BMC Proc.* **8**(Suppl 4), P24. BioMed Central Ltd. doi:10.1186/1753-6561-8-S4-P24

- Oliveira, E. R. A., Alencastro, R. B. de & Horta, B. A. C. (2017) New insights into flavivirus biology: the influence of pH over interactions between prM and E proteins. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **31**(11), 1009–1019. Springer International Publishing. doi:10.1007/s10822-017-0076-8
- Organización Panamericana de la Salud. (2019a) Actualización Epidemiológica Dengue 11 de noviembre de 2019. *Ops/Oms* 15. Retrieved from https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-2158&alias=50965-11-de-noviembre-de-2019-dengue-actualizacion-epidemiologica-1&Itemid=270&lang=es
- Organización Panamericana de la Salud. (2019b) Actualización Epidemiológica Dengue. Retrieved from https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=2019-3&alias=47784-22-de-febrero-de-2019-dengue-actualizacion-epidemiologica&Itemid=270&lang=es
- Organización Panamericana de la Salud. (2020) Actualización Epidemiológica Dengue y otras Arbovirosis 1–15. Retrieved from <https://www.paho.org/es/documentos/actualizacion-epidemiologica-dengue-otras-arbovirosis-10-junio-2020>
- Pal, S., Dauner, A. L., Valks, A., Forshey, B. M., Long, K. C., Thaisomboonsuk, B., Sierra, G., et al. (2015) Multicountry prospective clinical evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays and two rapid diagnostic tests for diagnosing dengue fever. *J. Clin. Microbiol.* **53**(4), 1092–1102. doi:10.1128/JCM.03042-14
- Paranavitane, S. A., Gomes, L., Kamaladasa, A., Adikari, T. N., Wickramasinghe, N., Jeewandara, C., Shyamali, N. L. A., et al. (2014) Dengue NS1 antigen as a marker of severe clinical disease. *BMC Infect. Dis.* **14**, 570. doi:10.1186/s12879-014-0570-8
- Paranjape, S. M. & Harris, E. (2009) Control of dengue virus translation and replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* doi:10.1007/978-3-642-02215-9-2
- Pauvolid-Corrêa, A., Morales, M. A., Levis, S., Figueiredo, L. T. M., Couto-Lima, D., Campos, Z., Nogueira, M. F., et al. (2011) Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* doi:10.1590/S0074-02762011000400014
- Peeling, R. W., Murtagh, M. & Oliaro, P. L. (2018) Epidemic preparedness: why is there a need to accelerate the development of diagnostics? *Lancet Infect. Dis.* **3099**(18), 1–7. Elsevier Ltd. doi:10.1016/S1473-3099(18)30594-2
- Peña, J., González, M., Ponce, C., Ariza, K. & Máttar, S. (2005) Virus del Oeste del Nilo: Perspectivas en el mundo vertebrado. *MVZ-Córdova* **10**(2), 593–601.
- Pierson, T. C. & Diamond, M. S. (2013) Flaviviruses. In: *Fields Virology* (D. M. Knipe & P. M. Howley, eds.), Sixth Edit., 747–794. Lippincott Williams & Wilkins.
- Possas, C., Lourenço-de-Oliveira, R., Taulil, P. L., Pinheiro, F. de P., Pissinatti, A., Cunha, R. V. da, Freire, M., et al. (2018) Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **113**(10), e180278. doi:10.1590/0074-02760180278
- Preugschat, F., Yao, C.-W. & Strauss, J. H. (1990) In Vitro Processing of Dengue Virus Type 2

- Nonstructural Proteins NS2A, NS2B, and NS3. *J. Virol.*
- Preugschat, F., Averett, D. R., Clarke, B. E. & Porter, D. J. T. (1996) A steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of the NTPase activity associated with the hepatitis C virus NS3 helicase domain. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.271.40.24449
- Purdy, D., Noga, A. & Chang, G. (2004) Noninfectious recombinant antigen for detection of St. Louis encephalitis virus-specific antibodies in serum by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **42**(10), 4709–4717. doi:10.1128/JCM.42.10.4709
- Qiu, L.-W., Di, B., Wen, K., Wang, X., Liang, W., Wang, Y., Pan, Y., et al. (2009) Development of an antigen capture immunoassay based on monoclonal antibodies specific for dengue virus serotype 2 nonstructural protein 1 for early and rapid identification of dengue virus serotype 2 infections. *Clin. Vaccine Immunol.* **16**(1), 88–95. doi:10.1128/CVI.00212-08
- Reddy, V., Ravi, V., Desai, A., Parida, M., Powers, A. M. & Johnson, B. W. (2012) Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of Chikungunya fever. *J. Med. Virol.* doi:10.1002/jmv.23406
- Reisen, W. K. (2003) Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. *Adv. Virus Res.* doi:10.1016/S0065-3527(03)61004-3
- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C. & Harrison, S. C. (1995) The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* **375**(6529), 291–298. doi:10.1038/375291a0
- Rice, C., Lenches, E., Eddy, Shin, S., Sheets, R. & Strauss, J. (1985) Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* (80-). **229**(4715), 726–733. doi:10.1126/science.4023707
- Ritchie, C. & Carbajal, A. (2012) Protein Purification. *Mater. Methodes* **2**, 134. doi:http://dx.doi.org/10.13070/mm.es.2.134
- Rodriguez-Morales, A. J. (2015) Zika: the new arbovirus threat for Latin America. *J. Infect. Dev. Ctries.* **9**(06), 684. doi:10.3855/jidc.7230
- Röltgen, K., Rose, N., Ruggieri, A., Warryn, L., Scherr, N., Pinho-Nascimento, C. A., Tamborrini, M., et al. (2018) Development of Dengue Virus Serotype–Specific NS1 Capture Assays for the Rapid and Highly Sensitive Identification of the Infecting Serotype in Human Sera. *J. Immunol.* **200**(11), 3857–3866. doi:10.4049/jimmunol.1701790
- Rothman, A. (2011) Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat. Rev. Immunol.* **11**(8), 532–543. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nri3014
- Ryan, J., Dave, K., Emmerch, E., Fernandez, B., Turell, M., Johnson, J., Gottfried, K., et al. (2003) Wicking assays for the rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viral antigens in mosquitoes (Diptera: Culcidae). *J. Med. Entomol.* **40**(1), 95–99. doi:10.1603/0022-2585-40.1.95
- Ryan, S. J., Carlson, C. J., Mordecai, E. A. & Johnson, L. R. (2018) Global expansion and redistribution of Aedes-borne virus transmission risk with climate change. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**(3), 1–20. doi:10.1371/journal.pntd.0007213
- Sabattini, M. S., Aviles, G. & Monath, T. O. (1998) Historical, Epidemiological and Ecological Aspects of Arboviruses in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae. In: *An Overview of*

Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries.

- Sambri, V., Capobianchi, M. R., Cavrini, F., Charrel, R., Donoso-Mantke, O., Escadafal, C., Franco, L., et al. (2013) Diagnosis of west nile virus human infections: overview and proposal of diagnostic protocols considering the results of external quality assessment studies. *Viruses* **5**(10), 2329–48. doi:10.3390/v5102329
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Vols. 1, 2 and 3. Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb. NY, 1989,.
- Sampath, A. & Padmanabhan, R. (2009) Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res.* **81**(1), 6–15. doi:10.1016/j.antiviral.2008.08.004.Molecular
- Sanchez-San Martín, C., Liu, C. & Kielian, M. (2009) Dealing with low pH: entry and exit of alphaviruses and flaviviruses. *Trends Microbiol.* **17**(11), 514–521. doi:10.1016/j.tim.2009.08.002.Dealing
- Seijo, A., Morales, A., Poustis, G. & Enría, D. (2011) Brote de encefalitis de San Luis en el área metropolitana Buenos Aires. *Med. (Buenos Aires)* **71**, 211–217. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0025-76802011000500003&script=sci_arttext&lng=en
- Sharma, M., Glasner, D. R., Watkins, H., Puerta-Guardo, H., Kassa, Y., Egan, M. A., Dean, H., et al. (2019) Magnitude and Functionality of the NS1-Specific Antibody Response Elicited by a Live-Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Candidate. *J. Infect. Dis.* doi:10.1093/infdis/jiz081
- Shenoy, B., Menon, A. & Biradar, S. (2014) Diagnostic utility of dengue NS1 antigen. *Pediatr. Infect. Dis.* **6**(3), 110–113. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.pid.2014.08.002
- Shi, P.-Y. (2014) Structural biology. Unraveling a flavivirus enigma. *Science* **343**(6173), 849–50. doi:10.1126/science.1251249
- Simari, M. B., Goñi, S. E., Luppo, V. C., Fabbri, C. M., Argüelles, M. H., Lozano, M. E., Morales, M. A., et al. (2019) Specific diagnostic method for St. Louis encephalitis virus using a non-structural protein as the antigen. *J. Gen. Virol.* 1–7. doi:10.1099/jgv.0.001359
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., et al. (2017) ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* doi:10.1099/jgv.0.000672
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M. & Panda, A. K. (2015) Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microb. Cell Fact.* **14**(1), 1–10. doi:10.1186/s12934-015-0222-8
- Smit, J. M., Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I. & Wilschut, J. (2011) Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses* **3**(2), 160–71. doi:10.3390/v3020160
- Smith, G. W. & Wright, P. J. (1985) Synthesis of proteins and glycoproteins in Dengue type 2 virus-infected Vero and Aedes albopictus cells. *J. Gen. Virol.* **66**(3), 559–571. doi:10.1099/0022-1317-66-3-559
- Somnuk, P., Hauhart, R. & Atkinson, J. (2011) N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion, cell-surface expression, hexamer stability, and interactions with human complement. *Virology* **413**(2), 253–264. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.virol.2011.02.022.N-linked
- Spinsanti, L. I. & Basquiera, A. L. (2003) St. Louis Encephalitis in Argentina: The First Case Reported in the Last Seventeen Years. *Emerg. Infect. ...* **9**(2), 271–273. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2901953/>
- Spinsanti, L. I., Díaz, L. a, Glatstein, N., Arselán, S., Morales, M. a, Farías, A. a, Fabbri, C., et al. (2008) Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. *J. Clin. Virol.* **42**(1), 27–33. doi:10.1016/j.jcv.2007.11.022
- Spinsanti, L. (2009) Eco-epidemiología del virus encefalitis St. Louis en Córdoba, Argentina. *Rev. la Fac. ...* **66**, 52–59. Retrieved from http://www.revista.fcm.unc.edu.ar/Rev.2009_Supl.1/2009_vol66_supl.virus.htm
- Spinsanti, L. I., Farías, A. A., Aguilar, J. J., Díaz, M. P. del & Contigiani, M. S. (2011) Immunoglobulin G subclasses in antibody responses to St. Louis encephalitis virus infections. *Arch. Virol.* **156**(10), 1861–1864. doi:10.1007/s00705-011-1047-3
- Stadler, K., Allison, S. L., Schlich, J. & Heinz, F. X. (1997) Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J. Virol.* **71**(11), 8475–81. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=192310&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Stapleton, J. T., Fong, S., Muerhoff, a S., Bukh, J. & Simmonds, P. (2011) The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* **92**(Pt 2), 233–46. doi:10.1099/vir.0.027490-0
- Stettler, K., Beltramello, M., Espinosa, D. A., Graham, V., Cassotta, A., Bianchi, S., Vanzetta, F., et al. (2016) Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science* (80-.). **353**(6301), 823–826. doi:10.1126/science.aaf8505
- Stock, N. K., Boschetti, N., Herzog, C., Appelhans, M. S. & Niedrig, M. (2012) The phylogeny of yellow fever virus 17D vaccines. *Vaccine* **30**(6), 989–994. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.vaccine.2011.12.057
- Sukhralia, S., Verma, M., Gopirajan, S., Dhanaraj, P. S., Lal, R., Mehla, N. & Kant, C. R. (2018) From dengue to Zika: the wide spread of mosquito-borne arboviruses. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. doi:10.1007/s10096-018-3375-7
- Sun, E.-C., Ma, J.-N., Liu, N.-H., Yang, T., Zhao, J., Geng, H.-W., Wang, L.-F., et al. (2011) Identification of two linear B-cell epitopes from West Nile virus NS1 by screening a phage-displayed random peptide library. *BMC Microbiol.* **11**(1), 160. BioMed Central Ltd. doi:10.1186/1471-2180-11-160
- Sun, E.-C., Zhao, J., Liu, N.-H., Yang, T., Ma, J.-N., Geng, H.-W., Wang, L.-F., et al. (2012a) Comprehensive mapping of West Nile virus (WNV)- and Japanese encephalitis virus serocomplex-specific linear B-cell epitopes from WNV non-structural protein 1. *J. Gen. Virol.* **93**(Pt 1), 50–60. doi:10.1099/vir.0.034900-0
- Sun, E.-C., Zhao, J., Liu, N., Yang, T., Xu, Q., Qin, Y., Bu, Z., et al. (2012b) Comprehensive mapping of common immunodominant epitopes in the West Nile virus nonstructural protein 1 recognized by avian antibody responses. *PLoS One* **7**(2), e31434. doi:10.1371/journal.pone.0031434
- Tafuku, S., Miyata, T., Tadano, M., Mitsumata, R., Kawakami, H., Harakuni, T., Sewaki, T., et al. (2011) Japanese encephalitis virus structural and nonstructural proteins expressed in

- Escherichia coli induce protective immunity in mice. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* **14**(2), 169–176. Elsevier Masson SAS. doi:10.1016/j.micinf.2011.09.004
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* doi:10.1093/molbev/mst197
- Tan, L. K., Wong, W. Y., Yang, H. T., Huber, R. G., Bond, P. J., Ng, L. C., Maurer-Stroh, S., et al. (2019) Flavivirus Cross-Reactivity to Dengue Nonstructural Protein 1 Antigen Detection Assays. *Diagnostics* **10**(1), 11. doi:10.3390/diagnostics10010011
- Tellechea, A. L., Luppo, V., Morales, M. A., Groisman, B., Baricalla, A., Fabbri, C., Sinchi, A., et al. (2018) Surveillance of microcephaly and selected brain anomalies in Argentina: Relationship with Zika virus and other congenital infections. *Birth Defects Res.* **110**(12), 1016–1026. doi:10.1002/bdr2.1347
- Thakur, K., Jaiswal, R. & Shukla, J. (2010) Over-expression and purification strategies for recombinant multi-protein oligomers: A case study of Mycobacterium tuberculosis ĩf/anti-ĩf factor protein complexes. *Protein Expr. purificationand Purif.* **74**(2), 223–230. doi:10.1016/j.pep.2010.06.018.Over-expression
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/22.22.4673
- Tikasingh, E. S., Spence, L. & Downs, W. G. (1966) The use of adjuvant and sarcoma 180 cells in the production of mouse hyperimmune ascitic fluids to arboviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **15**(2), 219–226. doi:10.4269/ajtmh.1966.15.219
- Tittarelli, E., Mistchenko, A. S. & Barrero, P. R. (2014) Dengue virus 1 in buenos aires from 1999 to 2010: Towards local spread. *PLoS One* **9**(10). doi:10.1371/journal.pone.0111017
- Tripathi, N. K., Shrivastva, A., Pattnaik, P., Parida, M., Dash, P. K., Gupta, N., Jana, A. M., et al. (2007a) Production of IgM specific recombinant dengue multiepitope protein for early diagnosis of dengue infection. *Biotechnol. Prog.* **23**(2), 488–493. doi:10.1021/bp0602698
- Tripathi, N. K., Shrivastva, A., Pattnaik, P., Parida, M., Dash, P. K., Jana, A. M. & Rao, P. V. L. (2007b) Production, purification and characterization of recombinant dengue multiepitope protein. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **46**(2), 105. doi:10.1042/ba20060090
- Tsai, W. Y., Youn, H. H., Tyson, J., Brites, C., Tsai, J. J., Pedroso, C., Drexler, J. F., et al. (2018) Use of urea wash ELISA to distinguish zika and dengue virus infections. *Emerg. Infect. Dis.* **24**(7), 1355–1359. doi:10.3201/eid2407.171170
- Valderrama, A., Díaz, Y. & López-Vergès, S. (2017) Interaction of Flavivirus with their mosquito vectors and their impact on the human health in the Americas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **492**(4), 541–547. doi:10.1016/j.bbrc.2017.05.050
- Venter, M. (2018) Assessing the zoonotic potential of arboviruses of African origin. *Curr. Opin. Virol.* **28**(8), 74–84. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.coviro.2017.11.004
- Villordo, S. M. & Gamarnik, A. V. (2009) Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Res.* doi:10.1016/j.virusres.2008.07.016
- Villordo, S. M., Carballada, J. M., Filomatori, C. V. & Gamarnik, A. V. (2016) RNA Structure

- Duplications and Flavivirus Host Adaptation. *Trends Microbiol.* **24**(4), 270–283. doi:10.1016/j.tim.2016.01.002
- Viranaicken, W., Nativel, B., Krejbich-Trotot, P., Harrabi, W., Bos, S., Kalamouni, C. El, Roche, M., et al. (2017) ClearColi BL21(DE3)-based expression of Zika virus antigens illustrates a rapid method of antibody production against emerging pathogens. *Biochimie* **142**, 179–182. doi:10.1016/j.biochi.2017.09.011
- Viranaicken, W., Ndebo, A., Bos, S., Souque, P., Gadea, G., El-Kalamouni, C., Krejbich-Trotot, P., et al. (2018) Recombinant zika NS1 protein secreted from vero cells is efficient for inducing production of immune serum directed against NS1 dimer. *Int. J. Mol. Sci.* **19**(1). doi:10.3390/ijms19010038
- Volpina, O. M., Volkova, T. D., Korojev, D. O., Ivanov, V. T., Ozherelkov, S. V., Khoretonenko, M. V., Vorovitch, M. F., et al. (2005) A synthetic peptide based on the NS1 non-structural protein of tick-borne encephalitis virus induces a protective immune response against fatal encephalitis in an experimental animal model. *Virus Res.* **112**(1–2), 95–9. doi:10.1016/j.virusres.2005.03.026
- Waggoner, J. J. & Pinsky, B. A. (2016) Zika virus: Diagnostics for an emerging pandemic threat. *J. Clin. Microbiol.* **54**(4), 860–867. doi:10.1128/JCM.00279-16
- Wahala, W. M. P. B. & Silva, A. M. de. (2011) The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses* **3**(12), 2374–2395. doi:10.3390/v3122374
- Wallis, T. P., Huang, C. Y., Nimkar, S. B., Young, P. R. & Gorman, J. J. (2004) Determination of the disulfide bond arrangement of dengue virus NS1 protein. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M312907200
- Wang, D., Zheng, Y., Kang, X., Zhang, X., Hao, H., Chen, W., Liu, L., et al. (2015) A multiplex ELISA-based protein array for screening diagnostic antigens and diagnosis of Flaviviridae infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**(7), 1327–1336. doi:10.1007/s10096-015-2353-6
- Watterson, D., Modhiran, N. & Young, P. R. (2016) The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral Res.* **130**, 7–18. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.antiviral.2016.02.014
- Weaver, S. C. & Barrett, A. D. T. (2004) Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**(10), 789–801. doi:10.1038/nrmicro1006
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., Fuller, S. D., et al. (2009) Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* **5**(4), 365–75. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.chom.2009.03.007
- Wood, W. B. (1966) Host specificity of DNA produced by Escherichia coli: Bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J. Mol. Biol.* doi:10.1016/S0022-2836(66)80267-X
- Woolhouse, M., Scott, F., Hudson, Z., Howey, R. & Chase-Topping, M. (2012) Human viruses: discovery and emergence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **367**(1604), 2864–71. doi:10.1098/rstb.2011.0354
- Yamaguchi, H. & Miyazaki, M. (2014) Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules* **4**(1), 235–251. doi:10.3390/biom4010235

- Yeh, J. Y., Lee, J. H., Seo, H. J., Park, J. Y., Moon, J. S., Cho, I. S., Lee, J. B., et al. (2010) Fast duplex one-step reverse transcriptase PCR for rapid differential detection of West Nile and Japanese encephalitis viruses. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.00582-10
- Yohan, B., Wardhani, P., Aryati, Trimarsanto, H. & Sasmono, R. T. (2017) Production of recombinant dengue non-structural 1 (NS1) proteins from clinical virus isolates. *Protein Expr. Purif.* **129**, 53–59. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.pep.2016.09.007
- Yokoyama, W. M., Christensen, M., Santos, G. Dos, Miller, D., Ho, J., Wu, T., Dziegielewski, M., et al. (2013) Production of Monoclonal Antibodies. *Curr. Protoc. Immunol.* **102**, 1–29. doi:10.1002/0471142735.im0205s102
- Youn, S., Li, T., McCune, B. T., Edeling, M. a, Fremont, D. H., Cristea, I. M. & Diamond, M. S. (2012) Evidence for a genetic and physical interaction between nonstructural proteins NS1 and NS4B that modulates replication of West Nile virus. *J. Virol.* **86**(13), 7360–71. doi:10.1128/JVI.00157-12
- Youn, S., Ambrose, R. L., Mackenzie, J. M. & Diamond, M. S. (2013) Non-structural protein-1 is required for West Nile virus replication complex formation and viral RNA synthesis 1–14.
- Young, P. R., Hilditch, P. A., Bletchly, C. & Halloran, W. (2000) An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J. Clin. Microbiol.* **38**(3), 1053–1057. doi:10.1002/anie.201411533
- Young, P. R., Ng, L. F. P., Hall, R. A., Smith, D. W. & Johansen, C. A. (2014) Arbovirus Infections. In: *Manson's Tropical Infectious Diseases*, Twenty Thi., Vol. 21, 129–161.e3. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-7020-5101-2.00015-7
- Zai, J., Mei, L., Wang, C., Cao, S., Fu, Z. F., Chen, H. & Song, Y. (2013) N-glycosylation of the premembrane protein of Japanese encephalitis virus is critical for folding of the envelope protein and assembly of virus-like particles. *Acta Virol.* doi:10.4149/av
- Zhang, W., Wu, J., Li, Y., Li, F. & Njoo, H. (2009) Rapid and Accurate In Vitro Assays for Detection of West Nile Virus in Blood and Tissues. *Transfus. Med. Rev.* **23**(2), 146–154. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.tmr.2008.12.008
- Zybert, I. A., Ende-Metselaar, H. van der, Wilschut, J. & Smit, J. M. (2008) Functional importance of dengue virus maturation: Infectious properties of immature virions. *J. Gen. Virol.* doi:10.1099/vir.0.2008/002535-0

Sección IX

Agradecimientos

9. Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de Quilmes, fundamentalmente a todas las personas que conforman el Departamento de Ciencia y Tecnología por permitirme realizar mi carrera de grado y doctorado, y haberme brindado los elementos necesarios durante estas etapas de formación.

Agradezco a mi directora Sandra por confiar en mí, por sus enseñanzas, consejos, paciencia y tiempo dedicado a ésta tesis y a mi codirector Mario por haberme dado lugar en el laboratorio y haberme brindado su apoyo, colaboración y confianza.

Agradezco a todos los que formaron parte del laboratorio... todos los días compartidos, muchas horas de nuestra vida, y es gracias a cada uno de ustedes que desde el año 2011 siempre fue un gusto ir a trabajar!

Javi y Cris, que ya formaban parte del laboratorio y fueron importantes acompañándome en esos primeros momentos.

Bet! que me bancó en todos los roles posibles, profesora, codirectora de tesina, compañera de labo, de docencia, tutora, siempre al pie del cañón para lo que necesitara, gracias!

A los que fueron llegando con el tiempo Pri, Ivi, Juan, Dani, Ceci, Ro. Sole, mil momentos compartidos entre frustraciones, alegrías y mates. Juli, compañero de mesada y de congresos, siempre dispuesto a charlar y discutir experimentos o los partidos de futbol del fin de semana. Merce y todas las tardes de charlas acompañadas por cientos de termos de agua y mates lavados.

A los que llegaron los últimos años para darle un nuevo empuje al laboratorio (y un nuevo nombre, gracias Gabi!), Gabi, Mili, Vale, Juan, Leo, Mel. Gracias por haberme brindado su experiencia, sus conocimientos y su compañía.

A Mary por haberme enseñado que a las 12 del mediodía se almuerza sin importar que sea lo que estés haciendo, por todas las cagadas a pedos y los gritos. Gracias Mary!

Agradezco a los laboratorios vecinos por confirmarme que la colaboración y la solidaridad son la base de todo avance.

A los compañeros de AVI, Daniel, Mariano, Marcos, Vani, Ceci, Vicky, Ale que siempre estuvieron disponibles para ayudar con consejos, ideas, reactivos o charlas relajadas que ayudan a volver con más ganas al trabajo. A la gente de Viro, Marce A. y Facu, por sus buena onda y sus aportes a esta tesis y mis publicaciones. Gracias a todos ustedes!

Agradezco enormemente a todos mis amigos y compañeros de la UNQ.

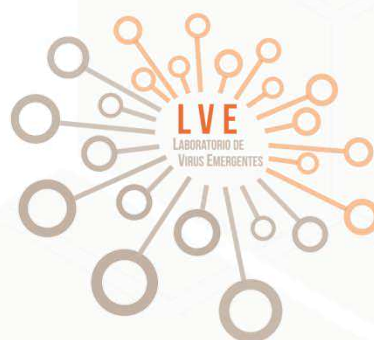
A Rami, Mati, Charly, Luqui, Mari, Romi, Marce M., Mir siempre dispuestos a escucharme y a darme su consejo o ir a tomar algo cuando termina el día de trabajo. Han sido parte importante de estos últimos años. Gracias Pame por tu compañía y ayuda en estos años, los almuerzos y las extensas meriendas que terminaban siendo cenas. A Lau y Silvi por acompañarme en mi inicio en la docencia y darme una mano siempre que lo necesitara. A Nico y Fede por bancarme en todas desde el principio de la carrera. A Seba por hacerme el aguante desde siempre y aguantarme en su auto todo el 2020.

Gracias a todos por la fuerza, el empuje y buena onda transmitidos siempre y en particular en ésta etapa!

Finalmente agradezco a mi familia, por haberme mostrado el camino, acompañarme y brindarme su apoyo en todo momento.



Universidad
Nacional
de Quilmes



- 2020 -