

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL



ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA UAEM

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNAM

"Desarrollo de diferentes metodologías para la purificación de la proteína NS1 y de los virus Dengue y Zika: potencial aplicación en vacunación"

TESIS

Que para obtener el título de:

LICENCIADA EN FARMACIA

presenta:

KARLA ALEJANDRA SOLIS QUINTERO

Codirectoras de tesis:

DRA. ANA CAROLINA ALCALÁ ARISTIGUIETA - UNAM - IBT

DRA. ANGÉLICA MENESES ACOSTA – UAEM

Mayo, 2021



Instituto de Biotecnología  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

La presente tesis se realizó en el laboratorio del Grupo Palomares-Ramírez, del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, en el Instituto de Biotecnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Ana Carolina Alcalá Aristiguieta. Agradezco el apoyo por la beca recibida por parte del proyecto IT200416, PAPIIT, DGAPA-UNAM.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios que me ha dado la vida, mi familia y la oportunidad de culminar este trabajo.

Agradezco a mi mamá y a mis hermanas que me han apoyado en todo, son mi pilar.

Agradezco a la Dra. Laura Alicia Palomares y al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez, que me aceptaron en su grupo, y me proporcionaron todo el material y lo necesario para trabajar.

Agradezco a Dra. Ana Carolina Alcalá Aristiguieta, mi codirectora de tesis externa del Instituto de Biotecnología UNAM, quien me brindo toda la atención, paciencia, consejos, y sobre todo enseñanzas y aprendizajes.

Agradezco a la Dra. Angélica Meneses Acosta mi codirectora de tesis interna de la Facultad de Farmacia UAEM por todo el apoyo brindado, la paciencia y su atención.

Agradezco al grupo Palomares-Ramírez: Michelle Gutiérrez, David Silverio Moreno, Alberto Porras, Mabel Rodríguez, Esmeralda Cuevas, Violeta Guadarrama, Karim Enrique Jaen, Víctor Manuel López, Juan Carlos Rivera, Selene Jocelyn Uribe y a todos por brindarme consejos y ayuda cuando la necesite. También agradezco a las técnicas: M.C. Ana Ruth Pastor, M.C. Martha Alicia Contreras, M.C Zoila Vanessa Hernández, por el apoyo en los experimentos, y sus consejos.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	iii
ÍNDICE.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ABREVIATURAS .....	xi
1. RESUMEN .....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Dengue: Aspectos generales .....	5
2.1.1. Historia y epidemiología de la enfermedad. ....	6
2.1.2. Virus Dengue: agente etiológico. ....	8
2.1.3. Proteína NS1 de Dengue .....	9
2.2. Virus del Zika: aspectos generales y la enfermedad .....	13
2.2.1. Epidemiología e historia .....	14
2.2.2. Virus Zika: agente etiológico. ....	15
2.2.3. Proteína NS1 de Zika .....	16
2.3. Vacunas .....	3
3. ANTECEDENTES .....	18
3.1. Producción <i>in vivo</i> de partículas virales.....	18
3.2. Producción <i>in vitro</i> de partículas virales.....	18

3.3.	Purificación de partículas virales.....	19
3.4.	Purificación de la proteína NS1.....	21
3.5.	Cromatografía para purificación de virus.....	22
4.	JUSTIFICACIÓN.....	23
5.	OBJETIVOS.....	24
5.1.	Objetivo general.....	24
5.2.	Objetivos particulares.....	24
6.	ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL.....	25
6.1.	Esquema de la Estrategía experimental.....	25
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1.	Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	26
7.1.1.	Líneas celulares empleadas.....	26
7.1.1.1.	Células C6/36.....	26
7.1.1.2.	Células CHO.....	26
7.1.1.3.	Células Vero.....	26
7.1.2.	Cultivo celular.....	27
7.1.2.1.	Descongelación de células.....	27
7.1.2.2.	Banco de células (congelación de células).....	27
7.2.	Propagación del stock viral.....	28
7.2.1.	Propagación de los virus Dengue y Zika en células C6/36.....	28

7.2.1.	Propagación de los virus Dengue y Zika en ratones lactantes. ....	29
7.3.	Células productoras del material para purificación .....	30
7.3.1.	CHO .....	30
7.3.1.1.	Cinética de infección de células CHO con virus Dengue. ....	30
7.3.1.2.	Purificación de la proteína NS1 por CEM. ....	30
7.3.1.3.	Purificación de la proteína NS1 por electroelución. ....	31
7.3.2.	Células C6/36.....	32
7.3.2.1.	Eliminación de albúmina mediante cromatografía por afinidad. ....	32
7.3.2.2.	Purificación de las partículas virales por Cromatografía de Exclusión Molecular (CEM). ....	33
7.3.2.3.	Purificación de partículas virales por colchón de sacarosa. ....	34
7.3.2.4.	Purificación de partículas virales con Sulfato de protamina y PEG. ....	35
7.3.2.4.1.	Eliminación de PEG 6000 por CEM.....	36
7.3.3.	Cerebro de ratones lactantes .....	36
7.4.	Identificación de virus y proteína. ....	37
7.4.1.	Cuantificación de proteína total. ....	37
7.4.2.	Western blot. ....	37
7.4.3.	Dot blot. ....	39
7.4.4.	Titulación de virus. ....	39
8.	RESULTADOS .....	41
8.1.	Células productoras del material de purificación.....	41

8.1.1. CHO .....	41
8.1.1.1. Cinética de infección con el virus Dengue 4 en CHO. ....	41
8.1.1.2. Purificación de la proteína NS1 recombinante por CEM .....	42
8.1.2. C6/36.....	44
8.1.2.1. Eliminación de la albúmina por cromatografía de afinidad.....	44
8.1.2.1.1.Purificación del virus Dengue y de la proteína NS1 con CEM. ....	51
8.1.2.2. Purificación viral por colchón de sacarosa. ....	59
8.1.2.2.1.Purificación del virus Dengue.....	59
8.1.2.2.2.Purificación del virus Zika.....	61
8.1.2.3. Purificación viral por el protocolo de Aizawa .....	62
8.1.2.3.1.Purificación de Zika.....	63
8.1.3. Cerebro de ratones lactantes .....	64
8.1.3.1. Purificación viral por el Protocolo de Aizawa .....	64
8.1.3.1.1.Purificación de Dengue 4 a partir de extracto de cerebro.....	64
8.1.3.1.2.Purificación de Dengue 2 a partir de extracto de cerebro. ....	65
8.1.3.1.2.1.Eliminación del PEG por CEM.....	69
9. DISCUSIÓN .....	72
10. CONCLUSIÓN.....	77
11. REFERENCIAS.....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1 Estructura del virus Dengue. ....	9
Figura. 2 Genoma del virus Dengue. ....	9
Figura. 3 Dímero de NS1. ....	10
Figura. 4 Hexámero de NS1. ....	11
Figura. 5 Esquema de la estrategia experimental. ....	25
Figura. 6 Corte de bandas de gel de electroforesis. ....	32
Figura. 7 Dispositivo para electroelución. ....	32
Figura. 8 Cámara de electroforesis. ....	32
Figura. 9 Plaqueo de la cinética a las 6, 8 y 24 h en CHO. ....	41
Figura. 10 CEM mediante la Superdex 200 del sobrenadante de CHO'S productoras de NS1 .....	42
Figura. 11 Western blot de la CEM de sobrenadante de CHO'S productoras de NS1 .....	43
Figura. 12 Tinción con tricloroetanol de CEM de la NS1 producida en CHO .....	43
Figura. 13 Tinción con tricloroetanol de la NS1 recuperada de la electroelución. ....	44
Figura. 14 Cromatograma de SFB al 2.5% en Blue Sepharose .....	45
Figura. 15 Gel de Electroforesis de muestras de SFB en resina blue Sepharose. ....	46
Figura. 16 Cromatograma de EMEM al 2.5% SFB en Blue Sepharose .....	47
Figura. 17 Gel de electroforesis de EMEM en la blue Sepharose .....	47
Figura. 18 Cromatograma de SFB al 2.5% por segunda vez en Blue Sepharose .....	48
Figura. 19 Cromatograma de EMEM al 2.5% SFB por segunda vez en Blue Sepharose .....	49
Figura. 20 Cromatograma de Dengue 4 en Blue Sepharose .....	49
Figura. 21 Gel de Coomassie de la eliminación de la albúmina de las muestras. ....	51
Figura. 22 CEM de Dengue 4 (con albúmina) mediante fluorescencia. ....	52



Figura. 23 CEM de Dengue 4 (con albúmina) mediante el arreglo de fotodiodos a 210nm. ..	53
Figura. 24 CEM de Dengue 4 (con albúmina) mediante el arreglo de fotodiodos a 280nm. ..	53
Figura. 25 CEM de Dengue 4 (parte 1) mediante el arreglo de fotodiodos a 260nm. Con albúmina.....	54
Figura. 26 CEM de Dengue 4 (parte 2) mediante el arreglo de fotodiodos a 260 nm. Sin albúmina.....	55
Figura. 27 CEM de Dengue 4 (parte 1) mediante el arreglo de fotodiodos a 280nm. Con albúmina.....	56
Figura. 28 CEM de Dengue 4 (parte 2) mediante el arreglo de fotodiodos a 280nm. Sin albúmina.....	57
Figura. 29 Western blot contra NS1 de la CEM de Dengue 4 (sin albúmina) .....	58
Figura. 30 Plaqueo del 1er pico de la CEM de Dengue 4 S/A.....	58
Figura. 31 Colchón de sacarosa. ....	59
Figura. 32 Coomassie de la purificación de Dengue 2 por colchón de sacarosa. ....	59
Figura. 33 Western blot de la purificación de Dengue 2 por colchón de sacarosa para detectar la proteína E .....	60
Figura. 34 Western blot de la purificación de Dengue 2 por colchón de sacarosa, 2do. intento. ....	61
Figura. 35 Western blot de la purificación de Zika por colchón de sacarosa.....	62
Figura. 36 Proceso de purificación del virus Zika por el Protocolo de Aizawa.....	63
Figura. 37 Western blot contra la proteína E de Zika producido en C6/36.....	64
Figura. 38 Proceso de purificación del virus Dengue 4 por el Protocolo de Aizawa. ....	65
Figura. 39 Proceso de purificación del virus Dengue 2 por el Protocolo de Aizawa. ....	66

Figura. 40 Western blot del proceso de purificación por el protocolo de Aizawa (contra la proteína E).....	67
Figura. 41 Ensayo de placa de la purificación de Dengue 2 a partir de extracto de cerebro...68	
Figura. 42 CEM de Dengue 2 con PEG a través de la resina G-100. ....	69
Figura. 43 CEM de Dengue 2 con PEG y tratamiento de etanol a través de la resina G-100. 70	

## ABREVIATURAS

ARN	Ácido bicínónico
BCA	Ácido ribonucleico
CEM	Cromatografía de exclusión molecular
DNV	Virus Dengue
EJ	Encefalitis japonesa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Phosphate-buffered saline (buffer fosfato salino)
PEG	Polietilenglicol
PrM	Precursora de Membrana
PVDF	Polivinilideno
RE	Retículo endoplasmático
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
UFP	Unidades formadoras de placa
VC	Virus de la encefalitis japonesa
VEJ	Volúmenes de la columna

## 1. RESUMEN

Los virus Dengue y Zika han provocado un gran impacto mundialmente pues son causantes de patologías que comprometen la vida y la calidad de ésta. A pesar de ello, aún no existe un tratamiento ni una vacuna capaz de prevenirlas de manera eficiente, por lo que es necesario contribuir al estudio de ambos virus y de su proteína NS1 multifuncional. A esta última se le han atribuido múltiples funciones el manipular de cierta forma las vías de activación del complemento; se ha encontrado en el suero de pacientes enfermos, desde que presentan fiebre, al igual que un incremento de los niveles de NS1 a la par del incremento en la carga viral. Por esta razón el objetivo de este trabajo fue desarrollar una serie de metodologías de purificación que permitan contar con preparaciones de virus y de la proteína NS1 purificados.

Para cumplir con este objetivo se obtuvieron stocks virales de Dengue y Zika propagados en cerebro de ratones lactantes y en células C6/36. A partir de los stocks se realizaron diferentes metodologías para la purificación de ambas partículas virales y de la proteína NS1. Para purificar con la misma metodología la partícula viral y la proteína NS1 (nativa) se realizó una cromatografía de exclusión molecular (CEM) con la columna Ultrahidrogel 500 (Waters). Para purificar únicamente las partículas virales se recurrió a técnicas de ultracentrifugación: 1) Colchón de sacarosa: que permite precipitar las partículas virales bajo el colchón separándolas del sobrenadante. 2) Sulfato de protamina y PEG: que precipita primero proteínas ajenas con sulfato de protamina y después las partículas virales con el PEG 6000. El PEG se eliminó con etanol o con CEM (usando la resina Sephadex G- 100). Por último, la purificación de la proteína NS1 (recombinante) se llevó a cabo mediante las técnicas: 1) CEM con la resina Superdex 200. 2) Electroelución.

La CEM con la columna de Ultrahidrogel 500 no permitió separar ni las partículas virales ni la proteína NS1. El colchón de sacarosa proporcionó partículas virales de Zika, pero

no de Dengue. La metodología con sulfato de protamina permitió obtener partículas virales viables de Dengue y Zika, pero con PEG. La NS1 se purificó utilizando ambos métodos la CEM con la Superdex 200 y la electroelución.

A partir del colchón de sacarosa se obtuvieron partículas virales puras, aunque habría que repetir ensayos para afirmar que también se encuentran viables.

La proteína NS1 recombinante solo se pudo purificar uniendo dos metodologías, la cromatografía y la electroelución, lo que la hace efectiva pero laboriosa.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Vacunas**

Una vacuna de acuerdo a la OMS es “cualquier preparación destinada a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos pudiendo estar compuesta de una suspensión de microorganismos muertos o atenuados, o de productos o derivados de microorganismos” (OMS 2020).

En la búsqueda de una vacuna contra dengue, la primera que obtuvo autorización fue la “Dengvaxia” una vacuna tetravalente de virus atenuado, que no ofrece una protección equilibrada contra todos los serotipos, aumentando el riesgo en personas vacunadas que no habían sido infectados previamente con ningún serotipo (Halstead, 2017). De esta manera se han buscado otras alternativas basadas en virus inactivados, ADN plasmídico mediante vectores, partículas VLP’s similares al virus, subunidades de proteínas recombinantes, estas últimas se han producido en diferentes hospederos, siendo las de mayor auge la proteína E y NS1. La NS1 tiene epítomos relacionados con el complejo de histocompatibilidad I y II, blancos de las células T, convirtiéndola en candidata para una vacuna (Tripathi & Shrivastava, 2018).

### **2.2. Los virus Dengue y Zika**

De acuerdo con la OMS, hasta julio del 2019 se ha transmitido el virus Zika en aproximadamente 49 países en América. En 100 de estos la enfermedad se ha vuelto endémica, y ésta se ha transformado en emergente después del brote del 2015 en Brasil y en otras partes del mundo (Alshammari et al., 2018). El Dengue es también una enfermedad emergente, amenazando a más de la mitad de la población mundial, que vive en áreas de riesgo (Ho et al., 2017), además de incrementarse el número de casos acumulados en América de 1.5 millones en los años 80’s a 16.2 millones del 2010 al 2019 (OMS, 2018), esto tan sólo en el 2015, la

OMS reportó 2.35 millones de casos en América, de estos, 10,200 eran casos de Dengue grave, terminando en 1181 casos fatales (OMS, 2018).

Se ha observado que, en las regiones endémicas de América para el virus de Dengue, también se ha reportado la presencia del virus del Zika, ya que comparten vectores de transmisión, principalmente los mosquitos del género *Aedes*. Otra similitud son sus síntomas como: fiebre, dolor de cabeza, muscular y articular, entre otros (Álvarez et al., 2018), pero un rasgo que sobresale es que se ha demostrado científicamente que los anticuerpos contra el Zika pueden potenciar la infección por el virus Dengue, aumentando el riesgo y haciendo más complicado tratar la infección (Kawecki & Christofferson, 2016).

Ambos virus son *flavivirus*, por lo tanto, presentan similitudes en su estructura, por ejemplo, tienen forma esférica y su genoma es de ARN con polaridad positiva, el cual codifica para diez proteínas: 3 estructurales y 7 no estructurales (NS). La NS1 (proteína no estructural 1) está involucrada en una variedad de efectos tanto adversos como protectores en el proceso de infección con ambos virus, por lo que la convierte en blanco de estudio para el desarrollo de una vacuna (Arredondo, Méndez & Medina, 2016).

Para desarrollar investigaciones con los virus Dengue y Zika, se deben establecer previamente protocolos para su propagación, con la finalidad de asegurar una fuente de estos agentes virales. Los métodos de propagación mayormente utilizados se basan en el pase de los virus en células de insecto C6/36 o en cerebros de ratones lactantes; ambos métodos aportan ventajas o desventajas dependiendo de los requerimientos del estudio a realizar con estos virus (Jensen, Nguyen & Jewett, 2016), (Coelho et al., 2017).

En este trabajo se plantea la purificación de las partículas virales a partir de extracto de cerebro de ratón lactante por ofrecer un alto título viral (Zompi & Harris 2012), también se purificarán las partículas virales a partir de cultivo de células C6/36 infectadas, obteniendo de

esta misma fuente, material para la purificación de la proteína NS1 (Kurosawa, Saito, Kobayashi & Okuyama, 2012).

### **2.3. Dengue: Aspectos generales**

El Dengue (DENV) es un *arbovirus* (virus transmitido por artrópodos), que pertenece a la familia *Flaviviridae*; género *Flavivirus*, en el que también se ubican otros virus de importancia sanitaria como el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el de la fiebre amarilla (YFV), Zika (ZIKV), y el del Oeste del Nilo (WNV), entre otros (Flipse & Smit, 2015), (Kuno, Chang, Tsuchiya, Karabatsos & Cropp, 1998).

El virus Dengue, causante de la enfermedad con el mismo nombre, es un gran problema de salud pública con alrededor de 100 millones de personas infectadas anualmente, generando una carga económica para la población y gobierno, principalmente en las zonas tropicales y subtropicales, donde habitan los mosquitos del género *Aedes*; principalmente *Ae. aegypti* y *Ae. Albopictus* (Guo et al., 2017), principales transmisores del virus.

La infección por cualquiera de los cuatro serotipos de Dengue (DENV1, 2, 3 y 4) se puede presentar de diversas formas: asintomática, con signos de alarma (Dengue no severo) y con signos graves (Dengue grave). En el Dengue sin síntomas de alarma es común encontrar dolor de huesos, fiebre alta, rash y dificultades respiratorias o gastrointestinales; mientras que en el Dengue no severo con síntomas de alarma se presentan los síntomas anteriores, además de derrames pleurales, hipotermia, shock, dolor de abdomen, entre otros. Por último, en el Dengue grave se observan principalmente hemorragias, dificultad para respirar, síndrome de shock del dengue (DSS) pudiendo ocasionar la muerte (Lee, Halverson & Ezinwa, 2018), (Brathwaite et al., 2012).



### **2.3.1. Historia y epidemiología de la enfermedad.**

Uno de los primeros reportes de la enfermedad causada por el virus de Dengue, pudo haber sido descrito en 1635 en la isla de Martinica, pero al carecer de un diagnóstico completo y detallado, sólo ha permanecido como una sospecha. Es en 1780, la fiebre del Dengue ya fue explícitamente reportada por Benjamín Rush en Filadelfia, EU (Brathwaite et al., 2012). Más tarde, en 1823 en Zanzibar, África, se presentan casos de esta enfermedad a la cual llamaban “*Denga*”, que se extendió por los puertos, del Mar Rojo, Golfo Pérsico, Arabia (Christie, 1882). Tras su extensión, en 1828 surge un brote de la enfermedad en la isla de Cuba, donde se le comienza a llamar “*Dunga*”, tiempo después “*Dengue*” (del castellano), (Brathwaite et al., 2012), (Muñoz, 1828), haciendo referencia a “fastidioso” y “mojigatería o prudery” nombre que lleva hoy en día (Christie, 1882). Durante el siglo XIX se suscitaron varias epidemias, en 1846 en Rio de Janeiro, Brasil donde la enfermedad fue nombrada “polka” (Tadeu & Figueiredo, 2003); continuando en Lima, Perú (1851), (Casimiro, 1890); en Alabama, Louisiana, New Orleans (1873) donde hubo alrededor de 40,000 de enfermos (Schneider & Droll, 2001); en las Bahamas y Bermuda (1882); en Texas (1885 y 1897); en Chile (1889); en Cuba (1897); en Florida (1898); y en Panamá (1904), de esta manera se siguió propagando por América latina (Brathwaite et al., 2012).

En 1924, ya se comenzaba a mencionar que el agente causante de la enfermedad del Dengue pertenecía a un grupo de virus (Harris & Duval, 1924). Y continuaron las epidemias durante el periodo de 1911-1946, donde se vieron afectadas las Islas de Caribe, Cuba, Puerto Rico, Bermudas, México, Panamá, Venezuela y al Golfo de Texas (Pinheiro & Corber, 1997). Al otro lado del mundo, en 1950, se dio a conocer la forma grave de la enfermedad en Filipinas y Tailandia (Schneider & Droll, 2001). Ésta se expandió al menos a 12 naciones de Asia y del Pacífico provocando una epidemia de la FHD (fiebre hemorrágica de dengue). Para el

continente americano, los casos de infecciones incrementaron a partir de 1960 (Tibaie, 2001), pese a que se erradicaba el mosquito *Aedes aegypti*, en algunas zonas, pocos años después se reportaba la presencia del mosquito y posterior a esto los casos de dengue grave y FHD (Schneider & Droll, 2001).

Se estima que hay 390 millones de infecciones por año en el mundo (Low, Ogston, Yong, Gan & Chee, 2018), el 75% de los casos de dengue presentan síntomas leves o son asintomáticos; menos de 1% se reportan como casos fatales, con alrededor de 9000 por año. De los casos mortales, el 90% de las muertes son principalmente niños menores a 15 años. Los factores que contribuyen al desarrollo de Dengue grave son principalmente una segunda infección con un serotipo heterólogo, además de la genética de la cepa DENV, la edad, condiciones inmunes del paciente, entre otros (Nunes et al., 2018).

Otra estimación muestra que durante en el 2011 se presentaron 139,000 casos de dengue sintomáticos y alrededor de 119 muertes en México, donde es recurrente la transmisión en 28 de los 32 estados, produciendo una gran carga económica, con un costo anual de aproximadamente \$2189.6 millones de pesos, de los cuales \$1120.56 millones le compete a la enfermedad y el resto a control de vectores; y podría aumentar por los casos no reportados. En un estudio en Morelos, Axochiapan y Tepalcingo, del total de las personas infectadas que mostraban sintomatología solo el 67% acudieron al médico y solo el 21% se informó al sistema de vigilancia de Morelos. El costo estimado en un hospital de tercer nivel o de alta especialidad fue de \$240 dólares por cama al día y \$65 dólares por la visita ambulatoria (Undurraga et al., 2015).

La enfermedad no sólo genera un costo económico, también genera una carente calidad de vida, aunque en la mayoría su estado de salud sea bueno previo al episodio de dengue. Los puntos más afectados durante el episodio de dengue son el sueño, energía, dolor, cognición,

movilidad y, por lo tanto, un problema para tener un cuidado personal, además de la depresión. Mientras que en los pacientes ambulatorios principalmente se presenta la fiebre del dengue y en hospitalizados con un 44.8% la fiebre hemorrágica o el dengue intermedio (Martelli et al., 2011).

En México, la carga económica general que incluye gastos médicos para el sistema de salud, del paciente y otros aspectos, entre los años 2012-2016 ascendió a \$144, \$161, \$133, \$131 y \$130 millones de dólares respectivamente (Zubieta et al., 2018), sin embargo, a pesar de la disminución de casos en el 2016 y por lo tanto en el gasto, a inicios del 2019 y hasta noviembre del mismo año en América se reportaron 2,870,402 casos de dengue, el mayor registrado en la historia hasta ese momento con 1,279 muertes y 26,406 casos de dengue grave (OPS/OMS, 2019).

### **2.3.2. Virus Dengue: agente etiológico.**

El Dengue es un virus envuelto de aproximadamente 50 nm y forma icosaédrica que está rodeado por una membrana lipídica, obtenida de las células hospederas. De esta manera está protegido y es transportado el genoma viral, el cual es una hebra de ARN de polaridad positiva (Velandia & Castellanos, 2011), con aproximadamente 10,700 nucleótidos, que codifica para una poliproteína de 3,411 aminoácidos, que se traduce en 3 proteínas estructurales que conforman los componentes del virión (*Figura 1*), la E (envoltura), M (membrana), C (Cápside) y 7 no estructurales la NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B y NS5 que están involucradas en procesos de replicación y ensamblaje (*Figura 2*) (Bäck & Lundkvist, 2013). La proteína prM o precursora de la proteína M, gracias a la furina se divide en dos, generando el péptido pr y la proteína M. La proteína E al ser la más abundante en la estructura del virus y unirse al receptor

celular la hace blanco de los anticuerpos, mismos que sirven para identificación viral en la investigación (López & Mota, 2000).

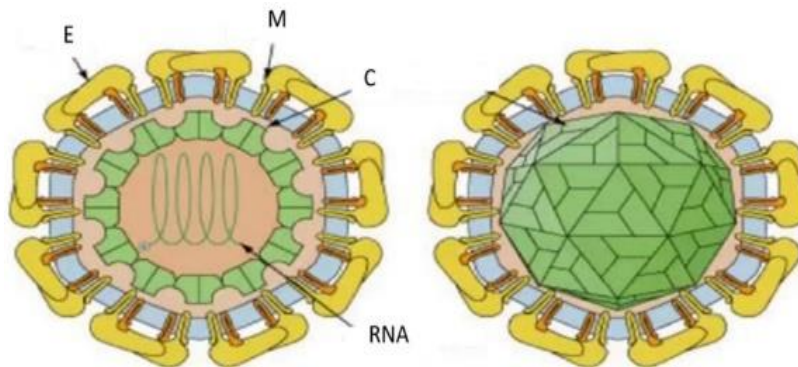


Figura. 1 Estructura del virus Dengue.  
En amarillo se muestra la proteína E, en verde la proteína C, en azul la proteína M y en el centro en color verde el RNA.

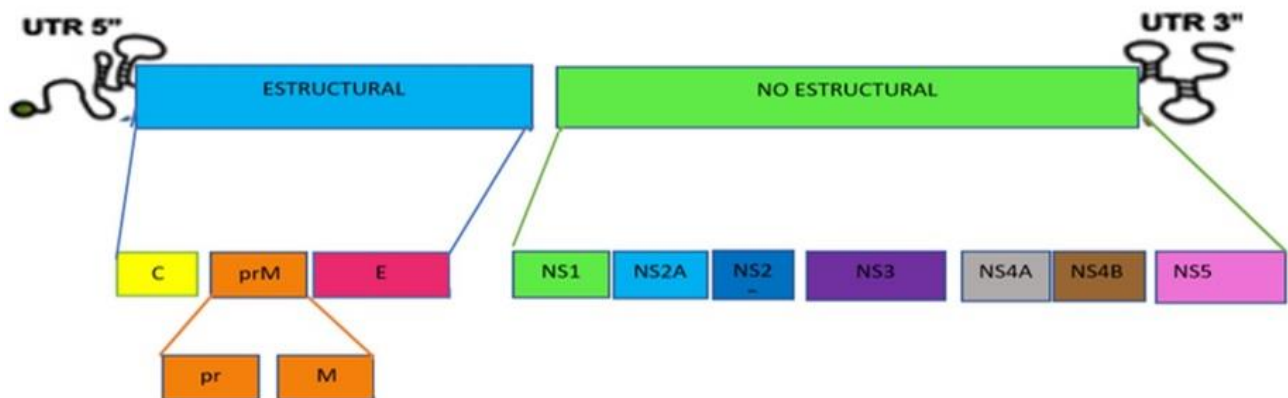


Figura. 2 Genoma del virus Dengue.  
El ARN viral codifica para 7 proteínas no estructurales NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5 y 3 proteínas estructurales E (envoltura), C (Cápside) y M (membrana). Esta última se desprende de la prM.

### 2.3.3. Proteína NS1 de Dengue

El gen que codifica para la proteína NS1 posee un tamaño de 1062 nucleótidos que generan una proteína de 354 aminoácidos con un peso molecular de entre 48 y 54 kDa (Perera & Kuhn, 2008), dependiendo del estatus de glicosilación. La proteína NS1 tiene un alto grado

de conservación entre los 4 serotipos, cuenta con dos sitios de glicosilación en la asparagina (Asn) 130 y 207, además de tener 12 cisteínas (Cys) también conservadas (Fan, Liu & Yuan, 2014). Esta proteína en su forma inmadura es un monómero con patrón de glicosilación variable, que se transforma en dímeros muy estables pero lábiles al calor y estos, a su vez, en hexámeros menos estables, ambos solubles (Perera & Kuhn, 2008), (Jason, Shamala & Azliyati, 2017). Para la formación de los dímeros, el extremo C-terminal de la propia proteína es sumamente esencial (Fan et al., 2014). Dentro de la célula se le vincula a la proteína con las membranas y fuera sobre la superficie de la célula<sup>40</sup>. Durante su procesamiento, la NS1 es traslocada hacia el lumen del RE, donde adquiere carbohidratos ricos en manosas, se dimeriza inmediatamente, teniendo tres rutas a seguir la replicación viral, la membrana plasmática y el medio extracelular (Scaturro, Cortese, Chatel-Chaix, Fischl & Bartenschlager, 2015).

En células de mamíferos se ha evidenciado que la NS1 en su forma dimérica se traslada hacia el aparato de Golgi, donde se modifica con la adición de un azúcar complejo al glucano N130, conservando al glucano 207 alto en manosas. La NS1 cuenta también con una parte hidrofóbica que la mantiene asociada a la membrana y puede permanecer en las vesículas celulares antes de asociarse a ésta, para finalmente ser secretada en forma de hexámero (Fan et al., 2014).

La proteína en forma de dímero cuenta con tres dominios: a)  $\beta$ -roll, conformado por dos horquillas  $\beta$  que se entrelazan, b) Wing, conformado por un subdominio  $\alpha / \beta$  y un conector y c)  $\beta$ -escalera, formada por 18 cadenas  $\beta$  antiparalelas ensambladas en una lámina  $\beta$  del largo del dímero (Figura 3) (Scaturro et al., 2015).

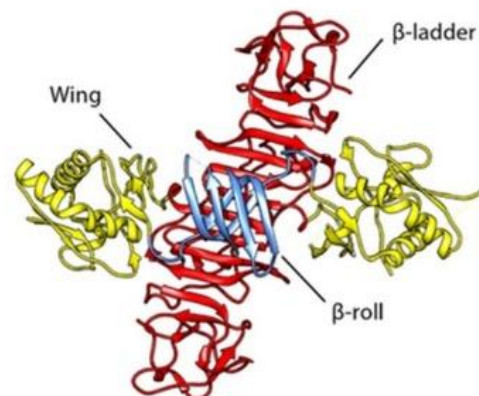
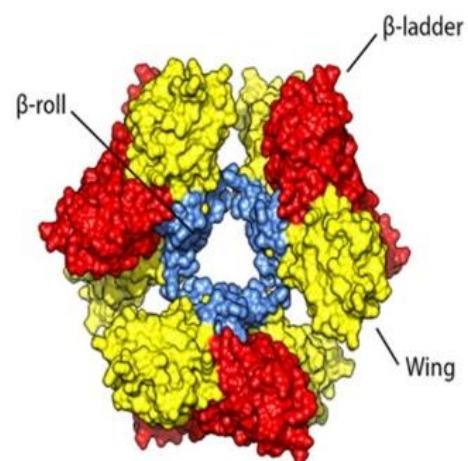


Figura. 3 Dímero de NS1.

La proteína NS1 es secretada en forma de hexámero (300 kDa) que consta de tres dímeros enlazados no covalentemente (Jason et al., 2017), que le dan la estructura de un barril hueco y abierto por ambos lados (*Figura 4*), con un interior abundante en lípidos necesarios para el ensamblaje y salida de la célula (Gutsche et al., 2011). El hexámero NS1 tiene el roll  $\beta$  al interior del barril, mientras que las  $\beta$ -escalera y los bucles del Wing hacia afuera (Scaturro et al., 2015). Siendo el hexámero su forma oligomérica principal extracelularmente (Jason et al., 2017).



*Figura. 4 Hexámero de NS1.*

En personas infectadas con Dengue, es posible encontrar en su suero la NS1, desde que presentan fiebre hasta que se encuentran enfermos (Gutsche et al., 2011), reportándose hasta 50  $\mu\text{g/mL}$  en pacientes que desarrollaron la enfermedad, lo que muestra una relación entre los niveles de la NS1 secretada y la patogénesis del virus Dengue (Alcon et al., 2002). Adicionalmente, también se ha reportado que el incremento de los niveles de NS1 se presentan a la par de un incremento en la carga viral (Jason et al., 2017). Por otra parte, los pacientes infectados también desarrollan niveles importantes de anticuerpos frente a la proteína NS1, los cuales se han reportado participan en procesos de patogénesis durante la infección como la permeabilidad vascular que provoca y lisis en el endotelio (Velandia & Castellanos, 2011).

La proteína NS1 unida a la membrana o en su forma secretada, manipula de cierta forma las vías de activación del complemento, al antagonizar la activación del complemento y deprimirlo uniéndose a proteínas del complemento como la C1s, el C4 y al factor H, evitando

que ejerzan su función, y por tanto, contrarrestando la respuesta inmune del hospedero (Fan et al., 2014), (Gutsche et al., 2011). *In vitro*, se ha visto que los anticuerpos IgG contra la NS1 de Dengue y JEV obtenidos de sueros llegan a estimular mediante el complemento una lisis en células infectadas y no infectadas, lo que provoca un sangrado y un derrame hacia el espacio extravascular que son característicos del Dengue grave (Velandia & Castellanos, 2011).

Una de las muchas funciones de la proteína NS1 es el promover la replicación del ARN, que se demostró cuando al realizar una mutación de alanina en la Asn 207, se retrasó la replicación viral y el efecto citopático. Otros estudios demostraron que con una mutación de un sitio de Cys y una deleción C- terminal se eliminó la replicación del virus, lo que no ocurrió con las mutaciones en la Asn 130 y la Glu 173, que solo es semejante su fenotipo al virus de tipo silvestre (Fan et al., 2014). Continuando con las mutaciones, se eliminó del genoma la porción que codifica para la NS1 y no hubo replicación, pero cuando se expresó en condiciones anormales, NS1 *in trans*, sí se llevó a cabo la replicación. Por lo tanto, la NS1 tiene un papel importante y esencial para que se pueda llevar a cabo la función viral (Scaturro et al., 2015).

La proteína NS1 también se ha encargado de mejorar la producción de las partículas virales, ya que interactúa con ellas mediante sus proteínas estructurales, además de contar con funciones en el ensamblaje (Scaturro et al., 2015) y mejorar la infección en hepatocitos previamente incubados con NS1 soluble de la misma cepa (Fan et al., 2014), (Gutsche et al., 2011), pues de alguna manera la presencia de lípidos como triglicéridos, ésteres de colesterol y fosfolípidos en la proteína facilita su difusión, pues imita a las lipoproteínas plasmáticas y a las HDL relacionadas con la homeostasis vascular (Gutsche et al., 2011).

Contradictoriamente, los anticuerpos dirigidos a regiones específicas de la NS1 también han demostrado ser protectores en modelos murinos retados con concentraciones letales del virus dengue, lo que la hace atractiva como inmunógeno vacunal. La multiplicidad de funciones

de la NS1 en el contexto de la infección con Dengue y Zika, la convierte en un blanco muy importante de investigación, debido a qué entender sus mecanismos específicos tanto de patogénesis como de protección aportará datos para poder utilizarla como blanco terapéutico o inmunógeno (Alcon et al., 2002).

#### **2.4. Virus del Zika: aspectos generales y la enfermedad.**

Entre el 2015 y 2016, el Zika se esparció en América causando brotes en alrededor de 47 países. A inicios del 2017, su incidencia bajó y en este mismo año, a partir del 23 de julio, el CDC (Centro de Control y Prevención de Enfermedades, E. U. A.) denominó a 95 naciones como áreas en riesgo por transmisión de Zika (Oduyebo et al., 2017) de los cuales gran parte son zonas tropicales y subtropicales, con alta probabilidad de volverse una enfermedad endémica (Wong, Poon & Wong, 2016).

El virus del Zika pertenece al género *flavivirus* y está estrechamente relacionado con el virus Dengue genética y estructuralmente. La NS1 es la proteína prueba de esto, pues está generalmente conservada entre los flavivirus, aunque también se sabe que contiene epítomos de reacción cruzada y son específicos del serotipo dentro de los virus del dengue (Jason et al., 2017). El virus Zika comparte el modo de transmisión vectorial con el virus Dengue y, a diferencia de dengue, éste también puede transmitirse de un humano a otro por vía sexual (Heinz & Stiasny, 2017). Los síntomas iniciales de la infección con Zika son similares a los de Dengue, por lo que clínicamente se complica su diferenciación. Sin embargo, las formas graves de ambas enfermedades presentan un espectro de manifestaciones muy diferentes. La infección con Zika es responsable de malformaciones genéticas en el feto que comprometen su vida o causan invalidez de por vida. Adicionalmente, la infección con Zika se relaciona con el



desarrollo del síndrome de Guillain-Barre en adultos, el cual es altamente incapacitante (Oduyebo et al., 2017).

#### **2.4.1. Epidemiología e historia.**

En 1947 en la ciudad de Entebbe, península del lago Victoria, en el centro de Uganda, África, se aisló el virus de Zika de un mono *Rhesus* centinela. Un año después, se detectó en mosquitos *Aedes africanus* y, en 1950, se documentó el aislamiento del virus en humanos en Nigeria, Tanzania y Uganda. De este último país se sospecha surgió el linaje africano, aunque se sugiere que una cepa también de Uganda se esparció a Malasia y Micronesia dando lugar a el linaje asiático (Wong, 2016) el cual llegó a Asia en 1970, cuando se informó de casos en Indonesia y Pakistán (Khaiboullina et al., 2018). Más tarde en el 2007, se dio un brote en el conjunto de islas de Micronesia y varios en Oceanía, iniciando con la isla Yap (Heinz & Stiasny, 2017), (Wong, 2016), en el que se confirmaron 49 casos y 59 probables (Wikan & Smith, 2016). En el 2013, en la Polinesia Francesa, se asoció la infección por el virus Zika y el síndrome de Guillain-Barré (Pierson & Graham, 2016). En el 2014, se reporta la presencia del Zika en América, en un brote en la Isla de Pascua, y en el 2015 en Brasil, iniciando una gran epidemia en América. En el 2016, se reportaron más de 2000 casos de infección por Zika y 118,000 sospechosos (Wong, 2016). De acuerdo con la OMS, en América puede haber hasta más de 4 millones de infecciones anualmente y se calcula que hay 2,17 mil millones de habitantes en zonas de riesgo (Heinz & Stiasny, 2017).

En México, el primer caso autóctono o infección adquirida localmente de Zika fue en Monterrey, Nuevo León, seguido de uno en Chiapas, que fueron notificados por el Punto Focal Nacional (PFN) del Reglamento Sanitario Internacional (NFI) en el 2015. La Secretaría de Salud a partir de la semana 34 del 2017, informó de casos autóctonos de Zika en 27 de 32

estados, donde los estados con más alta incidencia fueron: Yucatán con 61 casos por 100,000 habitantes y Colima con 40 casos por 100,000 (OPS/OMS, 2017).

Debido al impacto del Zika y su importancia en la Salud Pública, la OMS (2016) decretó como prioridad el desarrollo de una vacuna, con el fin de proteger a mujeres embarazadas frente a la infección con Zika (Hombach, Friede, Moorphy, Costello & Kieny, 2016). En México, entre el 2015 y 2017, hubo 5,667 casos confirmados de Zika en mujeres embarazadas, reportados por la Secretaría de Salud, siendo Yucatán el estado más afectado con 924 casos. Durante el mismo periodo, se reportaron 1131 casos de síndrome de Guillain-Barré, 11 de ellos con certeza de la asociación con el Zika (OPS/OMS, 2017).

#### **2.4.2. Virus Zika: agente etiológico.**

El origen del virus Zika se remonta a 1947, cuando en un estudio de vigilancia de fiebre amarilla en el bosque de Zika en Uganda se aisló el virus de la sangre de un mono que presentó fiebre elevada. A este virus aislado se le denominó cepa 766 (Hayes, 2009).

Zika es un virus de envoltura lipídica de aproximadamente 50 nm y de ARN monocatenario positivo (Nambala & Su, 2018), cuyo genoma contiene 10,794 nucleótidos que codifican a 3419 aminoácidos (Kuno & Chang 2007). Similar al de otros flavivirus y codifica de su extremo N al C de la poliproteína, para 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales (Wong, 2016). Las 3 proteínas estructurales son la E de envoltura, la prM como precursor de membrana y la C de cápside, todas relacionadas en el ensamblaje viral, entrada y salida del hospedero. Las 7 no estructurales son NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B y NS5, a las cuales se les atribuye la replicación y la evasión de la respuesta inmune (Nambala & Su, 2018).

### **2.4.3. Proteína NS1 de Zika.**

La NS1, es la única proteína no estructural secretada extracelularmente, por lo tanto, puede manipular las señales del sistema inmune innato y antagonizar el complemento además de ayudar a la replicación de ARN; se sugiere que causa daño en plaquetas y células endoteliales (Wong, 2016).

La NS1 (48 kDa) es una glicoproteína multifuncional, con un dinamismo conformacional, que se encuentra intracelularmente y se secreta al medio extracelular. Esta proteína, al igual que en Dengue, es un biomarcador para diagnosticar la enfermedad y comparte un 82% de semejanza en sus aminoácidos con la NS1 del virus de la fiebre amarilla YFV. Para que se procese la proteína NS1, su forma monomérica N-glicosilada forma un homodímero que puede asociarse con lípidos, y gran parte de estos dímeros permanecen unidos a complejos de replicación viral, otra parte se dirige hacia la membrana plasmática, y el resto es secretada de forma hexamérica (Viranaicken et al., 2018).

Dentro de la célula infectada, la NS1 existe como un dímero esencial para replicar el genoma viral. La NS1 (352 aminoácidos) extracelular contiene seis enlaces disulfuro intramoleculares que le dan estabilidad, es secretada por las células infectadas como una lipoproteína hexamérica, que le permite cumplir con funciones inmunomoduladoras, evadiendo la respuesta inmune, interactuando con el sistema del complemento, inhibiendo la producción del interferón (IFN) tipo I cuando se forma el complejo TBK1 (involucrado en la organización de los centrosomas), modulando la interacción entre el IFN del tipo I y el inflammasoma, lo que la convierte en un importante factor de virulencia (Freire et al., 2017), (Viranaicken et al., 2018), (Xia et al., 2018), (Zheng et al., 2018).

La NS1 muy aparte de sus muchas funciones, es capaz de generar una protección parcial contra la infección, esto ha sido demostrado a partir de la NS1 de algunos flavivirus, en

animales sin anticuerpos neutralizantes (Li et al., 2018). De igual manera, los anticuerpos generados contra la NS1 protegen de la infección de ZIKV (Viranaicken et al., 2018), por lo que la NS1 y sus anticuerpos se visualizan como candidatos terapéuticos o vacunas para este virus.

### **3. ANTECEDENTES.**

#### **3.1. Producción *in vivo* de las partículas virales de Zika.**

Hace cinco décadas, para aislar las cepas de Zika se molían los mosquitos con vidrio en polvo en un mortero, agregando penicilina y un buffer de fosfatos (pH 7.4) con albúmina al 0.75%. Esta suspensión se centrifugaba y, el sobrenadante era inoculado intracerebral, intraperitoneal o subcutánea en ratones suizos albinos lactantes (Lee & Moore, 1972), y se mostró que al inocular intracerebralmente a los ratones lactantes, las células astrogiales y neuronas se agrandaban rápidamente, lo que indicaba que había replicación viral en ellas (Bell, Field & Narang, 1971). De esta manera, el ratón adulto o lactante pasó a ser un modelo ideal para la producción en cerebro de virus con altos títulos (Lee & Moore, 1972), (Gard & Pedersen, 1941).

#### **3.2. Producción *in vitro* de las partículas virales de Dengue y Zika.**

Con el fin de disminuir el sacrificio de modelos animales como los ratones y de aprovechar el uso de uno de sus vectores naturales para su estudio, el virus Dengue y otros flavivirus, son comúnmente propagados y estudiados en células de insecto *Aedes albopictus* C6/36 adherentes (Sakoonwatanyoo, Boonsanay & Smith, 2006). Las células C6/36 son cultivadas a 28°C, en medio EMEM (Medio Esencial Mínimo Eagle) suplementado con 10% SFB (Suero fetal bovino) y con 0.5% de FBS cuando son inoculadas (Kurosawa, Saito, Kobayashi & Okuyama, 2012). También se han cultivado en medio DMEM (Eagle modificado de Dulbecco) al 10% de SFB, con 0.29 mg/mL de L-glutamina, penicilina y estreptomicina (Álvarez et al., 2012). Otro medio utilizado, aunque no con tanta frecuencia, es el medio Leibowitz L-15 suplementado con 2% de SFB, gentamicina, anfotericina B y penicilina

(Chaves et al., 2018). Sin embargo, las C6/36 no son la única línea celular que se utiliza para este fin, las células Vero (de mamífero) también han sido utilizadas comúnmente para propagar Dengue, Zika y otros flavivirus, purificarlos y aislar su ARN del sobrenadante del cultivo (Lemos, Guillén, Fernández, Díaz & Colarte, 2003). Los títulos virales obtenidos al utilizar las líneas celulares establecidas varían dependiendo del agente viral (Coelho et al., 2017).

### **3.3.Purificación de partículas virales.**

A lo largo del tiempo se han presentado una variedad de metodologías para purificar virus con diversos fines, los que incluyen su estudio y el desarrollo de vacunas. En 1932, se reportó la purificación del virus de la poliomielitis que, al ser absorbido e inactivado en un gel de alúmina a pH ácido y al cambiar el pH a básico, la absorción e inactivación era reversible liberando al virus en su forma activa (Sabin, 1932). Dos años después, se purificó parcialmente el virus de la fiebre amarilla por absorción sobre caolín y elución selectiva con amoníaco diluido (Hughes, 1934). En esa misma década ya se mencionaba a la ultracentrifugación como una técnica para concentrar altos volúmenes de preparaciones virales, sin embargo, no los purificaba, por lo que se buscaba que junto con otras técnicas se obtuvieran muestras concentradas y puras de virus (Galloway & Schlesinger, 1937). Fue así como se logró purificar los virus de la encefalomiélitis equina y del papiloma de conejo por centrifugación diferencial de extractos de los tejidos infectados (Gard & Pedersen, 1941). Más tarde, se describieron una serie de técnicas que ayudaron a purificar parcialmente el virus de la poliomielitis, haciendo uso de la extracción con éter, precipitación con sulfato de amonio, filtración y ultracentrifugación (Clark, Rasmussen & White, 1941). Mientras que para purificar el virus influenza se utilizaba la precipitación con bicarbonato de calcio, absorbiendo al virus,

separando los precipitados por centrifugación y su posterior resuspensión en una solución donde el bicarbonato de calcio era disuelto, liberando de esta manera a los virus (Zwart, 1949).

Lo anterior hizo posible que para 1947 ya se contara con agentes virales purificados que eran utilizados en preparaciones vacunales de virus influenza (Sigel, 1948) y encefalitis japonesa, pero con la finalidad de mejorar la inmunogenicidad y pureza de éstas, se observó que, al agregar sulfato de protamina a las suspensiones de tejido infectado con el virus, se generaban flóculos de componentes ajenos al virus, dejando el sobrenadante que contenía al virus parcialmente puro. De igual manera se probó con otros agentes virales, observándose lo mismo para los virus de la fiebre de la garrapata de Colorado, de la encefalomiелitis equina de tipo occidental, de la encefalomiocarditis, de la poliomiелitis, de la encefalitis rusa de primavera-verano, de la encefalitis de San Luis y del oeste del Nilo. Sin embargo, hubo algunos otros que sí se precipitaron como fueron el Herpes, la Coriomeningitis, la encefalomiелitis murina, la rabia y la Vaccinia (Warren, Weil, Russ & Jeffries, 1949). Para la purificación del virus Dengue, las primeras técnicas se basaron en la precipitación con etanol (Yaoi, Tagaya, & Ozawa, 1954) y la absorción en caolín (mineral de arcilla alto en silicio) para eluirlo posteriormente (Hotta, 1953). Más recientemente, se han aplicado otras metodologías como la cromatografía de hidroxiapatita-cerámica con una recuperación del 60 a 70% del virus Dengue 2 con actividad infecciosa (Kurosawa et al., 2012) y en los últimos años el protocolo sin gradiente, descrito por Jensen S. M. y colaboradores (2016), en el que realiza un colchón de sacarosa al 20% y la ultracentrifugación tradicional, precipitando las partículas virales de manera selectiva (Jensen et al., 2016), principio en el que se basa este trabajo.

Otras metodologías clásicas para purificación viral se basan en la precipitación con PEG-6000, la filtración con tamiz molecular (Zhang, Chan, Tan & Ooi, 2014), y, el gradiente de sacarosa discontinuo (Coelho et al., 2017). El protocolo descrito por Aizawa y colaboradores

(1980) es importante cuando se habla de la purificación en grandes volúmenes, en el cual el virus de la encefalitis japonesa (JEV) fue propagado en cerebro de ratón adulto por el alto rendimiento que ofrecía y por ser una fuente de virus para la vacuna contra el JEV. De acuerdo con este protocolo, el virus es tratado con sulfato de protamina que precipita a las proteínas ajenas del virus, lo que permite separarlas mediante ultracentrifugación, y, posteriormente, precipitar las partículas virales con polietilenglicol 6,000, disminuyendo la hemoglobina de ratón. Lo recuperado es infectivo en un 100% y la eliminación del polietilenglicol 6,000 se realiza mediante precipitación con etanol (Aizawa, Hasegawa, Chih-Yuan & Yoshioka, 1980).

### **3.4. Purificación de la proteína NS1.**

La NS1, al ser la única proteína no estructural secretada al medio extracelular, puede obtenerse a partir de sobrenadantes de cultivo de células de mamífero e insecto infectadas con el virus Dengue o Zika, pero el proceso es costoso, largo, trabajoso y no ha ofrecido rendimientos altos. Por lo tanto, se han buscado varias alternativas para producir la proteína NS1 de forma recombinante en bacterias como *Escherichia coli*, clonando en vectores de expresión la región genética que codifica para la NS1, generalmente expresándola con un tag o etiqueta de 6 Histidinas en el extremo N-terminal, lo que facilita su purificación por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) en condiciones desnaturizantes, sin embargo, esta aproximación no permite obtener estrictamente a la NS1 en su forma nativa (Lemos et al., 2003).

Para obtener la proteína NS1 en su forma nativa, el grupo de Rozen-Gagnon (2011), implementó una columna de inmunoafinidad que está conformada por anticuerpos monoclonales de ratón contra la NS1 y una resina de acoplamiento. De esta manera, la columna retiene la NS1 que etiquetaron con SUMOstar (un tag de fusión para aumentar el plegamiento



de proteínas y la solubilidad) y la eluyen con un cambio de pH. La etiqueta es retirada por un tratamiento de proteasas y la proteína en su forma nativa se pasa a través de una columna analítica, para separarse mediante cromatografía de exclusión molecular (CEM), (Rozen, Moreland, Ruedl & Vasudevan, 2012).

### **3.5.Cromatografía para purificación de virus.**

La cromatografía es una técnica que permite la separación de los compuestos de una mezcla con diferentes propiedades. Existen diferentes tipos de cromatografía, entre ellas: la de exclusión molecular que se utiliza para purificar fagos, mediante la resina Sephacryl S-500 o la resina Sepharose CL4B, las cuales después de la precipitación con PEG de una suspensión viral, se utilizan para eliminar prácticamente todos los contaminantes (Camacho et al., 2012). También se ha reportado la purificación cromatográfica para virus adenoasociados recombinantes del serotipo 1 (rAAV1) (Tomono et al., 2018) y para el virus de la influenza A. Para este último, se han utilizado dos tipos de cromatografía de exclusión molecular con las resinas: Sepharose 4 FF y de intercambio aniónico, obteniendo buenos rendimientos partiendo de virus producidos desde cultivos celulares (Kalbfuss, Wolff, Morenweiser & Reichl, 2007).

## 4. JUSTIFICACIÓN

El Dengue y Zika son virus de gran impacto a nivel mundial, pudiendo ocasionar patologías que comprometen la calidad de vida de los pacientes, generando en sus formas graves síndromes hemorrágicos y malformaciones fetales, respectivamente. El genoma de ambos virus codifica para la proteína NS1, la cual es secretada al espacio extracelular junto con las partículas virales y está involucrada en diferentes procesos de patogénesis durante el curso de la infección con ambos virus. Por otra parte, ciertos anticuerpos que se generan contra ella son capaces de conferir protección frente a dosis letales de la enfermedad. A pesar de la repercusión de ambas enfermedades, aún no existe un tratamiento específico para combatir las, ni una vacuna verdaderamente eficiente capaz de prevenirlas. Por lo que es necesario seguir contribuyendo con el estudio de ambos virus. Con base en lo anterior, contar con preparaciones purificadas tanto de virus como de la proteína NS1, es un aporte importante para aquellos estudios donde se requiera evaluar la respuesta del hospedero específicamente frente al virus o a la proteína NS1, eliminando los compuestos del medio y de la célula hospedera que pudieran interferir, actuar como antígenos o disparar una respuesta inmune inespecífica, dejando únicamente las funciones específicas de la proteína NS1, la cual puede ser protagonista de una posible vacuna contra la enfermedad.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1.Objetivo general**

Desarrollar varias metodologías para la purificación de partículas virales y de la proteína NS1 de los flavivirus Dengue y Zika, para establecer las condiciones que permitan utilizarlas en el desarrollo de vacunas.

### **5.2.Objetivos particulares:**

- Aumentar el stock viral inicial de Dengue y Zika a partir de células C6/36, CHO y en ratones lactantes para la purificación.
- Comparar la purificación de los virus Dengue y Zika por métodos de ultracentrifugación.
- Comparar la purificación de la proteína NS1 y los virus Dengue y Zika por métodos cromatográficos.
- Adaptar la purificación de la proteína NS1 recombinante a partir de sobrenadantes de cultivos celulares por un método cromatográfico.
- Evaluar la presencia de los virus Dengue y Zika y de la proteína NS1 en las muestras purificadas.
- Evaluar cuantitativamente los virus Dengue y Zika a partir de células Vero.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### 6.1. Esquema de la Estrategia experimental

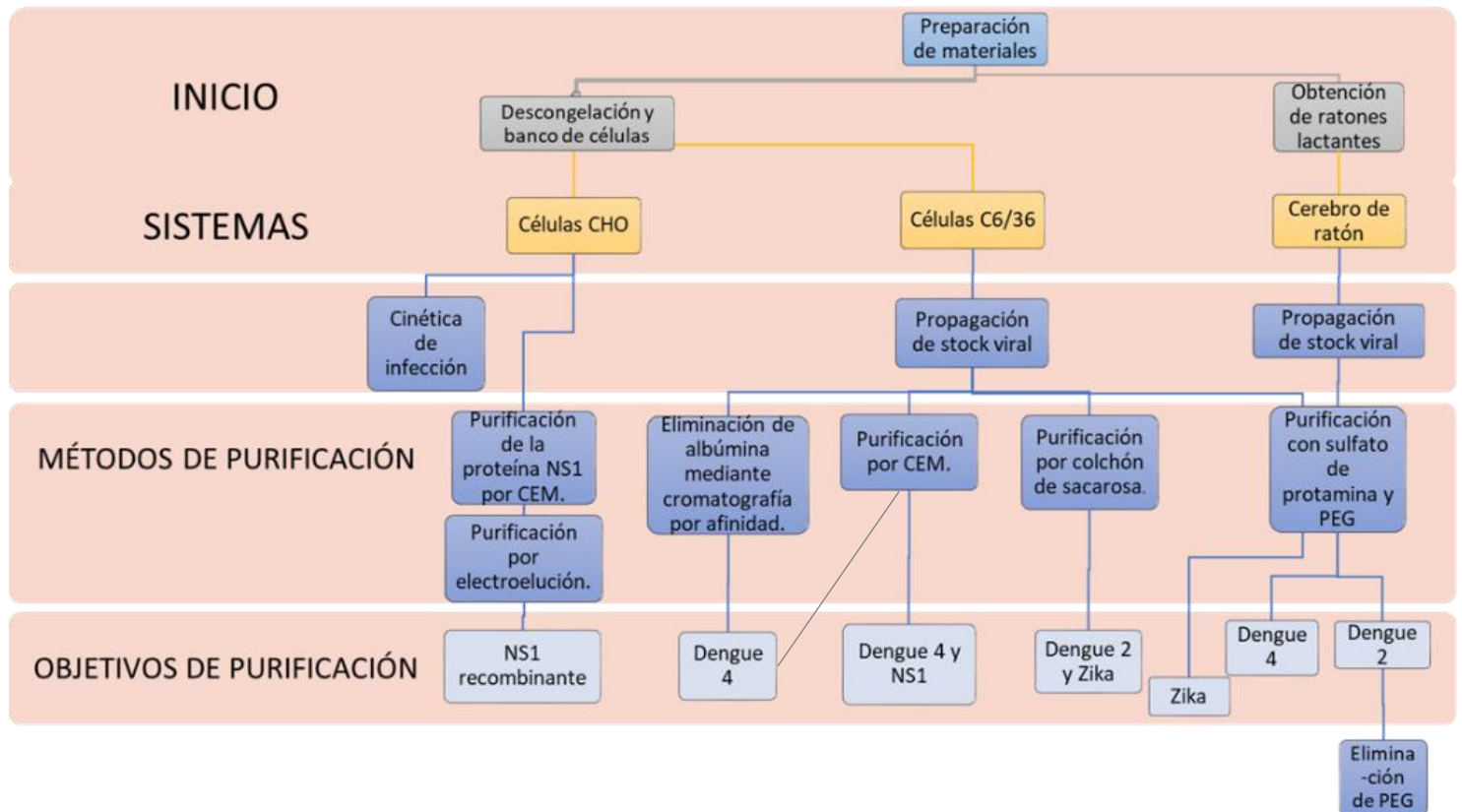


Figura. 5 Esquema de la estrategia experimental

Se parte de la obtención de las líneas celulares productoras de las partículas virales, evaluando diferentes metodologías para su purificación.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **7.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo.**

#### **7.1.1. Líneas celulares empleadas.**

##### **7.1.1.1. Células C6/36.**

La línea celular C6/36 de *Aedes albopictus* (Sakoonwatanyoo et al.2006) se cultivó en medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, ATCC®) suplementado con SFB al 5% en frascos T25 y T75 (Corning®). Se incubaron a una temperatura de 28°C, con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Estas células se utilizaron para la propagación los virus Dengue y Zika.

##### **7.1.1.2. Células CHO-S.**

Las células CHO-S (modificadas) provienen de ovario de hámster chino (Sánchez, Ángel, & Flores, 1999). En este trabajo, se cultivaron en suspensión en un medio CD FortiCHO (Gibco™) adicionado con 8 mM L- glutamina y se incubaron a 37 °C en agitación constante a 130 rpm, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 8% en matraces de 125 mL. Estas células se cultivaron para hacer ensayos de infección viral y para la producción de la proteína NS1 recombinante.

##### **7.1.1.3. Células Vero.**

Las Vero son células de mamífero epiteliales de riñón de mono verde africano (Álvarez et al., 2010), las cuales fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucosa, Sigma Aldrich) adicionado con 3.7 g de bicarbonato de sodio, a pH 7.4 (ajustado con una solución de HCl). El medio se esterilizó mediante una unidad de filtración dentro de una campana de flujo laminar (Clase II tipo A/B3, NUAIRE®, modelo UN-1425-400) y fue suplementado con 5% de SFB. Las células se incubaron en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al

5% a 37°C en frascos T25, T75 para la propagación viral o en microplacas de 24 pozos para llevar a cabo los ensayos de placa para la titulación viral.

### **7.1.2. Cultivo celular.**

#### **7.1.2.1. Descongelación de células.**

Para iniciar los cultivos celulares en adherencia, se descongelaron crioviales de células C6/36 o Vero. El proceso de descongelación se llevó a cabo de la siguiente manera: se extrajo un criovial del tanque de nitrógeno líquido donde son almacenados los bancos celulares. Previo a esto, ya se contaba con frascos T25 que contenían el medio específico de crecimiento. Una vez descongelados los crioviales, se aspiró el contenido con pipeta serológica y se traspasaron al frasco T25. Inmediatamente, los frascos se trasladaron a incubadoras con la temperatura y atmósfera de CO<sub>2</sub> específicas para cada tipo celular. Luego de dos horas, se recambió el medio de los T25, para el eliminar el DMSO (dimetilsulfóxido) procedente del medio de congelación. Todos los procesos de descongelación se llevaron a cabo en campanas de flujo laminar.

#### **7.1.2.2. Banco de células (congelación de células).**

Con el fin de preservar las células y contar con respaldo de este material a lo largo del proyecto, se realizaron bancos de las líneas celulares C6/36 y Vero, utilizadas en este trabajo. Para ello, se retiró el sobrenadante, se despegaron las células con tripsina (Vero) o con un raspador de células (C6/36), se resuspendieron en 4 mL de PBS (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de NaHPO y 2mM de KHHPO). La suspensión celular se centrifugó a 2,500 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 10 mL de medio EMEM al 10% de SFB y 10% de DMSO. Se realizó un conteo celular para verificar la

concentración y se procedió a guardar las células en crioviales una concentración de  $1 \times 10^6$  cels/mL en ultracongelación en tanque de nitrógeno líquido.

## **7.2. Propagación del stock viral.**

La cepa M7366 del virus Zika que se utilizó fue gentilmente donada por la Dra. Susana López Charretón del Instituto de Biotecnología/UNAM. La cepa del virus de Dengue 2 utilizada fue amablemente donada por la Dra. R. Victoria Pando Robles del Instituto Nacional de Salud Pública y la cepa de Dengue 4 fue proporcionada por la Dra. Ana Carolina Alcalá Aristiguieta. Las cepas fueron propagadas *in vivo* en cerebros de ratones lactantes e *in vitro* en células C6/36, con el fin de mantener los stocks virales y obtener las suspensiones virales a purificar.

### **7.2.1. Propagación de los virus Dengue y Zika en células C6/36.**

Monocapas de células C6/36 crecidas en frascos T75 fueron infectadas para la propagación de los virus Dengue y Zika, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Se preparó un inóculo viral en medio de crecimiento específico sin SFB, ajustando la cantidad de virus para infectar a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1. Se retiró el sobrenadante del medio de crecimiento de las células, se agregó el inóculo viral y se incubaron durante dos horas a la temperatura de crecimiento. Posteriormente, se retiró el inóculo, y se añadió medio nuevo suplementado con SFB al 5%. La incubación se mantuvo durante 4 o 5 días. El sobrenadante se colectó en tubos estériles y se centrifugó a 3,200 rpm (centrifuga Eppendorf, modelo 5810 R, 15 amp. versión, N. serie 5811F6377309), durante 10 min a 4°C. El sobrenadante resultante se alicuotó en microtubos y se almacenó a -70°C. Todo el

procedimiento de manipulación viral se realizó en campanas de bioseguridad tipo II. Por frasco T75 se obtuvieron 10 ml de suspensión viral.

### **7.2.1. Propagación de los virus Dengue y Zika en ratones lactantes.**

Se realizaron diluciones 1:10 de los stocks virales de Dengue y Zika en solución de cloruro de sodio al 0.9%. Se realizaron inoculaciones intracraneales a nivel de la fontanela bregmática de ratones lactantes CD1 (de dos o tres días de nacidos) con 10  $\mu$ L de la suspensión viral utilizando una jeringa de 1 mL. Posterior a la inoculación, los ratones se mantuvieron en observación y luego de que presentaron signos de alteraciones neurológicas como marcha lenta, parálisis, temblor fino en patas (Parida, Upadhyay, Pandya & Jana, 2002), se sacrificaron al someterlos a ultracongelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ , donde permanecieron conservados hasta el momento de realizar la extracción del cerebro. Para realizar la extracción del cerebro, se descongelaron sin perder la cadena fría. Una vez descongelados, con una jeringa de 10 mL se succionó el cerebro de cada ratón (10 ratones por camada), y fueron colectados en un tubo estéril de 50 mL de capacidad. Al contenido extraído (2.5 ml), se adicionó el mismo volumen de solución de cloruro de sodio al 0.9% o de PBS. Posteriormente, éste fue homogenizado utilizando una pistola de pipeta electrónica (Argos Technologies). Una vez homogeneizado, el extracto se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se trasvaso a tubos limpios y el proceso de centrifugación se repitió una vez más para eliminar restos celulares. El sobrenadante obtenido de la última centrifugación se filtró utilizando filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Millipore) dentro de campanas de Bioseguridad clase II (The Baker Company, tipo A/B3, modelo: SG-250) para conservar la esterilidad del extracto. El producto filtrado se alicuotó en microtubos estériles y se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de ser utilizado. Todo



el proceso se realizó siguiendo los protocolos aprobados por el comité de Bioética del Instituto de Biotecnología (UNAM).

### **7.3. Células productoras del material de purificación.**

#### **7.3.1. CHO.**

##### **7.3.1.1. Cinética de infección de células CHO con virus Dengue.**

Debido a la alta concentración de albúmina presente en el medio de crecimiento de las líneas celulares clásicamente utilizadas para la propagación de estos agentes virales, donde la albúmina es proveniente del SFB, y suele ser difícil de eliminar, además de que dificulta los análisis para la identificación de proteínas, en este trabajo se intentó como fuente alternativa de producción de virus el uso de células CHO. Estas células, crecen en suspensión y su medio de crecimiento no amerita ser suplementado con SFB, por lo que de ser permisivas a la infección con los virus Dengue o Zika, se pueden obtener virus en sobrenadante libre de albúmina. El procedimiento de infección consistió en agregar inóculos de virus Dengue 4 a una MOI=0.1 a células CHO en suspensión crecidas en matraces. Las células se incubaron a 37 °C en agitación constante a 130 rpm, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 8%. Posteriormente, se tomó 1mL del cultivo a las 4, 24 y 48 horas post infección, los cuales se utilizaron para analizar las muestras mediante ensayos de placa en células Vero para determinar el título viral.

##### **7.3.1.2. Purificación de la proteína NS1 por Cromatografía de Exclusion molecular**

Una alternativa para la obtención de proteína NS1, fue recolectarla de sobrenadantes de células CHO las cuales expresaban la NS1 del virus dengue 2 de manera recombinante. Este procedimiento se realiza de rutina en el laboratorio GPR a cargo de la Dra. Ana Carolina Alcalá. Así, las células CHO previamente se tranfectaron con un plásmido de expresión para eucariotas

(pCAGGS-NS1), el cual contiene el gen que codifica para la NS1 de Dengue 2. Para purificar la proteína NS1 recombinante de los demás componentes del cultivo celular, se usó la columna empacada Superdex 200 (GE Healthcare) en el equipo AKTA Prime Plus (código N. 03009481, N serie 1494383) y equilibrada con el buffer de fosfato de sodio 0.05 M, NaCl 0.15 M, pH 7.4, a un flujo de 1 mL/min. El sobrenadante de cultivo celular de las células CHO productoras de la proteína NS1 fue concentrado y de éste se destinó 1 mL a la Cromatografía de Exclusión Molecular. Las fracciones obtenidas a lo largo de la cromatografía fueron analizadas.

### **7.3.1.3. Purificación de la proteína NS1 por electroelución.**

Como alternativa para purificar la proteína NS1 recombinante, se optó por la electroelución. Esta técnica permite extraer la proteína de interés de la porción de gel de electroforesis que la contiene (G-Biosciences, n.d.). Por esta razón, inicialmente se hizo una electroforesis de la muestra de proteína NS1 (sobrenadantes de cultivo celular de las células CHO productoras de la proteína NS1) y sus respectivos controles (sobrenadantes de células CHO no transfectadas con el plásmido PCAGGS) en un gel de acrilamida al 12%. Este gel se tiñó con Azul de Coomassie y se cortaron las bandas correspondientes a la proteína NS1 (*Fig. 6*) de acuerdo con su peso molecular. Las bandas de interés se introdujeron en los dispositivos con microtubos de 2 mL de capacidad (*Fig. 7*), se sumergieron en la cámara de electroforesis (*Fig. 8*) para aplicar la corriente eléctrica (60 Volts) durante 30 min. La incidencia de la corriente en las muestras ocasionó la migración de la proteína fuera del gel, quedando dentro del dispositivo que la delimitó debido al tamaño de los poros de las membranas que se encuentran en los extremos de este.



Figura. 6 Corte de bandas de gel de electroforesis.

1) MP: Marcador de peso molecular Dual color. 2) pico 2  
3) pico 2 4) intemedio entre el hombro del pico 1 y el pico 2

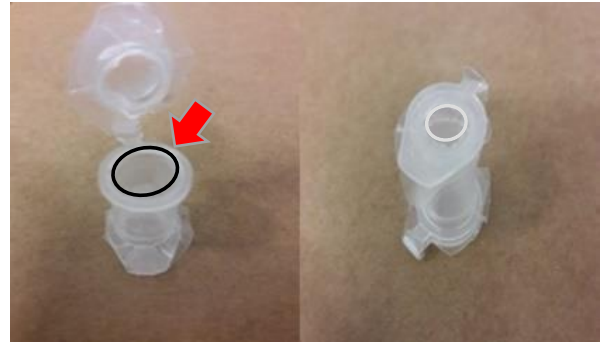


Figura. 7 Dispositivo para electroelución.

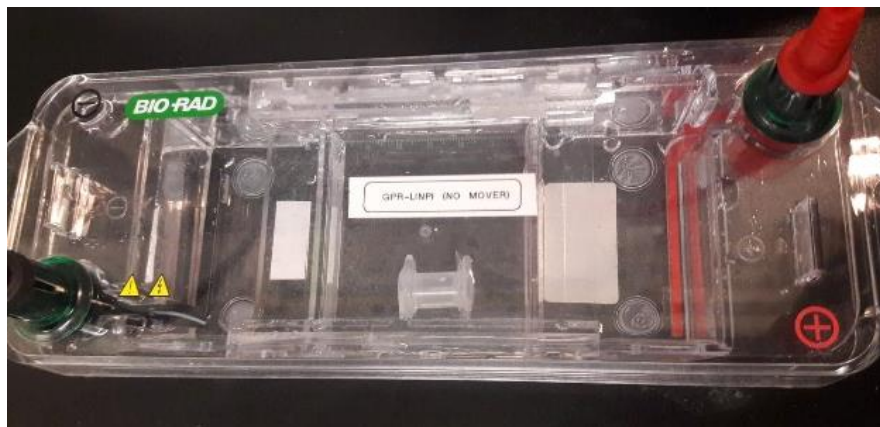


Figura. 8 Cámara de electroforesis.

### 7.3.2. Células C6/36.

#### 7.3.2.1. Eliminación de albúmina mediante cromatografía por afinidad.

Para eliminar la albúmina que aporta el SFB a los medios de cultivo EMEM y DMEM de las células en adherencia, se llevaron a cabo cromatografías de afinidad. Para ello, se empacaron 2.5 mL de la resina Blue Sepharose CL-6B (GE Healthcare), la cual está compuesta

de Sepharose CL-6B y Cibacron Blue F3G-A unidos covalentemente (Rothe, 1994). La estructura de este último es muy similar a la de ligandos naturales de muchas proteínas, lo que la hace muy útil para separar proteínas como la albúmina. La resina se regeneró con lavados de 5 volúmenes de la columna (VC) a alto pH (0.1M Tris HCl, 0.5M NaCl, pH 8.5) y a bajo pH (0.1M Acetato de sodio, 0.5M NaCl, pH 4.5). Posteriormente se pasaron 3 VC del eluyente con baja concentración iónica o buffer A (50mM Tris-HCl, 50Mm NaCl, pH 7.5) a 2 mL/min de flujo, quedando finalmente a 1.0 mL/min para inyectar la primera muestra.

El volumen de las muestras que se pasó por la resina fue de: 1 mL de SFB al 2%, 1 mL de medio EMEM al 2.5% de SFB y 2 mL de suspensión viral de Dengue 4 clarificado. Se inyectó la muestra a la resina ya equilibrada, las señales fueron transformadas y mostradas por el programa (PrimeView) en un cromatograma donde los picos (aumento en las unidades de absorbancia) de eluyente contenían la muestra sin albúmina. Minutos más tarde, al no generarse señal de absorbancia, se cambió el buffer a uno de mayor fuerza iónica o buffer B (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7.5 ó 50 mM Tris-HCl, 2 M NaCl, pH 7.5) para eluir la albúmina unida a la resina. Este procedimiento se llevó a cabo en un sistema de cromatografía líquida GE AKTA Prime Plus (N. código 03009481, N. serie 1494383).

### **7.3.2.2. Purificación de las partículas virales por Cromatografía de Exclusión**

#### **Molecular (CEM).**

Para separar y purificar las partículas virales y la proteína NS1 a partir de sobrenadantes de células infectadas con virus dengue o Zika, se utilizó un equipo para cromatografía de líquidos de alto rendimiento (Binary HPLC Pump, Waters 1525 ó Alliance BIO HPLC) con detectores de fluorescencia (Waters 2475) y arreglo de fotodiodos (Waters 996) a 280 nm (para detección de proteína), 210 nm (para detección de péptidos) y 260 nm (para detección de

ácidos nucleicos). A este equipo se le acopló una columna de exclusión molecular Ultrahidrogel 500, 7.8 x 300 mm (Waters, Part N. WAT01LS30), la cual fue equilibrada con buffer de fosfatos (0.1M, pH 7), a un flujo de 0.5 mL/min.

El sobrenadante de cultivo de las células C6/36 infectadas con el virus Dengue clarificado se diluyó 1:3 en PBS para obtener una concentración aproximada de 1 mg/mL de proteínas totales en un volumen de 90  $\mu$ L. Esta muestra se filtró y se inyectó en el equipo para hacerla pasar por la columna, al igual que varios controles como azida de sodio (65 Da), tiroglobulina (660 kDa) y sobrenadante de cultivo de células C6/36 sin infección. Luego de inyectar una a una, el equipo automáticamente aspiró 50  $\mu$ L de muestra. Las señales de absorbancia (AU) y las unidades de emisión (EU) de cada muestra fueron transformadas y mostradas por el programa Empower.2 en un cromatograma que indicaba la presencia de los picos en AU y EU. La cantidad de muestra eluída correspondiente a cada pico fue colectada para posterior análisis.

### **7.3.2.3. Purificación de partículas virales por colchón de sacarosa.**

Para purificar las partículas virales de los stocks, estos se sometieron a una metodología ya reportada por Jensen M.S. y colaboradores (2016), con algunas variantes para hacerlo más eficiente. Brevemente, se clarificó el stock viral (sobrenadante de células C6/36) colocando 3 mL de la solución de sacarosa al 20% (preparada en agua desionizada y esterilizada por ultrafiltración) en tubos de ultracentrífuga (14 x 95 mm) (Beckman, Ultra-Clear tubo de 14 mL). Posteriormente, encima de este colchón de sacarosa se colocó el stock viral clarificado (9 mL) con el cuidado de no mezclarlo con la sacarosa. Los tubos, se balancearon con su duplicado y se centrifugaron durante 3 horas a 30,000 rpm en ultracentrífuga (Beckman XL90 Manual, Rotor SW40 Ti). El sobrenadante se descartó y se dejó secar el tubo durante 15 min. El pellet

obtenido se disolvió en 9 mL de buffer HEPES (100 mM HEPES, pH 7.9, 50 mM NaCl, 4°C) y se centrifugaron nuevamente a 14,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante obtenido se eliminó cuidadosamente del tubo y el pellet se resuspendió en buffer HEPES (100 mM HEPES, pH 7.9, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl, 4°C). El pellet resuspendido contenía las partículas virales, por lo que se hicieron alícuotas y se conservó a -70°C para ser analizado posteriormente.

#### **7.3.2.4. Purificación de partículas virales con Sulfato de protamina y PEG.**

Aizawa y colaboradores (1980) describieron una metodología que resultó ser altamente eficiente para la purificación de partículas del virus de la encefalitis japonesa (JEV) con un grado vacuna, mediante la cual, obtuvieron altos títulos de virus purificados (Aizawa 1980). Dado el éxito reportado en la purificación de JEV por Aizawa y dada la similitud estructural de este virus con los virus Dengue y Zika, se aplicó esta metodología con algunas variaciones. De una manera diferente al protocolo original de Aizawa se obtuvo el stock viral a partir de la infección de células C6/36 con Dengue o Zika; este sobrenadante obtenido se considera el material de inicio. Posteriormente, se agregó una solución de sulfato de protamina a una concentración final de 1 mg/mL. Se llevó a cabo la incubación a 4°C por 3 horas, tiempo en el que se formaron flóculos. Esta reacción se realizó directamente en los tubos de ultracentrífuga, los cuales se centrifugaron durante 1 h a 16,000 g en la centrífuga (Beckman Coulter XPN-100-Ultracentrífuga, Rotor F0650). El sobrenadante se recuperó y se guardó el pellet para posterior análisis. A los sobrenadantes obtenidos (15 mL), se le agregó una solución de PEG (Polietilenglicol) 6000 (15 mL de PEG al 8%) para obtener una concentración final de 4% de PEG, para luego ser centrifugados a 16,000 g durante 30 min. El sobrenadante recuperado se reservó para su análisis y se continuó trabajando con el pellet, el cual fue resuspendido en 5 ml

de solución de etanol al 4% con la finalidad de eliminar el PEG 6000 de acuerdo a protocolo original, sin embargo, también para sustituir el uso de etanol y eliminar el PEG 6000 se ocupó la resina G-100 mediante una cromatografía de exclusión molecular.

#### **7.3.2.4.1. Eliminación de PEG 6000 por Cromatografía de Exclusion Molecular.**

Debido a la naturaleza lipídica de la envoltura de los agentes virales de interés, se consideró que el tratamiento con etanol propuesto por Aizawa podía afectar la estructura de las partículas y se buscó comparar éste con otras opciones. Por esta razón, se optó por aplicar la CEM como método de eliminación de PEG 6000. Para la CEM, se utilizó la resina Sephadex G-100 (GE Healthcare), la cual se empacó y luego se equilibró con el buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM KCl). Esta cromatografía se realizó en el equipo AKTA Prime Plus (N. código 03009481, N. serie 1494383).

Una vez empacada y calibrada la resina, se hizo pasar 1 mL de cada muestra: que consistía en el pellet resuspendido en PBS (después de la precipitación con PEG 6000 y centrifugación) con y sin etanol. Los picos obtenidos del cromatograma durante la corrida fueron recolectados para su análisis posterior.

### **7.3.3. Cerebro de ratones lactantes.**

#### **7.3.3.1. Purificación de partículas virales con Sulfato de protamina y PEG.**

De la misma manera que el procedimiento descrito por Aizawa, se obtuvo el stock viral del extracto de cerebro, sin embargo, éste fue de ratones lactantes en lugar de adultos. Este extracto fue diluido en PBS a 20% para obtener la suspensión viral (8 mL de extracto de cerebro y 22 mL de PBS). Posteriormente, se agregó la solución de sulfato de protamina (10

mL a 4 mg/mL) para una concentración final de 1 mg/mL. Se continuó con el procedimiento ya descrito previamente en el apartado 7.3.2.4. a partir de llevar la solución a concentración de 1 mg/mL de sulfato de protamina.

## **7.4. Identificación de virus y proteína.**

### **7.4.1. Cuantificación de proteína total.**

La cuantificación de proteína total se llevó a cabo mediante el método de Bradford (Bio-Rad) o un estuche comercial de BCA (Thermo Scientific <sup>TM</sup>, Kit de ensayo de proteínas Pierce <sup>TM</sup> BCA). Brevemente, para la determinación mediante Bradford, se realizó una curva estándar de albúmina con un rango de 8 a 80  $\mu\text{g/mL}$ . En microplacas de 96 pozos, se colocaron 150  $\mu\text{L}$  de cada concentración de albúmina, así como de las muestras de interés por pozo, por triplicado. Posteriormente, se agregaron a cada pozo 50  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se leyó la absorbancia de las muestras en un lector de microplacas (FLUOstar, BMG LABTECH, Omega) a 595 nm. En cuanto a la determinación de proteína con el estuche comercial de BCA (ácido bicinónico) se usó una curva estándar de albúmina con un rango de 20 a 320  $\mu\text{g/mL}$ . Paralelamente, se preparó el reactivo BCA (1: 50 reactivo A: B). En una microplaca de 96 pozos se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de las muestras y puntos de la curva por triplicado, seguido de la adición de 200  $\mu\text{L}$  de reactivo BCA e incubados por 30 min a 37°C, protegidos de la luz. La absorbancia de las muestras se determinó a 562 nm en un lector de microplacas (FLUOstar, BMG LABTECH, Omega).

### **7.4.2. Western blot.**

Para evaluar la presencia de partículas virales en las muestras, a cada 5  $\mu\text{L}$  de muestra con concentración conocida, se les adicionó buffer de carga 4x (1 mL de glicerol, 1.25 mL de



SDS (dodecilsulfato sódico) 20%, 0.5 mL de TRIS-HCL 1M pH 6.8, 0.5 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.2 mL de azul de bromofenol 1% y 1.55 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q), llevando el buffer de carga a 1x. Cada mezcla se calentó a 99°C durante 10 min para desnaturalizarla previo a cargarla y correrla en un gel de acrilamida al 12%. La corrida se llevó a cabo con buffer Tris-glicina (25mM Tris-Base, 195 mM glicina, SDS 0.8%) a 120 volts durante 90 min. Posterior a la separación electroforética de las proteínas, éstas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore; previamente activada con metanol) mediante electrotransferencia, en la que se utilizó el buffer de transferencia (25 mM Tris-Base, 195 mM glicina, metanol 20%). Posteriormente, la membrana se sumergió en una solución de bloqueo (PBS (buffer fosfato salino) 5% de leche sin grasa) durante dos horas en agitación. Se decantó la solución de bloqueo y se adicionó el anticuerpo primario específico para la proteína E (envoltura) del virus Dengue (de los 4 serotipos) (GeneTex, de conejo, policlonal, dilución 1:1000), o el anticuerpo anti la proteína E de Zika (GeneTex, de conejo, policlonal, dilución 1:1000) o el anticuerpo anti NS1 (GeneTex, de conejo, policlonal, dilución 1:1000) o el anticuerpo contra la proteína NS1 de Zika (GeneTex, de conejo, policlonal, dilución 1:1000) según el caso. El anticuerpo primario utilizado, se incubó toda la noche a 4°C, se realizaron 5 lavados con PBS-T (PBS, Tween 20 al 5%), en agitación durante 10 min. Luego del último lavado, se agregaron los anticuerpos secundarios de conejo o ratón conjugados a peroxidasa de rábano (HRP), las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS-T, luego de eliminar el último lavado, se agregaron 750  $\mu$ l de la solución para revelado quimioluminiscente (Luminol, Millipore, N° WBLUF0500). Las membranas se analizaron en un transiluminador utilizando los filtros adecuados (Chemidoc Bio-rad).

### **7.4.3. Dot blot.**

La evaluación de la presencia de partículas virales sin desnaturalizarse se realizó mediante la técnica dot blot. Para esto, se montó en el Trans-blot (Bio-rad) una membrana de PVDF (previamente activada con metanol) y se impregnaron 50  $\mu$ L de cada muestra a analizar mediante vacío. Al desmontarse la membrana, se colocó en contacto con la solución de bloqueo (PBS-leche 5%) incubándose durante toda la noche a 4°C. Posterior a 3 lavados con PBS-T de 10 min, se agregó el anticuerpo primario (EDEI C8, dilución 1:5000) dirigido contra el epítipo del dímero E. Luego de 3 lavados de 10 min con PBST, se agregó el anticuerpo secundario de anti-ratón (HPR) y se incubó en agitación durante 1 h. La membrana se reveló mediante quimioluminiscencia agregando luminol (Millipore WBLUF0500) y se analizó en un transiluminador (Chemidoc Bio-Rad).

### **7.4.4. Titulación de virus.**

Para conocer la cantidad de virus viable que contienen las muestras que se obtuvieron al inicio, durante y al final del proceso de purificación, se llevaron a cabo ensayos de placa. Para esto, se realizaron 8 diluciones seriadas en base 10 de cada muestra. Previamente se sembraron células Vero en cajas de cultivo de 24 pozos, cuando éstas alcanzaron la confluencia, se infectaron con duplicados de cada dilución. Para esto, se retiró el sobrenadante y se añadieron 200  $\mu$ L de cada dilución. Luego de 2 h de incubación en las condiciones de crecimiento de las células, se añadieron 0.5 mL de DMEM al 5% de SFB y 1 mL de una mezcla 1:1 de carboximetilcelulosa (3%) y medio DMEM (2X) suplementado con 5% de SFB. Las placas se incubaron durante 7 días en las condiciones de crecimiento de las células Vero. Transcurrido el tiempo de incubación, el sobrenadante fue retirado mediante inversión de la placa y se fijaron las células con paraformaldehído al 1% en PBS durante 10 min a temperatura

ambiente. Posteriormente, se retiró el medio de fijación y se añadió una solución de cristal violeta al 2% en PBS y se incubó durante 30 min a t.a. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró la solución colorante y se lavaron las placas bajo el chorro de agua para eliminar el exceso. Las placas formadas se visualizaron frente a una fuente de luz blanca. La determinación del título viral se realizó contando las placas visibles en la máxima dilución donde estuvieran presentes. El número de placas se multiplicó por la dilución correspondiente y por el volumen de solución de virus infectante. De esta manera, se obtuvo en cada caso el número de unidades formadoras de placa por mL de solución (UFP/mL).

## 8. RESULTADOS.

### 8.1. Células productoras del material de purificación.

#### 8.1.1. CHO.

##### 8.1.1.1. Cinética de infección con el virus Dengue 4 en CHO.

Con el fin de obtener cultivos libres de albúmina para propagar las partículas virales y la proteína NS1, inicialmente se realizó una cinética de infección con el virus Dengue 4 en células CHO, en la que se tomaron 3 muestras de sobrenadante a las 6, 24 y 48 h; a cada muestra se le hizo un ensayo de placa para conocer su título. De las tres muestras tituladas, en ninguna se visualizaron UFP como se aprecia en la *figura 9*. Debido a que no se observó la formación de placas en ninguna de las muestras tituladas, se decidió no trabajar con las células CHO como posible fuente de partículas virales. Era probable que esto sucediera porque se sabe que en las células CHO no se replican los virus VIH, Herpes, Sarampion, Influenza entre otros, (Bandaranayake & Almo, 2013), quizá no cuenta con los receptores necesarios.

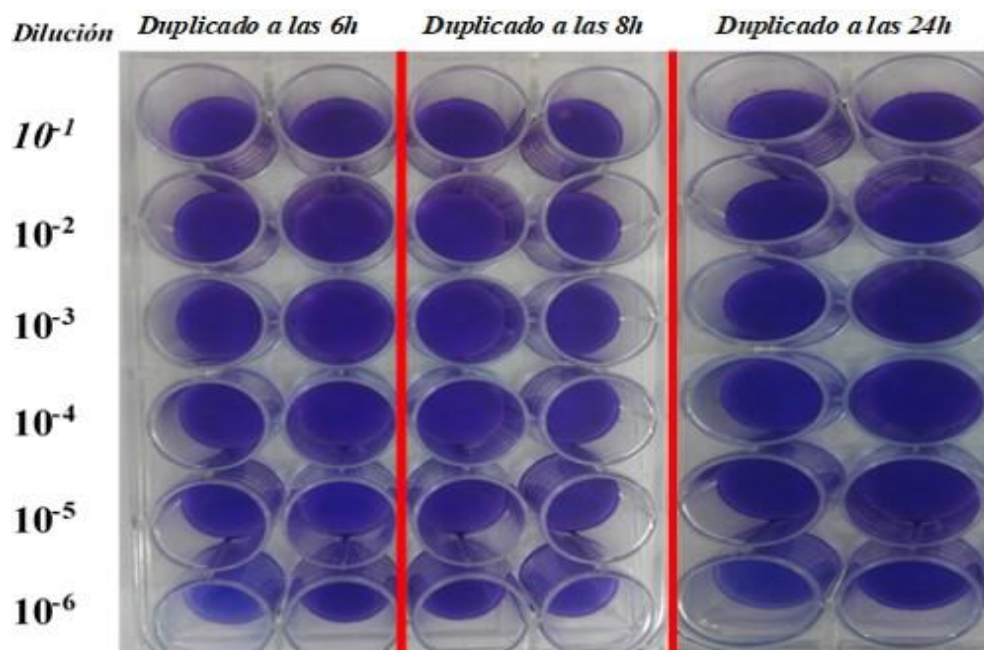
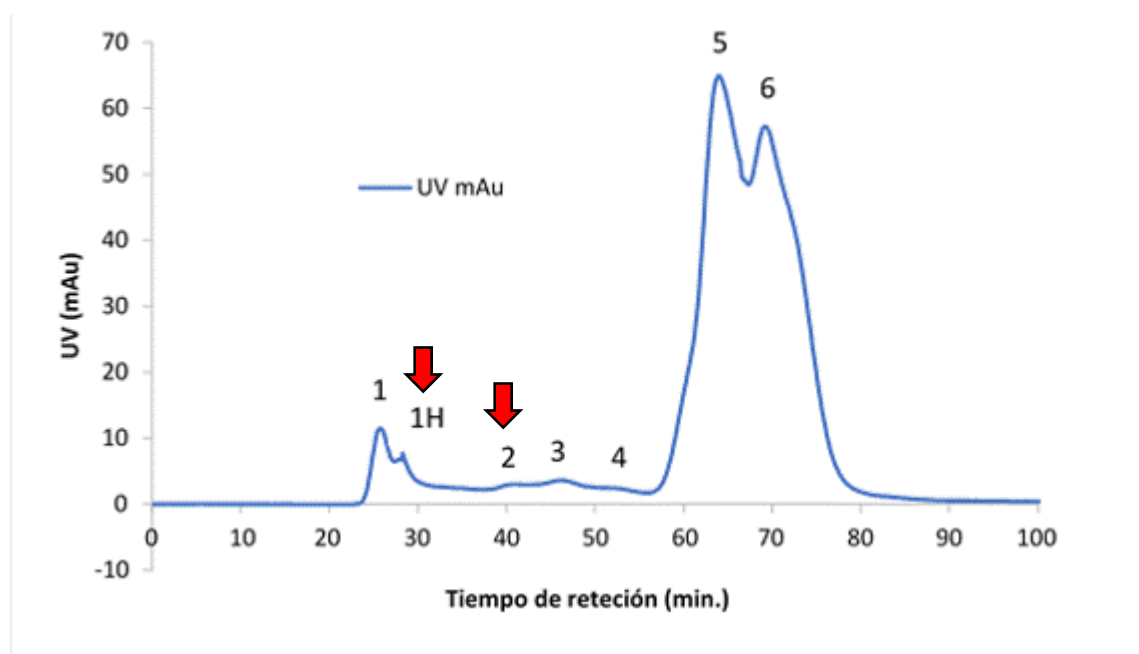


Figura. 9 Plaqueo de la cinética a las 6, 8 y 24 h en CHO

### 8.1.1.2. Purificación de la proteína NS1 recombinante por CEM.

De manera simultánea, se trabajó en la estandarización de un método de purificación para la proteína NS1 recombinante. Este método se basó en una CEM, que consistió en hacer pasar medio de cultivo concentrado de células CHO que expresaron la proteína NS1 recombinante por la columna con resina Superdex 200, esperando obtener hexámeros de NS1. En el cromatograma obtenido, (*figura 10*), se visualizan 6 picos de los cuales el primero contenía un hombro.



*Figura. 10 CEM mediante la Superdex 200 del sobrenadante de CHO'S productoras de NS1*

Cada pico cromatográfico se recolectó, para realizar un Western blot contra la proteína NS1 (*figura 11*). Mediante esta técnica se evidenció la presencia de una banda correspondiente a la proteína NS1 en el control positivo, de acuerdo a ésta y al marcador de peso molecular Dual color (en la señal a 50 kDa) se observó también la señal en el hombro del primer pico y en el segundo pico de la misma proteína.

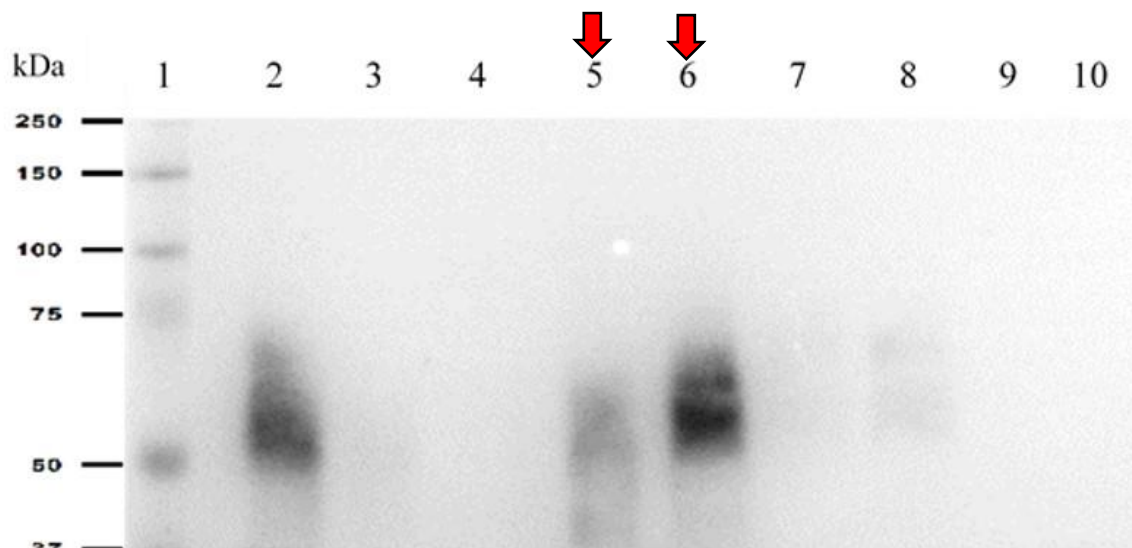


Figura. 11 Western blot de la CEM de sobrenadante de CHO'S productoras de NS1

1) MP: Marcador de peso molecular Dual color. 2) Control positivo: Sobrenadante de CHO productoras de NS1. 3) eluido de la purificación. 4) 1er. pico en la cromatografía. 5) Hombro del 1er. pico en la cromatografía. 6) 2do. pico en la cromatografía.. 7) 3er. pico en la cromatografía. 8) 4to. pico en la cromatografía. 9) 5to. pico en la cromatografía. 10) 6to.pico en la cromatografía.

Para corroborar la pureza de las muestras, se realizó una corrida electroforética y tinción con tricloroetanol del producto del hombro del pico 1 y el pico 2 (figura 12). En la figura 12 se observan bandas que coinciden con la proteína NS1 debido a su peso molecular, sin embargo, se evidenció la presencia de otras proteínas acompañantes con diferentes pesos moleculares, aunque con menor intensidad.

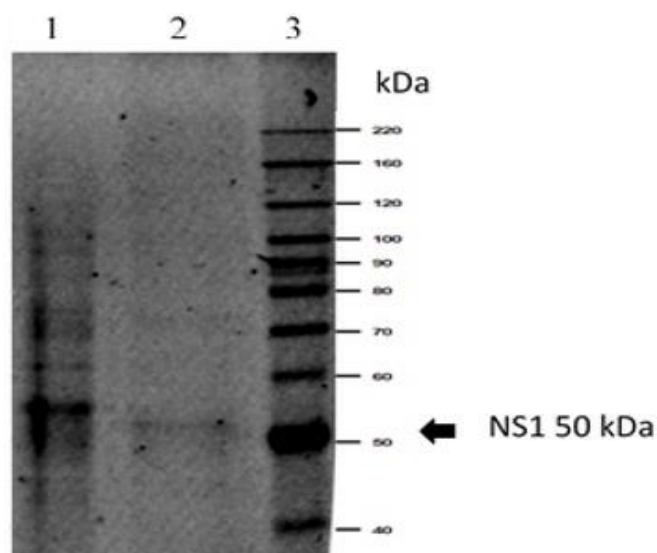


Figura. 12 Tinción con tricloroetanol de CEM de la NS1 producida en CHO

1) Hombro del 1er pico: hombro del 1er pico de la CEM en la Superrdex 200 del sobrenadante de CHO'S productoras de NS1 (Fig.57). 2) 2do. pico: 2do. pico de la CEM en la Superrdex 200 del sobrenadante de CHO'S productoras de NS1 (Fig.57). 3) MP: Marcador de peso molecular BenchMark™.

Después de que no se obtuvo la NS1 completamente pura, se electroeluyeron el hombro del 1er pico y el 2do pico para obtener la NS1 pura. El producto de la electroelución se colectó y se analizó para confirmar la presencia y pureza de la NS1 mediante una tinción con tricloroetanol (figura 13). En la imagen se apreció una banda única de 50 KDa, lo que convierte a este método en una alternativa viable para la purificación cualitativa de la proteína NS1.

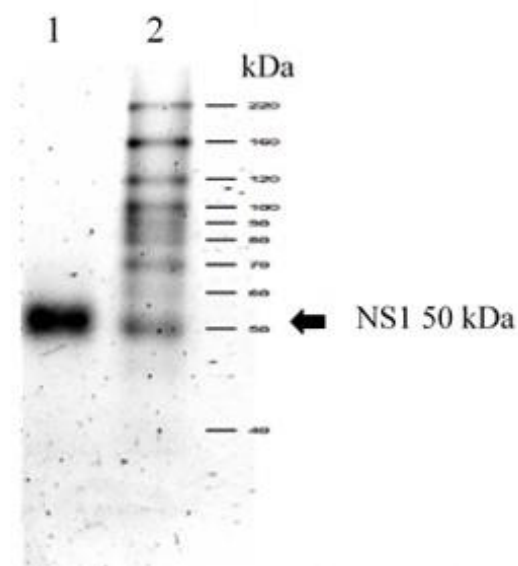


Figura. 13 Tinción con tricloroetanol de la NS1 recuperada de la electroelución.  
1) NS1 electroeluida: Suspensión de NS1 obtenida al electroeluir el hombro del 1er pico y el 2do pico de la CEM en la Superrdex 200 del sobrenadante de CHO'S productoras de NS1. 2) MP: Marcador de peso molecular BenchMark™.

## 8.1.2. C6/36.

### 8.1.2.1. Eliminación de la albúmina por cromatografía de afinidad.

Debido a los resultados anteriores, se decidió utilizar otra línea celular para propagar las partículas virales y para obtener la proteína NS1. Las células C6/36, clásicamente son utilizadas para la propagación de flavivirus, pero requieren SFB como suplemento en el medio de crecimiento el cual aporta altas concentraciones de albúmina. La albúmina resultó ser en este caso un componente que interfiere para la purificación de las partículas virales y de la NS1, debido a su alta concentración y a su peso molecular cercano al de la NS1 (60 KDa y 54 KDa

respectivamente). Las muestras se pasaron a través de la resina Blue Sepharose en la sección 7.3.2.1 de materiales y métodos se describen los detalles de esta estrategia de purificación de los cuales se obtuvieron los siguientes cromatogramas.

La primera muestra que se corrió a través de la resina fue 1 mL de SFB al 2.5% en buffer de corrida. Su cromatograma muestra dos picos de absorbancia (*figura 14*). El primer pico se encontró entre los 2 y 11 mL del volumen retención (VR) y representa lo que no retuvo la columna usando el buffer “A”. El segundo pico se presentó entre los 31 y 40 mL del VR con un aumento de la conductividad. Este segundo pico refleja la albúmina que previamente se acopló a la resina y fue liberada tras el cambio de buffer “A” al “B”.

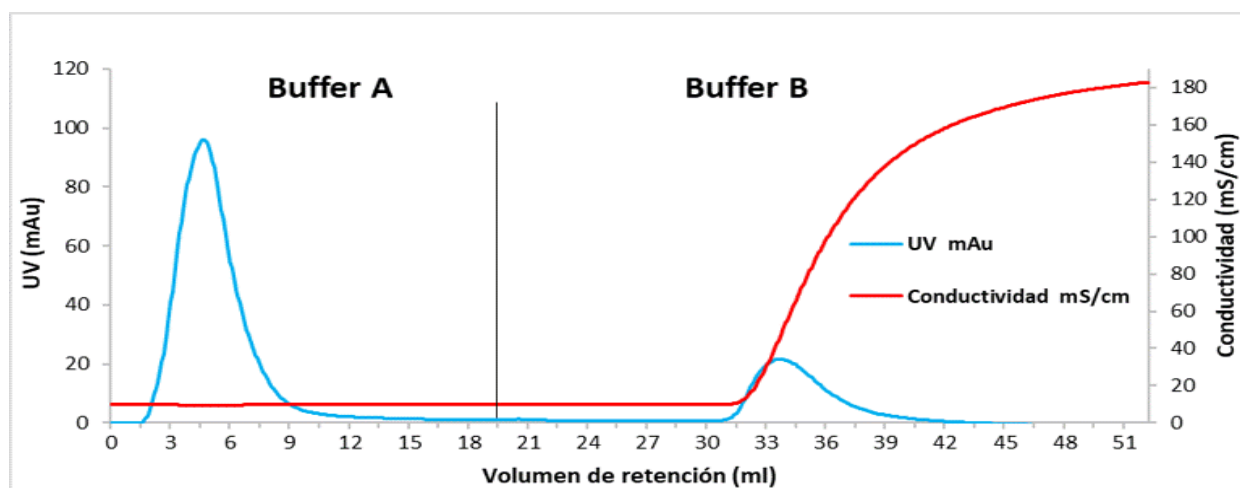


Figura. 14 Cromatograma de SFB al 2.5% en Blue Sepharose

Para verificar la identidad de cada pico, además de la separación de la albúmina de la muestra, se corrió la muestra del primer pico (lo no retenido por la resina) y la del segundo pico (lo retenido por la resina) en un gel de poliacrilamida al 12% el cual se tiñó con azul de Coomassie (*figura 15*). Como control se evaluó el SFB al 2.5%, el cual presentó varias bandas, entre ellas la albúmina con un peso de 67 kDa. El primer pico o el material de interés, presentó las mismas bandas que el control con menor señal. Sin embargo, parece contener aún proteína



del mismo peso que la albúmina. En la muestra del segundo pico o al menos, lo que fue capaz de retener la resina, sólo se detectó una banda de 67 kDa del peso de la albúmina.

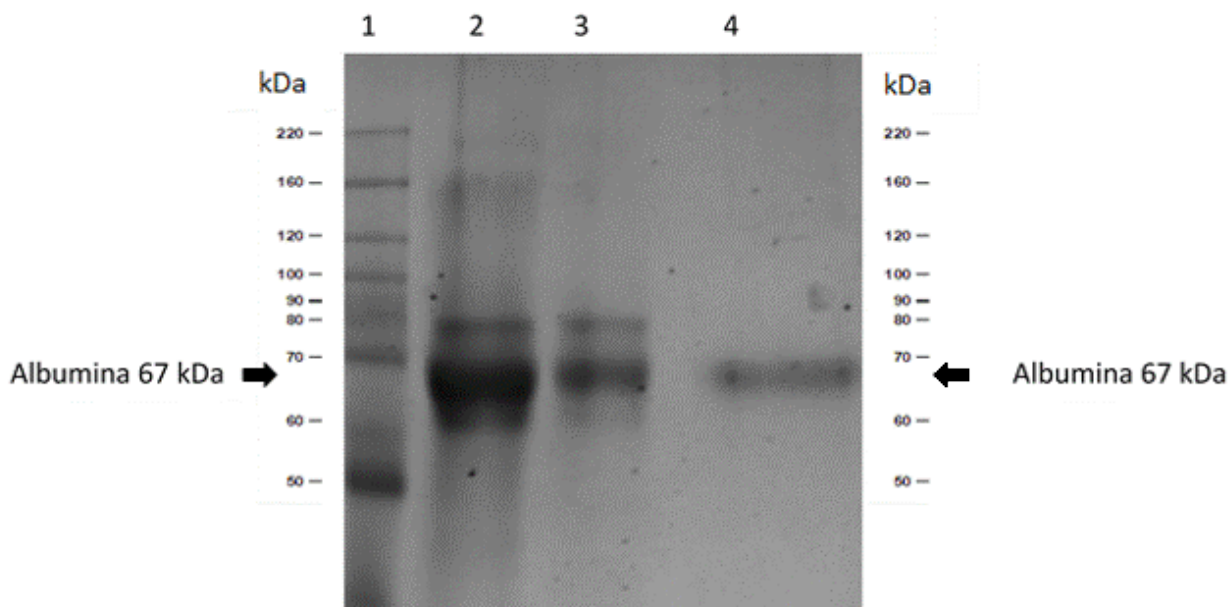


Figura. 15 Gel de Electroforesis de muestras de SFB en resina blue Sepharose  
1) Marcador de peso molecular BenchMark™. 2) Control positivo: SFB al 2.5%. 3)  
1er pico: lo no retenido por la resina. 4) 2do pico: la albúmina retenida por la resina.

Debido a que los resultados anteriores no permitieron saber si en su totalidad fue eliminada la albúmina de la muestra, se realizó otra cromatografía con la muestra de medio de cultivo de células C6/36 EMEM al 2.5% de SFB sin infección. Se obtuvo el cromatograma (figura 16) que muestra dos picos; el pico 1 se encontró de los 2 a 10 mL del VR con un ligero aumento en la conductividad; el pico 2 se presentó a los 34 mL del VR junto con el aumento de la conductividad. Adicionalmente, apareció un ruido a los 22 mL del VR después del cambio de buffer.

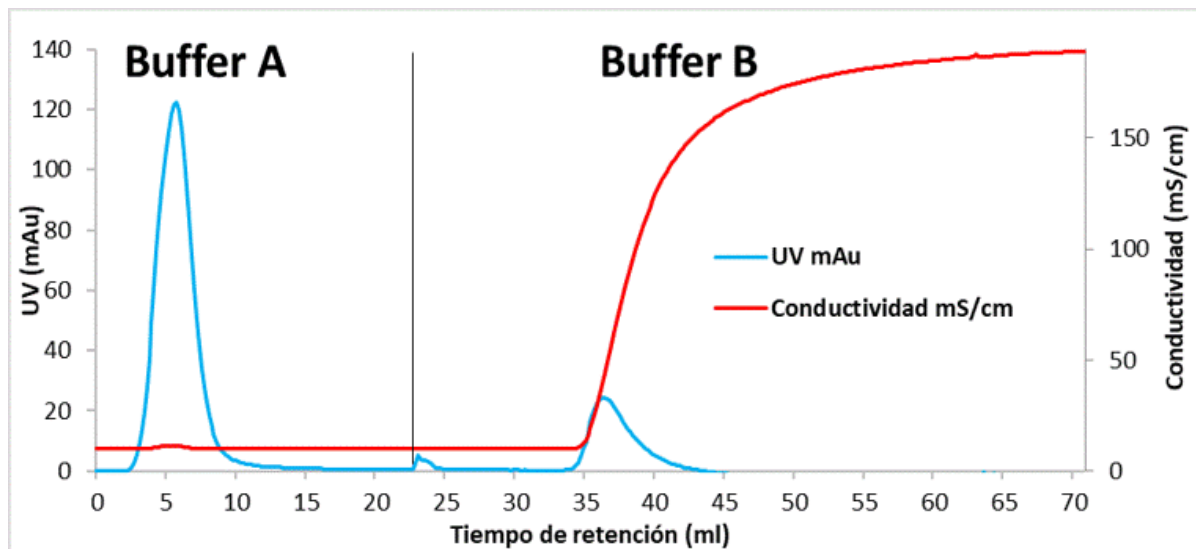


Figura. 16 Cromatograma de EMEM al 2.5% SFB en Blue Sepharose

Los picos obtenidos de la cromatografía fueron recolectados, concentrados y analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. El gel se tiñó con azul de Coomassie (figura 17). El carril del 1er. pico de la corrida presentó una banda con el peso de la albúmina además de otras dos de 80 kDa y de 60 kDa. El carril del 2do. pico presentó solo dos bandas, una de 67 kDa (peso molecular de la albúmina) con más intensidad y otra de 60 kDa.

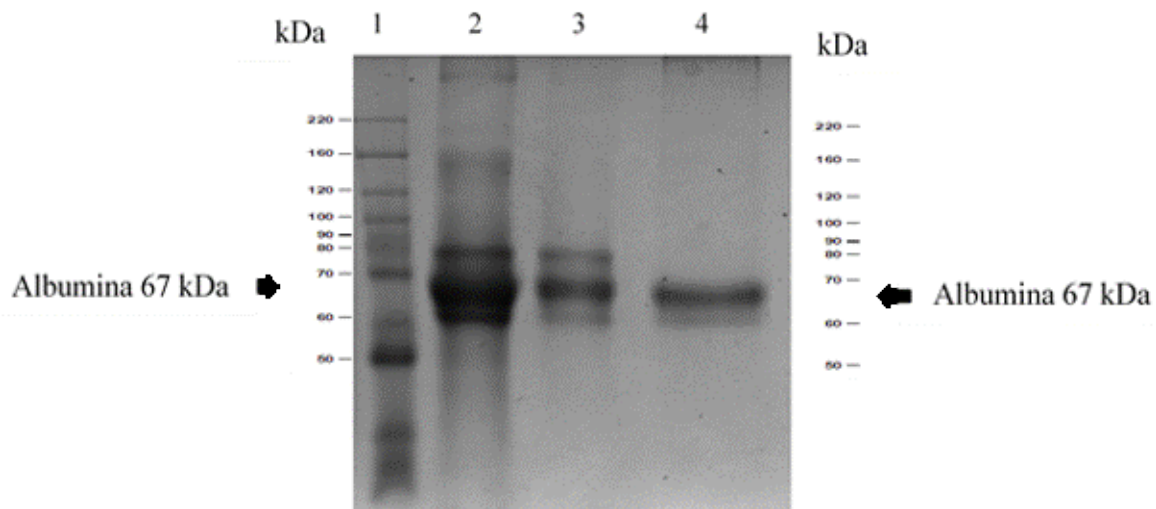
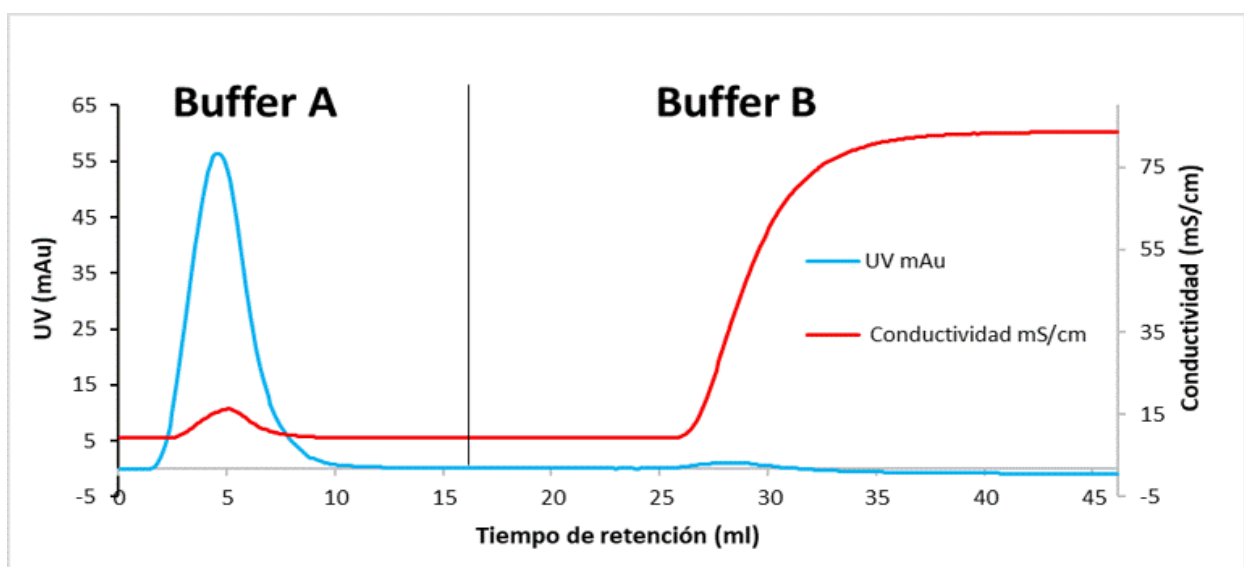


Figura. 17 Gel de electroforesis de EMEM en la blue Sepharose

1) MP: Marcador de peso molecular BenchMark™. 2) Control positivo: cultivo de células C6/36.  
3) 1er pico: lo no retenido por la resina. 4) 2do pico: la albúmina retenida por la resina

Debido a que el resultado anterior no permitió comprobar si se eliminó completamente la albúmina de las muestras, se corrieron adicionalmente las muestras de SFB y EMEM al 2.5% SFB a las que se le retiró la albúmina (pico 1 de la corrida de SFB al 2.5% y pico 1 de la corrida de EMEM al 5% SFB) para pasarlas nuevamente por la resina Blue Sepharose. A diferencia de la corrida anterior, se utilizó el buffer “B” con menor concentración de sales para evitar el problema de la precipitación de éstas al final del proceso.

En el cromatograma del pico 1 de SFB 2.5% (*figura 18*) se observa un pico de absorbancia a los 2 mL de VR y, después del cambio de buffer, se aprecia un ligero aumento en la absorbancia por lo que se verificó mediante un gel de poliacrilamida teñido con Coomassie que se trataba de albúmina (*figura 21*).



*Figura. 18* Cromatograma de SFB al 2.5% por segunda vez en Blue Sepharose

En el cromatograma del pico 1 de EMEM al 2.5% SFB (*figura 19*) se observa el primer pico de absorbancia a los 2 mL de VR y, tras el cambio de buffer, prácticamente se mantuvo constante la absorbancia, no se analizaron las muestras por la casi nula señal después del cambio de éste.

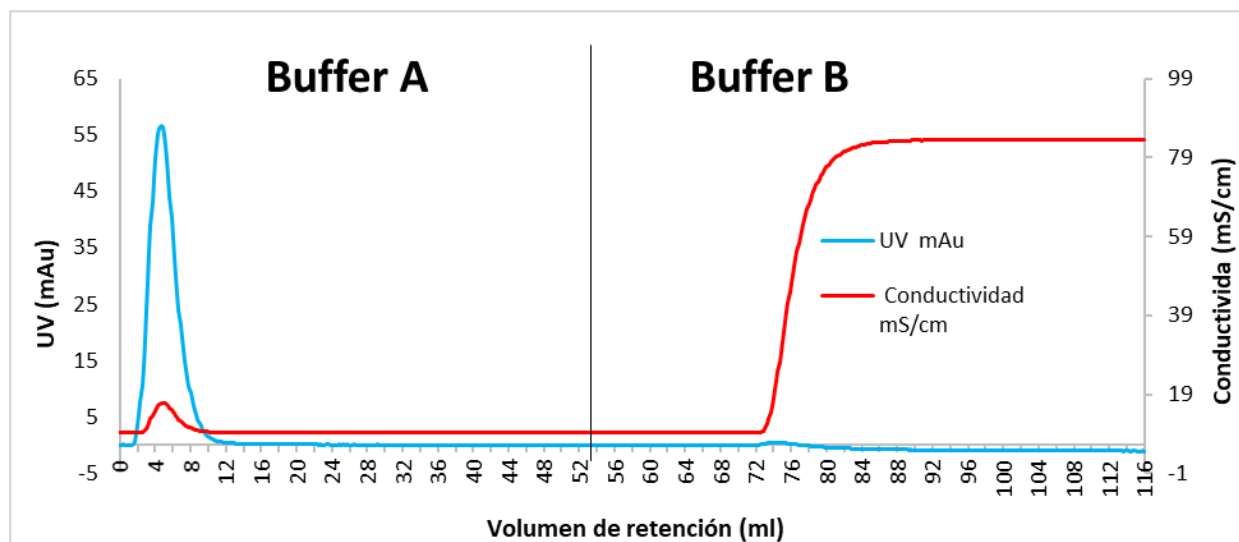


Figura. 19 Cromatograma de EMEM al 2.5% SFB por segunda vez en Blue Sepharose

Una vez estandarizada la eliminación de albúmina, se procedió a correr la muestra de cultivo de células C6/36 en EMEM al 2.5% SFB infectado con Dengue 4 en la resina Blue Sepharose. En el cromatograma resultante (*figura 20*) se visualizó un pico a los 2 mL de VR y un segundo pico a los 37 mL de VR después del cambio de buffer, pero a diferencia de los cromatogramas anteriores, éste se observó en un VR mayor y tras dos aumentos de la conductividad. En un gel teñido con Coomassie se analizaron los picos obtenidos (*figura 21*).

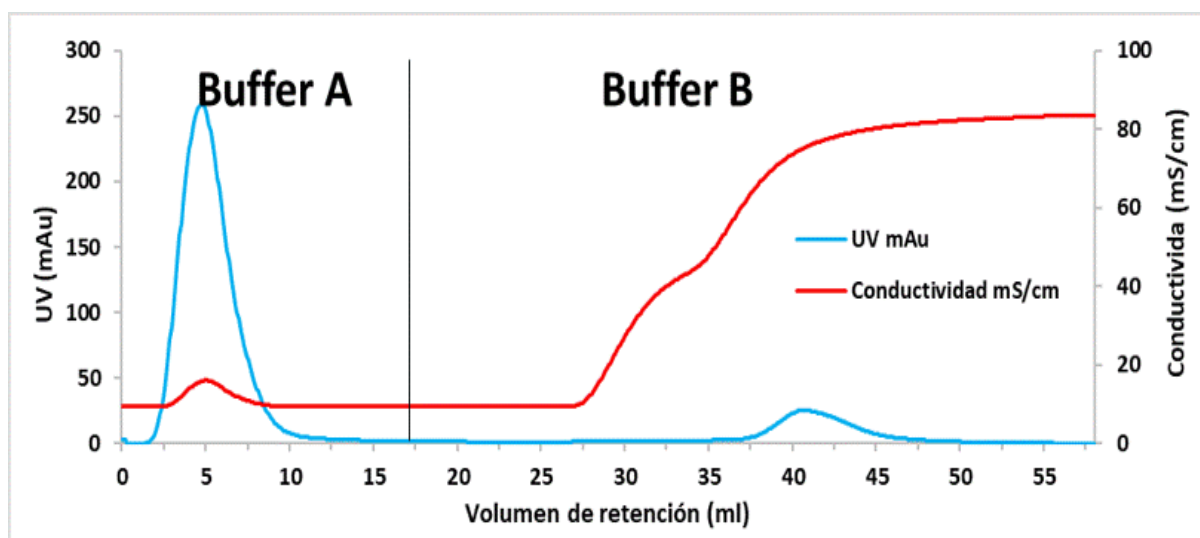


Figura. 20 Cromatograma de Dengue 4 en Blue Sepharose

Se analizaron los picos cromatográficos de las figuras 18 y 20. Cada muestra se corrió en un gel teñido con azul de Coomassie (*figura 21*). En el primer carril se cargó marcador de peso molecular (BenchMark™), en el segundo carril se cargó una suspensión del virus dengue 4, en el que se observan varias bandas, entre ellas una de 67 kDa (peso de la albúmina) que tiene mayor intensidad. En el tercer carril se cargó la albúmina retirada de la muestra de la suspensión de Dengue 4 presentando una única banda con el peso molecular de la albúmina. El quinto carril el SFB tiene varias bandas, entre ellas la de 67 kDa. El sexto carril, que es el control del medio EMEM, se vio reducido al ser empujado por las muestras de los carriles vecinos, además de que la cantidad que se corrió no fue suficiente para visualizar las bandas; el séptimo carril lo ocupa el SFB sin albúmina mostrando las mismas bandas que el SFB con albúmina. La muestra del séptimo carril fue pasada por la resina y se obtuvieron dos picos: el primero se corrió en el octavo carril mostrando las mismas bandas que el SFB con albúmina, el segundo se corrió en el noveno carril, no observándose ninguna banda, lo que sugiere que la resina previamente fue capaz de eliminar por completo la albúmina, por lo que al volver a someter la muestra a la cromatografía no se retiró nada, dado que la muestra ya no contenía albúmina, por último en el décimo carril se corrió un control de albúmina mostrando una única banda de 67 kDa.

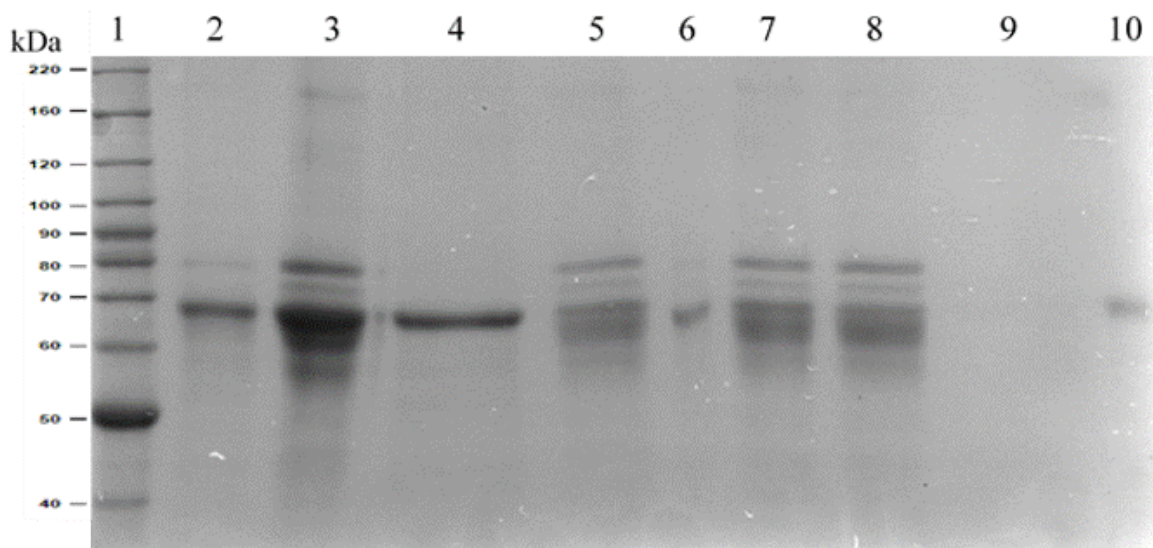


Figura. 21 Gel de Coomassie de la eliminación de la albúmina de las muestras.

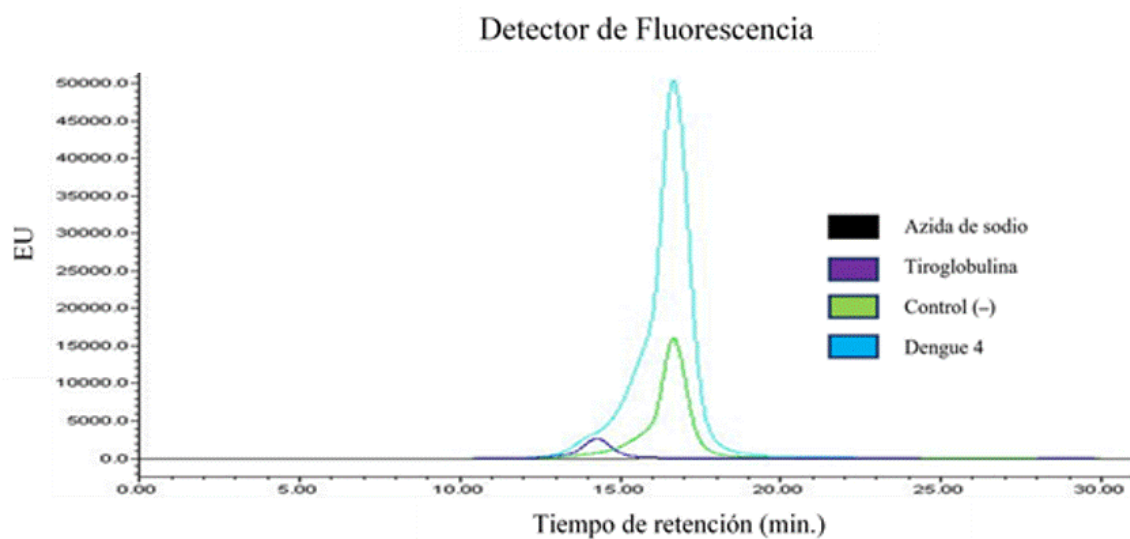
1) MP: Marcador de peso BenchMark™. 2) Dengue 4: cultivo de células C6/36 infectadas con dengue 4. 3) Dengue 4 sin albúmina: muestra no retenida por la resina Blue Sepharose (pico 1 de la muestra de dengue 4). 4) Albúmina retirada de dengue 4 (pico 2 de la muestra de dengue 4). 5) SFB 2.5%: 10 ul. 6) EMEM al 2.5% SFB: 2 ul. 7) SFB sin albúmina: muestra no retenida por la resina Blue Sepharose (pico 1 la muestra de SFB al 2.5%) \*. 8) 1er. pico: pico 1 obtenido de la corrida de la muestra de SFB al 2.5% sin albúmina. 9) Albúmina retenida por la resina de la muestra de SFB al 2.5% sin albúmina.

#### 8.1.2.1.1. Purificación del virus Dengue y de la proteína NS1 con CEM.

Después de asegurar la eficiencia de la resina Blue Sepharose, a partir de ésta se obtuvieron muestras de sobrenadante de cultivo de células C6/36 infectadas con Dengue 4 y no infectadas sin albúmina. Se tomaron también muestras de cultivos de células C6/36 infectadas y no infectadas (ambas contenían albúmina). Con el objetivo de purificar las partículas virales y la proteína NS1 de las muestras anteriores, se realizó una cromatografía de exclusión molecular con la columna “Ultrahidrogel 500”, usando como controles azida de sodio (65 Da), tiroglobulina (660 kDa) y cultivo de células C6/36 con y sin albúmina.

En la primera cromatografía se utilizó como muestra cultivo de células C6/36 infectadas con Dengue 4 (con albúmina) y como controles, cultivo de C6/36 sin infección (con albúmina), azida de sodio y tiroglobulina. De acuerdo con los detectores usados se obtuvieron los siguientes cromatogramas, de fluorescencia, mediante un arreglo de fotodiodos a 210 nm (Figura 23) y a 280 nm (Figura 24).

En el cromatograma de fluorescencia (*figura 22*) se presenta un único pico de la muestra de Dengue 4 (sobrenadante de células C6/36 infectadas con Dengue 4) a los 13 min. del tiempo de retención, casi a los mismos 13 min se aprecia un aumento de las unidades de emisión correspondiente a la tiroglobulina, un minuto después a los 14 se observa el inicio de un solo pico que pertenece al control negativo (sobrenadante de células C6/36), por último, el azida de sodio no muestra señal.



*Figura. 22 CEM de Dengue 4 (con albúmina) mediante fluorescencia.*

*Dengue 4: sobrenadante de C6/36 infectadas con Dengue 4). Control (-): sobrenadante de C6/36*

En el cromatograma del arreglo de diodos a 210 nm (para la detección de péptidos) (*figura 23*), se observó un pico entre los 12 y 15 min correspondiente a la tiroglobulina, un pico de los 20 a 23 min del azida de sodio, un pico con su hombro del control negativo entre los 12.5 y los 18.5 min y, un pico con dos hombros de la muestra de Dengue 4 en el mismo tiempo de 12.5 a 18.5 min que el control negativo.

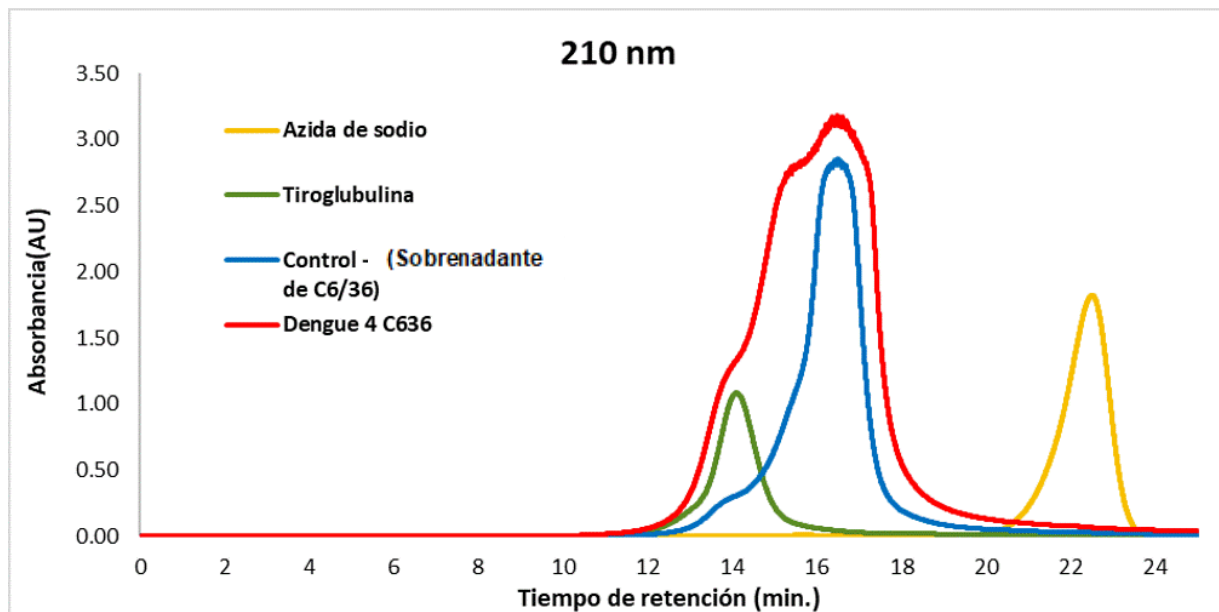


Figura. 23 CEM de Dengue 4 (con albúmina) mediante el arreglo de fotodiodos a 210nm.

Dengue 4: sobrenadante de C6/36 infectadas con Dengue 4). Control (-): sobrenadante de C6/36

De igual manera, a 280 nm (figura 24) no se observó separación de los componentes de la muestra y se aprecia que la muestra de Dengue 4 inicia a los 13 min y termina a los 18 min mismo tiempo que el control negativo, aunque este último con menor absorbancia.

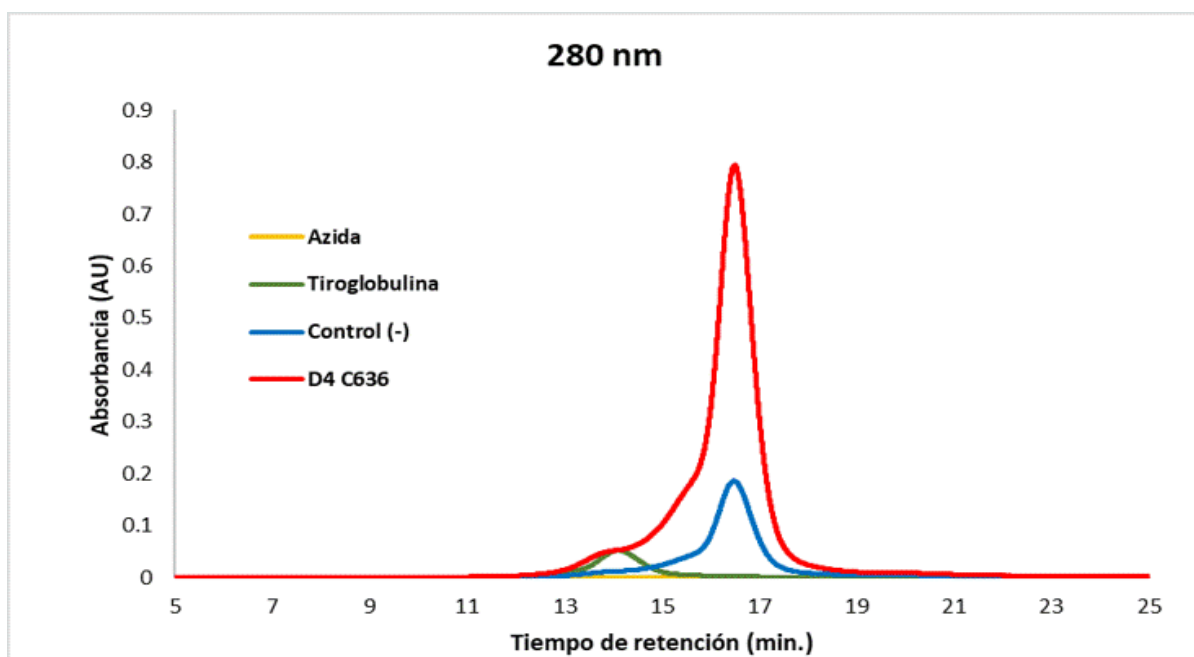


Figura. 24 CEM de Dengue 4 (con albúmina) mediante el arreglo de fotodiodos a 280nm.

Dengue 4: sobrenadante de C6/36 infectadas con Dengue 4). Control (-): sobrenadante de C6/36 sin infección



Debido a que no fue posible comprobar que se había retirado en su totalidad la albúmina de la muestra de Dengue 4 (de células C6/36) ya que se encuentra en el mismo tiempo de retención, para comprobarlo con la resina Blue Sepharose que se utiliza para retener albúmina se procedió a pasar por esta columna la muestra de cultivo de células C6/36 infectadas con Dengue (sin albúmina separada previamente por la resina Blue Sepharose). Ésta fue acompañada de controles como el sobrenadante de cultivo de células C6/36 sin infección (con y sin albúmina), albúmina y sobrenadante de C6/36 infectada con Dengue 4 (con albúmina), albúmina, azida de sodio y la albúmina retirada de sobrenadante de C6/36 infectada con Dengue 4 (tras su paso por la Blue Sepharose), los cuales fueron detectados en esta ocasión por el arreglo de fotodiodos a 260 nm (para la detección de ácidos nucleicos) y 280 nm (para la detección de proteínas).

El cromatograma obtenido se dividió en dos partes: la primera con las muestras que contenían albúmina (*figura 25*), en la cual se puede observar que no hay diferencia significativa entre el control negativo (sobrenadante de C6/36 sin infección) y la muestra de Dengue 4, ambas contienen un pico en el mismo tiempo de retención de la albúmina.

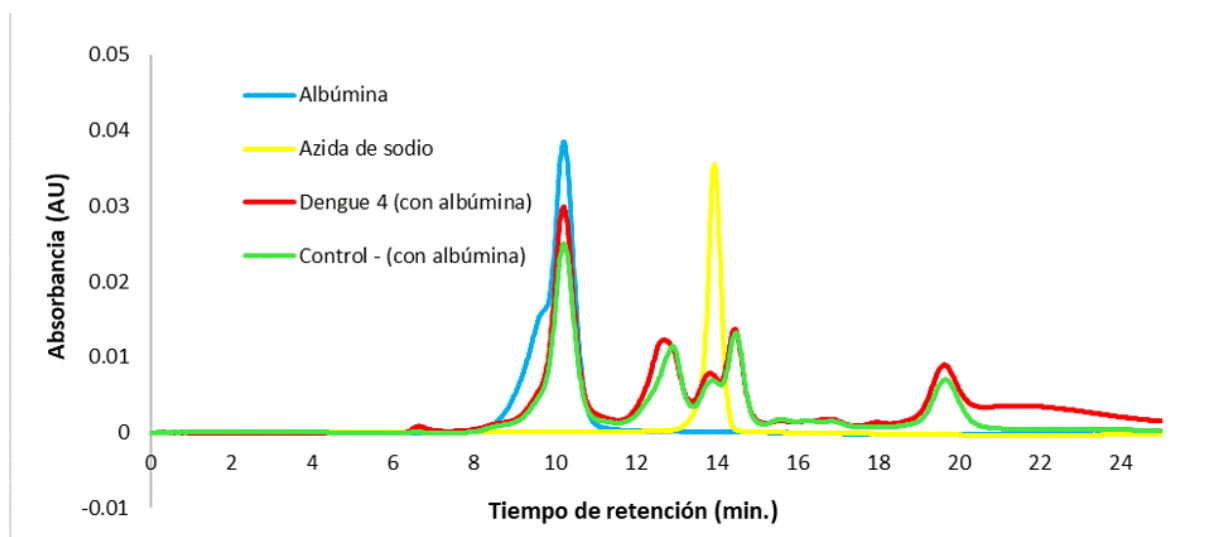
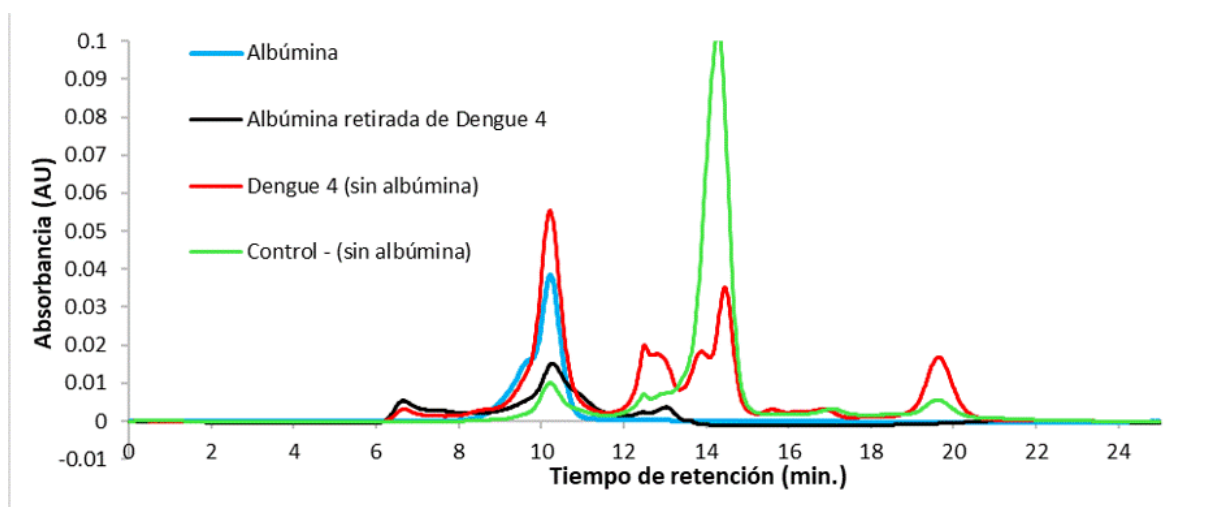


Figura. 25 CEM de Dengue 4 (parte 1) mediante el arreglo de fotodiodos a 260nm. Con albúmina.

La segunda parte del cromatograma a 260 nm (*figura 26*) que contenía la muestra de Dengue 4 sin albúmina y el control negativo (sobrenadante de C6/36 sin infección y sin albúmina) mostró una ligera diferencia entre los 6 y 7 min del tiempo de retención, misma que presentó la muestra de albúmina retirada de Dengue 4 (obtenida mediante la resina Blue Sepharose). Los demás picos no presentaron diferencia en el tiempo de retención, pero sí difirieron de las unidades de absorbancia.



*Figura. 26 CEM de Dengue 4 (parte 2) mediante el arreglo de fotodiodos a 260 nm. Sin albúmina.*

El cromatograma a 280 nm se presenta también en dos partes debido al número de muestras. En la primera parte, se encuentran las muestras que contenían albúmina (*figura 27*) y en la segunda parte las que no contenían albúmina (*figura 28*). En la primera parte del cromatograma a 280 nm (*figura 27*) que contiene al control negativo (sobrenadante de C6/36) y a la muestra de Dengue 4 (sobrenadante de C/36 infectadas con dengue 4), ambos con albúmina, no se observó diferencia significativa.

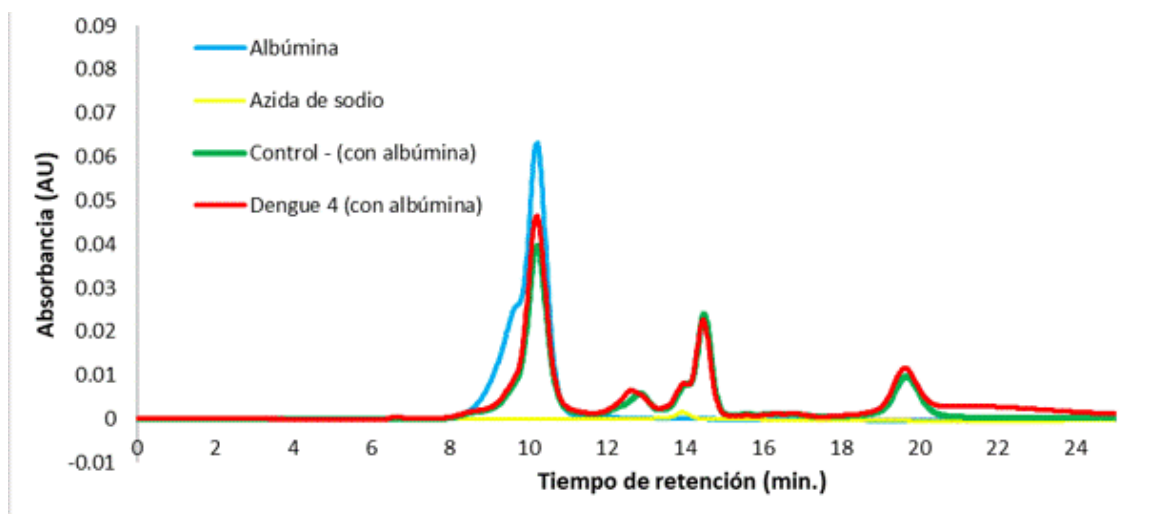


Figura. 27 CEM de Dengue 4 (parte 1) mediante el arreglo de fotodiodos a 280nm. Con albúmina

En la segunda parte del cromatograma a 280 nm (*figura 28*), sí se observaron diferencias entre la muestra de Dengue 4 (sobrenadante de C6/36 infectado con Dengue 4 sin albúmina) y el control negativo (sobrenadante de C6/36 sin albúmina), ya que el primer pico a los 6 min solo se observa de parte de Dengue 4 y no del control negativo. Sin embargo, éste también está presente en la albúmina que se le retiró a la muestra de Dengue 4. A partir del segundo pico, todos se traslapan entre sí, únicamente variando la altura de los picos, pero conservando el ancho de estos. El pico del control de albúmina se sobrelapa con todas las muestras. Cada pico fue recolectado para su análisis.

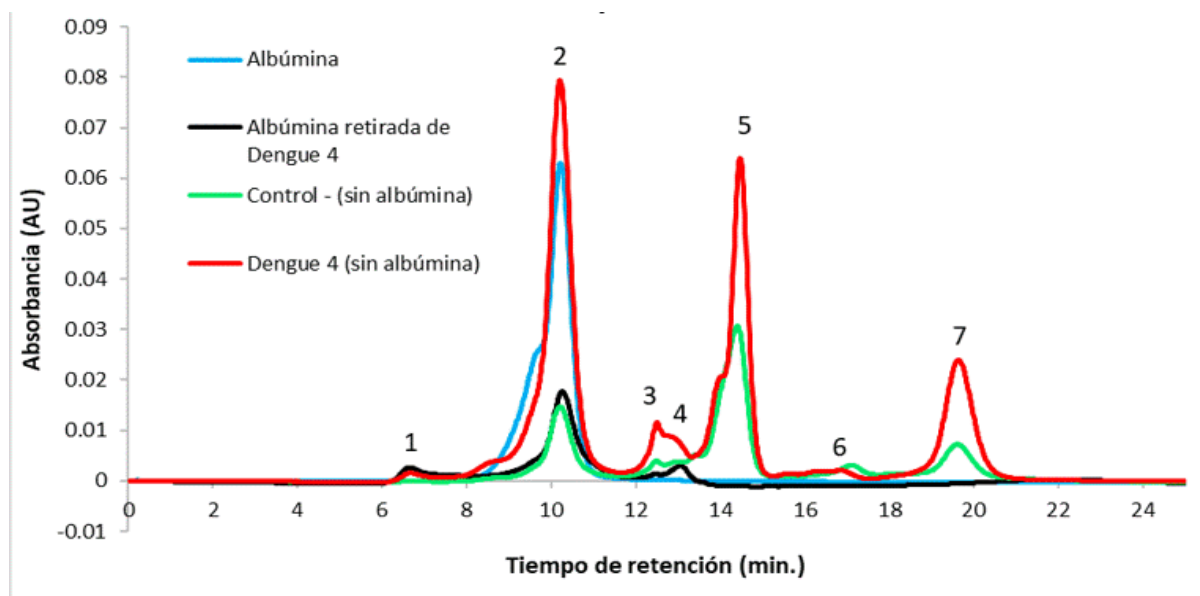


Figura. 28 CEM de Dengue 4 (parte 2) mediante el arreglo de fotodiodos a 280nm. Sin albúmina

Los picos obtenidos de la muestra de Dengue 4 sin albúmina, de acuerdo con el cromatograma anterior (*figura 28*) se analizaron para detectar la presencia de la NS1, mediante Western blot (*figura 29*). Del cual solo el control positivo (sobrenadante de C6/36 infectado con Dengue 4) dio señales de presencia de la NS1 y albúmina; los picos 2, 3 y 4 que se obtuvieron dentro y cercanos al tiempo de retención de la albúmina presentaron una tenue banda con peso similar a la albúmina. Las demás muestras se concentraron 4 veces no presentaron ninguna banda.

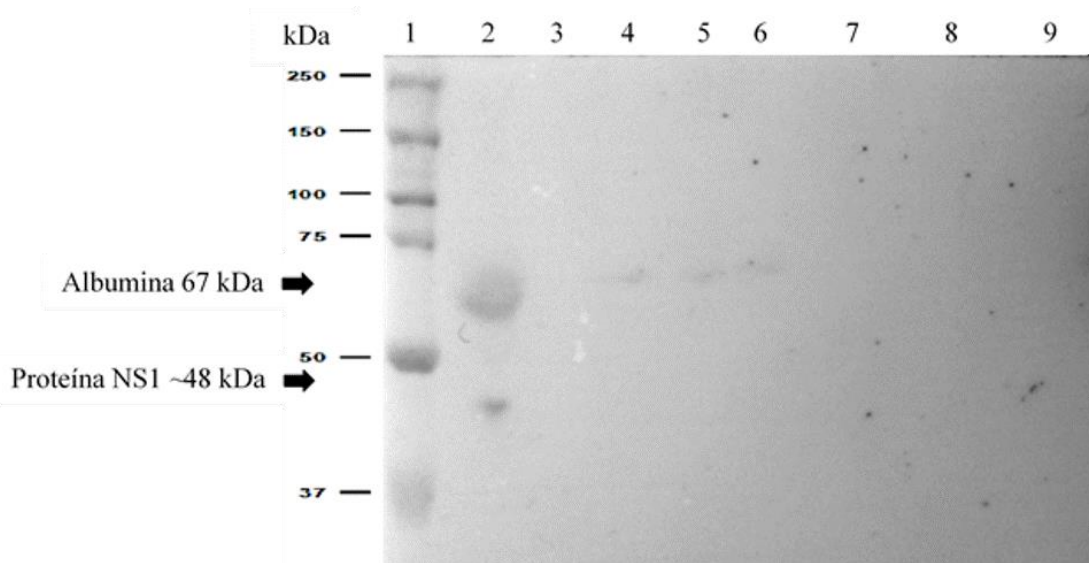


Figura. 29 Western blot contra NS1 de la CEM de Dengue 4 (sin albúmina)

1) MP: marcador de peso molecular Dual color. 2) Control positivo: sobrenadante de C6/36 infectadas con dengue 4. 3) Primer pico cromatográficos de Dengue 4 de la figura 28. 4) Segundo pico. 5) Tercer pico. 6) Cuarto pico. 7) Quinto pico. 8) Sexto pico. 9) Séptimo pico (todos los picos son tomados de la figura 28).

Para evaluar la viabilidad partículas virales, se tituló mediante ensayo de placa el primer pico del cromatograma a 280 nm (figura 28), por ser el único diferente al control negativo. En el ensayo de placa (figura 30) no hubo formación de placas en ninguna dilución de la muestra, por lo que sin poder descartar que haya partículas virales, al menos no se obtuvieron partículas viables.

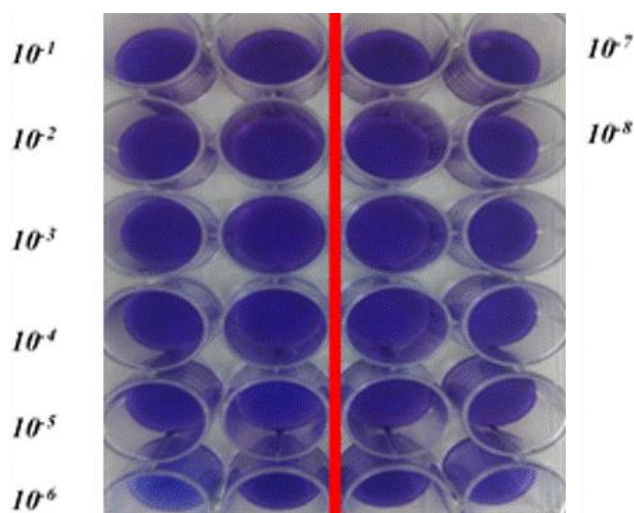


Figura. 30 Plaqueo del 1er pico de la CEM de Dengue 4 S/A  
Dengue 4 S/A: sobrenadante de C6/36 sin albúmina tras su paso por la Blue Sepharose

### 8.1.2.2. Purificación viral por colchón de sacarosa.

Al no poder purificarse el virus ni la proteína NS1 con la metodología anterior, se probó otra técnica sencilla, para purificar únicamente las partículas virales viables, haciendo uso de un colchón de sacarosa. Se realizó la purificación para ambos virus Dengue y Zika.

#### 8.1.2.2.1. Purificación del virus Dengue



Figura. 31 Colchón de sacarosa.

En la purificación del virus dengue se siguió el protocolo reportado por Jensen M.S. y colaboradores (Jensen 2016), en el cual preparó un colchón de sacarosa al 20% y sobre este se colocó el sobrenadante de células C6/36 infectadas con Dengue 2 (figura 31). El pellet final resuspendido se analizó mediante electroforesis en un gel teñido con Coomassie (figura 32) en el cual se observó una banda (67kDa) en los carriles de las muestras del lavado.

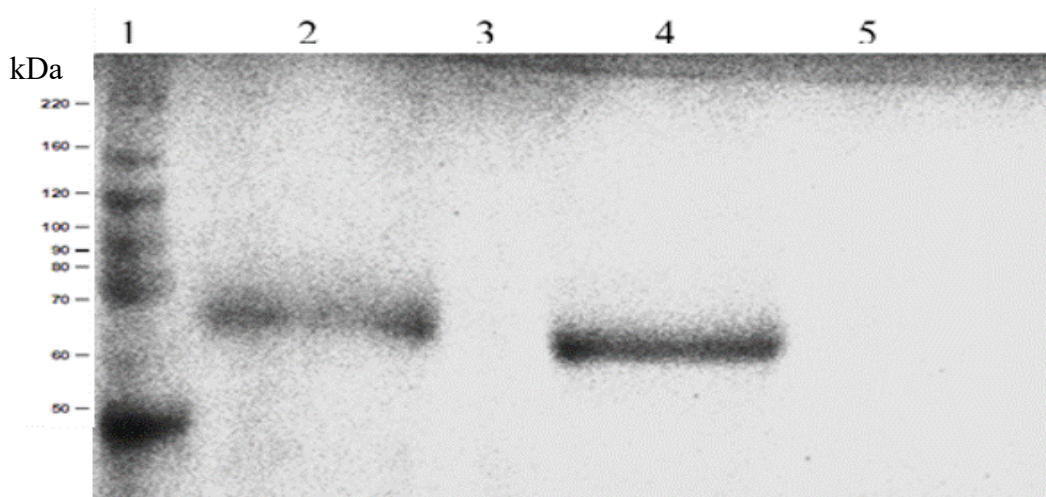
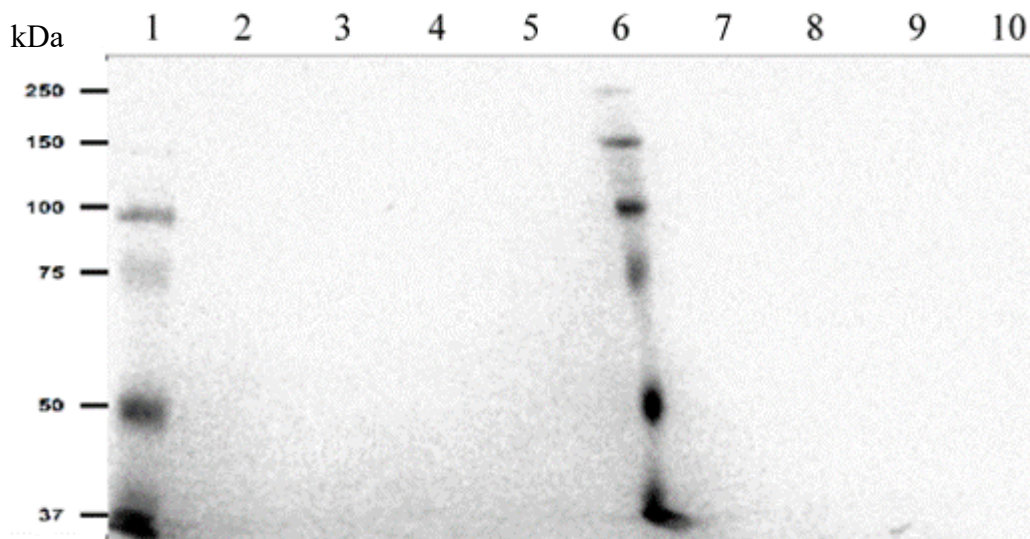


Figura. 32 Coomassie de la purificación de Dengue 2 por colchón de sacarosa.

1) MP: Marcador de peso molecular BenchMark™. 2) Lavado: sobrenadante despues del lavado del pellet. 3) Pellet: pellet final que contiene las particulas virales resuspendido en buffer HEPES. 4) Lavado: sobrenadante despues del lavado del pellet (duplicado). 5) Pellet: pellet final que contiene las particulas virales resuspendido en buffer HEPES (duplicado).



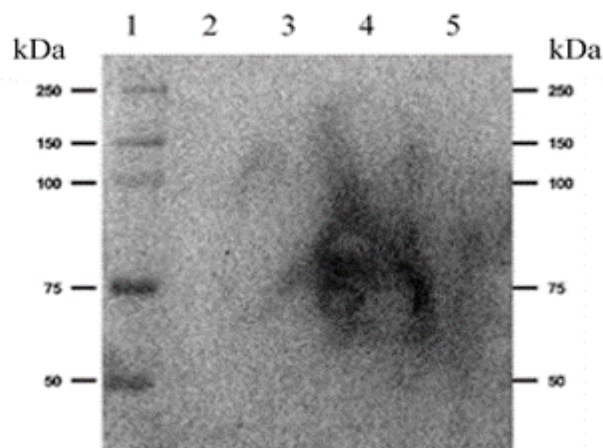
Debido al resultado anterior, se repitió varias veces la purificación. Adicionalmente, se realizaron Western blots para identificar a la proteína E de ambos virus, la cual forma parte de la estructura del virus y da origen a la envoltura; su identificación es señal de la presencia del virus. Sin embargo, en ninguna de las repeticiones fue posible identificar a la proteína viral por esta técnica ni en el pellet final, ni en los lavados de este (*Fig.33*).



*Figura. 33* Western blot de la purificación de Dengue 2 por colchón de sacarosa para detectar la proteína E

**1)MP:** Marcador de peso molecular Dual color. **2) Control positivo:** sobrenadante de C6/36 infectadas con Dengue 2. **3)Sobrenadante.de C6/36”A”:** sobrenadante de C6/36 infectadas con Dengue 2 que se ocupo al inicio de la purificación.. **4) Lavado:**sobrenadante despues del lavado del pellet “A”. **5) Pellet de virus “A”:** pellet final que contiene las particulas virales resuspendido en buffer HEPES. **6) MP:** Marcador de peso molecular Dual color. **7) Control negativo:** Buffer HEPES. **8) Sobr.de C6/36”B”:** sobrenadante de C6/36 infectadas con Dengue 2 que se ocupo al inicio de una segunda purificación (material mas fresco). **9) Lavado:** sobrenadante despues del lavado del pellet “B”. **10) Pellet de virus “B”:** pellet final que contiene las particulas virales resuspendido en buffer HEPES.

Debido a que únicamente se observaba señal de proteínas en las alícuotas del lavado, se modificó la metodología aumentando la velocidad de ultracentrifugación de 16,000 rcf a 30,000 rpm después del lavado, para asegurar que se volviera a formar el pellet y que éste no se quedara suspendido en el lavado. Se repitió dos veces más la purificación analizando las muestras con un Western blot (*figura 34*), una diluyendo el pellet en 9 mL y otra en 3 mL. Sin embargo, en ninguna fue posible observar ninguna banda, ni en el control positivo ya que el parecía haberse corrido además de que pudiera haber estado muy diluida la muestra.



*Figura. 34 Western blot de la purificación de Dengue 2 por colchón de sacarosa, 2do. intento.*

*1) MP: Marcador de peso molecular Dual color. 2) Control positivo: sobrenadante de C6/36 infectadas con Dengue 2.3) Pellet: pellet final que contiene las partículas virales resuspendido en buffer HEPES. 4) Lavado: sobrenadante después del lavado del pellet. 5) Buffer HEPES*

#### **8.1.2.2.2. Purificación del virus Zika.**

La purificación del virus Zika se llevó a cabo siguiendo el protocolo modificado del colchón de sacarosa. Sección 7.3.2.3. (de este trabajo). En la *figura 35* se muestra la imagen del Western blot de alícuotas de los diferentes pasos del proceso. Con el protocolo modificado, y tras la purificación se analizaron las muestras a lo largo del proceso mediante un Western blot contra la proteína E (proteína de envoltura del virus). En la imagen se aprecia una banda



correspondiente al tamaño esperado para la proteína E (50 kDa) del virus Zika tanto el control como en el carril donde se corrió el pellet resuspendido (en 3 mL) del colchón. En los demás carriles no se observó presencia de bandas.

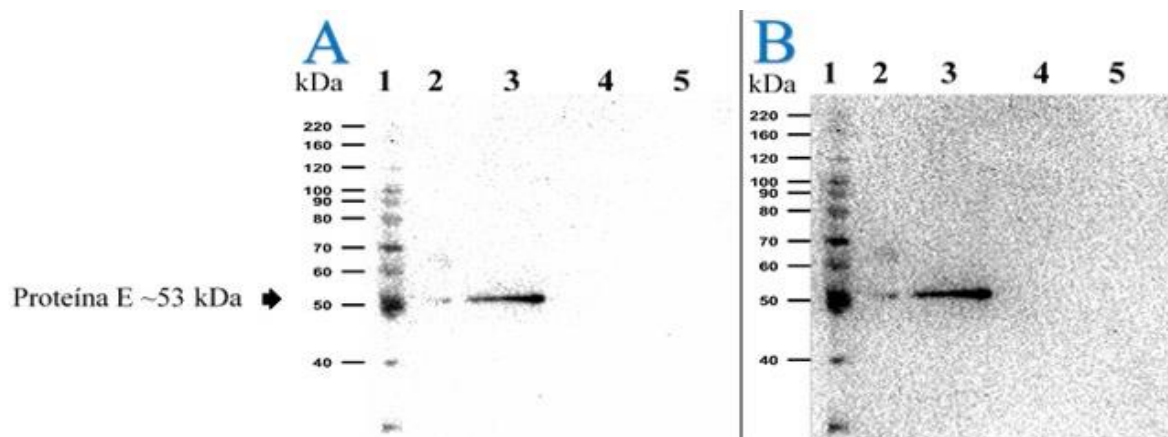


Figura. 35 Western blot de la purificación de Zika por colchón de sacarosa.

1) MP: Marcador de peso molecular BenchMark™. 2) Control positivo: sobrenadante de C6/36 infectadas con Zika. 3) Pellet: pellet final que contiene las partículas virales resuspendido en buffer HEPES. 4) Lavado: sobrenadante después del lavado del pellet 5) HEPES: buffer HEPES. Ambas imágenes son del mismo western blot con diferentes tiempos de exposición “A” a los 51 seg. y “B” a 97 seg.

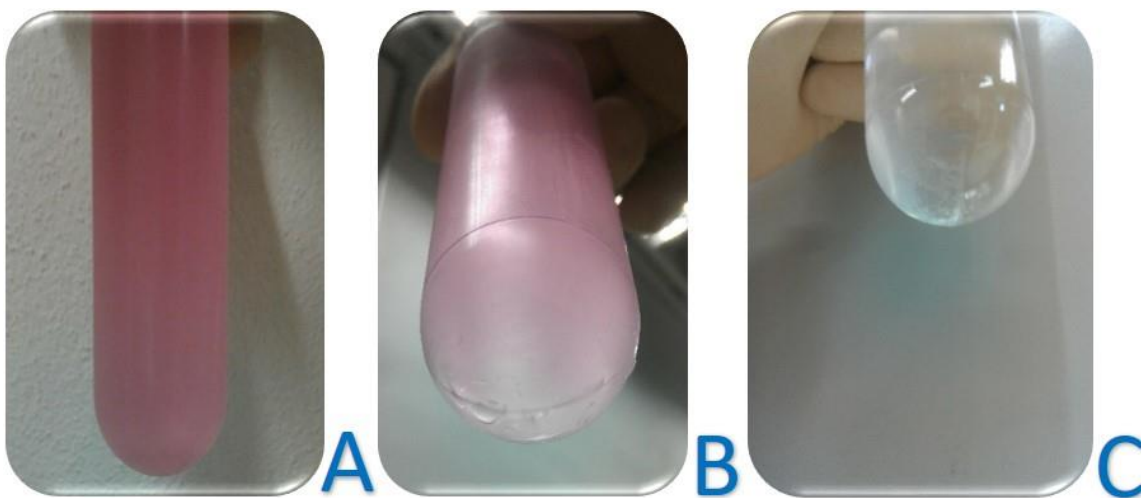
Después de verificar la presencia del virus, se evaluó mediante un ensayo de placa su viabilidad. En este ensayo, no se pudo apreciar la formación de placas, sólo se visualizaron algunas áreas circulares más tenues que otras, por lo que no se pudo determinar el título viral, sin embargo, no se probó la muestra sin diluir el pellet.

### 8.1.2.3. Purificación viral por el protocolo de Aizawa.

Después de no obtener los resultados esperados para el virus Zika con el colchón de sacarosa, se comenzó a trabajar con el virus Dengue mediante el protocolo de purificación de Aizawa, probándose con sus respectivas modificaciones para los virus de Dengue 2, 4 y también Zika (Aizawa 1980) (Sección 7.3.2.4 de este trabajo).

### 8.1.2.3.1. Purificación de Zika.

Con la finalidad de intentar la purificación de partículas virales a partir de otra fuente diferente a extractos de cerebro de ratones lactantes, se repitió el protocolo de purificación de Aizawa y colaboradores, partiendo de sobrenadantes de células C6/36 infectadas con Zika (*figura 36*) (Aizawa 1980).



*Figura. 36* Proceso de purificación del virus Zika por el Protocolo de Aizawa.

**A)** Sobrenadante de C6/36 infectadas con Zika y tratadas con sulfato de protamina. **B)** Sobrenadante viral de Zika con PEG, después de centrifugar. **C)** Pellet con PEG disuelto en PBS. Sección 7.3.2.4. de este trabajo.

Se tomaron muestras durante el proceso y se evaluaron mediante un Western blot contra la proteína E de Zika (*figura 37*), en el cual solo se apreciaron bandas en el control positivo y la muestra tras el tratamiento con sulfato de protamina, donde esta última presentó una banda muy cercana al peso molecular de la proteína E (~50 kDa). Sin embargo, en la muestra del pellet final donde se deberían encontrar las partículas virales no se aprecia ninguna banda que indique la presencia de esta proteína viral.

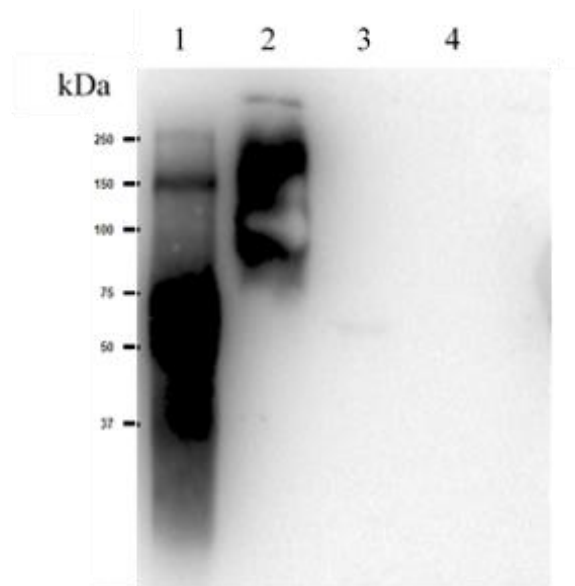


Figura. 37 Western blot contra la proteína E de Zika producido en C6/36  
1) MP: Marcador de peso molecular Dual color. 2) Control positivo: Sobrenadante de C6/36 infectadas con Zika 3) Sobrenadante con sulfato de protamina (Después de centrifugar la suspensión viral con sulfato de protamina).4) Pellet viral c/PEG en PBS: Pellet (obtenido después del tratamiento con PEG) en PBS.

### 8.1.3. Cerebro de ratones lactantes.

#### 8.1.3.1. Purificación viral por el Protocolo de Aizawa.

##### 8.1.3.1.1. Purificación de Dengue 4 a partir de extracto de cerebro.

En el primer paso de la purificación el extracto de cerebro de ratones lactantes infectados con Dengue 4 que se ve observo muy consistente, se tuvo que diluir y la suspensión viral adquirio mas fluidez, pero cuando se trató con sulfato de protamina se generó una gran cantidad de fóculos de una tonalidad blanquizca que al ser separados por ultracentrifugación se formo un gran pellet (*figura 38, A*). Al sobrenadante se le agregó PEG 6000, se centrifugó y esta vez se formó un pequeño pellet que apenas se aprecio (*figura 38, B*), el cual se trató con etanol dándole una tonalidad color azul a la solución (*figura 38, C*), pero después de agitar cuidadosamente para disolver el pellet se formaron burbujas (*figura 38, D*). Mediante ensayo

de placa se tituló el producto del pellet final disuelto en 5 mL de etanol al 4%. En este ensayo no se evidenció la presencia de placas.

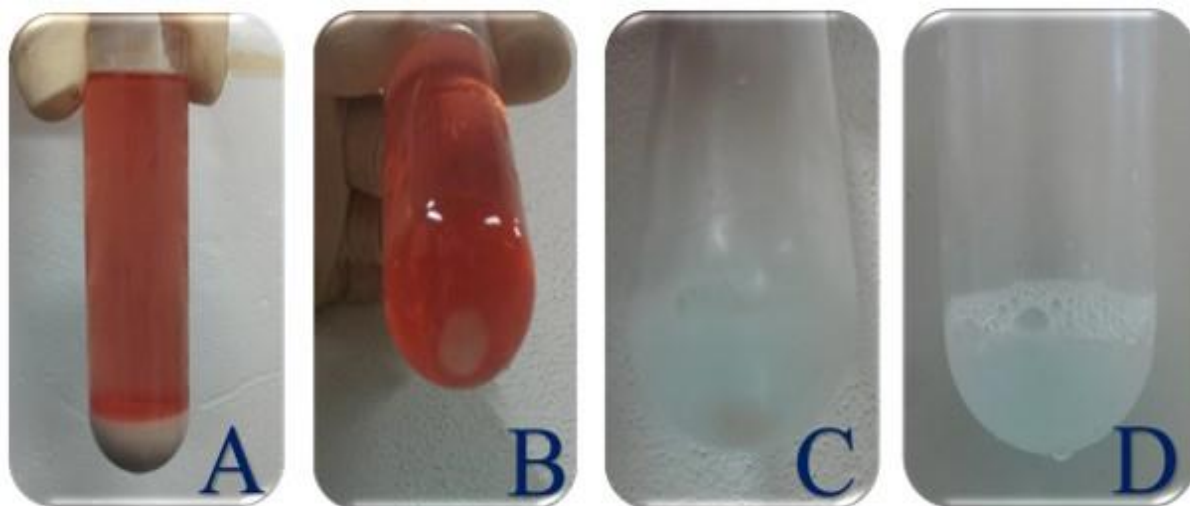


Figura. 38 Proceso de purificación del virus Dengue 4 por el Protocolo de Aizawa.

A) Suspensión viral DNV2 con sulfato de protamina tras ultracentrifugarse. B) Sobrenadante viral Dengue 4 con PEG al 4%, tras ultracentrifugarse. C) Pellet viral Dengue 4 con etanol al 4%. D) Pellet Dengue 4 disuelto en etanol al 4%.

#### 8.1.3.1.2. Purificación de Dengue 2 a partir de extracto de cerebro.

Debido al resultado obtenido en la purificación anterior, se optó por hacer algunas modificaciones para identificar en qué momento se perdían las partículas virales. Las modificaciones consistieron en omitir el paso con etanol y compararlo con un pellet que si fuera tratado con etanol. Inicialmente se siguió la misma metodología anterior (figura 39). Finalmente se evidenció, una menor cantidad de pellet en el tubo tratado con etanol.

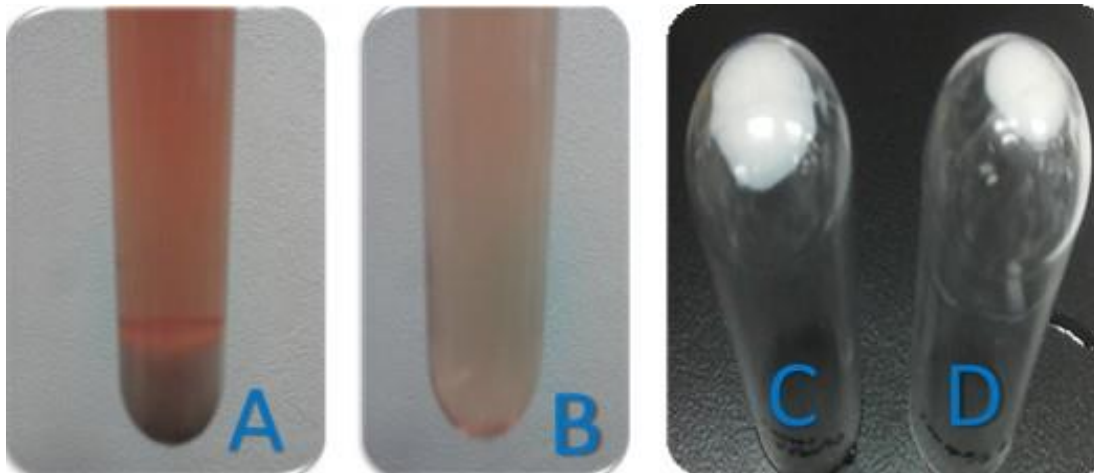


Figura. 39 Proceso de purificación del virus Dengue 2 por el Protocolo de Aizawa.

**A)** Suspensión viral de Dengue 2 con sulfato de protamina (1mg/mL), después de centrifugar. **B)** Sobrenadante viral de Dengue 2 con PEG, después de centrifugar. **C)** Pellet viral de Dengue 2 con PEG tratado únicamente con PBS. **D)** Pellet viral de Dengue 2 con PEG tratado con etanol al 4%.

De cada paso de la purificación se tomaron muestras, las cuales fueron evaluadas en un Western blot contra la proteína E de Dengue como señal de la presencia del virus, ya que la proteína E forma parte de la estructura del virus (*figura 40*). En el análisis, se puede apreciar la presencia de una banda correspondiente a la proteína E en el control positivo, en el sobrenadante luego del tratamiento con sulfato de protamina y en los pellets finales tratados o no con etanol. Sin embargo, en estos últimos pasos del proceso aparece una banda a 100 kDa el doble de la proteína E (50 kDa).

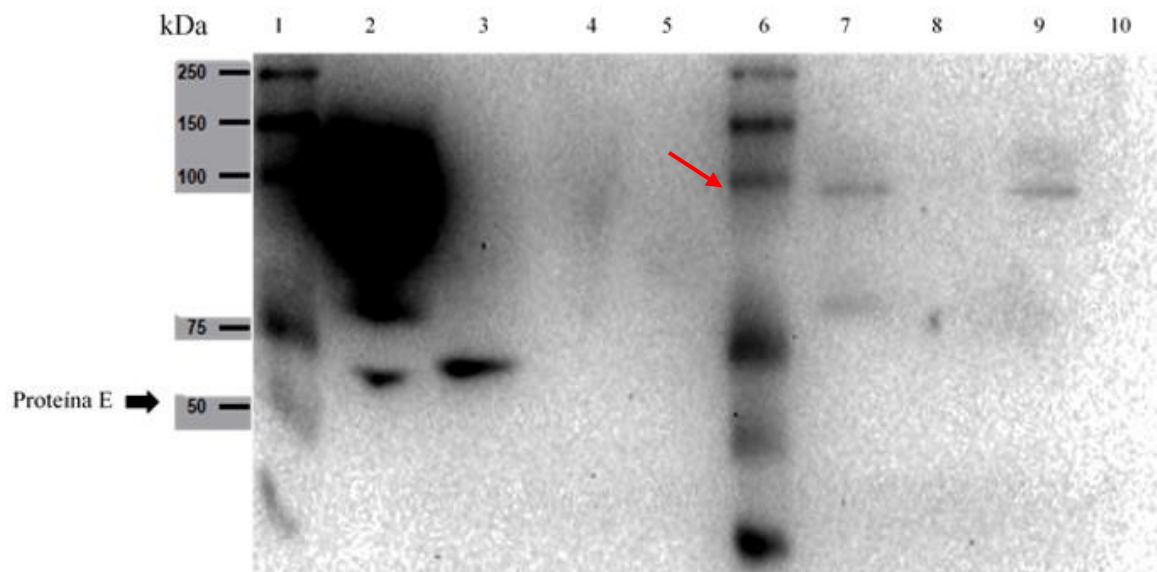


Figura. 40 Western blot del proceso de purificación por el protocolo de Aizawa (contra la proteína E).

**1)** MP: Marcador de peso molecular *Dual color*. **2)** Control positivo: Suspensión viral de extracto de cerebro infectado con Dengue 2 diluida. **3)** Sobrenadante/sulfato de protamina: Sobrenadante con sulfato de protamina (Después de centrifugar la suspensión viral con sulfato de protamina). **4)** Pellet de sulfato de protamina: Pellet con sulfato de protamina (Después de centrifugar la suspensión viral con sulfato de protamina). **5)** Sb/PEG: Sobrenadante obtenido después de centrifugar el Sobrenadante de sulfato protamina con PEG. **6)** MP: Marcador de peso molecular *Dual color*. **7)** Virus en PBS sin tratamiento de etanol: Pellet final que contiene el virus con PEG disueltos en PBS (previo a un lavado en PBS). **8)** Sobrenadante del lavado del virus en PBS: Sobrenadante del lavado del pellet (con PEG) en PBS. **9)** Virus en PBS tratado con etanol: Pellet final que contiene el virus disuelto en PBS, que fue tratado con etanol para eliminar el PEG. **10)** Sb del tratamiento con etanol. Sobrenadante después de tratar

Para obtener un resultado más certero se buscó el título viral de las muestras tomadas durante el proceso de la purificación, se realizaron ensayos de placa a cada muestra (figura 41). El control positivo (A) presentó pequeños halos con un título viral de  $4 \times 10^4$  UFP/mL, la muestra inicial de Dengue 2 (B) previa al proceso de purificación presentó halos inmediatos uno al otro, donde un halo presentaba un especie de aureola con un título viral de  $5 \times 10^4$  UFP/mL, la muestra del sobrenadante después del tratamiento con sulfato de protamina (C) (que es el primer paso en la purificación) presentó halos con la misma forma similar a una flor con un título viral de  $5 \times 10^5$  UFP/mL, la muestra del pellet disuelto en PBS después del tratamiento con PEG (D) mostró una combinación entre halos pequeños y en forma de flor con



un título viral de  $5 \times 10^4$  UFP/mL; y, la muestra del pellet con PEG tratado con etanol (E) cuya muestra presentó un título viral de 0 UFP/mL.

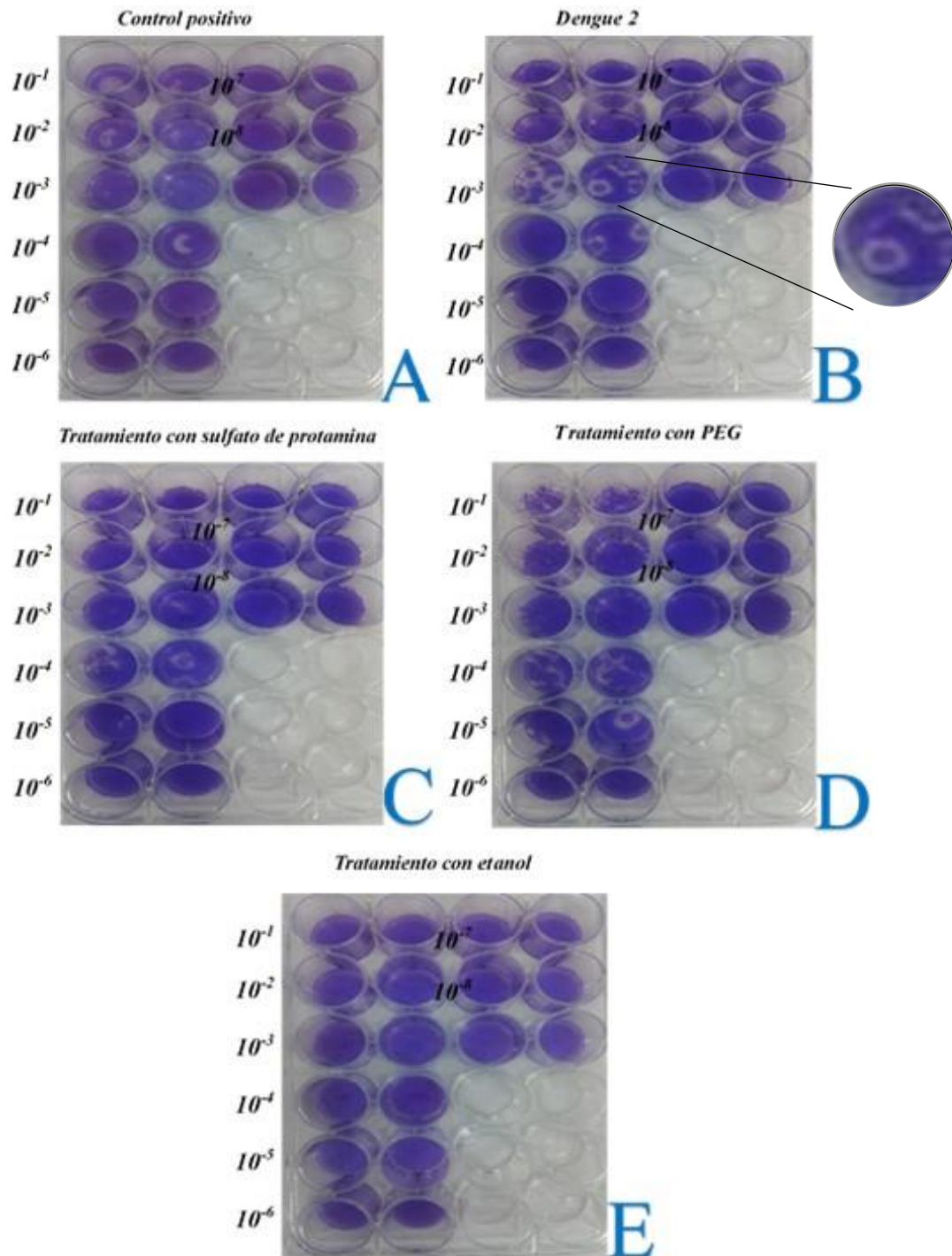


Figura. 41 Ensayo de placa de la purificación de Dengue 2 a partir de extracto de cerebro.

A) Ensayo de placa la suspensión viral de Dengue 2 utilizado como control positivo, con un título viral de  $4 \times 10^4$  UFP/mL.

B) Ensayo de placa de la suspensión de extracto de cerebro infectado con Dengue 2 que es el material de inicio de la purificación presento un título viral de  $5 \times 10^4$  UFP/mL, las placas obtenidas presentaron forma de halo similar a una flor, una forma inusual de placas. C) Ensayo de placa del sobrenadante después del tratamiento con Sulfato de protamina que es el primer paso en la purificación y presento un título viral de  $5 \times 10^5$  UFP/mL.

D) Ensayo de placa del pellet disuelto en PBS después del tratamiento con PEG que presento un título viral de  $5 \times 10^4$  UFP/mL.

E) Ensayo de placa del pellet con PEG tratado con etanol, cuya muestra presentó un título viral de 0 UFP/mL.

### 8.1.3.1.2.1. Eliminación del PEG por CEM.

Después de no obtener resultados en la purificación del virus Zika con el protocolo de Aizawa, se continuó trabajando con las muestras obtenidas al final de la purificación de Dengue 2 que aún contenían PEG, debido a que, hasta este paso, aún se contaba con partículas virales e infectivas. Por esta razón, se desarrolló un protocolo para eliminar el polietilenglicol a través de la cromatografía de exclusión molecular, utilizando la resina G-100. Las muestras sometidas a la cromatografía fueron: el pellet final (obtenido tras el tratamiento con PEG) tratado y no con etanol. La primera muestra que se corrió fue el pellet final con PEG sin tratar con etanol. En el cromatograma correspondiente a esta muestra, (figura 42) se reflejaron dos picos: el primero a los 18 min del tiempo de retención con muy poca altura y el segundo a los 40 min, mismo tiempo en el que se observó el PEG (que se corrió solo previamente) llegando a los 90 mAu.

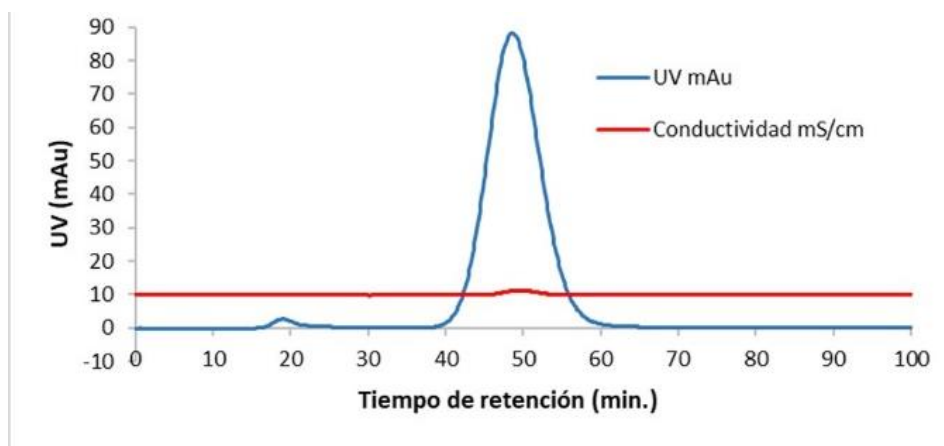
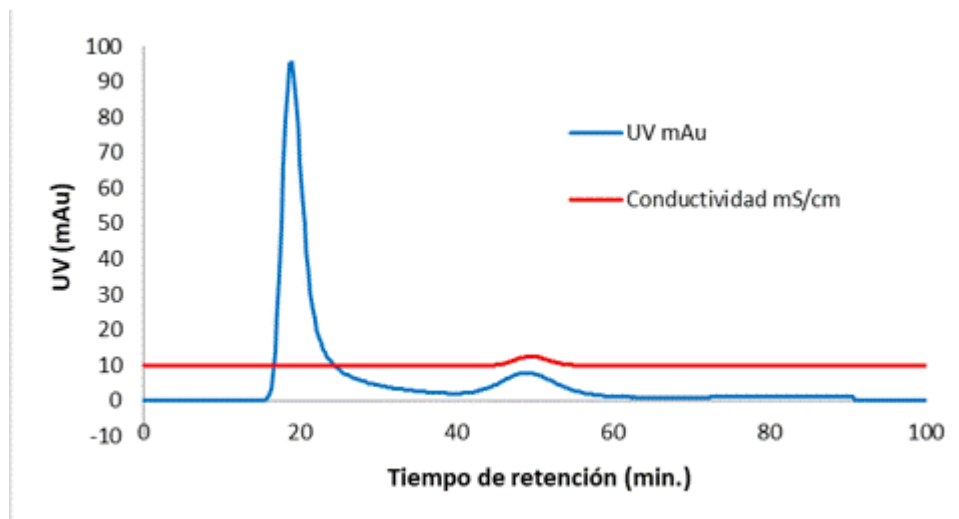


Figura. 42 CEM de Dengue 2 con PEG a través de la resina G-100.



En el cromatograma del pellet tratado con etanol, (*figura 43*) se evidencian dos picos similares al cromatograma anterior. El primer pico a los 18 min alcanzando mayores unidades de alrededor de 90 mAu, y el segundo también 40 min, con una considerable menor cantidad de mAu.



*Figura. 43 CEM de Dengue 2 con PEG y tratamiento de etanol a través de la resina G-100.*

El material de los dos picos observados en el cromatograma de la figura 43, fue recolectado y se sometió a ensayos de placa, en los cuales no hubo evidencia de la presencia de virus viables a pesar de presentar un pico de absorbancia considerablemente mayor.

### 8.1.2. Tabla de comparación de resultados

A continuación se resumen los resultados obtenidos en las técnicas usadas en este trabajo

SISTEMA	MÉTODO DE PURIFICACIÓN		OBJETIVO A PURIFICAR	RESULTADO
<b>Cerebro de raton</b>	Protocolo de Alizawa (Purificación con sulfato de protamina y PEG)		Dengue 4	No se obtuvo señal al final del proceso
			Dengue 2	La muestra tratada con etanol mostro señal del doble peso molecular de la proteina E en el western blot, pero con un titulo de 0 UFP
	Protocolo de Alizawa modificado (Purificación con sulfato de protamina y PEG)	Eliminación del PEG por Cromatografía de exclusión molecular a través de la resina G-100	Dengue 2	Se observa separación en el cromatograma pero no hay presencia mediante ensayo en placa.
<b>Células C6/36</b>	Protocolo de Aizawa (Purificación con sulfato de protamina y PEG)		Zika	Se obtiene señal de muestra hasta la mital del proceso en western blot
	Por colchón de sacarosa sin y con modificaciones		Dengue 2	Sin señal de muestra y control en western blot
	Por colchón de sacarosa con modificaciones		Zika	Señal de presencia en western blot
	Por Cromatografía de exclusión molecular a través de la columna Ultrahidrogel 500		Dengue 4	Se observa diferencia en el cromatograma pero no se detecto su presencia en westenr blot
	Eliminacion de albúmina por Cromatografía de afinidad atraves de la columna con resina Blue Sepharose	Por Cromatografía de exclusión molecular a través de la columna Ultrahidrogel 500	Dengue 4	
		Proteína NS1		
<b>Células CHO</b>	Por Cromatografía de exclusión molecular atraves de la columna con resina Superdex 200	Electroelución	Proteina NS1 recombinante	Proteína pura y posiblemente muy diluida.

Tabla 1. Resultados de la purificación de los virus Dengue 2, Dengue 4, Zika y su proteína NS1

## 9. DISCUSIÓN

Los *flavivirus* Dengue y Zika son virus con una alta repercusión en salud pública debido a la prevalencia y severidad en sus formas graves. Debido a esto, existe un creciente interés en la comunidad científica en plantear investigaciones que involucran el estudio de diferentes aspectos de la infección con estos virus como: mecanismos de patogénesis, evaluación de la respuesta inmune, mecanismos que favorecen la transmisión de estos agentes, interacción virus-hospedero tanto en humanos como en insectos vectores, desarrollo de vacunas, entre muchos (Gutsche et al., 2011) (Nunes et al., 2018) (Velandia et al., 2011) (Fan et al., 2014) y (Alcon et al., 2002).

Por esta razón, para la mayoría de estos estudios se hace necesario contar con preparaciones de virus purificados y viables. La proteína NS1, es la única proteína no estructural de los flavivirus que se secreta al espacio extracelular junto con las partículas virales y está implicada en diferentes mecanismos de patogénesis en las formas graves de la infección con Dengue y Zika. Sin embargo, los anticuerpos que se generan frente a ciertas regiones antigénicas de esta proteína, también se han asociado a protección frente a concentraciones letales del virus en modelos murinos. Por esta razón, se convierte en un blanco importante de estudio.

La purificación de flavivirus y sus productos como la proteína NS1, debe ser realizada mediante protocolos que rindan un producto que se adecue a su utilización posterior. Por ejemplo, si se requiere una preparación del virus puro sin NS1 o si, por el contrario, se requiere evaluar el comportamiento de ambos tal cual ocurre en un contexto natural de infección en los sueros de pacientes donde circulan concomitantemente. Por otra parte, también se debe considerar si se requieren virus viables para determinar cómo se afectan sus niveles de

replicación, producción, etc. o si se requieren virus inactivos como inmunógenos vacunales, para hacer ensayos de interacción, etc. Por esta razón, es importante evaluar previamente que producto se espera obtener de los procesos de purificación a utilizar para adecuarlos al objetivo de los protocolos de investigación del laboratorio.

En este trabajo, se planteó desarrollar una metodología eficiente para la purificación de partículas de Dengue y Zika viables y de la proteína NS1 por separado. Estas metodologías servirían como herramientas de obtención de estos bioelementos, que serían utilizados como material de partida en otros proyectos que se desarrollan en el laboratorio.

Como punto de partida a todos los métodos de purificación, es importante conocer el origen del stock inicial de virus, debido a que, dependiendo de las características del material de partida, también se deben ajustar los tratamientos que deben hacerse para lograr una purificación exitosa. En este trabajo, se intentó inicialmente hacer infecciones con virus Dengue en células CHO's en suspensión, ya que esta línea pudiera escalarse fácilmente para la obtención de grandes cantidades de suspensión viral y adicionalmente el medio de crecimiento no se suplementa con otras sustancias que pudieran interferir en la purificación. Sin embargo, la cinética de infección, en ningún muestreo (6h, 8h y 24 h) fue posible detectar la amplificación viral por parte de estas células, por lo que se descartaron para este propósito.

Debido a que ya se ha visto en trabajos anteriores que la NS1 recombinante se expresa conservando la estructura y las glicosilaciones de la NS1 nativa, plantear estrategias para purificar la NS1 recombinante es de utilidad y aplicable en investigaciones en donde se requiera evaluar comportamientos específicos de esta proteína (Lemos et al., 2003) (Rozen et al., 2012).

Se planteó purificar la NS1 recombinante a partir de sobrenadante de células CHO'S productoras de NS1 recombinante, con una cromatografía de exclusión molecular que logro separalas. Sin embargo, se obtuvieron dos fracciones que presentaban señal de NS1 en el

Western blot el hombro del pico 1 y el pico 2. Posiblemente por la cercanía al peso molecular de otras proteínas propias del medio y una mayor abundancia de estas no fue posible purificar la NS1 pura pues se encontraban proteínas de peso similares. Por lo que se pudo haber requerido una mayor concentración de la muestra de partida o una previa eliminación de los componentes por otro método. Las fracciones que contenían NS1, aunque no pura, se electroeluyeron obteniéndose de esta manera un 100% de pureza, porque su banda es la única que se corta y de la cual se extrae la proteína, pero es sumamente laboriosa la metodología y se requiere de una gran cantidad de geles y repeticiones para obtener una cantidad representativa, ya que constantemente se diluye por lo que para trabajar a grandes escalas sería inaccesible.

La purificación de la NS1 y del virus desde sobrenadantes de medios de cultivo en los que se requiera la presencia de suero fetal como las células C6/36 se complica debido a la alta concentración de albúmina presente en éste y, adicionalmente, por la cercanía de tamaños entre ésta y la proteína NS1. Por esta razón, se eliminó la albúmina del sobrenadante de las células C6/36 previamente infectadas con Dengue, pero sufrió al mismo tiempo una gran dilución y aumentó de concentración de sales por los buffers requeridos. Lo que muy probablemente imposibilitó su purificación mediante la cromatografía de exclusión molecular, que la propia purificación sometió a la muestra a otra dilución y aunque se mostrara una diferencia con el control negativo en el cromatograma, no presentó señal en el Western blot.

El método de purificación viral mediante un colchón de sacarosa descrito por Jensen M.S. y colaboradores plantea en su metodología un lavado a 16,000 rcf, con el fin de deshacerse de contaminantes (Jensen 2016). Sin embargo, tras la ausencia de partículas virales después de este paso y una señal de proteínas en el lavado, se realizaron modificaciones para el lavado con un aumento a 30,000 rpm en las revoluciones del centrifugado, para asegurar que se volviera a formar el pellet y que éste no se quedara suspendido en el lavado. A pesar de los intentos no

se obtuvieron partículas virales viables con ambos virus. Posiblemente, la concentración del material de inicio fue insuficiente y no se contó con la cantidad suficiente de virus de Dengue detectable para el Western blot, aunque el control positivo tampoco mostró señal, lo que podría dar un indicativo de un problema con el anticuerpo, pues el método fue descrito para el virus Dengue y por otra parte fue posible identificar proteínas virales del virus Zika mediante Western blot con la misma metodología modificada. Por lo que este método se podría usar donde no se requieran virus viables por que no se hicieran placas para demostrar su viabilidad.

Los flavivirus presentan una envoltura de naturaleza lipídica, que si es dañada se pierde la infectividad, debido a, que se compromete la integridad de las proteínas que la conforman, alterándose los sitios de unión entre ésta y sus receptores en la célula a ser infectada, es decir, se vuelven partículas no infecciosas. El método de purificación viral originalmente descrito por Aizawa y colaboradores empleaba etanol con la finalidad de retirar el PEG 6000 (agente precipitante de las partículas virales) usado en el último paso de la purificación, (Aizawa 1980). Sin embargo, dada la naturaleza lipídica de los virus Dengue y Zika, se probó el uso de etanol de acuerdo a la metodología de referencia y también se realizaron modificaciones para retirar el PEG 6000 mediante una cromatografía evitando el uso de etanol. Aun así, no fue posible la obtención de partículas virales viables. El cultivo de células C6/36 infectado con el virus Zika, presento señal en el sobrenadante después del sulfato de protamina, sin embargo, después de eso se pierde. Una posibilidad es que el material de partida no estuviera lo suficientemente concentrado o que los tratamientos iniciales utilizados en este protocolo estén resultando muy agresivos a los agentes virales ensayados. Aunque el protocolo original fue desarrollado para la purificación de un flavivirus muy cercano a Dengue y Zika, quizás la técnica no sea la más adecuada para la purificación de estos últimos. Dado que fue posible identificar proteínas virales en Western blot cuando se partió de extracto de cerebro de ratón que contenía una mayor

concentración de partículas virales. Este método sería de utilidad en investigaciones donde no se requieran partículas virales viables. Para concentrar partículas virales mediante ultracentrifugación se requiere de una fuerza de 16,000 g o más y velocidades desde 30,000 rpm durante horas según sea el caso (Jensen et al., 2016) (Aizawa et al., 1980).

## 10. CONCLUSIÓN.

Las células CHO's se mostraron resistentes a la infección por Dengue 4 y no permitieron obtener partículas virales. Sin embargo, estas células si son candidatas para producir la NS1 de manera recombinante, cuya proteína no se logró separar eficientemente por cromatografía de exclusión molecular usando la resina Superdex 200 aunque, ésta si eliminó gran parte de los contaminantes. Para complementar la purificación se usó la electroelución que discrimina por el peso molecular, la cual si ofreció la NS1 RECOMBINANTE pura.

La resina Blue Sepharose eliminó totalmente la albúmina del sobrenadante de células infectadas con Dengue 4 mediante la cromatografía de afinidad, cuyas muestras se pasaron a través de la cromatografía de exclusión molecular usando la resina Ultrahidrogel 500, mostrando una mayor separación de sus componentes en las muestras sin albúmina que en las muestras con albúmina pero no fue posible separar la NS1 nativa, ni las partículas virales del sobrenadante de células C6/36 infectadas al no mostrar señal en las técnicas de indentificación.

Con el protocolo de purificación del colchón de sacarosa con modificaciones en la velocidad de ultracentrifugación se logró obtener partículas del virus Zika sin título viral. En cuanto al mismo protocolo con y sin modificaciones para Dengue, no se pudo visualizar la presencia de partículas de Dengue en las técnicas de identificación de las muestras finales a la purificación y tampoco en el control positivo.

El protocolo de purificación de Aizawa modificado permitió obtener partículas virales viables en presencia de PEG presentando una morfología del halo diferente a la común con un título viral de  $5 \times 10^4$  UFP/mL a partir de extracto de cerebro. La muestra tratada con etanol para eliminar el PEG obtuvo un título viral de 0 UFP/MI. Se logró eliminar el PEG mediante cromatografía sin usar eanol pero con un título viral de 0 UFP/mL.



## **11. PRESPECTIVAS**

Como alternativa de este trabajo, sería indispensable comparar y evaluar otras metodologías más sencillas para la obtención de virus purificados y viables.

Una perspectiva de este trabajo pudiera ser trabajar en la maximización de estrategias de obtención de altas cantidades de NS1 recombinante, como, por ejemplo, hacer escalamientos del cultivo de células CHO, modificar las condiciones de cultivo, etc.

Evaluar modificaciones para concentrar las muestras después de las diluciones generadas por las técnicas de purificación.

Probar diferentes métodos para eliminar el PEG sin dañar las partículas virales que hasta este paso se encuentran intactas.

## 12. REFERENCIAS

- Alshammari, S. A., Alamri, Y. S., Rabhan, F. S., Alabdullah, A. A., Alsanie, N. A., Almarshad, F. A., & Alhaqbani, A. N. (2018). Overview of dengue and Zika virus similarity, what can we learn from the Saudi experience with dengue fever? *International Journal of Health Sciences*, 12(1), 77–82.
- Aizawa, C., Hasegawa, S., Chih-Yuan, C., & Yoshioka, I. (1980). Large-scale purification of Japanese encephalitis virus from infected mouse brain for preparation of vaccine. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(1), 54–57.
- Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., & Flamand, M. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of clinical microbiology*, 40(2), 376-381.
- Álvarez Escobar, María del Carmen, Torres Álvarez, Arnella, Torres Álvarez, Arling, Semper, Abel Iván, & Romeo Almanza, Daniel. (2018). Dengue, chikungunya, Virus de Zika. Determinantes sociales. *Revista Médica Electrónica*, 40(1), 120-128.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1684-18242018000100013&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242018000100013&lng=es&tlng=es).
- Álvarez Vera, Mayling, González Rodríguez, Annabel, Díaz Morejón, Danay, Morier Díaz, Luis, & Guzmán Tirado, María G. (2010). Normalización de la técnica de neutralización por placas en las células Vero para los virus del dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 62(2), 138-137. Recuperado en 16 de octubre de 2018,

de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602010000200009&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602010000200009&lng=es&tlng=es).

Álvarez-Rodríguez, L. M., Ramos-Ligonio, A., Rosales-Encina, J. L., Martínez-Cázares, M. T., Parissi-Crivelli, A. & López-Monteon, A. (2012). Expression, Purification, and Evaluation of Diagnostic Potential and Immunogenicity of a Recombinant NS3 Protein from All Serotypes of Dengue Virus. *Journal of Tropical Medicine*, 2012, 1–10. doi:10.1155/2012/956875.

Arredondo-García, JL, Méndez-Herrera, A, & Medina-Cortina, H. (2016). Arbovirus en Latinoamérica. *Acta pediátrica de México*, 37(2), 111-131. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-23912016000200111&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912016000200111&lng=es&tlng=es).

Bäck, A. T., & Lundkvist, Å. (2013). Dengue viruses – an overview. *Infection Ecology & Epidemiology*, 3, 10.3402/iee.v3i0.19839. <http://doi.org/10.3402/iee.v3i0.19839>

Bandaranayake AD, Almo SC. (2013). Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Lett*. 2014;588(2):253–260.

Bell, T. M., Field, E. J., & Narang, H. K. (1971). Zika virus infection of the central nervous system of mice. *Archiv für die Gesamte Virusforschung*, 35(2-3), 183–193. doi:10.1007/bf01249709

Brathwaite Dick, O., San Martín, J. L., Montoya, R. H., del Diego, J., Zambrano, B., & Dayan, G. H. (2012). The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4), 584–593. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0770>

Brault, A. C., Domi, A., McDonald, E. M., Talmi-Frank, D., McCurley, N., Basu, R. & Guirakhoo, F. (2017). A Zika Vaccine Targeting NS1 Protein Protects

Immunocompetent Adult Mice in a Lethal Challenge Model. *Scientific Reports*, 7, 14769. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-15039-8>

Camacho, F., Puchades, Y., Aguilar, A., Amín, N., García, A., Otero, O., & Vispo, N. S. (2012). Cromatografía de exclusión molecular como metodología para la purificación de bacteriófagos. *VacciMonitor*, 21(2), 6–9.

Casimiro Ulloa José (1890). La gripe y el dengue del Perú. Academia nacional de medicina de Lima.

Chaves, B. A., Orfano, A. S., Nogueira, P. M., Rodrigues, N. B., Campolina, T. B., Nacif-Pimenta, R. & Secundino, N. F. C. (2018). Coinfection with Zika Virus (ZIKV) and Dengue Virus Results in Preferential ZIKV Transmission by Vector Bite to Vertebrate Host. *The Journal of Infectious Diseases*, 218(4), 563–571. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiy196>

Christie, J. (1882). On Epidemics of Dengue Fever; Their Diffusion and Etiology. *The Indian Medical Gazette*, 17(3), 76–79. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5151939/pdf/indmedgaz70837-0020.pdf>

Clark, P. F., Rasmussen, A. F., & White, W. C. (1941). Further Studies on the Purification of Poliomyelitis Virus. *Journal of Bacteriology*, 42(1), 63–81.

Coelho, S. V. A., Neris, R. L. S., Papa, M. P., Schnellrath, L. C., Meuren, L. M., Tschoeke, D. A. & de Arruda, L. B. (2017). Development of standard methods for Zika virus propagation, titration, and purification. *Journal of Virological Methods*, 246, 65–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.04.011>

- Fan, J., Liu, Y., & Yuan, Z. (2014). Critical role of Dengue Virus NS1 protein in viral replication. *Virologica Sinica*, 29(3), 162–169. <https://doi.org/10.1007/s12250-014-3459-1>
- Flipse, J., & Smit, J. M. (2015). The Complexity of a dengue vaccine: A review of the human antibody response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(6), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003749>
- Freire, M. C. L. C., Pol-Fachin, L., Coêlho, D. F., Viana, I. F. T., Magalhães, T., Cordeiro, M. T. & Lins, R. D. (2017). Mapping Putative B-Cell Zika Virus NS1 Epitopes Provides Molecular Basis for Anti-NS1 Antibody Discrimination between Zika and Dengue Viruses. *ACS Omega*, 2(7), 3913–3920. doi:10.1021/acsomega.7b00608
- Galloway, I. A., & Schlesinger, M. (1937). Purification and concentration of the virus of foot-and-mouth disease by combined centrifugation and ultrafiltration methods. *The Journal of Hygiene*, 37(3), 463–470.
- Gard, S., & Pedersen, K. O. (1941). Purification of the virus of mouse encephalomyelitis (Theiler's virus). *Science*, 94(2447), 493–494. doi:10.1126/science.94.2447.493-a
- G-Biosciences (n.d.). Electroelution. (1st ed. EUA: A Geno Technology, Inc. (USA) brand name. [https://www.gbiosciences.com/image/pdfs/protocol/BE-602\\_protocol.pdf](https://www.gbiosciences.com/image/pdfs/protocol/BE-602_protocol.pdf)
- Guo, C., Zhou, Z., Wen, Z., Liu, Y., Zeng, C., Xiao, D. & Yang, G. (2017). Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990–2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 317. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00317>
- Gutsche, I., Coulibaly, F., Voss, J. E., Salmon, J., d'Alayer, J., Ermonval, M. & Flamand, M. (2011). Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America, 108(19), 8003–8008.

<http://doi.org/10.1073/pnas.1017338108>

Halstead, S. B. (2017). Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age. *Vaccine*, 35(47), 6355–6358. doi:10.1016/j.vaccine.2017.09.089

Harris, W. H., & Duval, C. W. (1924). STUDIES UPON THE ETIOLOGY OF DENGUE FEVER: I. EXPERIMENTAL TRANSMISSION TO THE LOWER ANIMAL. *The Journal of Experimental Medicine*, 40(6), 817–833. <https://doi.org/10.1097/00007611-192402000-00007>

Hayes, E. B. (2009). Zika Virus Outside Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 15(9), 1347–1350. <http://doi.org/10.3201/eid1509.090442>

Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2017). The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 81(1), e00055–16. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00055-16>

Ho, H. J., Wong, J. G. X., Mar Kyaw, W., Lye, D. C., Leo, Y. S., & Chow, A. (2017). Diagnostic Accuracy of Parameters for Zika and Dengue Virus Infections, Singapore. *Emerging Infectious Diseases*, 23(12), 2085–2088. <http://doi.org/10.3201/eid2312.171224>

Hombach, J., Friede, M., Moorphy, V., Costello, A., & Kieny, M. P. (2016). Developing a vaccine against Zika. *The BMJ*, 355, i5923. <http://doi.org/10.1136/bmj.i5923>

Hotta, S. (1953). Partial purification of the mouse-adapted dengue virus. *Acta Scholae Med. Univ. in Kioto*. 31(1), 7-10.

Hughes, T. P. (1934). A Partial Purification of Yellow Fever Virus Through Adsorption and Elution. *Journal of Bacteriology*, 28(4), 401–413.

- Jason H. Ambrose, Shamala Devi Sekaran, & Azliyati Azizan, (2017) “Dengue Virus NS1 Protein as a Diagnostic Marker: Commercially Available ELISA and Comparison to qRT-PCR and Serological Diagnostic Assays Currently Used by the State of Florida,” *Journal of Tropical Medicine*, vol. 2017, Article ID 8072491, 6
- Jensen, S. M., Nguyen, C. T., & Jewett, J. C. (2016). A gradient-free method for the purification of infective dengue virus for protein-level investigations. *Journal of Virological Methods*, 235, 125–130.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.05.017>
- Kalbfuss, B., Wolff, M., Morenweiser, R., & Reichl, U. (2007). Purification of cell culture-derived human influenza A virus by size-exclusion and anion-exchange chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(5), 932–944.  
<https://doi.org/10.1002/bit.21109>
- Kawecki, A. B., & Christofferson, R. C. (2016). Zika Virus–Induced Antibody Response Enhances Dengue Virus Serotype 2 Replication In Vitro. *The Journal of Infectious Diseases*, 214(9), 1357–1360. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiw377>.
- Khaiboullina, S., Uppal, T., Martynova, E., Rizvanov, A., Baranwal, M., & Verma, S. C. (2018). History of ZIKV Infections in India and Management of Disease Outbreaks, 9(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02126>
- Kuno, G., & Chang, G.-J. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of Virology*, 152(4), 687–696. doi: 10.1007/s00705-006-0903-z
- Kuno, G., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., & Cropp, C. B. (1998). Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *Journal of Virology*, 72(1), 73–83.  
<https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0874>

- Kurosawa, Y., Saito, M., Kobayashi, S., & Okuyama, T. (2012). Purification of Dengue Virus Particles by One-Step Ceramic Hydroxyapatite Chromatography, 2012(August), 155–160.
- Lee, H., Halverson, S., & Ezinwa, N. (2018). Mosquito-Borne Diseases. Primary Care: Clinics in Office Practice, 45(3), 393–407.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.05.001>
- Lee, V. H., & Moore, D. L. (1972). Vectors of the 1969 yellow fever epidemic on the Jos Plateau, Nigeria. Bulletin of the World Health Organization, 46(5), 669–673.
- Lemos, G., Guillén, I., Fernández, J. R., Díaz, T., & Colarte, A. B. (2003). Expression and purification of a full-length recombinant NS1 protein from a dengue 2 serotype viral isolate, (October 1999).
- Li, A., Yu, J., Lu, M., Ma, Y., Attia, Z., Shan, C. & Li, J. (2018). A Zika virus vaccine expressing premembrane-envelope-NS1 polyprotein. Nature Communications, 9(1), 3067. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05276-4>
- López Antuñano, F. J., & Mota, J. (2000). Desarrollo de agentes inmunizantes contra el dengue. Revista Panamericana de Salud Pública, 7, 285-292.
- Low, G. K.-K., Ogston, S. A., Yong, M.-H., Gan, S.-C., & Chee, H.-Y. (2018). Global dengue death before and after the new World Health Organization 2009 case classification: A systematic review and meta-regression analysis. Acta Tropica, 182, 237–245.
- Martelli, CM, Nascimento, NE, Suaya, JA, Siqueira, JB, Jr, Souza, WV, Turchi, MD & Shepard, DS (2011). Calidad de vida entre adultos con dengue confirmado en Brasil. La revista estadounidense de medicina e higiene tropical, 85 (4), 732–738. doi: 10.4269 / ajtmh.2011.11-0067



- Muñoz Bernal JA. (1828). Memoria sobre la epidemia que ha sufrido esta ciudad, nombrada vulgarmente el dengue. Oficina del Gobierno y Capitanía General. Habana. 1828; 1:26.
- Nambala, P., & Su, W. C. (2018). Role of Zika Virus prM Protein in Viral Pathogenicity and Use in Vaccine Development. *Frontiers in microbiology*, 9, 1797. doi:10.3389/fmicb.2018.01797
- Nunes, P. C. G., de Filippis, A. M. B., Lima, M. Q. da R., Faria, N. R. da C., de Bruycker-Nogueira, F., Santos, J. B. & Nogueira, R. M. R. (2018). 30 years of dengue fatal cases in Brazil: a laboratorial-based investigation of 1047 cases. *BMC Infectious Diseases*, 18, 346. <http://doi.org/10.1186/s12879-018-3255-x>.
- Oduyebo, T., Polen, K. D., Walke, H. T., Reagan-Steiner, S., Lathrop, E., Rabe, I. B. & Meaney-Delman, D. (2017). Update: Interim Guidance for Health Care Providers Caring for Pregnant Women with Possible Zika Virus Exposure — United States (Including U.S. Territories), July 2017. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 66(29), 781–793. <http://doi.org/10.15585/mmwr.mm6629e1>
- Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. (2017) Zika - Informe epidemiológico de México. Septiembre de 2017. Washington, D.C.: OPS / OMS; 2017
- Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Actualización Epidemiológica: Dengue. 11 de noviembre de 2019, Washington, D.C. OPS/OMS.2019, [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=dengue-2158&alias=50965-11-de-noviembre-de-2019-dengue-actualizacion-epidemiologica-1&Itemid=270&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-2158&alias=50965-11-de-noviembre-de-2019-dengue-actualizacion-epidemiologica-1&Itemid=270&lang=es)

- Parida, M, Upadhyay, C., Pandya, G., & Jana, A (2002). Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 273–278. doi: 10.1016/s0378-8741(01)00395-6
- Perera, R., & Kuhn, R. J. (2008). Structural Proteomics of Dengue Virus. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), 369–377. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.004>
- Pierson, T. C., & Graham, B. S. (2016). Zika virus: immunity and vaccine development. *Cell*, 167(3), 625–631. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.020>
- Pinheiro, Fransisco P & Corber, Stephen J. (1997) . Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q*. 1997; 50(3–4):161–9 pmid: 9477544. <http://www.who.int/iris/handle/10665/55167>
- Rothe, Gunter M. (1994). *Electroforesis de enzimas*. Springer-Verlag Berlín Heidelberg. Métodos de laboratorio. Berlín. 1er edición. DOI 10.1007 / 978-3-642-79069-0
- Rozen-gagnon, K., Moreland, N. J., Ruedl, C., & Vasudevan, S. G. (2012). Expression and immunoaffinity purification of recombinant dengue virus 2 NS1 protein as a cleavable SUMOstar fusion. *Protein Expression and Purification*, 82(1), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.11.003>
- Sabin, A. B. (1932). EXPERIMENTS ON THE PURIFICATION AND CONCENTRATION OF THE VIRUS OF POLIOMYELITIS. *The Journal of Experimental Medicine*, 56(3), 307–317.
- Sakoonwatanyoo, P., Boonsanay, V., & Smith, D. R. (2006). Growth and Production of the Dengue Virus in C6/36 Cells and Identification of a Laminin-Binding Protein as a Candidate Serotype 3 and 4 Receptor Protein. *Intervirology*, 49(3), 161–172. doi: 10.1159/000089377

- Sánchez-Lamar, Ángel, & Flores, Manuel. (1999). Genotoxicidad de *Phyllanthus orbicularis* evaluada mediante el ensayo de micronúcleos en células de ovario de hámster chino. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 18(1), 22-23. Recuperado en 17 de octubre de 2018, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03001999000100008&lng=es&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03001999000100008&lng=es&tlng=pt)
- Scaturro P, Cortese M, Chatel-Chaix L, Fischl W, Bartenschlager R (2015) Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLoS Pathog* 11(11): e1005277. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005277>
- Schneider, J., & Droll, D. (2001). A timeline for dengue in the Americas to December 31, 2000 and noted first occurrences. *The History of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) in the Region of the Americas, 1635-2001*, 1–3. [http://www.paho.org/english/hcp/hct/vbd/dengue\\_history.htm](http://www.paho.org/english/hcp/hct/vbd/dengue_history.htm)
- Sigel, M. M. (1948). INFLUENZA A IN A VACCINATED POPULATION. *Journal of the American Medical Association*, 136(7), 437. doi:10.1001/jama.1948.0289024000300
- Tadeu, L., & Figueiredo, M. (2003). Dengue in Brazil: Past, Present and Future Perspective Brazilian flaviviruses. *Dengue Bulletin*, 27(1), 25–33.
- Tibaire Montes, M. (2001). Actualización en dengue: Parte 1. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(1), 39-45. [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562001000100007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000100007&lng=es&tlng=es).
- Tomono, T., Hirai, Y., Okada, H., Miyagawa, Y., Adachi, K., Sakamoto, S. & Okada, T. (2018). Highly Efficient Ultracentrifugation-free Chromatographic Purification of

- Recombinant AAV Serotype 9. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 11(December), 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.10.015>
- Tripathi NK and Shrivastava A (2018) Recent Developments in Recombinant Protein–Based Dengue Vaccines. *Front. Immunol.* 9:1919. doi: 10.3389/fimmu.2018.01919
- Undurraga, E. A., Betancourt-Cravioto, M., Ramos-Castañeda, J., Martínez-Vega, R., Méndez-Galván, J., Gubler, D. J. & Shepard, D. S. (2015). Economic and disease burden of dengue in Mexico. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(3), e0003547. doi:10.1371/journal.pntd.0003547
- Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Dengue virus: structure and viral cycle*, 15(571), 33–43. <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v15n1/v15n1a06.pdf>
- Viranaicken, W., Ndebo, A., Bos, S., Souque, P., Gadea, G., El-Kalamouni, C. & Roche, M. (2018). Recombinant Zika NS1 Protein Secreted from Vero Cells Is Efficient for Inducing Production of Immune Serum Directed against NS1 Dimer. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19010038>
- Warren, J., Weil, M. L., Russ, S. B., & Jeffries, H. (1949). Purification of Certain Viruses by Use of Protamine Sulfate. *Experimental Biology and Medicine*, 72(3), 662–664. doi: 10.3181/00379727-72-17535
- Wikan, N., & Smith, D. R. (2016). Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(7), e119–e126. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30010-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30010-X)
- Wong, S. S.-Y., Poon, R. W.-S., & Wong, S. C.-Y. (2016). Zika virus infection—the next wave after dengue? *Journal of the Formosan Medical Association*, 115(4), 226–242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfma.2016.02.002>

World Health Organization. (2018). Dengue and severe dengue. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

Xia, H., Luo, H., Shan, C., Muruato, A. E., Nunes, B. T. D., Medeiros, D. B. A. & Shi, P.-Y. (2018). An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nature Communications*, 9, 414. <http://doi.org/10.1038/s41467-017-02816-2>

Y. Kurosawa, M. Saito, S. Kobayashi & T. Okuyama, (2012) "Purification of Dengue Virus Particles by One-Step Ceramic Hydroxyapatite Chromatography," *World Journal of Vaccines*, Vol. 2 No. 3, 2012, pp. 155-160. 10.4236/wjv.2012.23020.

Yaoi, H., Tagaya, I., & Ozawa, Y. (1954). Purification of dengue fever virus by means of methanol precipitation. *Yokohama medical bulletin*, 5 2, 68-71.

Zhang, S., Chan, K. R., Tan, H. C., & Ooi, E. E. (2014). Dengue Virus Growth, Purification, and Fluorescent Labeling. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0348-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0348-1_1)

Zheng, Y., Liu, Q., Wu, Y., Ma, L., Zhang, Z., Liu, T. & Cui, J. (2018). Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS1 - caspase - 1 axis. *The EMBO Journal*, e99347. doi:10.15252/embj.201899347

Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses*, 4(1), 62–82. <http://doi.org/10.3390/v4010062>

Zubieta-Zavala, A., López-Cervantes, M., Salinas-Escudero, G., Ramírez-Chávez, A., Castañeda, J. R., Hernández-Gaytán, S. I. & Durán-Arenas, L. (2018). Economic impact of dengue in Mexico considering reported cases for 2012 to 2016. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(12), e0006938. doi:10.1371/journal.pntd.0006938

Zwart Voorspuij, A. J. (1949). A new and simple method for the purification and concentration of influenza virus. *Experientia*, 5(12), 474–474. doi: 10.1007/bf02165427



**FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARIA DE DOCENCIA  
JEFATURA DE LA LICENCIATURA**

---

**Fecha: 24 de septiembre de 2020  
Asunto: VOTOS APROBATORIOS  
Medio de Notificación: Electrónica  
Folio: FF/D/SD/JLF/0139/2020**

**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE  
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES  
U.A.E.M  
PRESENTE**

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y del Instituto de Biotecnología, dependiente de la Universidad Nacional Autónoma de México, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis **"Desarrollo de diferentes metodologías para la purificación de la proteína NS1 y de los virus Dengue y Zika: potencial aplicación en vacunación"** presentada por la pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Karla Alejandra Solís Quintero, (20141010566)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**Jurado**

**Firma**

Dra. Judith González Christen

\_\_\_\_\_

Dra. Rosa Victoria Pando Robles

\_\_\_\_\_

Dr. Julio César Rivera Leyva

\_\_\_\_\_

Dra. Michelle Gutiérrez Mayret

\_\_\_\_\_

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

\_\_\_\_\_



“Estandarización de una metodología para la purificación del virus y de la proteína NS1 de Dengue y Zika”

**ATENTAMENTE**  
**“POR UNA HUMANIDAD CULTA”**

---

**M.P.D. Reyna América Serrano López**  
**Secretaria de Docencia**

Cp  
Archivo  
Cp.  
Bdm

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.  
C.P. 62210 Tel. 777 329 7000 Ext. 3365





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 13 de abril de 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello

REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ | Fecha:2020-09-28 23:45:01 | Firmante  
C8yDrdoLCLaYXrXaLmmz1IZ2XxsGY7CqjctGtYchTf1R5zpuXU8ooJ8Bxw8HipR93vpKDzCZoMPP9Q/EV52kpQ1gKKoQf3w5gZKj784mFAAQYCYDjcwH+wpGLb65p4gyfZ7SVf06/G857Vvy1xuXqScMYnq1E66FEgalN7ZQSLp/xtxc79JpBgr+kFb66KnDyVwl/6+rYWSL1tWzG9X26/a15Yw0gNusJl6BalFTR6QWV7E6H5Q65Z2naZbCmPNobGrkrfXY4ztSRuecrXEVPSMaE1QgzFKkk97rIBvk+MA+JoKOqlwYq73eC7xw73IDFwSqbZQJfeA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



G

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/MPiX7P9qGQV96MoAea51rD6c1Ok39nPE>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL DE LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) de abril

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello

**ROSA VICTORIA PANDO ROBLES | Fecha:2020-12-19 15:28:06 | Firmante**  
D9J9I4VODGQGWuWpUShP6zcgJuoJ4WbHXCPdJmHfyGErZ2pmiJUKRlp95dHojhUbJ3isGPcX27EUKyH++DdfmMWWkY/VuC4U4n2bX1+xNsSlqoPIKR+vGybnwnwYf8HNDdHH/4rlzmebSMAKzpz8MQ8FQUe9BfTxWHLqCkhrmjPC+urp++j+kezVvNiJIM5RFyinzPv2kMCZg3yumI9NNtbbh6s3TurdlyXZrYfz/H4gRdtfSgzsYyE/rOfi77KsEmtRCrjXNzrzpwJrGfJJXNcHJZKmnNSnHnrVlKR7ZMnNDG6F2OH49RaAovq0ahof5mS7E/aUQ

**JULIO CESAR RIVERA LEYVA | Fecha:2020-12-19 16:07:53 | Firmante**  
H4w9cXBLXsdmNCXE/tnBXLi59c5rsZ2sVbK1IXJvuYVs+nL5uajujqYSDA4wvROTtRyYqNaA4VhEIXb+8i+KRJftnyksrhZ5dMfSQWiyZJWuWT7gmtFuoLeheTWWGDgSBKyeWAFs6Nc4h0LiNvoK87L8/cEV80e04ZtrG725iaaRwgMzW9vs6CzNjed12ZhO6FkaQ1QrM+cl3M3a+n3fAT/wYorRXks+l2jJf1o5g5kFau/z7dMLK/+UFMy4rSvcOug/tlrcR93eyb3rhMKa6ZsYlJ+9KsZe8srkfpaykFDJt6g1LAdeRpn5JLqhvTCQDdiX66g

**SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2020-12-19 19:00:55 | Firmante**  
CJNZ9QqFCoLNOJvsFrEYExFOPX9hPnOTyGdL60/QIQBgn8kdXEPSSsdWNbdylQqQXAAmn0DJXAFezx0ExhobLS9hNYurZLeYIBUM0eABe7iHW1TiiAvQNi7bVHjPzSManaWQXEHL10ulc6bDgdLBviGhhSB6Ln+XwJZ8xfOfiejS2ozf28K6/LVSrt3GNrRtb7eV52+0vhGVXZqkJHvgrDdcVbXGh/dgRfKBXnIBNZyU4j3W2SbaG8QTUmJIEl0oGX1x1gFVnMGV5cB/4XmRlennKUx0F02F7s50TpwZTnlSjtr9csXrofA9zltigpVq1mxS0JNCA==

**JUDITH GONZALEZ CHRISTEN | Fecha:2020-12-19 19:53:23 | Firmante**  
DSphAdDT5UvSrAa6cy9WAhaG4TDoY3Ttjy6XwWolPhbfc0xnwUHQU0iX2sy+rmZuR3yRiBYCG6CaSg5f+uFIHT1nnuH/pCfotE4gjCyp2Pv3g6weS1GYI2uV9NxrqYmoydBKJIGIXmt0BV3yyhLwdQ6jQBduttwD1W6bceva8T1QFWm14TURq6clJN/Qj8DCnrTaeOg9gsZoiCIC+WiBlk2fMr/ljDWQggFqKIBd7V7KSUpZ4t7vx0uawGvMZNOKN5anwdKgPeuZMtNqQgci37Alkqh7ndup9UthNKnEM92Eh9xzqu904Uujdul0jNVXe4IA7TbJ2g==

**MICHELLE MAYRET GUTIERREZ | Fecha:2020-12-21 16:29:16 | Firmante**  
d+Eay1k27gzlLqU4sTWblRbcvwdCw6pdn7M7YOELMEVH7MwouXnJlXtraG3JLECLsUXLeHhAbsNOY6LG5Fput+fj0aGEh2S96RDjigNRnASgiK3GrYw4aneEVHFecbfroiachsqQtd1Hnvj0ilqifLARA7/jzfU6s8JuOZWHsvWarBoMEd0jv53TENtgMfhnGiiM8EjQWqozsbtS0JFBQyV632QsPupwbwPeupsSbt0R3gvKFwRrgxDNOTSL5n4tvbdT9/6P7RP7cr6BFhhqpeTdnzRG93nMF2RBWUMu5CrFm2YN2X+Nn5L3hZpl9VhnAUWJ1FgpA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/h7d729ehi1dwnvSjgXhKuAIAFPKkRrK>

x



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023