



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



Universidad
Nacional
de Quilmes

Simari, Milagros Belén

Herramientas inmunológicas y diagnósticas basadas en la proteína NS5 de flavivirus



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:

Simari, M. B. (2026). *Herramientas inmunológicas y diagnósticas basadas en la proteína NS5 de flavivirus.* (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/20.500.11807/6195>

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

Herramientas inmunológicas y diagnósticas basadas en la proteína NS5 de flavivirus

TESIS DOCTORAL

Milagros Belén Simari

milisimari18@gmail.com

Resumen

La emergencia y reemergencia de infecciones por flavivirus en las últimas décadas representa una amenaza creciente para la salud pública global. La co-circulación de flavivirus antigénicamente relacionados en la región de las Américas presenta un desafío significativo para el diagnóstico serológico, ya que la reactividad cruzada de los anticuerpos, especialmente contra la proteína de envoltura (E), limita la especificidad de los inmunoensayos convencionales. Para superar esta limitación, la proteína no estructural 5 (NS5) ha emergido como un antígeno prometedor. En este trabajo de tesis, se evaluó el potencial de la NS5 para el desarrollo de herramientas de diagnóstico específicas. Se produjo y purificó un panel de proteínas NS5 recombinantes de diversos flavivirus de importancia regional, las cuales demostraron ser funcionalmente activas y antigénicas. Estas proteínas se utilizaron para desarrollar un ensayo de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG y para generar sueros policlonales específicos, concebidos como herramientas inmunológicas para el estudio de la proteína NS5. Los sueros generados mostraron altos títulos. La validación del ensayo ELISA-NS5-SLEV con un panel de muestras clínicas exhibió una especificidad del 100% y una sensibilidad del 84.2%. Adicionalmente, los ensayos preliminares demostraron el potencial del sistema para discriminar entre infecciones por DENV y SLEV. En conjunto, estos resultados validan a la proteína NS5 como un antígeno valioso para el desarrollo de métodos de diagnóstico serológico más específicos, proporcionando una base sólida para la creación de inmunoensayos mejorados que contribuyan a una vigilancia epidemiológica más precisa.

Herramientas inmunológicas y diagnósticas basadas en la proteína NS5 de flavivirus

Lic. Milagros Belén Simari
Director: Dr. Néstor Gabriel Iglesias
Codirectora: Dra. Sandra Elizabeth Goñi

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

-2025-



Universidad
Nacional
de Quilmes



El trabajo de tesis “Herramientas inmunológicas y diagnósticas basadas en la proteína NS5 de flavivirus” fue desarrollado bajo la dirección del Dr. Néstor Gabriel Iglesias y la codirección de la Dra. Sandra Elizabeth Goñi, en el Laboratorio de Virus Emergentes (LVE), del Instituto de Microbiología Básica y Aplicada (IMBA-CIC-UNQ), Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes. El mismo fue posible gracias a las becas doctorales otorgadas por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (2019) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (2020-presente), el financiamiento de la Secretaría de Investigación (UNQ) y la Fundación Florencio Fiorini, y la colaboración del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui”.



Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de Quilmes y a cada persona con la que tuve la suerte de cruzarme en este camino. Muchos colaboraron de manera directa o indirecta, ya sea compartiendo un reactivo, prestando un equipo, acompañando con una charla en los pasillos o simplemente brindando apoyo. Agradezco especialmente a Marcelo Argüelles y Estefanía del Laboratorio de Inmunología y Virología; a Ezequiel del Centro de Investigación y Desarrollo en Nanomedicinas; al Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Molecular, Área de virus de insectos; al Laboratorio de Micología Molecular; y a Pamela, Diego y todo el Laboratorio de Expresión y Plegado de Proteínas.

A mi director, Gabriel, por su confianza y por guiarme en este proceso; y a mi codirectora, Sandra, por su acompañamiento y por su disponibilidad para aconsejarme u ofrecerme alternativas cuando los resultados no eran los esperados.

Agradezco a todos los que forman o formaron parte del Laboratorio de Virus Emergentes durante estos años. A quienes me recibieron cuando ingresé: Soledad, Matías, Daniela, Juan y Valeria. A quienes siempre estuvieron dispuestos a compartir sus conocimientos y experiencia: Juan Carballeda, Leopoldo, Mario y María José. A Iara y Mercedes, con quienes compartí de cerca la etapa del doctorado, por estar siempre, entendiendo las frustraciones y colaborando en todo momento. Y a quienes se sumaron más recientemente al grupo, trayendo energía e ideas nuevas: Elena, Malena, Ornella, Agustín y Federico.

Conocí grandes personas durante estos años en la UNQui. Le agradezco especialmente a Agustín, por su paciencia durante las cursadas y tantas charlas donde compartimos buenos y malos resultados, ya sea del laboratorio o de Boca.

Quiero agradecer también a alguien que, aunque no lo sepa, fue parte muy importante de esta tesis: agradezco a mi perra Lipa, por ser mi compañera durante el proceso de escritura. A mi abuela le agradezco por haber estado siempre, acompañándome en cada momento importante.

Y, por último, agradezco a mi familia por su apoyo incondicional, por guiarme, por valorar cada logro y por ayudarme a confiar en mí. Es tanto lo que tengo para agradecerles que simplemente lo resumo: gracias por todo.

Parte de los resultados presentados en esta tesis dieron lugar a la publicación del siguiente artículo científico:

Simari, M. B., Goñi, S. E., Luppo, V. C., Fabbri, C. M., Argüelles, M. H., Lozano, M. E., Morales, M.A., & Iglesias, N. G. (2020). Specific diagnostic method for St. Louis encephalitis virus using a non-structural protein as the antigen. *Journal of General Virology*, 101(2), 168-174. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001359>

Glosario de abreviaturas

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (<i>Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity</i>)
ADE	Potenciación dependiente de anticuerpos (<i>Antibody-Dependent Enhancement</i>)
ADN	Ácido desoxiribonucleico
APC	Células presentadoras de antígenos (<i>Antigen-Presenting Cells</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNdc	Ácido ribonucleico de doble cadena
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNsg	Ácido ribonucleico subgenómico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
cGAS	Sintasa de GMP-AMP cíclico (<i>Cyclic GMP-AMP Synthase</i>)
CR	Complejo de replicación
DAR	Región aguas abajo del AUG (<i>Downstream AUG Region</i>)
DE	Desviación estándar
DENV	Virus del dengue (<i>Dengue virus</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNasa	Desoxirribonucleasa
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
ECL	Quimioluminiscencia mejorada (<i>Enhanced Chemiluminescence</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
His₆	Etiqueta de seis histidinas
HRP	Peroxidasa de rábano picante (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN-I	Interferón tipo I
IL	Interleuquina
IMAC	Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>)
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactósido
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma (<i>Internal Ribosome Entry Site</i>)
ISFVs	Flavivirus que infectan insectos (<i>Insect-Specific Flaviviruses</i>)
ISGs	Genes estimulados por interferón (<i>IFN-Stimulating genes</i>)
JEV	Virus de la encefalitis japonesa (<i>Japanese encephalitis virus</i>)
LB	Luria-Bertani

MBFVs	Flavivirus transmitidos por mosquitos (<i>Mosquito-Borne Flaviviruses</i>)
MCS	Sitio de clonado múltiple (<i>Multiple Cloning Site</i>)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MIA	Inmunoensayos de microesferas (<i>Microsphere Immunoassay</i>)
MTasa	Metiltransferasa
nAbs	Anticuerpos neutralizantes (<i>Neutralizing Antibodies</i>)
NC	Nucleocápside
NKV	Vector desconocido (<i>No Known Vector</i>)
NLS	Señal de localización nuclear (<i>Nuclear Localization Signal</i>)
NS	No estructural (<i>Non-Structural</i>)
NTP	Nucleótido trifosfato
NTPasa	Trifosfatasa de nucleótidos (<i>Nucleoside Triphosphatase</i>)
OR	Organelas de replicación
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PBS	Buffer fosfato salino (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PBS-T	Buffer fosfato salino con Tween 20 (<i>Phosphate-Buffered Saline with Tween 20</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Pi	Fosfato inorgánico
PPi	Pirofosfato
PRNT	Ensayo de neutralización por reducción de placa (<i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>)
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones (<i>Pattern Recognition Receptor</i>)
PVDF	Fluoruro de Polivinilideno (<i>Polyvinylidene Fluoride</i>)
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN (<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
RE	Retículo endoplasmático
RLR	Receptores tipo RIG-I (<i>RIG-I-Like Receptors</i>)
RTPasa	ARN trifosfatasa (RNA Triphosphatase)
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>)
SAM	S-Adenosilmetionina
SDS	Dodecil sulfato de sodio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SEC	Cromatografía de exclusión molecular (<i>Size Exclusion Chromatography</i>)
SL	Bucle de tallo (<i>Stem-Loop</i>)
SLEV	Virus de la encefalitis de Saint Louis (<i>Saint Louis encephalitis virus</i>)
SR	Sitio de restricción
SUMO	Pequeña proteína modificadora similar a ubiquitina (<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>)
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBFVs	Flavivirus transmitidos por garrapatas (<i>Tick-Borne Flaviviruses</i>)

TLR	Receptores tipo Toll (<i>Toll-Like Receptor</i>)
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
UAR	Región aguas arriba del AUG (<i>Upstream AUG Region</i>)
UTR	Región no traducida (<i>Untranslated Region</i>)
VC	Volúmenes de columna
WB	Western blot
WNV	Virus del Nilo Occidental (<i>West Nile virus</i>)
WT	Tipo salvaje (<i>Wild Type</i>)
YFV	Virus de la fiebre amarilla (<i>Yellow fever virus</i>)
ZIKV	Virus de Zika (<i>Zika virus</i>)

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Arbovirus	1
1.1.1. Mecanismos de transmisión y persistencia viral	1
1.1.2. Complejidad de las interacciones biológicas	2
1.1.3. Impacto en la salud pública	3
1.2. Flavivirus	3
1.2.1. Familia <i>Flaviviridae</i>	3
1.2.2. Clasificación y diversidad	4
1.2.3. Principales flavivirus transmitidos por mosquitos	5
1.3. Ciclo de replicación de los flavivirus	7
1.3.1. Estructura del virión, unión y entrada a la célula	7
1.3.2. Traducción y procesamiento de la poliproteína	8
1.3.3. Formación de organelas de replicación y circularización del genoma	9
1.3.4. Síntesis del ARN viral	11
1.3.5. Ensamblaje, maduración y liberación de la progenie viral	12
1.4. Proteínas no estructurales de los flavivirus	12
1.4.1. Complejo de replicación	13
1.4.2. Proteínas moduladoras de membrana y andamiaje	13
1.4.3. Actividad proteasa-helicasa	14
1.5. Proteína no estructural 5	15
1.5.1. Dominio metiltransferasa	16
1.5.2. Dominio polimerasa	16
1.5.3. Flexibilidad de la región interdominio y diversidad conformacional	18
1.5.4. Transiciones del dominio RdRp	19
1.5.5. Localización	20
1.6. Inmunidad innata	21
1.6.1. Primeros mecanismos de defensa frente a la infección por flavivirus	21
1.6.2. Evasión viral de la respuesta inmune innata	22
1.7. Inmunidad adaptativa	24
1.7.1. Respuesta humoral frente a la infección por flavivirus	24
1.7.2. Anticuerpos neutralizantes	25
1.7.3. Reactividad cruzada y potenciación dependiente de anticuerpos	26
1.7.4. Anticuerpos contra proteínas NS	27
1.7.5. Respuesta celular frente a la infección por flavivirus	28
1.7.6. Evasión viral de la respuesta inmune adaptativa	29
1.8. Epidemiología y diagnóstico de flavivirus	29

1.8.1.	Flavivirus emergentes y reemergentes de interés regional	29
1.8.2.	Métodos de diagnóstico y limitaciones.....	31
1.8.3.	El desafío de la reactividad cruzada en el serodiagnóstico de flavivirus.....	34
1.8.4.	Nuevos métodos de diagnóstico serológico con proteínas NS como antígeno	35
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
2.1.	Hipótesis	37
2.2.	Objetivos	37
2.2.1.	Objetivo general	37
2.2.2.	Objetivos específicos.....	37
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1.	Materiales biológicos	38
3.1.1.	Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	38
3.1.2.	Cepas virales y moldes para la amplificación de NS5	38
3.1.3.	Vectores de expresión	39
3.2.	Métodos de biología molecular	39
3.2.1.	Purificación de ADN plasmídico	39
3.2.2.	Amplificación de las secuencias codificantes de NS5	39
3.2.3.	Electroforesis en gel de agarosa.....	41
3.2.4.	Purificación de los productos de amplificación	41
3.2.5.	Digestión con enzimas de restricción y ligación de ADN.....	41
3.2.6.	Transformación de <i>E. coli</i> y selección de clones recombinantes	42
3.2.7.	Verificación de las construcciones plasmídicas	42
3.3.	Métodos de proteínas recombinantes	43
3.3.1.	Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	43
3.3.2.	Lisis celular.....	44
3.3.3.	Purificación de proteínas	44
3.3.4.	Análisis de proteínas	45
3.3.5.	Ensayo de actividad enzimática (RdRp)	45
3.4.	Métodos inmunológicos	46
3.4.1.	Producción de sueros policlonales.....	46
3.4.2.	Western blot (WB)	46
3.4.3.	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).....	48
3.4.4.	Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	49
3.5.	Desarrollo de un ELISA indirecto para la detección de IgG	49
3.5.1.	Paneles de sueros humanos y consideraciones éticas	49
3.5.2.	Optimización del protocolo de ELISA.....	50
3.5.3.	Análisis de precisión (repetibilidad y reproducibilidad)	50
3.6.	Análisis estadístico y de datos	50
3.6.1.	Software y pruebas de significancia.....	50

3.6.2.	Determinación de los parámetros de rendimiento del ELISA	50
4.	RESULTADOS	52
4.1.	Producción y caracterización de proteínas NS5 recombinantes	52
4.1.1.	Construcción de los plásmidos de expresión para las proteínas NS5 de flavivirus.....	52
4.1.2.	Expresión de las proteínas NS5 recombinantes en <i>E. coli</i>	53
4.1.3.	Purificación de las proteínas NS5 recombinantes	53
4.1.4.	Caracterización inmunológica, funcional y estructural de las proteínas NS5 purificadas	57
4.2.	Desarrollo y validación de sueros policlonales para la detección de la proteína NS5 de flavivirus	60
4.2.1.	Inmunización de conejos con la proteína NS5 recombinante purificada	60
4.2.2.	Titulación y evaluación de la respuesta inmune mediante ELISA	60
4.2.3.	Caracterización de la especificidad y sensibilidad de los sueros policlonales ..	61
4.2.4.	Aplicación de los sueros para la detección de NS5 en sistemas celulares.....	63
4.3.	Diseño y optimización de un ELISA indirecto para la detección de IgG	65
4.3.1.	Optimización de la concentración de antígeno para la sensibilización.....	65
4.3.2.	Optimización de las diluciones de anticuerpos	66
4.3.3.	Establecimiento de las condiciones óptimas del ensayo	68
4.4.	Validación analítica y diagnóstica del ELISA-NS5-SLEV	68
4.4.1.	Determinación del punto de corte	68
4.4.2.	Validación de la precisión del ensayo	69
4.4.3.	Evaluación de la especificidad analítica y reactividad cruzada	69
4.4.4.	Clasificación de muestras individuales y rendimiento diagnóstico	70
4.5.	Aplicaciones preliminares y estudios comparativos	71
4.5.1.	Validación preliminar del ELISA-NS5-DENV-1.....	71
4.5.2.	Evaluación de la reactividad cruzada entre SLEV y WNV.....	72
5.	DISCUSIÓN	74
5.1.	La proteína NS5 recombinante como un antígeno robusto para el desarrollo de inmunoensayos	74
5.2.	Generación de un panel de sueros policlonales específicos como herramientas de investigación	75
5.3.	Desarrollo y validación de un ELISA específico para el diagnóstico de SLEV..	76
5.4.	Potencial y desafíos para el diagnóstico de DENV y WNV	78
6.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	80
6.1.	Conclusiones.....	80
6.2.	Perspectivas	80
7.	BIBLIOGRAFÍA	82
8.	ANEXOS	94
Anexo I.	Prueba de suero policlonal anti-NS5-DENV-4.....	94

ANEXO II. Panel de sueros humanos	95
ANEXO III. Composición de soluciones y buffers.....	99

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Arbovirus

Los arbovirus representan un grupo diverso de virus definidos por su forma de transmisión, ya que dependen de artrópodos hematófagos para propagarse entre sus hospedadores. Este término, derivado de la expresión en inglés *arthropod-borne virus*, surge como un agrupamiento de naturaleza ecológica y no implica una relación taxonómica, ya que se trata de un concepto que reúne virus de familias distintas. Sin embargo, algunos virus se incluyen en este grupo principalmente debido a su estrecha relación genética con arbovirus conocidos, incluso si no se ha establecido aún una asociación clara con un vector artrópodo (Young et al., 2014).

En las últimas décadas, se han convertido en un creciente problema de salud mundial, con el resurgimiento de enfermedades conocidas y la emergencia inesperada de otras, provocando grandes brotes y nuevos patrones clínicos que afectan a millones de personas en todo el planeta (Musso et al., 2022).

1.1.1. Mecanismos de transmisión y persistencia viral

Los arbovirus se distinguen por su capacidad de replicarse tanto en hospedadores invertebrados como vertebrados. Los vectores invertebrados incluyen principalmente mosquitos, flebotomos, garrapatas y culicoides, mientras que los hospedadores vertebrados son, en su mayoría, mamíferos y aves.

La transmisión biológica, característica de este grupo, implica la multiplicación del virus dentro del artrópodo. Este proceso, conocido como período de incubación extrínseco, puede durar varios días, desde que el vector ingiere sangre infectada hasta que el virus alcanza sus glándulas salivales y se vuelve transmisible. Posteriormente, al alimentarse, el artrópodo infecta a un hospedador vertebrado, el cual desarrolla viremia tras un período de incubación intrínseco de dos días a más de una semana. Este mecanismo difiere de la transmisión mecánica, en la cual el virus simplemente contamina las partes bucales del vector y se transfiere de forma inmediata (Shope & Meegan, 1997).

Si bien algunas interacciones son específicas y la transmisión biológica incluye un vector y una especie hospedadora, la mayoría de los arbovirus son generalistas y utilizan múltiples especies de vectores y hospedadores, manteniéndose a través de una compleja red de transmisión (Diaz et al., 2013).

El mantenimiento eficaz de los arbovirus en la naturaleza requiere tres elementos: un vector competente, un hospedador vertebrado susceptible y condiciones ambientales apropiadas. La principal forma de mantenimiento es la transmisión horizontal entre vectores y

hospedadores. Sin embargo, en ciertos casos, también pueden transmitirse verticalmente dentro de la población de vectores (Lequime & Lambrechts, 2014). A través de este mecanismo, también conocido como transmisión transovárica, una hembra infectada transmite el virus a su descendencia. Aunque la transmisión vertical por sí sola es generalmente insuficiente para mantener el virus a largo plazo, este proceso es fundamental para la persistencia viral durante condiciones adversas para la transmisión horizontal, como las estaciones secas en zonas tropicales, estaciones frías en regiones templadas o campañas de fumigación (Lequime et al., 2016).

1.1.2. Complejidad de las interacciones biológicas

La mayoría de las enfermedades causadas por arbovirus son zoonosis, lo que implica que afectan primariamente a otros vertebrados, causando infecciones incidentales en humanos. Este salto de especie, mediante el cual un patógeno se transmite de su reservorio natural en especies silvestres a un hospedador secundario, se denomina *spillover* (Weaver, 2005). De forma simplificada, podría decirse que los arbovirus operan a través de tres ciclos de transmisión interconectados (Figura 1.1):

- El ciclo enzoótico (o silvestre) implica a animales silvestres como hospedadores reservorios, que, aunque se infectan y desarrollan viremias altas, rara vez son susceptibles a la enfermedad. Estas viremias permiten que se produzca la amplificación del virus mediante vectores primarios.
- El ciclo epizoótico (o rural) ocurre cuando el virus se transmite a animales domésticos, que actúan como amplificadores, pudiendo generar brotes epidémicos en estas poblaciones y, en algunos casos, extenderse a los humanos.
- El ciclo epidémico (o urbano) se establece cuando el virus circula directamente entre humanos y vectores antropofílicos que facilitan la transmisión (Go et al., 2014).

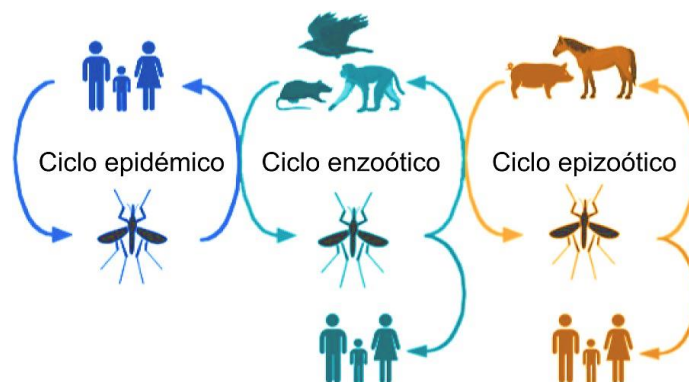


Figura 1.1. Ciclos de transmisión de los arbovirus. Se representan los ciclos enzoótico, epizoótico y epidémico, y los eventos de *spillover* que resultan en la infección humana (Adaptado de Weaver, 2005).

En los tres ciclos de transmisión puede haber eventos de saltos de especies. Para algunos arbovirus, los saltos del ciclo enzoótico al epidémico o epizootico no son importantes para su supervivencia, ya que los humanos y algunos animales son hospedadores terminales que no actúan como reservorio para futuras rondas de transmisión. En otros casos, el ciclo epidémico en humanos puede mantenerse por sí mismo debido a altos niveles de viremia que permiten una transmisión eficiente entre el vector y los humanos sin necesidad de un hospedador de amplificación enzoótico (Young, 2018).

Esta perspectiva de que los arbovirus se mantienen en ciclos estables contrasta con la dinámica de la transmisión y el mantenimiento de los arbovirus en los ecosistemas. Los ciclos individuales son, en realidad, parte de una compleja red de transmisión. La fuerza de estos ciclos de flujo viral está afectada por factores ambientales y climáticos que varían, forzando al virus a una adaptabilidad constante para su mantenimiento (Diaz et al., 2013).

1.1.3. Impacto en la salud pública

Entre los más de 500 arbovirus registrados en el Catálogo Internacional de virus transmitidos por artrópodos, más de 100 están implicados en enfermedades humanas, impactando considerablemente en la salud pública a nivel global (Musso et al., 2022). Estos virus infectan a las poblaciones en patrones que van desde casos esporádicos hasta grandes epidemias, y sus manifestaciones clínicas son muy variadas, abarcando desde cuadros asintomáticos hasta enfermedades graves que pueden incluir fiebre sistémica, encefalitis y fiebre hemorrágica. Aunque muchos arbovirus son poco conocidos y causan brotes de manera infrecuente, otros han provocado históricamente enfermedades de alto impacto con tasas de mortalidad significativas (Artsob et al., 2017).

Los arbovirus agrupan a varias familias diversas. Sin embargo, la mayoría de los arbovirus que causan enfermedades humanas pertenecen a tres familias principales: *Togaviridae* (género *Alphavirus*), *Bunyaviridae* (géneros *Bunyavirus*, *Orthobunyavirus*, *Nairovirus* y *Phlebovirus*) y *Flaviviridae* (género *Flavivirus*). En particular, las infecciones causadas por flavivirus, son lo suficientemente prevalentes como para ser motivo de preocupación mundial, posicionando a este género como el más importante desde el punto de vista médico (Young et al., 2014).

1.2. Flavivirus

1.2.1. Familia *Flaviviridae*

Los miembros de la familia *Flaviviridae* han sido considerados entre los patógenos humanos más importantes desde el descubrimiento del agente causal de la fiebre amarilla. En 1881 ya existían sospechas de la relación entre los mosquitos y esta enfermedad. Sin embargo,

el agente causal no fue descubierto hasta 1900. A través de una serie de experimentos, se demostró que la fiebre amarilla podía ser transmitida a través del suero filtrado de un individuo infectado y que este agente infeccioso era transmitido a humanos por mosquitos (Schweitzer et al., 2009). Desde entonces, el virus de la fiebre amarilla se ha mantenido como miembro representativo de la familia. De hecho, el nombre *Flaviviridae* deriva del latín *flavus*, que significa amarillo, en alusión a la ictericia característica de la enfermedad. No obstante, es el único miembro de la familia que causa esta condición (Best, 2016).

Esta familia de pequeños virus envueltos incluye cuatro géneros: *Pestivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* y *Flavivirus* —más recientemente denominado *Orthoflavivirus* para evitar ambigüedades con virus de la familia *Flaviviridae* (Postler et al., 2023), aunque en esta tesis *flavivirus* referirá siempre al género—. Su genoma de ARN no segmentado de polaridad positiva contiene un único y largo marco abierto de lectura (ORF). En el género *Flavivirus*, el inicio de la traducción del ARN genómico depende de una estructura de caperuza en el extremo 5' (*cap-5'*), mientras que los géneros restantes utilizan un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Estructuralmente, los viriones suelen tener forma esférica, con una envoltura lipídica, una proteína de cápside y dos (*Flavivirus*, *Hepacivirus* y *Pegivirus*) o tres proteínas de envoltura (*Pestivirus*) (Simmonds et al., 2017).

A pesar de las similitudes en la morfología de los viriones, la organización del genoma y las estrategias de replicación, los miembros de esta familia exhiben diversas propiedades biológicas, especialmente en su modo de transmisión. Una característica distintiva y fundamental es que la gran mayoría de las especies del género *Flavivirus* son patógenos humanos transmitidos por artrópodos (Lindenbach et al., 2013).

1.2.2. Clasificación y diversidad

Los miembros del género *Flavivirus* pueden clasificarse según el artrópodo que los transmite en cuatro grupos: los transmitidos por garrapatas (TBFVs por *tick-borne flaviviruses*), los transmitidos por mosquitos (MBFVs por *mosquito-borne flaviviruses*), aquellos con vector desconocido (NKV por *no known vector*) y los que infectan exclusivamente a insectos (ISFVs por *insect-specific flaviviruses*). Esta notable diversidad está asociada con una amplia variabilidad genética, mecanismos complejos de patogénesis y asociaciones entre virus, vectores y hospedadores (Moureau et al., 2015).

Los análisis filogenéticos, basados tanto en genomas completos como en secuencias de proteínas individuales, reflejan esta clasificación. Estos árboles evolutivos muestran patrones de ramificación que ilustran cómo la adaptación a hospedadores vertebrados e invertebrados específicos ha moldeado la dispersión, epidemiología y posiblemente incluso la patogénesis de los flavivirus (Gould et al., 2003). Los MBFVs, por ejemplo, se agrupan en clados definidos por su asociación con mosquitos del género *Aedes* o *Culex*. Esta

asociación con el vector se correlaciona a su vez con el tropismo y el tipo de hospedador: los virus neurotrópicos suelen ser transmitidos por *Culex* e infectan aves, mientras que los virus asociados a enfermedades hemorrágicas en humanos son transmitidos por *Aedes* e infectan primates (Pierson & Diamond, 2013).

1.2.3. Principales flavivirus transmitidos por mosquitos

Según la filogenia de los MBFVs, se distinguen dos ramas principales (Figura 1.2). Una de ellas incluye al virus de la fiebre amarilla (YFV) y virus relacionados. La segunda rama es más extensa y contiene a los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1-4), transmitidos por *Aedes*, y a un gran grupo de virus transmitidos por *Culex*, que incluye al virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus de la encefalitis de Saint Louis (SLEV) y el virus del Nilo Occidental (WNV). Curiosamente, dentro de esta segunda rama también se encuentra un grupo de virus transmitidos por *Aedes*, como el virus de Zika (ZIKV), que están estrechamente relacionados con los flavivirus asociados a *Culex* (Nelson & Ploss, 2024).

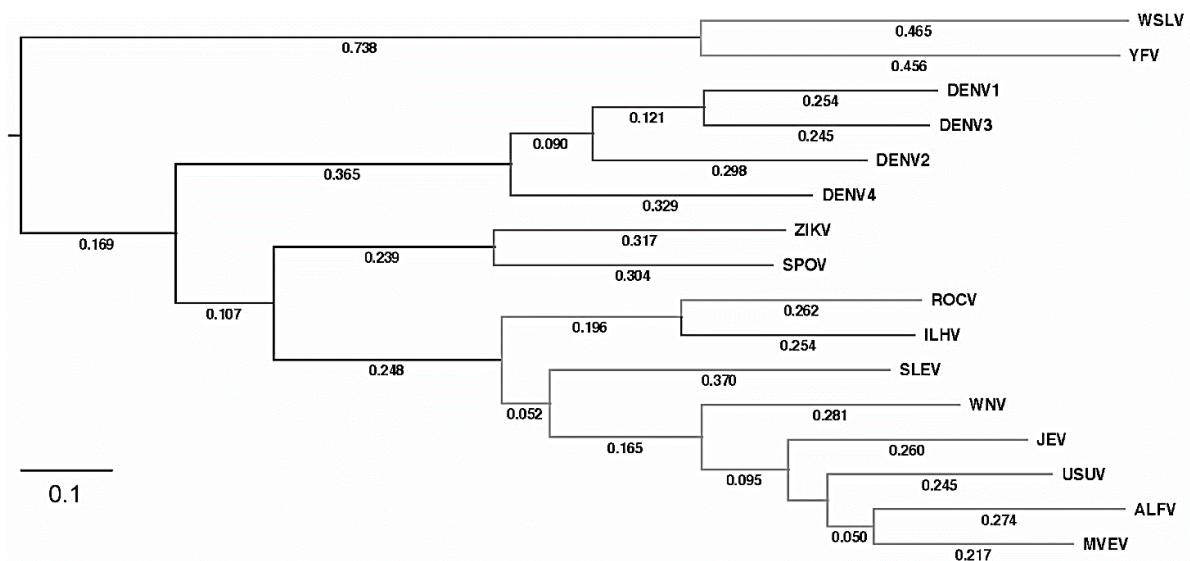


Figura 1.2. Árbol filogenético de MBFVs. El análisis revela dos ramas principales dentro de los MBFVs: una asociada al grupo de YFV y otra que incluye a DENV-1-4, JEV, SLEV, WNV, ZIKV y otros virus transmitidos por mosquitos estrechamente relacionados con este grupo. El árbol filogenético se construyó a partir de secuencias genómicas completas, alineadas con MAFFT y analizadas mediante máxima verosimilitud (RAxML) con 100 réplicas de *bootstrap* (Nelson & Ploss, 2024).

La presentación clínica de las infecciones por dichos flavivirus es variable, con infecciones asintomáticas o síndrome febril agudo e inespecífico. Los síntomas comunes son fiebre, sarpullido, dolor de cabeza y malestar general, y generalmente se resuelven de forma autolimitada en aproximadamente una semana. Sin embargo, en una minoría de los casos

sintomáticos, la infección puede progresar a una enfermedad grave con patologías potencialmente letales o con secuelas permanentes (Boldescu et al., 2017).

YFV, transmitido por mosquitos *Aedes*, se mantiene principalmente en un ciclo de transmisión selvático, donde los primates no humanos actúan como reservorios del virus. Los brotes urbanos ocurren cuando personas infectadas introducen el virus en áreas densamente pobladas donde hay mosquitos capaces de transmitirlo y baja cobertura de vacunación. La enfermedad puede presentarse de diferentes formas en los humanos, desde infecciones sin síntomas o fiebre leve hasta casos graves de hemorragia aguda que puede llevar a la muerte (Shearer et al., 2017).

DENV, con sus cuatro serotipos, es el arbovirus de mayor incidencia global. Transmitido principalmente por *Aedes aegypti*, causa un espectro de enfermedades que van desde fiebres autolimitadas hasta el dengue grave, un síndrome potencialmente mortal. Anualmente se reportan casos distribuidos en más de 100 países, asociados a la presencia global del principal vector (Pierson & Diamond, 2020). La incidencia exacta de este virus es difícil de determinar. Sin embargo, se estima que el número de infecciones anuales varía entre 284 y 528 millones en todo el mundo, con aproximadamente 100 millones de infecciones sintomáticas y 10 000 muertes al año (Bohm et al., 2024).

Los virus neurotrópicos como JEV, WNV y SLEV circulan principalmente entre aves y mosquitos *Culex*. Las infecciones en humanos a menudo son asintomáticas pero pueden provocar enfermedades neurológicas graves como meningitis y encefalitis. Aunque se encuentran en partes geográficamente diferentes (JEV en la región Asia-Pacífico, SLEV en América y WNV en África y Medio Oriente), tienden a extenderse y pueden causar brotes inesperados. Por ejemplo, WNV en las últimas décadas ha causado brotes en el sur de Europa y llegó a América, donde rápidamente se extendió por todo el continente (Turtle et al., 2012).

ZIKV se destaca como excepción entre los virus asociados a *Aedes* por ser neurotrópico. Además, es el único flavivirus capaz de transmitirse por vía sexual entre humanos. Por décadas su circulación estuvo restringida a países de África ecuatorial y Asia, infectando a primates no humanos y, en raras ocasiones, a humanos, causando enfermedades febriles leves y erupciones cutáneas. Fue durante la mayor epidemia de ZIKV, ocurrida en Brasil entre 2015 y 2016, que se estableció relación entre las infecciones causadas por este virus y un aumento del síndrome de Guillain-Barré en adultos y bebés nacidos con microcefalia u otros defectos neurológicos. Recientemente, ZIKV fue detectado en Europa e India (Nelson & Ploss, 2024).

1.3. Ciclo de replicación de los flavivirus

El ciclo de replicación de los flavivirus es un proceso coordinado que se puede dividir a grandes rasgos en etapas de unión, entrada, traducción y replicación, ensamblaje y liberación (**Figura 1.3**).

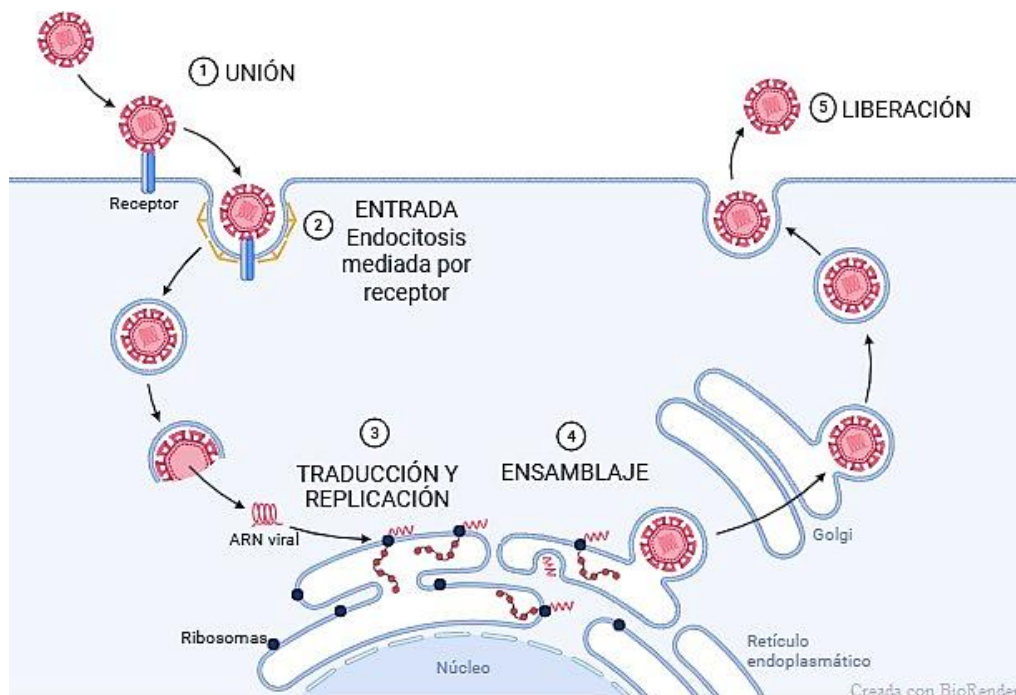


Figura 1.3. Etapas del ciclo de replicación de los flavivirus. (1) El virión se une a receptores de la superficie celular. (2) La partícula viral es internalizada por endocitosis mediada por receptor, fusiona su membrana en el endosoma y libera el genoma al citoplasma. (3) El ARN viral se traduce como una poliproteína en el retículo endoplasmático (RE), que es procesada en proteínas estructurales y no estructurales. Estas últimas forman el complejo de replicación y generan organelas de replicación. (4) En el RE ocurre el ensamblaje y gemación de partículas inmaduras, que luego maduran a través de la red trans-Golgi. (5) Los viriones maduros e infecciosos son liberados al exterior celular.

1.3.1. Estructura del virión, unión y entrada a la célula

El virión de los flavivirus es pequeño, de entre 40 y 60 nm, con una envoltura icosaédrica y una nucleocápside (NC) esférica de 30 nm. Está conformado por tres proteínas estructurales: la proteína de la cápside (C, ~11 kDa), la proteína de la membrana (M, ~8 kDa) y la proteína de la envoltura (E, ~50 kDa). La NC, formada por múltiples copias de la proteína C que encapsulan el genoma, está rodeada por una bicapa lipídica derivada de la célula hospedadora en la que se anclan las proteínas M y E. La proteína M corresponde a un pequeño fragmento proteolítico derivado de su forma precursora prM. La proteína E, componente predominante de la envoltura viral, es clave en el reconocimiento de los receptores de la célula hospedadora (Contigiani et al., 2017).

La infección se inicia cuando la proteína E se une a receptores en la superficie celular, desencadenando la internalización del virión por endocitosis. Aunque los receptores específicos varían entre los flavivirus, a menudo involucran factores de adhesión de baja afinidad como los glicosaminoglicanos (ej. heparán sulfato) y lectinas tipo C (ej. DC-SIGN). La heterogeneidad estructural de las partículas virales, debido a una maduración incompleta y al comportamiento dinámico de las glicoproteínas de la envoltura, contribuye al amplio tropismo tisular y rango de hospedadores de los flavivirus (Rey et al., 2018).

Tras la internalización, la acidificación de la vesícula endosomal provoca cambios en la estructura del virión, dejando expuesto el bucle de fusión altamente hidrofóbico de la proteína E. Como resultado, las membranas viral y endosomal se fusionan y se desensamblan las partículas virales. Luego de la fusión, la NC se libera en el citoplasma y la proteína de la cápside se disocia del genoma, dando lugar a que este pueda ser traducido por la maquinaria de la célula hospedadora (van Leur et al., 2021; Fishburn et al., 2022).

1.3.2. Traducción y procesamiento de la poliproteína

El genoma de los flavivirus consiste en una molécula de ARN monocatenario de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb. En el extremo 5' posee un *cap* de tipo I (m^7GpppN^m) mientras que el extremo 3', a diferencia de los ARNm celulares, no está poliadenilado. Posee un único ORF flanqueado por regiones no traducidas (UTRs), de aproximadamente 100 nt en el extremo 5' y entre 400 y 700 nt en el 3' (**Figura 1.4A**).

Tras la entrada a la célula, el genoma es directamente traducido como una poliproteína de aproximadamente 3 400 AA. Esta poliproteína da origen, por clivajes co- y post-traduccionales, a las proteínas estructurales (C, prM y E) y a siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Lindenbach & Rice, 2003). Durante la traducción, las proteínas son translocadas y ancladas en el retículo endoplásmico (RE) por diversas secuencias de señal y dominios de anclaje a la membrana (**Figura 1.4B**): prM, E y NS1 se encuentran principalmente en el lumen del RE, mientras que C, NS3, y NS5 se ubican en el citoplasma. NS2A, NS2B, NS4A y NS4B poseen varios dominios transmembrana, por lo tanto, diversas partes de estas proteínas se encuentran a cada lado y en la membrana del RE. La proteasa viral NS3 y su cofactor NS2B realizan los clivajes en el lado citoplasmático y las escisiones en el lado de la luz del RE las realiza el complejo de la peptidasa señal. La poliproteína también tiene un sitio de clivaje en prM, que dará lugar a la proteína M madura por acción de la proteasa furina, y un sitio adicional entre NS1 y NS2A que es escindido por una enzima desconocida. Una vez finalizada la traducción, las proteínas no estructurales recién sintetizadas cooptan el genoma viral y cambian su función principal de la traducción a la replicación (Barrows et al., 2018).

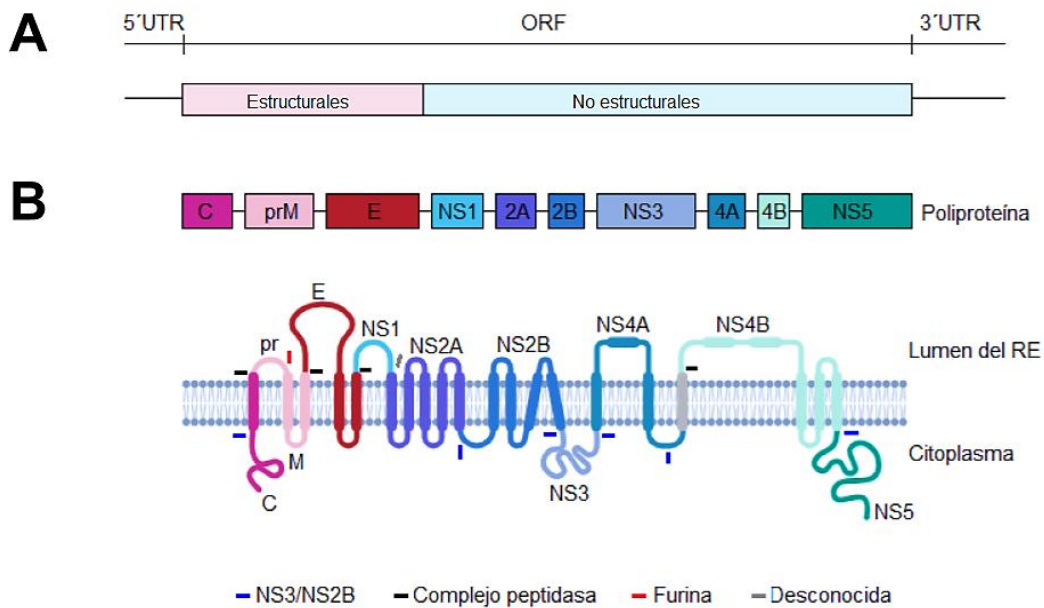


Figura 1.4. Organización del genoma de los flavivirus y procesamiento de la poliproteína. (A) El genoma de ARN de cadena positiva de los flavivirus (~11 kb), flanqueado por las regiones 5' y 3'UTR, codifica un único ORF. (B) La poliproteína se traduce en el RE. El clivaje proteolítico, mediado por proteasas virales y del hospedador, genera 10 proteínas funcionales: 3 estructurales (C, prM y E) y 7 no estructurales (NS1–NS5). Entre NS4A y NS4B, se encuentra un pequeño péptido de 2 kDa (2k). Se indican los diferentes sitios de corte (Adaptado de Barrows et al., 2018).

1.3.3. Formación de organelas de replicación y circularización del genoma

La síntesis del ARN viral se inicia cuando las proteínas no estructurales se ensamblan en un complejo de replicación (CR), conduciendo a la invaginación de la membrana del RE para formar organelas de replicación (OR). Las OR permiten generar copias del genoma viral, mediante un ARN complementario de cadena negativa que actúa como intermediario, y facilitan su posterior empaquetamiento. Esta compartimentalización asegura la coordinación sincrónica de cada paso del proceso, aumentando la eficiencia y la velocidad. Además, brinda protección frente a nucleasas, proteasas y otros factores celulares, como sensores citoplasmáticos que desencadenarían una respuesta inmune contra el ARN viral y sus intermediarios (van den Elsen et al., 2021).

Además de codificar la poliproteína, el genoma de ARN de los flavivirus contiene información estructural esencial para la replicación, localizada principalmente en las regiones no traducidas (**Figura 1.5**). Aunque sus secuencias primarias varían, las estructuras secundarias que forman están altamente conservadas.

El 5'UTR comprende dos dominios conservados: el *stem-loop A* (SLA), que funciona como promotor de la replicación viral, y el *stem-loop B* (SLB), que se extiende hasta la región codificante y contiene secuencias esenciales para las interacciones ARN-ARN de largo alcance. Ambos dominios están separados por una secuencia oligo(U), que funciona como espaciador (Ramos-Lorente et al., 2021). El 3'UTR es más complejo y se divide en tres

dominios: los dominios I y II contienen elementos considerados prescindibles para la replicación pero que sirven como potenciadoras de los procesos virales, mientras que el dominio III está altamente conservado entre los flavivirus y es funcionalmente importante. Este dominio, formado por el elemento CS1 y una estructura terminal de *stem-loop* (3'SL), interactúa con proteínas virales y del hospedador para modular la síntesis y traducción del ARN viral (Gebhard et al., 2011; Ng et al., 2017).

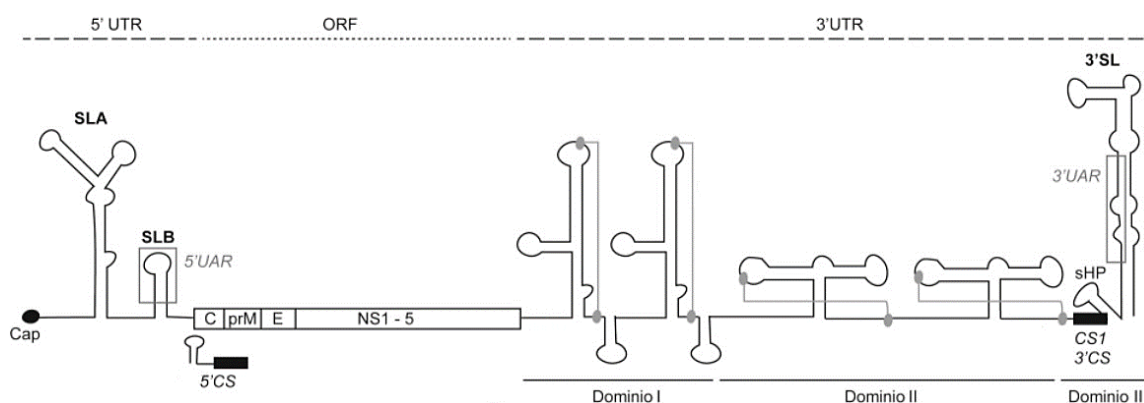


Figura 1.5. Representación esquemática del ARN de los flavivirus. Se muestra la estructura general del genoma viral, utilizando a DENV como modelo representativo. El ORF se encuentra flanqueado por una región no traducida en el extremo 5' (5'UTR) y otra en el extremo 3' (3'UTR). Se señalan los principales elementos estructurales de ARN conservados, que son cruciales para la replicación y la circularización del genoma. En el 5'UTR se localizan el *stem-loop* A (SLA) y el *stem-loop* B (SLB), así como las secuencias conservadas 5'UAR y 5'CS. El 3'UTR se organiza en tres dominios, siendo el Dominio III el más conservado y conteniendo elementos como el *stem-loop* 3' (3'SL), la secuencia conservada CS1 y las secuencias de circularización 3'UAR y 3'CS (Adaptado de Ng et al., 2017).

Las secuencias presentes en los extremos del genoma viral propician interacciones ARN-ARN de largo alcance que conducen a la circularización del genoma, esencial para que ocurra la replicación. En los MVFVs existen al menos tres pares de secuencias complementarias que participan en este proceso (5'-3' CS, 5'-3' UAR y 5'-3' DAR). Según el modelo de circularización propuesto, el proceso se inicia mediante la interacción entre los motivos 5' y 3'CS. El dúplex se extiende aún más a través de los contactos DAR y las interacciones adicionales mediadas por UAR promueven reacomodamientos conformacionales adicionales en el extremo 3' del genoma viral. Además de estas interacciones ARN-ARN, se cree que la circularización del genoma podría estabilizarse por factores proteicos virales y del hospedador, reclutados por diferentes dominios estructurales del ARN genómico (Fernández-Sanlés et al., 2017). Un equilibrio preciso entre las formas lineal y circular es esencial para la propagación de los flavivirus. Además, según estudios recientes, el proceso de circularización podría por sí mismo promover la inhibición de la traducción y el cambio entre la traducción y la replicación (Abram et al., 2024).

1.3.4. Síntesis del ARN viral

La reacción de polimerización es catalizada por la actividad ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) de la proteína NS5, en asociación con la proteasa/helicasa NS3, otras proteínas virales no estructurales y factores celulares. Conforme al modelo ampliamente aceptado (**Figura 1.6**), la NS5 se une al promotor SLA en el extremo 5' del genoma, es decir a aproximadamente 11 000 nt de distancia del sitio de inicio de la replicación. La circularización del genoma resulta entonces clave para acercar el extremo 3' al complejo NS5-SLA. Esta conformación permite que la polimerasa acceda al extremo 3' para iniciar la síntesis de la cadena negativa de ARN (Villordo & Gamarnik, 2009).

La NS5 utiliza la hebra genómica de polaridad positiva como molde para sintetizar una hebra complementaria de polaridad negativa, formando un intermediario de ARN de doble cadena (ARNdc). Este ARNdc sirve a su vez como molde para la síntesis de nuevas hebras genómicas positivas. La replicación es asimétrica, produciendo muchas más hebras positivas que negativas. La actividad helicasa de la NS3 es necesaria para desenrollar el ARNdc y permitir rondas sucesivas de síntesis. Además, los nuevos genomas de ARN de polaridad positiva son modificados con una estructura de *cap-5'* mediante las actividades trifosfatasa de NS3 y metiltransferasa de NS5, preparándolos para ser traducidos o empaquetados (Klema et al., 2015).

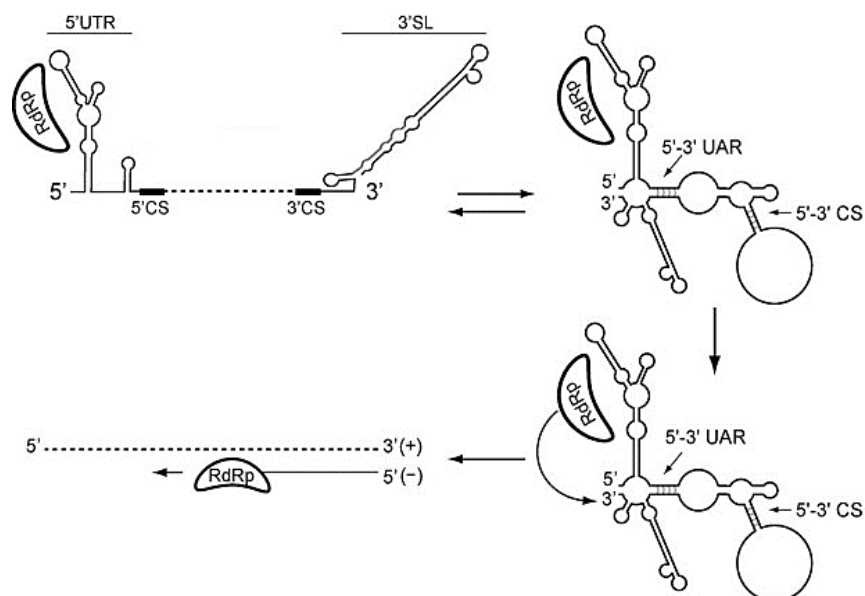


Figura 1.6. Modelo de circularización del genoma para la iniciación de la síntesis de ARN en flavivirus. La proteína NS5 (con actividad RdRp) se une al SLA en el 5'UTR. La circularización del genoma, mediada por secuencias complementarias, acerca el extremo 3' al complejo NS5-SLA. Esta conformación permite que la RdRp inicie la síntesis de la hebra de ARN de polaridad negativa a partir del extremo 3' de la hebra genómica (Villordo & Gamarnik, 2009).

1.3.5. Ensamblaje, maduración y liberación de la progenie viral

Cada molécula de ARN que es sintetizada puede ser usada para nuevas rondas de traducción o replicación, o ser empaquetada en nuevos viriones, aunque los factores que lo determinan aún no están claros.

El ensamblaje se inicia con la encapsidación del genoma por la proteína C para formar la NC. Aún no se ha identificado una secuencia de empaquetamiento en el genoma de los flavivirus, pero se sabe que la proteína C se une a diversos ácidos nucleicos de forma no específica a través de efectos electrostáticos. A pesar de esta característica, C es capaz de excluir el ARN monocatenario, el ARN bicatenario y los ARN del hospedador para empaquetar selectivamente solo el ARN genómico de cadena positiva recién sintetizado. Una teoría actual es que la especificidad del empaquetado del ARN la proporciona NS2A, cuya función sería transferir de manera efectiva el ARN que emerge del CR ([Jablunovsky & Jose, 2024](#)). Al complejo NS2B-NS3 también se le ha atribuido un posible rol en este proceso coordinado a través del procesamiento de la poliproteína, entre otras posibles funciones.

El acoplamiento entre replicación y ensamblaje asegura que solo el ARN viral recién sintetizado sea empaquetado. De la misma forma, la formación de la NC está estrechamente acoplada con la adquisición de la envoltura, de modo que rara vez se observan NCs desnudas en la célula. La NC es simultánea o consecutivamente envuelta por las proteínas estructurales transmembrana prM y E, junto con una bicapa lipídica derivada del RE, para formar la partícula de virus inmaduro que brota en la luz del RE. La adquisición de membrana comienza con la heterodimerización de las proteínas prM y E que, además, forman partículas subvirales que carecen de NC y también son liberadas durante la infección ([Barnard et al., 2021](#)).

Los viriones inmaduros transitan por el aparato de Golgi con el segmento pr de la proteína prM cubriendo el bucle de fusión de la proteína E para evitar la fusión viral prematura durante la salida del virus. El ambiente ácido de la red trans-Golgi induce un cambio conformacional que permite a la proteasa celular furina cortar la proteína precursora prM, generando la proteína M madura. El segmento pr permanece unido de forma no covalente para seguir protegiendo contra la fusión prematura y solo se disocia de la envoltura viral tras el cambio de pH de ácido a neutro en el espacio extracelular, lo que da lugar a la liberación final de viriones maduros e infecciosos ([Verhaegen & Vermeire, 2024](#)).

1.4. Proteínas no estructurales de los flavivirus

En contraste con las proteínas estructurales, se denomina proteínas no estructurales (NS) a aquellas que no se incorporan a la partícula viral. NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y

NS5, muchas veces en conjunto a proteínas celulares, cumplen múltiples funciones. Entre ellas se destacan la remodelación de la organización interna de la célula, la maduración de la poliproteína, la replicación del ARN viral y la evasión del sistema inmunológico (El Sahili & Lescar, 2017).

1.4.1. Complejo de replicación

Las proteínas NS se ensamblan, junto con factores de la célula hospedadora, para formar el CR dentro de las OR (**Figura 1.7**). En este sistema, NS1 ancla el complejo en el lumen del RE, mientras que NS2A y NS4A actúan como proteínas de andamiaje. Aunque la función específica de NS4B no está completamente dilucidada, se ha demostrado su interacción con NS3 y su importancia en la replicación viral. Además, tanto NS2A como NS4A han sido asociadas con funciones replicativas. El núcleo funcional del complejo está conformado por NS3, su cofactor NS2B y NS5 (Caldwell et al., 2022).

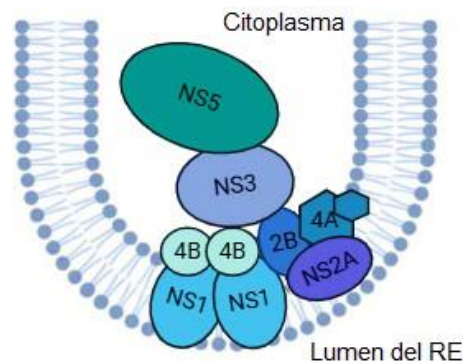


Figura 1.7. Esquema del Complejo de Replicación de los Flavivirus. La replicación del ARN viral tiene lugar en organelas especializadas formadas por invaginaciones de la membrana del RE. Las proteínas NS virales se ensamblan dentro de estas vesículas, creando un microambiente protegido para la síntesis del genoma (Adaptado de Caldwell et al., 2022).

La interacción entre NS3 y NS5 es esencial para la eficiencia del proceso de replicación. Aunque la función exacta de esta cooperación no se conoce por completo, se postula que la interacción posiciona a la helicasa NS3 cerca del túnel de entrada del molde de ARN en la polimerasa NS5, asegurando un acoplamiento espacial entre el desenrollamiento del molde y la síntesis de la nueva hebra. La importancia de esta interacción se subraya por el hecho de que mutaciones en residuos clave pueden interrumpir la interacción y abolir completamente la replicación viral (Duan et al., 2019).

1.4.2. Proteínas moduladoras de membrana y andamiaje

Este grupo de proteínas NS es fundamental para la biogénesis de las estructuras membranosas donde ocurre la replicación, y para el andamiaje y organización del CR.

NS1 es una glicoproteína altamente conservada de 46 a 55 kDa, dependiendo de su estado de glicosilación. Puede encontrarse tanto como un dímero asociado a membrana (en compartimentos vesiculares dentro de la célula o en la superficie celular), como en forma de un hexámero soluble, secretado y asociado a lípidos. Se sintetiza como un monómero hidrofílico que, luego de ser glicosilado, dimeriza rápidamente adquiriendo una naturaleza hidrofóbica. La NS1 intracelular cumple un papel esencial como cofactor en la replicación viral. Sin embargo, su función precisa en este proceso aún no ha sido completamente esclarecida. Otra fracción de la NS1 expresada es transportada a través del aparato de Golgi mediante la vía secretora, donde sus residuos de carbohidratos expuestos son modificados y procesados en azúcares más complejos para luego ser secretada desde la célula en forma de hexámero soluble. La NS1 secretada y la asociada a la superficie celular son altamente inmunogénicas, y tanto la proteína como los anticuerpos que induce han sido implicados en la patogénesis de la enfermedad (Muller & Young, 2013; Fisher et al., 2023). NS2A presenta múltiples hélices transmembrana y una topología compleja. Participa activamente en la síntesis del ARN viral y en el ensamblaje de partículas virales, actuando como una plataforma asociada a membranas que facilita la interacción entre componentes estructurales y no estructurales del virus (van den Elsen et al., 2023).

NS4A y NS4B son pequeñas proteínas hidrofóbicas con múltiples dominios transmembrana de 16 y 27 kDa respectivamente. Poco se conoce acerca de los mecanismos de NS4A pero la evidencia experimental sugiere que actúa como impulsor principal de las invaginaciones del retículo endoplasmático donde se ensambla el CR, organizando de forma coordinada sus componentes luminales, transmembrana y citoplasmáticos. Por su parte, NS4B tiene capacidad intrínseca para inducir reordenamientos de membrana y, en colaboración con NS4A, contribuye a mantener la arquitectura del CR. En conjunto, ambas proteínas facilitan la replicación viral al sostener la estructura del CR, organizar la maquinaria replicativa y modular la actividad de sus componentes enzimáticos (Barrows et al., 2018).

1.4.3. Actividad proteasa-helicasa

La proteína NS3 se encuentra conservada entre los flavivirus, con un 67 % de identidad de secuencia. Consiste en 618 residuos (70 kDa aproximadamente) de los cuales el primer tercio corresponde a un dominio serina proteasa y la porción C-terminal restante a un dominio helicasa. El dominio helicasa de NS3 posee actividades enzimáticas de helicasa de ARN, trifosfatasa de nucleótidos (NTPasa) y trifosfatasa de ARN (RTPasa). Las actividades helicasa y NTPasa de NS3 desenrollan la forma de ARN de doble cadena intermedia, mientras que la actividad RTPasa prepara el ARN genómico recién sintetizado para el añadido del *cap-5'* (Du Pont et al., 2022).

NS2B es una proteína de membrana de 14 kDa que contiene tres dominios hidrofóbicos y un dominio central hidrofílico. Este último actúa como cofactor para la actividad proteasa de NS3, permitiendo así el procesamiento de la poliproteína. La interacción NS2B-NS3 también puede provocar la fijación de NS3 en la membrana, favoreciendo el anclaje del complejo replicativo a las membranas del compartimento intracelular (Wahaab et al., 2021).

1.5. Proteína no estructural 5

Entre las proteínas flavivirales, NS5 es la más grande, con alrededor de 900 AA, y además la más conservada. Desempeña un rol clave en la replicación a través de sus actividades enzimáticas necesarias para la síntesis y *capping* del genoma viral, llevando adelante sus funciones a través de dos dominios (**Figura 1.8A**): un dominio N-terminal de metiltransferasa (MTasa) que tiene la capacidad de unirse a GTP y de realizar dos reacciones de metilación bioquímicamente distintas que son necesarias para la formación del *cap* del ARN, y un dominio C-terminal de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (Davidson, 2009).

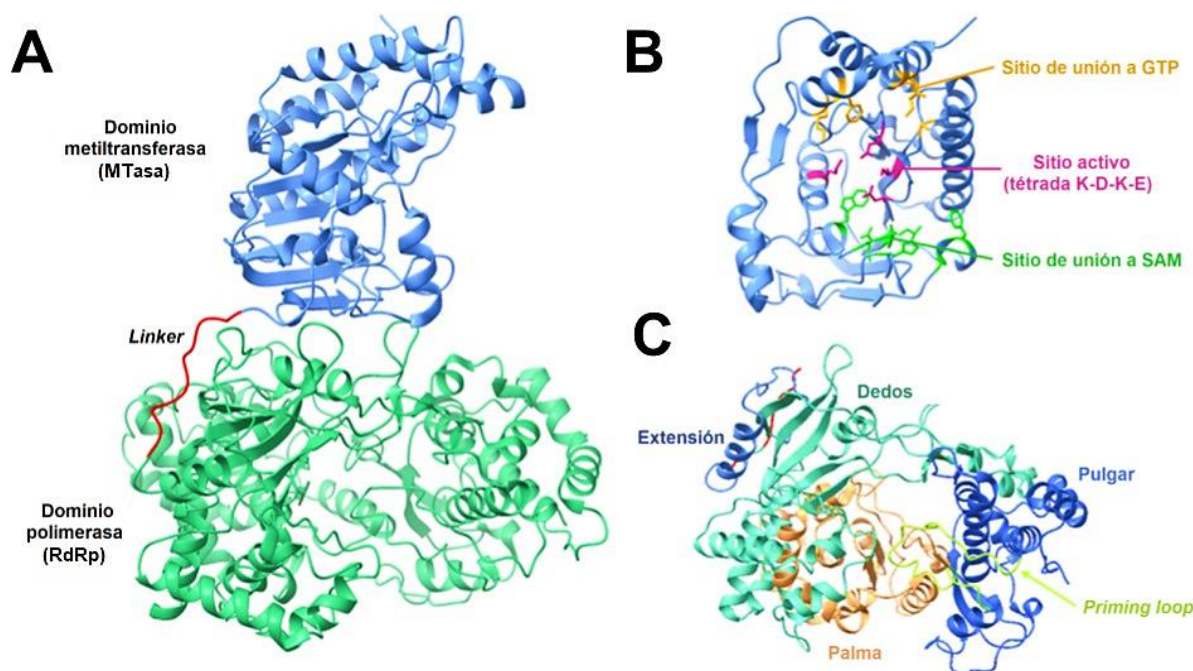


Figura 1.8. Estructura y dominios funcionales de la proteína NS5 de los flavivirus. Se muestra la estructura de la proteína NS5 de ZIKV como modelo representativo de la arquitectura conservada en todos los flavivirus. **(A)** Representación en cintas (*ribbon*) de la proteína completa, mostrando el dominio N-terminal metiltransferasa (MTasa) y el dominio C-terminal ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). **(B)** Detalle del sitio activo del dominio MTasa, indicando los residuos clave requeridos para la unión de GTP y SAM, y para la actividad de metilación. **(C)** Detalle del dominio RdRp, mostrando la arquitectura de "mano derecha" con los subdominios dedos, palma y pulgar. Se resalta la extensión que conecta los dominios MTasa y RdRp a través del *linker* (en rojo) y el *priming loop* conservado, requerido para la polimerización del ARN (Goh et al., 2024).

Además de su rol central en la replicación, NS5 desempeña funciones adicionales. La evolución y diversificación del papel de la proteína NS5 podría haber sido facilitada por la estrategia de los flavivirus de expresar todas sus proteínas a partir de un único ORF. Dado que deben producirse grandes cantidades de poliproteína para generar suficientes proteínas estructurales para cada nuevo virión, NS5 también se acumula en niveles que probablemente excedan los requeridos para la replicación. Puede que por este motivo NS5 haya adquirido funciones secundarias, como su participación en la evasión de la respuesta inmune del hospedador (Selisko et al., 2014).

1.5.1. Dominio metiltransferasa

El dominio MTasa (**Figura 1.8B**) utiliza GTP como sustrato para transferir GMP al ARN difosforilado que ha sido procesado por NS3, generando la estructura base del *cap*. Luego, cataliza tanto la metilación en el N-7 de la guanina como en el grupo 2'-OH de la ribosa del ARN viral, utilizando S-Adenosilmetionina (SAM) como donador de metilos, para formar la estructura de *cap* tipo I (m^7GpppN^m) (Issur et al., 2009).

Este dominio, de alrededor de 30 kDa, se divide a su vez en tres subdominios:

- El subdominio N-terminal comprende un motivo hélice-giro-hélice seguido por una hebra β y una hélice α , y aloja el sitio de unión al GTP.
- El subdominio central está compuesto por una lámina β de siete hebras flanqueada por hélices α , lo que se asemeja estrechamente a la topología observada en el dominio catalítico de otras metiltransferasas. Este segmento alberga los sitios de unión para el cofactor SAM y el sustrato GTP y en su centro se sitúa la tétada catalítica conservada K-D-K-E, imprescindible para las metilaciones en N-7 y 2'-OH.
- El subdominio C-terminal, constituido por elementos de hélice α y hebra β , establece interacciones estabilizadoras con los subdominios N-terminal y central.

El dominio MTasa está conectado, mediante un enlace flexible, al dominio RdRp (~70 kDa). La flexibilidad de esta región es esencial, ya que mutaciones que rigidizan este enlace provocan una disminución de la actividad de la RdRp y la atenuación de la replicación viral. (Goh et al., 2024).

1.5.2. Dominio polimerasa

Al igual que otras polimerasas virales, el dominio RdRp de los flavivirus adopta una estructura tridimensional que se asemeja a una mano derecha semicerrada, pudiendo a su vez dividirse en tres subdominios (**Figura 1.8C**): palma, dedos y pulgar. Además, dentro de esta estructura se pueden reconocer siete motivos estructurales (de la A a la G) a partir de

secuencias altamente homólogas y/o estructuras conservadas. Estos motivos, compartidos por todas las RdRp virales, son responsables de la unión de NTPs y la catálisis (Duan et al., 2019).

Entre los motivos catalíticos de las RdRp, los motivos A, B, C, D y E se localizan en el subdominio palma, que es la región más conservada de la enzima. Por su parte, los motivos F y G se encuentran en las regiones que corresponden a los dedos, específicamente en los dedos anular y meñique, respectivamente (Wu et al., 2020). Los motivos A y C contienen dos residuos de ácido aspártico conservados que participan en la coordinación de iones metálicos divalentes para la polimerización de nucleótidos (formación del enlace fosfodiéster). El motivo B ayuda al movimiento de la hebra molde en las etapas tardías de la transcripción. El motivo D está relacionado con la discriminación de nucleótidos, y un residuo conservado de lisina desempeña un papel importante en los reordenamientos estructurales de la RdRp necesarios para formar el complejo ARN-NTP-UTP. Los motivos E y C interactúan con la cadena principal del ARN producto (Duan et al., 2019).

Cada uno de los tres subdominios de la RdRp presenta las siguientes características:

- El subdominio palma se parece considerablemente al de otras RdRp aunque con algunas diferencias estructurales. Típicamente, el dominio palma está compuesto por una lámina β central, formada por tres cadenas β antiparalelas, rodeadas por hélices α . En cambio, la lámina β central en el caso de los flavivirus consta de solo dos cadenas β más cortas, rodeadas por ocho hélices α (Davidson, 2009).
- El subdominio pulgar, compuesto por ocho hélices α , es crucial para posicionar el ARN. Su interfaz con la palma la constituye el motivo E, implicado en la unión del NTP iniciador. Una característica destacada del pulgar de los flavivirus es la presencia de un *priming loop* flexible que se proyecta hacia el sitio activo. Se ha propuesto que este bucle es fundamental para la iniciación *de novo* de la síntesis de ARN y para regular la transición a la fase de elongación (Malet et al., 2008; Wang et al., 2018).
- El subdominio dedos comprende un núcleo central, compuesto por una lámina β de tres cadenas, y dos proyecciones conocidas como "puntas de los dedos". La punta del dedo índice interactúa con la parte superior del subdominio pulgar, generalmente mediante interacciones hidrofóbicas, lo que permite cerrar la estructura de la RdRp y contribuye a su estabilidad térmica (Lu & Gong, 2017). El subdominio dedos regula la actividad *de novo* de la RdRp mediante su participación en la formación del sitio activo y del canal de entrada de los NTP, con el motivo F implicado en la estabilización del par de bases naciente y el motivo G en la unión a ARN molde (Wang et al., 2018).

En la arquitectura de la RdRp de los flavivirus, todos los motivos presentes actúan de manera conjunta para formar tres túneles que aseguran la replicación eficiente. El túnel de entrada del ARN molde se ubica en la interfaz de los subdominios de los dedos y el pulgar. En el túnel de entrada de NTPs, el motivo F de los dedos facilita la difusión de nucleótidos trifosfato. Por último, el túnel de salida del ARN de doble cadena, cuya apertura es regulada por el *priming loop*, permite la elongación y liberación del ARN sintetizado (Davidson, 2009; Wang et al., 2018).

1.5.3. Flexibilidad de la región interdominio y diversidad conformacional

A pesar de la alta conservación estructural de sus dominios individuales, la proteína NS5 completa de los flavivirus exhibe una notable plasticidad. Esta flexibilidad, mediada por la región que conecta los dominios MTasa y RdRp, permite la modulación de las interacciones entre sus dominios y la coordinación de sus actividades enzimáticas (Li et al., 2014).

Los análisis cristalográficos de la proteína NS5 completa han revelado la existencia de al menos dos conformaciones globales principales. La primera estructura de alta resolución, obtenida para la NS5 de JEV, mostró una conformación "extendida" con una interfaz interdominio definida y conservada (Lu & Gong, 2013). Sin embargo, la posterior cristalización de la NS5 de DENV-3 reveló una conformación "compacta", donde la orientación relativa entre los dominios MTasa y RdRp difería en una rotación de 105° (Zhao et al., 2015a). Estudios posteriores con NS5 de ZIKV y DENV-2 confirmaron que la proteína puede adoptar ambos estados, sugiriendo que estas dos formas representan conformaciones alternativas y estables que coexisten en solución y son necesarias para la función viral (Wang et al., 2018; Wu et al., 2020).

La transición entre las conformaciones extendida y compacta (incluyendo secuencialmente conformaciones intermedias) ocurriría principalmente mediante movimientos rotacionales. Tres elementos estructurales podrían desempeñar roles críticos en la transición entre estos estados (**Figura 1.9**): la secuencia conservada GTR (Gly-Thr-Arg) en el extremo C-terminal del dominio MTasa, la región conectora que une los dos dominios (*linker*) y una hélice del dedo índice de la RdRP. Aunque la región interdominio muestra baja conservación de secuencia, su flexibilidad estructural es esencial. El movimiento de torsión requeriría una flexión significativa del *linker*, utilizando los residuos GTR como pivote o eje de giro y la hélice conservada podría ser la guía para el movimiento rotacional del dominio MTasa (Klema et al., 2016; Wu et al., 2020). Además, un residuo de valina o isoleucina estrictamente conservado en la región interdominio, apodado "dedo resbaladizo" (*greasy finger*), parece ser crucial para regular el acoplamiento y la comunicación funcional entre los dominios, permitiéndoles adoptar las orientaciones necesarias para la replicación (Zhao et al., 2015b).

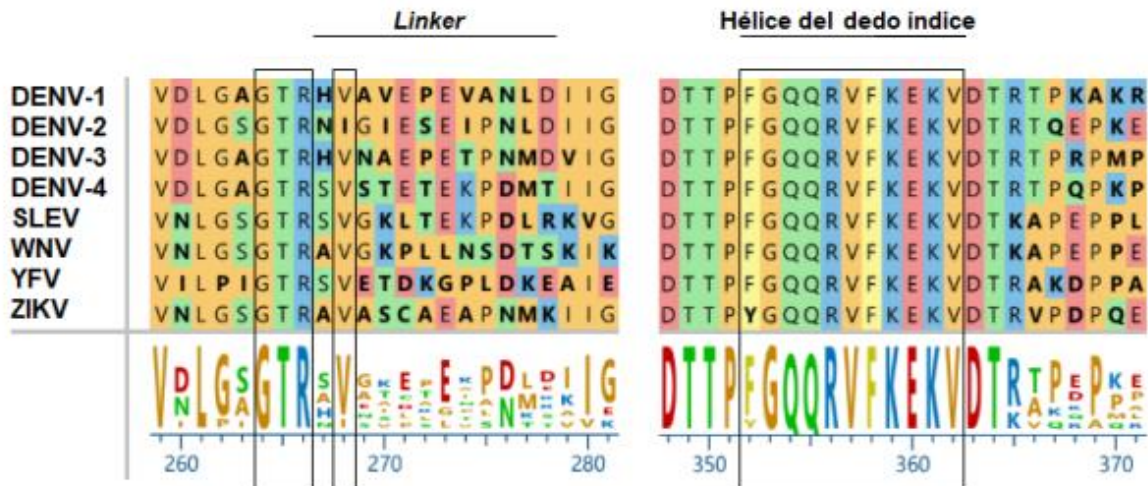


Figura 1.9. Elementos estructurales clave que regulan las transiciones conformacionales de NS5. Se muestra un alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de la proteína NS5 de un panel representativo de flavivirus. Se destacan tres regiones críticas implicadas en la transición entre los diferentes estados conformacionales de la proteína: el motivo pivote GTR, la región conectora (*linker*) y la hélice conservada del dedo índice. Además se señala la valina (o isoleucina) del "dedo resbaladizo" (*greasy finger*).

La función de la RdRp está modulada por su interacción con el dominio MTasa, aunque este acoplamiento tiene efectos diferentes según el virus: en ZIKV el dominio RdRp por sí solo es menos activo que la proteína NS5 completa, mientras que en DENV la eliminación del dominio MTasa aumenta la síntesis de ARN *in vitro*. Esta diferencia funcional se atribuye a las distintas redes de interacciones y a las orientaciones relativas que adoptan los dominios MTasa y RdRp en cada virus. Estas variaciones estructurales afectan directamente la eficiencia de la síntesis de ARN, demostrando cómo la arquitectura global de la proteína NS5 y la comunicación entre sus dominios son críticas para su función replicativa (Zhao, 2017).

El contexto funcional de estas conformaciones alternativas aún no está completamente claro. Sin embargo, estudios recientes indican que ambas conformaciones son necesarias para que la NS5 lleve a cabo su función en la replicación viral, mientras que la dinámica conformacional hacia una estructura extendida favorecería la interacción con factores celulares permitiendo que NS5 desarrolle sus funciones como antagonista de la respuesta antiviral (Biswal et al., 2024).

1.5.4. Transiciones del dominio RdRp

Independientemente de la orientación global de la proteína, el propio dominio RdRp debe experimentar sus propios cambios conformacionales. Todas las estructuras cristalográficas disponibles muestran la RdRp en una conformación "cerrada", representativa de un estado

de preiniciación. Para llevar a cabo la síntesis de ARN, la enzima debe transicionar a través de tres estados diferentes en cada fase de la síntesis de ARN viral:

- En la preiniciación, el dominio RdRp adopta una conformación cerrada que puede recibir los primeros NTPs pero donde el túnel por el cual debe salir el ARNdc recién sintetizado se encuentra bloqueado.
- En el estado de iniciación, la NS5 se une al extremo 3' del ARN viral gracias a la circularización del genoma y el *priming loop* cumple una función crucial al actuar como una plataforma estabilizadora que posiciona correctamente el primer nucleótido (adenosina). Esto permite la formación del primer enlace ribosa-fosfato, generando un cebador de dinucleótidos y liberando pirofosfato como subproducto.
- Por último, una vez que se ha sintetizado el cebador inicial, la proteína NS5 experimenta un cambio conformacional a gran escala hacia el estado de elongación. Este cambio implica la retracción del *priming loop*, lo que a su vez provoca la apertura del túnel de salida del ARNdc.

La transición de una conformación cerrada a una abierta se considera el paso limitante de la velocidad de la actividad polimerasa. La conformación abierta propuesta garantiza una polimerización de ARN procesiva y continua a medida que el ARNdc es translocado a través del túnel ahora despejado (El Sahili & Lescar, 2017; Wang et al., 2018).

1.5.5. Localización

Dada la naturaleza del genoma de los flavivirus, la replicación ocurre exclusivamente en el citoplasma sin la necesidad de intermediarios nucleares. Sin embargo, una proporción significativa de la proteína NS5 se localiza en el núcleo durante la infección de algunos flavivirus como ZIKV, JEV, YFV y WNV. Las funciones de la NS5 nuclear son variadas y se centran principalmente en la modulación de la respuesta antiviral del hospedador.

La localización nuclear de NS5 se observa desde las primeras etapas de la infección, como se demuestra en ensayos de inmunofluorescencia donde un 95 % de la señal asociada a NS5 se acumula en el núcleo alrededor de las 24 horas postinfección. Este ingreso debe incluir el transporte activo a través del complejo del poro nuclear, considerando el gran tamaño de NS5. Tal como ha sido demostrado, el mecanismo de importación nuclear está mediado por señales de localización nuclear (NLS) que utilizan tanto la vía de transporte de importina α - β como la vía de importina β (Lopez-Denman & Mackenzie, 2017; Tan et al., 2019).

La localización de NS5 dentro de la célula puede variar significativamente entre diferentes flavivirus e incluso entre serotipos. En DENV se identificó una NLS central (residuos

380-398) y una NLS en la región c-terminal (residuos 881-900). No obstante, cada serotipo parece emplear una estrategia distinta, donde las NLS interactúan de manera diferente con la maquinaria de importación. La NS5 de DENV-1 se encuentra principalmente en el citoplasma, mientras que en los demás serotipos se observa acumulación de NS5 en los núcleos de células infectadas. Esta variabilidad específica de serotipo sugiere que, a pesar de tener las mismas herramientas, cada virus ha evolucionado para regular la función nuclear de su NS5 (Cheng et al., 2024). En WNV se observó que el bloqueo de la localización nuclear de NS5 mediante inhibidores de la exportación o importación nuclear, o la mutación de una NLS conservada, condujo a una disminución intrínseca de la capacidad replicativa viral, evidenciando la importancia del proceso (Lopez-Denman et al., 2018).

El tráfico nucleocitoplasmático de NS5 es un proceso dinámico que depende de otros factores, además de las NLS, como las modificaciones post-traduccionales. La fosforilación y la SUMOilación de NS5 han demostrado ser cruciales en la distribución subcelular de NS5. La hiperfosforilación de NS5 se ha relacionado con una mayor acumulación nuclear en ciertos flavivirus, lo que subraya un nivel adicional de control sobre su localización y función. Además, se ha identificado un motivo de interacción con SUMO tanto en DENV como en ZIKV, y su mutación afecta la localización nuclear. La SUMOilación parece regular la distribución de NS5 dentro del núcleo, promoviendo una localización difusa en el nucleoplasma (DENV) o la formación de cuerpos nucleares discretos (ZIKV) (Tan et al., 2019; Conde et al., 2020).

1.6. Inmunidad innata

La infección por flavivirus se inicia cuando los viriones son inoculados en la epidermis y la dermis durante la picadura del vector. En este sitio inicial, el virus encuentra varias células permisivas para su replicación, principalmente queratinocitos y células dendríticas de la piel, un blanco inicial común y crucial para muchos flavivirus. Una vez infectadas, estas células dendríticas migran desde la piel hacia los ganglios linfáticos locales. En los órganos linfoides, la replicación viral se amplifica y se transmite a otras células inmunes, como macrófagos y monocitos. Este proceso facilita la diseminación del virus al torrente sanguíneo, resultando en una viremia que permite al virus alcanzar y establecer la infección en órganos internos (Laureti et al., 2018). Mientras los flavivirus llevan adelante su ciclo de infección, la célula hospedadora debe poner en marcha mecanismos de defensa contra los patógenos.

1.6.1. Primeros mecanismos de defensa frente a la infección por flavivirus

La primera línea de defensa del hospedador es la inmunidad innata que, aunque no es

específica, es importante por ser rápida y por desempeñar un papel clave en el establecimiento de la inmunidad adaptativa, que será específica contra el patógeno y de larga duración. La respuesta inmune se inicia con la detección del virus mediante sensores especializados denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Estos receptores se encuentran distribuidos dentro de los compartimentos endosomales y el citoplasma, y son capaces de detectar y responder al ARN viral y a las células infectadas por virus. Existen tres clases principales de PRRs que participan en la detección eficiente de flavivirus: los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores tipo RIG-I (RLR), ambos sensores de ARN, y la sintasa de GMP-AMP cíclico (cGAS). Este último es un sensor de ADN que detecta ADN mitocondrial libre en el citoplasma producto de las alteraciones de la membrana mitocondrial que inducen los flavivirus (Pan et al., 2022).

La transducción de señales mediada por PRRs da como resultado la secreción de interferón tipo I (IFN-I), componente principal de la respuesta innata contra la infección viral, que posteriormente se une a los receptores de IFN-I (IFNAR1/IFNAR2) y activa la cascada de señalización JAK-STAT para estimular la expresión de genes estimulados por interferón (ISGs). La cascada de señalización de TLR y RLR también induce la producción de citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina 1 β (IL-1 β) y la interleuquina 18 (IL-18). La respuesta coordinada de múltiples PRRs asegura el establecimiento del estado antiviral, a partir de la producción rápida de interferón, mientras que la inflamación, debida a la secreción de interleuquinas, conduce al reclutamiento celular para contener y eliminar la infección. Es importante destacar que una respuesta excesiva puede contribuir a la patogénesis de enfermedades, como ocurre en los casos de dengue grave (Cedillo-Barrón et al., 2018; Fernandes-Santos & Leal de Azeredo, 2022).

Además de la respuesta mediada por interferón, existen otras barreras inmunológicas como la activación del complemento, la inmunidad mediada por células NK, la apoptosis y la autofagia (van Leur et al., 2021).

1.6.2. Evasión viral de la respuesta inmune innata

Para establecer una infección exitosa, los flavivirus han desarrollado una serie de estrategias para antagonizar la respuesta inmune innata, donde las proteínas NS cumplen un rol fundamental. Algunas de ellas incluyen la glicosilación de NS1 (factor clave para su estabilidad y secreción), lo cual le permite interactuar de manera eficiente con los componentes del complemento y evitar su activación; la inhibición de la señalización de IFN-I, atribuida a la proteína NS4B; la acción de NS2B contra la enzima cGAS, con el objetivo de impedir la detección del ADN mitocondrial asociado con el daño celular, entre otras (van Leur et al., 2021).

En este sentido, NS5 también cumple un rol clave, ya que participa en diversos mecanismos

de antagonismo viral frente al sistema inmune del hospedador. En primer lugar, la metilación del ARN viral por parte del dominio MTasa de NS5 lo protege de ser reconocido. Además, NS5 es también el antagonista más potente y directo de la señalización JAK-STAT dependiente de IFN-I descrito hasta ahora en todos los flavivirus estudiados. A pesar de las restricciones evolutivas impuestas por la necesidad de conservar sus funciones enzimáticas, distintos flavivirus han evolucionado incorporando en NS5 funciones inmunomoduladoras adicionales (Best, 2017). Como consecuencia, esta proteína emplea con frecuencia múltiples estrategias para suprimir la vía de señalización JAK-STAT no solo entre diferentes especies de *Flavivirus*, sino también dentro de la misma especie. Por ejemplo:

- La NS5 de ZIKV emplea una doble estrategia contra mediadores de la vía de señalización. Por un lado, inhibe la fosforilación de STAT1, mientras que a su vez se une a STAT2 e induce su degradación. Notablemente, la NS5 de ZIKV puede mediar esta degradación sin necesidad de ser procesada a partir de la poliproteína.
- La NS5 de DENV se une a STAT2 e inhibe su fosforilación, lo que resulta en una reducción de la transcripción de ISGs, y media la fosforilación de STAT1, aunque no interactúa directamente con ella. Además, al igual que la NS5 de ZIKV, promueve la degradación de STAT2 pero por un mecanismo diferente, ya que la degradación en este caso solo es detectada cuando el N-terminal es procesado proteolíticamente (cuando NS5 es separada de NS4B durante el procesamiento de la poliproteína).
- Las proteínas NS5 de YFV, JEV y WNV también interfieren con esta vía en distintos pasos. La NS5 de YFV dirige su acción contra STAT2 como parte de su mecanismo de supresión del IFN-I, la NS5 de JEV inhibe la fosforilación de STAT1 pero aún no se han identificado interacciones específicas, mientras que la NS5 de WNV interactúa con una proteína del hospedador requerida para la maduración de IFNAR1 y esta interacción podría ser la vía por la cual se inhibe la fosforilación de STAT1 y STAT2 (Thurmond et al., 2018).

La localización nuclear de NS5 también tiene implicancias en la evasión de la respuesta inmune, a través de la modulación de la respuesta antiviral del hospedador por varios mecanismos observados en diferentes flavivirus. Se ha demostrado que la NS5 nuclear interfiere con la maquinaria de *splicing* del ARNm celular, alterando el procesamiento de transcritos de factores antivirales. Además, puede suprimir la producción de interferón tipo I y la inducción de citoquinas como la IL-8, e interactuar con la cromatina para bloquear la transcripción de ciertos genes específicos. En el caso de ZIKV, la acumulación nuclear de NS5 es crucial para inducir la patología neuronal observada en modelos de la enfermedad (Goh et al., 2024).

Finalmente, además de las proteínas NS, los flavivirus emplean una estrategia de evasión basada en ARN. En las células infectadas se acumulan grandes cantidades de ARN subgenómicos (ARNsg), generados debido a la degradación incompleta del ARN genómico viral por la exorribonucleasa XRN1 del hospedador, que se detiene en elementos estructurales conservados dentro de la región 3'UTR del virus. Estos ARN no codificantes actúan como supresores de la respuesta a IFN-I y alteran la estabilidad del ARNm del hospedador. Además, los ARNsg promueven la citopatogenicidad y la apoptosis en las células infectadas y son cruciales para la transmisión por vectores artrópodos (permiten que el virus supere la barrera intestinal del mosquito y se acumule en su saliva, facilitando así la transmisión) (Slonchak & Khromykh, 2018; Doets & Pijlman, 2024).

1.7. Inmunidad adaptativa

Cuando un patógeno logra evadir las defensas de la inmunidad innata y alcanza un umbral significativo de antígeno, se activa la inmunidad adaptativa, una respuesta crucial en los vertebrados. Este sistema se divide en dos ramas fundamentales: la respuesta inmune humoral, basada en la producción de anticuerpos por linfocitos B, y la respuesta inmune celular, en la que intervienen las células T CD4+ y CD8+. En el caso de las infecciones por flavivirus, estudios han demostrado que tanto la rama humoral como la celular comparten características comunes, a la vez que presentan diferencias notables, siendo ambos componentes determinantes en la patogénesis y en el desenlace clínico de la enfermedad. (Ye et al., 2013).

1.7.1. Respuesta humoral frente a la infección por flavivirus

La respuesta humoral, mediada por la producción de anticuerpos, es un componente crítico para el control de la replicación y diseminación de los flavivirus. El blanco principal son las proteínas estructurales E y prM, aunque también hay evidencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína C y proteínas NS.

Los anticuerpos ejercen sus funciones protectoras a través de dos mecanismos principales. Por un lado, interfieren directamente en el ciclo viral, principalmente a través de la neutralización. Por otro lado, desencadenan funciones efectoras (Hurtado-Monzón et al., 2020). La protección que brindan los anticuerpos, mediante su porción Fc, incluye la fijación del complemento, la opsonización (marcado para fagocitosis) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Esta respuesta se dirige a epítopes tanto conformacionales (dependientes de la estructura tridimensional) como lineales (secuencias continuas de aminoácidos), siendo los primeros los más abundantes, aunque los segundos pueden exhibir una mayor afinidad de unión (Fumagalli et al., 2021).

La dinámica de la respuesta humoral varía entre una infección primaria y una secundaria, lo cual tiene importantes implicancias para el diagnóstico. Tras una infección primaria, los anticuerpos de clase IgM son los primeros en aparecer, detectables entre tres y cinco días tras el inicio de los síntomas, y persisten durante varios meses. Los anticuerpos IgG aparecen una semana después, aumentando lentamente hasta alcanzar niveles que pueden durar décadas. En contraste, durante una infección secundaria, la estimulación de células B de memoria provoca un rápido aumento de los títulos de IgG, siendo detectables incluso en la fase aguda, mientras que la respuesta de IgM es a menudo baja o ausente. (Wahala & De Silva, 2011; Falconi-Agapito et al., 2021).

1.7.2. Anticuerpos neutralizantes

La protección contra la infección por flavivirus es mediada principalmente por anticuerpos neutralizantes (nAbs), los cuales se dirigen predominantemente contra epítopes en la glicoproteína de envoltura E. Estos anticuerpos bloquean la infectividad viral a través de múltiples mecanismos, como la agregación de viriones, la interferencia con la unión a receptores celulares o el bloqueo de la fusión de membranas en el endosoma (Rey et al., 2018). Sin embargo, para que la neutralización sea eficaz, se requiere la unión de múltiples anticuerpos, siguiendo un modelo de umbral. Esto significa que el virión se neutraliza solo cuando un número crítico de anticuerpos se ha unido. Esta potencia neutralizante depende tanto de la afinidad del anticuerpo como del número de epítopes accesibles (Pierson & Diamond, 2008).

La accesibilidad de estos epítopes, y por lo tanto la eficacia de la neutralización, se ve afectada por la heterogeneidad estructural de las partículas virales. Esto implica una dificultad adicional que no es captada por los modelos estáticos de la estructura del virión, los cuales identifican el estado físico más abundante de la partícula viral y pueden no detectar conformaciones de baja abundancia que existen en un equilibrio dinámico. La población de viriones es diversa, conteniendo partículas inmaduras y parcialmente maduras debido al procesamiento ineficiente de la proteína prM. Además, incluso los viriones maduros son altamente dinámicos, con la proteína E experimentando constantes cambios conformacionales, un fenómeno conocido como "respiración viral" (Slon Campos et al., 2018).

Como consecuencia, los cambios en la accesibilidad de los epítopes provocados por conformaciones alternativas de E y la presencia de poblaciones heterogéneas de viriones, influyen en el repertorio de epítopes disponibles para la unión de anticuerpos y la neutralización. Las razones por las cuales los flavivirus conservan estas propiedades probablemente se relacionan con mecanismos de entrada viral, dado que la diversidad de formas circulantes podría facilitar la expansión de su tropismo hacia distintos hospedadores

y tejidos. Asimismo, la complejidad antigénica derivada de la heterogeneidad y la dinámica de las partículas podría conferirles una ventaja en hospedadores vertebrados, al permitirles explotar respuestas de anticuerpos no protectores y favorecer así infecciones heterólogas subsecuentes (Rey et al., 2018).

1.7.3. Reactividad cruzada y potenciación dependiente de anticuerpos

Una característica central de la respuesta humoral a los flavivirus es la reactividad cruzada. Debido a las similitudes genéticas (y, en consecuencia, antigénicas), la infección por un flavivirus induce la producción tanto de anticuerpos específicos como de anticuerpos que reconocen a otros flavivirus. Esta reactividad cruzada es la base para la clasificación de los flavivirus en complejos serológicos (Tabla 1.1), definidos según la capacidad de sueros policlonales postinmunización contra un flavivirus para neutralizar a otros. Este agrupamiento implica que los miembros de un mismo complejo pueden ser neutralizados en cierta medida por los mismos sueros (Rathore & St. John, 2020).

En un individuo con inmunidad preexistente, la presencia de anticuerpos circulantes con reactividad cruzada pero sin capacidad neutralizante puede potenciar la infección y provocar consecuencias patológicas. El fenómeno de potenciación dependiente de anticuerpos (ADE) ocurre cuando anticuerpos preexistentes se unen a un flavivirus heterólogo de forma no neutralizante o sub-neutralizante. En lugar de bloquear la infección, estos anticuerpos forman complejos inmunes con la partícula viral, facilitando su entrada en células que expresan receptores Fcγ (como monocitos y macrófagos) y resultando en una replicación viral exacerbada. Aunque la ADE se ha demostrado *in vitro* para múltiples flavivirus, su relevancia clínica *in vivo* ha sido confirmada de manera concluyente para DENV (Pierson & Diamond, 2020).

Tabla 1.1

Serocomplejos del género Flavivirus que incluyen los principales patógenos humanos

Complejo	Principales especies virales
Encefalitis japonesa	JEV, WNV, SLEV, Usutu (USUV)
Dengue	DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4
Fiebre amarilla	YFV
Spondweni	Spondweni (SPOV), ZIKV

Nota. Clasificación basada en la reactividad cruzada de los nAbs (Adaptado de Rathore & St. John, 2020).

La base bioquímica de la ADE radica en la estequiometría de la neutralización. Durante una infección secundaria por DENV, los anticuerpos con reactividad cruzada generados en la primera infección pueden unirse al nuevo serotipo con menor afinidad o avidéz. Esta unión subóptima resulta en una ocupación del virión por debajo del umbral de neutralización, una condición ideal para que se produzca la ADE. Anticuerpos con alta reactividad cruzada (como los anticuerpos contra prM) implican una gran tendencia a ADE, incluso si fueron producidos en infecciones primarias de otros flavivirus como ZIKV. Además, en el caso de partículas virales inmaduras, anticuerpos anti-E y anti-prM pueden inducir ADE incluso a altas concentraciones (Pierson & Diamond, 2008; Hurtado-Monzón et al., 2020)

Este mecanismo es clave para explicar el incremento en la patogenicidad observada en infecciones secundarias de DENV e infecciones primarias en lactantes que han adquirido pasivamente anticuerpos maternos. En ambos casos, la presencia de anticuerpos preexistentes y no perfectamente neutralizantes se correlaciona con una mayor carga viral y una patogénesis más grave (Slon Campos et al., 2018).

1.7.4. Anticuerpos contra proteínas NS

Además de la complejidad de la respuesta humoral contra las proteínas estructurales y el riesgo de reactividad cruzada patogénica, otro factor interesante en la respuesta inmune es la presencia de anticuerpos contra proteínas NS, con principal foco en NS1, NS3 y NS5. Dado que las proteínas NS no se incorporan al virión, los anticuerpos específicos contra proteínas NS no neutralizan directamente la infectividad viral (Chong et al., 2019).

La glicoproteína NS1 es el blanco NS más estudiado, en gran parte porque es secretada por las células infectadas y circula en el suero. Induce una fuerte respuesta humoral durante la infección y los anticuerpos anti-NS1 pueden conferir protección a través de mecanismos efectoros como la activación del complemento y la citotoxicidad celular (Chong et al., 2019; Carpio & Barrett, 2021). Como consecuencia, la presencia de estos anticuerpos es importante para limitar la replicación viral. Sin embargo, se ha demostrado que los anticuerpos anti-NS1 pueden reaccionar de forma cruzada con plaquetas y células endoteliales, a través de un mecanismo de mimetismo molecular. Esta autoinmunidad ha sido implicada en la patogénesis de las formas graves del dengue, como las hemorragias y la trombocitopenia. Además, también podría estar vinculada a el daño hepático observado en estas infecciones (Reyes-Sandoval & Ludert, 2019; Goh et al., 2024).

A diferencia de NS1, el resto de las proteínas NS son exclusivamente intracelulares. Por lo tanto, estas proteínas pueden ser capturadas por células presentadoras de antígenos (APC), como las células dendríticas y los linfocitos B, cuando ocurre la lisis de una célula infectada y se libera su contenido en el medio extracelular. Dentro de estas APCs, las proteínas virales son degradadas en péptidos de 12 a 20 AA, los cuales son cargados en

los MHC de Clase II. Los complejos péptido-MHC-II son entonces expuestos en la superficie celular. Una célula T CD4+ que reconozca este complejo proporcionará la activación necesaria para que las células B que han reconocido a las proteínas NS se diferencien en células plasmáticas y produzcan anticuerpos anti-NS de alta afinidad (Wullimann & Ljunggren, 2025). Si bien se describió la presencia de estos anticuerpos, principalmente anti-NS3 y anti-NS5, se desconoce el rol que cumplen, ya que no podrían tener influencia al no poder acceder a sus blancos dentro de la célula. Sin embargo, su presencia en el suero es un indicador de la exposición al antígeno durante la infección (Wahala & De Silva, 2011). Se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-NS5 en pacientes infectados por diversos flavivirus, como WNV (Prince et al., 2008) y DENV, donde también se detectaron anticuerpos anti-NS3 (Valdés et al., 2000). La presencia de estos anticuerpos en muestras de fase aguda de infecciones primarias y secundarias sugiere la posibilidad de implementar nuevos métodos de diagnóstico basados en estos antígenos.

1.7.5. Respuesta celular frente a la infección por flavivirus

Además de la respuesta humoral, la inmunidad mediada por células T es un componente crucial de la defensa adaptativa contra los flavivirus, ya que estas células cumplen importantes roles en el control y la eliminación de patógenos. Esta respuesta se divide en dos ramas principales: por un lado, las células T CD4+ que, además de ayudar a las células B a generar anticuerpos de alta afinidad, producen citoquinas y activan células inmunes innatas. Por otro lado, las células T CD8+, responsables de reconocer y eliminar directamente las células infectadas. Ambas poblaciones son capaces de generar células de memoria de larga vida para una respuesta rápida ante futuras infecciones (Pardy & Richer, 2019).

Sin embargo, la respuesta de las células T en las infecciones por flavivirus ha sido implicada tanto en la protección como en la patogénesis. Las células T CD8+ son esenciales para controlar la replicación viral al migrar a los tejidos infectados, pero esta misma actividad citotóxica puede causar un daño tisular colateral significativo, especialmente en tejidos vulnerables como el sistema nervioso central. De hecho, las altas tasas de mortalidad en las encefalitis por flavivirus a menudo resultan de este desequilibrio entre el control viral y la inmunopatogénesis. Por lo tanto, la supervivencia a la infección depende del equilibrio entre una eliminación eficaz del virus y una supresión oportuna de la respuesta inmune para minimizar el daño (Chong et al., 2019).

La complejidad de esta respuesta se magnifica en el contexto de infecciones secuenciales debido a la reactividad cruzada. El alto grado de identidad de secuencia entre los flavivirus provoca que la respuesta secundaria esté dominada por la reactivación de células de memoria de la primera infección, un fenómeno conocido como "pecado original antigénico".

Como los virus no son idénticos, esto puede llevar a la movilización de clones de células T con baja avidéz por el nuevo virus, comprometiendo la eficacia de la respuesta.

En particular, estas células T con reactividad cruzada tienen un rol controvertido en la patogénesis de DENV. Se ha observado que, durante una infección secundaria, se movilizan muchas células T de memoria que reconocen mejor al primer virus que al segundo. Estas células a menudo exhiben una respuesta alterada: producen una "tormenta" de citoquinas pro-inflamatorias pero tienen una menor capacidad citotóxica. Esta magnitud de la respuesta es frecuentemente asociada con la severidad de la enfermedad en infecciones secundarias por DENV (Slon Campos et al., 2018). Sin embargo, otros estudios mostraron que la reactividad cruzada también puede ser protectora, asociándose con respuestas de células T robustas (Aberle et al., 2018). En definitiva, el papel de la respuesta de células T en la infección por DENV sigue siendo un área de debate, con evidencia que apoya tanto un efecto perjudicial como uno protector. Es probable que ambas hipótesis sean válidas dependiendo de una compleja interacción de factores (Grifoni et al., 2020).

1.7.6. Evasión viral de la respuesta inmune adaptativa

Además de antagonizar la inmunidad innata, los flavivirus han desarrollado varias estrategias para evadir la respuesta inmune adaptativa. Entre ellas, una de las principales es la variación antigénica, impulsada por la actividad propensa a errores de la proteína NS5. Durante la replicación del genoma, la baja fidelidad de la NS5 introduce mutaciones de forma constante. Esta alta tasa de mutación, combinada con la presión selectiva ejercida por el sistema inmune del hospedador, genera una población viral diversa conocida como cuasiespecies. Algunas de estas variantes virales pueden presentar cambios en los epítopes clave, permitiéndoles escapar del reconocimiento tanto de los anticuerpos neutralizantes como de las células T específicas.

La capacidad de generar diversidad antigénica es, por lo tanto, una estrategia de evasión clave que complica el control de la infección por parte del sistema inmune y, además, representa un desafío significativo para el diseño de vacunas y terapias duraderas. Este fenómeno de escape viral subraya la compleja co-evolución entre los flavivirus y sus hospedadores y representa un desafío constante para la salud pública (Ye et al., 2013; Kaur & Tripathi, 2021).

1.8. Epidemiología y diagnóstico de flavivirus

1.8.1. Flavivirus emergentes y reemergentes de interés regional

La emergencia y reemergencia de infecciones por flavivirus en las últimas décadas representa una amenaza creciente para la salud pública global. Factores como el cambio

climático, la urbanización y los viajes internacionales han facilitado la expansión de estos virus y sus vectores, exponiendo a miles de millones de personas en zonas endémicas (Pierson & Diamond, 2020; Hale, 2023).

Un ejemplo que refleja esta expansión es WNV, que hasta los años 90 causaba brotes esporádicos. En 1999 se introdujo en América y se convirtió rápidamente en una causa endémica de encefalitis, con millones de infecciones estimadas sólo en Estados Unidos (Hale, 2023; Goh et al., 2024). De manera similar, ZIKV reemergió tras décadas de circulación limitada con brotes masivos entre 2015 y 2016. Aunque su incidencia actualmente ha disminuido, el riesgo de reemergencia persiste (Elliot & Mattapallil, 2024).

En este contexto de reemergencia, SLEV es de particular relevancia para la región de las Américas. Fue responsable de brotes de enfermedad febril y casos de encefalitis humana en Argentina en 2002, 2005 y 2010, y en Brasil en 2004 y 2006. La primera gran epidemia fuera de Norteamérica se reportó en Córdoba, en 2005, con 47 infecciones confirmadas y 9 casos fatales (Diaz et al., 2015). Durante la temporada 2024-2025 se reportaron 16 casos de SLEV, todos en región centro (4 en Buenos Aires, 7 en Córdoba, 4 en Entre Ríos y 1 en Santa Fe) (Ministerio de Salud de la República Argentina, 2025a). Al igual que WNV, se mantiene en la naturaleza a través de una red de transmisión entre varias especies de *Culex* y diferentes especies de aves. La continua detección de su circulación en ecosistemas semiáridos de Argentina subraya la persistencia y evolución de estos virus, planteando un riesgo latente para la salud pública (Rucci et al., 2024).

DENV presenta gran incidencia en regiones tropicales y subtropicales. Sin embargo, es reportado en todo el mundo. En las Américas, reemergió entre las décadas de 1960 y 1970 y, a pesar de los esfuerzos por contenerlo, los ciclos epidémicos continúan ocurriendo (Santos et al., 2023). Hasta mediados del 2025, se reportaron en la Región de las Américas más de 3 millones de casos (incidencia acumulada de 358 casos por 100 000 habitantes). Esta cifra representa una disminución de 69% en comparación con el mismo periodo del 2024 y 10% con respecto al promedio de los últimos 5 años.

Desde la reemergencia de DENV en Argentina en 1997, las temporadas epidémicas de 2023 y 2024 fueron las de mayor magnitud registradas, acumulando más del 80% de todos los casos históricos. Aunque en la temporada actual (2024-2025) se observa un descenso en el número de casos, la transmisión viral persiste, con una circulación predominante de los serotipos DENV-1 (64.5%) y DENV-2 (35.2%) (Ministerio de Salud de la República Argentina, 2025a; 2025b).

La amenaza que representan estos flavivirus se ve magnificada por un escenario de expansión continua y opciones de control limitadas. Proyecciones conservadoras estiman que, debido a factores como el cambio climático y la urbanización, el número de personas en riesgo podría quintuplicarse para mediados de siglo. A esto se suma la alta tasa de

mutación de estos virus, que puede generar nuevas cepas con mayor virulencia o tropismo alterado (Goh et al., 2024; Nelson & Ploss, 2024). Si bien la vacunación es una estrategia eficaz, y existen vacunas licenciadas para virus como YFV, JEV y DENV, no hay vacunas disponibles para otros flavivirus de gran importancia médica, como WNV o ZIKV (Wullimann & Ljunggren, 2025). En cuanto a antivirales, a pesar de los avances en ensayos preclínicos y clínicos, no existen tratamientos aprobados para las infecciones por flavivirus, lo cual constituye un desafío relevante para la salud pública (Diani et al., 2023).

En este contexto, ante la falta de medidas de control eficaces y la posibilidad del surgimiento de nuevos brotes, se subraya la importancia del diagnóstico preciso y la vigilancia epidemiológica.

1.8.2. Métodos de diagnóstico y limitaciones

Las infecciones por flavivirus se caracterizan por un período de viremia corto, que comienza tres o cuatro días antes del inicio de la fiebre, y puede durar hasta cuatro o cinco días a partir de entonces. A menudo los primeros síntomas son indistinguibles de otras enfermedades febriles. Un diagnóstico preciso es importante tanto para la atención clínica como para el apoyo a la vigilancia. Además, considerando las implicancias para la salud pública en todo el mundo, son necesarias instalaciones de diagnóstico integrales para una detección específica y más sencilla en entornos urbanos o remotos (Chong et al., 2019).

El diagnóstico se basa en dos estrategias principales (o la combinación de ambas): la detección directa del virus o sus componentes, y la detección indirecta de la respuesta inmune del hospedador. La selección del ensayo depende tanto del momento de la toma de muestra como del propósito de la prueba (**Figura 1.10**) (Goncalves et al., 2018).

Entre los métodos directos, se encuentran el aislamiento viral y la detección del ARN viral mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. La técnica de RT-qPCR, considerada el método de referencia (*gold standard*) para el diagnóstico en la fase aguda de la infección, se destaca por su sensibilidad y especificidad, permitiendo la identificación del virus incluso con cargas virales bajas y la diferenciación entre distintos flavivirus. La principal limitación de estos métodos es la corta ventana de tiempo en la que son efectivos, ya que la viremia en la mayoría de las infecciones por flavivirus a menudo ha disminuido cuando comienzan los síntomas. Además, algunos protocolos requieren mucho tiempo y son costosos, requieren laboratorios clínicos con instrumentos sofisticados y mano de obra calificada, lo que restringe su uso en establecimientos de atención primaria de salud. Para superar este obstáculo, se están desarrollando activamente nuevas tecnologías, como la amplificación isotérmica, que pretenden facilitar el diagnóstico mediante técnicas portátiles, sencillas y de bajo costo, mejorando y manteniendo la sensibilidad y especificidad de los métodos disponibles actualmente (Endale et al., 2021; Dias et al., 2023).

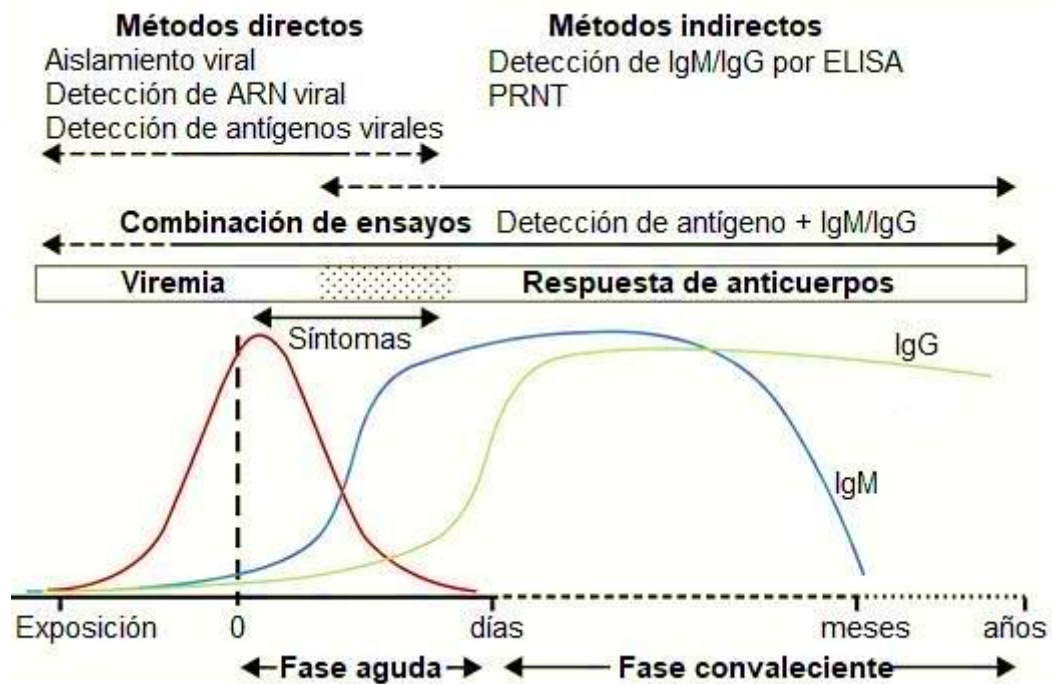


Figura 1.10. Estrategias de diagnóstico según la cinética de los marcadores virales e inmunológicos durante una infección por flavivirus. El gráfico ilustra la evolución temporal de los principales marcadores utilizados para el diagnóstico. La viremia (línea roja) aparece antes del inicio de los síntomas (día 0) y es detectable durante la fase aguda temprana. La respuesta de anticuerpos comienza con la aparición de anticuerpos IgM (línea azul), seguida por IgG (línea verde), que puede persistir de por vida. La ventana de tiempo óptima para los métodos directos es la fase virémica aguda. En el diagnóstico serológico, la detección de anticuerpos IgM es indicativa de una infección reciente y la seroconversión o un aumento de cuatro veces en el título de IgG entre muestras pareadas (aguda y convaleciente) confirma la infección. Además, los ensayos que detectan tanto antígenos como anticuerpos pueden ampliar la ventana de diagnóstico para cubrir todo el espectro de la enfermedad (Adaptado de [Goncalves et al., 2018](#)).

Una estrategia alternativa para la detección directa se basa en el antígeno NS1, secretado por las células infectadas pocas horas después de la infección viral, alcanzando un máximo de tres a cinco días después de la aparición de los síntomas y detectable en algunos casos hasta el día doce. Por este motivo, la inmunodetección de NS1 se puede utilizar para el diagnóstico temprano (incluso cuando ya no es posible utilizar métodos como la RT-qPCR) de forma rápida, simple y asequible, y su disponibilidad podría proporcionar una solución de prueba sencilla en el lugar de atención para los países en desarrollo. En particular, la detección del antígeno NS1 mediante ELISA o pruebas rápidas ha demostrado ser muy útil para el diagnóstico temprano del dengue, con alta sensibilidad y especificidad. En este caso, la cantidad de antígeno es importante ya que se correlaciona con el nivel de viremia, lo que lo convierte en un marcador potencial de las formas graves de esta enfermedad ([Fisher et al., 2023](#)).

De cualquier modo, a pesar de los beneficios de los métodos directos para un diagnóstico rápido y confiable, su eficacia se limita principalmente a los primeros días de infección y puede verse afectada por una baja carga viral en infecciones particulares, tal como se ha visto para casos de WNV o ZIKV (Musso & Desprès, 2020). Luego de este período, el diagnóstico de los flavivirus depende en gran medida de los ensayos serológicos, que detectan la presencia de anticuerpos específicos. Existe una amplia gama de ensayos serológicos para determinar los niveles de anticuerpos contra flavivirus. Estos incluyen técnicas clásicas como el Western blot (WB), el dot blot, los ensayos de inhibición de la hemaglutinación y los ensayos de inmunofluorescencia (IFI), además de los formatos de ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) que son ampliamente utilizados en laboratorios de diagnóstico. Para los ensayos de neutralización se han desarrollado versiones rápidas y de alto rendimiento. Más recientemente, han surgido nuevas plataformas como los inmunoensayos basados en microesferas (MIA) y los ensayos de flujo lateral (pruebas rápidas) (Chan et al., 2022).

El método *gold standard* para la serología de flavivirus es el Ensayo de neutralización por reducción de placas (PRNT). Este ensayo funcional mide la capacidad de los anticuerpos de un suero para neutralizar la infectividad del virus vivo, siendo la prueba más específica disponible. No obstante, el PRNT es laborioso, costoso, requiere de varios días para obtener un resultado y necesita instalaciones con un nivel de bioseguridad adecuado para manipular virus infecciosos, lo que limita su uso a laboratorios de referencia (Kabir et al., 2021).

A diferencia del PRNT, el ELISA es una de las técnicas serológicas más utilizadas en el diagnóstico de flavivirus, debido a su versatilidad, sensibilidad y su capacidad para analizar un gran número de muestras simultáneamente. Los formatos de ELISA más comunes están diseñados para detectar isotipos específicos como IgM e IgG. El ELISA de captura de IgM es particularmente útil para el diagnóstico en la fase aguda, ya que la IgM es el primer anticuerpo en aparecer. Por su parte, la detección de IgG es indicativa de una infección pasada o en fase de convalecencia en una infección primaria. Sin embargo, en una infección secundaria, los títulos de IgG aumentan de forma muy rápida y temprana. Esta cinética diferencial permite utilizar la relación de títulos IgM/IgG como una herramienta para distinguir entre infecciones primarias y secundarias. No obstante, el diagnóstico no debe basarse únicamente en la detección de IgM, ya que este anticuerpo puede persistir en la circulación durante varios meses, lo que puede dificultar la diferenciación entre una infección reciente y una pasada (Chan et al., 2022).

La principal limitación en serología es la reactividad cruzada de anticuerpos, que depende del ensayo utilizado para el diagnóstico y del nivel de exposición a otros flavivirus co-circulantes. Además, puede depender de la ruta de infección, como se ha informado para

YFV con diferentes patrones de reacción cruzada entre individuos previamente expuestos mediante vacunación o infección natural (Musso & Desprès, 2020).

En definitiva, la elección de un método diagnóstico para infecciones por flavivirus implica un compromiso fundamental. Generalmente, existe una relación inversa entre la disponibilidad técnica de un ensayo y la especificidad de su resultado (**Figura 1.11**). Los métodos directos ofrecen la máxima especificidad pero están limitados a la fase aguda de la infección. En el otro extremo, los métodos serológicos son más fáciles de implementar, pero a menudo sacrifican especificidad debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos. A partir de esto se puede concluir que no existe un único método de diagnóstico "ideal" para las infecciones por flavivirus. La elección de la prueba óptima depende fundamentalmente del contexto clínico y epidemiológico, del tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas y el propósito del análisis, ya sea para el manejo clínico de un paciente agudo, la vigilancia epidemiológica o la evaluación de vacunas (Peeling et al., 2010).

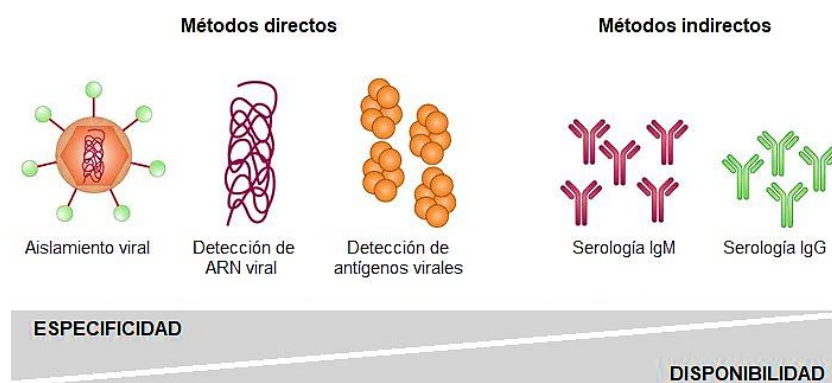


Figura 1.11. Relación entre la disponibilidad y la especificidad de los ensayos diagnósticos. El esquema ilustra el compromiso entre la ventana de detección, la especificidad y la complejidad técnica de los diferentes ensayos. Los métodos directos ofrecen la máxima especificidad pero su utilidad está restringida a la corta ventana de la fase virémica aguda. Los métodos serológicos proporcionan una ventana de detección más amplia. Sin embargo, su especificidad es a menudo menor debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos, aunque son técnicamente más accesibles (Adaptado de Peeling et al., 2010).

1.8.3. El desafío de la reactividad cruzada en el serodiagnóstico de flavivirus

La principal limitación del serodiagnóstico de flavivirus es la reactividad cruzada, un fenómeno que surge de la alta similitud antigénica entre las proteínas virales. La proteína E, principal blanco de la respuesta de anticuerpos, es el antígeno más utilizado en los inmunoensayos comerciales. Sin embargo, su uso es problemático debido a su similitud aminoacídica, la cual puede alcanzar un 70-80% entre virus del mismo serocomplejo y se mantiene en un 40-50% entre serocomplejos diferentes. Como resultado, los anticuerpos generados durante una infección o vacunación a menudo reaccionan de forma cruzada,

llevando a resultados falsos positivos y a una clasificación errónea del agente causal (Cleton et al., 2015; Chan et al., 2022). La co-circulación de múltiples arbovirus complica aún más este escenario. En las mismas regiones endémicas no solo coexisten diferentes flavivirus, sino también alfavirus como chikungunya, todos causando síndromes febriles agudos difíciles de diferenciar (Kerkhof et al., 2020).

Un diagnóstico serológico que no pueda diferenciar de manera fiable entre estas infecciones no solo complica la vigilancia epidemiológica, sino que también puede afectar negativamente el manejo clínico del paciente. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos antígenos que ofrezcan una mayor especificidad sigue siendo una necesidad crítica en la salud pública. Si bien es probable que ningún antígeno único pueda resolver por completo la complejidad del serodiagnóstico en regiones hiperendémicas, el desarrollo de nuevas herramientas es fundamental. El futuro del diagnóstico de flavivirus probablemente radique en estrategias combinadas, donde antígenos altamente específicos puedan complementar las pruebas existentes para lograr una clasificación inequívoca (Fischer et al., 2021).

1.8.4. Nuevos métodos de diagnóstico serológico con proteínas NS como antígeno

Para superar las limitaciones de los antígenos estructurales, diversos estudios han sugerido que las proteínas NS podrían ser blancos más específicos de especie, ofreciendo una vía prometedora para el desarrollo de ensayos serológicos más precisos (Wong et al., 2017). La investigación se ha centrado principalmente en el uso de antígenos alternativos como la proteína NS1. Aunque los ensayos basados en NS1 a menudo ofrecen una mejor discriminación que los basados en la proteína E, estudios recientes han demostrado que una reactividad cruzada significativa persiste, por ejemplo, entre DENV y ZIKV (Endale et al., 2021; Frazer & Norton, 2024).

En este contexto, la proteína NS5 podría ser un candidato muy prometedor para mejorar la especificidad del serodiagnóstico, con varios estudios validando experimentalmente este potencial para diferentes flavivirus de importancia médica.

Para WNV, un inmunoensayo basado en NS5 demostró ser capaz de discriminar de manera fiable entre infecciones por WNV, DENV y SLEV. Un hallazgo crucial de este estudio fue que el ensayo podía diferenciar entre una infección natural por WNV y la inmunidad generada por la vacunación contra otros flavivirus (como YFV o JEV), una distinción difícil de lograr con otros antígenos (Wong et al., 2003).

En el caso de DENV, un ELISA desarrollado con la proteína NS5 de DENV-2 no solo demostró ser 100% específico, sino que también permitió diferenciar entre infecciones primarias y secundarias basándose en la relación de títulos IgM/IgG (Narayan et al., 2016). También se ha demostrado que la NS5 de DENV-2 reacciona fuertemente con sueros de

pacientes infectados con los cuatro serotipos, mostrando una mayor concordancia que algunos ensayos comerciales basados en NS1 y la proteína E (Zhang et al., 2019).

Para ZIKV, se ha confirmado que la respuesta de anticuerpos a NS5 es más específica que la dirigida contra la proteína E. La inclusión de NS5 en ensayos *multiplex*, junto con E y NS1, mejora significativamente la precisión del diagnóstico diferencial entre ZIKV y DENV, combinando la sensibilidad de la proteína E con la especificidad de las proteínas NS (Wong et al., 2017).

Estos estudios demuestran el valor de la proteína NS5 como un antígeno para mejorar la especificidad del serodiagnóstico de flavivirus. Su capacidad para discriminar entre infecciones por virus estrechamente relacionados, diferenciar la inmunidad natural de la vacunal en ciertos contextos, y su compatibilidad con diferentes formatos, lo posicionan como una herramienta complementaria de gran potencial.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El diagnóstico serológico de las infecciones por flavivirus se ve dificultado por la alta reactividad cruzada de los anticuerpos generados contra la proteína de envoltura (E), el antígeno más utilizado en los inmunoensayos comerciales. Esta limitación compromete la vigilancia epidemiológica y el manejo clínico en regiones donde co-circulan múltiples flavivirus. La proteína no estructural 5 (NS5), a pesar de ser la más conservada del género, presenta epítopes que podrían ser estructuralmente menos conservados entre serocomplejos en comparación con los de la proteína E, postulándose como un candidato prometedor para el desarrollo de métodos de diagnóstico más específicos. No obstante, su utilidad como antígeno diagnóstico requiere una validación rigurosa.

2.1. Hipótesis

La proteína no estructural 5 (NS5) de flavivirus de importancia regional, producida de forma recombinante en un sistema heterólogo, es un antígeno inmunogénico y de alta especificidad. Su correcta caracterización permite el desarrollo de herramientas inmunológicas y plataformas de diagnóstico serológico capaces de discriminar eficazmente entre infecciones causadas por flavivirus antigénicamente relacionados en co-circulación.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Desarrollar y validar un conjunto de herramientas inmunológicas y diagnósticas basadas en la proteína NS5 recombinante para mejorar la especificidad en la detección y diferenciación de flavivirus de relevancia epidemiológica en la región.

2.2.2. Objetivos específicos

- Producir y caracterizar NS5 recombinantes de flavivirus de importancia regional.
- Generar un panel de anticuerpos policlonales de conejo anti-NS5 y validar especificidad y aplicabilidad en técnicas inmunológicas.
- Desarrollar y estandarizar un ensayo de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG, utilizando las proteínas NS5 de SLEV y DENV-1 como antígenos.
- Realizar una validación analítica y diagnóstica del ELISA-NS5-SLEV utilizando un panel de muestras clínicas caracterizadas.
- Evaluar de forma preliminar el desempeño del ELISA-NS5-DENV-1 y explorar el perfil de reactividad cruzada entre flavivirus de un mismo serocomplejo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se detallan los materiales y procedimientos utilizados para llevar a cabo los objetivos de esta tesis. Los cultivos bacterianos fueron procesados en un flujo laminar Telstar Clase II (Modelo AV-100) e incubados según fuera necesario en estufa de cultivo (30X40, Fac) o en agitador orbital refrigerado (LOM-80-LIGHT, MRC). En todos los casos se usaron reactivos químicos de grado analítico. La composición de los buffers y soluciones de uso general se detalla en el **Anexo III**, mientras que la composición de los buffers específicos para ciertos procedimientos se describe en la sección correspondiente.

3.1. Materiales biológicos

3.1.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para este trabajo se utilizaron dos cepas de *Escherichia coli*. Todos los cultivos bacterianos se realizaron en medio Luria-Bertani (LB), incubados a 37°C. Los cultivos líquidos se mantuvieron con agitación constante (200 rpm), y los medios sólidos fueron preparados suplementando el LB con 1.5% (p/v) de agar. Para la selección de las cepas recombinantes, los medios fueron suplementados, según fuera necesario, con uno o más de los siguientes antibióticos: ampicilina (100 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL) y cloranfenicol (34 µg/mL).

Cepa de clonado. Para la propagación y el mantenimiento de los plásmidos, se utilizó la cepa *E. coli* XL1-Blue. Esta cepa es deficiente en la endonucleasa RecA, lo que mejora la estabilidad de los plásmidos recombinantes.

Cepa de expresión. La expresión de las proteínas recombinantes se llevó a cabo en la cepa *E. coli* Rosetta (DE3) pLacI. Esta cepa está diseñada para mejorar la expresión de proteínas eucariotas, ya que contiene un plásmido que codifica para ARNt de codones raros en *E. coli*. Adicionalmente, el plásmido pLacI (resistente a cloranfenicol) produce de forma constitutiva el represor Lac (LacI), el cual reprime la transcripción desde el promotor T7 *lac* en ausencia del inductor, permitiendo controlar la expresión del gen de interés.

3.1.2. Cepas virales y moldes para la amplificación de NS5

La secuencia codificante de la proteína NS5 de DENV-1, cepa Hawaii, fue amplificada a partir de ARN viral. Para ello, se extrajo el ARN total del sobrenadante de cultivo de células C6/36 infectadas, cosechado a los 4 días postinfección, proporcionado por el Laboratorio de Estrategias Antivirales del Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA. La extracción se realizó con el reactivo TRIzol™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración y pureza del ARN obtenido fueron determinadas por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 1000® (Thermo Fisher Scientific). Este ARN fue utilizado como molde para la reacción de retrotranscripción seguida de amplificación (RT-PCR).

Para la amplificación de las secuencias codificantes de NS5 de los virus restantes, se utilizaron diferentes construcciones plasmídicas como moldes. Las secuencias correspondientes a DENV-3 (cepa H87), DENV-4 (cepa H241) y ZIKV (cepa MR 766) fueron amplificadas a partir de plásmidos que contenían porciones de los respectivos genomas, los cuales fueron cedidos por el Laboratorio de Virología Molecular de la Fundación Instituto Leloir. La secuencia de NS5 de WNV se obtuvo por amplificación a partir de la construcción pWNrep-DsRed, un replicón derivado de la cepa Eg101 (Maeda et al., 2008), el cual fue amablemente cedido por el Dr. Shintaro Kobayashi (Universidad de Hokkaido, Japón).

3.1.3. Vectores de expresión

Para la expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli*, se utilizaron los vectores comerciales pET-28a(+) (Novagen), que confiere resistencia a kanamicina, y pQE-30 (Qiagen), que confiere resistencia a ampicilina. Ambos vectores permiten el clonado direccional de un inserto y dirigen la expresión de la proteína de interés fusionada a una etiqueta de seis histidinas (His₆) en su extremo N-terminal. Adicionalmente, se empleó el plásmido pET-NS5-SLEV (derivado de la cepa CbaAr-4005), previamente construido y disponible en el laboratorio.

Para los ensayos de expresión en células de mamífero, se utilizó el plásmido pcDNA-NS5-SLEV, también disponible previamente en el laboratorio.

3.2. Métodos de biología molecular

3.2.1. Purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico, empleado tanto como molde para PCR como para el aislamiento de vectores de expresión y construcciones finales, fue purificado a partir de cultivos bacterianos de 5 mL crecidos durante toda la noche. La purificación se realizó mediante columnas de centrifugación utilizando el kit comercial QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad del ADN resultante se analizó mediante espectrofotometría, utilizando el equipo NanoDrop 1000® (Thermo Fisher Scientific), considerando la absorbancia a 260 nm y las relaciones A260/280 y A260/230.

3.2.2. Amplificación de las secuencias codificantes de NS5

Las secuencias codificantes de NS5 fueron amplificadas mediante dos estrategias. Para DENV-1, cuyo material de partida era ARN viral, se utilizó el kit TransScript® One-Step

RT-PCR SuperMix (TransGen Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo con los primers DENV-1-NS5-Fwd y DENV-1-NS5-Rev (**Tabla 3.1**) bajo el siguiente programa de ciclado: un paso de retrotranscripción a 45°C por 30 min; una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos de [94°C por 30 s, 52°C por 30 s, y 72°C por 3 min]; y una extensión final a 72°C por 6 min.

Para la amplificación de las secuencias de NS5 de los demás flavivirus a partir de moldes plasmídicos, se empleó la ADN polimerasa de alta fidelidad TransTaq® High Fidelity (HiFi) PCR SuperMix (TransGen Biotech). Todas las reacciones se realizaron con un programa de ciclado estándar: 94°C por 5 min; 35 ciclos de [94°C por 30 s, T_a específica por 30 s, y 72°C por 3 min]; y una extensión final a 72°C por 6 min. La temperatura de *annealing* (T_a) para cada par de primers fue determinada empíricamente, basándose en la temperatura de *melting* (T_m) teórica de la porción de hibridación de los oligonucleótidos. Los valores de T_a específicos utilizados para cada reacción se detallan en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1

Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las secuencias de NS5

Primer	Secuencia (5'→3')	T_a (°C)
DENV-1-NS5-Fwd	ACTGCTGAGG <u>GCTAGC</u> AGAGGTACGGGGGCTCAAGG	52
DENV-1-NS5-Rev	TTAGTCACGCGG <u>CCGCTT</u> ACCAGAGTGCCCCCTTCGGGA	52
DENV-3-NS5-Fwd	GCGCATGAG <u>CTC</u> GGAACAGGGTCACAAGGTG	52
DENV-3-NS5-Rev	CAGATTA <u>AAGCTT</u> TTACCAAATGGCTCCCTCTG	52
DENV-4-NS5-Fwd	GCGCATG <u>GCTAGC</u> GGAAGTGGGACCGCAGGA	55
DENV-4-NS5-Rev	CAGATT <u>CTCGAG</u> TTACAGAACTCCTTCACTCTC	55
ZIKV-NS5-Fwd	GCGCATG <u>GCTAGC</u> GAGGTGGAACGGGAGAGAC	58
ZIKV-NS5-Rev	CAGATTTG <u>TCTCGACTT</u> ACAGCACTCCAGGTGTGGA	58
WNV-NS5-Fwd	GCGCAT <u>CATATG</u> GGTGGGGCAAAGGA	52
WNV-NS5-Rev	CAGATTTA <u>AAGCTT</u> TCTACAGTACTGTGTC	52

Nota. Las secuencias subrayadas corresponden a sitios de restricción: GCTAGC (*NheI*), GCGGCCGC (*NotI*), GAGCTC (*SacI*), AAGCTT (*HindIII*), CTCGAG (*XhoI*), GTCGAC (*Sall*) y CATATG (*NdeI*).

Todos los oligonucleótidos fueron diseñados para incorporar sitios de restricción en sus extremos 5' para facilitar el clonado direccional y fueron sintetizados comercialmente (Genbiotech).

3.2.3. Electroforesis en gel de agarosa

La integridad de los plásmidos y el resultado de las reacciones de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) (Agarosa LE, PB-L) preparados en buffer TAE. El ADN fue visualizado mediante tinción con bromuro de etidio (Sigma), añadido a la agarosa a una concentración final de 0.5 µg/mL antes de la polimerización del gel. Las muestras, mezcladas con buffer de carga Naranja G, fueron corridas a 100 V durante 40 minutos. El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó por comparación con el marcador de peso molecular 1 kpb plus (PB-L). Las imágenes de los geles fueron capturadas bajo luz ultravioleta utilizando un sistema de documentación de geles (Gel Doc EZ, Bio-Rad).

3.2.4. Purificación de los productos de amplificación

Tras la amplificación, se analizó una alícuota de cada reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa para verificar el éxito de la reacción y la especificidad del producto. En base a este resultado, el resto de la mezcla de reacción de PCR fue purificado directamente mediante columnas de centrifugación utilizando el kit comercial QIAquick® PCR Purification (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. En caso de obtenerse productos inespecíficos, el amplicón del tamaño deseado se purificó a partir del gel con el kit AccuPrep® Gel Purification (Bioneer). Finalmente, la concentración y pureza del ADN purificado fueron determinadas por espectrofotometría (NanoDrop 1000®).

3.2.5. Digestión con enzimas de restricción y ligación de ADN

Para la construcción de los plásmidos, tanto los productos de PCR purificados (insertos) como los vectores de expresión (pET-28a y pQE-30) fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes (New England Biolabs, Promega o Thermo Fisher Scientific) para generar extremos cohesivos. Las reacciones de digestión se realizaron incubando aproximadamente 1 µg de ADN con 5 unidades de enzima en el buffer recomendado por el fabricante, durante toda la noche a 37°C. En los casos que requerían una digestión doble con enzimas incompatibles, estas se realizaron de manera secuencial, con una purificación intermedia del ADN en columna (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen). Tras la digestión final, las enzimas fueron inactivadas por calor (65°C, 20 min) y los productos de ADN digeridos fueron purificados utilizando el mismo kit de columnas.

A continuación, el inserto y el vector digeridos y purificados fueron ligados utilizando la enzima T4 ADN Ligasa (Promega). Las reacciones de ligación se prepararon con una

relación molar inserto:vector de 5:1 y se incubaron a 25°C durante 2 horas, seguido de una incubación a 4°C durante toda la noche. La mezcla de ligación resultante fue utilizada directamente para la transformación de células competentes.

3.2.6. Transformación de *E. coli* y selección de clones recombinantes

Para la transformación, primero se prepararon células de *E. coli* XL1-Blue químicamente competentes. Brevemente, a partir de una colonia aislada en una placa de LB sin antibiótico, se realizó un cultivo líquido en Caldo superóptimo (SOB). En la fase logarítmica del cultivo (DO_{600} 0.4-0.6), el mismo fue cosechado por centrifugación (10 minutos a 4°C y 2500 rcf en Centrífuga Avanti J-26XP de Beckman Coulter, rotor JA-14), lavado con una solución fría de $CaCl_2$ (buffer Inoue) y finalmente resuspendido en buffer Inoue con el agregado de DMSO para su almacenamiento a -80°C.

El proceso de transformación se realizó por choque térmico. Para ello, la mezcla de ligación fue añadida a una alícuota de 100 μ L de células competentes. Se realizó una incubación en hielo durante 30 minutos, seguida de un choque térmico a 42°C por 90 segundos e inmediatamente después, una incubación en hielo por 2 minutos. Posteriormente, se añadieron 900 μ L de medio LB y las células se recuperaron por incubación a 37°C con agitación durante 40 minutos. Finalmente, para maximizar la recuperación de transformantes, la suspensión celular completa fue concentrada por centrifugación, resuspendida en 200 μ l de medio LB, y sembrada en su totalidad en una placa de LB conteniendo el antibiótico de selección apropiado. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Las colonias resultantes fueron seleccionadas para su posterior análisis y verificación.

3.2.7. Verificación de las construcciones plasmídicas

Para identificar los clones recombinantes, se realizó un *screening* de múltiples colonias para cada construcción. En el caso de los plásmidos basados en el vector pET-28a(+), se utilizó la técnica de PCR de colonia. Brevemente, se seleccionaron varias colonias de cada transformación. Cada colonia fue repicada en una nueva placa de LB realizando estrías para su posterior recuperación. Simultáneamente, una pequeña porción de la misma colonia fue resuspendida en agua ultrapura, lisada por ebullición (100°C, 10 min) y centrifugada para ser utilizada como molde en la reacción de PCR. La amplificación se realizó con los primers universales T7 Promotor y T7 Terminador, y los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa. Las colonias que generaron un amplicón del tamaño esperado fueron identificadas y, a partir de las estrías en placa, se inocularon cultivos líquidos para luego proceder a la purificación del ADN plasmídico.

Para la construcción pQE-NS5-DENV-3, el *screening* se realizó mediante análisis del perfil de restricción. El ADN plasmídico de las colonias seleccionadas fue purificado mediante el kit ya mencionado, y posteriormente digerido con la enzima *Bam*HI. Se eligió esta enzima para verificar la presencia del inserto a través del patrón de bandas generado, observado por electroforesis en gel de agarosa.

Finalmente, para asegurar la integridad de la secuencia y la correcta inserción en el marco de lectura, las construcciones finales (purificadas a partir de los clones positivos seleccionados) fueron verificadas mediante secuenciación de ADN (método Sanger), servicio proporcionado por la empresa Macrogen Inc. Los plásmidos fueron almacenados a -20°C para su posterior transformación en las células de expresión *E. coli* Rosetta.

3.3. Métodos de proteínas recombinantes

3.3.1. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*

Transformación de *E. coli* rosetta. Los plásmidos de expresión verificados fueron transformados en células *E. coli* Rosetta (DE3) pLacI, las cuales fueron previamente preparadas para ser químicamente competentes como se describió en la **Sección 3.2.6**. Tras la transformación por choque térmico, las células fueron sembradas en placas de agar LB suplementadas con los antibióticos de selección correspondientes según el plásmido de expresión (kanamicina o ampicilina), y cloranfenicol (antibiótico de selección de la cepa).

Preparación de inóculos y stocks celulares. A partir de una colonia única de cada transformación, se inoculó un precultivo de 5 mL de medio LB con los antibióticos apropiados, el cual se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación (200 rpm). Este cultivo iniciador fue utilizado para los ensayos de expresión y para la preparación de stocks celulares a largo plazo, mediante la adición de glicerol estéril (20% v/v final) y almacenamiento a -80°C.

Optimización de las condiciones de expresión. Para determinar las condiciones óptimas de expresión, se inocularon 20 mL de medio LB a partir del cultivo iniciador (en una relación 1:100) y se incubaron a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0.6. En este punto, se tomó una muestra pre-inducción (t_0) y se evaluaron dos condiciones de inducción en cultivos paralelos:

1. Adición de IPTG a una concentración final de 1 mM e incubación a 30°C con agitación durante 4 horas.
2. Adición de IPTG a una concentración final de 100 μ M e incubación a 20°C con agitación durante 16 horas (*overnight*). Se mantuvo un cultivo de control sin IPTG en las mismas condiciones.

Para el análisis, se tomaron alícuotas de cada cultivo en los puntos de tiempo correspondientes. Las alícuotas fueron normalizadas por DO_{600} para asegurar una cantidad de células equivalente, y los pellets celulares resultantes fueron resuspendidos directamente en buffer de carga Laemmli 4X (conteniendo β -mercaptoetanol) y calentados a 100°C durante 10 minutos. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE para evaluar el nivel de expresión en cada condición.

Producción a gran escala y cosecha celular. La producción a gran escala se realizó en la condición de 16 horas a 20°C . Se inocularon cultivos de 1 L y se indujo la expresión siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Al finalizar la incubación, las células fueron cosechadas por centrifugación en botellas de 250 mL a 3800 rcf durante 10 minutos a 4°C (Centrífuga Avanti J-26XP de Beckman Coulter, rotor JA-14). Los pellets celulares fueron almacenados a -20°C hasta su posterior procesamiento.

3.3.2. Lisis celular

Los pellets celulares obtenidos de los cultivos a gran escala fueron resuspendidos en 10 mL de buffer de lisis (50 mM Fosfato de Sodio pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol, 10% glicerol, 0.2% Tween 20) en presencia de DNasa I y cocktail inhibidor de proteasas (Sigma). La lisis celular se llevó a cabo mediante disrupción mecánica utilizando una Prensa de French (FA-032, Thermo Electron Corporation). Las células fueron sometidas a 3 ciclos de lisis a una presión de 1000 psi. El extracto crudo fue clarificado por centrifugación a velocidad máxima durante 15 minutos a 4°C (Centrífuga Sigma 3-18KS, rotor 12150). El sobrenadante, conteniendo la fracción proteica soluble, fue recuperado y filtrado a través de una membrana de $0.45\ \mu\text{m}$ en preparación para la cromatografía.

3.3.3. Purificación de proteínas

Las purificaciones cromatográficas se realizaron utilizando el sistema ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare), el cual permite monitorear el proceso a través de la absorbancia a 280 nm.

Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC). La fracción soluble clarificada y filtrada fue cargada a un flujo de 0.5 mL/min en una columna HisTrap FF de 1 mL (GE Healthcare), equilibrada con buffer A (50 mM Fosfato de Sodio pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol, 10% glicerol). Tras la carga de la muestra, la columna fue lavada con 10 volúmenes de columna (VC) de buffer A a un flujo de 1 mL/min para eliminar las proteínas no retenidas. A continuación, las proteínas unidas inespecíficamente fueron eluidas con un lavado de 10 VC utilizando buffer A suplementado con 50 mM de Imidazol (10% de buffer B). Finalmente, las proteínas His₆-NS5 fueron eluidas con un pulso del 100% de buffer B (50 mM Fosfato de Sodio pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM β -mercaptoetanol, 500 mM Imidazol). Se colectaron fracciones durante todo el proceso.

Cromatografía de exclusión molecular (SEC). Para la purificación de NS5-ZIKV, las fracciones de IMAC que contenían la proteína fueron agrupadas y cargadas en una columna de exclusión molecular XK 16/40 (GE Healthcare) rellena con Superdex 75 prep grade (GE Healthcare) previamente equilibrada (buffer 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM DTT). La separación se realizó a un flujo isocrático de 1 mL/min y se colectaron fracciones de 1 mL.

Diálisis y almacenamiento. Las fracciones más puras de cada proteína, obtenidas por IMAC o SEC según corresponda, fueron identificadas por SDS-PAGE. Para ello, 5 µl de cada fracción se sembraron con buffer de carga Laemmli 4X (conteniendo β-mercaptoetanol). Posteriormente, las fracciones fueron agrupadas y dializadas exhaustivamente a 4°C contra un buffer de almacenamiento (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM DTT). Las alícuotas fueron almacenadas a -20°C.

3.3.4. Análisis de proteínas

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). El análisis de las diferentes muestras proteicas (lisados celulares totales y fracciones de purificación) se realizó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida al 10%, utilizando el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). La corrida electroforética se llevó a cabo en buffer Tris-Glicina-SDS a una corriente constante de 30 mA por gel durante aproximadamente 60 minutos.

Para la visualización de las bandas, los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie R-250 durante 20 minutos con calentamiento suave, seguido de múltiples lavados con una solución de decoloración (etanol-ácido acético) hasta la aparición de bandas nítidas. El peso molecular de las proteínas fue estimado por comparación con marcadores de referencia, ya sea el Marker de Proteínas (14-94 kDa, PB-L) o el Blue Plus® Protein Ladder (14-100 kDa, TransGen Biotech).

Cuantificación. La concentración de las proteínas purificadas fue determinada mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay), utilizando BSA como estándar para generar una curva de calibración. Las muestras fueron diluidas apropiadamente para asegurar que su absorbancia cayera dentro del rango lineal de la curva. La absorbancia a 595 nm fue medida en un lector de microplacas (Epoch, Bio-Tek) y los datos fueron analizados con el software Gen5.

3.3.5. Ensayo de actividad enzimática (RdRp)

La actividad de la polimerasa NS5-SLEV se cuantificó mediante un ensayo colorimétrico basado en la detección de pirofosfato (PPi), adaptado de [Nguyen et al. \(2013\)](#). La proteína

NS5 mutante (NS5_{mut}), que contiene una sustitución de aminoácidos en el motivo E del sitio activo, fue proporcionada por el Dr. Leopoldo Gebhard (LVE-UNQ) para utilizarla como control.

La reacción de polimerización se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL conteniendo buffer de reacción (50 mM Hepes pH 8.0, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 10 mM DTT), inhibidor de RNasa, 0.15 µg de la proteína NS5 (WT o mutante), 0.5 µg del molde poli(C), y 500 µM de GTP.

Las reacciones se incubaron a 30°C durante 60 minutos. La polimerización se detuvo y el P_{Pi} acumulado fue convertido en fosfato inorgánico (Pi) mediante la adición de una pirofosfatasa termoestable (New England Biolabs) e incubación a 70°C durante 15 minutos. Finalmente, la cantidad de Pi generado fue cuantificada midiendo la absorbancia a 640 nm (lector de microplacas Epoch, Bio-Tek) tras la adición de un reactivo de detección a base de verde de malaquita y molibdato, incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Los datos fueron analizados con el software Gen5. La concentración de Pi se determinó por interpolación a partir de una curva de calibración estándar realizada con soluciones de fosfato de concentración conocida.

3.4. Métodos inmunológicos

3.4.1. Producción de sueros policlonales

Antes de comenzar con el esquema, se obtuvo una muestra de suero preinmune para ser utilizada como control. Conejos de la raza New Zealand White (2 hembras por grupo) fueron inmunizados con 250 µl de adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich) conteniendo 50 µg de proteína recombinante NS5 de DENV-3, DENV-4, ZIKV Y SLEV. Se dieron tres refuerzos con adyuvante incompleto en intervalos de entre 25 y 30 días. Todas las aplicaciones se hicieron por vía subcutánea en la región posterior del lomo del animal.

Al finalizar el esquema de inmunización, la sangre colectada se dejó coagular a temperatura ambiente. Finalmente, el suero fue clarificado por centrifugación (2000 rcf durante 15 minutos a 4°C) y el sobrenadante fue recuperado, alicuotado y almacenado a -20°C.

Todos los procedimientos con animales se realizaron con la colaboración del Lic. Marcelo Argüelles (Laboratorio de Inmunología y Virología-UNQ), en estricto cumplimiento de las normativas nacionales e internacionales para el bienestar animal, y fueron revisados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad Nacional de Quilmes (CICUAL-UNQ 001/16).

3.4.2. Western blot (WB)

Protocolo general. Tras la separación de las proteínas mediante SDS-PAGE

(descrito en la **Sección 3.3.4**), se procedió a su transferencia a una membrana de PVDF (Amersham Hybond, GE Healthcare), activada en metanol absoluto. La transferencia electroforética se realizó con un buffer Tris-Glicina en un sistema de transferencia semi-seca (Trans-Blot SD, Bio-Rad) a 25 V durante 30 minutos.

Después de la transferencia, la membrana fue bloqueada para minimizar la unión inespecífica, incubándola durante toda la noche a 4°C en una solución de bloqueo (PBS conteniendo 1% de caseína).

Tras el bloqueo, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS. Luego, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en solución de dilución (PBS-T 0.1% con 1% de caseína), durante 1 hora a 37°C con agitación suave. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno con PBS-T 0.1%. La incubación con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) se realizó en las mismas condiciones que el primario. Finalmente, tras una serie de tres lavados finales, la detección de las bandas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia mejorada (ECL) utilizando el reactivo Bio-Lumina (PB-L). La señal quimioluminiscente fue capturada en placas radiográficas (Medical X-ray film, AGFA) utilizando un casete de autorradiografía (Hypercassette™, GE-Amersham). Las membranas se tiñeron con una solución de Amido Black a fin de visualizar la carga total de proteínas. El peso molecular de las proteínas detectadas se estimó por comparación con el marcador pre-teñido Precision Plus™ Protein Dual Color Standards (10–250 kDa, Bio-Rad).

Confirmación de la identidad de la proteína NS5-SLEV recombinante. Para verificar la presencia de la etiqueta de histidina, se siguió el protocolo general con algunas modificaciones. La membrana fue transferida con 1 µg de proteína His₆-NS5-SLEV purificada, 1 µg de BSA como control negativo y 1 µg de NS1-SLEV-His₆ (expresada y purificada por el Dr. Matías Lorch durante su tesis realizada en LVE-UNQ) como control positivo. Luego del bloqueo, la membrana fue incubada durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo de ratón anti-His₆ (BioLegend) a una dilución de 1:500. El anticuerpo secundario fue anti-ratón-HRP (dilución 1:2000) (Santa Cruz Biotechnology).

Caracterización de sueros policlonales de conejo. Para determinar la especificidad del suero anti-NS5-SLEV, este fue utilizado como anticuerpo primario a una dilución de 1:1000. La membrana contenía 1 µg de NS5-SLEV, además de lisado de *E. coli* transformada con el vector vacío (cultivo inducido) y 1 µg de NS1-His₆ como controles negativos. El anticuerpo secundario (1:2000) fue anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Sigma). También se evaluó la sensibilidad de la detección con cantidades decrecientes de la proteína NS5-SLEV, desde 1.5 µg hasta aproximadamente 5 ng (diluciones seriadas 1:2).

Detección de NS5 nativa en células infectadas. Para detectar la proteína viral en un contexto biológico, se analizaron 50 µL de lisados de células C6/36 infectadas con SLEV

(amablemente cedidos por la Dra. María Alejandra Morales, INEVH). Las muestras fueron inactivadas por calor y preparadas con buffer de carga 4X. La membrana fue incubada con el suero anti-NS5-SLEV (dilución 1:1000) como anticuerpo primario, seguido del anticuerpo secundario anti-conejo-HRP (Sigma) a una dilución 1:2000.

Adicionalmente, se realizó en colaboración con el Laboratorio de Virología Molecular de la Fundación Instituto Leloir, un análisis comparativo de detección de NS5 y reactividad cruzada mediante Western blot. Para ello se utilizó el suero policlonal anti-NS5-DENV-4 y células A549 infectadas con DENV-2, DENV-4 y ZIKV. Los resultados se contrastaron con los obtenidos mediante inmunofluorescencia.

3.4.3. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Protocolo general. Se realizaron ensayos de ELISA indirecto en placas de 96 pocillos de alta afinidad (Greiner Bio-One). Las placas fueron sensibilizadas incubando cada pocillo con 50 μ l de la solución de antígeno en buffer carbonato-bicarbonato (pH 9.6) durante toda la noche a 4°C. Tras la sensibilización, las placas fueron lavadas cuatro veces con solución de lavado (PBS, 0.1% Tween 20, 0.3 M NaCl) y bloqueadas con una solución de caseína al 1% en PBS durante 1 hora a 37°C.

Después de tres lavados, se añadieron los sueros primarios (humanos o de conejo) a las diluciones correspondientes en solución de dilución (PBS, 0.1% Tween 20, 0.3 M NaCl, caseína 1%) y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Las placas fueron lavadas nuevamente tres veces y se añadió el anticuerpo secundario apropiado (anti-IgG humana (Abcam) o anti-IgG de conejo (Sigma), ambos conjugados a HRP) a su dilución de trabajo. Tras una incubación de 1 hora a 37°C y una serie final de tres lavados, la reacción fue revelada utilizando el sustrato TMB (Abcam) o ABTS (Kirkegaard & Perry Laboratories). La reacción fue detenida con la solución de parada correspondiente y la absorbancia fue medida a 450 nm o 405 nm, respectivamente, en un lector de microplacas (Epoch, Bio-Tek). Los datos fueron adquiridos y procesados con el software Gen5.

Caracterización antigénica de proteínas recombinantes. Para evaluar la integridad antigénica, se sensibilizaron placas con 500 ng/pocillo de proteína NS5 nativa o desnaturalizada por calor (100°C, 20 min). Se ensayaron diluciones seriadas (desde 1:50 hasta 1:1600) de sueros de pacientes con infección confirmada.

Titulación y caracterización de sueros policlonales de conejo. Para determinar el título de los sueros hiperinmunes, se sensibilizaron placas con 100 ng/pocillo del antígeno homólogo correspondiente. Se analizaron diluciones seriadas por triplicado de cada suero y de su suero preinmune. El título se definió como la inversa de la máxima dilución que arrojó una absorbancia superior a la media más dos desviaciones estándar de las réplicas del suero preinmune (dilución 1:1000). Además, para evaluar la especificidad, el suero anti-

NS5-SLEV fue ensayado a diluciones seriadas contra placas sensibilizadas con los antígenos NS5-DENV-1 y NS5-WNV. Los sueros restantes del panel se evaluaron en una dilución 1:1000 frente al antígeno NS5-SLEV.

3.4.4. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Para estudiar la localización subcelular de la proteína, se utilizaron cubreobjetos con células BHK-21 previamente transfectadas con el plásmido pcDNA-NS5-SLEV. Estos extendidos fueron preparados y cedidos por el Dr. Juan Manuel Carballada (Laboratorio de Virología, UNAHUR). Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos, seguido de una permeabilización con Triton X-100 al 0.2% durante 15 minutos. Tras bloquear con PBS conteniendo 3% de BSA durante 1 hora, las células fueron incubadas con el suero policlonal anti-NS5-SLEV (dilución 1:500 en PBS con BSA 0.2%) durante toda la noche a 4°C. La detección se realizó con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Cy3 (Invitrogen, dilución 1:1000 PBS con BSA 0.2%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. Los cubreobjetos fueron montados con ProLong™ Gold Antifade Mountant (Invitrogen) y las imágenes fueron capturadas con el equipo Cytation 5 (BioTek).

3.5. Desarrollo de un ELISA indirecto para la detección de IgG

3.5.1. Paneles de sueros humanos y consideraciones éticas

Para la validación de los ensayos de ELISA se utilizaron dos paneles de sueros humanos anonimizados, obtenidos del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" (INEVH) perteneciente a la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS). El uso de estas muestras fue revisado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación correspondiente a dicha institución.

El panel principal, empleado para la validación del ELISA-NS5-SLEV, consistió en un total de 59 muestras: 19 sueros de pacientes con infección por SLEV confirmada por PRNT, 14 positivos para DENV, 9 para YFV, 3 para ZIKV, 1 para WNV y 13 muestras negativas. Los detalles de cada muestra se presentan en la **Tabla A.1 (Anexo II)**. Como grupo control adicional se incluyeron muestras de pacientes con infección confirmada por virus no relacionados (chikungunya, hantavirus, fiebre hemorrágica argentina), también proporcionadas por el INEVH.

Para la validación preliminar del ELISA-NS5-DENV-1, se utilizó un segundo panel reducido, detallado en la **Tabla A.2 (Anexo II)**, compuesto por 12 muestras: 10 sueros de pacientes con infección por DENV confirmada y 2 sueros de donantes sanos. Se incorporaron, además, 2 sueros positivos para DENV, 4 para SLEV, 1 para YFV y 4 controles negativos

adicionales. El detalle de estos sueros, correspondientes al panel utilizado para el ELISA-NS5-SLEV, se encuentra en la **Tabla A.1 (Anexo II)**.

3.5.2. Optimización del protocolo de ELISA

El protocolo de ELISA indirecto, basado en el descrito en la **Sección 3.4.3**, fue estandarizado para la detección de IgG humana. Se realizó una optimización secuencial utilizando la proteína NS5 de SLEV y DENV-1. Primero, se determinó la concentración óptima de antígeno para la sensibilización de la placa, evaluando la relación señal/ruido (absorbancia positiva/absorbancia negativa) para 5, 10 y 20 µg/mL de proteína (250, 500 y 1000 ng por pocillo respectivamente). A continuación, se optimizó la dilución del anticuerpo secundario anti-IgG humana-HRP (Abcam). Finalmente, se titularon sueros de pacientes para establecer las diluciones de trabajo óptimas.

Con los parámetros establecidos, se evaluaron las muestras de sueros disponibles. Además, para realizar una evaluación preliminar de la reactividad cruzada entre SLEV y WNV, se utilizó la proteína NS5-WNV como antígeno para analizar un suero de paciente con infección confirmada por SLEV, un suero de paciente con infección confirmada por WNV y un control negativo.

3.5.3. Análisis de precisión (repetibilidad y reproducibilidad)

La repetibilidad (intraensayo) se evaluó analizando 4 réplicas de tres sueros control (positivo fuerte, positivo débil, negativo) en la misma placa. La reproducibilidad (interensayo) se evaluó analizando los mismos controles por duplicado en 5 ensayos independientes realizados en días diferentes por el mismo operador.

3.6. Análisis estadístico y de datos

3.6.1. Software y pruebas de significancia

Todos los datos fueron procesados y graficados utilizando el software Microsoft Excel (versión 2019). Las comparaciones estadísticas entre las medias de dos grupos se realizaron mediante la prueba *t* de Student no pareada. Para la comparación de más de dos grupos, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Un valor de *p* inferior a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

3.6.2. Determinación de los parámetros de rendimiento del ELISA

El punto de corte (*cut-off*) del ensayo se definió como la media de las absorbancias de la población de sueros negativos más dos desviaciones estándar (DE).

La precisión (repetibilidad y reproducibilidad) se expresó como el coeficiente de variación (%CV), calculado como $(DE / Media) * 100$.

La sensibilidad, especificidad, valores predictivos (VPP y VPN) y la exactitud se calcularon a partir de una tabla de contingencia 2x2. Los intervalos de confianza del 95% (IC 95%) para estos parámetros se determinaron mediante el método exacto de Clopper-Pearson.

4. RESULTADOS

4.1. Producción y caracterización de proteínas NS5 recombinantes

4.1.1. Construcción de los plásmidos de expresión para las proteínas NS5 de flavivirus

Para construir un panel de plásmidos de expresión de la proteína NS5 de diferentes flavivirus, se obtuvieron las regiones codificantes correspondientes a DENV-1, DENV-3, DENV-4, ZIKV y WNV. La secuencia de NS5-DENV-1 se amplificó directamente a partir de ARN viral mediante RT-PCR, mientras que las secuencias de las NS5 de DENV-3, DENV-4, ZIKV y WNV se amplificaron por PCR convencional utilizando como molde plásmidos previamente caracterizados. La amplificación se confirmó por electroforesis en gel de agarosa, observándose en todos los amplicones purificados una banda de ADN del tamaño molecular esperado (~2.7 kpb) para cada gen de NS5 (**Figura 4.1A**).

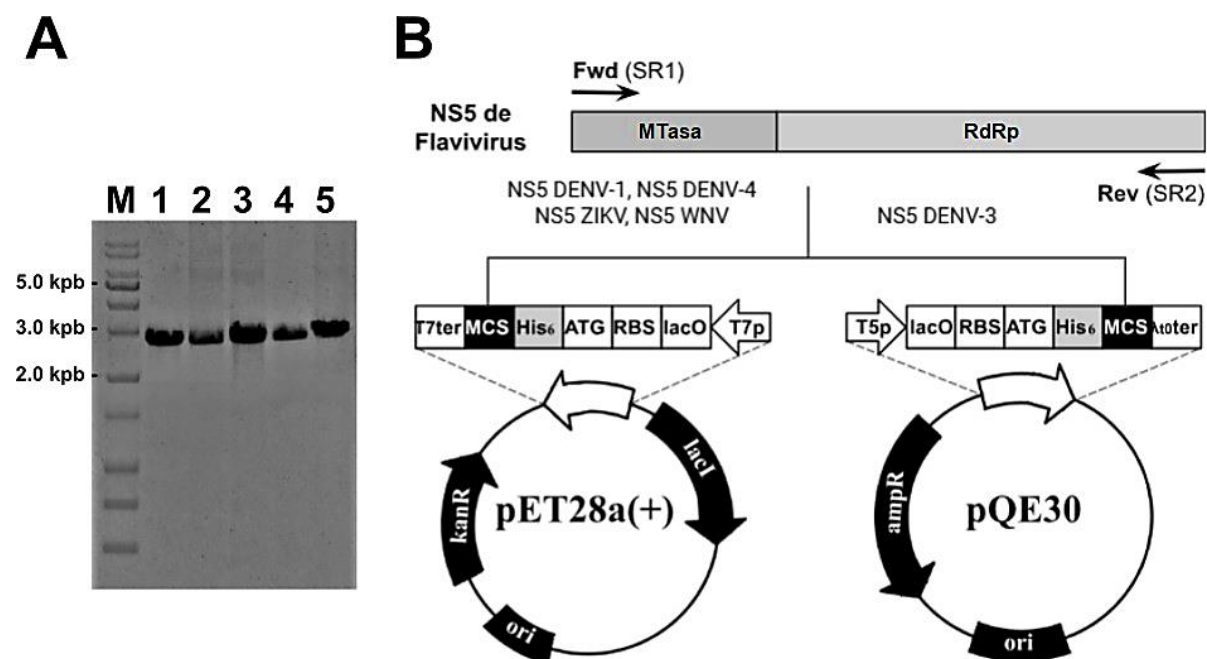


Figura 4.1. Amplificación de las secuencias codificantes de NS5 de flavivirus y estrategia de clonado. (A)

Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR correspondientes a las secuencias de NS5. M: Marcador de peso molecular (Ladder 1 kbp plus). Carril 1: NS5-DENV-1. Carril 2: NS5-DENV-3. Carril 3: NS5-DENV-4. Carril 4: NS5-ZIKV. Carril 5: NS5-WNV. **(B)** Representación esquemática de la estrategia de clonado utilizada para generar el panel de plásmidos de expresión. Los amplicones de PCR, que contienen las secuencias codificantes de NS5 flanqueadas por sitios de restricción (SR) incorporados en los primers, fueron clonados direccionalmente en el sitio de clonado múltiple (MCS) de los vectores pET28a(+) o pQE30, según se indica. El diseño genera proteínas de fusión con una etiqueta de hexahistidina (His₆) N-terminal para facilitar su purificación posterior.

Posteriormente, todos los amplicones purificados fueron clonados direccionalmente en los vectores de expresión correspondientes, tal como se observa en la estrategia de clonado esquematizada en la **Figura 4.1B**. Las regiones codificantes de NS5 de DENV-1, DENV-4, ZIKV y WNV fueron insertadas en el vector pET-28a(+), mientras que la de DENV-3 fue clonada en el vector pQE-30, generando así las construcciones finales. Junto con el plásmido pET-NS5-SLEV, disponible previamente en el laboratorio, estas nuevas construcciones conformaron el panel de vectores de expresión necesarios para llevar a cabo los estudios propuestos.

4.1.2. Expresión de las proteínas NS5 recombinantes en *E. coli*

Para analizar la expresión de las proteínas recombinantes a partir de las construcciones generadas, se transformaron células de *E. coli* Rosetta (DE3) pLacI y se indujo la expresión mediante la adición de IPTG en dos condiciones: 4 hs a 30°C y 16 hs a 20°C. Las muestras de cultivo totales, antes y después de la inducción, fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). A modo de ejemplo representativo, en la **Figura 4.2A** se muestra el análisis para la proteína NS5 de SLEV. En ambas condiciones, la inducción con IPTG resultó en la sobreexpresión de la proteína de interés, con un peso molecular aparente de ~105 kDa, lo cual es consistente con el tamaño teórico de la proteína de fusión His₆-NS5. Si bien se detectó un nivel bajo de expresión basal en el control no inducido de 16 horas (carril NI), el rendimiento total de la proteína en el cultivo inducido bajo esta condición fue mayor que en la inducción a 30°C.

A continuación, se evaluó la solubilidad de la proteína producida bajo la condición de mayor rendimiento. Los cultivos inducidos durante 16 hs a 20°C fueron lisados y clarificados por centrifugación. El análisis por SDS-PAGE de la fracción soluble resultante reveló una banda clara del tamaño esperado (**Figura 4.2B**), confirmando que la proteína se expresaba de forma soluble.

En base a estos resultados, que demuestran un alto rendimiento de expresión y la presencia de proteína soluble, se seleccionó la condición de 16 horas a 20°C como la estrategia óptima. En consecuencia, este protocolo fue escalado a cultivos de mayor volumen para la posterior purificación de las proteínas en condiciones nativas.

4.1.3. Purificación de las proteínas NS5 recombinantes

Luego de la expresión de las proteínas NS5 en la fracción soluble, se procedió a su purificación en condiciones nativas. Para ello, se empleó una cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC), la cual permite la captura selectiva de las proteínas a través de su etiqueta de hexahistidina N-terminal.

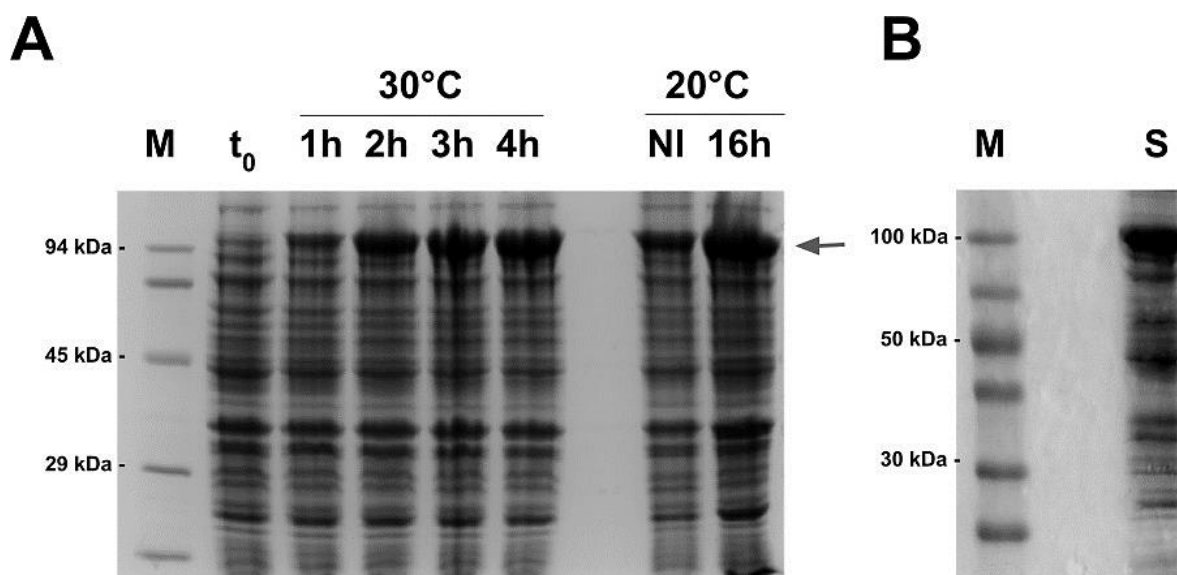


Figura 4.2. Análisis de expresión de NS5-SLEV y confirmación de la presencia de la proteína soluble. Las proteínas totales fueron separadas por SDS-PAGE al 10% y teñidas con azul de Coomassie. **(A)** Cinética y optimización de la expresión. Se analizaron muestras de cultivo total. Se cargaron alícuotas equivalentes en cada carril. La flecha indica la banda de ~105 kDa correspondiente a la proteína NS5-SLEV. M: Marcador de peso molecular (Marker de Proteínas PB-L). t_0 : Muestra antes de la inducción. 1h-4h: Muestras tomadas tras 1, 2, 3 y 4 horas de inducción (1 mM de IPTG, 30°C). NI: Control no inducido crecido durante 16hs a 20°C. 16h: Muestra inducida durante 16 horas (100 μ M IPTG, 20°C). **(B)** Confirmación de la expresión soluble de NS5-SLEV. Se muestra la fracción soluble obtenida tras la lisis celular y clarificación por centrifugación del cultivo inducido durante 16h a 20°C. M: Marcador de peso molecular (Blue Plus Protein Marker). S: Fracción soluble.

El proceso de purificación fue monitoreado por la absorbancia a 280 nm, como se muestra en el cromatograma representativo para NS5-SLEV (**Figura 4.3A**). Tras la carga del lisado soluble clarificado, la mayor parte de las proteínas de *E. coli* no se unieron a la resina y fueron eliminadas en la fracción no retenida (*flow-through*). En este punto, asegurada la interacción entre la proteína de interés y matriz de la columna, se procedió a incrementar el flujo y se realizó un lavado con buffer A suplementado con 50 mM de Imidazol (10% de buffer B) para remover proteínas unidas inespecíficamente. La proteína NS5 fue eluida de la columna con un pulso de 500 mM de Imidazol, resultando en un pico de absorbancia bien definido.

Las fracciones de cada etapa de la purificación fueron analizadas por SDS-PAGE (**Figura 4.3B**). El total inyectado en la columna (carril T) y la fracción no retenida (carril FT) mostraron un complejo perfil de proteínas bacterianas. Luego de un lavado (carril L), se observó la eliminación de las proteínas contaminantes. La fracción eluida (carril E) mostró una banda predominante correspondiente a la proteína NS5 de tamaño completo (~105 kDa) con un grado de pureza superior al 95% (estimado por densitometría) y con productos de degradación apenas detectables, por lo cual no se consideró necesaria una purificación adicional.

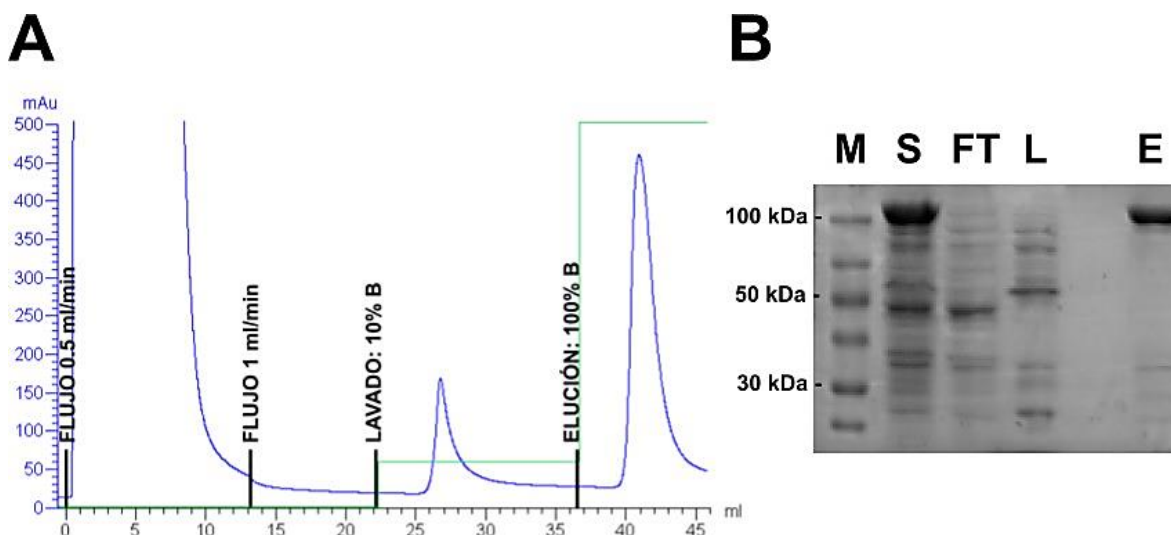


Figura 4.3. Purificación de la proteína NS5-SLEV. La proteína NS5-SLEV fue purificada mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC). **(A)** Cromatograma representativo de la purificación de NS5-SLEV. La curva azul representa la absorbancia a 280 nm (mAu), indicando la concentración de proteínas. En verde se indican los cambios en la concentración de buffer B al momento del lavado (10% de buffer B) y elución (100% de buffer B). El eje X indica el volumen de elución (mL). **(B)** Análisis por SDS-PAGE al 10% de las fracciones obtenidas durante la purificación. Las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie. M: Marcador de peso molecular (Blue Plus Protein Ladder). S: Fracción soluble cargada en la columna. FT: Fracción no retenida (*flow-through*). L: Fracción de lavado con 10% de buffer B. E: Fracción de elución.

En contraste, la purificación de NS5-ZIKV por IMAC reveló una degradación proteolítica severa. Aunque la proteína de tamaño completo (~105 kDa) fue capturada, una proporción mayoritaria del material eluido correspondía a un producto de degradación co-purificado de ~35 kDa (**Figura 4.4A**). Con el objetivo de enriquecer la muestra en la proteína NS5-ZIKV de tamaño completo, las fracciones eluidas fueron agrupadas y sometidas a un segundo paso de cromatografía de exclusión molecular (SEC). El cromatograma resultante mostró dos picos principales de elución (**Figura 4.4B**). El análisis por SDS-PAGE de las fracciones correspondientes a cada pico se muestra en la **Figura 4.4C**. El primer pico, que eluyó a un volumen menor (indicativo de un mayor tamaño molecular), contenía la proteína NS5 de tamaño completo (~105 kDa). En estas fracciones iniciales, la proporción de la proteína íntegra fue mayoritaria. Sin embargo, aún presentaban bandas de degradación adicionales. El segundo pico, que eluyó a un volumen mayor, correspondía principalmente al producto de degradación de ~35 kDa. A pesar de que se logró resolver la NS5 de tamaño completo del fragmento de degradación, el rendimiento final de NS5-ZIKV íntegra fue considerablemente bajo, como consecuencia de la extensa degradación proteolítica ocurrida en las etapas previas y durante la SEC.

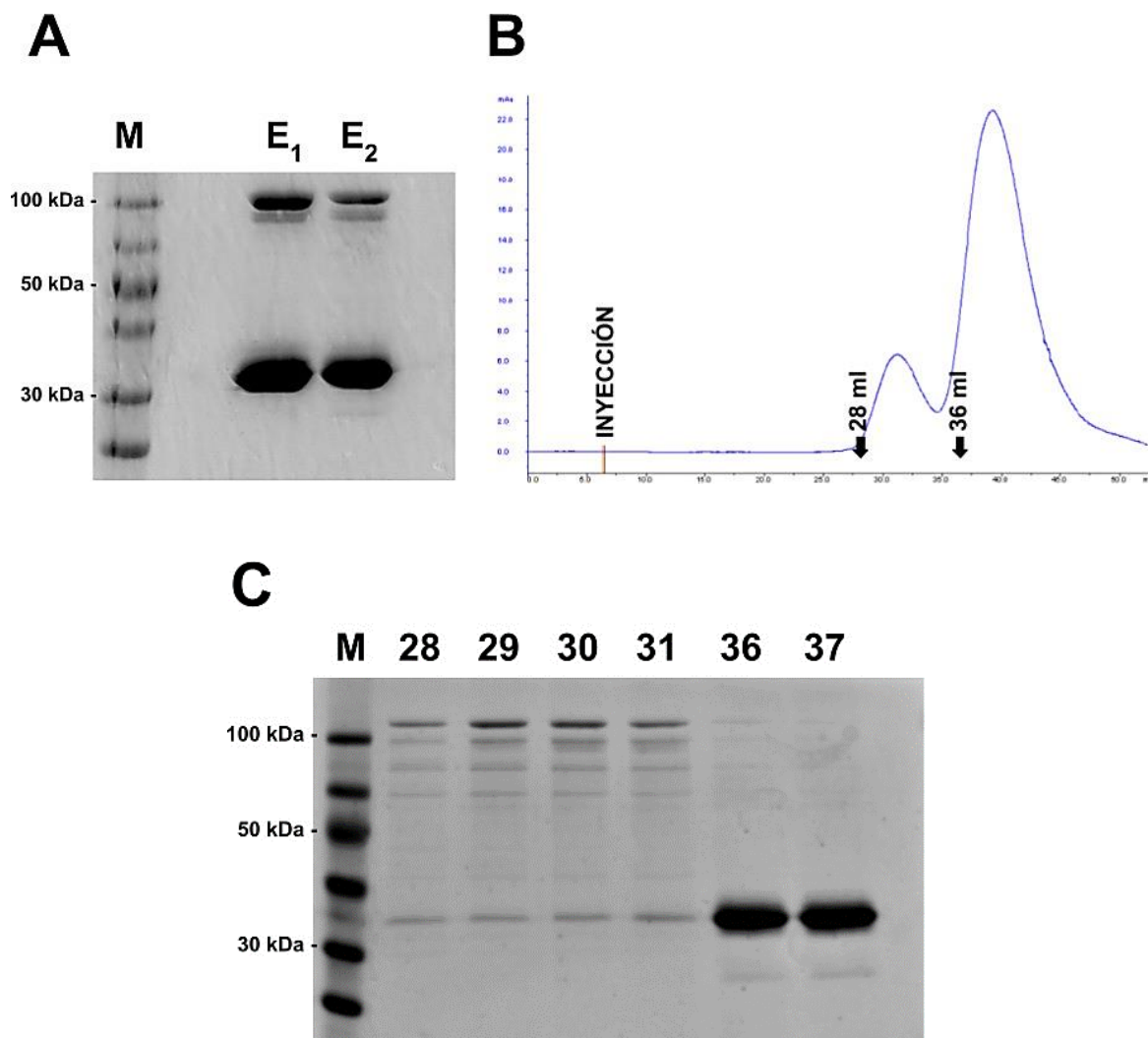


Figura 4.4. Purificación en dos pasos de la proteína NS5-ZIKV. La proteína fue purificada mediante una estrategia secuencial de IMAC seguida de SEC. **(A)** Análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las fracciones eluidas (E_1 y E_2) tras el primer paso de purificación por IMAC. Se observa la proteína de tamaño completo (~105 kDa) junto con un producto de degradación de ~35 kDa. M: Marcador de peso molecular (Blue Plus Protein Ladder). **(B)** Cromatograma de la purificación por cromatografía de exclusión molecular (SEC) de la muestra obtenida en (A). La elución muestra dos picos principales a volúmenes de retención de ~28 mL y ~36 mL. **(C)** Análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las fracciones seleccionadas del cromatograma de SEC. Los números de los carriles corresponden a los volúmenes de elución en mL. Se confirma que el primer pico (fracciones 28-31) contiene mayor proporción de la proteína NS5 de tamaño completo, mientras que el segundo pico (fracciones 36-37) corresponde al producto de degradación. M: Marcador de peso molecular (Blue Plus Protein Ladder).

Las purificaciones de NS5-DENV-1 y NS5-WNV presentaron un escenario de degradación moderada. A diferencia de NS5-ZIKV, durante la elución de la columna de IMAC se observó un fraccionamiento parcial entre la proteína de tamaño completo y sus productos de degradación. Como se muestra en la **Figura 4.5**, las fracciones iniciales de la elución (E_1), de menor concentración, contenían una banda predominante de NS5 íntegra (~105 kDa) y

productos de degradación no detectables por tinción de Coomassie. En contraste, las fracciones posteriores (E₂), revelaron la presencia de bandas de degradación minoritarias. Basado en la experiencia con NS5-ZIKV, donde la SEC resultó en un bajo rendimiento final, se optó por agrupar las fracciones donde la proporción de proteína íntegra era máxima y los contaminantes estaban por debajo del límite de detección. Las proteínas NS5 restantes del panel mostraron un comportamiento de purificación similar (datos no mostrados).

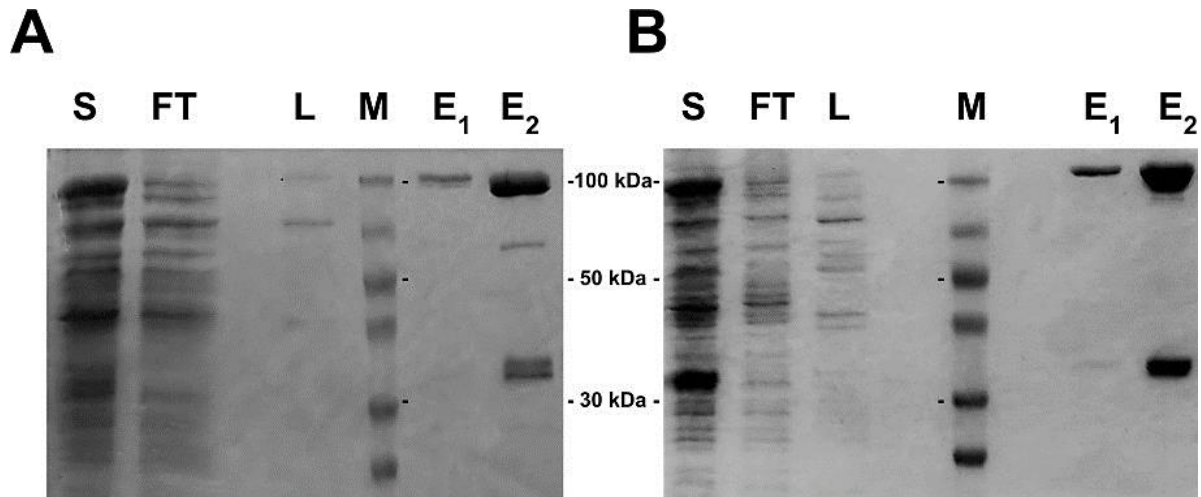


Figura 4.5. Purificación de las proteínas NS5-DENV-1 y NS5-WNV. Las proteínas fueron purificadas mediante IMAC. Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE al 10% y tinción con azul de Coomassie. **(A)** Purificación de NS5-DENV-1. **(B)** Purificación de NS5-WNV. Para ambos paneles: S: Fracción soluble cargada en la columna. FT: Fracción no retenida (*flow-through*). L: Fracción de lavado con 10% de buffer B. M: Marcador de peso molecular (Blue Plus Protein Ladder). E₁ y E₂: Fracciones de elución secuenciales.

Las proteínas purificadas fueron dializadas contra un buffer final de almacenamiento y conservadas a -20°C para su uso en ensayos posteriores. La concentración proteica fue determinada por el método de Bradford. Se obtuvieron entre 2 mg y 4 mg de proteína por litro de cultivo bacteriano luego de las purificaciones por IMAC. En contraste, la proteína NS5-ZIKV que requirió un paso de purificación adicional resultó en un menor rendimiento, obteniéndose en promedio 1 mg de proteína por litro de cultivo.

4.1.4. Caracterización inmunológica, funcional y estructural de las proteínas NS5 purificadas

La identidad de la proteína NS5-SLEV fue confirmada por Western blot (WB) mediante un anticuerpo comercial específico para la etiqueta de hexahistidina (anti-His). Como se demuestra en la **Figura 4.6**, se detectó una banda del tamaño esperado. Esto valida que el producto purificado corresponde a la proteína recombinante His₆-NS5. De manera importante, este anticuerpo también reconoció la banda de ~35 kDa, lo cual corrobora que se trata del fragmento N-terminal de la proteína NS5 resultante de un evento de proteólisis.

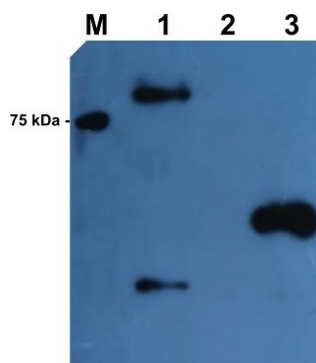


Figura 4.6. Caracterización de la identidad de la proteína NS5-SLEV purificada. Análisis de la identidad de la proteína por WB utilizando un anticuerpo anti-His₆. Se cargó 1 µg de cada proteína. M: Marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standards). Carril 1: NS5-SLEV purificada. Carril 2: Control negativo, BSA. Carril 3: Control positivo, proteína NS1-SLEV-His₆ (~41 kDa).

Como prueba de concepto para validar la funcionalidad de las proteínas purificadas, se caracterizó la actividad enzimática de NS5-SLEV. Se evaluó su actividad ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) *in vitro* mediante un ensayo colorimétrico que mide la liberación de pirofosfato. Como se muestra en la **Figura 4.7**, la proteína NS5 de tipo salvaje (WT) exhibió una actividad polimerasa robusta en presencia de un molde de poli(C) y GTP como sustrato. Esta actividad fue estrictamente dependiente del molde, ya que no se detectó señal en las reacciones que carecían de poli(C). Además, se comparó con una mutante de NS5 (NS5_{mut}), la cual presenta una sustitución en el motivo E del sitio activo. Esta proteína mutante, expresada y purificada de manera análoga a la WT, resultó ser catalíticamente inactiva en este ensayo. En conjunto, estos resultados confirman que la NS5-SLEV recombinante es una enzima funcionalmente activa.

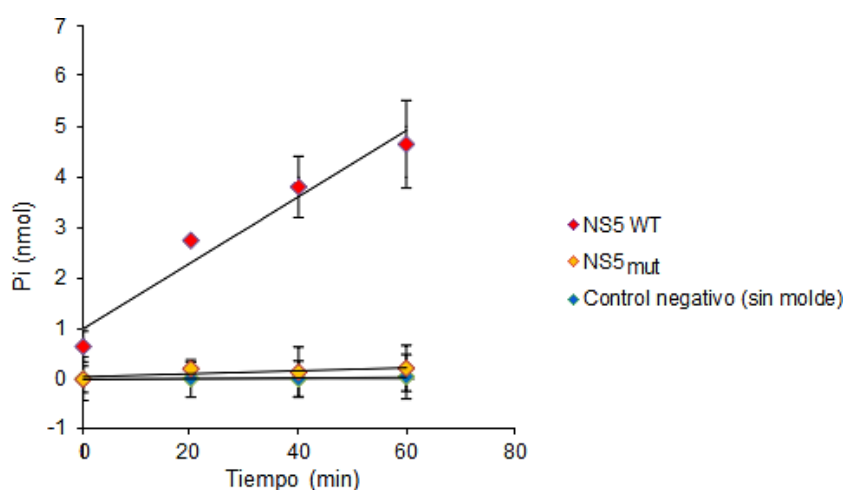


Figura 4.7. Actividad ARN polimerasa dependiente de ARN de la proteína NS5-SLEV recombinante. La actividad RdRp se midió mediante un ensayo colorimétrico basado en la detección de fosfato inorgánico (Pi) con verde de malaquita. El gráfico muestra la producción de Pi a lo largo del tiempo para diferentes condiciones de reacción. Cada punto representa la media ± la desviación estándar (DE) de tres réplicas.

Con el fin de validar las herramientas clave para estudios posteriores, se procedió a una caracterización antigénica más detallada de las proteínas NS5-SLEV y NS5-DENV-1. Para determinar si las proteínas recombinantes conservaban los determinantes inmunológicos de la proteína nativa, se evaluó su reactividad en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) frente a un suero de paciente con infección confirmada por SLEV o DENV y un suero control. Las proteínas NS5 fueron reconocidas por el suero positivo correspondiente, pero no por el suero negativo (**Figura 4.8A**). Adicionalmente, se evaluó la importancia de la estructura tridimensional para este reconocimiento. Para ambas proteínas, la reactividad del suero positivo fue dependiente de la conformación, ya que la desnaturalización térmica de los antígenos resultó en una reducción de la señal de absorbancia (**Figura 4.8B**). En conjunto, estos resultados sugieren que ambas proteínas recombinantes están correctamente plegadas y presentan epítopes antigénicos relevantes.

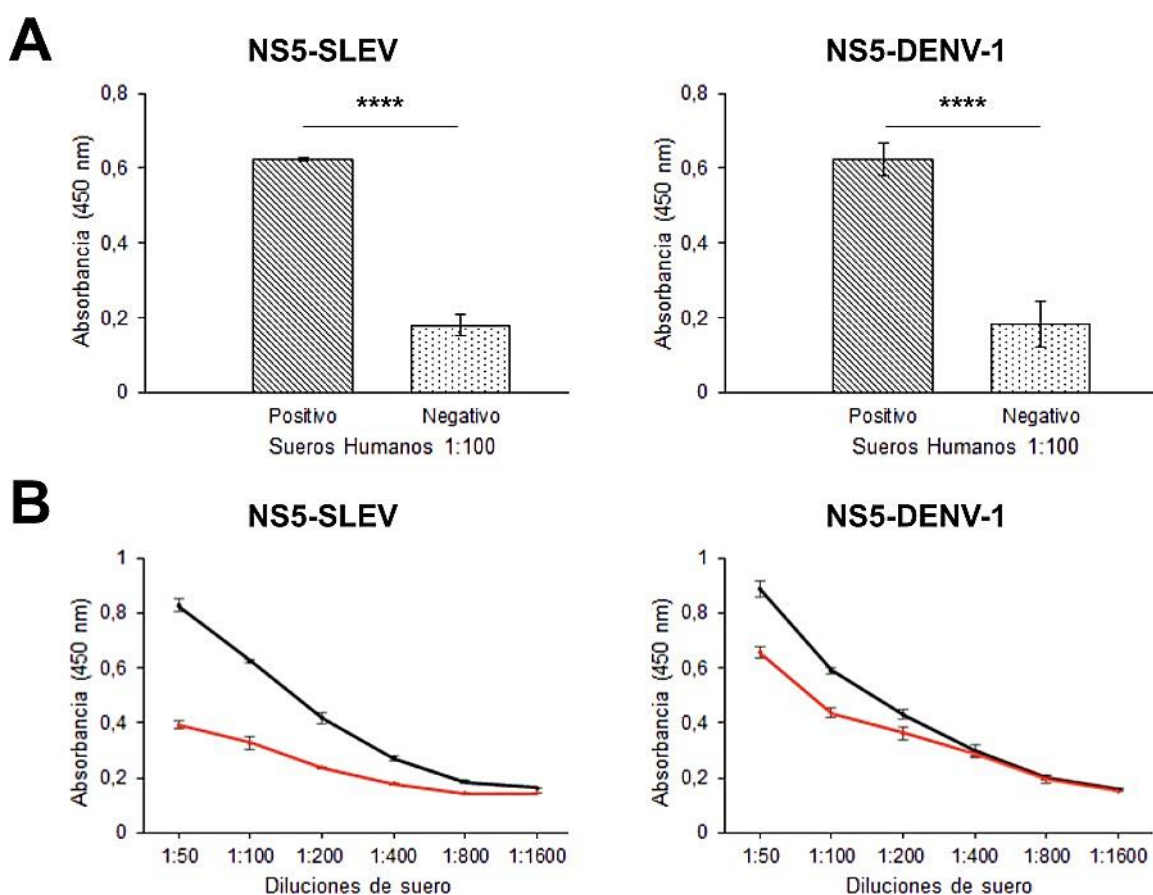


Figura 4.8. Reconocimiento antigénico de las proteínas NS5 recombinantes por sueros humanos. Se evaluó la reactividad de las proteínas NS5-SLEV y NS5-DENV-1 mediante ELISA indirecto. **(A)** Comparación de la reactividad de un suero positivo y un control negativo frente a la proteína NS5. Las barras representan la media de la absorbancia \pm la DE ($n=3$). La significancia estadística fue determinada mediante una prueba t de Student no pareada (****, $p < 0.0001$). **(B)** Análisis de la dependencia conformacional del reconocimiento antigénico. Se comparó la reactividad del suero positivo a diferentes diluciones frente a la proteína nativa (curva negra) y desnaturalizada por calor (curva roja). Cada punto representa la absorbancia media \pm la DE ($n=3$).

En resumen, los métodos descritos en esta sección permitieron la producción y purificación exitosa de un panel de proteínas NS5 recombinantes de flavivirus.

Dos de estas proteínas, NS5-SLEV y NS5-DENV-1, fueron caracterizadas con mayor detalle. Los ensayos confirmaron que ambas poseen la identidad y las propiedades antigénicas esperadas. Adicionalmente, se demostró que la proteína NS5-SLEV es una enzima catalíticamente activa. La validación de estas dos proteínas sustenta su empleo en el desarrollo de los ensayos de diagnóstico descritos en la **Sección 4.3**. Por su parte, las proteínas purificadas NS5-DENV-3, NS5-DENV-4, NS5-ZIKV y NS5-SLEV se utilizaron para la generación de anticuerpos policlonales, como se detalla en la **Sección 4.2**.

4.2. Desarrollo y validación de sueros policlonales para la detección de la proteína NS5 de flavivirus

4.2.1. Inmunización de conejos con la proteína NS5 recombinante purificada

Con el fin de generar herramientas inmunológicas para la detección específica de la proteína NS5, se utilizó la proteína NS5 recombinante de DENV-3, DENV-4, ZIKV y SLEV como antígeno para la producción de sueros policlonales. Para este propósito, se llevaron a cabo inmunizaciones en conejos de la raza New Zealand White, de los cuales se extrajeron muestras de sangre antes del inicio del protocolo para obtener suero preinmune, que serviría como control negativo. Tras la finalización del esquema de inmunización, se obtuvo el suero hiperinmune, cuya reactividad y título de anticuerpos se caracterizaron en los siguientes apartados.

4.2.2. Titulación y evaluación de la respuesta inmune mediante ELISA

Para cuantificar la respuesta de anticuerpos IgG específicos contra NS5 generada en los conejos inmunizados, se realizó un ensayo de ELISA indirecto. Se sensibilizaron placas de 96 pocillos con la proteína NS5 recombinante correspondiente y luego se incubó con diluciones seriadas del suero preinmune y del suero hiperinmune final.

A modo de ejemplo, en la **Figura 4.9** se muestra la curva de titulación para el suero anti-NS5-SLEV, donde se observa una fuerte reactividad del suero hiperinmune. A partir de la media de los valores obtenidos para el suero preinmune en dilución 1:1000 más dos veces la desviación estándar, se estableció el valor de corte (*cut-off*).

El título de anticuerpos se definió como la inversa de la máxima dilución del suero que produjo una absorbancia mayor al umbral. Todos los sueros producidos alcanzaron títulos finales elevados (mayores a 1:200 000), indicando una respuesta inmune robusta en todos los casos.

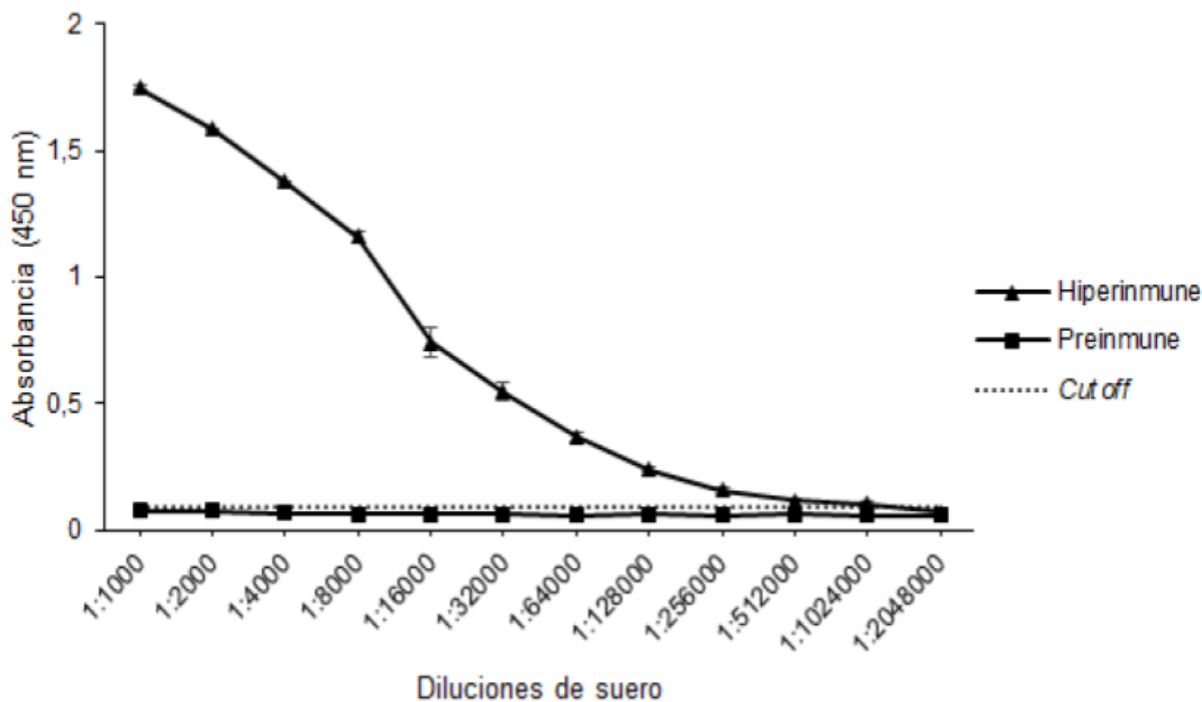


Figura 4.9. Análisis de la respuesta inmune en conejos inmunizados con la proteína NS5-SLEV. La reactividad de diluciones seriadas del suero hiperinmune y del suero preinmune fue comparada mediante ELISA indirecto. Cada punto representa la absorbancia media \pm la DE de tres réplicas. La línea de puntos horizontal representa el valor de corte (*cut-off*), calculado como la media de las réplicas del suero preinmune (dilución 1:1000) más dos veces su DE.

Estos resultados demuestran que las proteínas NS5 recombinantes purificadas son altamente inmunogénicas en conejos, capaces de inducir la producción de anticuerpos IgG específicos.

4.2.3. Caracterización de la especificidad y sensibilidad de los sueros policlonales

Se evaluó la especificidad de los sueros policlonales generados mediante dos aproximaciones complementarias. Se utilizó el WB para una caracterización detallada de un suero representativo, y un ensayo de ELISA de reactividad cruzada para analizar el perfil de reconocimiento de los sueros producidos.

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos generados, se utilizó el suero anti-NS5-SLEV en un ensayo de WB. Como se observa en la **Figura 4.10A**, el suero reconoció la banda de ~105 kDa correspondiente a la proteína NS5-SLEV purificada. Adicionalmente, el suero también mostró reactividad con la especie de ~35 kDa, lo cual evidencia que este fragmento, derivado de la proteína NS5, es inmunogénico. No se detectó ninguna reactividad cruzada contra un lisado total de *E. coli* (el sistema de expresión), ni contra una proteína recombinante con etiqueta de histidina.

A continuación, se evaluó la sensibilidad de la detección. Se realizó un WB cargando cantidades decrecientes de la proteína NS5-SLEV purificada. Como se observa en la **Figura 4.10B**, el suero fue capaz de detectar la proteína en un amplio rango de concentraciones, con un límite de detección visual estimado en aproximadamente 23 ng.

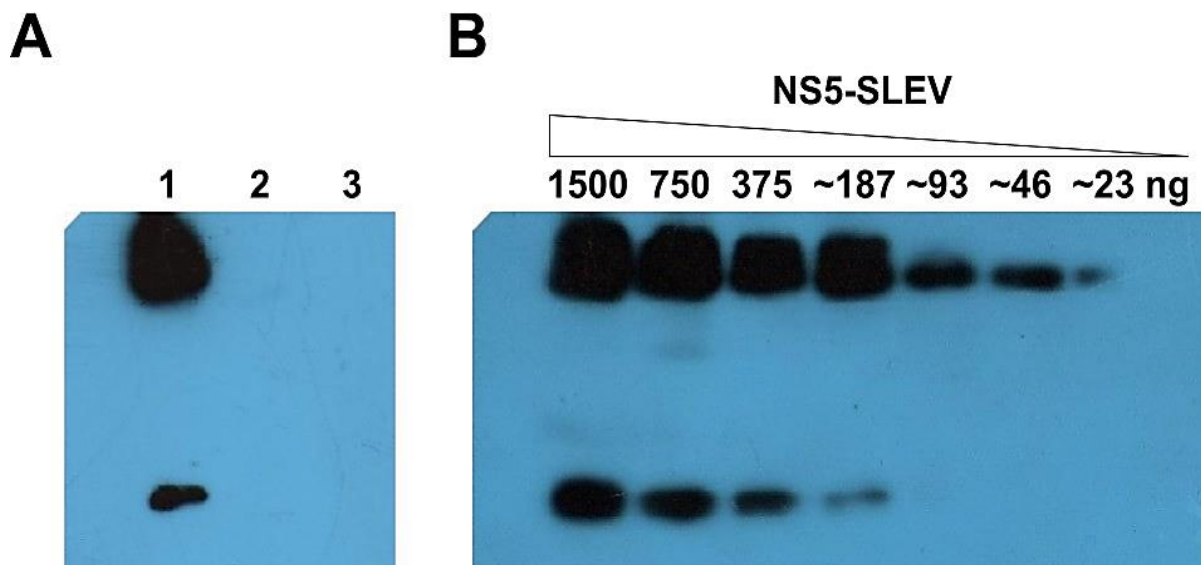


Figura 4.10. Caracterización del suero policlonal anti-NS5-SLEV por WB. (A) Análisis de especificidad. La membrana fue incubada con el suero hiperinmune (1:1000). Carril 1: NS5-SLEV purificada (1 μ g). Carril 2: Control negativo, *E. coli* Rosetta transformadas con el vector vacío e inducidas (aproximadamente 20 μ g de lisado celular total). Carril 3: Control negativo, NS1-SLEV-His₆ (1 μ g). **(B)** Análisis de la sensibilidad. Se cargaron cantidades decrecientes de la proteína NS5-SLEV purificada, desde 1.5 μ g hasta aproximadamente 5 ng (diluciones seriadas 1:2). El límite de detección visual se estimó en ~23 ng.

A fin de evaluar la reactividad cruzada, se tituló el suero anti-NS5-SLEV contra dos antígenos diferentes: la NS5 de un virus del mismo serocomplejo (NS5-WNV), y la NS5 de un serocomplejo distante (NS5-DENV-1). Estos resultados se compararon con los obtenidos frente a NS5-SLEV, donde se observó una potente respuesta con un título máximo que alcanzó un valor de 1:1 024 000. Como se observa en la **Figura 4.11A**, se detectó una reactividad cruzada significativa pero de menor título contra NS5-WNV (1:128 000), y una reactividad más baja contra NS5-DENV-1 (título de 1:16 000). Estos resultados indican que el suero anti-NS5-SLEV es específico, aunque reconoce epítopes conservados.

Adicionalmente, se confirmó que los sueros anti-DENV reaccionaron contra el antígeno NS5-DENV-1, con un título de 1:64 000 (**Figura 4.11B**).

A continuación, se evaluó la reactividad de los sueros anti-NS5-DENV y anti-NS5-ZIKV a una dilución fija (1:1000) contra el antígeno NS5-SLEV. Los resultados mostraron que ninguno de estos sueros presentó una reactividad cruzada significativa (**Figura 4.11C**).

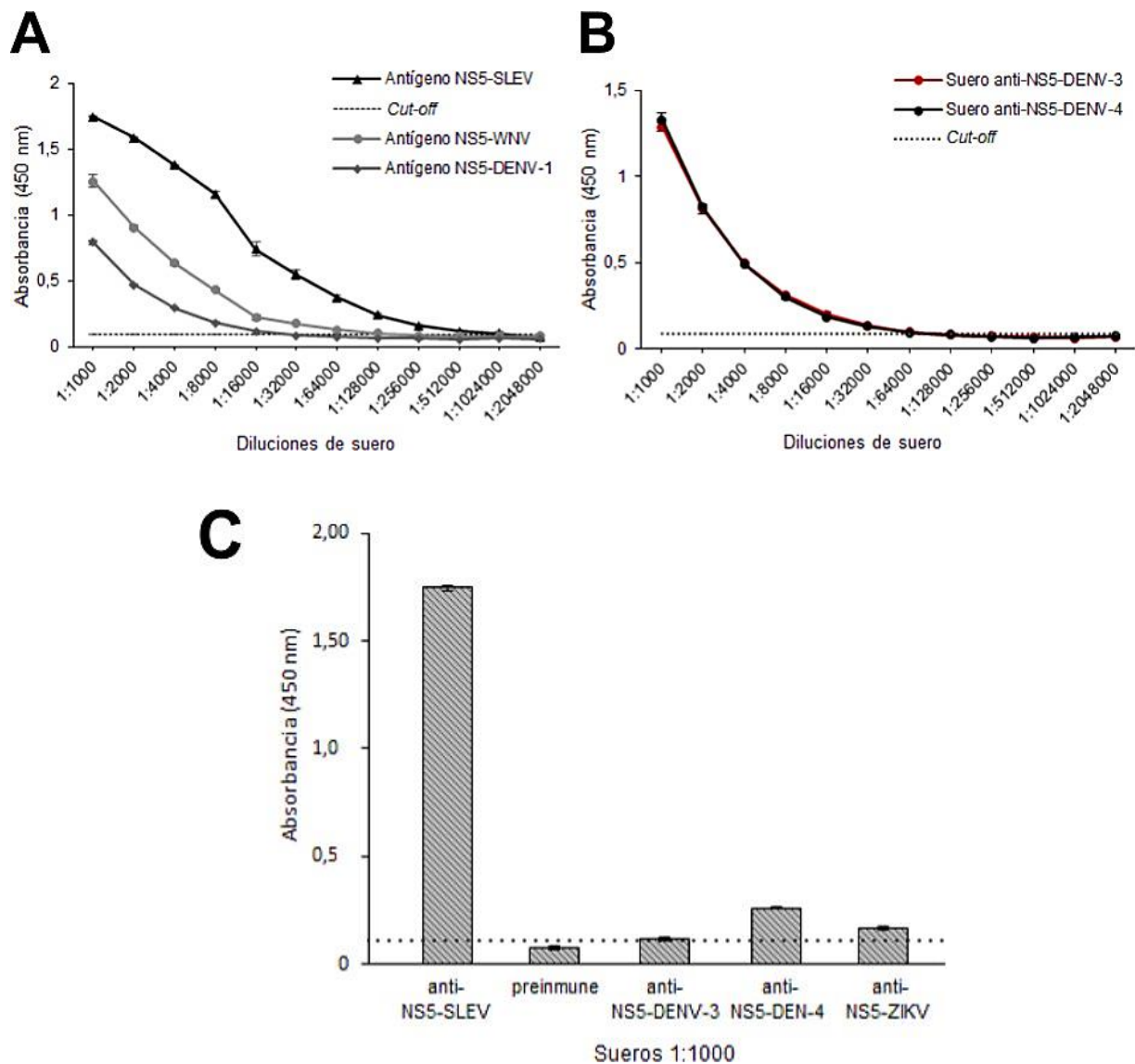


Figura 4.11. Análisis de reactividad cruzada del panel de sueros policlonales anti-NS5. (A) Curvas de titulación por ELISA del suero anti-NS5-SLEV frente a tres antígenos diferentes: NS5-SLEV, NS5-WNV NS5-DENV-1. Cada punto representa la absorbancia media \pm la DE ($n=3$). **(B)** Curvas de titulación por ELISA de los sueros anti-NS5-DENV-3 y -DENV-4 frente a NS5-DENV-1. Cada punto representa la absorbancia media \pm la DE ($n=3$). **(C)** Ensayo de reactividad cruzada contra el antígeno NS5-SLEV. Se muestra la reactividad de los diferentes sueros heterólogos (anti-NS5-DENV-3, -DENV-4 y -ZIKV) a una dilución fija de 1:1000, en comparación con el suero homólogo (anti-NS5-SLEV) y un suero preimmune (control negativo). Las barras representan la absorbancia media \pm la DE ($n=3$).

4.2.4. Aplicación de los sueros para la detección de NS5 en sistemas celulares

Para validar la aplicabilidad de los anticuerpos generados como herramientas de detección en un contexto biológico, se utilizó el suero anti-NS5-SLEV para analizar lisados de células C6/36 infectadas con el virus SLEV, mediante WB. Como se observa en la **Figura 4.12A**, el

siero anti-NS5-SLEV detectó la banda del peso molecular esperado (~105 kDa). Este resultado sugiere fuertemente que el anticuerpo es capaz de detectar la proteína NS5 producida durante la infección viral.

A continuación, se evaluó la utilidad del anticuerpo para estudiar la localización subcelular de la proteína mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Para este fin, se expresó NS5-SLEV de forma transitoria en células BHK mediante la transfección de un plásmido de expresión para mamíferos. El análisis por microscopía de fluorescencia reveló una señal intensa y de localización mayoritariamente citoplasmática en las células que expresan la proteína NS5-SLEV (**Figura 4.12B**). La especificidad del suero fue confirmada por la ausencia total de señal en las células adyacentes (presumiblemente no transfectadas), las cuales actúan como un control interno negativo en el mismo campo visual. Este resultado demuestra la alta especificidad del suero y su utilidad para estudios de localización *in situ*.

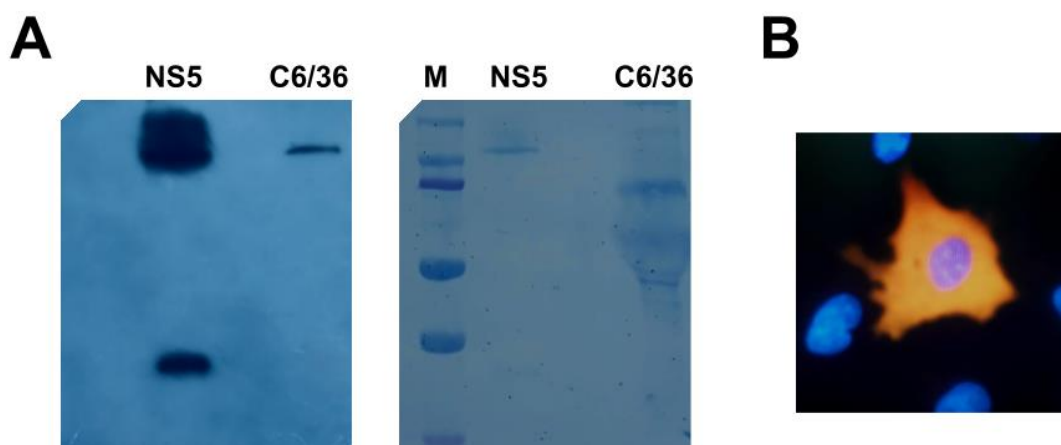


Figura 4.12. Aplicación del suero anti-NS5-SLEV para la detección de la proteína NS5 en sistemas celulares. (A) Detección de NS5 por WB en células infectadas. Se utilizó la proteína NS5-SLEV como control y se analizó un lisado de células C6/36 infectadas con el virus SLEV. La membrana fue incubada con el suero anti-NS5-SLEV (1:1000). A la izquierda de la placa radiográfica se muestra la membrana teñida con Amido Black. **(B)** Localización subcelular de la proteína NS5-SLEV recombinante por IFI. Células BHK fueron transfectadas con un plásmido de expresión para NS5-SLEV. La proteína fue detectada con el suero policlonal anti-NS5; la señal citoplasmática se muestra en naranja (secundario anti-conejo-Cy3) y los núcleos en azul (DAPI).

Adicionalmente, la aplicación del suero anti-NS5-DENV-4 fue evaluada en ensayos de WB e IFI, realizados por el grupo de investigación perteneciente al Laboratorio de Virología Molecular de la Fundación Instituto Leloir. Los resultados de este estudio demostraron que el suero reconoce de forma inespecífica la NS5 de DENV-2 y ZIKV en las condiciones desnaturizantes del WB. Sin embargo, no se observó reacción cruzada frente a las proteínas nativas en los ensayos de IFI (**Anexo I**).

En conjunto, los resultados de esta sección culminan en el desarrollo y la caracterización de un panel de sueros policlonales para las proteínas NS5 de diversos flavivirus. La afinidad,

especificidad y funcionalidad de estos sueros en aplicaciones biológicas permite establecerlos como herramientas de gran utilidad para ensayos futuros.

4.3. Diseño y optimización de un ELISA indirecto para la detección de IgG

Habiendo generado y caracterizado un panel de proteínas NS5, el siguiente objetivo fue el desarrollo de una aplicación diagnóstica. En esta sección se describe la estandarización de un ensayo de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG específicos utilizando NS5-SLEV y NS5-DENV-1 como antígeno. La elección radica en la relevancia epidemiológica de dichos virus y en el desafío que representan para el diagnóstico diferencial.

4.3.1. Optimización de la concentración de antígeno para la sensibilización

Para determinar la concentración óptima de recubrimiento, se realizaron titulaciones en paralelo para las proteínas NS5-SLEV y NS5-DENV-1. Se sensibilizaron placas con 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína (250, 500 y 1000 ng por pocillo respectivamente) y se evaluó la reactividad de sus respectivos sueros positivos (muestras de pacientes con infección confirmada) y de un suero negativo a una dilución fija (**Figura 4.13**).

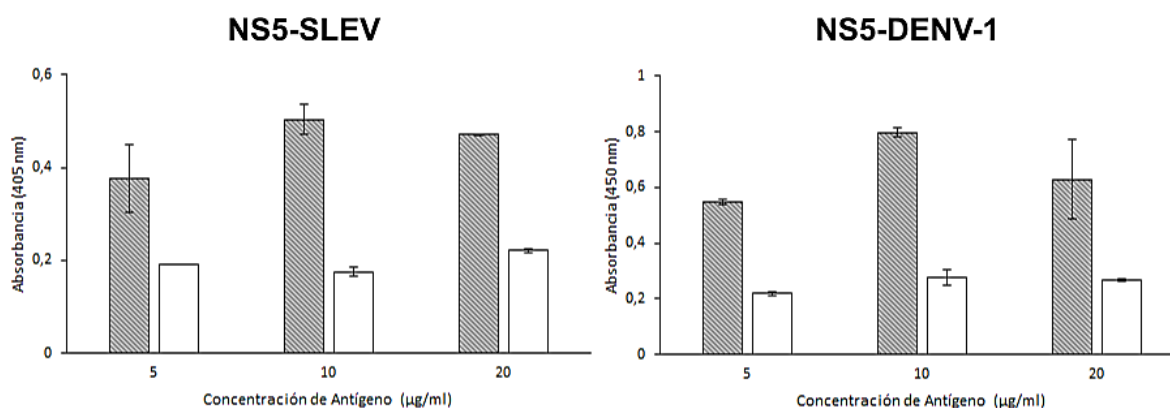


Figura 4.13. Optimización de la concentración de antígeno para la sensibilización de la placa. Se sensibilizaron placas de ELISA con 50 μl /pocillo de diferentes concentraciones de la proteína NS5. La reactividad fue evaluada con sueros de pacientes con infección confirmada por SLEV o DENV y con sueros de donantes sanos. Las barras representan la media de la absorbancia \pm la DE de tres réplicas para sueros positivos (barras grises) y sueros negativos (barras blancas). El eje X indica la concentración de la solución de recubrimiento ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Para ambos sistemas, se observó un comportamiento similar: la señal del suero positivo aumentó al pasar de 5 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pero disminuyó a la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, un

fenómeno consistente con una inhibición por exceso de antígeno. Para identificar la condición más discriminadora, se calculó la relación señal/ruido (absorbancia positiva/absorbancia negativa). En ambos casos, esta relación alcanzó su valor máximo a la concentración de 10 µg/mL. Por lo tanto, esta concentración fue seleccionada como la óptima para todos los ensayos posteriores, ya que proporciona la mayor capacidad de discriminación y evita los efectos inhibitorios.

4.3.2. Optimización de las diluciones de anticuerpos

Una vez establecida la concentración de antígeno, se procedió a evaluar las diluciones de los anticuerpos. Primero, se determinó la dilución óptima del anticuerpo secundario. Para ello, se realizó un ensayo comparativo utilizando NS5-SLEV, con un panel de sueros positivos (n=3) y negativos (n=3) a una dilución fija (1:100) y dos concentraciones del anticuerpo secundario (1:1000 y 1:2000).

Los resultados de esta optimización se muestran en la **Figura 4.14**. Aunque la absorbancia media de los sueros positivos fue ligeramente mayor con la dilución 1:1000, la señal de fondo de los sueros negativos también fue más elevada. Para determinar la condición más específica, se calculó la relación señal/ruido (S/N) promedio. La dilución 1:2000 arrojó una relación S/N superior (3.06) en comparación con la dilución 1:1000 (2.68). Esta mejora en la discriminación fue consistente a través de un rango de sueros positivos débiles, moderados y fuertes. Un comportamiento análogo fue observado para el ELISA de NS5-DENV-1 (datos no mostrados).

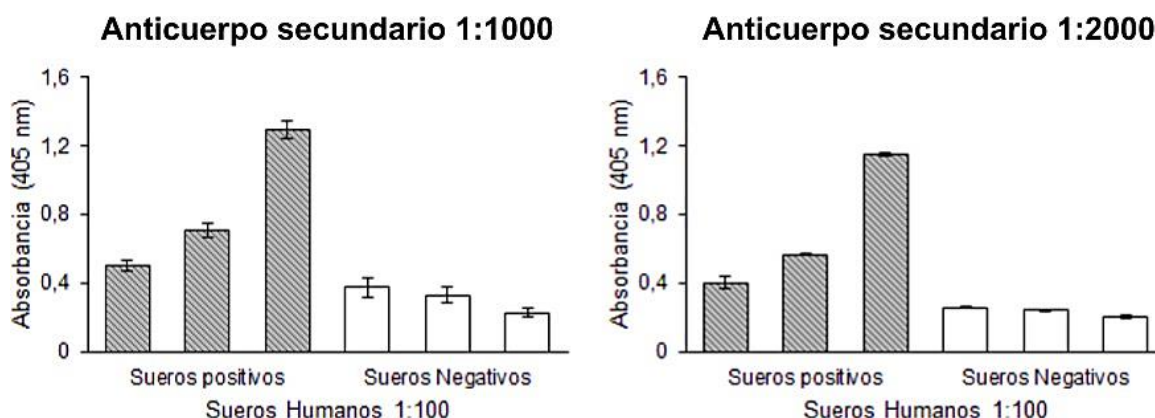


Figura 4.14. Optimización de la dilución del anticuerpo secundario para el ELISA-NS5-SLEV. Se ensayaron dos diluciones del anticuerpo secundario (1:1000 y 1:2000) utilizando una concentración fija de antígeno (10 µg/mL) y de sueros primarios (1:100). El gráfico muestra la reactividad de tres sueros positivos y tres sueros negativos. Las barras representan la absorbancia media ± la DE de tres réplicas.

En base a este análisis, se seleccionó la dilución 1:2000 como la condición óptima para el anticuerpo secundario, ya que proporciona la mejor capacidad de discriminación entre muestras positivas y negativas.

Posteriormente, utilizando las condiciones de antígeno y anticuerpo secundario previamente optimizadas, se procedió a titular los sueros de pacientes para cada sistema de ELISA. El valor de corte para cada ensayo se estableció independientemente, calculado como la absorbancia media de los negativos más dos veces la desviación estándar, resultando en un valor de 0.33 para el ELISA-NS5-SLEV y 0.35 para el ELISA-NS5-DENV-1. Luego se realizaron diluciones para un panel de sueros positivos para cada virus. A modo de ejemplo representativo, en la **Figura 4.15** se muestra la curva de titulación para dos sueros de SLEV y dos de DENV-1.

Los títulos de los sueros, definidos como la máxima dilución por encima del umbral, variaron entre 1:200 y 1:400.

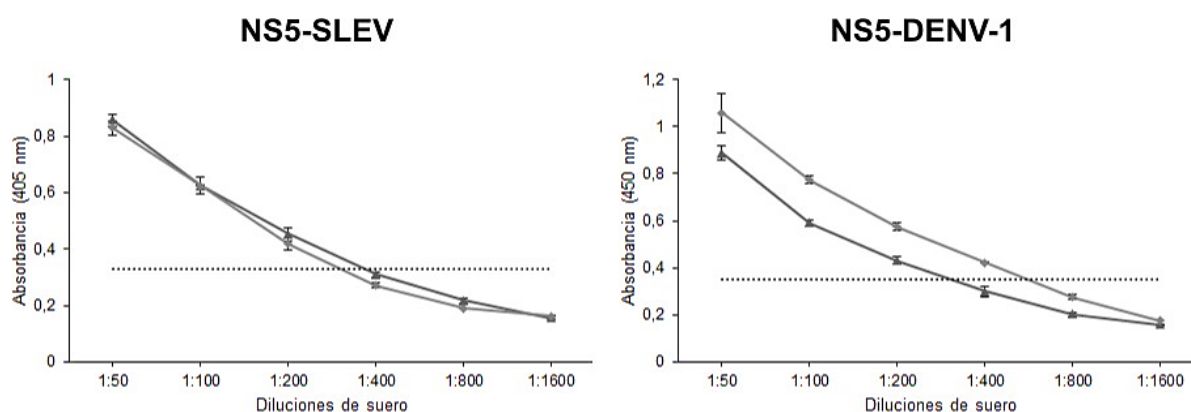


Figura 4.15. Titulación de sueros de pacientes para la estandarización de los ensayos ELISA. Se realizaron curvas de dilución seriada para sueros de pacientes representativos utilizando las condiciones de ensayo optimizadas. Cada punto representa la absorbancia media \pm la DE de tres réplicas. Las líneas de puntos horizontales indican los valores de corte (*cut-off*) específicos para cada ensayo, calculados como la media de las réplicas de sueros negativos (dilución 1:100) más dos veces su DE.

En base a estas curvas de titulación, se procedió a seleccionar una dilución de trabajo única para los ensayos de validación. Aunque las diluciones más bajas (1:50) proporcionaron la máxima señal, se seleccionó una dilución de 1:100 como la condición de trabajo óptima para ambos sistemas. Esta dilución asegura la detección robusta de las muestras de baja avidéz, manteniendo al mismo tiempo un rango dinámico adecuado para las muestras de alta avidéz, evitando la posible saturación de la señal al analizar sueros de pacientes con títulos de anticuerpos muy elevados. Además, representa el mejor compromiso entre la obtención de una señal robusta y la conservación de la muestra.

4.3.3. Establecimiento de las condiciones óptimas del ensayo

Finalmente, se establecieron las condiciones restantes para el protocolo de ELISA. Basado en la experiencia previa del laboratorio con inmunoensayos similares y en protocolos estandarizados, se determinó que el uso de caseína al 1% en PBS-T como buffer de bloqueo durante 1 hora a 37°C era eficaz para minimizar la unión inespecífica.

Del mismo modo, se establecieron las condiciones de incubación, siendo a 4°C durante toda la noche para la sensibilización del antígeno, y de 2 horas y 1 hora para la incubación con los sueros primarios y con el anticuerpo secundario, respectivamente, ambos a 37°C. Estas condiciones demostraron proporcionar resultados robustos y reproducibles y, por lo tanto, fueron adoptadas como el protocolo final.

En conjunto, los experimentos de optimización descritos en esta sección permitieron establecer un protocolo de ELISA indirecto estandarizado. Este protocolo se empleó como base para llevar a cabo una evaluación diagnóstica del ensayo NS5-SLEV (**Sección 4.4**), seguida de un análisis preliminar del sistema NS5-DENV-1 y otros estudios de especificidad del panel (**Sección 4.5**).

4.4. Validación analítica y diagnóstica del ELISA-NS5-SLEV

A partir del protocolo de ELISA estandarizado previamente, se evaluó su rendimiento utilizando muestras clínicamente relevantes. En esta sección se describe la validación analítica y diagnóstica del ensayo de ELISA indirecto para la detección de IgG en muestras de suero utilizando la proteína NS5-SLEV como antígeno. Para este fin, se utilizó un panel de 59 sueros humanos, compuesto por 19 muestras de pacientes con infección por SLEV confirmada, 27 muestras positivas para otros flavivirus y 13 muestras negativas. La condición de cada muestra fue previamente determinada por el método de referencia, el Ensayo de neutralización por reducción de placas (PRNT), cuyos detalles se presentan en la **Tabla A.1 (Anexo II)**.

4.4.1. Determinación del punto de corte

El primer paso en la validación del ensayo fue establecer un umbral objetivo para discriminar entre muestras positivas y negativas. Para ello, se analizaron los valores de absorbancia obtenidos con el panel de 13 sueros negativos. El punto de corte se definió estadísticamente como la media de las absorbancias de esta población más dos veces su desviación estándar. Aplicando esta fórmula, se estableció un valor de *cut-off* de 0.30, el cual fue utilizado para la clasificación de todas las muestras en los análisis posteriores.

4.4.2. Validación de la precisión del ensayo

Se evaluó la precisión del ensayo ELISA-NS5-SLEV mediante el análisis de la repetibilidad (variación intraensayo) y la reproducibilidad (variación interensayo). Para ello, se analizaron tres muestras de suero (un positivo fuerte, un positivo débil y un negativo) que cubren el rango de medición del ensayo. La repetibilidad se determinó analizando cada muestra por cuadruplicado en la misma placa, mientras que la reproducibilidad se evaluó a partir de cinco ensayos independientes realizados en días diferentes.

La precisión se cuantificó calculando el coeficiente de variación (%CV) para cada condición, y los resultados se resumen en la **Tabla 4.1**. El ensayo demostró una alta precisión en todo su rango de medición. La repetibilidad resultó en %CV que no superaron el 12%. De manera similar, la reproducibilidad a lo largo de cinco días distintos fue también resultó en %CV consistentemente por debajo del 12%. Estos resultados confirman la fiabilidad y consistencia del protocolo de ELISA estandarizado.

Tabla 4.1

Precisión del ensayo ELISA-NS5-SLEV

Parámetro	N° de muestra	Media (Absorbancia 405 nm)	Desviación estándar (DE)	Coeficiente de variación (%CV)
Repetibilidad (Intraensayo)	6 (Positivo fuerte)	1.338	0.062	4.6%
	4 (Positivo débil)	0.526	0.063	12.0%
	20 (Negativo)	0.198	0.004	2.0%
Reproducibilidad (Interensayo)	6 (Positivo fuerte)	1.353	0.087	6.4%
	4 (Positivo débil)	0.590	0.049	8.3%
	20 (Negativo)	0.188	0.020	10.6%

Nota. La repetibilidad (intraensayo) se evaluó a partir de 4 réplicas analizadas en la misma placa. La reproducibilidad (interensayo) se evaluó a partir de 5 ensayos independientes realizados en días diferentes.

4.4.3. Evaluación de la especificidad analítica y reactividad cruzada

Para evaluar la especificidad analítica del ensayo y su potencial de reactividad cruzada, se comparó la reactividad media de los diferentes grupos de sueros que componen el panel. Como grupo control adicional se incluyeron muestras de pacientes con infección confirmada por virus no relacionados (chikungunya, hantavirus, fiebre hemorrágica argentina). Como se

muestra en la **Figura 4.16**, la absorbancia media del grupo de sueros de infecciones por SLEV fue significativamente mayor que la de todos los grupos restantes ($p < 0.01$, ANOVA). Es importante destacar que no se observaron diferencias significativas entre la reactividad del grupo de donantes sanos y los grupos de pacientes con otras infecciones virales (tanto flavivirales como no flavivirales), lo que indica una alta especificidad analítica.

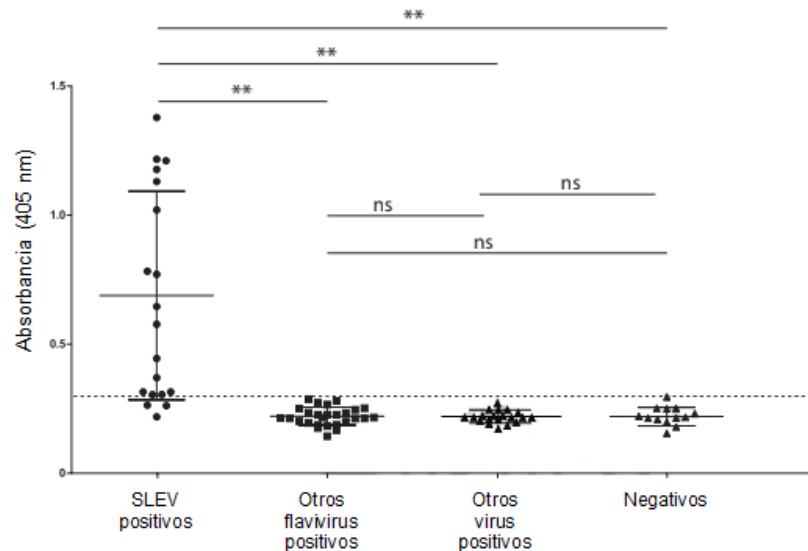


Figura 4.16. Análisis de la especificidad del ELISA-NS5-SLEV. Se analizaron muestras de suero de pacientes. Cada punto representa una muestra individual. Las líneas y las barras de error representan la media \pm el error estándar de la media para cada grupo (Análisis ANOVA: **, $p < 0.01$; ns, no significativo).

4.4.4. Clasificación de muestras individuales y rendimiento diagnóstico

A continuación, se analizó la clasificación de cada una de las 59 muestras del panel para determinar el rendimiento diagnóstico del ensayo. Utilizando el valor de corte de 0.30, se graficó el valor de absorbancia para cada suero individual. Como se observa en la **Figura 4.17**, 16 de las 19 muestras de pacientes con SLEV y la totalidad de las muestras negativas fueron clasificadas correctamente de acuerdo a los resultados obtenidos a través de PRNT.

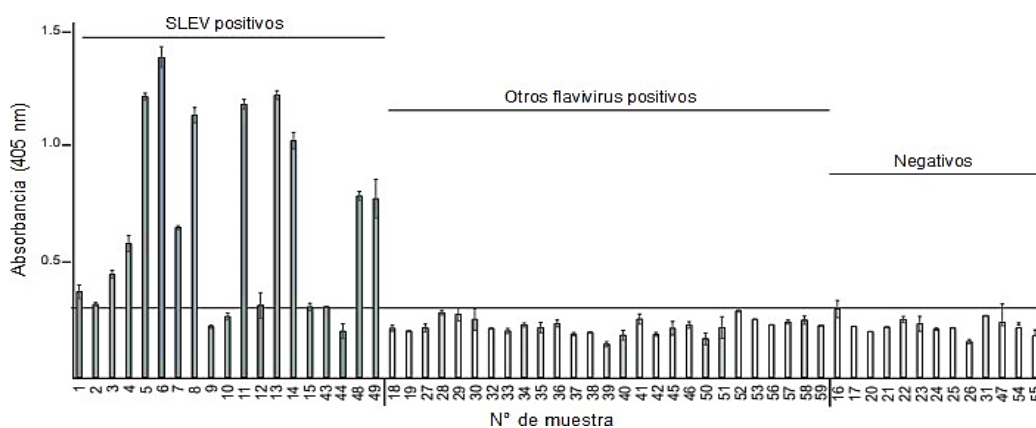


Figura 4.17. Clasificación de muestras de suero individuales por el ELISA-NS5-SLEV. El gráfico muestra los valores de absorbancia para cada una de las 59 muestras del panel de validación. Cada barra representa la media de las réplicas \pm su DE. La línea horizontal en 0.30 representa el valor de corte del ensayo.

A partir de esta clasificación, se calcularon los parámetros de rendimiento diagnóstico, los cuales se resumen en la **Tabla 4.2**.

Tabla 4.2

Parámetros de rendimiento diagnóstico del ensayo ELISA-NS5-SLEV

Parámetro de rendimiento	Valor (%) (IC 95%)
Sensibilidad	84.2 (60.4 - 96.6)
Especificidad	100 (91.2 - 100)
Valor Predictivo Positivo (VPP)	100 (79.4 - 100)
Valor Predictivo Negativo (VPN)	93.0 (80.9 - 98.5)
Exactitud	94.9 (85.8 - 98.9)

Nota. IC 95%: Intervalo de Confianza del 95%, calculado por el método de Clopper-Pearson. Los datos brutos (VP, FN, VN, FP) fueron 16, 3, 40 y 0, respectivamente, sobre un total de 59 muestras.

En resumen, la validación analítica y diagnóstica demostró que el ensayo ELISA-NS5-SLEV es altamente específico y preciso, con una sensibilidad del 84.2% y una especificidad del 100%.

4.5. Aplicaciones preliminares y estudios comparativos

4.5.1. Validación preliminar del ELISA-NS5-DENV-1

Habiendo validado el ELISA-NS5-SLEV en la sección anterior, se realizó una validación preliminar del ensayo ELISA-NS5-DENV-1 utilizando un panel reducido de sueros (**Tabla A.2, Anexo II**). El punto de corte específico para este ensayo (calculado como se describe en la **Sección 4.4.1** para el ELISA-NS5-SLEV) se estableció en 0.38. Como se muestra en la **Figura 4.18**, el ensayo fue capaz de clasificar correctamente a las 12 muestras positivas y a la totalidad de las negativas. Aunque el número limitado de controles no permite un cálculo robusto de los parámetros de rendimiento, estos resultados sugieren que el ensayo tiene potencial para el diagnóstico de DENV. El ensayo preliminar exhibió una especificidad del 100%, sin mostrar reactividad cruzada con los otros flavivirus analizados.

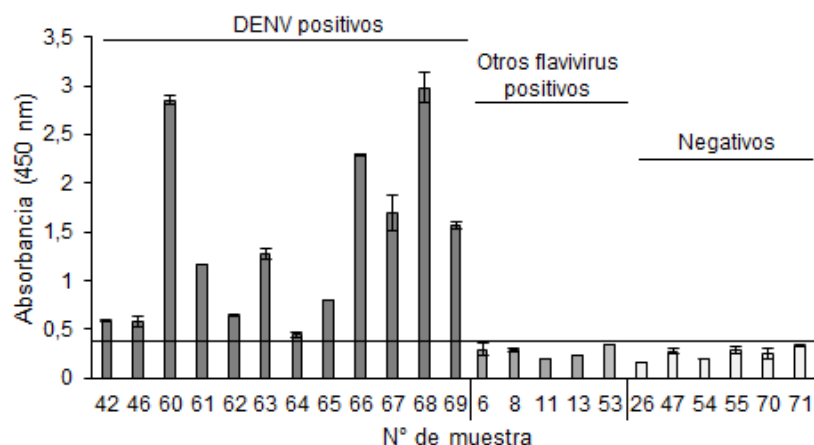


Figura 4.18. Clasificación de muestras de suero individuales por el ELISA-NS5-DENV-1. El gráfico muestra los valores de absorbancia para cada una de las 23 muestras evaluadas. Cada barra representa la absorbancia media \pm la DE (n=3). La línea horizontal en 0.38 representa el valor de corte del ensayo.

4.5.2. Evaluación de la reactividad cruzada entre SLEV y WNV

Finalmente, se investigó la relación antigénica entre las proteínas NS5 de SLEV y WNV utilizando sueros de pacientes con infección confirmada y un control negativo (**Figura 4.19**). En el ensayo que utilizaba NS5-SLEV como antígeno, el suero anti-SLEV produjo una señal elevada en comparación tanto con el suero anti-WNV ($p < 0.01$) como con el suero negativo ($p < 0.01$). Es de destacar que no se observaron diferencias significativas entre la señal generada por el suero anti-WNV y el control, indicando una alta especificidad del antígeno. Por otro lado, en el ensayo que utilizaba NS5-WNV como antígeno, el suero homólogo anti-WNV generó una señal significativamente mayor que el suero negativo ($p < 0.001$). Sin embargo, se detectó una notable reactividad cruzada, ya que el suero anti-SLEV también mostró una absorbancia significativamente superior a la del control negativo ($p < 0.01$). A pesar de esta reactividad cruzada, la señal de la reacción homóloga (anti-WNV) fue significativamente mayor que la de la reacción heteróloga (anti-SLEV) ($p < 0.01$).

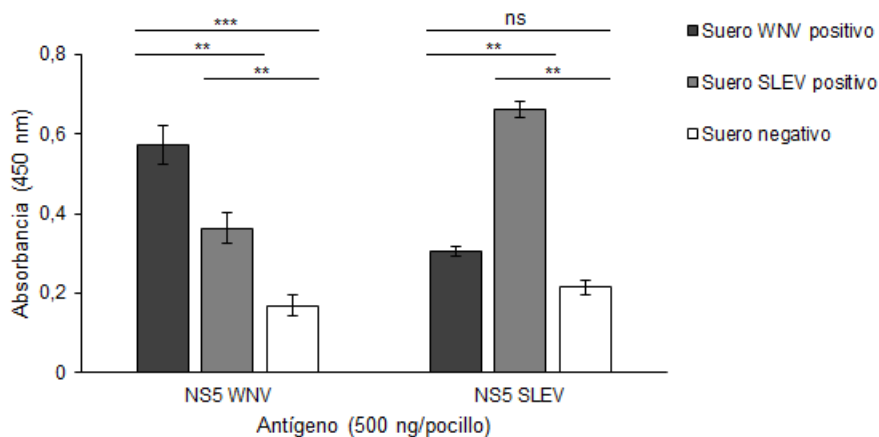


Figura 4.19. Análisis de la reactividad cruzada entre NS5 de SLEV y WNV. Se evaluó mediante ELISA la reactividad de sueros humanos positivos para ambos flavivirus y un control negativo contra el antígeno NS5-WNV y NS5-SLEV. Las barras representan la absorbancia media \pm DE (n=3) (Análisis ANOVA: ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; ns, no significativo).

En conjunto, los estudios presentados en esta sección expanden la validación de los inmunoensayos desarrollados. Se ha demostrado el potencial del ensayo ELISA-NS5-DENV-1 en una validación preliminar con un panel reducido de muestras. Los ensayos exploratorios sugieren la existencia de mayor reactividad cruzada entre los virus del serocomplejo JEV, como SLEV y WNV, sugiriendo una mayor presencia de epítopes conservados en la proteína NS5 entre estos dos virus relacionados.

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis, se desarrolló y validó con éxito un conjunto de herramientas inmunológicas y diagnósticas basadas en la proteína NS5, culminando en un ensayo de ELISA robusto y específico para el serodiagnóstico de la infección por SLEV. Este logro aborda la necesidad de contar con métodos diagnósticos que puedan diferenciar entre infecciones por flavivirus co-circulantes en la región.

5.1. La proteína NS5 recombinante como un antígeno robusto para el desarrollo de inmunoensayos

Un requisito fundamental para el desarrollo de inmunoensayos es la obtención de antígenos recombinantes de alta calidad. En este trabajo, se logró expresar y purificar un panel de proteínas NS5 de diferentes flavivirus. Un desafío recurrente en este proceso fue la degradación proteolítica, un fenómeno previamente reportado en la literatura para la NS5 de diversos flavivirus, como DENV-2 (Alves et al., 2016). De manera consistente con estos reportes, observamos una degradación significativa en la NS5 de ZIKV (**Figura 4.4A y C**) y moderada en las de DENV y WNV (**Figura 4.5A y B**), mientras que la NS5 de SLEV se mostró notablemente más estable (**Figura 4.3B**).

La optimización de las condiciones de expresión, particularmente la inducción a baja temperatura (20°C) durante un tiempo prolongado, demostró ser una estrategia eficaz para obtener la proteína soluble y reducir la degradación, un hallazgo que concuerda con estudios previos (Ackermann & Padmanabhan, 2001; Alves et al., 2016). A pesar de estas mejoras, la presencia del fragmento de ~35 kDa persistió. En el caso de NS5-ZIKV fue indispensable un segundo paso de purificación por SEC, una estrategia similar a la utilizada por otros autores. Es de notar que, incluso durante la SEC, se observó la aparición de nuevas bandas de degradación de menor intensidad, lo que subraya la inestabilidad de esta proteína. Considerando de la SEC no fue satisfactoria, para el resto de las proteínas se decidió agrupar las fracciones donde la proporción de proteína íntegra era máxima y los contaminantes estaban por debajo del límite de detección. Aunque esta estrategia implica un menor rendimiento total en comparación con agrupar todas las fracciones, permitió obtener preparaciones de NS5 con una pureza suficiente para los ensayos posteriores, evitando la pérdida sustancial de material asociada a un segundo paso cromatográfico.

El rendimiento final obtenido, de 1 a 4 mg/L de cultivo, se encuentra dentro del rango reportado para esta proteína (Wong et al., 2017).

La localización del sitio de corte proteolítico principal en la región conectora (*linker*) entre los

dominios MTasa y RdRp es un fenómeno conservado. Datos previos del grupo de trabajo (datos no publicados) y de la literatura sugieren que este corte ocurre justo después de la secuencia conservada GTR, en una región que se presume está expuesta al solvente (Malet et al., 2007). La mayor estabilidad observada para la NS5 de SLEV podría deberse a diferencias sutiles en la estructura de esta región interdominio o en las interacciones que la estabilizan. Se ha reportado que estas interacciones varían entre flavivirus, por ejemplo, en NS5 de JEV la interfase es principalmente hidrofóbica, mientras que en NS5 de DENV se estabiliza por interacciones polares y electrostáticas (Lu & Gong, 2013).

A pesar de los desafíos en su producción, la validación final de las proteínas purificadas confirmó su idoneidad como antígenos. Se demostró que la NS5-SLEV es catalíticamente activa (Figura 4.7), un indicador clave de su correcto plegamiento. Más importante aún, tanto la NS5-SLEV como la de DENV-1 fueron reconocidas robustamente por sueros de pacientes (Figura 4.8), confirmando que las proteínas recombinantes producidas en *E. coli* preservan los determinantes antigénicos relevantes durante la infección natural. Este hallazgo es fundamental para su uso en el desarrollo de los inmunoensayos descritos en las siguientes secciones.

5.2. Generación de un panel de sueros policlonales específicos como herramientas de investigación

Uno de los objetivos de este trabajo fue la generación de herramientas inmunológicas para el estudio de las proteínas NS5. Se logró producir con éxito un panel de sueros policlonales de conejo contra cuatro proteínas NS5 de flavivirus. La inmunogenicidad de los antígenos recombinantes se evidenció en los altos títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA, que alcanzaron valores de hasta 1:1 024 000. La potencia de estos sueros fue confirmada por WB, donde el suero anti-NS5-SLEV fue capaz de detectar hasta alrededor de 20 ng de proteína (Figura 4.10B).

El análisis de la reactividad cruzada reveló un perfil de especificidad a nivel de serocomplejo, un hallazgo clave para el potencial uso diagnóstico de NS5. El suero anti-NS5-SLEV, por ejemplo, reconoció a la NS5 de WNV (del mismo serocomplejo) con un título 8 veces menor, y a la de DENV-1 (de un serocomplejo distante) con un título 64 veces menor (Figura 4.11A). Inversamente, los sueros generados contra los virus de DENV y ZIKV no mostraron una reactividad cruzada significativa contra la NS5 de SLEV (Figura 4.11C). Nuestros hallazgos sobre la especificidad de los anticuerpos anti-NS5 se ven reforzados por estudios colaborativos que, aunque muestran cierta reactividad cruzada en WB, confirman la utilidad de estos sueros para la detección en inmunofluorescencia (Anexo I). Estos resultados sugieren que, si bien existen epítopes lineales conservados entre los

flavivirus (detectados en WB), la respuesta humoral generada es predominantemente específica para los epítopes conformacionales.

Finalmente, los sueros producidos se utilizaron como herramientas para investigar la localización subcelular de la proteína NS5. Mediante inmunofluorescencia, se observó que tanto la NS5 de SLEV (expresada por transfección) como la de DENV-4 (durante la infección) presentaban una localización predominantemente citoplasmática (**Figuras 4.12A y A.1B**). Esta observación para DENV-4 (cepa H241) es consistente con reportes previos para esta cepa específica ([Hannemann et al., 2013](#)). Es interesante notar que la localización de NS5 es un rasgo variable incluso entre los serotipos de DENV: mientras que en DENV-1 y DENV-4 tiende a ser citoplasmática, en DENV-2 y DENV-3 es mayoritariamente nuclear. Sin embargo, para la cepa EDEN4 de DENV-4 también se observó acumulación de NS5 en el núcleo. A diferencia de los otros serotipos, la regulación de la localización de NS5 de DENV-4 continúa siendo un interrogante ([Cheng et al., 2024](#)). Nuestro hallazgo preliminar de una localización citoplasmática para la NS5 de SLEV, para la cual no existían estudios previos, puede representar una contribución al conocimiento de la biología de este virus. El suero producido constituye una herramienta útil para expandir la investigación al contexto de una infección.

5.3. Desarrollo y validación de un ELISA específico para el diagnóstico de SLEV

La co-circulación de múltiples flavivirus en Argentina, que a menudo causan cuadros febriles indiferenciables, subraya la necesidad crítica de contar con métodos serológicos específicos. Dicha especificidad es fundamental tanto para el diagnóstico diferencial de casos clínicos, como para la vigilancia epidemiológica fiable. Como se demostró en este trabajo, el desarrollo de un ELISA indirecto basado en la proteína NS5 recombinante de SLEV representa un avance significativo hacia este objetivo.

Uno de los hallazgos de este trabajo fue la demostración de que, tal como ocurre en otras infecciones flavivirales, los pacientes infectados con SLEV desarrollan una respuesta de anticuerpos detectable contra la proteína NS5. Esta fue la primera vez que se reportó la presencia de anticuerpos anti-NS5 en el contexto de una infección natural por SLEV ([Simari et al., 2019](#)). Se observó que nuestro antígeno recombinante fue reconocido tanto por sueros de pacientes con un patrón de infección homotípico como heterotípico, lo que indica que la NS5 es un inmunógeno relevante en ambos escenarios de infección.

La validación de este ensayo demostró una excelente especificidad (100%). Al ser evaluado contra un panel de sueros de pacientes con otras infecciones por flavivirus (DENV, ZIKV, YFV, WNV) y virus no relacionados, no se detectó ningún falso positivo (**Figura 4.16**). Este

resultado es de gran importancia, ya que el principal problema de los ensayos serológicos basados en la proteína E es precisamente la reactividad cruzada. Nuestros datos se alinean con estudios previos que, aunque utilizan diferentes plataformas (ej. MIA), también han demostrado que la NS5 de WNV y ZIKV es un antígeno significativamente más específico que la proteína E (Wong et al., 2003; Wong et al., 2017).

Curiosamente, la alta especificidad de la NS5 parece contradecir su mayor grado de conservación de secuencia en comparación con la proteína E. Una posible explicación, como sugieren Wong et al. (2003), es que los epítopes inmunodominantes de la proteína E podrían ser estructuralmente más conservados entre los flavivirus que los de la NS5, a pesar de una menor similitud global. Esto posiciona a la NS5 como un antígeno superior para el diagnóstico diferencial.

La sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 84.2%. Es importante destacar que los tres falsos negativos (sueros N° 9, 10 y 44) correspondían a muestras de pacientes que presentaban títulos bajos por el método de referencia PRNT. En particular, la muestra N° 9 corresponde a una infección de 4 días desde el inicio de los síntomas, por lo cual es lógico que sea negativa para IgG. Esto sugiere que el ensayo es muy eficaz para detectar respuestas inmunes moderadas a fuertes, aunque su sensibilidad analítica (o límite de detección) podría ser insuficiente para detectar concentraciones muy bajas de anticuerpos, características de respuestas inmunes débiles o muy tempranas. Futuros trabajos podrían enfocarse en determinar formalmente el límite de detección y en implementar estrategias de amplificación de señal para mejorarlo.

Adicionalmente, se debe notar que cuatro de las muestras consideradas positivas (sueros N° 2, 12, 15 y 43) arrojaron valores de absorbancia muy cercanos al valor de corte. Estos resultados podrían ser difíciles de interpretar en un contexto clínico, subrayando la importancia de incluir controles positivos débiles al validar futuros ensayos y, potencialmente, de establecer un rango de resultados indeterminados que requieran una prueba confirmatoria.

Al comparar el rendimiento de nuestro ensayo con otros basados en NS5, nuestros resultados son consistentes. Por ejemplo, un MIA para NS5-ZIKV reportó una sensibilidad del 74% (Wong et al., 2017), mientras que nuestro 84.2% se acerca al 92% reportado para un MIA de NS5-WNV (Wong et al., 2003). Es importante destacar que, a diferencia de otros trabajos que obtuvieron el antígeno a partir de cultivos virales (Narayan et al., 2016), nuestra producción de NS5 recombinante en *E. coli* ofrece una alternativa más segura, escalable y económica.

En conclusión, el ELISA-NS5-SLEV desarrollado en esta tesis se establece como una herramienta diagnóstica con un perfil muy valioso: prioriza la especificidad a costa de una sensibilidad ligeramente menor para las muestras más débiles. Este perfil lo hace

particularmente útil en ambos ámbitos de aplicación definidos previamente. En el diagnóstico clínico, su alta especificidad lo convierte en una excelente prueba confirmatoria para casos sospechosos en contextos de brotes. En la vigilancia epidemiológica, es ideal para estudios de seroprevalencia donde evitar los falsos positivos es crucial para no sobreestimar la circulación del virus. Además, al ser un formato de ELISA, es una técnica más rápida, segura y factible de implementar en laboratorios de menor complejidad en comparación con el PRNT.

Si bien ningún ensayo único es perfecto, la complejidad del diagnóstico de los flavivirus requiere el desarrollo de nuevos métodos que, en combinación con los ya existentes, permitan una identificación precisa de estos virus. El ELISA-NS5-SLEV ofrece una especificidad que puede complementar a otros ensayos más sensibles pero menos específicos.

5.4. Potencial y desafíos para el diagnóstico de DENV y WNV

Además de la validación del ensayo para SLEV, este trabajo exploró el potencial de la plataforma NS5 para otros flavivirus. La validación preliminar del ELISA-NS5-DENV-1 (**Figura 4.18**), aunque realizada con un número limitado de muestras (especialmente de controles), arrojó resultados muy prometedores, con una alta sensibilidad y especificidad. Esto sugiere que el protocolo de producción de antígeno y de desarrollo de ELISA estandarizado en esta tesis podría ser una plataforma adaptable para el diagnóstico de otros flavivirus.

El análisis de la reactividad cruzada entre SLEV y WNV reveló un panorama antigénico complejo, con resultados que demuestran diferencias críticas en las propiedades antigénicas de las proteínas NS5 de SLEV y WNV (**Figura 4.19**). El ensayo basado en NS5-SLEV demostró ser altamente específico en las condiciones evaluadas, siendo capaz de discriminar claramente entre la reactividad del suero homólogo anti-SLEV y la del suero heterólogo anti-WNV empleado en este ensayo. Este hallazgo inicial, aunque requeriría validación con un panel más amplio de sueros, sugiere que la NS5 de SLEV podría contener epítopes únicos con potencial para el desarrollo de herramientas de serodiagnóstico más específicas.

En marcado contraste, la NS5 de WNV exhibió una significativa reactividad cruzada, reconociendo anticuerpos en el suero anti-SLEV a un nivel estadísticamente superior al del control negativo. No obstante, es crucial destacar que la reacción homóloga se mantuvo dominante, ya que la señal generada por el suero anti-WNV fue significativamente mayor que la observada con el suero anti-SLEV. Este resultado sugiere la existencia de epítopes conservados, responsables de la reactividad cruzada, junto con epítopes específicos de

WNV que son reconocidos con mayor afinidad por los anticuerpos presentes en el suero homólogo. Si bien la confirmación de esta tendencia requerirá el análisis de un panel de sueros más diverso, estos datos son consistentes con el desafío recurrente del serodiagnóstico de flavivirus y refuerzan la necesidad de una caracterización antigénica detallada para cada sistema.

Los resultados de los ensayos serológicos realizados en este trabajo son consistentes con la especificidad de la proteína NS5 reportada en la literatura. En este estudio, el ELISA basado en NS5-DENV-1 mostró reactividad con sueros de otros serotipos de Dengue. Este hallazgo se alinea con reportes previos que indican que, si bien la NS5 puede ser útil para diferenciar entre serocomplejos de flavivirus, su alta conservación dentro del complejo Dengue limita su utilidad para la serotipificación (Zhang et al., 2019).

De manera similar, se observó reactividad cruzada en el ensayo con NS5 de WNV, el cual fue reconocido por el suero anti-SLEV. Este tipo de reactividad entre virus del serocomplejo de la Encefalitis Japonesa ha sido previamente documentado. En este contexto, es importante destacar que, a pesar de observarse ciertos falsos positivos con sueros de SLEV, se demostró que el uso de NS5 de WNV como antígeno ofrecía una especificidad considerablemente mayor en comparación con la proteína E (Wong et al., 2003).

En conclusión, los resultados de esta tesis apoyan firmemente la viabilidad de utilizar la proteína NS5 para desarrollar inmunoensayos capaces de distinguir entre infecciones por diferentes serocomplejos de flavivirus. La reactividad cruzada asimétrica observada entre SLEV y WNV es un ejemplo de la complejidad en el diagnóstico y justifica la necesidad de realizar estudios más amplios, con paneles de muestras más grandes, para establecer relaciones antigénicas y diseñar las mejores estrategias para un diagnóstico diferencial robusto.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1. Conclusiones

A lo largo de este trabajo de tesis, se han alcanzado los siguientes objetivos:

- Se logró producir y purificar exitosamente un panel de seis proteínas NS5 recombinantes de flavivirus de importancia regional. La caracterización posterior confirmó que estas proteínas son funcionalmente activas y antigénicamente íntegras, validándolas como herramientas de alta calidad para el desarrollo de inmunoensayos.
- Se generó un panel de cuatro sueros policlonales de conejo dirigidos contra las proteínas NS5. La validación de estos reactivos demostró que son de alto título y se confirmó su aplicabilidad para la detección de la proteína NS5 tanto en Western blot como en ensayos de inmunofluorescencia.
- Se desarrolló y estandarizó un protocolo de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG humanos, utilizando las proteínas NS5 de SLEV y DENV-1 como antígenos. Se optimizaron todos los parámetros críticos del ensayo, resultando en un método robusto y reproducible.
- La validación analítica y diagnóstica del ELISA-NS5-SLEV demostró que el ensayo es altamente preciso y específico. Con un panel de muestras clínicas, se determinó una especificidad del 100% y una sensibilidad del 84.2%, estableciendo su potencial como una herramienta fiable para el diagnóstico y vigilancia de infecciones por SLEV.
- La evaluación preliminar del ELISA-NS5-DENV-1 arrojó resultados prometedores, con una alta especificidad y sensibilidad en un panel reducido de muestras. Adicionalmente, los estudios de reactividad cruzada revelaron un complejo patrón antigénico, destacando la capacidad de los ensayos basados en NS5 para discriminar entre los principales serocomplejos de flavivirus.

6.2. Perspectivas

Los resultados obtenidos en esta tesis abren nuevas y prometedoras líneas de investigación.

Un primer desafío a abordar es la optimización de la producción de las proteínas NS5. Aunque se obtuvieron proteínas funcionales, la degradación proteolítica fue un problema recurrente. Futuros estudios, que ya se encuentran en curso en nuestro laboratorio, se

enfocarán en el diseño de construcciones más estables mediante mutagénesis dirigida para mejorar el rendimiento y la homogeneidad de los antígenos.

Las herramientas generadas en este trabajo y los resultados obtenidos en el ELISA de IgG sientan las bases para el desarrollo de un ELISA de captura para la detección de IgM anti-NS5, un marcador clave de infección aguda. Esto requerirá la conjugación de los anticuerpos policlonales de conejo generados, una estrategia que podría superar las dificultades encontradas en ensayos directos preliminares.

Asimismo, los reactivos producidos serán esenciales para la investigación de la biología fundamental de SLEV, un virus poco estudiado. El suero anti-NS5-SLEV permitirá realizar, por primera vez, estudios detallados sobre la localización subcelular de esta proteína durante la infección.

Finalmente, la disponibilidad de la proteína NS5-SLEV activa permitirá profundizar en los mecanismos moleculares de la replicación viral. Se planea realizar estudios biofísicos cuantitativos, como titulaciones fluorimétricas, para caracterizar la interacción de la polimerasa con elementos reguladores clave del ARN viral, como las estructuras SLA y 3'SL. Estos análisis permitirán definir parámetros fundamentales como la afinidad, la estequiometría y la especificidad de estas interacciones, aspectos que hasta ahora se desconocen para la NS5 de SLEV.

Considerando que la proteína NS5 es foco de numerosos estudios para el desarrollo de tratamientos antivirales y vacunas, la continuación de estas líneas de investigación no solo ampliará nuestro conocimiento sobre la biología de los flavivirus, sino que también podría contribuir al diseño racional de nuevas estrategias antivirales y vacunales que tengan a la proteína NS5 como blanco terapéutico.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aberle, J. H., Koblischke, M., & Stiasny, K. (2018). CD4 T cell responses to flaviviruses. *Journal of Clinical Virology*, 108, 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.09.020>
- Abram, Q. H., Landry, B. N., Wang, A. B., Kothe, R. F., Hauch, H. C., & Sagan, S. M. (2024). The myriad roles of RNA structure in the flavivirus life cycle. *RNA biology*, 21(1), 634-650. <https://doi.org/10.1080/15476286.2024.2357857>
- Ackermann, M. & Padmanabhan, R. (2001). De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39926-39937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104248200>
- Alves, R. P. D. S., Pereira, L. R., Fabris, D. L. N., Salvador, F. S., Santos, R. A., Zanotto, P. M. D. A., Romano, C. M., Amorim, J. H., & Ferreira, L. C. D. S. (2016). Production of a recombinant dengue virus 2 NS5 protein and potential use as a vaccine antigen. *Clinical and Vaccine Immunology*, 23(6), 460-469. <https://doi.org/10.1128/CVI.00081-16>
- Artsob, H., Lindsay, R., & Drebot, M. (2017). Arboviruses. En S. R. Quah (Ed.), *International Encyclopedia of Public Health* (pp. 154–160). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00023-0>
- Barnard, T. R., Abram, Q. H., Lin, Q. F., Wang, A. B., & Sagan, S. M. (2021). Molecular determinants of flavivirus virion assembly. *Trends in biochemical sciences*, 46(5), 378-390. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.12.007>
- Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K. C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S. C., Schott-Lerner, G., Pompon, J., Sessions, O. M., Bradrick, S. S., & Garcia-Blanco, M. A. (2018). Biochemistry and molecular biology of flaviviruses. *Chemical reviews*, 118(8), 4448-4482. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>
- Best, S. M. (2016). Flaviviruses. *Current Biology*, 26(24), R1258-R1260. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.029>
- Best, S. M. (2017). The many faces of the flavivirus NS5 protein in antagonism of type I interferon signaling. *Journal of virology*, 91(3), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/JVI.01970-16>
- Biswal, M., Yao, W., Lu, J., Chen, J., Morrison, J., Hai, R., & Song, J. (2024). A conformational selection mechanism of flavivirus NS5 for species-specific STAT2 inhibition. *Communications Biology*, 7(1), 76. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-05768-8>
- Bohm, B. C., Borges, F. E. D. M., Silva, S. C. M., Soares, A. T., Ferreira, D. D., Belo, V. S., Lignon, J. S., & Bruhn, F. R. P. (2024). Utilization of machine learning for dengue

- case screening. *BMC Public Health*, 24(1), 1573. <https://doi.org/10.1186/s12889-024-19083-8>
- Boldescu, V., Behnam, M. A., Vasilakis, N., & Klein, C. D. (2017). Broad-spectrum agents for flaviviral infections: dengue, Zika and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(8), 565-586. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.33>
- Caldwell, H. S., Pata, J. D., & Ciota, A. T. (2022). The role of the flavivirus replicase in viral diversity and adaptation. *Viruses*, 14(5), 1076. <https://doi.org/10.3390/v14051076>
- Carpio, K. L. & Barrett, A. D. (2021). Flavivirus NS1 and its potential in vaccine development. *Vaccines*, 9(6), 622. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060622>
- Cedillo-Barrón, L., García-Cordero, J., Shrivastava, G., Carrillo-Halfon, S., León-Juárez, M., Bustos Arriaga, J., León Valenzuela, P., & Gutiérrez Castañeda, B. (2018). The role of flaviviral proteins in the induction of innate immunity. *Virus Protein and Nucleoprotein Complexes*, 407-442. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8456-0_17
- Chan, K. R., Ismail, A. A., Thergarajan, G., Raju, C. S., Yam, H. C., Rishya, M., & Sekaran, S. D. (2022). Serological cross-reactivity among common flaviviruses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 975398 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.975398>
- Cheng, C. X., Tan, M. J. A., Chan, K. W. K., Choy, M. M. J., Roman, N., Arnold, D. D., ... & Vasudevan, S. G. (2024). Serotype-specific regulation of dengue virus NS5 protein subcellular localization. *ACS Infectious Diseases*, 10(6), 2047-2062. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00054>
- Chong, H. Y., Leow, C. Y., Majeed, A. B. A., & Leow, C. H. (2019). Flavivirus infection—A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. *Virus research*, 274, 197770. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197770>
- Cleton, N. B., Godeke, G. J., Reimerink, J., Beersma, M. F., Doorn, H. R. V., Franco, L., Goeijenbier, M., Jimenez-Clavero, M. A., Johnson, B. W., Niedrig, M., Papa, A., Sambri, V., Tami, A., Velasco-Salas, Z. I., Koopmans, M. P. J., & Reusken, C. B. (2015). Spot the difference—development of a syndrome based protein microarray for specific serological detection of multiple flavivirus infections in travelers. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(3), e0003580. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003580>
- Conde, J. N., Schutt, W. R., Mladinich, M., Sohn, S. Y., Hearing, P., & Mackow, E. R. (2020). NS5 sumoylation directs nuclear responses that permit Zika virus to persistently infect human brain microvascular endothelial cells. *Journal of virology*, 94(19), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/jvi.01086-20>

- Contigiani, M. S., Diaz, L. A., & Spinsanti, L. (2017). Flavivirus. En C. Marcondes (Ed.), *Arthropod Borne Diseases* (pp. 73-88). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13884-8_6
- Davidson, A. D. (2009). New insights into flavivirus nonstructural protein 5. *Advances in virus research*, 74, 41-101. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(09\)74002-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)74002-3)
- Diani, E., Lagni, A., Lotti, V., Tonon, E., Cecchetto, R., & Gibellini, D. (2023). Vector-Transmitted Flaviviruses: An Antiviral Molecules Overview. *Microorganisms*, 11(10), 2427. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102427>
- Dias, B. D. P., Barbosa, C. C., Ferreira, C. S., Mayra Soares Alves dos Santos, S., Arrieta, O. A. P., Malta, W. C., Maximiano Dias Gomes, M. L., Alves e Silva, M., de Matos Fonseca, J., Pinto Borges, L., & Silva, B. D. M. (2023). Challenges in direct detection of flaviviruses: a review. *Pathogens*, 12(5), 643. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050643>
- Diaz, L. A., Flores, F. S., Quaglia, A., & Contigiani, M. S. (2013). Intertwined arbovirus transmission activity: reassessing the transmission cycle paradigm. *Frontiers in physiology*, 3, 493. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00493>
- Diaz, L. A., Goni, S. E., Iserte, J. A., Quaglia, A. I., Singh, A., Logue, C. H., Powers, A. M., & Contigiani, M. S. (2015). Exploring genomic, geographic and virulence interactions among epidemic and non-epidemic St. Louis encephalitis virus (Flavivirus) strains. *PLoS One*, 10(8), e0136316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136316>
- Doets, K. & Pijlman, G. P. (2024). Subgenomic flavivirus RNA as key target for live-attenuated vaccine development. *Journal of Virology*, 98(7), e00100-23. <https://doi.org/10.1128/jvi.00100-23>
- Du Pont, K. E., McCullagh, M., & Geiss, B. J. (2022). Conserved motifs in the flavivirus NS3 RNA helicase enzyme. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 13(2), e1688. <https://doi.org/10.1002/wrna.1688>
- Duan, Y., Zeng, M., Jiang, B., Zhang, W., Wang, M., Jia, R., Zhu, D., Liu, M., Zhao, X., Yang, Q., Wu, Y., Zhang, S., Liu, Y., Zhang, L., Yu, L., Pan, L., Chen, S., & Cheng, A. (2019). Flavivirus RNA-dependent RNA polymerase interacts with genome UTRs and viral proteins to facilitate flavivirus RNA replication. *Viruses*, 11(10), 929. <https://doi.org/10.3390/v11100929>
- El Sahili, A. & Lescar, J. (2017). Dengue virus non-structural protein 5. *Viruses*, 9(4), 91. <https://doi.org/10.3390/v9040091>
- Elliott, K. C. & Mattapallil, J. J. (2024). Zika Virus—A Reemerging Neurotropic Arbovirus Associated with Adverse Pregnancy Outcomes and Neuropathogenesis. *Pathogens*, 13(2), 177. <https://doi.org/10.3390/pathogens13020177>

- Endale, A., Medhin, G., Darfiro, K., Kebede, N., & Legesse, M. (2021). Magnitude of antibody cross-reactivity in medically important mosquito-borne flaviviruses: a systematic review. *Infection and drug resistance*, 4291-4299. <https://doi.org/10.2147/IDR.S336351>
- Falconi-Agapito, F., Kerkhof, K., Merino, X., Michiels, J., Van Esbroeck, M., Bartholomeeusen, K., Talledo, M., & Ariën, K. K. (2021). Dynamics of the magnitude, breadth and depth of the antibody response at epitope level following dengue infection. *Frontiers in immunology*, 12, 686691. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.686691>
- Fernandes-Santos, C. & Leal de Azeredo, E. (2022). Innate immune response to dengue virus: Toll-like receptors and antiviral response. *Viruses*, 14(5), 992. <https://doi.org/10.3390/v14050992>
- Fernández-Sanlés, A., Ríos-Marco, P., Romero-López, C., & Berzal-Herranz, A. (2017). Functional information stored in the conserved structural RNA domains of flavivirus genomes. *Frontiers in microbiology*, 8, 546. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00546>
- Fischer, C., Jo, W. K., Haage, V., Moreira-Soto, A., de Oliveira Filho, E. F., & Drexler, J. F. (2021). Challenges towards serologic diagnostics of emerging arboviruses. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(9), 1221-1229. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.047>
- Fishburn, A. T., Pham, O. H., Kenaston, M. W., Beesabathuni, N. S., & Shah, P. S. (2022). Let's get physical: flavivirus-host protein–protein interactions in replication and pathogenesis. *Frontiers in microbiology*, 13, 847588. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.847588>
- Fisher, R., Lustig, Y., Sklan, E. H., & Schwartz, E. (2023). The role of NS1 protein in the diagnosis of flavivirus infections. *Viruses*, 15(2), 572. <https://doi.org/10.3390/v15020572>
- Frazer, J. L. & Norton, R. (2024). Dengue: A review of laboratory diagnostics in the vaccine age. *Journal of Medical Microbiology*, 73(5), 001833. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001833>
- Fumagalli, M. J., Figueiredo, L. T. M., & Aquino, V. H. (2021). Linear and continuous flavivirus epitopes from naturally infected humans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 710551. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.710551>
- Gebhard, L. G., Filomatori, C. V., & Gamarnik, A. V. (2011). Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses*, 3(9), 1739-1756. <https://doi.org/10.3390/v3091739>
- Go, Y. Y., Balasuriya, U. B., & Lee, C. K. (2014). Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clinical*

- and experimental vaccine research*, 3(1), 58-77.
<https://doi.org/10.7774/cevr.2014.3.1.58>
- Goh, J. Z., De Hayr, L., Khromykh, A. A., & Slonchak, A. (2024). The flavivirus non-structural protein 5 (NS5): structure, functions, and targeting for development of vaccines and therapeutics. *Vaccines*, 12(8), 865. <https://doi.org/10.3390/vaccines12080865>
- Goncalves, A., Peeling, R. W., Chu, M. C., Gubler, D. J., de Silva, A. M., Harris, E., Murtagh, M., Chua, A., Rodriguez, W., Kelly, C., & Wilder-Smith, A. (2018). Innovative and new approaches to laboratory diagnosis of Zika and dengue: a meeting report. *The Journal of infectious diseases*, 217(7), 1060-1068. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix678>
- Gould, E. A., de Lamballerie, X., Zanotto, P. M., & Holmes, E. C. (2003). Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus Flavivirus. *Advances in virus research*, 59, 277-314. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)59008-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)59008-X)
- Grifoni, A., Tian, Y., Sette, A., & Weiskopf, D. (2020). Transcriptomic immune profiles of human flavivirus-specific T-cell responses. *Immunology*, 160(1), 3-9. <https://doi.org/10.1111/imm.13161>
- Hale, G. L. (2023). Flaviviruses and the traveler: around the world and to your stage. a review of west nile, yellow fever, dengue, and zika viruses for the practicing pathologist. *Modern Pathology*, 36(6), 100188. <https://doi.org/10.1016/j.modpat.2023.100188>
- Hannemann, H., Sung, P. Y., Chiu, H. C., Yousuf, A., Bird, J., Lim, S. P., & Davidson, A. D. (2013). Serotype-specific differences in dengue virus non-structural protein 5 nuclear localization. *Journal of Biological Chemistry*, 288(31), 22621-22635. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.481382>
- Hurtado-Monzón, A. M., Cordero-Rivera, C. D., Farfan-Morales, C. N., Osuna-Ramos, J. F., De Jesús-González, L. A., Reyes-Ruiz, J. M., & Del Ángel, R. M. (2020). The role of anti-flavivirus humoral immune response in protection and pathogenesis. *Reviews in medical virology*, 30(4), e2100. <https://doi.org/10.1002/rmv.2100>
- Issur, M., Geiss, B. J., Bougie, I., Picard-Jean, F., Despins, S., Mayette, J., Hobdey, S. E., & Bisailon, M. (2009). The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *Rna*, 15(12), 2340-2350. <https://doi.org/10.1261/rna.1609709>
- Jablunovsky, A. & Jose, J. (2024). The dynamic landscape of capsid proteins and viral RNA interactions in flavivirus genome packaging and virus assembly. *Pathogens*, 13(2), 120. <https://doi.org/10.3390/pathogens13020120>
- Kabir, M. A., Zilouchian, H., Younas, M. A., & Asghar, W. (2021). Dengue detection: advances in diagnostic tools from conventional technology to point of care. *Biosensors*, 11(7), 206. <https://doi.org/10.3390/bios11070206>

- Kaur, S. & Tripathi, S. (2021). Innate immune subversion strategies of human flaviviruses. *Critical Reviews™ in Immunology*, 41(3). <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2021039844>
- Kerkhof, K., Falconi-Agapito, F., Van Esbroeck, M., Talledo, M., & Ariën, K. K. (2020). Reliable serological diagnostic tests for arboviruses: feasible or utopia?. *Trends in microbiology*, 28(4), 276-292. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.11.005>
- Klema, V. J., Padmanabhan, R., & Choi, K. H. (2015). Flaviviral replication complex: coordination between RNA synthesis and 5'-RNA capping. *Viruses*, 7(8), 4640-4656. <https://doi.org/10.3390/v7082837>
- Klema, V. J., Ye, M., Hindupur, A., Teramoto, T., Gottipati, K., Padmanabhan, R., & Choi, K. H. (2016). Dengue virus nonstructural protein 5 (NS5) assembles into a dimer with a unique methyltransferase and polymerase interface. *PLoS pathogens*, 12(2), e1005451. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005451>
- Laureti, M., Narayanan, D., Rodriguez-Andres, J., Fazakerley, J. K., & Kedzierski, L. (2018). Flavivirus receptors: diversity, identity, and cell entry. *Frontiers in immunology*, 9, 2180. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02180>
- Lequime, S. & Lambrechts, L. (2014). Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: A historical perspective. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 681-690. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.025>
- Lequime S., Paul, R.E., & Lambrechts, L. (2016). Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. *PLoS Pathog* 12(5): e1005548. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005548>
- Li, X. D., Shan, C., Deng, C. L., Ye, H. Q., Shi, P. Y., Yuan, Z. M., Gong, P., & Zhang, B. (2014). The interface between methyltransferase and polymerase of NS5 is essential for flavivirus replication. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(5), e2891. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002891>
- Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Advances in virus research*, 59, 23-62. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)59002-9](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59002-9)
- Lindenbach, B. D., Murray, C. L., Thiel, H. J., & Rice, C. M. (2013). Flaviviridae. En D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (pp 712-746). Wolters Kluwer.
- Lopez-Denman, A. J., & Mackenzie, J. M. (2017). The IMPORTance of the nucleus during flavivirus replication. *Viruses*, 9(1), 14. <https://doi.org/10.3390/v9010014>
- Lopez-Denman, A. J., Russo, A., Wagstaff, K. M., White, P. A., Jans, D. A., & Mackenzie, J. M. (2018). Nucleocytoplasmic shuttling of the West Nile virus RNA-dependent RNA polymerase NS5 is critical to infection. *Cellular microbiology*, 20(8), e12848. <https://doi.org/10.1111/cmi.12848>

- Lu, G., & Gong, P. (2013). Crystal Structure of the full-length Japanese encephalitis virus NS5 reveals a conserved methyltransferase-polymerase interface. *PLoS pathogens*, 9(8), e1003549. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003549>
- Lu, G. & Gong, P. (2017). A structural view of the RNA-dependent RNA polymerases from the Flavivirus genus. *Virus Research*, 234, 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.020>
- Maeda, J., Takagi, H., Hashimoto, S., Kurane, I., & Maeda, A. (2008). A PCR-based protocol for generating West Nile virus replicons. *Journal of virological methods*, 148(1-2), 244-252. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.12.005>
- Malet, H., Egloff, M. P., Selisko, B., Butcher, R. E., Wright, P. J., Roberts, M., Gruez, A., Sulzenbacher, G., Vonnrhein, C., Bricogne, G., Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A., Davidson, A. D., & Canard, B. (2007). Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5. *Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10678-10689. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607273200>
- Malet, H., Massé, N., Selisko, B., Romette, J. L., Alvarez, K., Guillemot, J. C., Tolou, H., Yap, T. L., Vasudevan, S. G., Lescar, J., & Canard, B. (2008). The flavivirus polymerase as a target for drug discovery. *Antiviral research*, 80(1), 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.06.007>
- Ministerio de Salud de la República Argentina, Dirección de Epidemiología. (2025a). *Boletín Epidemiológico Nacional* N°767, SE 30. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2025/01/ben-767-se-30_vf.pdf
- Ministerio de Salud de la República Argentina, Dirección de Epidemiología. (2025b). *Boletín Epidemiológico Nacional* N°771, SE 34. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2025/01/ben-771-se_34.pdf
- Moureau, G., Cook, S., Lemey, P., Nougairede, A., Forrester, N. L., Khasnatinov, M., et al. (2015). New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences. *PloS one*, 10(2), e0117849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117849>
- 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 research*, 98(2), 192-208. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008>
- Musso, D. & Desprès, P. (2020). Serological diagnosis of flavivirus-associated human infections. *Diagnostics*, 10(5), 302. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10050302>
- Musso, D., Rousset, D., & Peyrefitte, C. (2022). Special issue “endemic arboviruses”. *Viruses*, 14(3), 645. <https://doi.org/10.3390/v14030645>
- Narayan, R., Raja, S., Kumar, S., Sambasivam, M., Jagadeesan, R., Arunagiri, K., Krishnasamy, K., & Palani, G. (2016). A novel indirect ELISA for diagnosis of dengue

- fever. *Indian Journal of Medical Research*, 144(1), 128-133. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.193300>
- Nelson, A. N. & Ploss, A. (2024). Emerging mosquito-borne flaviviruses. *mBio*, 15(12), e02946-24. <https://doi.org/10.1128/mbio.02946-24>
- Ng, W. C., Soto-Acosta, R., Bradrick, S. S., Garcia-Blanco, M. A., & Ooi, E. E. (2017). The 5' and 3' untranslated regions of the flaviviral genome. *Viruses*, 9(6), 137. <https://doi.org/10.3390/v9060137>
- Nguyen, H. T. D., Chong, Y., Oh, D. K., Heo, Y. S., Viet, P. T., Kang, L. W., Jeon, S. J., & Kim, D. E. (2013). An efficient colorimetric assay for RNA synthesis by viral RNA-dependent RNA polymerases, using thermostable pyrophosphatase. *Analytical biochemistry*, 434(2), 284-286. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.11.019>
- Pan, Y., Cai, W., Cheng, A., Wang, M., Yin, Z., & Jia, R. (2022). Flaviviruses: innate immunity, inflammasome activation, inflammatory cell death, and cytokines. *Frontiers in Immunology*, 13, 829433. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.829433>
- Pardy, R. D. & Richer, M. J. (2019). Protective to a T: the role of T cells during Zika virus infection. *Cells*, 8(8), 820. <https://doi.org/10.3390/cells8080820>
- Peeling, R. W., Artsob, H., Pelegrino, J. L., Buchy, P., Cardoso, M. J., Devi, S., Enria, D. A., Farrar, J., Gubler, D. J., Guzman, M. G., Halstead, S. B., Hunsperger, E., Kliks, S., Margolis, H. S., Nathanson, C. M., Nguyen, V. C., Rizzo, N., Vázquez, S., & Yoksan, S. (2010). Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews Microbiology*, 8(Suppl 12), S30-S37. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2459>
- Pierson, T. C. & Diamond, M. S. (2008). Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. *Expert reviews in molecular medicine*, 10, e12. <https://doi.org/10.1017/S1462399408000665>
- Pierson, T. C. & Diamond, M. S. (2013). Flaviviruses. En D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (pp 747-794). Wolters Kluwer.
- Pierson, T. C. & Diamond, M. S. (2020). The continued threat of emerging flaviviruses. *Nature microbiology*, 5(6), 796-812. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>
- Postler, T. S., Beer, M., Blitvich, B. J., Bukh, J., De Lamballerie, X., Drexler, J. F., Imrie, A., Kapoor, A., Karganova G. G., Lemey, P., Lohmann, V., Simmonds, P., Smith, D. B., Stapleton, J. T., & Kuhn, J. H. (2023). Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. *Archives of virology*, 168(9), 224. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05835-1>
- Prince, H. E., Lapé-Nixon, M., Yeh, C., Tobler, L. H., & Busch, M. P. (2008). Persistence of antibodies to West Nile virus nonstructural protein 5. *Journal of clinical virology*, 43(1), 102-106. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.03.025>

- Ramos-Lorente, S., Romero-López, C., & Berzal-Herranz, A. (2021). Information encoded by the flavivirus genomes beyond the nucleotide sequence. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3738. <https://doi.org/10.3390/ijms22073738>
- Rathore, A. P. & St. John, A. L. (2020). Cross-reactive immunity among flaviviruses. *Frontiers in immunology*, 11, 334. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00334>
- Rey, F. A., Stiasny, K., Vaney, M. C., Dellarole, M., & Heinz, F. X. (2018). The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. *EMBO reports*, 19(2), 206-224. <https://doi.org/10.15252/embr.201745302>
- Reyes-Sandoval, A. & Ludert, J. E. (2019). The dual role of the antibody response against the flavivirus non-structural protein 1 (NS1) in protection and immuno-pathogenesis. *Frontiers in immunology*, 10, 1651. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01651>
- Rucci, K. A., Arias-Builes, D. L., Visintin, A. M., & Diaz, A. (2024). Serological survey reveals enzootic circulation of St. Louis encephalitis and West Nile viruses in semiarid Monte ecosystem of Argentina. *Scientific Reports*, 14(1), 4994. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55723-0>
- Santos, L. L., de Aquino, E. C., Fernandes, S. M., Ternes, Y. M. F., & Feres, V. C. D. R. (2023). Dengue, chikungunya, and Zika virus infections in Latin America and the Caribbean: a systematic review. *Revista panamericana de salud publica*, 47, e34. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.34>
- Schweitzer, B. K., Chapman, N. M., & Iwen, P. C. (2009). Overview of the Flaviviridae with an emphasis on the Japanese encephalitis group viruses. *Laboratory medicine*, 40(8), 493-499. <https://doi.org/10.1309/lm5yws85njpcwesw>
- Selisko, B., Wang, C., Harris, E., & Canard, B. (2014). Regulation of Flavivirus RNA synthesis and replication. *Current opinion in virology*, 9, 74-83. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.09.011>
- Shearer, F. M., Moyes, C. L., Pigott, D. M., Brady, O. J., Marinho, F., Deshpande, A., Longbottom, J., Browne, A. J., Kraemer, M. U. G., O'Reilly, K. M., Hombach, J., Yactayo, S., de Araújo, V. E. M., da Nóbrega, A. A., Mosser, J. F., Stanaway, J. D., Lim, S. S., Hay, S. I., Golding, N., & Reiner, R. C. (2017). Global yellow fever vaccination coverage from 1970 to 2016: an adjusted retrospective analysis. *The Lancet infectious diseases*, 17(11), 1209-1217. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30419-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30419-X)
- Shope, R. E. & Meegan, J. M. (1997). Arboviruses. En A. S. Evans & R. A. Kaslow (Eds.), *Viral Infections of Humans*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0036-4_6
- Simari, M. B., Goñi, S. E., Luppo, V. C., Fabbri, C. M., Argüelles, M. H., Lozano, M. E., Morales, M.A., & Iglesias, N. G. (2020). Specific diagnostic method for St. Louis

- encephalitis virus using a non-structural protein as the antigen. *Journal of General Virology*, 101(2), 168-174. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001359>
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D. B., Stapleton, J. T., & Ictv Report Consortium. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology*, 98(1), 2-3. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>
- Slon Campos, J. L., Mongkolsapaya, J., & Sreaton, G. R. (2018). The immune response against flaviviruses. *Nature immunology*, 19(11), 1189-1198. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0210-3>
- Slonchak, A. & Khromykh, A. A. (2018). Subgenomic flaviviral RNAs: What do we know after the first decade of research. *Antiviral research*, 159, 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.09.006>
- Tan, M. J. A., Chan, K. W. K., Ng, I. H., Kong, S. Y. Z., Gwee, C. P., Watanabe, S., & Vasudevan, S. G. (2019). The potential role of the ZIKV NS5 nuclear spherical-shell structures in cell type-specific host immune modulation during ZIKV infection. *Cells*, 8(12), 1519. <https://doi.org/10.3390/cells8121519>
- Thurmond, S., Wang, B., Song, J., & Hai, R. (2018). Suppression of type I interferon signaling by flavivirus NS5. *Viruses*, 10(12), 712. <https://doi.org/10.3390/v10120712>
- Turtle, L., Griffiths, M. J., & Solomon, T. (2012). Encephalitis caused by flaviviruses. *QJM: An International Journal of Medicine*, 105(3), 219-223. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcs013>
- Valdés, K., Alvarez, M., Pupo, M., Vázquez, S., Rodríguez, R., & Guzmán, M. G. (2000). Human dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(5), 856-857. <https://doi.org/10.1128/cdli.7.5.856-857.2000>
- van den Elsen, K., Quek, J. P., & Luo, D. (2021). Molecular insights into the flavivirus replication complex. *Viruses*, 13(6), 956. <https://doi.org/10.3390/v13060956>
- van den Elsen, K., Chew, B. L. A., Ho, J. S., & Luo, D. (2023). Flavivirus nonstructural proteins and replication complexes as antiviral drug targets. *Current opinion in virology*, 59, 101305. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2023.101305>
- van Leur, S. W., Heunis, T., Munnur, D., & Sanyal, S. (2021). Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence*, 12(1), 2814-2838. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996059>
- Verhaegen, M. & Vermeire, K. (2024). The endoplasmic reticulum (ER): a crucial cellular hub in flavivirus infection and potential target site for antiviral interventions. *npj Viruses*, 2(1), 24. <https://doi.org/10.1038/s44298-024-00031-7>

- Villordo, S. M. & Gamarnik, A. V. (2009). Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus research*, 139(2), 230-239. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.016>
- Wahaab, A., Mustafa, B. E., Hameed, M., Stevenson, N. J., Anwar, M. N., Liu, K., Wei, J., Qiu, Y., & Ma, Z. (2021). Potential role of flavivirus NS2B-NS3 proteases in viral pathogenesis and anti-flavivirus drug discovery employing animal cells and models: a review. *Viruses*, 14(1), 44. <https://doi.org/10.3390/v14010044>
- Wahala, W. M. P. B. & De Silva, A. M. (2011). The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses*, 3(12), 2374-2395. <https://doi.org/10.3390/v3122374>
- Wang, B., Thurmond, S., Hai, R., & Song, J. (2018). Structure and function of Zika virus NS5 protein: perspectives for drug design. *Cellular and molecular life sciences*, 75, 1723-1736. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2751-x>
- Weaver, S. C. (2005). Host range, amplification and arboviral disease emergence. En C. J. Peters & C. H. Calisher, (Eds) *Infectious diseases from nature: Mechanisms of viral emergence and persistence* (pp. 33-44). Springer. https://doi.org/10.1007/3-211-29981-5_4
- Wong, S. J., Boyle, R. H., Demarest, V. L., Woodmansee, A. N., Kramer, L. D., Li, H., Drobot, M., Koski, R. A., Fikrig, E., Martin, D. A., & Shi, P. Y. (2003). Immunoassay targeting nonstructural protein 5 to differentiate West Nile virus infection from dengue and St. Louis encephalitis virus infections and from flavivirus vaccination. *Journal of clinical microbiology*, 41(9), 4217-4223. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.9.4217-4223.2003>
- Wong, S. J., Furuya, A., Zou, J., Xie, X., Dupuis, A. P., Kramer, L. D., & Shi, P. Y. (2017). A multiplex microsphere immunoassay for Zika virus diagnosis. *EBioMedicine*, 16, 136-140. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.01.008>
- Wu, J., Ye, H. Q., Zhang, Q. Y., Lu, G., Zhang, B., & Gong, P. (2020). A conformation-based intra-molecular initiation factor identified in the flavivirus RNA-dependent RNA polymerase. *PLoS Pathogens*, 16(5), e1008484. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008484>
- Wullmann, D. & Ljunggren, H. G. (2025). Human T Cell Responses to Flavivirus Vaccines. *European Journal of Immunology*, 55(8), e70027. <https://doi.org/10.1002/eji.70027>
- Ye, J., Zhu, B., Fu, Z. F., Chen, H., & Cao, S. (2013). Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine*, 31(3), 461-471. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.015>
- Young, P. R. (2018). Arboviruses: A Family on the Move. En R. Hilgenfeld & S. Vasudevan (Eds.), *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_1

- Young, P. R., Ng, L. F. P., Hall, R. A., Smith, D. W., & Johansen, C. A. (2014). Arbovirus infections. En: J. Farrar, P. J. Hotez, T. Junghans, G. Kang, D. Lalloo, & N. J. White (Eds.), *Manson's tropical diseases*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5101-2.00015-7>
- Zhang, T., Wang, M. L., Zhang, G. R., Liu, W., Xiao, X. Q., Yang, Y. S., Li, J. T., Xun, Z. M., Li, D. Y., & Chan, P. K. (2019). Recombinant DENV 2 NS5: an effective antigen for diagnosis of DENV infection. *Journal of virological methods*, 265, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.12.005>
- Zhao, B., Yi, G., Du, F., Chuang, Y. C., Vaughan, R. C., Sankaran, B., Kao, C. C., & Li, P. (2017). Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. *Nature communications*, 8(1), 14762. <https://doi.org/10.1038/ncomms14762>
- Zhao, Y., Soh, T. S., Zheng, J., Chan, K. W. K., Phoo, W. W., Lee, C. C., Tay, M. Y. F., Swaminathan, K., Cornvik, T. C., Lim, S. P., Shi, P. Y., Lescar, J., Vasudevan, S. G., & Luo, D. (2015a). A crystal structure of the Dengue virus NS5 protein reveals a novel inter-domain interface essential for protein flexibility and virus replication. *PLoS pathogens*, 11(3), e1004682. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004682>
- Zhao, Y., Soh, T. S., Chan, K. W. K., Fung, S. S. Y., Swaminathan, K., Lim, S. P., Shi, P. Y., Huber, T., Lescar, J., Luo, D., & Vasudevan, S. G. (2015b). Flexibility of NS5 methyltransferase-polymerase linker region is essential for dengue virus replication. *Journal of virology*, 89(20), 10717-10721. <https://doi.org/10.1128/jvi.01239-15>

8. ANEXOS

Anexo I. Prueba de suero policlonal anti-NS5-DENV-4

Los resultados presentados en esta sección fueron obtenidos en colaboración con el Laboratorio de Virología Molecular de la Fundación Instituto Leloir, dirigido por la Dra. Andrea Gamarnik. La contribución de nuestro laboratorio consistió en proporcionar el suero policlonal anti-NS5-DENV-4 producido en conejo. Los resultados de este estudio demostraron que el suero reconoce de forma inespecífica la NS5 de DENV-2 y ZIKV en las condiciones desnaturalizantes del WB (**Figura A.1A**). En ensayos de IFI de células A549 infectadas, se detectó la proteína nativa NS5-DENV-4 (**Figura A.1B**). Sin embargo, no se observó reacción cruzada frente a NS5-DENV-2 y NS5-ZIKV.

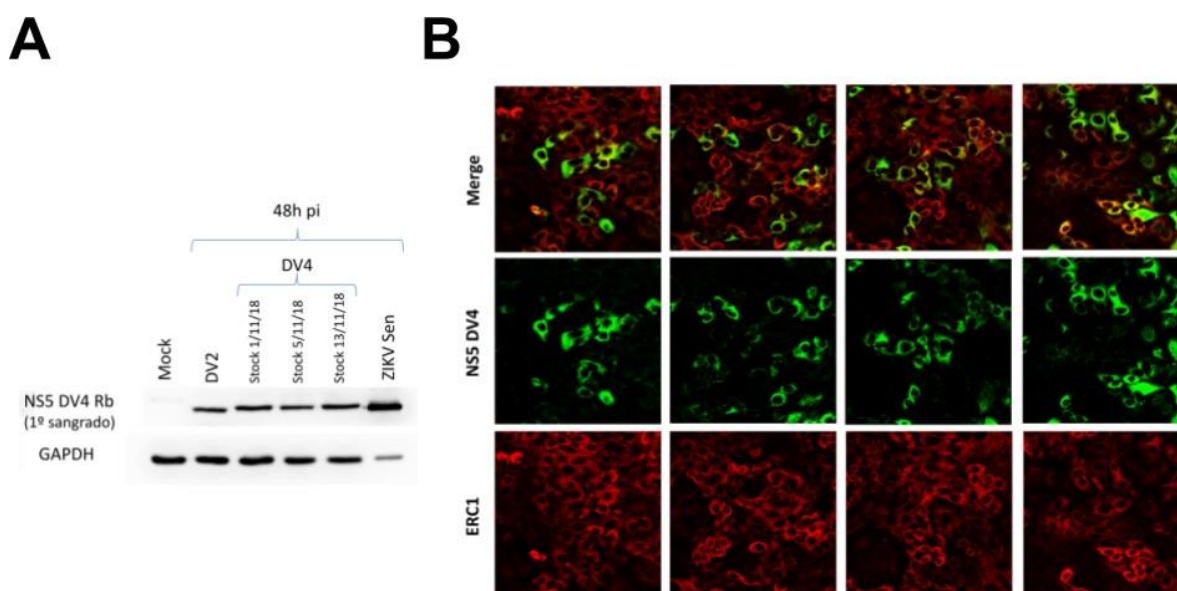


Figura A.1. Caracterización y aplicación del suero policlonal anti-NS5-DENV-4 (A) Análisis de la especificidad y reactividad cruzada del suero por WB. Se analizaron lisados de células A549 no infectadas (Mock) o infectadas durante 48 horas (48h pi) con DENV-2, tres stocks diferentes de DENV-4, o ZIKV. La membrana fue incubada con el suero de conejo anti-NS5-DENV-4. La detección de GAPDH se utilizó como control. **(B)** Análisis de la localización subcelular de NS5-DV4 por IFI. Células A549 fueron infectadas con DENV-4 y analizadas a las 48h pi. La proteína NS5 fue detectada con el suero anti-NS5-DV4 (verde) y la proteína celular ERC1 con un anticuerpo específico (rojo).

ANEXO II. Panel de sueros humanos

Panel de sueros humanos para ELISA-NS5-SLEV

El panel de sueros utilizado para la validación fue caracterizado por el Ensayo de neutralización por reducción de placas (PRNT), utilizando un umbral de positividad de $PRNT_{90} \geq 1:20$. La interpretación de los resultados de PRNT para diferenciar entre respuestas inmunes homotípicas (positivas para un solo flavivirus) y heterotípicas (positivas para varios flavivirus) fue la siguiente: en los patrones heterotípicos, una muestra se consideró positiva para un virus específico sólo si su título de anticuerpos neutralizantes era al menos cuatro veces superior al título contra los otros flavivirus analizados. La única excepción fue la muestra positiva para WNV, cuya condición fue confirmada como positiva para IgG e IgM mediante un ensayo de ELISA 'in-house' previamente validado.

Los ensayos fueron realizados por la Bioq. Victoria Celina Lupo y la Dra. Cintia Marcela Fabbri, bajo dirección de la Dra. María Alejandra Morales (INEVH).

Tabla A.1

Caracterización del panel de sueros humanos mediante el Ensayo de Neutralización por Reducción de Placas (PRNT)

Nº	Días desde inicio de síntomas	Título por PRNT							
		DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	SLEV	WNV	YFV	ZIKV
1	6	<10	<10	<10	<10	>80	<10	80	<10
2	8	<10	<10	<10	<10	>80	<10	80	<10
3	13	<20	<20	<20	<20	160	<20	<20	<20
4	25	<20	<20	<20	<20	80	<20	<20	<20
5	12	<10	20	10	<10	40	10	<10	<10
6	57	<10	20	10	10	>80	10	<10	<10
7	5	<10	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10
8	24	<10	<10	<10	<10	160	<10	<10	<10
9	4	<20	<20	<20	<20	20	<20	<20	<20
10	16	<40	<40	<40	<40	40	<40	<40	<40
11	175	<40	<40	<40	<40	80	<40	<40	<40

Nº	Días desde inicio de síntomas	Título por PRNT							
		DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	SLEV	WNV	YFV	ZIKV
12	5	<20	<20	<20	<20	40	<20	<20	<20
13	62	<40	<40	<40	<40	80	<40	<40	<40
14	30	<40	<40	<40	<40	80	<40	<40	<40
15	70	<40	<40	<40	<40	80	<40	40	<40
16	8	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
17	8	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
18	9	160	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
19	24	320	80	80	40	<40	<40	<40	<40
20	13	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
21	25	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
22	1	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
23	15	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
24	7	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
25	20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
26	NA	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
27	5	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	40
28	12	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	40
29	11	20	20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
30	22	<40	40	<40	<40	<40	<40	<40	<40
31	9	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
32	NA	<20	<20	<20	<20	<20	<20	80	<20
33	NA	<20	<20	<20	<20	<20	<20	20	<20
34	12	80	20	20	<20	<20	<20	<20	<20
35	19	160	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40
36	17	<40	<40	<40	<40	<40	<40	320	<40

N°	Días desde inicio de síntomas	Título por PRNT							
		DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	SLEV	WNV	YFV	ZIKV
37	32	<20	<20	<20	<20	<20	<20	160	<20
38	NA	<40	<40	<40	<40	<40	<40	>1280	<40
39	8	160	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
40	19	160	40	40	<40	<40	<40	<40	<40
41	8	320	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
42	22	>1280	40	40	<40	<40	<40	<40	<40
43	5	<20	<20	<20	<20	20	<20	<20	<20
44	69	<40	<40	<40	<40	40	<40	<40	<40
45	5	<20	<20	<20	<20	<20	<20	320	<20
46	NA	>640	20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
47	NA	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
48	10	<20	<20	<20	<20	20	<20	<20	<20
49	34	<40	<40	<40	<40	40	<40	<40	<40
50	16	160	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
51	31	160	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40
52	8	<20	<20	<20	<20	<20	<20	>640	<20
53	18	<40	<40	<40	<40	<40	<40	640	<40
54	22	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
55	7	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
56	NA	640	80	80	<40	<40	<40	<40	<40
57	17	<40	<40	<40	<40	<40	<40	160	<40
58	NA	<40	<40	<40	<40	<40	80	<40	320
59	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Nota. Los títulos se expresan como la inversa de la dilución. Se consideraron positivos los títulos ≥ 20 , los cuales se muestran en negrita en la tabla. NA: no aplicable. ND: no determinado. La muestra N° 59 corresponde a la muestra positiva para WNV, cuya condición fue confirmada como positiva para IgG e IgM mediante un ensayo de ELISA 'in-house'

Panel de sueros humanos para ELISA-NS5-DENV-1

Al igual que el panel de sueros utilizado para la validación del ELISA-NS5-SLEV, los sueros utilizados fueron caracterizados por PRNT y proporcionados por el INEVH.

Tabla A.2

Caracterización del panel de sueros humanos mediante el Ensayo de Neutralización por Reducción de Placas (PRNT)

N°	Días desde inicio de síntomas	Título por PRNT							
		DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	SLEV	WNV	YFV	ZIKV
60	11	<40	160	<40	<40	<40	<40	<40	<40
61	8	<40	<40	<40	80	<40	<40	<40	<40
62	4	160	<20	<40	<80	<80	<80	<40	<40
63	32	20	>640	40	<20	<20	<20	<20	<20
64	34	>1280	80	NH	NH	<40	<40	<40	<40
65	5	80	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<10
66	13	320	40	80	40	<20	<20	<40	<20
67	35	80	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40
68	37	20	320	40	20	<20	<20	<20	<20
69	43	<40	320	40	<40	<40	<40	<40	<40
70	10	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
71	31	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40

Nota. Los títulos se expresan como la inversa de la dilución. Se consideraron positivos los títulos ≥ 20 , los cuales se muestran en negrita en la tabla. NH: Neutralización al 100%" (del inglés Neutralization, *hundred percent*)

ANEXO III. Composición de soluciones y buffers

Cultivos bacterianos y preparación de bacterias competentes

- LB Lennox (Luria–Bertani): 5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona, 5 g de NaCl, H₂O destilada c.s.p. 1L. Esterilizado por calor húmedo en autoclave (Ficolnox SL 9000).
- LB Lennox sólido: 5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona, 5 g de NaCl, 15 g agar bacteriológico, H₂O destilada c.s.p. 1L. Esterilizado por calor húmedo en autoclave (Ficolnox SL 9000).
- Antibióticos: se preparan en soluciones 1000X. Las soluciones en agua se esterilizan mediante filtración con filtros de 0.22 µm estériles (Millex®-GP Filter Unit).
 - Ampicilina: 100 mg/mL en agua destilada estéril.
 - Kanamicina: 50 mg/mL en agua destilada estéril.
 - Cloranfenicol: 34 mg/mL en etanol.
- Caldo superóptimo (SOB): 5 g de extracto de levadura, 20 g de triptona, 0.5 g de NaCl, 10 mL de KCl 250 mM, se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 5N, H₂O destilada c.s.p. 1L. Esterilizado por calor húmedo en autoclave Ficolnox SL 9000. Antes de inocular, se añaden 1.25 ml de MgCl₂ 2M estéril.
- Buffer Inoue: 55 mM MnCl₂·4H₂O, 15 mM CaCl₂·2H₂O, 250 mM KCl, 10 mM PIPES (a partir de una solución 0.5 M ajustada a pH 6.7), H₂O destilada c.s.p. 1L. Se esteriliza mediante filtración con filtros de 0.22 µm estériles (Millex®-GP Filter Unit) y se almacena a -20°C hasta su uso.

Electroforesis en gel de agarosa

- Buffer TAE: 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8.0.
- Buffer naranja G 5X: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, EDTA 10 mM, 0.025% Orange G, 50% (v/v) glicerol.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

- Buffer Tris-Glicina-SDS (buffer de corrida): 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0.1% (p/v) SDS, con un pH de ~8.3.
- Buffer de carga 4X (Buffer de carga Laemmli): 200 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.4% (p/v) Azul de Bromofenol, 40% (v/v) glicerol, 8% (p/v) SDS, 5% (v/v) β-mercaptoetanol.
- Solución de tinción: Coomassie brilliant blue R-250 0.25% (p/v), etanol 45% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v).
- Solución de decoloración: etanol 40% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v).

Western blot

- Buffer de transferencia: 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0.1% (p/v) SDS, con un pH de ~8.3.
- PBS (buffer fosfato salino): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4.
- Solución de bloqueo: 1% (p/v) caseína en PBS.
- Solución de dilución: 1% (p/v) caseína en PBS-T (PBS con 0.1% (v/v) Tween-20).
- Solución de Amido Black: Amido Black 0.1% (p/v), isopropanol 25% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v).

ELISA

- Buffer de sensibilización (*coating* buffer): 10 mM Carbonato de Sodio, 90 mM Bicarbonato de Sodio, 137 mM NaCl, pH 9.6.
- Solución de lavado: PBS 1X, 0.2% (v/v) Tween-20, 18.6 g/L NaCl.
- Buffer de dilución/bloqueo: 1% (p/v) caseína en buffer de lavado.

Purificación de proteínas

- Buffer de lisis: 50 mM Fosfato de Sodio pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% (v/v) glicerol, 0.2% (v/v) Tween 20.
- Buffer A: 50 mM Fosfato de Sodio pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% (v/v) glicerol.
- Buffer B: 50 mM Fosfato de Sodio pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol 10% glicerol (v/v), 500 mM Imidazol.
- Buffer SEC: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% (v/v) glicerol, 1 mM DTT.
- Buffer de almacenamiento: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% (v/v) glicerol, 1 mM DTT.

Ensayo de actividad polimerasa

Buffer de reacción: 50 mM Hepes pH 8.0, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 10 mM DTT.