

CLOADO, EXPRESIÓN Y EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA INMUNOGENICIDAD DE ANTÍGENOS DE ORF2 DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E (HEV)

Lic. Florencia Ottonelli

Orientador: PhD. Santiago Mirazo

Co-orientador: Dr. Juan Arbiza

Maestría en Ciencias Biológicas
Biología celular y molecular

PEDECIBA

2023

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a:

Dr. Santiago Mirazo

por permitirme volver y confiar en que podía llegar hasta el final.

Dr. Juan Arbiza

por abrirme las puertas del laboratorio, allá por el 2015.

Instituto Pasteur de Montevideo

Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE)

por su apertura, disposición y enseñanzas durante los ensayos.

Universidad de Santa Catarina (UFSC)

Dr. Oscar Bruña-Romero, Mg. Vania Mareze

por acompañar este proceso desde su inicio, recibíendome en el laboratorio, enseñándome diversas técnicas con aplicación en esta investigación.

En segundo lugar, no puedo dejar de agradecer a las personas que integran la Sección de Virología en Facultad de Ciencias, quienes me hicieron sentir parte desde siempre, aún después de distanciarme, motivándome a volver. Especialmente a la Lic. Lucía Moreira, compañera de laboratorio, de crisis existenciales, apoyo moral y escritura a la par.

En tercer lugar, agradecer a todas las personas que me impulsaron a seguir adelante, *mi familia y amistades*, que mantuvieron la chispa encendida de que algún día iba a ocurrir, aunque ni yo lo creyera. Las mismas personas que acompañaron el camino desde el 2016 hasta hoy con un “¿te cebo un mate?”, “vas a poder” esas que aún en lo tedioso o monotemático de “no puedo, tengo que escribir”, no abandonaron GRACIAS.

Por último, pero no menos importante, debo agradecer a las personas que integran el EFI – Clubes de Ciencia como estrategia de enseñanza, curso que realicé en el 2022 y me hizo volver a conectar con esta parte de quien soy, motivando, aunque ellos no lo sepan, la decisión de volver y terminar este recorrido.

"I have not failed.

I have just found ten thousand ways that will not work."

Thomas A. Edison

Índice general

Portada	1
Agradecimientos	2
Índice general	4
Índice de figuras.....	7
Índice de tablas.....	8
Abreviaturas.....	9
1-Resumen	10
2-Introducción.....	12
2.1-Historia de la hepatitis E.....	12
2.2-Taxonomía y clasificación	13
2.3-Géneros y genotipos	14
2.4-Epidemiología.....	18
2.5-Distribución geográfica de genotipos	22
2.6-Estructura viral, genoma y proteínas	24
2.6.3a-ORF1.....	26
2.6.3b-ORF2.....	28
2.6.3c-Dominios de ORF2	29
2.6.3d-ORF3.....	31
2.6.3e-ORF4.....	32
2.7-Proteínas recombinantes de ORF2 y la formación de partículas similares a virus (VLPs)	33
2.8-Ciclo viral de HEV.....	35
2.9-Modos de transmisión	39
2.10-Clínica.....	41
2.11-Tratamiento y prevención.....	44

2.12-Vacunas.....	45
2.13-Proteína Z del virus Junín	48
3-Hipótesis de trabajo.....	51
4-Objetivos.....	52
4.1-Objetivo general.....	52
4.2-Objetivos específicos.....	52
5-Materiales y métodos	53
5.1-Estrategia general de trabajo	53
5.2-Diseño de <i>primers</i> para la amplificación de 239.....	54
5.3-Construcción del plásmido pRSET-239	57
5.4-Purificación de VLPs de HEV.....	60
5.4.2a-Cultivo de células HEK 293	62
5.4.2b-Transfección de células HEK 293 con los plásmidos pZ-ORF2, pZ-E2s, pZ-EGFP.....	62
5.5-Inmunización de ratones C57BL/6 con los antígenos producidos pZ-ORF2, pZ-E2s y pZ-EGFP	64
5.6-Evaluación de la generación de anticuerpos mediante técnicas inmunoenzimáticas	65
5.7-Expresión de proteínas ORF2 en <i>E.coli</i> y posterior extracción utilizando la técnica de sonicación	66
5.8- Cuantificación y visualización de las proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE	68
6-Resultados.....	70
6.1- Amplificación de 239 de HEV por PCR.....	70
6.2- Construcción de los plásmidos pJet-239 y pRSET-239	70
6.3- Purificación de las VLPs y evaluación de la expresión de E2s y ORF2 utilizando GFP como control.....	71

6.4- Expresión de proteínas ORF2 en <i>E.coli</i> y posterior extracción utilizando la técnica de sonicación	73
7-Discusión	75
8-Conclusión.....	81
9-Bibliografía.....	82

Índice de figuras

Figura 1: Visualización del virus de la Hepatitis E	14
Figura 2: Subfamilias, géneros, genotipos y especies hospederas	16
Figura 3: Seroprevalencia global en %	20
Figura 4: Datos de seroprevalencias de IgG (%) en las Américas	21
Figura 5: Distribución geográfica de los cuatro genotipos de HEV principales, capaces de infectar al ser humano.....	22
Figura 6: Distribución de genotipos y subtipos en América del Sur.....	24
Figura 7: Esquema de la organización genómica de HEV	25
Figura 8: Organización genética y traducción del virus de HEV	29
Figura 9: Interpretación de la estructura de HEV	31
Figura 10: Ciclo viral del HEV	38
Figura 11: Modos de transmisión de HEV	41
Figura 12: Proteína Z del Virus Junín	49
Figura 13: Estrategia general de trabajo.....	53
Figura 14: Mapa del vector pJET1.2/blunt.....	57
Figura 15: Mapa del vector pRSET.....	60
Figura 16: Mapa del plásmido que codifica la proteína Z del virus Junín	61
Figura 17: Protocolo de inmunización prime-boost heterólogo en ratones C57BL/6. ...	65
Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa (239).....	70
Figura 19: Electroforesis en gel de agarosa (pJet / pRSET).....	71
Figura 20: Dot blot de las VLPs purificadas.....	72
Figura 21: Curva de calibración con BSA.....	73
Figura 22: SDS-PAGE 4-15%	74

Índice de tablas

Tabla 1: Resumen de los diferentes subtipos de HEV	17
Tabla 2: <i>Primers</i>	54
Tabla 3: Condiciones de PCRs	56
Tabla 4: <i>Prime-boost</i> heterólogo	64
Tabla 5: Condiciones del primer ensayo de extracción de proteínas ORF2.....	67
Tabla 6: Condiciones del segundo ensayo de extracción de proteínas ORF2.....	68
Tabla 7: Resultados obtenidos mediante ELISA	72
Tabla 8: Concentraciones de las proteínas ORF2.....	73

Abreviaturas

● A	Armstrong	● mL	mililitro
● aa	aminoácidos	● mM	milimolar
● Abs	Absorbancia	● M	Molar
● ADN	Ácido desoxirribonucleico	● NCR	Región no codificante
● ARN	Ácido Ribonucleico	● <i>ne</i> HEV	HEV no envuelto
● ARNsg	Subgenómico	● nm	nanometro
● BSA	Seroalbúmina bovina	● nt	nucleótidos
● Cap	Caperuza	● OMS	Organización Mundial de la Salud
● CRE	Cis reactivo	● ORF	Marco Abierto de Lectura
● DAM	Dominio antigénico mínimo	● ORF2 ^c	asociado a la cápside
● dNTPs	desoxinucleótidos	● ORF2 ^s	secretado
● EDTA	Ácido etilendiaminotetracético	● pb	pares de bases
● ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas	● PBS	Buffer fosfato salino
● <i>e</i> HEV	HEV casi-envuelto	● PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
● FBS	Suero fetal bovino	● RE	Retículo endoplasmático
● g	gramos	● rpm	Revoluciones por minuto
● GFP	proteína verde fluorescente	● RpRd	ARN polimerasa ARN dependiente
● HEV	Virus de la Hepatitis E	● s	segundo
● hr	hora	● SVR	Respuesta virológica sostenida
● HVR	Región hipervariable	● T	Triangulación
● IgG/IgM	Inmunoglobulina G/M	● TA	Temperatura ambiente
● IPTG	Inductor de la expresión génica	● TAE	Tris acetato EDTA
● Kb	Kilo base	● v/v	volumen/volumen
● KDa	Kilo Dalton	● VLPs	Partículas similares a virus
● µg	microgramo	● w/v	masa/volumen
● min	minuto		
● µL	microlitro		

1-Resumen

El virus de la hepatitis E (HEV) está actualmente catalogado como una importante causa de hepatitis viral aguda en el mundo. Anualmente se estiman unos 20 millones de casos sintomáticos, lo cual seguramente sea una subestimación debido a la elevada tasa de infección asintomática y la ausencia de métodos de diagnóstico disponibles en ciertos contextos de elevada incidencia. Epidemias de HEV se han registrado en países de bajos ingresos o en desarrollo donde la infección es endémica, mientras que casos autóctonos y esporádicos han sido documentados en naciones industrializadas.

La infección por HEV suele ser autolimitada, con una tasa de letalidad <4%, sin embargo, en personas embarazadas, la letalidad puede ser tan elevada como un 30% aproximadamente y recientes reportes sugieren que la infección por HEV puede cronificarse en pacientes con algún nivel de inmunocompromiso, causando un amplio abanico de manifestaciones extrahepáticas. Por estas razones, desde hace unos años se considera a HEV como una amenaza emergente y desatendida para la salud pública.

El género *Paolahepevirus* de HEV, incluye ocho genotipos de los cuales HEV-1, HEV-2, HEV-3 y HEV-4 son capaces de infectar humanos. Los genotipos antropotrópicos HEV-1 y HEV-2, son transmitidos principalmente a través del agua contaminada con materia fecal (*waterborne*); mientras que para los genotipos HEV-3 y HEV-4 la vía principal de transmisión es zoonótica.

No existe un tratamiento recomendado para infecciones de HEV aguda, excepto en pacientes de riesgo con hepatitis severa, para lo cual está aprobado el uso de Ribavirina. Hasta la fecha, la única vacuna disponible en el mercado, es *Hecolin™* desarrollada por

Xiamen Innovax Biotech, con fase III de ensayos clínicos completa, licenciada para uso comercial en China y recientemente también en Pakistán.

Dado que la proteína de cápside (ORF2) comparte más del 85% de identidad en los 4 genotipos capaces de infectar humanos, el HEV se presenta como un único serotipo y por tanto ORF2 es un buen candidato como vacuna de subunidades de HEV al proteger de forma cruzada entre genotipos.

En este trabajo nos propusimos diseñar diferentes estrategias para la producción de VLPs de HEV-3, utilizando diferentes antígenos de ORF2 y las características biológicas de la proteína Z del virus Junín, capaz de generar vesículas extracelulares. Partiendo de esta base, hipotetizamos que es posible desarrollar sistemas de expresión de antígenos que potencialmente pudieran ser utilizados en estrategias de inmunoprevención o diagnóstico.

Se lograron poner a punto nuevas metodologías para el laboratorio, además de trabajar con técnicas de diseño y expresión de proteínas recombinantes que estaban desarrollándose en la región y de las cuales no había casi antecedentes, apostando por una tecnología nueva de producción de antígenos.

2-Introducción

El virus de la hepatitis E (HEV) está actualmente catalogado como una importante causa de hepatitis viral aguda en el mundo y ha sido categorizado sexto recientemente entre los virus con alto riesgo de expansión, destacando su potencial zoonótico (Grange et al., 2021). En un estudio realizado por la OMS, (2020) se estimó que anualmente se infectan 20,1 millones de personas por HEV, de las cuales 3,4 millones son sintomáticas, 70.000 fallecen y 3000 nacen muertas. A partir de la evidencia disponible se sugiere que las limitaciones en los diagnósticos y la elevada tasa de infección subclínica, estos valores podrían estar subestimados (Rein et al., 2012; Lynch et al., 2023). La letalidad en personas embarazadas puede ser tan elevada como un 30% aproximadamente (Jin et al., 2016; Ahmad et al., 2020), además recientes reportes sugieren que la infección por HEV puede cronificarse en algunos pacientes, causando un amplio abanico de manifestaciones extrahepáticas. Por esta razón, actualmente HEV es considerada una amenaza severa para la salud pública (Song et al., 2014; Wu et al., 2016).

2.1-Historia de la hepatitis E

La primera epidemia (29.000 casos identificados) de la infección causada por el virus de la hepatitis E, ocurrió en la India (Nueva Delhi) en 1955, y se debió a la contaminación fecal ampliamente diseminada en el agua de consumo de la ciudad. Entre 1955 y 1956 se volvieron a observar presuntas epidemias de hepatitis E en la Ex Unión Soviética y el Sudeste Asiático (Hillis et al., 1973; Mynt et al., 1985). Pero estas epidemias no fueron reconocidas como una enfermedad humana en sí misma hasta 1980, cuando tests

serológicos para el diagnóstico de hepatitis A y hepatitis B fueron aplicados en muestras colectadas y almacenadas durante la epidemia en India (Khuroo, 1980). Recién en 1983 se designa hepatitis E al nuevo virus, identificado como la causa de transmisión entérica de hepatitis no-A, no-B (nAnB) (Balayan, 1983). El virus descubierto fue nombrado Virus de la hepatitis E, por su transmisión entérica y porque tiende a causar enfermedades endémicas y epidémicas (Aggarwal, 2011; Rodríguez-Frías et al., 2012).

2.2-Taxonomía y clasificación

El virus de la hepatitis E (HEV) (Fig.1) inicialmente fue incluido en la familia *Picornaviridae* (Quintana & González, 2003), ya que cuando fue detectado el agente etiológico no-A, no-B, se asumió que pertenecía a la misma familia del virus de la hepatitis A (Balayan et al., 1983; Miller, 1995). Más tarde, en base a las propiedades físico-químicas y microscopía electrónica, que revelaba morfologías similares a otros agentes pertenecientes a la familia *Caliciviridae*, se indicó que podría ser miembro de esta familia (Tam et al., 1991), pero en un género separado (*Hepevirus*) (Kabrane-Lazizi et al., 2001). Posteriormente, en el séptimo reporte del Comité Internacional de Taxonomía Viral, se ubicó al HEV en una familia separada, *Hepeviridae* (Berke & Metson, 2000). Smith et al., (2014) propusieron un esquema taxonómico en el cual la familia *Hepeviridae* se dividía en dos géneros *Orthohepevirus* y *Piscihepevirus*. Actualmente esta familia se divide en dos subfamilias *Orthohepevirinae* (que integra todos los HEV de mamíferos y aves) y *Parahepevirinae* (que incluye HEV identificado únicamente en peces) (Purdy et al., 2022). Finalmente, la subfamilia *Orthohepevirinae* se divide en cuatro géneros: *Paslahepevirus* (que se ha encontrado en mamíferos

incluyendo humanos, cerdos, ciervos, conejos camellos, ganado y delfines nariz de botella); *Avihepevirus* (restringido a aves, específicamente gallinas); *Rocahepevirus* (incluye roedores, eulipotiflos y mustélidos), y por último, el género *Chirohepevirus* (cuyos seres vivos con HEV perteneciente a este género son los murciélagos) (Purdy et al., 2022). Antiguamente éstos géneros habían sido clasificados por Purdy et al., 2017 como *Orthohepevirus A, B, C y D*, respectivamente.

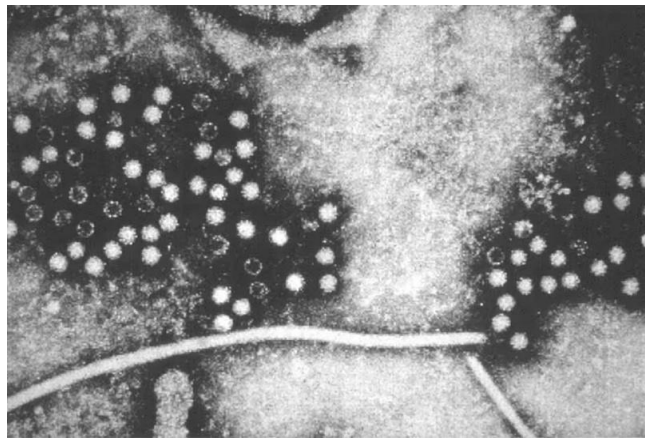


Figura 1. Visualización del virus de la Hepatitis E mediante microscopía electrónica de transmisión. Extraída de: <https://www.cdc.gov/dotw/hepatitis-e/index.html>

2.3-Géneros y genotipos

Basados en la variabilidad de los genes de la metiltransferasa, helicasa y ARN polimerasa del HEV, se ha identificado en la subfamilia *Parahepevirinae* un único género, *Psicuhepevirus*. Mientras que en la subfamilia *Orthohepevirinae* se identificaron 4 géneros: *Paslahepevirus*, *Avihepevirus*, *Rocahepevirus* y *Chirohepevirus* (Purdy et al., 2023).

El género *Paslahepevirus* es a su vez dividido en dos especies, *Paslahepevirus balayani* y *Paslahepevirus alci*. La primera, contiene ocho genotipos que difieren en su ruta de

transmisión y los hospederos que infectan (Kinast et al., 2022). Como se observa en la Figura 2, los genotipos HEV-1, HEV-2, HEV-3, HEV-4 y HEV-7 son capaces de infectar humanos. Entre ellos, los genotipos HEV-1 y HEV-2 parecen estar restringidos a humanos y primates superiores (Forni et al., 2008). Los genotipos HEV-3 y HEV-4 por el contrario tienen un amplio rango de hospederos, siendo los cerdos y jabalíes los principales reservorios. Además, el genotipo HEV-3 es capaz de infectar conejos ciervos y mangostas y el HEV-4 infecta yacs. Los genotipos HEV-7 y 8 han sido identificados en camellos (Lee et al., 2016; Yip et al., 2017; Smith et al., 2020 y Jin et al., 2022). Finalmente, los genotipos HEV-5 y HVE-6 infectan principalmente jabalíes, aunque estudios recientes demostraron que HEV-5 tiene la capacidad de infectar monos *cynomolgus*, sugiriendo que este genotipo podría tener el potencial de infectar humanos (Li et al., 2019).

Los miembros del género *Rocahepevirus* fueron categorizados en tres genotipos: HEV-C1 (presente en mamíferos roedores y soricomorfos) también es conocido como “hepatitis de roedores” y está distribuido globalmente (Wang et al., 2020); el genotipo HEV-C2 (presente en mustélidos) y HEV-C3 (presente en roedores) (Wang et al., 2020; Purdy et al., 2022). Algo a destacar, es que en estudios recientes se han reportado casos de infección de humanos con HEV-C1 lo que podría significar una causa de enfermedad infecciosa emergente (Sridhar et al., 2018; Andonov et al., 2019; Rivero-Juarez et al., 2022).

El género *Avihepevirus* infecta gallinas y posiblemente otras especies de aves (Kenney, 2019; Purdy et al., 2022). Se ha sugerido recientemente que, basado en la divergencia genómica y distribución geográfica, puede ser categorizado en al menos cinco genotipos (Iqbal et al., 2019).

Por último, el género *Chirohepevirus*, ha sido detectado en varias especies de murciélagos en diferentes países, pero hasta ahora no hay evidencia de transmisión a humanos (Wang & Meng, 2021a; Wang & Yang, 2022).

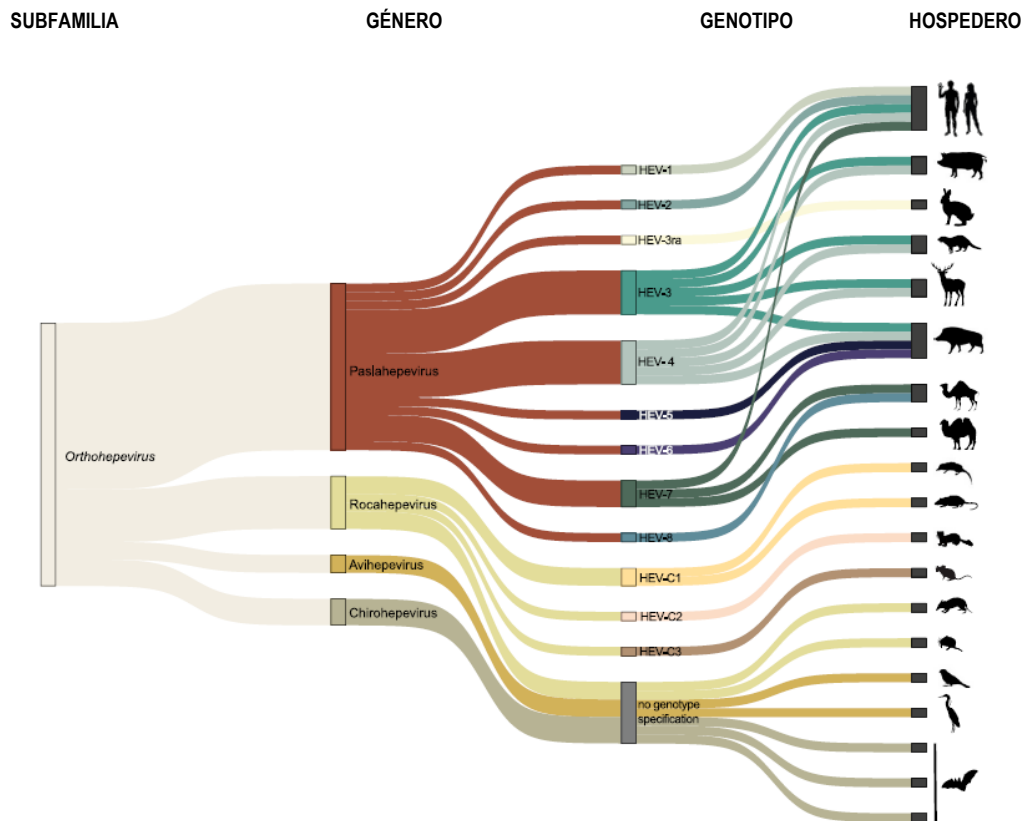


Figura 2. Subfamilias, géneros, genotipos y especies hospederas. Clasificación actualizada según Purdy et al., 2022. Extraída de Kinast et al., 2022.

A partir de análisis filogenéticos de distancias nucleotídicas en secuencias genómicas completas de HEV, se clasificaron los genotipos en diferentes subtipos (Tabla 1) que se nombran mediante un esquema secuencial alfanumérico, exceptuando la variante asociada a conejo, denominada *ra* (*rabbit-associated*) (Kumar et al., 2016; Smith et al., 2020).

Tabla 1. Resumen de los diferentes subtipos de HEV y las especies hospedero en que fueron encontrados.

Subtipos	Origen geográfico	Hospedero	Subtipos	Origen geográfico	Hospedero
1a	India, Pakistán, UK, Myanmar	Humano	3ra	Francia, Alemania, China, Corea del Sur, USA	Conejo, liebre humano
1b	China, Pakistán	Humano			
1c	India	Humano			
1d	Marruecos	Humano	4a	China, Mongolia, Taiwán, Corea del Sur	Cerdo, humano
1e	Chad	Humano			
1f	Bangladesh, India, UK	Humano			
1g	India, Mongolia, Pakistán, Japón, UK, Francia	Humano	4b	Taiwán, China, Camboya, Corea del Sur	Cerdo, humano, Mono Rhesus
1	India	Humano	4c	Japón	Cerdo, humano
1	Nigeria	Humano	4d	China	Cerdo, humano
2a	México	Humano	4e	India	Cerdo
2b	Nigeria	Humano	4f	Japón	Humano
3a	Japón, USA, Corea del Sur, UK, Alemania, Canadá, Singapur, China, México, Tailandia	Humano, cerdo, mangosta	4g	Japón, China	Humano
			4h	China	Humano, cerdo, vaca, cabra, yak
3b	Japón, China, Canadá	Humano, cerdo, jabalí, ciervo, mangosta.	4i	China, Japón	Cerdo, jabalí, humano
3c	Francia, Alemania, Países bajos, Suecia, UK, Tailandia, Canadá	Humano, jabalí	4	China, Japón	Cerdo, humano
3d			5a	Japón	Jabalí
3e	Francia, Alemania, Hungría, Italia, UK, Japón	Humano, cerdo, jabalí, <i>Maccaca sp.</i>	6a	Japón	
			6	Japón	
3f	Francia, Alemania, UK, Suecia, Dinamarca, España, Tailandia, Japón, Singapur	Humano, cerdo, jabalí	7a	Emiratos Árabes Unidos	Camello
			7	Emiratos Árabes Unidos	Camello, humano
3g	Kyrgyzstán	Cerdo	8a	China	Camello
3h	Francia, Suiza, Mongolia	Humano, cerdo	8	China	Camello
3i	Suecia, Alemania	Humano, jabalí			
3j	Canadá	Cerdo			
3k	Japón	Humano, cerdo			
3l	Italia, Francia	Humano, cerdo			
3m	Francia, España	Humano			
3	Mongolia, Italia, Japón, Alemania	Cerdo, jabalí			

Extraída y adaptada: Smith et al., 2020

2.4-Epidemiología

2.4.1-Situación epidemiológica global

Epidemias de HEV solo se han registrado en países de bajos ingresos o en desarrollo en regiones de África, Asia o América Central por lo que aproximadamente 1/3 de la población mundial está expuesta al virus (Mirazo et al., 2014a). Sin embargo, infecciones autóctonas, esporádicas y tasas de alta seroprevalencia han sido documentadas en naciones en desarrollo o industrializadas (Capai et al., 2019; O'keefe et al., 2021). Debido a que la incidencia de la infección por HEV ha aumentado constantemente en varios países industrializados (Webb & Dalton, 2019), la perspectiva de enfermedad regional o endémica, predominante en países de bajos recursos, actualmente ha cambiado a una preocupación global (Lapa et al., 2015; Harrison & Dicaprio, 2018).

Se han desarrollado numerosos estudios orientados a evaluar sistemáticamente la prevalencia de HEV en diferentes continentes y la mayoría se basaron en la seropositividad de anticuerpos IgG anti-HEV, que usualmente persisten por varios años (Aggarwal, 2013). Sin embargo, en un estudio realizado por Li et al., (2020) además de utilizar estos anticuerpos como indicadores, también incluyeron anticuerpos IgM anti-HEV, los cuales persisten unos pocos meses, por lo que se consideran evidencia de una infección reciente o actual y ARN viral, indicador de una infección que se está transitando (Fig. 3). A partir de este estudio se determinó que la tasa de seropositividad más alta de anticuerpo IgG anti-HEV se encontraba en África 21,7%, seguido de Asia 15,8%, Europa 9,31%, América del Norte 8,05%, América del Sur 7,28% y Oceanía 5,99%. Mientras que la seroprevalencia de anticuerpos IgM anti-HEV fue de 3,09% en

África, 2,43% en América del Sur, 1,86% en Asia, 0,79% en Europa y 0,22% en América del Norte. Por último, la prevalencia de ARN viral fue de 0,93% en Asia, 0,18% en América del Sur, 0,08% en Europa y 0% en África, América del Norte y Oceanía.

Generalmente, la seroprevalencia varía dependiendo del área geográfica considerada y la población estudiada. Por ejemplo, en poblaciones que están en contacto con cerdos o en consumidores habituales de productos derivados de este animal, la prevalencia de anticuerpos anti-HEV es mayor (Lapa et al., 2015). Algunos estudios realizados en Italia, mostraron que la seroprevalencia de IgG anti-HEV en donantes de sangre se encontraba en un rango entre 1,3% y 52% (Mansuy et al., 2011; Scottu et al., 2014), mientras que en Asia y África las tasas de seroprevalencia estuvieron entre el 10% y el 40% con un aumento en la frecuencia, en grupos de mayor edad (>50 años) (OMS, 2023). Estas bajas tasas en regiones endémicas podrían explicarse por las fallas en el sistema de vigilancia de salud para detectar casos de HEV agudos en países de bajos recursos, o la baja sensibilidad de los ensayos serológicos (Kamar et al., 2017) ya que el uso de kits ELISA de diferentes fabricantes, podría explicar parcialmente las disparidades en las estimaciones entre diferentes estudios (Li et al., 2020).

Según el estudio llevado a cabo por Li et al., (2020), basados en la seropositividad de anticuerpos IgG anti-HEV, el 12,47% de la población global, correspondiente a aproximadamente 939 millones de individuos, ha tenido infección causada por HEV.

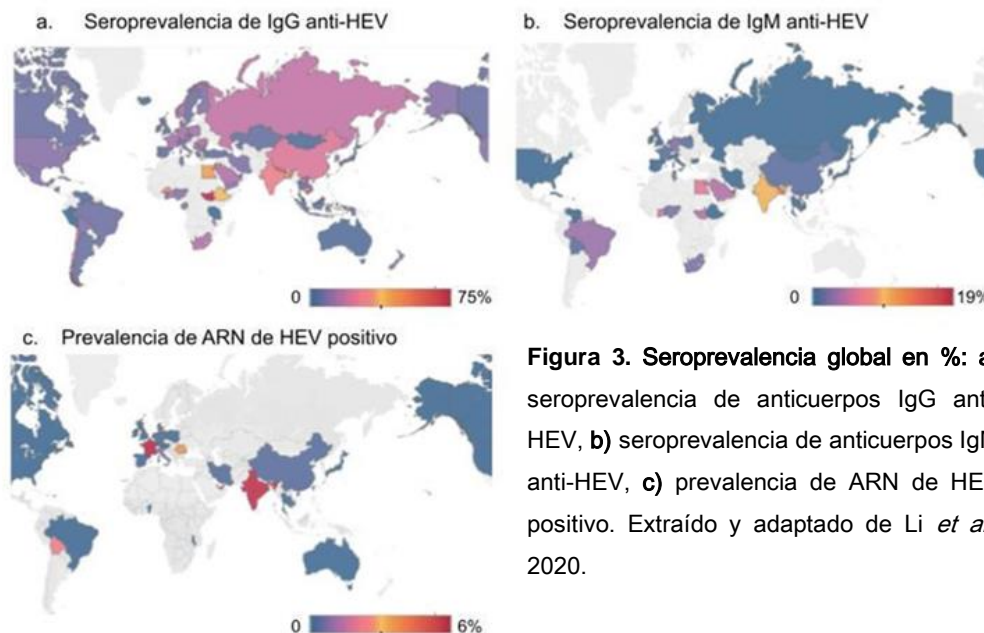


Figura 3. Seroprevalencia global en %: a) seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-HEV, b) seroprevalencia de anticuerpos IgM anti-HEV, c) prevalencia de ARN de HEV positivo. Extraído y adaptado de Li *et al.*, 2020.

2.4.2-Situación epidemiológica regional

Desde que se describió para Sudamérica el HEV por primera vez en 1994 (Pujol et al., 1994), han habido varios estudios reportando su circulación en el continente, así como la detección molecular en una variedad de fuentes (suero humano, heces humanas y animales, agua superficial y residual). También han sido reportados estudios serológicos en diferentes poblaciones (donantes de sangre, personas HIV+, receptores de trasplante de órganos, pacientes dializados, población pediátrica y general, etc.); pero la información de la región continúa limitada y fragmentada (Pisano et al., 2018).

Un estudio desarrollado en Brasil, utilizando un inmunoensayo *in house* reveló una prevalencia de 30% de anticuerpos IgG anti-HEV (Pandolfi et al., 2017), resultados que sugieren que la región Sur de Brasil, podría ser endémica para HEV (Pisano et al., 2018).

Otros estudios, también realizados en Brasil, han mostrado una tendencia al aumento en la positividad de anticuerpos IgG anti-HEV de 0% a 4,3% desde 1997 a 2006, con

las frecuencias más altas observadas del 2011 al 2013 (5,9%, 8,6% y 6,1% respectivamente) (Passos-Castilho et al., 2015).

Fernández-Villalobos et al., (2022) estimó que la seroprevalencia de IgG en la población general en las Américas es de 7,2% (América del Norte 9%, América Central y Caribe 6,5% y América del Sur 7,2%). Aun teniendo en cuenta las diferencias entre países y regiones de las Américas, el pool de seroprevalencias fue comparable, con excepción de Bolivia, Perú y Colombia que mostraron tener seroprevalencias de IgG anti-HEV más altas (Fig.4). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la estimación real de la seroprevalencia de HEV (IgG e IgM anti-HEV) en la población, resulta extremadamente difícil debido al uso de diferentes ensayos con sensibilidades y especificidades variadas (Aslan & Balaban, 2020; Li et al., 2020).

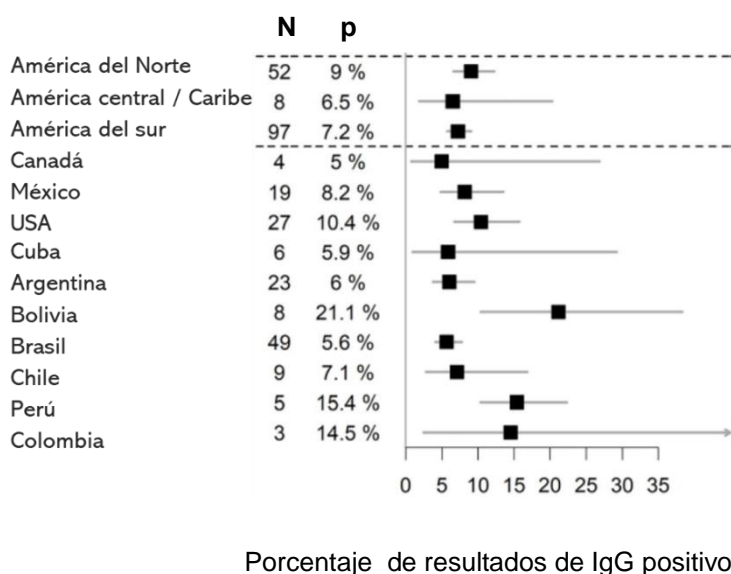


Figura 4. Descripción general de las seroprevalencias de IgG obtenidas por GLMM con intervalos de confianza del 95 % construidos utilizando cuantiles t: N número de resultados positivos, p porcentaje. Extraído y adaptado: Fernández-Villalobos, et al., (2022).

2.4.3-Situación epidemiológica en Uruguay

Estudios realizados en muestras de plasma de 400 donantes de sangre uruguayos revelaron una seroprevalencia de 10%, 10 veces más alta que hace 20 años atrás (Bangueses et al., 2020). Además, se reportó una tasa de detección de ARN de al

menos 0,75% y se secuenciaron dos muestras, las cuales mediante estudios filogenéticos, fueron agrupadas con muestras uruguayas de HEV-3 tanto humanas como de suinos (Bangueses et al., 2020).

2.5-Distribución geográfica de genotipos

Los genotipos que principalmente afectan al ser humano son, HEV-1, HEV-2, HEV-3 y HEV-4 cuya distribución global se puede observar en la Figura 5.

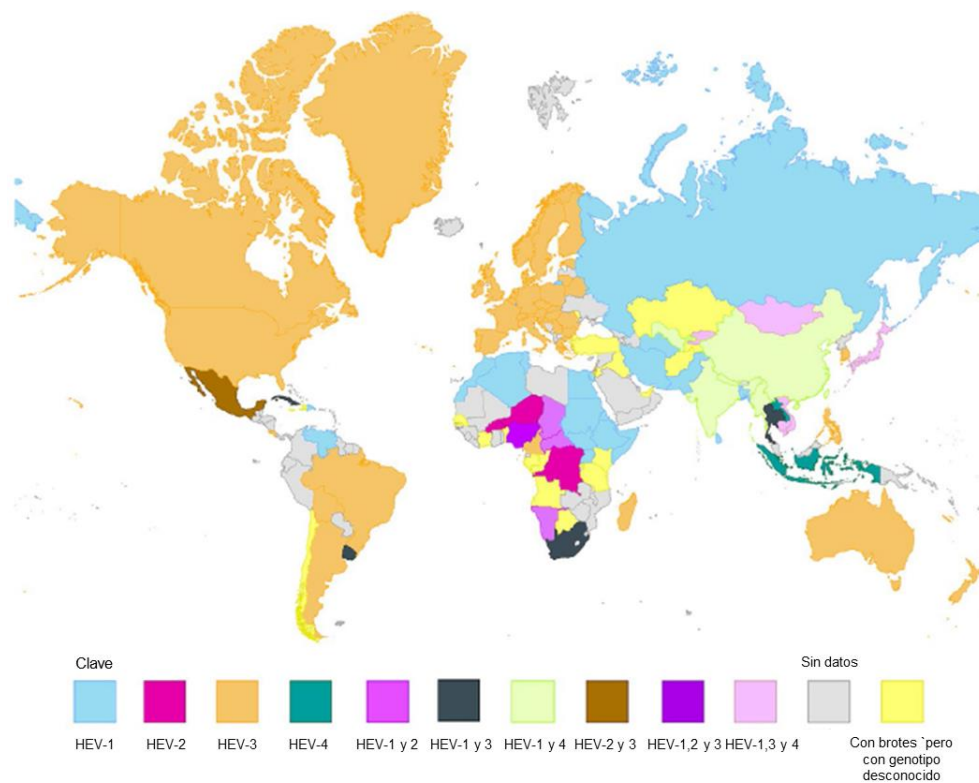


Figura 5. Mapa con la distribución geográfica de los cuatro genotipos de HEV principales, capaces de infectar al ser humano. Extraído de Treagus et al., 2021.

Entre los genotipos que infectan humanos, HEV-1 subtipo 1a es el más prevalente en Asia, mientras que el subtipo 1d lo es en África. HEV-2 fue detectado en México y África, pero el genotipo más ampliamente distribuido es HEV-3, cuyos subtipos 3a y 3b circulan en USA y Japón, mientras que 3f y 3i lo hacen en Europa. HEV-4 circula en China

principalmente, aunque también ha sido aislado de cerdos europeos (Pallerla et al., 2020; Kupke & Werner, 2021). Los genotipos HEV-5 y 6 fueron aislados de muestras de jabalíes en Japón (Takahashi et al., 2011), mientras que los genotipos HEV-7 y HEV-8 fueron aislados de muestras en Emiratos Árabes Unidos y China, respectivamente (Smith et al., 2020).

En Latinoamérica, el genotipo HEV-3 es el más frecuentemente detectado: el subtipo 3a fue reportado en Argentina y el subtipo 3b en Argentina y Brasil. También se detectaron dos casos autóctonos de HEV-1 en Venezuela, así como un caso importado en Argentina de un viajero internacional (Pisano et al., 2018). El genotipo HEV-3 (Fig.6) presenta una alta heterogeneidad reflejada por el amplio número de subtipos descritos a lo largo del mundo, que también se evidencia en América del Sur donde se ha reportado la presencia de los subtipos 3a, 3b, 3c, 3h, 3i, 3e y 3f. Incluso se han reportado casos de co-circulación de los subtipos 3c y 3f. En algunas regiones el mismo genotipo ha sido reportado en humanos, cerdos y muestras ambientales (Pisano et al., 2018).

Figura 6. Distribución de genotipos y subtipos en América del Sur. Los países en gris corresponden a aquellos de los cuales no hay datos de detección molecular. Se observan las fuentes de aislamiento. Extraído y adaptado de Pisano et al., 2018.



2.6-Estructura viral, genoma y proteínas

2.6.1-Estructura viral

La partícula viral de HEV es esférica de simetría icosaédrica T=3, originalmente reconocida por carecer de envoltura, y de hecho, los viriones presentes en heces y bilis se presentan como una partícula desnuda (*neHEV*) de 32-34 nm de diámetro (Yin et al., 2016; Ji et al., 2021). Sin embargo, recientemente se han descubierto partículas de 40 nm de diámetro, que circulan en la sangre asociadas a la membrana de sus hospederos. A éstas, se las ha definido como “casi-envueltas” (*eHEV*) (Nan et al., 2017; Ji et al., 2021) y las proteínas de cápside están completamente ocultas por la membrana (Nagashima et al., 2011a). Estas características las hacen menos eficientes para la

fijación (Yin et al., 2016) pero resistentes a la neutralización mediada por anticuerpos (Chapuy-Regaud et al., 2017).

2.6.2-Genoma viral

El genoma viral (Fig.7) está formado por una sola hebra de ARN, de polaridad positiva con una longitud que varía entre 6,6 y 7,3 Kb (Nimgaonkar et al., 2018) y contiene tres marcos abiertos de lectura solapados (ORFs) (Kumar et al., 2013). El ORF1 codifica una poliproteína no estructural, ORF2 codifica la proteína de cápside y ORF3 codifica una proteína multifuncional. Además, se ha demostrado que HEV-1 contiene un ORF adicional, el ORF4, cuya proteína es de vida corta y se expresa en condiciones de estrés del retículo endoplasmático, probablemente inducida por la respuesta antiviral del hospedero (Nair et al., 2016).

Hacia el extremo 5' se encuentra una cap de metil-guanina y hacia el extremo terminal 3' se encuentra un segmento poli-A. Fueron descritas dos regiones no codificantes (NCRs) en los extremos 5' y 3' de 27 y 68 nucleótidos de longitud, respectivamente (Nan & Zhang, 2016).

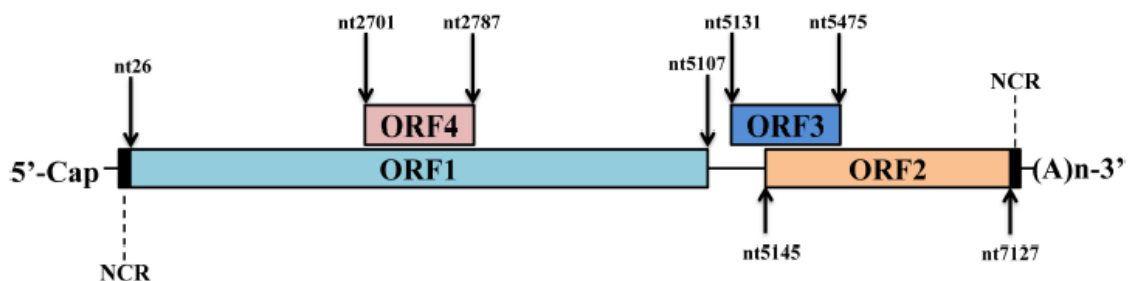


Figura 7. Esquema de la organización genómica de HEV. Desde el extremo 5' al 3' se observa: Cap (caperuza de metil-guanina), Región no codificante (NCR), ORFs, NCR y segmento poli-A. Extraído de Zhou et al., 2021.

2. 6. 3-Proteínas virales

2. 6. 3a-ORF1

El ORF1 posee 5082 nt, es el marco abierto de lectura más largo del genoma de HEV y codifica en la región una poliproteína de 1693 aa de longitud, que contiene ocho dominios funcionales putativos (Perttilä et al., 2013). Desde el N-terminal al C-terminal se incluyen los dominios: metil-transferasa (MT), Y, cisteín proteasa (PCP), región hipervariable (HVR), región rica en prolina (pro), X, Helicasa (Hel) y ARN polimerasa ARN dependiente (RpRd) (Nan & Zhang, 2016).

La proteína de 110 KDa que se traduce a partir de la secuencia nucleotídica del 1 al 979 del ORF1 de HEV, posee actividad de MT y guanililtransferasa (GT) (Magden et al., 2001). En el dominio Y se identificó un sitio potencial de palmitolación (C336-C337) que está altamente conservado en los genotipos HEV-1 al HEV-4. Estos aminoácidos, junto con W413, son importantes para la replicación del HEV y posiblemente estén implicados en la unión a la membrana en complejos de replicación intracelulares (Parvez, 2017).

El dominio PCP es una proteasa tipo quimiotripsina que puede procesar ORF1 y ORF2 (Paliwal et al., 2014). La HVR y los segmentos Pro fueron considerados parte de la misma región (Nan & Zhang, 2016) y recientemente se demostró que la HVR se encuentra en una región intermedia flanqueada por los segmentos N y C terminales del dominio Pro (Muñoz-Chimeno et al., 2020). El dominio hipervariable es considerado como una región altamente susceptible a inserciones y deleciones de extensos segmentos de genes (Pudupakam et al., 2009, 2011; Purdy, 2012; Purdy et al., 2012), incluso genes originarios del hospedero (Shukla et al., 2011). Esta heterogeneidad genética podría asociarse a la persistencia del virus en la fase aguda de la infección por HEV y explica la aparición de mutantes capaces de sobrevivir a la respuesta inmune del

hospedero. Debido a las numerosas inserciones y deleciones, esta región es la principal responsable de las diferencias de tamaño de los genomas de HEV, entre genotipos. En efecto, análisis de secuencias a niveles aminoacídicos han revelado que la HVR representa más del 71% de la divergencia de la secuencia entre genotipos, con una variabilidad intragenotípica de 31-46% (Pudupakam et al., 2011), lo que podría estar relacionado a la adaptación a un amplio rango de hospederos (Purdy et al., 2012). Aunque HVR no es requerida para la infectividad viral *in vitro*, se observó que sí influye en la eficiencia de la replicación del ARN (Pudupakam et al., 2009, 2011). Se ha sugerido que HVR podría tolerar pequeñas deleciones que no afectan la infectividad, pero sí la interacción con factores virales y del hospedero en la entrada y el ensamble (Parvez, 2017). El dominio X, también conocido como macrodominio cataliza la reacción de conversión de ADP-ribosa-1"-monofosfato a ADP-ribosa y se concluyó que es vital para la replicación del genoma en el estadio post-traducciona (Parvez, 2015), pero no durante el proceso de transcripción (Parvez, 2013). Se ha demostrado que el dominio *Hel* de HEV tiene activado NTP-asa y que es capaz de relajar el dúplex de ARN (Karpe & Lole, 2010).

HEV tiene una RpRd tipo 3 del supergrupo de los "alfa"virus, ARN simple hebra de sentido positivo (Koonin et al., 1992). Éste contiene un motivo altamente conservado GDD, el cual en general, juega un rol crucial en la actividad catalítica (Wang & Meng, 2021a) y sustituciones en este motivo pueden anular su actividad (Emerson et al., 2004). Se ha demostrado que RpRd se une específicamente al 3' terminal del ARN, requiriendo dos estructuras de *tallo-bucle* conocidas como dominio SL1 (nts: 7173-7194) y SL2 (nts: 7089-7163) en la extensión poli-A, que están separadas de una región de simple hebra. Allí, el 3' terminal del genoma viral actúa como elemento cis-reactivo (CRE) que es

crucial para la iniciación de la replicación del genoma (Agrawal et al., 2001). Un segundo CRE está localizado en la región de unión entre ORF1 y el comienzo de la región subgenómica del genoma de HEV, el cual contiene una estructura tallo-bucle altamente conservada que es esencial para la síntesis del ARN subgenómico (Huang et al., 2004).

2. 6. 3b-ORF2

El ORF2 de HEV tiene 1983 nt de longitud comenzando en el nucleótido 37 *downstream* del codón de *stop* de ORF1 y terminando 65 nt *upstream* del segmento poli-A (Nan & Zhang, 2016). En un inicio se presumía que la proteína ORF2 de HEV, originalmente identificada como el componente mayor de la cápside, únicamente tenía la función de unirse a los receptores celulares mediando la infección en células susceptibles *in vivo* e *in vitro* (Nan et al., 2017); haciendo de ORF2 el blanco perfecto para desarrollar vacunas.

En los últimos años, se descubrió que esta proteína existe en formas diferentes a la de cápside en células infectadas, indicando que juega múltiples roles además de ser el componente estructural del virión (Zhou et al., 2021).

Existen dos formas distintas de proteína de cápside traducida desde el ORF2: una forma secretada (ORF2^s), y una forma asociada a la cápside (ORF2^c) iniciada en un codón AUG interno previamente desconocido, que se encuentra 15 aa *downstream* del codón de inicio de ORF2^s (Montpellier et al., 2018). La proteína de ORF2^s es sometida a modificaciones postraduccionales y posee un tamaño mayor, que la proteína de ORF2^c, 84 KDa y 72 KDa, respectivamente (Yin et al., 2018). Se ha sugerido que la proteína ORF2^c permanece sin glicosilar en el citoplasma para ser incorporada en partículas

infectivas, mientras que ORF2^s es secretada al espacio extracelular en forma de dímero glicosilado y carece de regiones involucradas en la unión celular (Chen et al., 2022). Algunos estudios han sugerido que ORF2^s no es esencial en el ciclo viral de HEV, pero es capaz de reducir la neutralización mediada por anticuerpos, evadiendo así, al sistema inmunitario del hospedero. Se presenta de forma mayoritaria tanto en el suero de pacientes infectados con HEV como en el sobrenadante de cultivos celulares (Montpellier et al., 2018; Yin et al., 2018). Por otra parte, la proteína ORF2^c es altamente inmunogénica (Schofield et al., 2000; Wang & Meng, 2021).

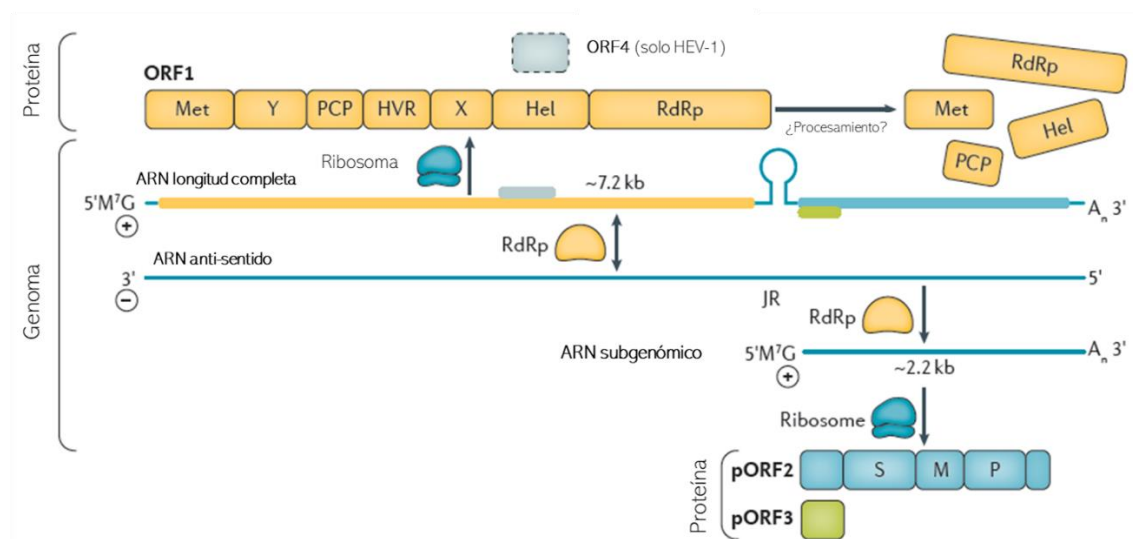


Figura 8. Organización genética y traducción del virus de HEV. El HEV es un virus de ARN de 6,6-7,3 Kb de sentido positivo. El ARNm está capeado en el extremo terminal 5' y poliadenilado en el extremo terminal 3' y en la región de unión entre el ORF1 y el ORF2/3 contiene una estructura crítica para la replicación, un *stem-loop*. Después de la traducción de la poliproteína de ORF1, la RpRd del ORF1, transcribe el ARN a un intermediario de sentido negativo y sirve como templado para la transcripción de más ARN de sentido positivo; mientras que ARNm de longitud completa sirve para empacar nuevos viriones. El ARN subgenómico (ARNsg) contiene al ORF2 y el ORF3 y está capeado en el extremo 5' y poliadenilado en el 3' terminal. Estos genes serán traducidos en la proteína de cápside (ORF2) y en una viroporina (ORF3). Extraído y adaptado de Nimgaonkar, et al., 2017.

2.6.3c-Dominios de ORF2

Los monómeros de la proteína ORF2 contienen tres dominios diferentes (Fig.9): S (*shell* aa: 129-319), M (*medium* aa: 320-455) y P (*protrusion*, también conocido como E2s, aa 456-606). El dominio M está asociado al dominio S y se localiza en la superficie

icosaédrica, alrededor del eje 3-*fold*. Los dominios M y P están asociados mediante una larga bisagra rica en prolina (haciendo la cápside más resistente a proteasas); P está compuesto por dos subdominios: P1 y P2, siendo P2 una protrusión de P1 (Yamashita et al., 2009). Se demostró que el péptido de la cápside proteica de HEV que consiste en una parte de M y P completo, es capaz de unirse a la membrana de varias líneas celulares, sugiriendo que el dominio P, además de estar implicado en la unión con moléculas receptoras, está involucrado en la unión a receptores celulares (Yamashita et al., 2009). Tres inserciones bucle altamente expuestas, pueden encontrarse en la parte más superior de la superficie *spike*, lo que sugiere su participación antigénica (Guu et al., 2009). La cápside proteica de HEV contiene una secuencia señal en la región N-terminal de 22 aa (que consiste en residuos ricos en arginina, un centro hidrofóbico de 14 aa y residuos de prolina que inducen un giro amplio) y sitios N-ligados a glicosilación, que parecen ser importantes para la dimerización de la cápside proteica (Xu et al., 2016). También contiene una señal putativa de localización al retículo endoplasmático (RE) en su N-terminal (Surjit et al., 2007).

El alineamiento de ORF2 muestra conservación estructural en los dominios S y M, que son las unidades básicas de las partículas virales (Xing et al., 2010), lo que podría sugerir que se ensambla de una forma relativamente conservada. Pero, sin embargo, presenta un grado más bajo de conservación en el dominio P (Zhang et al., 2018), lo que podría representar las diferencias en el reconocimiento y entrada de HEV a las células hospedero de diferentes especies (Bai et al., 2020).

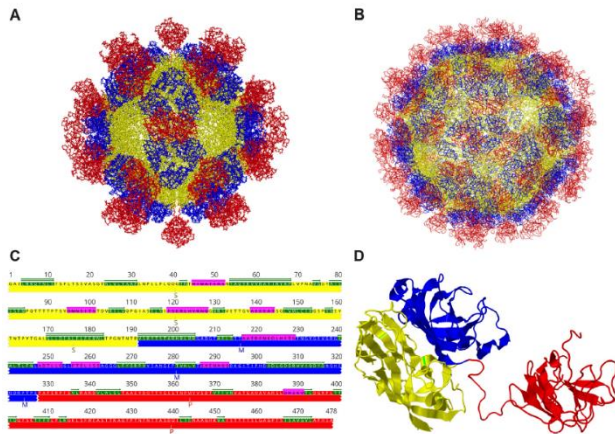


Figura 9. Interpretación de la estructura de HEV: **A)** VLP T=1, comprende 60 subunidades de cápside. **B)** VLP T=3 compuesto por 180 subunidades de cápside. **C)** Representación de la estructura secundaria asignada a la proteína de cápside truncada. La secuencia de ORF2 corresponde a los aminoácidos del 119 al 606 de HEV. Los dominios S (*Shell*), M (*Medium*) y P (*Protruding*) están pintados en amarillo, azul y rojo respectivamente. α -hélice y β -láminas están indicadas en rosa y verde respectivamente. **D)** Estructura terciaria de la proteína de cápside truncada de HEV, se muestran los dominios S, M y P de izquierda a derecha respectivamente. Extraído y adaptado de Wang & Meng, 2021.

2. 6. 3d-ORF3

El ORF3 es el marco abierto de lectura más pequeño del genoma de HEV. Al igual que ORF2 es traducido desde un ARN subgenómico y solapa con éste en 300 nt en un marco de lectura diferente, produciendo una proteína de 113-115 aa. Esta región de solapamiento ha sido identificada como una de las regiones más conservadas de HEV (Nan & Zhang, 2016). Es una fosfoproteína (conocida como VP13) con una masa molecular de 13 KDa, contiene dos dominios mayores N-terminales D1 (aa 7-23) y D2 (aa 28-53) y dos regiones ricas en prolina en su C-terminal, P1 (aa 66-77) y P2 (aa 95-111) (Holla et al., 2013).

Varias funciones se han propuesto para VP13: el dominio D1, rico en cisteína, es necesario para la asociación de la proteína con el citoesqueleto (Holla et al., 2013) y esta interacción con los microtúbulos posiblemente inhibe la liberación del citocromo c, que protege a la célula de la apoptosis, favoreciendo la infección y replicación del virus. Una reacción de palmitoilación en esta región es crítica para la asociación de VP13 a la membrana, su localización subcelular y su posible involucramiento en la estabilización de las proteínas virales. También se ha demostrado que los residuos de cisteína son

necesarios para la secreción de viriones infectivos, indicando que modificaciones postraduccionales mediadas por la célula hospedera juegan un rol funcional clave para HEV (Gouttenoire et al., 2018). Por un lado, la asociación de ORF3 a lípidos es indispensable para la formación de partículas HEV asociadas a membrana (los viriones casi envueltos) y la contribución al brotamiento. Por otro lado, ORF3 funciona como canal iónico y comparte características estructurales con viroporina clase I. La viroporina generalmente es requerida por muchos virus para la liberación del virión desde células infectadas (Nagashima et al., 2011b). En un estudio realizado por Kannan et al., (2009) sugirieron que VP13 se transporta a los microtúbulos organizando su asociación con las dineínas, que median el transporte de la cápside y así facilitar la infección viral.

2. 6. 3e-ORF4

El ORF4 (nt: 2835 - 3308) codifica para una proteína de vida corta y su secuencia aminoacídica está generalmente conservada entre las cepas de HEV-1. Es sintetizada desde un marco de lectura alternativo, sólo bajo condiciones de estrés en el RE. Probablemente este estado de estrés sea iniciado como una respuesta antiviral del hospedero, que a su vez genera las condiciones ideales para la replicación óptima de HEV-1 (Nair et al., 2016). Su traducción es IRES-dependiente y su producto es indispensable para la replicación e interacción con múltiples proteínas virales, permitiendo ensamblar el complejo de replicación y promoviendo la actividad de la RpRd al interactuar con eEF1 α 1 y tubulina β del hospedero (Nair et al., 2016). Interesantemente, se ha demostrado que ORF4 es degradada por proteosomas del hospedero, lo cual podría ser una estrategia antiviral para restringir la propagación del virus (Nair et al., 2016)

2.7-Proteínas recombinantes de ORF2 y la formación de partículas similares a virus (VLPs)

El HEV exhibe una simetría icosaédrica T=3 con 90 dímeros que están organizados en la cápside. El ORF2 forma la cápside proteica por subunidades homodiméricas las cuales protruyen desde la superficie del virus y son responsables, entre otras funciones, de la infección debido a su interacción con las células del hospedero (Li et al., 2009; Yamashita et al., 2009).

Se ha demostrado que la proteína codificada por ORF2 es capaz de autoensamblarse y formar VLPs cuando se la expresa mediante sistemas recombinantes en *baculovirus* o *Escherichia coli* (*E. coli*) (Li et al., 2005). El N-terminal de ORF2 contiene una secuencia que codifica para un péptido señal que lo transloca al RE, mientras que el C-terminal es esencial para encapsidar el genoma viral y estabilizar la proteína (Shiota et al., 2013). Los N y C terminales truncados de ORF2 como 595 (aa: 14-608) forman una VLP icosaédrica T=3 (n=180) similar a los viriones nativos; la proteína 495 (aa: 112-606) presenta una forma de VLP ORF2 similar al virión de geometría icosaédrica T=1 (n=60) (Li et al., 2020). Las partículas T=1 son estructuralmente distintas a las partículas T=3 y no encapsidan el ARN viral. La delección de 111 aa del N-terminal y el volumen insuficiente de la cavidad central, podría determinar la falla en la encapsidación del ARN (Yamashita et al., 2009). Una región bisagra flexible rica en prolina, entre los dominios M y P contribuye a los cambios topológicos en las VLPs T=1 y T=3 (Mori & Matsuura, 2011; Xing et al., 2010).

Los epítopes reconocidos por anticuerpos neutralizantes están localizados en el C-terminal de la proteína, en el dominio E2s que forma un homodímero ajustado con residuos clave en la interacción, localizados en la interfaz dimérica (Mazalovska & Kouokam, 2020). La interacción del dominio E2s inicia la homodimerización de la proteína ORF2 en capsómeros que se ensamblarán en la partícula del virus y a través de esta interacción con las células del hospedero se inicia la infección (Guu, et al., 2009; Li et al., 2009; Yamashita et al., 2009). Los dominios E2 extendidos con 26 residuos aminoacídicos adicionales forman la proteína 239 (aa:368-606) que pueden autoensamblarse en VLPs con un diámetro de 20-30 nm (Li et al., 2015); pero también pueden ser más cortos, como las proteínas 179 (aa: 439-617) que se autoensamblan en VLPs de aproximadamente 20 nm (Cao et al., 2017). La capacidad de formar VLPs ha sido sugerida para un amplio rango de proteínas ORF2 truncadas en el N-terminal (Li et al., 2005; Li et al., 2015; Cao et al., 2017; Zheng et al., 2018).

La inmunogenicidad de las VLPs formadas por versiones de ORF2 con N-terminal truncado, depende de su capacidad para formar estructuras particuladas (Li et al., 2005; Cao et al., 2017; Zheng et al., 2018). Las VLPs formadas por 239 en ratones, mostraron una inmunogenicidad 240 veces más alta que E2 dimérico (Li et al., 2005), también indujeron una respuesta de células T potente, ausente en animales inmunizados con E2, a pesar de que el epítope para las células T es compartido en estos dos inmunógenos (Wu et al., 2007). El ensamblado de las VLPs es un factor crítico para determinar la capacidad de los productos de proteína ORF2 de HEV de ser altamente inmunogénica e inducir la formación de anticuerpos neutralizantes del virus (Gordeychuk et al., 2022).

2.8-Ciclo viral de HEV

HEV es resistente a la inactivación por las condiciones ácidas y alcalinas leves del tracto intestinal, facilitando la vía de transmisión fecal-oral (Rodríguez-Frías et al., 2012). Siendo un virus que se transmite principalmente por esta vía, ingresa primero al hospedero por vía oral y se replica en las células del epitelio del intestino. Subsecuentemente, el virus pasa al torrente sanguíneo y alcanza su órgano blanco, el hígado (Williams et al., 2001).

El ciclo viral de HEV (Fig.10) permanece poco comprendido a la fecha debido a la carencia de un sistema de cultivo celular eficiente para propagar el virus, si bien algunos novedosos sistemas de genética reversa parecen estar cambiando esa realidad (Wang & Meng, 2021a). Estudios realizados por Ji et al., (2021) demostraron que la infectividad *in vitro* de las dos formas (*eHEV* y *neHEV*) es muy diferente; las partículas de *neHEV* son más infecciosas que *eHEV*. Sin embargo, se observó que al remover la envoltura de *eHEV* aumenta su infectividad y mejora el tiempo de unión y entrada a la célula. Esto se debe a que los virus envueltos requieren del reclutamiento de varios factores necesarios para la fijación y la endocitosis, mientras que los virus desnudos no requieren de la fusión de membranas.

El receptor celular específico para HEV aún continúa sin identificarse (Kalia et al., 2009). Algunos ensayos de inmunoprecipitación y ELISA han demostrado que el ectodominio ASGPR1/2, un receptor de la superficie celular, presente en la membrana basolateral, interactúa con la proteína de la cápside viral (ORF2) (Wibing et al., 2021). Otros ensayos sugirieron a la integrina $\alpha 3$ como un factor potencial de la fijación/entrada y se observó una interacción directa con *neHEV*. Sin embargo, anticuerpos anti-integrina $\alpha 3$, no

pueden inhibir la infección, por lo que se continúan necesitando análisis para comprender su rol (Shiota et al., 2019).

Varios estudios que usan la expresión de proteínas de cápside recombinantes para generar VLPs como modelo de viriones no envueltos, sugieren roles para proteoglicanos heparán-sulfato, ATP sintasa subunidad 5 β y GRP78 durante la fijación/entrada del virus (Kalia et al., 2009; Yin et al., 2016; Yin & Feng, 2019). Sin embargo, la ausencia de proteínas virales en la superficie de las partículas de *e*HEV demuestra que estos viriones deben utilizar factores de fijación y/o receptores celulares diferentes, para iniciar la entrada. Interesantemente, la membrana de *e*HEV contiene fosfatidilserina, la cual podría unirse al receptor TIM-1 de la superficie celular de las células hospederas y de este modo servir como factor de fijación potencial (WiBing et al., 2021). La internalización, tanto de *e*HEV como de *ne*HEV involucra vías dependientes de clatrina y dinamina. *e*HEV también requiere de una pequeña GTPasa Ras relacionada a las proteínas Rab 5 y Rab 7 (Yin et al., 2016). Se han propuesto diferentes puntos de liberación del genoma viral para *e*HEV y *ne*HEV luego de un proceso de desensamblaje poco entendido (Yin et al., 2016). Para *e*HEV, se ha sugerido que requiere del tráfico hacia la membrana lisosomal para la degradación de la envoltura lipídica del virus (Wibing et al., 2021). Luego de la traducción de la poliproteína de ORF1, la RpRd transcribe el ARN a un intermediario de sentido negativo que sirve como templado para la transcripción de más ARN de sentido positivo (ARN subgenómico); mientras que el ARNm de longitud completa sirve para empacar nuevos viriones. El ARN subgenómico (ARNsg) contiene al ORF2 y el ORF3 y estos genes son traducidos en las proteínas de cápside y en la viroporina, respectivamente (Nimgaonkar, et al., 2017).

El proceso de ensamblaje de los virus usualmente involucra interacciones entre la cápside viral, proteínas no estructurales y la acción coordinada de factores del hospedero. Curiosamente, sólo una fracción menor de las proteínas de cápside ORF2 son ensambladas como partículas infecciosas (ORF2^c). En contraste, grandes cantidades de variantes de ORF2 no asociadas a viriones, con función inmunomoduladora, son secretadas a través de la vía exosomal (ORF2^s) (WiBing et al., 2021).

La proteína ORF3 interactúa con microtúbulos y múltiples proteínas celulares del hospedero modelando el ambiente para la replicación de HEV (Kennan et al., 2009; Gouttenoire et al., 2018). Esta proteína se une a TSG101 involucrada en la vía de transporte, facilitando el brotamiento de los viriones nacientes en cuerpos multivesiculares (Nagashima et al., 2011b). Finalmente, éstos se fusionan con la membrana plasmática y los viriones son liberados desde las membranas basolaterales de las células del hígado, al sistema sanguíneo, rodeadas por membrana lipídica (eHEV), o al ducto de la vesícula biliar donde las envolturas son degradadas por los ácidos y sales biliares, convirtiendo las eHEV en nHEV (Nagashima et al., 2017).

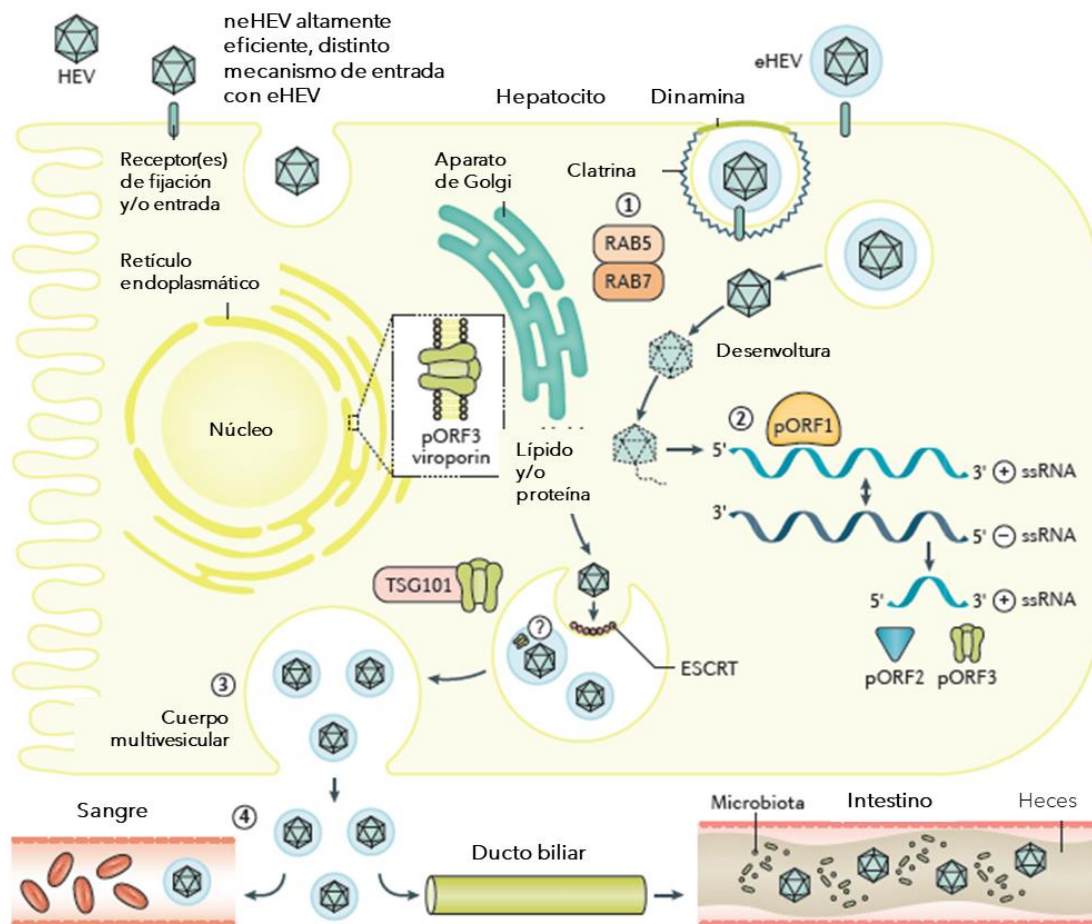


Figura 10. Ciclo viral del HEV. Paso 1) Comienza con mecanismos de entrada diferenciales en caso de ser eHEV o neHEV. Paso 2) Se expone el ARNm y la poliproteína ORF1 conteniendo la RpRd es traducida para entonces transcribir el ARN+ al templado de ARN-, el cual sirve para transcribir tanto el ARN+ de longitud completa como el ARNsg que contiene ORF2 y ORF3. Esta última es utilizada en el paso 3 para el brotamiento del virus eHEV en cuerpos multivesiculares. Luego del brotamiento los viriones pueden seguir dos caminos distintos: la circulación sanguínea manteniendo la envoltura lipídica que lo protege de los anticuerpos anti-ORF2; o el ducto biliar donde los detergentes y proteasas degradarán la envoltura lipídica y se convertirá en neHEV, lo que explica por qué aparece sin envoltura en las muestras fecales. Extraído y adaptado de Nimgaonkar et al., 2017.

2.9–Modos de transmisión

Existen varias vías de transmisión del HEV (Fig.11): *waterborne*, zoonótica, parenteral, vertical y persona-persona.

- **Waterborne**: es la forma principal de transmisión de HEV, particularmente para infecciones causadas por los genotipos antropotrópicos HEV-1 y HEV-2 en áreas endémicas causando brotes epidémicos mediante el consumo directo de agua contaminada (Krush et al., 2015; Raji et al., 2021), o de forma indirecta por la contaminación de mariscos, irrigación de cultivos, etc. (Takuissu et al., 2022). También se relaciona a casos importados en regiones desarrolladas (Khuroo et al., 2016). Cabe destacar que, a pesar de los diferentes estudios que mostraron la presencia de HEV en ambientes acuáticos en países desarrollados, esta forma de transmisión no ha sido investigada (Takuissu et al., 2022).
- **Zoonótica**: de los virus causantes de hepatitis virales, HEV es el único que posee animales no humanos como reservorios, los cuales se presentan asintomáticos (Pavio et al., 2010). Se cree que esta es la principal vía de transmisión para los genotipos HEV-3 y HEV-4 en países desarrollados donde son predominantes (Forni et al., 2008; Lewis et al., 2010). Esto se debe a la ingesta de carne cruda o poco cocida de animales infectados, principalmente cerdos o jabalíes o a través del contacto directo (Vina-Rodríguez, 2015; Wang & Meng, 2021a).

Desde que se descubrió por primera vez una infección de HEV-3 en cerdos domésticos de Estados Unidos, en 1997 (Chandler et al., 1999) se han identificado muchos aislamientos de este genotipo provenientes de suinos a lo largo de todo el mundo, y ha probado ser la causa principal de infección humana de HEV. Aunque los suinos son

reconocidas como los reservorios más frecuentes de HEV-3 y HEV-4 (Pavio et al., 2015), se ha demostrado que está presente en una amplia variedad de animales domésticos y silvestres (Ahmed & Nasheri, 2022). En los últimos años se han identificado un número creciente de variantes de HEV que ha expandido su rango de hospederos en una gran diversidad de especies animales, alrededor del mundo (Wang & Meng, 2021a). Se han reportado infecciones en humanos con el genotipo HEV-7 relacionadas al consumo de leche y carne de camello (Lee et al., 2016) y HEV-C2 relacionado con ratas, incluso se han documentado casos de infección a humanos causadas por HEV presente en cabra y conejo (Wang & Meng, 2021a).

Además de la diversidad de animales hospederos que se han identificado, algunos estudios demostraron que al inocular cerdos y gallinas con HEV de forma intravenosa se lograba detectar ARN en otros órganos además del hígado, incluyendo estómago, riñón, pulmones, amígdalas, glándulas salivales y músculo (Billam et al., 2008; Bouwknecht et al., 2009).

- **Parenteral:** ha habido reportes de infecciones de HEV luego de transfusiones sanguíneas completas y transfusión de productos sanguíneos como eritrocitos, granulocitos o plaquetas (Huzly et al., 2014; Gallian, 2019; Sayed et al., 2021); así como posteriores a trasplantes de órganos (Denner, 2019), abuso de drogas intravenosas (Kuznetsova, 2018) y hemodiálisis (Eini et al., 2015).
- **Vertical:** La transmisión de HEV de madre a feto, durante el tercer trimestre de gestación, ha sido reportada en numerosos estudios (El sayed zaki et al., 2014; Gupta & Agarwala, 2018) y ha sido descrita principalmente en casos de infección por el genotipo HEV-1 (Kar et al., 2008).

- **Persona-persona:** El contacto directo y transmisión del virus entre personas también juega un rol en la epidemiología de HEV, principalmente para los genotipos HEV-1 y HEV-2, causantes de brotes epidémicos. Los genotipos HEV-3 y HEV-4 no presentan una transmisión eficiente entre seres humanos (Teshale, 2010).

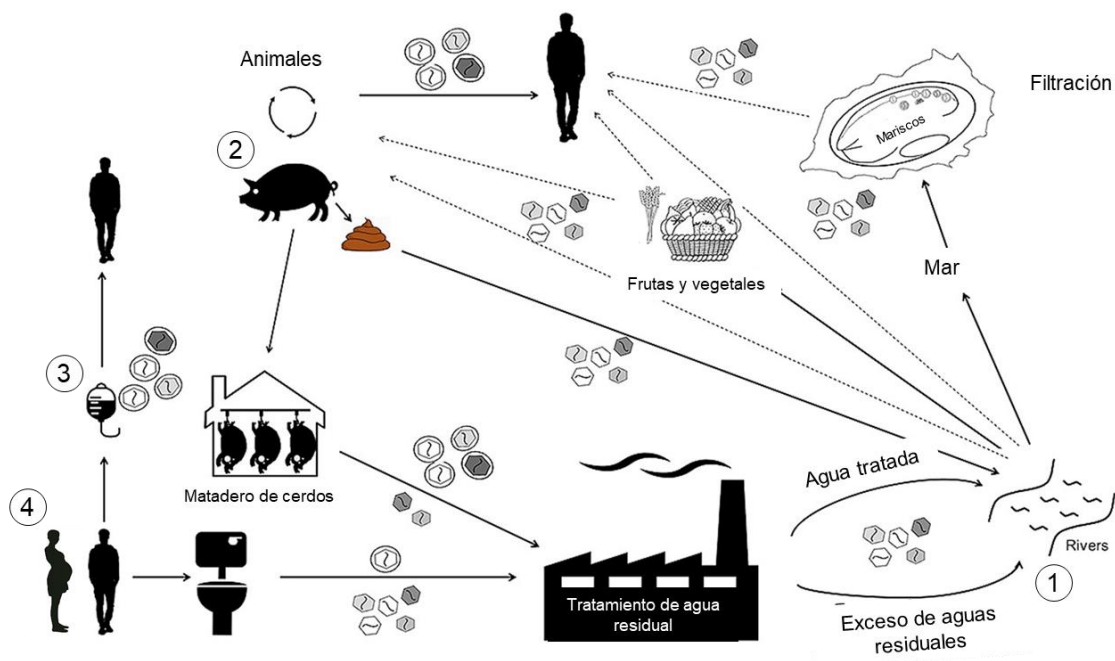


Figura 11. Modos de transmisión de HEV: 1) *Waterborne* directa a través del consumo de agua contaminada o indirecta a través del consumo mariscos o cultivos contaminados. 2) Zoonosis, a través del consumo de carne u otros productos de animales portadores de HEV. 3) Vía parenteral debido a transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos, agujas intravenosas. 4) Vertical de la madre a feto durante el embarazo. Figura extraída y modificada de Fenaux et al., 2019.

2.10-Clínica

Típicamente el HEV causa una infección aguda que se resuelve en un período de 2 a 6 semanas (OMS, 2022). En términos generales, los síntomas incluyen: fatiga, disminución de apetito, náuseas, fiebre e ictericia. La infección crónica puede ocurrir en

pacientes inmunocomprometidos y puede conducir a cirrosis o falla hepática (Kamar et al., 2017; Valavan et al., 2021).

El periodo de incubación después de la entrada del virus al hospedero, que usualmente es a través del tracto gastrointestinal es de entre 2 y 8 semanas (Wedemeyer et al., 2012). Después de atravesar la mucosa intestinal, llega al hígado a través de la vena porta y en tres semanas comienza la replicación en los hepatocitos, lo que coincide con la aparición de los síntomas clínicos como resultado del daño tisular. La viremia a menudo coincide con la excreción de partículas de HEV en las heces pocos días antes de los síntomas clínicos, y persiste entre 14 y 21 días (Aggarwal, 2000). Mientras la viremia va disminuyendo, aparecen anticuerpos anti-HEV, daño hepático y aumentan los niveles de transaminasa en el suero.

Las manifestaciones clínicas de la infección por HEV varían dependiendo del genotipo viral y el hospedero; los genotipos HEV-1 y HEV-2 son más virulentos, y suelen presentarse como hepatitis viral aguda con una alta tasa infección sintomática (Aggarwal, 2011; Aggarwal & Goel, 2018). Por el contrario, la infección por HEV-3 y HEV-4 suele ser asintomática o subclínica (Mirazo et al., 2014). Interesantemente, existe evidencia de que el riesgo de hospitalización en individuos infectados con HEV-3 varía según el subtipo. De hecho, pacientes infectados con el subtipo 3c parecen tener menor riesgo que aquellos infectados con los subtipos 3f o 3e (Subissi et al., 2018; Abravanel et al., 2020; Ahmed & Nasheri, 2022).

En pacientes inmunocomprometidos, el hospedero no es capaz de generar suficiente inmunidad, facilitando el desarrollo de una infección crónica (Narayanan, 2019). Se han conocido casos en los cuales pacientes inmunocomprometidos han desarrollado infecciones crónicas de HEV cuando se han infectado con HEV-3 y HEV-4 (Dalton et

al., 2009); incluso se ha reportado un caso de hepatitis crónica asociada a HEV-7 luego del trasplante de hígado en un paciente de Emiratos Árabes Unidos (Lee et al., 2016; Wang & Meng, 2021a).

Si bien no es un proceso frecuente, luego de cronificarse la infección con HEV, se la ha asociado a manifestaciones neurológicas como el síndrome de Parsonage-Turner (amiotrofia neurológica) (HEV-3) y el síndrome Guillain-Barré (HEV-1, HEV-3 y HEV-4) (Kamar et al., 2010; van der Berg et al., 2014). Los síntomas neurológicos podrían estar ligados a la emergencia de variantes neurotrópicas (Kamar et al., 2010). Además de los tejidos nerviosos, HEV también se ha encontrado en riñón, placenta, bazo, nódulos linfáticos y tejido intestinal, exhibiendo un amplio tropismo tisular (Pischke et al., 2017).

Los factores de riesgo asociados a la infección por HEV podrían ser específicos a los diferentes genotipos o regiones. El aumento de la edad es un factor importante en regiones endémicas para las infecciones con HEV-1 y HEV-2 (Kmush, 2013). Para las naciones industrializadas los grupos entre 15 y 25 años son los de mayor riesgo ante la infección, con un pico de seroprevalencia entre los 40 y 60 años (Faber, 2012; Kmush et al., 2015; Horn, 2018). Esto puede asociarse al consumo de carne animal cruda o poco cocida (Meng, 2011), además de ciertas exposiciones ocupacionales, que contribuyen a incrementar la seroprevalencia de HEV, particularmente HEV-3 y HEV-4 (Kmush et al., 2015).

El sexo también es un factor de riesgo, siendo mayor la tasa de seroprevalencia e incidencia en varones en comparación con mujeres no embarazadas (Sridhar et al., 2015). Embarazo, inmunosupresión y pre-existencia de enfermedad hepática son también factores, que aumentan el riesgo para la infección con HEV (Howard, 2010;

Kamar, 2014). Entre los factores de riesgo ambientales, las estaciones lluviosas o monzones afectan la incidencia de hepatitis E en países en desarrollo (Labrique, 1999); así como las condiciones extremadamente secas, el pobre tratamiento del agua residual y la densidad poblacional (Kamar et al., 2012; Azman et al., 2019; Carratala et al., 2019).

Las infecciones con HEV en la población en general se resuelven sin tratamiento, con una tasa de letalidad menor al 4%. Sin embargo, en mujeres embarazadas infectadas con HEV-1, esta tasa puede aumentar al 30%, por evolución a falla hepática fulminante (Kumar et al., 2013; Jin et al., 2016; Ahmad et al., 2020).

2.11-Tratamiento y prevención

La hepatitis E se ha convertido en un problema clínico importante dado que las infecciones en individuos inmunodeprimidos pueden progresar a hepatitis crónica; lo que requiere un tratamiento antiviral costoso. Además, la infección crónica puede llevar a cirrosis, necesitando trasplante (Kamar et al., 2008).

Las opciones de tratamiento son pocas (Lhomme et al., 2020) y no existe un tratamiento recomendado para infecciones agudas por HEV. Se ha sugerido la Ribavirina para algunos casos de pacientes inmunocompetentes con hepatitis severa (Perón et al., 2011) y se la ha evaluado como un antiviral efectivo para pacientes infectados crónicamente con HEV con respuesta virológica sostenida (SVR) de aproximadamente 85-90%. Sin embargo, una minoría de los pacientes fallan en conseguir la SVR, posiblemente por las mutaciones virales (Kamar et al., 2014; Dalton & Kamar, 2016). Tratamientos con interferón están contraindicados en pacientes con trasplante de riñón,

páncreas, corazón o pulmón, porque incrementa el riesgo de rechazo causado por la estimulación del sistema inmunitario (Lhomme S, et al., 2020).

No se conocen otras terapias antivirales efectivas contra la infección crónica de HEV por este motivo la Ribavirina es actualmente el tratamiento elegido para pacientes con HEV crónico, sin embargo, urge la necesidad de encontrar otros componentes específicos para el HEV con los cuales tratar a los pacientes que fallan en eliminar el virus luego de esta terapia (Lhomme et al., 2020).

2. 12–Vacunas

En general, los sistemas *in vitro* de cultivos celulares tienen grandes ventajas para el desarrollo de vacunas atenuadas o inactivadas contra un virus. Sin embargo, no es el caso de HEV y los sistemas disponibles como Huh-7s10-3, A549, HepG2/C3A, no soportan producciones a gran escala de partículas virales, independientemente del genotipo (Tanaka et al., 2007; Okamoto, 2011; Berto et al., 2013, Johne et al., 2016; Nan & Zhang, 2016).

A la fecha, la mayoría de las investigaciones se han enfocado en vacunas de proteínas recombinantes (Cao et al., 2018), usando sistemas de expresión como *E.coli* o células de insecto (*Baculovirus*) (Li et al., 2005; Shrestha et al., 2007; Zhang et al., 2002; 2009; Zhu et al., 2010). El sistema de expresión *E.coli* es el más económico y comúnmente utilizado, dado que se puede expresar una gran cantidad de proteínas heterólogas, de forma rápida (Cao et al., 2018). Sin embargo, al ser un sistema de producción que utiliza procariotas, no permite modificarlas post-traduccionalmente. El sistema de expresión *Baculovirus*, al utilizar células eucariotas, puede producir a través de modificaciones

post-traduccionales, partículas que son morfológicamente y antigénicamente similares a las partículas del virus nativas; sin embargo, este sistema insume un tiempo relativamente prolongado en comparación con el sistema *E.coli* (Liu et al., 2013).

Aunque se han estudiado más de 14 vacunas candidatas para HEV (Cao et al., 2018) solo las tres que se detallan a continuación han progresado en ensayos clínicos. Las tres han sido producidas utilizando VLPs recombinantes de la proteína ORF2, con diferentes longitudes; diseñadas para mimetizar los epítopes de neutralización de la superficie del virión (Zhao et al., 2013).

1. Proteína recombinante de 56 KDa expresada en *Baculovirus*, HEV-1 aa 112-607. Los ensayos clínicos fase II indicaron elevada efectividad para la prevención de HEV (Shrestha et al., 2007).
2. La vacuna de la proteína 179 HEV-4 recombinante aa 439-617 expresada en *E.coli* producida por *Changchun Institute of Biological Products, Co., Ltd* (China) ha sido evaluada en ensayos clínicos fase I en China mostrando buena seguridad, tolerancia e inmunogenicidad (Cao et al., 2017; 2023).
3. La única vacuna disponible en el mercado es la 239 de HEV-1 (*Hecolin™*) desarrollada por *Xiamen Innovax Biotech*, expresada en *E.coli*. Es un segmento de ORF2 truncado que comprende los aa 368-606 y forma una VLP de 23 nm de diámetro (Zhang et al., 2016). El inmunógeno 239 en esta vacuna cubre el dominio M de forma parcial y el dominio P entero, formando una versión truncada de VLP T=1 que contiene los epítopes inmunes funcionales (Li et al., 2015). Esta vacuna ha completado la fase III de ensayos clínicos y ha sido licenciada solo para uso comercial en China (Zhang et al., 2013; 2015; Nelson et al., 2016; Nimgaonkar et al., 2018;) y recientemente en Pakistán (Lynch J, et al., 2023).

Desde el año 2015 la OMS ha recomendado que se considere el uso de esta vacuna en respuestas a brotes. Recientemente, en el año 2022, fue utilizada en una campaña de vacunación contra hepatitis E en el campo de personas desplazadas de Bentiu, en Sudán del Sur, donde los brotes de la enfermedad son un constante riesgo. Alrededor de 25.000 personas, incluyendo mujeres embarazadas, recibieron la vacuna, con exitosos resultados que demuestran que es posible utilizar esta vacuna aún en condiciones difíciles y promueven a otros países a emplearla en respuesta a brotes y para disminuir la carga de la enfermedad (Médicos sin fronteras, 2022).

Aunque los genotipos seleccionados para elaborar las vacunas en cada desarrollo son diferentes, pueden proteger de forma cruzada dado que, aunque se han caracterizado distintos genotipos, las cepas de HEV se comportarían como un único serotipo (Innis & Lynch, 2018). Esto se debe a que la proteína de cápside comparte más del 85% de identidad con los 4 genotipos pertenecientes a la especie *Paslahepevirus balayani*, capaces de infectar humanos de forma frecuente. Por tanto, ORF2 es un buen candidato como vacuna de subunidades de HEV (Mori & Matsuura, 2011).

En investigaciones previas, Li et al., (2015) demostraron que HEV-VLPs generadas con HEV-5 y HEV-6 exhibían reactividad antigénica cruzada contra HEV-1, HEV-3 y HEV-4, y además los anticuerpos contra VLPs de HEV-5 y HEV-6 tenían la capacidad de neutralizar al menos parcialmente la infección de HEV-3 en un sistema de cultivo celular, indicando que los genotipos de HEV-5 y HEV-6 presentan epítopes similares a los de HEV-3.

Más recientemente, en un trabajo llevado a cabo por Guo et al., (2020) se observó que monos infectados con HEV-7 fueron protegidos de una reinfección por HEV-3, lo que sugiere que los epítopes inmunogénicos de HEV-7 presentan elevada identidad

antigénica con aquellos de HEV-3 y que la vacuna basada en la cápside proteica de HEV-3 es capaz de prevenir la infección por HEV-7. Por tanto, VLPs de HEV-1 y HEV-3 podrían ser candidatos para una vacuna universal contra hepatitis E (Guo et al., 2020).

2.13-Proteína Z del virus Junín

La familia *Arenaviridae* incluye al virus Lassa (agente etiológico de fiebre hemorrágica en el Oeste de África), Guanarito (causante de fiebre hemorrágica en Venezuela), Virus Junin (en Argentina), entre otros (McCormick et al., 2001). Se caracteriza por tener una nucleocápside helicoidal que contiene el genoma ARN bisegmentado, rodeado por una bicapa lipídica con espículas de glicoproteínas integradas en ella (Fig.12). Cada hebra de ARN (una pequeña S, y una larga L) codifica dos genes virales mediante la estrategia de ambisentido, separados por una región intergénica. La hebra S de ARN codifica para la nucleoproteína (NP), el precursor de la glicoproteína (GP) (Eichler et al., 2003); mientras que la hebra L de ARN codifica para la RpRd y la proteína de interés, proteína Z. Esta proteína posee una longitud de 99 aa y una masa molecular de aproximadamente 11 KDa (Salvato et al., 1989a,b)

La proteína Z contiene un motivo en forma de anillo con actividad de unión a zinc (Salvato et al., 1992). También posee dos motivos diferentes, ricos en prolina que son característicos de los dominios tardíos: PPPY y PTAP separados por 8 aa. Están altamente conservados y se ha demostrado que median la interacción con las proteínas de las células hospedero. Análisis mutagénicos revelaron que ambos son necesarios para la mediación del brotamiento, una de las funciones atribuidas a esta proteína. Pérez et al., (2003) evidenciaron esta proteína, como la fuerza principal para el brotamiento de

los *Arenavirus*. Otras funciones descritas son: efecto inhibitorio de la replicación del ARN viral y transcripción a través de su interacción con proteínas tardías (López et al., 2001; Wildo et al., 2008), capacidad de interactuar en el reclutamiento de la nucleoproteína viral (Neuman et al., 2005), así como la inhibición de la traducción a través de interacciones con factores celulares (Borden et al., 1998).

Strecker et al., (2003) demostraron el rol que cumple la proteína Z del virus Lassa en el ensamble y liberación de VLPs y que sólo ésta es capaz de unirse fuertemente a la membrana como proteína de matriz. También fue demostrado que la expresión de la proteína Z recombinante en ausencia de otras proteínas virales es suficiente para liberar las partículas virales con envoltura lipídica.

Las proteínas de matriz viral juegan roles críticos en las últimas etapas de replicación de virus ARN, y cuando se expresan en células por sí solas, liberan VLPs (Parent et al., 1995; Wills et al., 1994). Sin embargo, para la producción de VLPs infecciosas es necesario además de la presencia de la proteína Z, la GP. Se ha reportado que la inserción de epítopes en la secuencia pZ con una longitud de 20-30 aa sigue permitiendo la formación de las VLPs sin interferir con la actividad de brotamiento (Chackeiran, 2007).

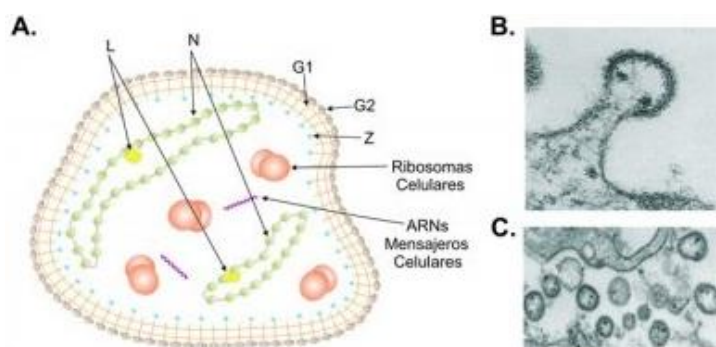


Figura 12. Proteína Z del Virus Junín: **A)** Representación del virus se observa el ARN bisegmentado (L, long y S, small). G1 y G2 indican glicoproteínas asociadas a la matriz, L (RpRd), N (nucleocápside) y Z indica la proteína asociada a la bicapa lipídica, fuerza principal de brotamiento de los Arenavirus. **B y C)** Brotamiento.

Las propiedades biológicas descritas, permitieron suponer que este sistema podría ser utilizado como un excelente candidato para expresar proteínas heterólogas de forma eficiente. Así, en Goñi et al., (2010) se optimizaron sistemas de expresión y purificación de la proteína Z del virus Junin, probándose en ratones con el fin de analizar la generación de anticuerpos. En este trabajo se sentaron las bases para el posterior desarrollo de metodologías que utilizaran proteínas recombinantes conteniendo pZ, capaz de inducir por sí misma el brotamiento y así generar partículas envueltas que carguen en su superficie con el antígeno específico del virus de interés (Borio et al., 2012). Mareze et al., (2015) utiliza esta tecnología para evaluar dos vacunas candidatas contra la infección generada por el virus del Dengue (DENV), mediante la fusión de la secuencia de la proteína Z y se secuencias codificantes de péptidos de la proteína de envoltura conservada en todos los serotipos de DENV.

3-Hipótesis de trabajo

Este trabajo pretende utilizar diferentes estrategias para la producción del VLPs de HEV-3, basadas en la capacidad que presenta la proteína 239 de autoensamblarse en células procariotas y en las características biológicas de la proteína Z del virus Junín para expresar dominios antigénicos de ORF2 de HEV en células eucariotas. Las VLPs al mimetizar las características estructurales del virus en ausencia del ácido nucleico, son mucho más seguras que otras vacunas como las atenuadas o inactivadas.

Partiendo de esta base, hipotetizamos que es posible desarrollar sistemas de expresión de antígenos como los descritos para ser potencialmente utilizados en estrategias de inmunoprevención o diagnóstico.

4-Objetivos

4.1-Objetivo general

Generar dos antígenos derivados de ORF2 de HEV-3 y evaluar el potencial inmunogénico *in vitro* e *in vivo* para el posible desarrollo de estrategias inmunoprotectoras y sistemas de diagnóstico serológico de infecciones causadas por HEV, adaptadas al contexto epidemiológico de la región.

4.2-Objetivos específicos

1. Amplificar mediante PCR y clonar en vectores de expresión procariota, la secuencia codificante del antígeno 239 correspondiente al ORF2 de HEV-3.
2. Expresar la proteína 239 con capacidad de autoensamblaje, en medios de cultivo *E.coli*, para generar VLPs.
3. Estandarizar métodos de purificación de las VLPs generadas mediante diferentes sistemas celulares, y evaluarlos mediante técnicas inmunoenzimáticas.
4. Evaluar la respuesta inmune generada con las VLPs obtenidas a partir de la expresión de los antígenos de pZ-E2s, pZ- ORF2 y 239 en diferentes cultivos celulares, en un modelo *in vivo* animal.
5. Estudiar en forma preliminar la sensibilidad y especificidad de los antígenos de ORF2 en un sistema de detección de respuesta inmune anti-HEV con un kit comercial (ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species-IDVet).

5-Materiales y métodos

5.1-Estrategia general de trabajo

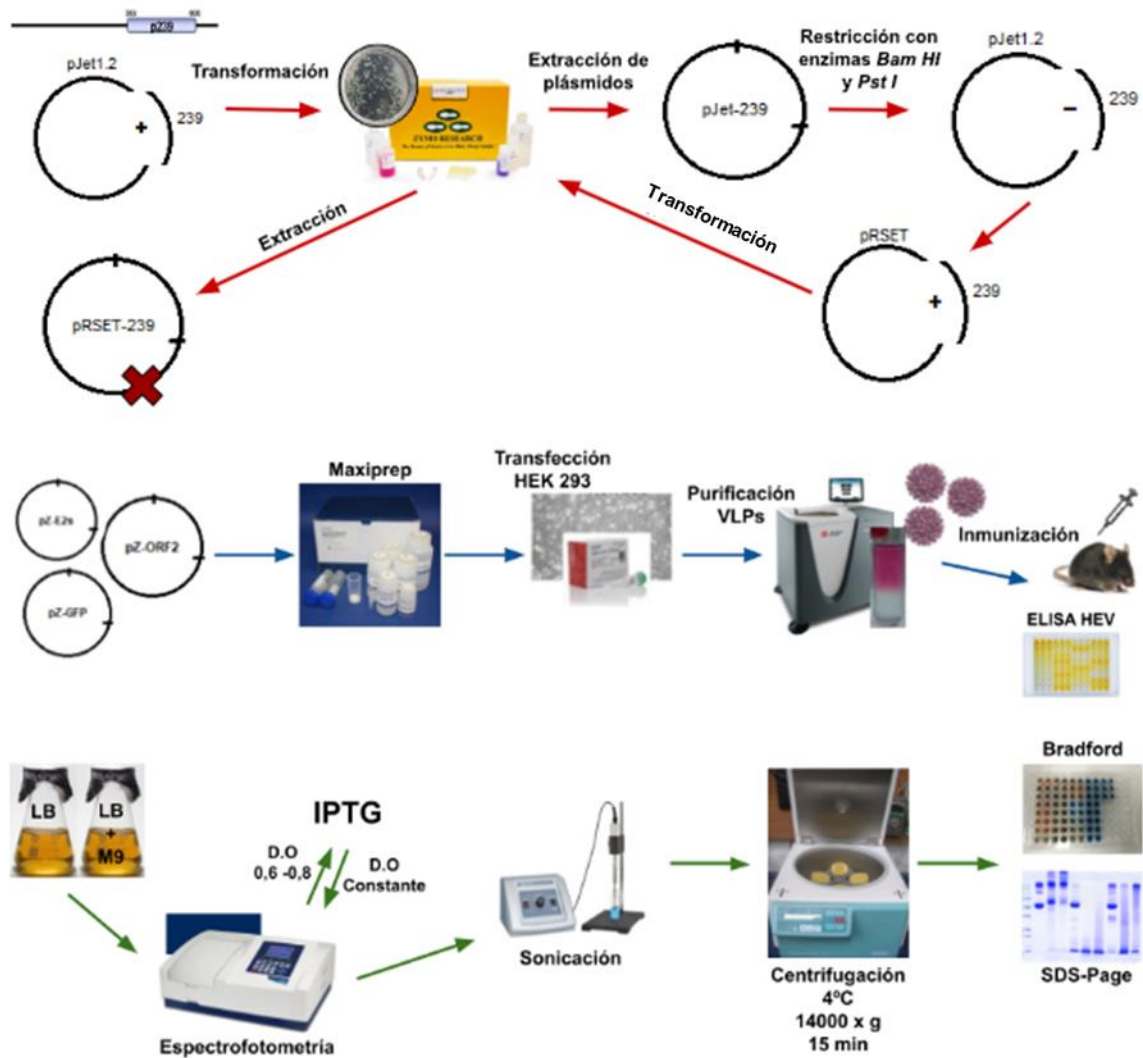


Figura 13. Estrategia general de trabajo. En una primera etapa se amplificó la secuencia 239 de ORF2 de HEV-3 mediante PCR, utilizando *primers* construidos y modificados para contener los sitios de restricción de las enzimas correspondientes. Se purificó la secuencia y se insertó en el vector de clonado pJET1.2/blunt, con las cuales se transformaron bacterias *E.coli* Dh5 α mediante *shock* térmico. Se extrajo el plásmido pJet-239 de interés y se escindió la secuencia 239 utilizando las enzimas *Pst I* y *Bam HI*. El producto purificado se insertó en el vector de expresión pRSET y se repitió el procedimiento descrito previamente. En una segunda etapa, se realizó Maxiprep con el fin de obtener los plásmidos pZ-E2s, pZ-ORF2 y pZ-EGFP en altas concentraciones para transfectar células Hek 293 y producir VLPs, las cuales se purificaron mediante ultracentrifugación a 96000 rpm en colchón de sacarosa. Estos antígenos fueron utilizados para inmunizar ratones C57BL/6 y luego evaluar el potencial inmunogénico mediante ELISA cualitativo en Kit comercial anti-HEV-3. Por último, en una tercera etapa de trabajo, se evaluaron diferentes condiciones de medio de cultivo e IPTG para expresar proteínas ORF2 en bacterias *E.coli* Dh5 α , las cuales fueron cuantificadas utilizando Bradford y visualizadas mediante SDS-PAGE 4-15%.

Primera etapa

5.2-Diseño de *primers* para la amplificación de 239

Con el objetivo de amplificar la secuencia correspondiente al antígeno 239 de 700 pb incluida en el segmento ORF2 de HEV se diseñaron *primers* específicos que fueron posteriormente modificados para contener los sitios de restricción de las correspondientes enzimas como se indica en la Tabla 2. Para amplificar esta secuencia se emplearon diferentes plásmidos conteniendo ORF2 disponibles en el laboratorio, según se detalla en la Tabla 3.

Tabla 2. *Primers* contruidos con los sitios de restricción correspondientes a las enzimas según se indica en cada caso.

Polaridad	Primer	Secuencia	Tm
(-)	R1-Bam HI	CGG GCA CCC TAA TTT AAA GGA TCC TTA AGC AAT G	64°C
(-)	R2-Bam HI	CGG GCA GGG TAA TCC AAA GGA TCC TCA AGC AAT GCT AGC	71°C
(-)	R3-Bam HI	GTA TCC TCC AAT GGA ATC TCC GCA GAG TGG GG	61°C
(-)	R4-Bam HI	GGT AAT CCA AAG TAT CAT CCT CAA GGG ATC CTA G	62°C
(+)	F1-Pst I	GGT GTT GGT GAG ATC GGC CTG CAG ATA	62°C
(+)	F2-Pst I	GGT GTT GGT GAG ATC GGC CTG CAG ATA	62°C
(+)	F3-Nco I	GGT GTT GGT GAG ATC GGC CAT GGG ATA	66°C
(-)	R239 Externo	GCA GAA ATC ATC AAA AGT ATG GGC ACG AGC	67,6°C
(-)	R239-Bam HI	CAG TAT CCT CGA GAA CAG CAA GGA TCC AAT	66,8°C
(+)	F239 Externo	GAT TTG CAT TTT TAC TGG TAC GAA CGG C	67,2°C
(+)	F239-Pst I	GGT CTG CAG ATT GCC CTG ACT CTG TTT AAT	67,9°C

Para amplificar el fragmento correspondiente a 239, se efectuaron diferentes diseños de PCRs tal como se detalla a continuación.

5.2.1-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En todos los casos se colocó 5 μ L de Buffer Taq 10X, 1,5 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 1 μ L de dNTPs 10 mM, 3 μ L de ADN plasmídico, 0,4 μ L de Taq TM ADN Polimerasa (Fermentas, Life Sciences, Estados Unidos), 1 μ L de primer *forward* y *reverse* (50 mM) y H₂O estéril para completar 50 μ L de volumen final.

Los ciclados se implementaron con T_m variable según el juego de *primers* que se utilizó y se detallan en la Tabla 3.

5.2.2-Nested PCR

Como estrategia alternativa para amplificar el fragmento 239 se implementó una Nested PCR para la cual se utilizaron 5 μ L de Buffer Taq 10X, 4 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 1 μ L de dNTPs 10 mM, 3 μ L de ADN plasmídico, 0,4 μ L de Taq TM ADN Polimerasa (Fermentas, Life Sciences, Estados Unidos), 1 μ L de *primer forward* y *reverse* externos e internos (50 mM) y cantidad de H₂O estéril necesaria para completar 50 μ L. Los ciclados y *primers* para cada etapa se detallan en la Tabla 3.

Para visualizar la correcta amplificación, se realizó electroforesis en gel de agarosa 1% y se purificó la muestra mediante *Nucleospin® Gel and PCR clean up* (Macherey-Nagel, Alemania), según las indicaciones del fabricante. El tamaño de banda se comparó con marcadores de peso molecular de 100 pb o de 1 Kb (*DNA Ladder, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos).

Tabla 3. Condiciones de las diferentes PCRs realizadas (juegos de *primers*, ciclados y muestras utilizadas en cada caso).

Primers	Ciclado	Ciclos	Muestras
(+) F1-Pst I (-) R1-Bam HI	98°C, 5'(95°C, 45''; 58°C , 45''; 72°C, 45'')72°C,10'	35	pSGI-ORF2, pRSET-ORF2 pZ-ORF2
(+) F1-Pst I (-) R2-Bam HI	98°C, 5'(95°C, 45''; 58°C , 45''; 72°C, 45'')72°C,10'	35	pSGI-ORF2, pRSET-ORF2 pJet-ORF2, pZ-ORF2
(+) F3-Nco I (-) R4-Bam HI	98°C, 5'(95°C, 45''; 58°C , 45''; 72°C, 45'')72°C,10'	35	pSGI-ORF2, pRSET-ORF2
(+) F1-Pst I (-) R4-Bam HI	98°C, 5'(95°C, 45''; 58°C , 45''; 72°C, 45'')72°C,10'	35	pRSET-239
(+) F2-Pst I (-) R2-Bam HI	98°C, 5'(95°C, 45''; 61°C , 45''; 72°C, 45'')72°C,10'	35	pZ-ORF2, pRSET-ORF2
(+) F239 Ext (-) R239 Ext (+) F239 Int (-) R239 Int	98°C, 5'(95°C, 45''; 68°C , 45''; 72°C, 45'')72°C,10'	35	pRSET-ORF2
(+) F239 Ext (-) R239 Ext (+) F239 Int (-) R239 Int	98°C, 5'(95°C, 45''; 67°C , 45''; 72°C, 45'')72°C,10'	35	pRSET-ORF2

*Las diferentes **Tm** se indican en negrita

5.3-Construcción del plásmido pRSET-239

5.3.1-Clonado de 239 en el vector pJet1.2/blunt

Para la construcción del primer plásmido, el fragmento correspondiente a 239 amplificado y purificado fue clonado en el vector pJet1.2/blunt (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos) de 2,97 Kb (Fig.14).

Se realizaron diferentes mezclas para las ligaciones en volúmenes finales de 10 μ L y 20 μ L, en las siguientes condiciones:

En un primer paso se agregó 1 μ L de enzima *blunting* (*Fermentas Thermo Scientific*, Estados Unidos), 10 μ L de *Buffer 2X*, producto purificado 239 en una relación de 3:1 con respecto al vector y cantidad de H₂O estéril necesaria para completar el volumen final. Se dejó 5 min a 70°C y posteriormente, se agregó 1 μ L de enzima ligasa T4 (*Fermentas Thermo Scientific*, Estados Unidos) y 1 μ L del vector pJet1.2 (50 μ g/mL). En todos los casos las mezclas se dejaron 1 hora a 22°C.

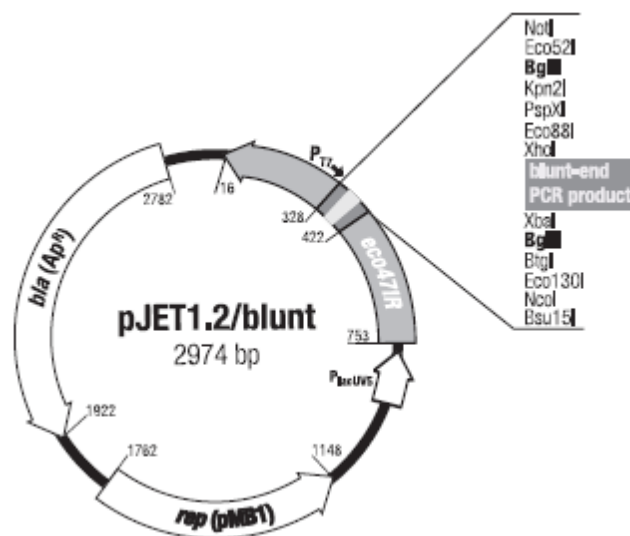


Figura 14. Mapa del vector pJET1.2/blunt en el cual se inserta el segmento de extremos romos 239 con 700 pb aproximadamente. Extraída del manual de usuario CloneJET PCR Cloning Kit, *Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos.

5.3.2-Transformación de bacterias competentes *E. coli* Dh5 α con el plásmido pJet-239

Una vez obtenido el plásmido se procedió a transformar bacterias competentes *E. coli* Dh5 α (*New England Biolabs*, Estados Unidos) mediante tratamiento de *shock* térmico según el siguiente protocolo: se mezclaron 3 μ L de producto de ligación con 25 μ L de bacterias en un tubo *ependorf* de 1,5 mL y se lo colocó en hielo durante 30 min. Posteriormente se lo expuso a una temperatura de 42°C durante 45 s y nuevamente en hielo por 5 min. Se adicionaron 250 μ L de medio de cultivo Luria Bertani (LB) y se dejó 1 hr a 37°C y 220 rpm.

Finalmente, las bacterias fueron sembradas en placas de Petri, en medio LB-agar con ampicilina (100 μ g/mL) con el objetivo de obtener colonias resistentes que hayan incorporado el plásmido. Se dejaron 24 horas en estufa a 37°C y se seleccionaron las colonias positivas según su morfología. A éstas, se las dejó crecer en 3 mL de medio LB líquido con ampicilina a 37°C, 220 rpm durante 18-20 horas. Luego de ese período se extrajeron los plásmidos empleando los kits de extracción Zyppy™ Plasma *Miniprep Kit* (*Zymo Research*, Estados Unidos) o *Kit Miniprep* QIAGEN® (*Qiagen*, Estados Unidos) de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes.

5.3.3-Escisión del fragmento 239 del plásmido pJet1.2 utilizando las enzimas *Bam* HI y *Pst* I

Una vez extraído el primer plásmido pJet-239, se realizó la escisión del fragmento de interés. Se utilizaron enzimas de restricción, con el fin de generar extremos cohesivos en el fragmento, que nos permitieron su inserción en un vector de expresión en células

procariotas, pRSET. Las diferentes digestiones se realizaron en volúmenes de 10 μ L y 20 μ L, tal como se detalla a continuación:

Se colocó 2 μ L de Buffer *Bam HI* 2X, 1 μ L de enzima *Bam HI* y 2 μ L de enzima *Pst I* (Fermentas, Thermo Scientific, Estados Unidos), ADN plasmídico pJet-239 y cantidad necesaria de H₂O estéril para completar el volumen final. Posteriormente se colocó la mezcla a 37°C durante 2 hrs y finalmente 15 min a 75°C u 80°C con el fin de inactivar las enzimas.

En todos los casos, la correcta escisión del fragmento se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y se purificó la muestra mediante *Nucleospin® Gel and PCR clean up* (Macherey-Nagel, Alemania), según las indicaciones del fabricante.

5.3.4-Construcción del plásmido de expresión pRSET-239

Para la construcción del segundo plásmido, el producto 239 purificado se insertó en el vector de expresión pRSET de 2,9 Kb (Fig.15). Éste último se obtuvo a partir de la digestión, en forma paralela, del plásmido pRSET-ORF2 previamente construido, utilizando las mismas enzimas para así generar extremos cohesivos.

La ligación del fragmento 239 al vector pRSET se realizó en volúmenes de 10 μ L y 20 μ L tal como se detalla a continuación:

Se agregó 2 μ L de Buffer 10X, 1 μ L de ligasa T4 (*Fermentas*, Thermo Scientific, Estados Unidos), los productos de purificación 239 en una relación 3:1 con respecto al plásmido pRSET y cantidad de H₂O estéril necesaria para completar un volumen final de 10 μ L. Una vez finalizada la mezcla, se la dejó 1 hr a 22°C.

Posteriormente se procedió con la transformación de bacterias *E.coli* Dh5α (*New England Biolabs*, Estados Unidos) tal como se detalló anteriormente.

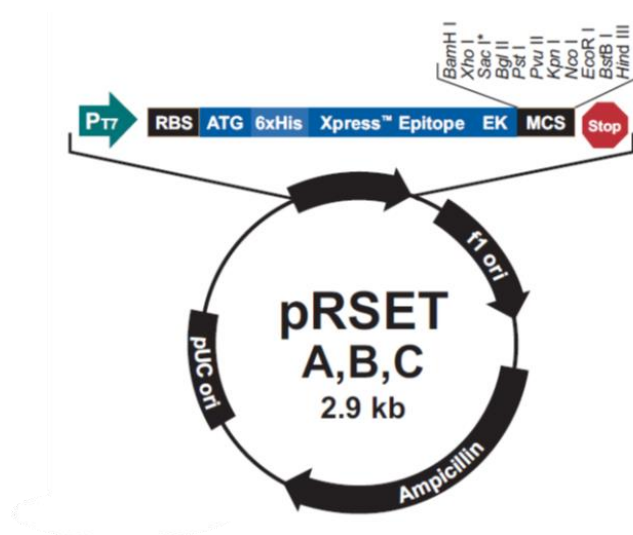


Figura 15. Mapa del vector pRSET. En este vector se inserta el fragmento 239 de 700 pb con extremos cohesivos, luego de escindirlo de pJET1.2 con las enzimas de restricción *Bam HI* y *Pst I*. Extraído del manual de usuario *Invitrogen*, Estados Unidos.

Segunda etapa

5.4–Purificación de VLPs de HEV

5.4.1–Producción de los plásmidos pZ–E2s, pZ–ORF2 y pZ–EGFP

Los plásmidos pZ–N3 y pZ–EGFP el cual contiene una proteína reportera (*Green Fluorescent Protein, GFP*) fueron cedidos por la Dra. Cristina Borio de la Universidad Nacional de Quilmes (Fig. 16). El plásmido pZ–N3 fue previamente utilizado en nuestro laboratorio para la construcción de pZ–ORF2 y pZ–E2s ambos de interés por su potencial inmunogénico, mientras que pZ–EGFP fue utilizado como control del proceso de

construcción de VLPs. Para la extracción del ADN plasmídico puro y en alta concentración, necesario para transfectar células e inmunizar animales se utilizó *el kit Nucleobond® Xtra Maxi Plus (Macherey-Nagel, Alemania)*.

Con este fin, se crecieron las bacterias transformadas con los plásmidos correspondientes (pZ-E2s, pZ-ORF2 y pZ-GFP) en preinóculos de 3 mL de LB líquido con antibiótico kanamicina (50 µg/mL) durante 8 horas a 37°C y 300 rpm, que posteriormente se diluyeron en 300 mL del mismo medio en una relación 1/1000 y se las dejó crecer entre 12-16 hs a 300 rpm y 37°C hasta alcanzar un DO₆₀₀ final de 4. Para realizar este procedimiento se utilizó el *Kit Nucleobond® Xtra Maxi Plus (Macherey-Nagel, Alemania)* según las indicaciones del fabricante.

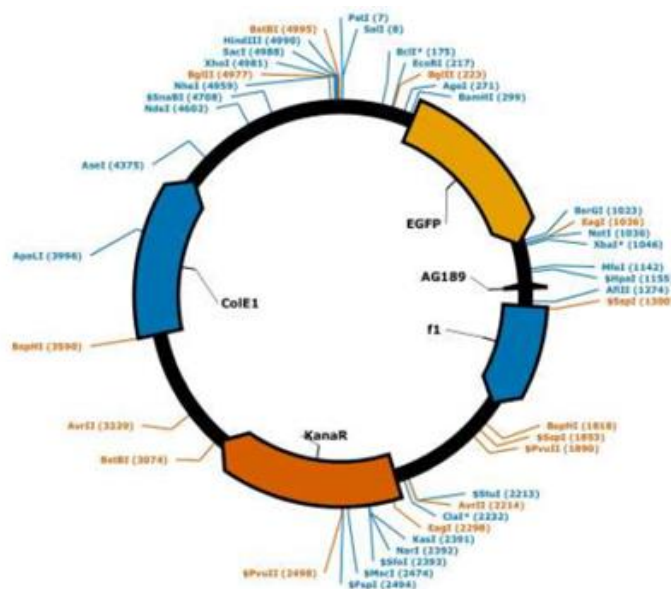


Figura 16. Mapa del plásmido que codifica la proteína Z del virus Junín en marco de lectura con la proteína verde fluorescente (GFP, *Green protein fluorescent*). El segmento GFP fue escindido con *Bam HI* y *Not I* para poder clonar ORF2 y luego éste fue escindido con el fin de clonar la secuencia correspondiente a E2s. Extraído de Mirazo, 2014a.

5.4.2-Transfección en células HEK 293 con pZ-ORF2, pZ-E2s y pZ-EGFP

5.4.2a-Cultivo de células HEK 293

Para realizar la transfección celular con los plásmidos pZ-ORF2, pZ-E2s y pZ-EGFP previamente contruidos, se propagaron células HEK 293 en medio de *Dulbecco-Eagle* (DMEM), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 100 µg/mL de antibiótico estreptomina a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂.

5.4.2b-Transfección de células HEK 293 con los plásmidos pZ-ORF2, pZ-E2s, pZ-EGFP

Para proceder con la transfección, el día previo a la misma, se sembraron células HEK 293 en placas de Petri estándar (*Greiner*, España).

La transfección de los plásmidos fue realizada utilizando el reactivo *Lipoafectamine® LTX with Plus™* (*Invitrogen Life Technologies*, Estados Unidos), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En cada caso fueron transfectados 18 µg de ADN, utilizando una relación 1:2 con el reactivo transfectante. A las 48 horas post-transfección el sobrenadante conteniendo las VLPs de las células transfectadas pZ-ORF2, pZ-E2s y pZ-EGFP fueron colectados.

5.4.3-Purificación de las VLPs

A partir del sobrenadante de las células transfectadas se realizó una primera centrifugación a 4000 rpm a 4°C durante 20 min con el fin de sedimentar los restos celulares. Posteriormente a la clarificación, las VLPs presentes en el sobrenadante fueron sedimentadas en un colchón de sacarosa 30% w/v (previamente filtrada) a 96000

rpm durante 2 horas a 4°C. Los *pellets* fueron resuspendidos en PBS 1% y almacenados a 4°C.

5.4.4-Evaluación de la expresión de las VLPs utilizando *dot blot*

Con el fin de evaluar la expresión de las VLPs producidas con los plásmidos pZ-ORF2, pZ-E2s y pZ-EGFP se realizó el inmunoensayo *dot blot*, para el cual se sembraron 5 µL de las muestras y el control en una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Estados Unidos). Se bloqueó con PBS-BSA 0,5% durante 30 minutos y se incubó el anticuerpo primario anti-ORF2 HEV (abcam, Estados Unidos) que reconoce epítopes conformacionales, en una dilución 1:500 durante 2 hr a temperatura ambiente. Luego de los lavados con PBS-BSA 0,5%, el anticuerpo secundario empleado fue un anti-IgG de ratón conjugado con una fosfatasa alcalina (abcam, Estados Unidos) en una dilución 1:2000 durante 45 min. Se repitieron los lavados y se procedió con el revelado, para el cual se utilizó una solución 1:9 (v/v) de nitro-bluetetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate (NBT/BCIP) (*Invitrogen, Life technologies*, Estados Unidos) durante 10 min.

Paralelamente se llevó a cabo otro *dot blot* con un anticuerpo primario anti-pZ en una dilución 1:1000 y anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a una fosfatasa alcalina en la misma dilución, ambos fueron incubados durante 1 hr.

5.4.5-Cuantificación de las VLPs

La cuantificación de las VLPs purificadas se realizó mediante el equipo *Qubit 4 Fluorometer* (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos) según se describe en el manual

operativo y se midió la absorbancia a 595 nm utilizando el lector *Varioskan™ LUX multimode microplate reader* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

5.5–Inmunización de ratones C57BL/6 con los antígenos producidos pZ–ORF2, pZ–E2s y pZ–EGFP

Este procedimiento fue realizado en conjunto con el personal de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) en el Instituto Pasteur de Montevideo, siguiendo el protocolo de Mareze et al., (2015) en el cual se utilizan ratones macho C57BL/6 de 8 semanas (4 ratones por grupo) inmunizados siguiendo el protocolo *prime-boost* heterólogo que se observa en la Tabla 4.

En la primera dosis los ratones fueron inmunizados a través de la vía intramuscular (bíceps femoral o abductor) con aguja BD® Ultra-fine 100 U conteniendo 50 µg de ADN plasmídico (25 µg por músculo izquierda, derecha) en gel adyuvante hidróxido de aluminio 2% (HCl Biosector, Dinamarca). Dos semanas después del *priming* se realizó el primer sangrado.

Tabla 4. *Prime-boost* heterólogo: Antígenos y adyuvantes utilizados en cada grupo experimental.

Grupos	Priming (ADN plasmídico)	Booster 1 (VLPs)	Booster 2 (VLPs)
pZ-E2s	pZ-E2s (50 µg) + Alumina + PBS Vf = 100 µL por ratón	pZ-E2s (20 µg) + IFA + PBS Vf = 100 µL por ratón	pZ-E2s (20 µg) + IFA Vf = 100 µL por ratón
pZ-ORF2	pZ-ORF2 (50 µg) + Alumina + PBS Vf = 100 µL por ratón	pZ-ORF2 (20 µg) + IFA + PBS Vf = 100 µL por ratón	pZ-ORF2 (20 µg) + IFA Vf = 100 µL por ratón
pZ-GFP	pZ-GFP (50 µg) + Alumina + PBS Vf = 100 µL por ratón	pZ-GFP (20 µg) + IFA + PBS Vf = 100 µL por ratón	pZ-GFP (20 µg) + IFA + PBS Vf = 100 µL por ratón

A la sexta semana del *priming* se realizó el primer *booster* conteniendo 20 µg de las VLPs producidas previamente en Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) (Gibco BRL Life Technologies, Estados Unidos) de forma subcutánea. Se realizó un segundo *booster* 4 semanas después de realizado el primero, tal como se detalla en la (Fig. 17). Dos semanas después, se realizó el sangrado final seguido de eutanasia priorizando el bienestar animal.

En ambas ocasiones las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min y guardadas a -20°C.

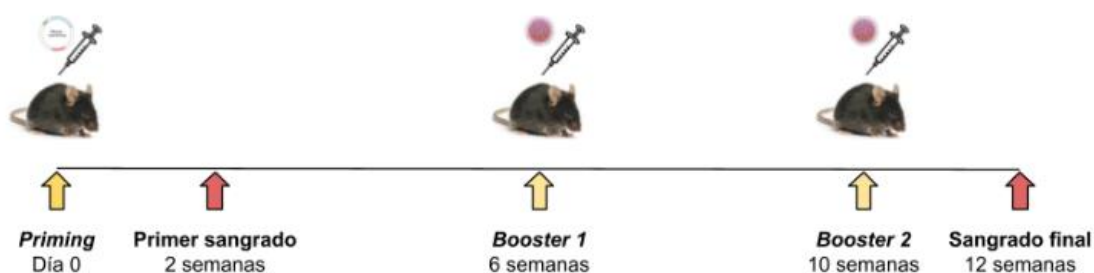


Figura 17. Protocolo de inmunización *prime-boost* heterólogo en ratones C57BL/6 (Mareze et al., 2015): Se realiza el *priming* el día 0, usando 50 µg de ADN plasmídico (pZ-E2s, pZ-ORF2 y pZ-EGFP) con adyuvante de hidróxido de aluminio. A las 2 semanas se realiza el primer sangrado y se conservan los sueros a -20°C. 6 semanas después del *priming* se realiza el primer *booster* empleando como antígeno las VLPs (20 µg) purificadas en IFA. A la semana 10 se realiza un segundo *booster* y se finaliza el ensayo a la semana 12 con un último sangrado, seguido de eutanasia humanitaria.

5.6-Evaluación de la generación de anticuerpos mediante técnicas inmunoenzimáticas

Para la evaluación de los anticuerpos generados en los ratones C57BL/6, a partir de las inmunizaciones realizadas con los antígenos pZ-ORF2, pZ-E2s y el control pZ-EGFP se utilizaron los sueros obtenidos a las dos semanas del *priming* (ADN plasmídico + Alúmina) y el sangrado final, posterior al segundo *booster* (VLPs + IFA). Se utilizó un ELISA indirecto comercial (*ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species*, IDVet,

Francia), para la detección de anticuerpos anti-Hepatitis E, HEV-3 en suero y plasma de cerdos y otras especies, tal como indica el fabricante.

Tercera etapa

5.7-Expresión de proteínas ORF2 en *E. coli* y posterior extracción utilizando la técnica de sonicación

Para la expresión de proteínas ORF2 se partió de cultivos de bacterias *E.coli* transformadas con pRSET-ORF2 y mantenidas a -80°C. Éstas se crecieron en 3 mL de medio de cultivo LB con ampicilina (100 µg/mL) a 37°C, 220 rpm *overnight*. Posteriormente se inoculó 50 µL del precultivo en diferentes matraces conteniendo 50 mL del mismo medio previamente autoclavados, a los cuales se les agregó el antibiótico y en algunos casos el medio LB fue enriquecido con sales M9ZB (NZ-amina 1%, NaCl 0,5%, Sales M9 1x, Sulfato de Magnesio 1 mM, Glucosa 0,4%), tal como se detalla en las Tablas 5 y 6.

Los cultivos bacterianos se dejaron con agitación constante a 37°C y 220 rpm, midiéndose la absorbancia cada hora hasta alcanzar un D.O₆₀₀ de 0,6-0,8 para ser inducido. Se varió la concentración de IPTG (Thermo Scientific, Estados Unidos) utilizada para cada inducción como se detalla en las Tablas 5 y 6. Posterior a la inducción se continuó midiendo la absorbancia hasta llegar a un DO₆₀₀ constante. El cultivo *post*inducción se guardó en tubos *falcon* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) de 50 mL, mientras que una muestra del cultivo previo a la inducción se guardó

en un microtubo de centrifuga de 1,5 mL manteniendo todo a -20°C hasta el momento de la extracción.

Para poder realizar la extracción, las muestras se centrifugan a 4°C, 4000 rpm durante 20 min, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones.

Al *pellet* bacteriano se le agregó *buffer* de lisis (PBS 1X, Tritón 0,1 %, NP40 1%) e inhibidor de proteasas PMSF 1 mM (abcam, Estados Unidos) y de esta forma se procedió a sonicar, según lo detallado en las Tablas 5 y 6. Las muestras se mantuvieron durante una hr a 4°C y se centrifugaron a 14000 rpm, durante 15 min a la misma temperatura.

Tabla 5. Condiciones del primer ensayo de extracción de proteínas ORF2

Ensayo 1	Condiciones	1	2	3	4
Cultivo	Medio LB	45 mL	45 mL	50 mL	50 mL
	Ampicilina	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
	Sales M9ZB	5 mL	5 mL	-	-
	IPTG	1 mM	5 mM	1 mM	5 mM
Extracción	Buffer de lisis	800 µL	500 µL	1000 µL	800 µL
	IP	1,6 µL	1 µL	2 µL	1,6 µL
	Pulsos	3	3	3	3
	Tiempo	5 min	5 min	5 min	5 min
	Amplitud	30%	30%	30%	30%

Buffer de lisis e IP se ajusta según el tamaño de *pellet* bacteriano obtenido después de la centrifugación.

Tabla 6. Condiciones del segundo ensayo de extracción de proteínas ORF2

Ensayo 2	Condiciones	1	2	3	4	5	6
Cultivo	Medio LB	50 mL	45 mL	50 mL	45 mL	50 mL	45 mL
	Ampicilina	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
	Sales M9ZB	-	5 mL	-	5 mL	-	5 mL
	IPTG	1 mM	1 mM	2 mM	2 mM	5 mM	5 mM
Extracción	Buffer de lisis	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	IP	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
	Pulsos	3	3	5	5	5	5
	Tiempo	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s
	Amplitud	30%	30%	30%	30%	30%	30%

5.8- Cuantificación y visualización de las proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE

Para la cuantificación de las proteínas ORF2 producidas se utilizó la técnica de *Bradford*.

Para ello se realizó la curva de calibración con Suero de Albúmina Bovina (BSA) en las siguientes concentraciones: 0,2 mg/mL, 0,25 mg/ml, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL y 1 mg/mL.

A cada muestra (pre y post inducción) se le agregó 0,3 µL de detergente Tritón 0,1%. Posteriormente se colocaron en placas de 96 *wells*, 10 µL de cada una de las muestras por duplicado, en 300 µL del reactivo *Bradford*. Para finalizar se midió la absorbancia a 595 nm utilizando el lector *Varioskan™ LUX multimode microplate reader* (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos).

Para la posterior visualización de las proteínas ORF2 purificadas, se colocaron 15 µL de las muestras a 80°C durante 5 min, posteriormente se agregó 3 µL de *buffer* de carga y 1 µL de DTT (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos).

Las proteínas purificadas fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) Tris-Glicina 4-15% y teñidas con solución de tinción Azul de *Coomassie*. Se utilizaron 5 μ L del marcador de peso molecular *Spectra BR, Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (*Thermo Fisher*, Estados Unidos).

6-Resultados

Primera etapa

6.1- Amplificación de 239 de HEV por PCR

Mediante PCR se logró amplificar el fragmento 239, utilizando los *primers* específicamente diseñados para esta secuencia de 700 pb (Fig. 18).

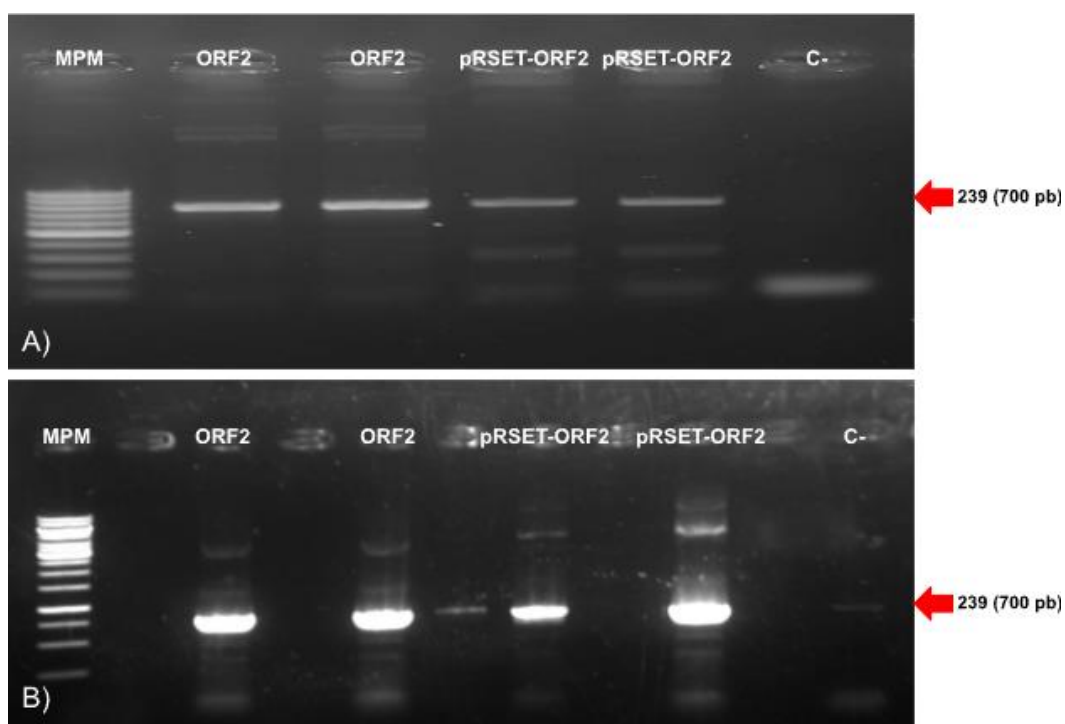


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 1%. En la imagen **A)** se observa el producto 239 de 700 pb amplificado por PCR a partir de la secuencia de ORF2 y el plásmido pRSET-ORF2, utilizando los *primers* F1-Pst I y R1-Bam HI, comparado con el Marcador de Peso Molecular (MPM) de 100 pb *DNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos). En la figura **B)** se observa el producto 239 amplificado utilizando los *primers* F2-Pst I y R2-Bam HI, comparado con el MPM de 1Kb *DNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos).

6.2- Construcción de los plásmidos pJet-239 y pRSET-239

El producto purificado de 239 fue clonado en el vector pJet1.2/blunt (2,97 Kb) en primera instancia y luego en el vector pRSET (2,9 Kb). Para verificar la correcta inserción del

fragmento de interés en los plásmidos (Fig 19), se realizaron las digestiones utilizando las enzimas de restricción correspondientes *Pst I* y *Bam HI* (*Fermentas, Thermo Scientific*, Estados Unidos).

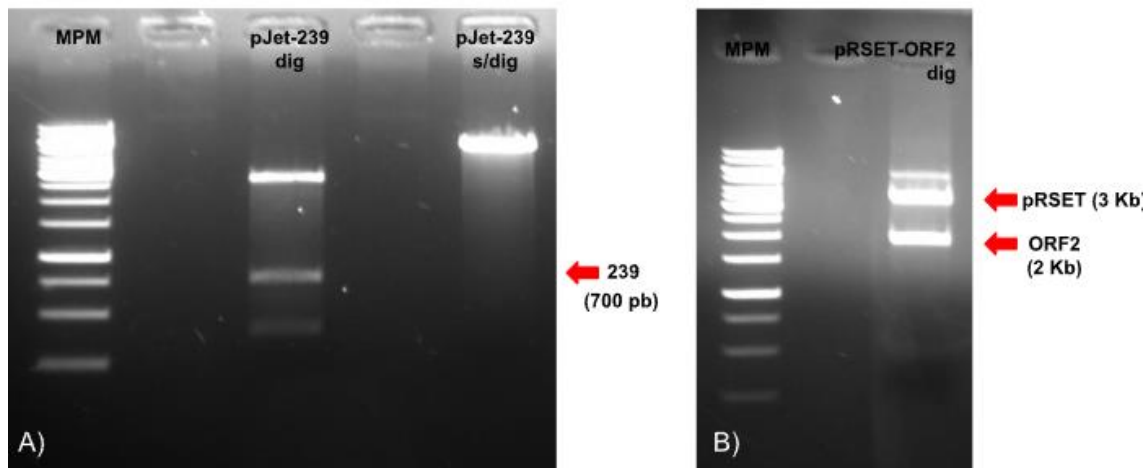


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa 1%. En la imagen **A)** se observan las dos bandas correspondientes a pJet de aproximadamente 3Kb y el fragmento de interés, 239 de 700 pb digerido con las enzimas de restricción *Pst I* y *Bam HI* con intención de generar extremos cohesivos para la posterior ligación al vector pRSET. En la imagen **B)** se observa la banda correspondiente al vector pRSET de aproximadamente 3 Kb escindido del fragmento ORF2 de 2 Kb, utilizando las mismas enzimas. En ambos casos se compara con el MPM de 1 Kb *DNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos).

Segunda etapa

6.3- Purificación de las VLPs y evaluación de la expresión de E2s y ORF2 utilizando GFP como control

6.3.1-*Dot blot*

Con el objetivo de evaluar la correcta expresión de las proteínas luego de la transfección de las células HEK 293 se realizaron ensayos inmunoenzimáticos con los anticuerpos anti-ORF2 en una dilución de 1:500, con el cual no se obtuvieron reacciones visibles y por este motivo no se muestran resultados, y con el anticuerpo anti-pZ, en una dilución

1:1000 a partir del cual se observaron reacciones con pZ-ORF2 y pZ-GFP, pero no con pZ-E2s (Fig. 20).



Figura 20. Dot blot de las VLPs purificadas. Evaluación de la identidad de la proteína con anticuerpo primario anti-pZ 1:1000 y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a una fosfatasa alcalina. Se observa reacción con pZ-ORF2 y pZ-EGFP pero no con pZ-E2s.

6.3.2- Evaluación de la generación de anticuerpos mediante ELISA indirecto comercial

Una vez obtenidas las muestras de suero, éstas fueron analizadas utilizando un Kit ELISA indirecto comercial (*ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species*), para la detección de anticuerpos anti-HEV-3. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 490 nm y se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados obtenidos mediante ELISA. Grupos experimentales: pZ-E2s y pZ-ORF2, grupo control pZ-GFP. Se analiza la presencia de anticuerpos anti-HEV-3 obtenidos en los 2 sangrados realizados, con Abs de 490 nm. En todos los casos se observan resultados negativos.

Ratones	pZ-E2s		pZ-ORF2		pZ-GFP	
	Abs 490 nm	M/C+	Abs 490 nm	M/C+	Abs 490 nm	M/C+
Primer sangrado	0,052	0,177	0,059	0,200	0,035	0,119
	0,055	0,187	0,021	0,071	0,038	0,129
	0,046	0,156	0,028	0,095	0,037	0,126
	0,044	0,150	0,063	0,214	0,054	0,183
Segundo sangrado	0,047	0,160	0,061	0,207	0,048	0,163
	0,104	0,353	0,023	0,078	0,042	0,143
	0,087	0,296	0,048	0,163	0,043	0,146
	0,053	0,180	0,048	0,163	0,092	0,313

M/C+ = Negativo <0,9; Equívoco 0,9-1,1; Positivo >1,1 (C- 0,047, C+ 0,294)

Tercera etapa

6.4- Expresión de proteínas ORF2 en *E. coli* y posterior extracción utilizando la técnica de sonicación

6.4.1- Cuantificación de proteínas utilizando la técnica *Bradford*

Utilizando la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración realizada con BSA (Fig. 21), se calcularon las concentraciones de proteínas ORF2 purificadas (Tabla 8) a partir de la producción en bacterias *E. coli*.

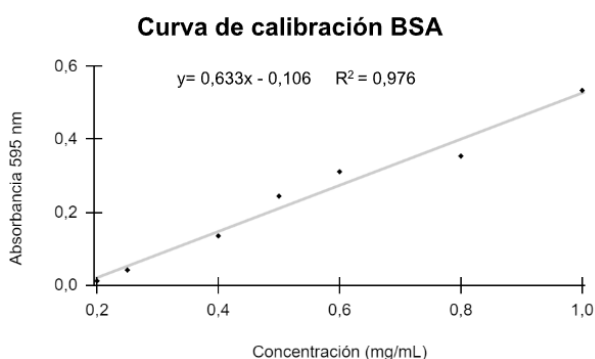


Figura 21. Curva de calibración con BSA a partir de la cual se calculan las concentraciones de proteína purificada. Para la realización de la curva se utilizan 0,2 mg/mL, 0,25 mg/ml, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL y 1 mg/mL. $R^2=0,976$ y la ecuación de la recta es $y=0,633x-0,106$.

Tabla 8. Concentraciones de las proteínas ORF2 obtenidas a partir de la ecuación de la recta.

Condiciones	Abs. 595 nm	Concentración
5 mM c/sales	0,834	1,48 mg/mL
5 mM s/sales	0,692	1,26 mg/mL
2 mM c/sales	0,698	1,27 mg/mL
2 mM s/sales	0,753	1,36 mg/mL
1 mM c/sales	0,534	0,88 mg/mL
1 mM s/sales	0,450	1,00 mg/mL

c/sales (con sales M9ZB), s/sales (sin sales M9ZB)

Las proteínas de ORF2 purificadas fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato-sódico (SDS-PAGE) Tris-Glicina 4-15% y teñidas con solución de tinción Azul de *Coomassie* (Fig.22). Las bandas se compararon con el marcador de peso molecular *Spectra BR, Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos).

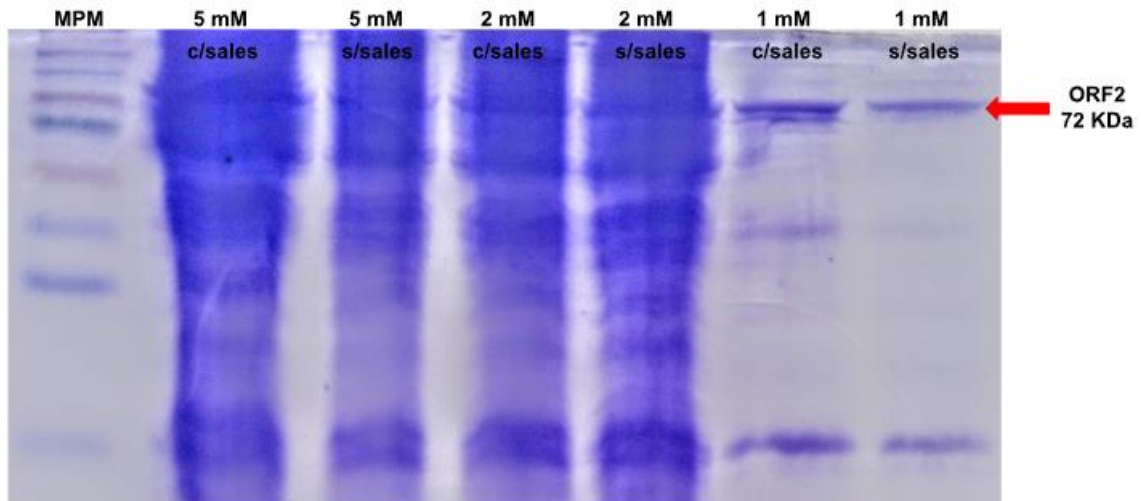


Figura 22. SDS-PAGE 4-15%, visualización de las bandas correspondientes a las proteínas purificadas utilizando distintas concentraciones de sales M9ZB e IPTG. Con la flecha en rojo se indica la banda de interés correspondiente a la proteína ORF2 de aproximadamente 72 KDa. Las bandas se compararon con el marcador de peso molecular *Spectra BR, Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

7-Discusión

El virus de la hepatitis E (HEV) está actualmente catalogado como el mayor causante de la hepatitis viral aguda en el mundo y ha calificado sexto recientemente entre los virus con alto riesgo de expansión, destacando su potencial zoonótico (Grange et al., 2021). En regiones endémicas causa importantes brotes de difícil control y prevención y con elevada morbi-mortalidad, mientras que en regiones desarrolladas la infección crónica en pacientes con inmunosupresión es la principal preocupación (O'keefe et al., 2021).

Al no existir un tratamiento específico disponible para la Hepatitis E, el desarrollo de una vacuna es la estrategia más adecuada para prevenir e intentar controlar esta enfermedad (Cao et al., 2018). Si bien hay algunas vacunas en desarrollo y otra, como *Hecolin™*, aprobada recientemente para su uso de emergencia en ciertos contextos epidemiológicos, aún falta mucho que avanzar para lograr una vacuna efectiva y ampliamente disponible. Una de las limitantes en este sentido, es la ausencia de un sistema de cultivo celular reproducible disponible para replicar HEV *in vitro*, lo cual impide en gran medida el desarrollo de vacunas inactivadas o atenuadas. Por este motivo, la mayoría de las investigaciones se han enfocado en vacunas con tecnologías de ADN-recombinante (Cao et al., 2018).

En este trabajo nos propusimos generar dos antígenos derivados de ORF2 de HEV-3 y evaluar su potencial inmunogénico *in vitro* e *in vivo* para el posible desarrollo de estrategias inmunoprotectoras y sistemas de diagnóstico serológico de infecciones causadas por HEV adaptadas al contexto epidemiológico de la región.

Una de las estrategias consistió en utilizar la propiedad que posee el antígeno 239 de autoensamblarse y generar VLPs T=1 similares a la partícula nativa del HEV (Li et al., 2015) en sistemas de expresión procariotas. Este enfoque metodológico es muy similar al utilizado en el desarrollo de vacunas anti-HEV-1 en China (Li et al., 2005; Li et al., 2015; Zhang et al., 2016).

Esta primera etapa de la investigación implicó el diseño de *primers* específicos de la secuencia 239, los cuales fueron a su vez modificados para contener los sitios de restricción de las enzimas *Pst I* y *Bam HI*. Una vez amplificada esta secuencia, se insertó en el vector de clonado pJet1.2/blunt con extremos romos y se escindió utilizando las enzimas correspondientes para generar los extremos cohesivos que permitieran su posterior ligación al vector pRSET. Sin embargo, a pesar de haber realizado numerosos intentos, con diferentes condiciones en las mezclas de ligación y transformaciones, no logramos obtener el plásmido pRSET-239. En cada caso se obtuvieron colonias con plásmido sin inserto o directamente no se obtuvieron colonias transformantes. Es probable que las bacterias utilizadas para clonar el plásmido pRSET con el inserto no hayan sido las adecuadas para el procedimiento. Según las instrucciones del fabricante del vector, las bacterias competentes para el clonado, transformación y mantenimiento son las que se incluyen en el kit TOP10F' y éstas podrían ser sustituidas por bacterias *E.coli* BL21. Sin embargo, en este trabajo se utilizaron bacterias *E.coli* Dh5 α , las cuales se recomiendan para el mantenimiento de los plásmidos, no así para clonado ni expresión (pRSET A, B y C *User manual, Invitrogen Technologies*), siendo posible que estas bacterias hayan condicionado la continuidad de esta etapa experimental. Por otra parte, el vector pRSET utilizado, no provino de un kit comercial, sino que se escindió y purificó a partir de plásmidos construidos en trabajos anteriores (Jameel, 1995; Mirazo,

2014) lo que pudo haber comprometido su eficiencia dado que desconocemos el estado en que pueden estar dichas bacterias después de varios años almacenadas a -80°C (Sarnaik et al., 2021). Además, tampoco conocemos la estabilidad de los plásmidos luego de repetidas transformaciones, deleciones e inserciones (Silva et al., 2012).

Como alternativas se diseñaron *primers* para amplificar la secuencia con sitios de corte para las enzimas de restricción *Bam HI* y *Nco I*, o para realizar *Nested* PCR. Aunque se logró amplificar la secuencia mediante PCR convencional, no se logró el objetivo de generar el plásmido pRSET-239 que permitiría la expresión de la proteína en un sistema procariota para su posterior análisis como estrategia de inmunoprotección *in vivo*.

La segunda estrategia realizada con el objetivo de producir antígenos de HEV, utilizó las ventajas de las VLPs sumadas a las características biológicas de la proteína Z del virus Junín. Para llevarlo a cabo, se purificaron diferentes plásmidos con secuencias codificantes de antígenos de HEV-3: pZ-E2s, pZ-ORF2 elaborados previamente en el laboratorio por Ottonelli, (2016) y Mirazo, (2014a), respectivamente y pZ-GFP donado por la Dra. Cristina Borio de la Universidad de Quilmes, Argentina, que se empleó como control.

Estos plásmidos fueron producidos en altas concentraciones con el fin de utilizarlos en las transfecciones de células eucariotas HEK 293 para producir las VLPs de interés, y en el protocolo *prime-boost* heterólogo de inmunización utilizado durante esta investigación a partir del trabajo de Mareze et al., (2015). Los protocolos *prime-boost* heterólogos son estrategias de inmunización que promueven mayores y mejores respuestas inmunitarias específicas a antígenos comparadas con las estrategias de inmunización homólogas (Walczak, et al., 2010; Cayabyab, et al., 2011, Kardani, et al.,

2015). Sin embargo, no hay antecedentes con este sistema en el que se haya utilizado un *priming* con ADN plasmídico y un *booster* con VLPs.

En este trabajo se debieron realizar algunas variaciones al protocolo *prime-boost* heterólogo desarrollado por Mareze et al., (2015). En primer lugar, el adyuvante utilizado en el *priming* fue hidróxido de aluminio, en vez de adyuvante monofosforil lipídico A (MPLA) por no contar con disponibilidad. El hidróxido de aluminio, genera “*depot effect*” lo que confiere una mayor duración entre las interacciones de las células y el antígeno, promoviendo respuestas inmunitarias más prolongadas, también favorece el mantenimiento de las características físicas y químicas de los antígenos empleados. Durante la respuesta inmunitaria innata, es capaz de reclutar hematocitos y promover la diferenciación en células dendríticas (CD) que pueden migrar eficientemente a los nódulos linfáticos induciendo la proliferación de linfocitos T. A su vez, también acelera las reacciones inflamatorias locales independientemente de los *Toll-like-receptors* (TLRs) (He P, et al., 2015). A pesar de que el adyuvante fue sustituido en el protocolo, se mantuvieron las cantidades utilizadas, lo que podría haber resultado en una dosis baja de hidróxido de aluminio, insuficiente para absorber todo el antígeno que luego se inocula en el individuo. O por el contrario, una dosis con alto contenido de adyuvante que suprima la respuesta inmunitaria por no liberar el antígeno.

Para disminuir el tiempo de almacenamiento y evitar contaminantes, la expresión de las VLPs se llevó a cabo previo al primer *booster*, debiéndose realizar los controles inmunoenzimáticos de forma simultánea. El *dot blot* realizado para evaluar la expresión de los antígenos, mostró reacciones con pZ-ORF2 y pZ-GFP, no así con pZ-E2s, lo que hace difícil determinar la presencia o ausencia de antígeno al desconocer el límite de detección de la reacción. En consecuencia, se decidió realizar una segunda variante al

protocolo de Mareze et al., (2015), optando por realizar un segundo *booster* en las mismas condiciones que el primero, y así asegurarnos de la presencia de antígeno durante el ensayo. Con las muestras de suero obtenidas de ambos sangrados (en las semanas 2 y 12 *post priming*), se realizó un ELISA indirecto comercial para evaluar la generación de anticuerpos anti-HEV-3, con el cual se obtuvieron resultados negativos en los dos grupos experimentales además del control.

A partir de los resultados obtenidos con el ELISA, mediante el cual no se obtuvieron reacciones positivas que evidenciaran la presencia de anticuerpos anti-HEV-3 en las muestras analizadas; se sugieren tres alternativas: 1) que las VLPs no se expresaran y/o purificaran según lo esperado, 2) que las VLPs sí se expresaran y purificaran, pero no se lograra la respuesta esperada debido al incorrecto plegamiento de la proteína, dado que la función de los anticuerpos es conformación dependiente (Tang et al., 2011); o que el antígeno quedara cubierto por la envoltura celular que rodea las VLPs al brotar (Borio et al., 2012), 3) que el *prime-boost* heterólogo no activara respuestas inmunitarias específicas sobre el antígeno de HEV-3, en los animales inoculados.

Son escasos los trabajos realizados anteriormente, que emplearan la proteína Z del virus Junín para generar proteínas recombinantes y utilizarlas como estrategias de inmunoprotección (Borio et al., 2012; Mareze et al., 2015). El trabajo más reciente examinó la eficiencia de la producción de VLPs expresando únicamente la proteína Z de varios *Arenavirus* diferentes, concluyendo que cada virus tiene su propio mecanismo de producción de partículas los cuales varían entre distintos tipos celulares (Mpingabo 2020). Sin embargo, a pesar de ser una idea innovadora, el poco desarrollo de esta tecnología evidencia la falta de consistencia empírica.

Dado que en la primera etapa de esta investigación no se logró expresar la proteína 239 de HEV en *E.coli* Dh5 α , en su lugar utilizamos la proteína ORF2 de HEV-3 para avanzar en la optimización de la expresión y purificación de proteínas en células procariontas. Para lograrlo, se probó cultivar bacterias *E.coli* Dh5 α en medios de cultivo LB con diferentes concentraciones de sales M9ZB, así como diferentes concentraciones de inductor de la expresión génica (IPTG). En los resultados se observa que al utilizar IPTG 1mM en medio LB sin sales, se obtiene únicamente la proteína inducida. Mientras que en medio LB con sales se observa mayor intensidad en la banda, sugiriendo una mayor concentración de la proteína de interés, aunque también se observan bandas correspondientes a otras proteínas celulares.

A pesar de que los resultados sugieren la correcta expresión y purificación de la proteína ORF2, estos ensayos podrían haberse repetido empleando bacterias *E.coli* BL21, dado que el vector de expresión utilizado fue pRSET.

8-Conclusión

En una primera etapa, se lograron expresar y purificar antígenos basados en VLPs de proteínas recombinantes pZ-E2s y pZ-ORF2, en un sistema eucariota; con los cuales se inmunizaron ratones utilizando una estrategia *prime-boost* heteróloga (ADN plasmídico/VLPs), sin observarse respuesta inmunogénica.

A pesar de no lograr generar el vector pRSET-239 y por consiguiente, no expresar las proteínas 239 en un sistema procariota; se decidió optimizar esta técnica de expresión y purificación utilizando otro antígeno de HEV (proteína ORF2). En éstas últimas, se debió haber continuado trabajando para lograr una mayor optimización del protocolo, pero el tiempo se vio condicionado por la llegada de la pandemia ocasionada por el Covid-19. Sin embargo, en una primera instancia podemos afirmar que las proteínas ORF2 de HEV-3 inducidas se expresaron y purificaron correctamente, lo que podría sentar las bases de futuros experimentos, con el fin de expresar el antígeno 239 en *E.coli* y evaluar su potencial inmunogénico *in vivo* al generar anticuerpos específicos anti-HEV-3.

Para finalizar, es importante destacar la variedad de técnicas empleadas a lo largo de esta investigación, lo que implicó poner a punto nuevas metodologías para nuestro laboratorio, además de trabajar con técnicas que estaban desarrollándose en la región y de las cuales no existían casi antecedentes. Se apostó a una tecnología nueva de producción de antígenos que a pesar de ser teóricamente novedosa, a partir de los resultados obtenidos y su escaso desarrollo, hoy podemos concluir que debe ser investigada en mayor profundidad para ser optimizada.

9–Bibliografía

Abravanel F, Dimeglio C, Castanier M, Péron JM, Kamar N, Lhomme S, Izopet J: **Does HEV-3 subtype play a role in the severity of acute hepatitis E?** Liver Int, 2020, 40:333–337 <https://doi.org/10.1111/liv.14329>, PMID: 31837187

Aggarwal R, Kini D, Sofat S, Naik SR, Krawczynski K: **Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E**, Lancet, 2000 356(9235):1081-1082, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02737-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02737-9) , PMID: 11009149.

Aggarwal R: **Clinical presentation of hepatitis E**. Virus Res, 2011, 161(1):15-22. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.03.017> , PMID: 21458513.

Aggarwal R: **Hepatitis E: Historical, contemporary and future perspectives**. J Gastroenterol Hepatol 2011b, 26:72-82

Aggarwal R: **Diagnosis of hepatitis E**, Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(1):24-33, <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.187> , PMID: 23026902

Aggarwal R, Goel A: **Natural History, Clinical Manifestations, and Pathogenesis of Hepatitis E Virus Genotype 1 and 2 Infections**, Cold Spring Harb Perspect Med, 2019 1;9(7):a032136, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032136> , PMID: 29735580

Agrawal S, Gupta D, Panda SK: **The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)**. Virology, 2001, 282:87–101. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0819>

Ahmad R & Nasheri N: **Animal Reservoirs for Hepatitis E Virus within the Paslahepevirus Genus**, Running title: Reservoirs for hepatitis E virus, Veterinary Microbiology, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109618>, PMID: 36640568

Ahmad T, Hui J, Musa TH, Behzadifar M, Baig M: **Seroprevalence of hepatitis E virus infection in pregnant women: a systematic review and meta-analysis**, Ann Saudi Med, 2020, 40(2):136-146, <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2020.136> , PMID: 32241162

Ahmad T, Jin H, Dhama K, YattooMI, Tiwari R, Bilal M, Dhawan M, Emran TB, Alestad HI, Alhani HM, BinKhalaf HK, Rabaan AA: **Hepatitis E virus in pigs and the environment: An updated review of public health concerns**, Narra J, 2022, (2): e78 - <http://doi.org/10.52225/narra.v2i2.78>

Andonov A, Robbins M, Borlang J, Cao J, Hatchette T, Stueck A, Deschambault Y, Murnaghan K, Varga J, & Johnston L: **Rat hepatitis E virus linked to severe acute hepatitis in an immunocompetent patient**. The Journal of Infectious Diseases, 2019, 220(6), 951-955, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz025> , PMID: 30649379

Aslan AT & Balaban HY: **Hepatitis E virus: Epidemiology, diagnosis, clinical manifestations, and treatment**. World J Gastroenterol 2020, 26(37): 5543-5560 <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i37.5543>

Aspinall EJ, Couturier E, Faber M, Said B, Ijaz S, Tavošchi L, Takkinen J, Adlhoch C: **Hepatitis E virus infection in Europe: surveillance and descriptive epidemiology of confirmed cases, 2005 to 2015**, Euro Surveill, 2017, 29;22(26):30561. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.26.30561> , PMID: 28681720

Azman AS, Ciglenecki I, Wamala JF, Lynch J, Aggarwal R, Rahman M, Wong S, Serafini M, Moussa AM, Dalton HR, Shrestha A, Pant R, Peck R, Gurley ES: **Hepatitis E should be considered a neglected tropical disease**, PLoS Negl Trop Dis, 2019, 25;13(7):e0007453. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007453> , PMID: 31344038

Bai Ch, Cai J, Han P, Qi J, Yuen KY, Wang Q: **The crystal structure of the emerging human-infecting hepatitis E virus E2s protein**, Bioch and Bioph Res Com, 2020, 532, (1) 25-31, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.074>, PMID: 32819713

Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinzkaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VE: **Evidence for a virus non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route**, Intervirology 1983, 20:23-31, <https://doi.org/10.1159/000149370> , PMID: 6409836

Bangueses F, Abin-Carriquiry JA, Cancela F, Curbelo J, Mirazo S: Serological and molecular prevalence of hepatitis E virus among blood donors from Uruguay, J Med Virol, 2020; 1–5. <https://doi.org/10.1002/jmv.26231>

Berke T, Matson DO: **Reclassification of the *Caliciviridae* into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis**, Arch Virol 2000, 145:1421-1436, <https://doi.org/10.1007/s007050070099> , PMID: 10963346

Berto A, Van der Poel WH, Hakze-van der Honing R, Martelli F, La Ragione RM, Inglese N, Collins J, Grierson S, Johne R, Reetz J, Dastjerdi A, Banks M: **Replication of hepatitis E virus in three-dimensional cell culture**, J Virol Methods, 2013, 187(2):327-32. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.10.017> , PMID: 23159673

Billam P, Pierson FW, Li W, LeRoith T, Duncan RB, Meng XJ: **Development and Validation of a Negative-Strand-Specific Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of a Chicken Strain of Hepatitis E Virus: Identification of Nonliver Replication Sites**, Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(8), 2630-2634 <https://doi.org/10.1128/JCM.00536-08>, PMID: 18562592

Borden KL, Campbell DEJ, Salvato MS: **An *arenavirus* RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm**, J Virol 1998, 1:758-766, <https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.758-766.1998> , PMID: 9420283

Borio CS, Bilen MF, Argüelles MH, Goñi SE, Iserte JA, Glikmann G, Lozano ME: **Antigen vehiculization particles based on the Z protein of Junin virus**, Biotechnology, 2012, 12:80 <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/12/80>, PMID: 23121996

Bouwknegt M, Rutjes SA, Reusken C, Stockhofe-Zurwieden N, Frankena K, de Jong M, de Roda Husman, AM, van der Poel, W: **The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation**, BMC Veterinary Research, 2009, 5(1), 1-12, <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-7> , PMID: 19193209

Cao YF, Tao H, Hu YM, Shi CB, Wu X, Liang Q, Chi CP, Li L, Liang ZL, Meng JH, Zhu FC, Liu ZH, Wang XP: **A phase 1 randomized open-label clinical study to evaluate the safety and tolerability of a novel recombinant hepatitis E vaccine**, Vaccine, 2017, 35(37):5073-5080, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.072> , PMID: 28803715

Cao Y, Bing Z, Guan S, Zhang Z, Wang X: **Development of new hepatitis E vaccines**, Hum. Vaccines Immunother, 2018, 14 2254-2262, <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1469591>, PMID: 29708836

Cao YF, Zhou YF, Zhao DY, Chang JL, Tang JG, Chang DY, Zhang XM, Wang XP: **Expression and immunogenicity of hepatitis E virus-like particles based on recombinant truncated ORF2 capsid protein**, Prot Expr Purif, 2022, 1046-5928, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2022.106214>, PMID: 36526214

Capai L, Falchi A, & Charrel R: **Meta-analysis of human IgG anti-HEV seroprevalence in industrialized countries and a review of literature**, *Viruses*, 2019, 11(1), 84, <https://doi.org/10.3390/v11010084> , PMID: 30669517

Carratala A, Joost S: **Population density and water balance influence the global occurrence of Hepatitis E epidemics**, *Sci Rep*, 2019, 9(1):10042, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46475-3> , PMID: 31296895

Chackerian B: **Virus-like-particles: Flexible platforms for vaccine development**, *Expert Rev Vaccines* 2007, 3:381-390 <https://doi.org/10.1586/14760584.6.3.381> , PMID: 17542753.

Chandler JD, Riddell MA, Li F, Love RJ, Anderson DA: **Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds**, *Veterinary Microbiology*, 1999, 68(1–2), 95-105 [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(99\)00065-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(99)00065-6) , PMID: 10501166.

Chapuy-Regaud S, Dubois M, Plisson-Chastang C, Bonnefois T, Lhomme S, Bertrand-Michel J, You B, Simoneau S, Gleizes PE, Flan B, Abravanel F, Izopet J: **Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response**, *Biochimie*, 2017, 141:70-79. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.05.003> , PMID: 28483690.

Chen Z, Guo S, Li G, Ying D, Wen G, Fang M, Wang Y, Tang, Z, Zheng Z, Xia N: **A Secreted Form of the Hepatitis E Virus ORF2 Protein: Design Strategy, Antigenicity and Immunogenicity**, *Viruses*, 2022, 14, 2122, <https://doi.org/10.3390/v14102122> , PMID: 36298677

Corwin A, Jarot K, Lubis I, Nasution K, Suparmawo S, Sumardiati A, Widodo S, Nazir S, Orndorff G, Choi Y, et al: **Two years' investigation of epidemic hepatitis E virus transmission in West Kalimantan (Borneo), Indonesia**, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1995 89(3):262-5, [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(95\)90529-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(95)90529-4) , PMID: 7660427

Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M: **Hepatitis E: an emerging infection in developed countries**, *Lancet Infect Dis*, 2008, (11):698-709, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70255-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70255-X) , PMID: 18992406.

Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S: **Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection**, *N Engl J Med*, 2009, 361:1025-1027, <https://doi.org/10.1056/NEJMc0903778> , PMID: 19726781

Dalton HR, Kamar N: **Treatment of hepatitis E virus**. *Curr Opin Infect Dis*, 2016, 29:639–644, <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000316> , PMID: 27607911

Denner J: **Hepatitis E virus (HEV)—The Future**, *Viruses*, 2019, 11 (3), 251, <https://doi.org/10.3390/v11030251> , PMID: 30871152

Echevarria JM, Fogeda M, Avellon A: **Diagnosis of acute hepatitis E by antibody and molecular testing: a study on 277 suspected cases.** *J Clin Virol*, 2011, 50:69-71, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.09.016> , PMID: 21035388

Eichler R, Lenz O, Strecker T, Garten W: **Signal peptide of Lassa virus glycoprotein GP-C exhibits an unusual length**, *FEBS Lett*, 2001, 538:203-206, [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00160-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00160-1) , PMID: 12633879

Eini P, Mamani M, Javani M: **Seroprevalence of hepatitis e among hemodialysis patients: a report from hamadan, iran.** *Hepat Mon*, 2015, 15, (5) e26260, [https://doi.org/10.5812/hepatmon.15\(5\)2015.26260](https://doi.org/10.5812/hepatmon.15(5)2015.26260) , PMID: 26045706

El Sayed Zaki M, El Razek M, El Razek H: **Maternal-Fetal Hepatitis E Transmission: Is It Underestimated?** *Journal of clinical and translational hepatology*, 2014, 2 (2), 117-123, <https://doi.org/10.14218/JCTH.2014.00006> , PMID: 26356414

Emerson SU, Nguyen H, Graff J, Stephany DA, Brockington A, Purcell RH: **In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein**, *J Virol*, 2004, 78:4838–4846, <https://doi.org/10.1128/jvi.78.9.4838-4846.2004> , PMID: 15078965

Faber MS, Wenzel JJ, Jilg W, Thamm M, Höhle M, Stark K: **Hepatitis E virus seroprevalence among adults, Germany**, *Emerg Infect Dis*, 2012, (10):1654-7. <https://doi.org/10.3201/eid1810.111756> , PMID: 23018055

Favorov MO, Fields HA, Purdy MA, Yashina TL, Aleksandrov AG, Alter MJ, Yarasheva DM, Bradley DW, Margolis HS: **Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings**, *J Med Virol*, 1992, 36(4):246-50. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890360403> , PMID: 1578218

Fenaux H, Chassaing M, Berger S, Gantzer C, Bertrand I, Schvoerer E: **Transmission of hepatitis E virus by water: An issue still pending in industrialized countries**, *Water Research*, 2019, (151) 144-157, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.014> , PMID: 30594083

Feng Z, Lemon SM: **Peek-a-boo: membrane hijacking and the pathogenesis of viral hepatitis**, *Trends Microbiol*, 2014, 22:59-64, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.10.005> , PMID: 24268716

Fernández Villalobos NV, Kessel B, Rodiah I, Ott JJ, Lange B, Krause G: **Seroprevalence of Hepatitis E virus infection in the Americas: Estimates from a systematic review and meta-analysis.** PLoS ONE 2022, 17(6): e0269253, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269253> , PMID: 35648773

Forni D, Cagliani R, Clerici M, & Sironi M: **Origin and dispersal of Hepatitis E virus,** Emerging Microbes & Infections, 2018 7(1):11, <https://doi.org/10.1038/s41426-017-0009-6> , PMID: 29410449

Gallian P, Pouchol E, Djoudi R, Lhomme S, Mouna L, Gross S, Bierling P, Assal A, Kamar N, Mallet V, Roque-Afonso AM, Izopet J, Tiberghien P: **Transfusion-Transmitted Hepatitis E Virus Infection in France,** Transfus Med Rev, 2019, 33(3):146-153. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2019.06.001> , PMID: 31327668

Goñi SE, Borio CS, Romano FB, Rota RP, Pilloff MG, Iserte JA, Tortorici MA, Stephan BI, Bilen MF, Ghiringhelli PD, Lozano ME: **Expression and purification of Z protein from Junín virus,** J Biomed Biotechnol, 2010, <https://doi.org/10.1155/2010/970491> , PMID: 20652066

Gordeychuk I, Kyuregyan K, Kondrashova A, Bayurova E, Gulyaev S, Gulyaeva T, Potemkin I, Karlsen A, Isaeva O, Belyakova A, Lyashenko A, Sorokin A, Chumakov A, Morozov I, Isaguliants M, Ishmukhametov A, Mikhailov M: **Immunization with recombinant ORF2 p551 protein protects common marmosets (Callithrix jacchus) against homologous and heterologous hepatitis E virus challenge,** Vaccine, 2022, 40, (1)89-99, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.11.042> , PMID: 34836660

Gouttenoire J, Pollán A, Abrami L, Oechslin N, Mauron J, Matter M, Oppliger J, Szkolnicka D, Thi D, van der Goot VL, Moradpour FG, D: **Palmitoylation mediates membrane association of hepatitis E virus ORF3 protein and is required for infectious particle secretion,** PLoS Pathog, 2018, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007471> , PMID: 30532200

Grange ZL, Goldstein T, Johnson CK, Anthony S, Gilardi K, Daszak P, Olival KJ, O'Rourke T, Murray S, Olson SH, Togami E, Vidal G; Expert Panel; PREDICT Consortium; Mazet JAK: **University of Edinburgh Epigroup members those who wish to remain anonymous. Ranking the risk of animal-to-human spillover for newly discovered viruses,** Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(15):e2002324118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002324118> , PMID: 33822740

Guo Y, Yang F, Xu X, Feng M, Liao Y, He Z, Takeda N, Muramatsu M, Li Q, Li TC: **Immunization of human hepatitis E viruses conferred protection against challenge by a camel hepatitis E virus,** Vaccine, 2020, 38(16):7316-7322, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.09.036> , PMID: 32980200

Gupta E, Agarwala P: **Hepatitis E virus infection: An old virus with a new story!** Indian journal of medical microbiology, 2018, 36 (3), 317, https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_18_149 , PMID: 30429382

Guu TSY, Liu Z, Ye Q, Mata DA, Li K, Yin C, Zhang J, Tao YJ: **Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding**, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 2009, 106, 12992-12997, <https://doi.org/10.1073/pnas.0904848106> , PMID: 19622744

Harrison L & DiCaprio E: **Hepatitis E virus: an emerging foodborne pathogen**, Frontiers in Sustainable Food Systems, 2018, 2: 14

He P, Zou Y, Hu Z: **Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism**, Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2015, 11:2, 477- 488, <https://doi.org/10.1080/21645515.2014.1004026> , PMID: 25692535

Hillis A, Shreshta SM, Saha NK: **An epidemic of infectious hepatitis E in the Kathmandu Valley**, J Nepal Med Assoc 1973, 11-51

Hingane S, Joshi N, Surjit M, Ranjith-Kumar CT: **Hepatitis E Virus ORF2 Inhibits RIG-I Mediated Interferon Response**, Front Microbiol, 2020, 11:656, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00656> , PMID: 32351484

Holla RP, Ahmad I, Ahmad Z, Jameel S: **Molecular virology of hepatitis E virus**, Semin Liver Dis, 2013, 33:3-14, <https://doi.org/10.1055/s-0033-1338110> , PMID: 23564385

Horn J, Hoodgarzadeh M, Klett-Tammen CJ, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ: **Epidemiologic estimates of hepatitis E virus infection in European countries**, Journal of Infection, 2018, 77(6), 544–552, <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.09.012> , PMID: 30268515

Howard CM, Handzel T, Hill VR, Grytdal SP, Blanton C, Kamili S, Drobeniuc J, Hu D, Teshale E: **Novel risk factors associated with hepatitis E virus infection in a large outbreak in northern Uganda: results from a case-control study and environmental analysis**, Am J Trop Med Hyg, 2010, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0384> , PMID: 21036857

Huang FF, Sun ZF, Emerson SU, Purcell RH, Shivaprasad HL, Pierson FW, Toth TE, Meng XJ: **Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV**, J Gen Virol, 2004, 85:1609-1618, <https://doi.org/10.1099/vir.0.79841-0> , PMID: 15166445

Huzly D, Umhau M, Bettinger D, Cathomen T, Emmerich F, Hasselblatt P, Hengel H, Herzog, R, Kappert O, Maassen S: **Transfusion-transmitted hepatitis E in Germany, 2013**, *Eurosurveillance*, 2014, 19(21), 20812, <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.21.20812> , PMID: 24906377

Innis BL, Lynch JA: **Immunization against Hepatitis E**, *Cold Spring Harb Perspect. Med*, 2008, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032573> , PMID: 29530951

Institute of Health Metrics and Evaluation. **Acute Hepatitis E - Level 4 cause**, 2019, 4-5

Iqbal T, Rashid U, Idrees M, Afroz A, Kamill S, & Purdy MA: **A novel avian isolate of hepatitis E virus from Pakistan**, *Virology Journal*, 2019, 16(1), 1-10, <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1247-0> , PMID: 31753030

Isaacson M, Frean J, He J, Seriwatana J, Innis BL: **An outbreak of hepatitis E in Northern Namibia, 1983**, *Am J Trop Med Hyg*, 2000, 62(5):619-25, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.62.619> , PMID: 11289674

Ji H, Chen S, He Q, Wang W, Gong S, Qian Z, Zhang Y, Wei D, Yu W, Huang F: **The different replication between nonenveloped and quasi-enveloped hepatitis E virus**, *J Med Virol*, 2021, 93(11):6267-6277. <https://doi.org/10.1002/jmv.27121> , PMID: 34076903

Jin H, Zhao Y, Zhang X, Wang B, Liu P: **Case-fatality risk of pregnant women with acute viral hepatitis type E: a systematic review and meta-analysis**, *Epidemiol Infect*, 2016, 144:2098-2106, <https://doi.org/10.1017/S0950268816000418> , PMID: 26939626

John L, Thomas S, Herchenroder O, Püntzer BM, Schaefer S: **Hepatitis E Virus ORF2 Protein Activates the Pro-Apoptotic Gene CHOP and Anti-Apoptotic Heat Shock Proteins**, *PLoS ONE*, 2011, 6(9): e25378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025378> , PMID: 21966512

Johne R, Trojnar E, Filter M, and Hofmann J: **Thermal Stability of Hepatitis E Virus as Estimated by a Cell Culture Method**, *Appl. Environ. Microbiol*, 2018, 82, 4225-4231 <https://doi.org/10.1128/AEM.00951-16> , PMID: 27208095

Kabrane-Lazizi Y, Zhang M, Purcell RH, Miller KD, Davey RT, Emerson SU: **Acute hepatitis caused by a novel strain of hepatitis E virus most closely related to United States strains**, *J Gen Virol* 2001, 82:1687-1693, <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-7-1687> , PMID: 11413380

Kalia M, Chandra V, Rahman SA, Sehgal D, Jameel S: **Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection**, *J Virol*, 2009, 83:12714–12724, <https://doi.org/10.1128/JVI.00717-09> , PMID: 19812150

Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Péron JM, Guitard J, Cointault O, Esposito L, Abravanel F, Danjoux M, Durand D, Vinel JP, Izopet J, Rostaing L: **Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients**, N Engl J Med, 2008, 358(8):811-817, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706992> , PMID: 18287603

Kamar N, Izopet J, Cintas P, Garrouste C, Uro-Coste E, Cointault O, Rostaing L: **Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis**, Am J Transpl, 2010, 10:1321-1324, <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03068.x> , PMID: 20346067

Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, Dalton HR: **Hepatitis E**, Lancet. 2012, 379(9835):2477-2488, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61849-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61849-7) , PMID: 22549046

Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J: **Hepatitis E virus infection**. Clin Microbiol Rev. 2014; 27:116–138, <https://doi.org/10.1128/CMR.00057-13> PMID: 24396139

Kamar N, Izopet J, Pavio N, Aggarwal R, Labrique A, Wedemeyer H, Dalton HR: **Hepatitis E virus infection**. Nat Rev Dis Primers 2017, 3:17086 <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.86> , PMID: 29154369

Kamar N. and Pischke S: **Acute and Persistent Hepatitis E Virus Genotype 3 and 4 Infection: Clinical Features, Pathogenesis, and Treatment**, Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2018, p. a031872, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031872> , PMID: 29735575

Kannan H, Fan S, Patel D, Bossis I, Zhang YJ: **The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics**, J Virol, 2009, 83:6375-6382, <https://doi.org/10.1128/JVI.02571-08> , PMID: 19369329

Kardani K, Bolhassani A, Shahbazi S: **Prime-boost vaccine strategy against viral infections: Mechanisms and benefits**, Vaccine, 2016, 20;34(4):413-423, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.11.062> , PMID: 26691569

Kar P, Jilani N, Husain SA, Pasha ST, Anand R, Rai A, Das BC: **Does hepatitis E viral load and genotypes influence the final outcome of acute liver failure during pregnancy?** Am J Gastroenterol, 2008, 10:2495-2501, <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2008.02032.x> , PMID: 18785952

Karpe YA, Lole KS: **NTPase and 5' to 3' RNA duplex-unwinding activities of the hepatitis E virus helicase domain**, J Virol, 2010, 84:3595-3602, <https://doi.org/10.1128/JVI.02130-09> , PMID: 20071563

Kenney SP: **The current host range of hepatitis E viruses**, Viruses, 2019, 11(5), 452, <https://doi.org/10.3390/v11050452> , PMID: 31108942

Khuroo MS: **Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis: possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type**, The American journal of Medicine 1980, 6:818-824, [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(80\)90200-4](https://doi.org/10.1016/0002-9343(80)90200-4) , PMID: 6770682

Khuroo MS: **Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane**, Virus Res, 2011, 161:3-14, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.02.007> , PMID: 21320558

Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS: **Transmission of Hepatitis E Virus in Developing Countries**, Viruses, 2016, 8 (9), 253, <https://doi.org/10.3390/v8090253> , PMID: 27657112

Kinast V, Klöhn M, Nocke M, Todt D, Steinmann E: **Hepatitis E virus species barriers: seeking viral and host determinants**, Cur Op in Viro, 2022, 56:101274, <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2022.101274> , PMID: 36283248

Kmush B, Wierzba T, Krain L, Nelson K, Labrique AB: **Epidemiology of hepatitis E in low- and middle-income countries of Asia and Africa**, Semin Liver Dis, 2013, (1):15-29, <https://doi.org/10.1055/s-0033-1338111> , PMID: 23564386

Kmush BL, Nelson KE, Labrique AB: **Risk factors for hepatitis E virus infection and disease**, Expert review of anti-infective therapy, 2015, 13 (1), 41–53, <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.981158> , PMID: 25399510

Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR, Bradley DW: **Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses**, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 1992, 89, 8259-8263, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.8259> , PMID: 1518855

Kumar S, Subhadra S, Singh B, Panda BK: **Hepatitis E virus: the current scenario**, Int J Infect Dis 2013, 17:228-233, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.11.026> , PMID: 23313154

Kumar S, Stecher G, Tamura K: **MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets**, Mol Biol Evol 2016, 33:1870–1874, <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054> , PMID: 27004904

Kuznetsova TV, Ivanova-Pozdejeva A, Reshetnjak I, Geller J, Värvi K, Rumvolt R, Vikentjeva M, Trubnikova EV, Pozdniakova NV, Shevelev AB, Golovljova I: **Hepatitis E virus infection in different groups of Estonian patients and people who inject drugs**, J Clin Virol, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.04.011> , PMID: 29702351

Labrique AB, Thomas DL, Stoszek SK, Nelson KE: **Hepatitis E: an emerging infectious disease**, Epidemiol Rev, 21(2):162-79, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a017994> , PMID: 10682255

Lapa D, Capobianchi MR, Garbuglia AR: **Epidemiology of Hepatitis E Virus in European Countries**, Int. J. Mol. Sci, 2015, 16:25711-25743, <https://doi.org/10.3390/ijms161025711> , PMID: 26516843

Lee GH, Tan BH, Teo ECY, Lim SG, Dan YY., Wee A, Aw PPK, Zhu Y, Hibberd ML, Tan CK., Purdy MA, & Teo CG: **Chronic infection with Camelid Hepatitis E Virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk**, Gastroenterology, 2016, 150(2), 355-7.e3, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.048> , PMID: 26551551

Lenggenhager D, Gouttenoire J, Malehmir M, Bawohl M, Honcharova-Biletska H, Kreutzer S, Semela D, Neuweiler J, Hürlimann S, Aepli P, Fraga M, Sahli R, Terracciano L, Rubbia-Brandt L, Müllhaupt B, Sempoux C, Moradpour D, Weber A: **Visualization of hepatitis E virus RNA and proteins in the human liver**, J Hepatol, 2017, (3):471-479, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.04.002> , PMID: 28412294

Lewis H, Wichmann O, Duizer E: **Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review**, Epidemiology & Infection, 2010, 138 (2), 145–166, <https://doi.org/10.1017/S0950268809990847> , PMID: 19804658

Li P, Liu J, Li Y, Su J, Ma Z, Bramer WM, Cao W, de Man RA, Peppelenbosch MP, Pan Q: **The global epidemiology of hepatitis E virus infection: A systematic review and meta-analysis**, Liver Int. 2020, 40(7):1516-1528, <https://doi.org/10.1111/liv.14468> , PMID: 32281721

Li SW, Zhang J, Li YM, Ou SH, Huang GY, He ZQ, Ge SX, Xian YL, Pang SQ, Ng MH, Xia NS: **A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates**, Vaccine, 2005, 23(22):2893-28901, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.11.064> , PMID: 15780738

Li S, Tang X, Seetharaman J, Yang C, Gu Y, Zhang J, Du H, Shih JW, Hew CL, Sivaraman J, Xia N: **Dimerization of hepatitis E virus capsid protein E2s domain is essential for virus-host interaction**, PLoS Pathog, 2009, 5(8):e1000537, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000537> , PMID: 19662165

Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y, Wang JC, Engvall H, Hammar L, Xing L, Cheng RH: **Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus**, J Virol, 2005, (20):12999-3006, <https://doi.org/10.1128/JVI.79.20.12999-13006.2005> , PMID: 16189002

Li TC, Kataoka M, Takahashi K, Yoshizaki S, Kato T, Ishii T, Takeda N, Mishiro S, Wakita T, **Generation of hepatitis E virus-like particles of two new genotypes G5 and G6 and comparison of antigenic properties with those of known genotypes**, Veterinary Microbiology, 2015, 150-157, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.04.020> , PMID: 25934534

Li TC, Bai H, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Doan YH, Takahashi K, Mishiro S, Journal Pre-proof Takeda N, & Wakita T: **Genotype 5 Hepatitis E Virus Produced by a Reverse Genetics System Has the Potential for Zoonotic Infection**, Hepatology Communications, 2019, 3(1), 160-172, <https://doi.org/10.1002/hep4.1288> , PMID: 30620002

Li Y, Huang X, Zhang Z, Li S, Zhang J, Xia N, & Zhao Q: **Prophylactic hepatitis E vaccines: Antigenic analysis and serological evaluation**, Viruses, 2020, <https://doi.org/10.3390/v12010109> , PMID: 31963175

Liu, F, Wu X, Li L, Liu Z, Wang Z: **Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: Successes and challenges**, Protein Expr. Purif, 2013, 90, 104-116, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.05.009> , PMID: 23742819

Lin S, Yang Y, Nan Y, Ma Z, Yang L, Zhang YJ: **The Capsid Protein of Hepatitis E Virus Inhibits Interferon Induction via Its N-terminal Arginine-Rich Motif**, Viruses 11, 2019, <https://doi.org/10.3390/v11111050> , PMID: 31717991

Lin S, Zhang YJ: **Advances in Hepatitis E Virus Biology and Pathogenesis**, Viruses, 2021; 13: 267, <https://doi.org/10.3390/v13020267> , PMID: 33572257

Liu ZQ, Zuo JL, Yan Q, Fang QW, Zhang TJ: **Epidemiologic and spa-tio-temporal characteristics of hepatitis E in China, 2004-2014**, The Chinese Journal of Epidemiology, 2017, 38:1380-1385, <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.10.017> , PMID: 29060984

López N, Jacamo R, Franze-Fernández MT: **Transcription and RNA replication of tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is a inhibitor of these processes.** J Virol, 2001, 24:12241-12251, <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.10.017> , PMID: 29060984

Lynch JA, Lim JK, Asaga PEP, Wartel TA, Marti M, Yakubu B, Rees H, Talaat K, Kmush B, Aggarwal R, Ciglenecki I, Gurley E, Labrique AB: **Hepatitis E vaccine-Illuminating the barriers to use,** PLoS Negl Trop Dis, 2023, 17(1):e0010969, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010969> , PMID: 36602994

Magden J, Takeda N, Li T, Auvinen P, Ahola T, Miyamura T, Merits A, Kääriäinen L: **Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus,** J. Virol, 2001, 75, 6249-6255, <https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6249-6255.2001> , PMID: 11413290

Mansuy JM, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Sauné K, Miédouge M, Ellis V, Rech H, Destruel F, Kamar N, Dalton HR, Izopet J: **Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France,** Emerg Infect Dis, 2011, (12):2309-12. <https://doi.org/10.3201/eid1712.110371> , PMID: 22172156

Mareze V.A, Borio C.S., Bilen M.F., Fleith R., Mirazo S., Santos Mansur D., Arbiza J., Lozano M.E., Bruña-Romero O: **Tests in mice of a dengue vaccine candidate made of chimeric Junin virus-like particles and conserved dengue virus envelope sequences,** Appl Microbiol Biotechnol, 2015, <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6973-7> , PMID: 26386688

Mazalovska M, Kouokam JC: **Progress in the production of virus-like particles for vaccination against hepatitis E virus,** Viruses, 2020, 12 (8):826, <https://doi.org/10.3390/v12080826> , PMID: 32751441

McCormick JB, King IJ, Wenn PA, Johnson KM, O'Sullivan R, Smith ES, Trippel S, Tong TC: **A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever,** J Infect Dis, 2001, 155:445-455, <https://doi.org/10.1093/infdis/155.3.445> , PMID: 3805772

Médicos sin fronteras: Una excelente noticia: realizamos la primera campaña de vacunación masiva del mundo contra un brote de hepatitis E, <https://www.msf.org/actualidad/excelente-noticia-sudan-del-sur-realizamos-primera-vacunacion-masiva-del-mundo-contra-hepatitis-e-bentiu>

Miller M: **Viral taxonomy.** Clin Infect Dis 1995, 21:279-280, <https://doi.org/10.1093/clinids/21.2.279> , PMID: 8562731

Mirazo, S: **Caracterización Molecular y Variabilidad genética del Virus de la Hepatitis E**. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, UdelaR, 2014a

Mirazo S, Ramos N, Mainardi V, Gerona S, Arbiza J: **Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update**, *Hepat Med*. 2014b, 6:45-59, <https://doi.org/10.2147/HMER.S63417> , PMID: 24966702

Montpellier C, Wychowski C, Sayed IM, Meunier J-C, Saliou J-M, Ankavay M, Bull A, Pillez A, Abravanel F, Helle F, Brochot E, Drobecq H, Farhat R, Aliouat-Denis C-M, Haddad JG, Izopet J, Meuleman P, Goffard A, Dubuisson J, Cocquerel L: **Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein**, *Gastroenterology*, 2018, 154:211–223e8, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.09.020> , PMID: 28958858

Mori Y, and Matsuura Y: **Structure of hepatitis E viral particle**, *Virus Res*, 2011, 161, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.03.015>, PMID: 21440590

Mpingabo PI., Urata S, Yasuda J: **Analysis of the Cell Type-Dependence on the Arenavirus Z-Mediated Virus-Like Particle Production**, *Microbiol*, 2020, 11:562814. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562814> , PMID: 33117310

Muñoz-Chimeno M, Cenalmor A, Garcia-Lugo MA, Hernandez M, Rodriguez-Lazaro D, Avellon A: **Proline-Rich Hypervariable Region of Hepatitis E Virus: Arranging the Disorder**, *Microorganisms* 8, 2020, <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091417> , PMID: 32942608

Mynt H, Soe MM, Khin T, Mynt TM , Tin KM: **A clinical and epidemiological study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis in Rangoon**, *Am J trop Med Hyg* 1985, 34:1183-1189, <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091417> , PMID: 32942608

Nagashima S, Takahashi M, Jirintai, Tanaka T, Yamada K, Nishizawa T, Okamoto H: **A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells**. *J Gen Virol*, 2011, 92(2):269-278, <https://doi.org/10.1099/vir.0.025791-0> , PMID: 21068219

Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanaka T, Nishizawa T, Yasuda J, Okamoto H: **Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions**, *J Gen Virol*, 2011, 92(12):2838-2848, <https://doi.org/10.1099/vir.0.035378-0> , PMID: 21880841

Nagashima S, Takahashi M, Kobayashi T; Tanggis; Nishizawa T, Nishiyama T, Primadharsini PP, Okamoto H: **Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway**, *J Virol*, 2017, 91(22):e00822-17, <https://doi.org/10.1128/JVI.00822-17> , PMID: 28878075

Nair VP, Anang S, Subramani C, Madhvi A, Bakshi K, Srivastava A, Shalimar, Nayak B, Kumar R, Surjit CT, M: **Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus**, PLoS Pathog 2016, 12:e1005521, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005521> , PMID: 27035822

Nan Y & Zhang YJ: **Molecular Biology and Infection of Hepatitis E Virus**, Front Microbiol 2016, 7:1419, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01419> , PMID: 27656178

Nan Y, Wu C, Zhao Q, and Zhou EM: **Zoonotic Hepatitis E Virus: an ignored risk for public health**, Front. Microbiol, 2017, 8:2396. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02396> , PMID: 29255453

Narayanan S, Abutaleb A, Sherman KE, Kottlil S: **Clinical features and determinants of chronicity in hepatitis E virus infection**, J Viral Hepat, 2019(4):414-421, <https://doi.org/10.1111/jvh.13059> , PMID: 30636092

Nelson KE, Heaney CD, Labrique AB, Kmush BL, Krain LJ: **Hepatitis E: prevention and treatment**, Curr. Opin. Infect. Dis. 29 (2016) 478–485, <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000294> , PMID: 27454402.

Neuman BW, Adair BD, Burns JW, Miligan RA, Buchmeier MJ, Yeager M: **Complementarity in the supramolecular design of *arenavirus* and *retrovirus* revealed by electron cryomicroscopy and image analysis**, J Virol 2005, 6:3822-3830, <https://doi.org/10.1128/JVI.79.6.3822-3830.2005> , PMID: 15731275

Nicot F, Dimeglio C, Miguères M, Jeanne N, Latour J, Abravanel F, Ranger N, Harter A, Dubois M, Lameiras S, Baulande S, Chapuy-Regaud S, Kamar N, Lhomme S, Izopet J: **Classification of the Zoonotic Hepatitis E Virus Genotype 3 Into Distinct Subgenotypes**, Front Microbiol. 2021; 11, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.634430> , PMID: 33584599

Nimgaonkar I, Ding Q, Schwartz RE, Ploss A: **Hepatitis E virus: advances and challenges**, Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol., 2017, 15 (2), 96-110, <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.150> , PMID: 29162935

O'Keefe J, Tracy L, Yuen L, Bonanzinga S, Li X, Chong B, Nicholson S, & Jackson K: **Autochthonous and Travel Acquired Hepatitis E Virus in Australia**, Frontiers in Microbiology 2021, 12, 640325, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.640325> , PMID: 33633719

Okamoto H: **Genetic variability and evolution of Hepatitis E virus**, Virus Res, 2007, 127:216-228, <https://doi.org/10.3390/v11050456> , PMID: 31109076

Okamoto H: **Efficient cell culture systems for hepatitis E virus strains in feces and circulating blood**, Rev. Med. Virol, 2011, 21, 18-31, <https://doi.org/10.1002/rmv.678> , PMID: 21294213

OMS, 2023: Hepatitis E. Available from: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/hepatitis-e>. Acceso: 18 Febrero 2023.

Ottonelli F: **Expresión del dominio antigénico mínimo del ORF2 de HEV en un sistema de VLP basado en la proteína Z del virus Junín y caracterización preliminar**. Tesis de grado. Facultad de Ciencias, UdelaR, 2016

Pallerla SR, Harms D, Johne R, Todt D, Steinmann E, Schemmerer M, Wenzel JJ, Hofmann J, Shih JWK, Wedemeyer H, Bock CT, Velavan TP: **Hepatitis E Virus Infection: Circulation, Molecular Epidemiology, and Impact on Global Health**, Pathogens, 2020, 9(10):856, <https://doi.org/10.3390/pathogens9100856> , PMID: 33092306

Paliwal D, Panda SK, Kapur N, Varma SPK, Durgapal H: **Hepatitis E virus (HEV) protease: a chymotrypsin-like enzyme that processes both non-structural (pORF1) and capsid (pORF2) protein**, J Gen Virol, 2014, 95:1689-1700, <https://doi.org/10.1099/vir.0.066142-0> , PMID: 24795447

Panda SK., Nanda SK., Zafrullah M., Ansari IH., Ozdener MH., Jameel S: **An Indian strain of hepatitis E virus (HEV): cloning, sequence, and expression of structural region and antibody responses in sera from individuals from an area of high-level HEV endemicity**, J Clin Microbiol, 1995,(10):2653-9, <https://doi.org/10.1128/jcm.33.10.2653-2659.1995> , PMID: 8567900

Pandolfi R, Ramos de Almeida D, Alves Pinto M, Kreutz LC, Frandoloso R: **In house ELISA based on recombinant ORF2 protein underline high prevalence of IgG anti-hepatitis E virus amongst blood donors in south Brazil**, PLoS ONE, 2017;12:e0176409, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176409> , PMID: 28486512

Parent LJ, Bennett RP, Craven RC, Nelle TD, Krishna NK, Bowzard, JB, Wilson CB, Puffer BA, Montelaro RC, Wills JW: **Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins**, J Virol 1995, 69:5455-5460, <https://doi.org/10.1128/JVI.69.9.5455-5460.1995>, PMID: 7636991

Parvez MK: **Molecular characterization of hepatitis E virus ORF1 gene supports a papain-like cysteine protease (PCP)-domain activity**, Virus Res, 2013, 178:553-556, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.07.020> , PMID: 23978667

Parvez MK: **The hepatitis E virus ORF1 “X-domain” residues form a putative macrodomain protein/Appr-1”-pase catalytic-site, critical for viral RNA replication**, *Gene*, 2015, 566:47-53, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.026> , PMID: 25870943

Parvez MK: **Mutational analysis of hepatitis E virus ORF1“Y-domain”: Effects on RNA replication and virion infectivity**, *World J Gastroenterol*, 2017, 23:590-602, <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i4.590> , PMID: 28216965

Passos-Castilho AM, de Sena A, Reinaldo MR, Hernandes Granato CF: **Hepatitis E virus infection in Brazil: results of laboratory based surveillance from 1998 to 2013**, *Rev Soc Bras Med Trop*, 2015, 48:468-470, <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0036-2015> , PMID: 26132499

Pavio N, Meng XJ, Renou C: **Zoonotic hepatitis: animal reservoirs and emerging risk**, *Vet Res*, 2010, 140: 256-265, <https://doi.org/10.1051/vetres/2010018> , PMID: 20359452

Pavio N, Meng XJ, Doceul, V: **Zoonotic origin of hepatitis E**, *Current Opinion in Virology*, 2015, 10, 34-41, <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.12.006> , PMID: 25588602

Perez-Gracia MT, Garcia M, Suay B. Mateos-Lindemann ML: **Current Knowledge on Hepatitis E**. *J Clin Transl Hepatol*, 2015, 28: 117-126, <https://doi.org/10.14218/JCTH.2015.00009> , PMID: 26355220

Pérez M, Craveb RC, de la Torre JC: **The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies**, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 22:12978-12983, <https://doi.org/10.1073/pnas.2133782100> , PMID: 14563923

Pérez P, Martín-Acebes M, Poderoso T, Lázaro-Frías A, Saiz JC, Sorzanod CO, Esteban M, García-Arriaza J: **The combined vaccination protocol of DNAMVA expressing Zika virus structural proteins as efficient inducer of T and B cell immune responses**, *Emerging Microbes & Infections* 2021, VOL. 10, <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1951624> , PMID: 34213405

Perttilä J, Spuul P, Ahola T: **Early secretory pathway localization and lack of processing for hepatitis E virus replication protein pORF1**, *J Gen Virol*, 2013 94:807-816, <https://doi.org/10.1099/vir.0.049577-0> , PMID: 23255617

Pisano MB, Martinez-Wassaf MG, Mirazo S, et al: **Hepatitis E virus in South America: The current scenario**, *Liver Int.* 2018: 38:1536-1546. <https://doi.org/10.1111/liv.13881> , PMID: 29788538

Pischke S, Hartl J, Pas SD, Lohse AW, Jacobs BC, van der Eijk AA: **Hepatitis E virus: infection beyond the liver?** J Hepatol, 2017, 66:1082-1095, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.11.016> , PMID: 27913223

Pudupakam RS, Huang YW, Opriessnig T, Halbur PG, Pierson FW, Meng XJ: **Deletions of the hypervariable region (HVR) in open reading frame 1 of hepatitis E virus do not abolish virus infectivity: evidence for attenuation of HVR deletion mutants in vivo,** J Virol, 2009, 83:384-395, <https://doi.org/10.1128/JVI.01854-08> , PMID: 18945785

Pudupakam RS, Kenney SP, Córdoba L, Huang Y-W, Dryman BA, Leroith T, Pierson FW, Meng X-J: **Mutational analysis of the hypervariable region of hepatitis e virus reveals its involvement in the efficiency of viral RNA replication,** J Virol, 2011, 85:10031-10040, <https://doi.org/10.1128/JVI.00763-11> , PMID: 21775444

Pujol FH, Favorov MO, Marcano T, Esté JA, Magris M, Liprandi F, Khudyakov YE, Khudyakova NS, Fields HA: **Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban and rural populations in Venezuela,** J Med Virol, 1994, (3):234-236, <https://doi.org/10.1002/jmv.1890420305> , PMID: 8006635

Purcell RH: **Hepatitis Viruses: changing patterns of human disease,** Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 7:2401-2406, <https://doi.org/10.1073/pnas.91.7.2401> , PMID: 8146130

Purdy MA, Lara J, Khudyakov YE: **The hepatitis E virus polyproline region is involved in viral adaptation,** PLoS ONE, 2012, 7:e35974, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035974> , PMID: 22545153

Purdy MA, Harrison TJ, Jameel S, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel WHM, Smith DB, Consortium IR: **ICTV virus taxonomy profile: *Hepeviridae*,** J Gen Virol, 2017, 98(11) 2645-2646, <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000940> , PMID: 29022866

Purdy MA, Drexler JF, Meng XJ, Norder H, Okamoto H, Van der Poel W, Reuter G, de Souza WM, Ulrich RG & Smith DB: **ICTV Virus Taxonomy Profile: *Hepeviridae* 2022.** The Journal of general virology, 2023, 103(9), <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001778> , PMID: 36170152

Quintana J & González A: **Virus de la Hepatitis E,** Rev Biomed 2003, 14:165-189

Raji YE, Toung OP, Taib NM, Sekawi ZB: **A systematic review of the epidemiology of Hepatitis E virus infection in South – Eastern Asia,** Virulence, 2021, 12(1), 114-129, <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1865716> , PMID: 33372843

Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST: **The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005**, *Hepatology*, 2012, 55(4):988–997, <https://doi.org/10.1002/hep.25505> , PMID: 22121109

Rivero-Juarez A, Frias M, Perez AB, Pineda JA, Reina G, Fuentes-Lopez A, Freyre-Carrillo, C, Ramirez-Arellano E, Alados JC, & Rivero A: **Orthohepevirus C infection as an emerging cause of acute hepatitis in Spain: First report in Europe**, *Journal of Hepatology*, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.01.028> , PMID: 35167911

Rodríguez-Frías F, Jardi R, Buti M: **Hepatitis E: virología molecular, epidemiología y patogénesis**, Elsevier 2012, 10:624-634, <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.01.014> , PMID: 22386306

Salvato M, Shimomaye EM, Oldstone MB: **The primary structure of the lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase**, *Virology* 1989a, 169:377-384, [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90163-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90163-3) , PMID: 2705303

Salvato M, Shimomaye EM: **The completed sequence of lymphocytic choriomeningitis reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein**, *Virology* 1989b, 173:1-10, [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90216-x](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90216-x) , PMID: 2510401

Salvato M, Schweighofer KJ, Burns J, Shimomaye EM: **Biochemical and immunological evidence that the 11 KDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus**, *Virus Res* 1992, 22:185-198, [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(92\)90050-j](https://doi.org/10.1016/0168-1702(92)90050-j) , PMID: 1626415

Sarnaik A, Mhatre A, Faisal M, Smith D, Davis R, Varman AM Novel perspective on a conventional technique: **Impact of ultra-low temperature on bacterial viability and protein extraction**, *PLoS ONE*, 2021, 16(5): e0251640, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251640> , PMID: 33999956

Sayed IM, Elhameed, Z, El-kareem D, Russell R: **Hepatitis E Virus Persistence and / or Replication in the Peripheral Blood Mononuclear Cells of Acute HEV**, *Journal Pre-proof Infected Patients*, 2021, 12, 1-11, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.696680> , PMID: 34335528

Schofield DJ, Glamann J, Emerson SU, Purcell RH: **Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein**, *J Virol* 2000, ;74:5548–55, <https://doi.org/10.1128/jvi.74.12.5548-5555.2000> , PMID: 10823861

Scotto G, Martinelli D, Centra M, Querques M, Vittorio F, Delli Carri P, Tartaglia A, Campanale F, Bulla F, Prato R, Fazio V: **Epidemiological and clinical features of HEV infection: a survey in the**

district of Foggia (Apulia, Southern Italy). *Epidemiol Infect.* 2014, 142(2):287-294, <https://doi.org/10.1017/S0950268813001167> , PMID: 23673019

Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, Ishii K: **The hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life cycle: implication for viral genome encapsidation and particle stabilization**, *J Virol*, 2013, (10):6031-6036, <https://doi.org/10.1128/JVI.00444-13> , PMID: 23468481

Shiota T, Li TC, Nishimura Y, Yoshizaki S, Sugiyama R, Shimojima M, Saijo M, Shimizu H, Suzuki R, Wakita T, Muramatsu M, Ishii K: **Integrin $\alpha 3$ is involved in non-enveloped hepatitis E virus infection**, *Virology*, 2019, 536:119-124, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.07.025> , PMID: 31421623

Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, Mammen MP Jr, Thapa GB, Thapa N, Myint KS, Fourneau M, Kuschner RA, Shrestha SK, David MP, Seriwatana J, Vaughn DW, Safary A, Endy TP, Innis BL. **Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine**, *N Engl J Med.* 2007, 356(9):895-903, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061847> , PMID: 17329696

Shukla P, Nguyen HT, Torian U, Engle RE, Faulk K, Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Purcell RH, Emerson SU: **Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(6):2438-2443, <https://doi.org/10.1073/pnas.1018878108> , PMID: 21262830

Silva F, Queiroz JA, Domingues FC: **Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli***, *Biotechnol Adv.* 2012, (3):691-708. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.12.005> , PMID: 22244816

Skidmore SJ: **Factors in spread of hepatitis E**, *The Lancet*, 1999, 354 (9184), 1049-1050, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)00241-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)00241-X) , PMID: 10509491

Smith DB, Simmonds P, Members Of The International Committee On The Taxonomy Of Viruses Hepeviridae Study Group, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel WHM, Purdy MA. **Consensus proposals for classification of the family *Hepeviridae***, *J Gen Virol*, 2015, 96(5):1191-1192, <https://doi.org/10.1099/vir.0.000115> , PMID: 26015322

Smith DB, Simmonds P, Izopet J, Oliveira-Filho EF, Ulrich RG, Johne R, Koenig M, Jameel S, Harrison TJ, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel WHM, Purdy MA: **Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes**, *J Gen Virol*, 2016, 97(3):537-542, <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000393> , PMID: 26743685

Smith DB, Izopet J, Nicot F, Simmonds P, Jameel S, Meng XJ, Norder H, Okamoto H, van der Poel WHM, Reuter G, & Purdy MA: **Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species *Orthohepevirus A*)**, The Journal of General Virology, 2020, 101(7), 692-698, <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001435> , PMID: 32469300

Song YJ, Park WJ, Park BJ, Lee JB, Park SY, Song CS, Lee NH, SeoKH, Kang YS, Choi IS: **Hepatitis E virus infections in humans and animals**, Clin Exp Vaccine Res, 2014, 3:29-36, <https://doi.org/10.7774/cevr.2014.3.1.29> , PMID: 24427760

Sridhar S, Lau SKP, Woo PCY: **Hepatitis E: A disease of reemerging importance**, Journal of the Formosan Medical Association, 2015, 114 (8), 681-690, <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2015.02.003> , PMID: 25773541

Sridhar S, Teng JLL, Chiu TH, Lau SKP, & Woo PCY: **Hepatitis E Virus Genotypes and Evolution: Emergence of Camel Hepatitis E Variants**, International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(4)869, <https://doi.org/10.3390/ijms18040869> , PMID: 28425927

Sridhar S, Yip CCY, Wu S, Cai J, Zhang AJX, Leung KH, Chung, TWH, Chan, JFW, Chan WM, & Teng JLL: **Rat hepatitis E virus as cause of persistent after liver transplant**, Emerging Infectious Diseases, 2018, 24(12)2241-2250, <https://doi.org/10.3201/eid2412.180937> , PMID: 30457530

Strecker T, Eichler R, Meulen Jt, Weissenhorn W, Dieter Klenk H, Garten W, Lenz O: **Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]**, J Virol, 2003, 77(19):10700-10705, <https://doi.org/10.1128/jvi.77.19.10700-10705.2003> , PMID: 12970458

Subissi L, Peeters M, Lamoral S, Klamer S, Suin V, Van Gucht S: **Subtype-specific differences in the risk of hospitalisation among patients infected with hepatitis E virus genotype 3 in Belgium, 2010–2018**. Epidemiol Infect, 2019, 147:e224. <https://doi.org/10.1017/S0950268819001122> , PMID:31364564

Surjit M, Jameel S, Lal SK: **Cytoplasmic localization of the ORF2 protein of hepatitis E virus is dependent on its ability to undergo retrotranslocation from the endoplasmic reticulum**, J Virol, 2007, 81:3339–3345, <https://doi.org/10.1128/JVI.02039-06> , PMID: 17229684

Takahashi M, Yamada K, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Tanaka T, Okamoto H: **Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces**. Arch Virol, 2008, 153:1703-1713, <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0179-6> , PMID: 18679765

Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai Mizuo H, Yazaki Y, Takagi T, Azuma M, Kusano E, Isoda N, Sugano K, Okamoto H: **Hepatitis E virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation**, *J Clin Microbiol*, 2010, 48:1112-1125, <https://doi.org/10.1128/JCM.02002-09> , PMID: 20107086

Takahashi M, Nishizawa T, Sato H, Sato Y, Jirintai Nagashima S, & Okamoto H: **Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype**, *The Journal of General Virology*, 2011, 92(4):902-908, <https://doi.org/10.1099/vir.0.029470-0> , PMID: 21228128

Takuissu GR, Kenmoe S, Ndip L, Ebogo-Belobo JT, Kengne-Ndé C, Mbagu DS, Bowo-Ngandji A, Oyono MG, Kenfack-Momo R, Tchatchouang S, Kenfack-Zanguim J, Lontuo Fogang R, Zeuko'o Menkem E, Kame-Ngasse GI, Magoudjou-Pekam JN, Nkie Esemu S, Veneri C, Mancini P, Bonanno Ferraro G, Iaconelli M, Suffredini E, La Rosa G: **Hepatitis E Virus in Water Environments: A Systematic Review and Meta-analysis**, *Food Environ Virol*, 2022, 14(3):223-235, <https://doi.org/10.1007/s12560-022-09530-3> , PMID: 36036329

Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR: **Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome**, *Virology*, 1991, 185(1):120-131, [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90760-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90760-9) , PMID: 1926770

Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, Okamoto H. **Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus**. *J Gen Virol*, 88(3):903-911, <https://doi.org/10.1099/vir.0.82535-0> , PMID: 17325363

Tang X, Yang C, Gu Y, Song C, Zhang X, Wang Y, Zhang J, Hew CL, Li S, Xia N, Sivaraman J: **Structural basis for the neutralization and genotype specificity of hepatitis E virus**, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108:10266–10271, <https://doi.org/10.1073/pnas.1101309108> , PMID: 21642534

Teshale EH, Grytdal SP, Howard C, Barry V, Kamili S, Drobeniuc J, Hill VR, Okware S, Hu DJ, Holmberg SD: **Evidence of person-to-person transmission of hepatitis E virus during a large outbreak in Northern Uganda**, *Clin Infect Dis*, 2010, 50(7):1006-1010, <https://doi.org/10.1086/651077> , PMID: 20178415.

Thakur V, Ratho RK, Kumar S, Saxena SK, Bora I, Thakur P: **Viral Hepatitis E and Chronicity: A Growing Public Health Concern**, *Front Microbiol*, 2020, 11:577339. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.577339> , PMID: 33133046

Thermo Fisher Invitrogen, Technologies, pRSET A, B, and C For high-level expression of recombinant proteins in E. coli, User Manual https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/prset_man.pdf

Treagus S, Wright C, Baker-Austin C, Longdon B, Lowther J: **The Foodborne Transmission of Hepatitis E Virus to Humans**, Food Environ Virol, 2021, 13(2):127-145, <https://doi.org/10.1007/s12560-021-09461-5> , PMID: 33738770

Tsutsumi S, Gotoh T, Tomisato W, Mima S, Hoshino T, Hwang HJ, Takenaka H, Tsuchiya T, Mori M, Mizushima T: **Endoplasmic reticulum stress response is involved in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis**, Cell Death Differ, 2004, 11(9):1009-1016, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401436> , PMID: 15131590

Velavan TP, Pallerla SR, Johne R, Todt D, Steinmann E, Schemmerer M, Wenzel JJ, Hofmann J, Shih JWK, Wedemeyer H, & Bock CT: **Hepatitis E: An update on One Health and clinical medicine**, Liver International, 2021, 41(7):1462-1473, <https://doi.org/10.1111/liv.14912> , PMID: 33960603

van den Berg B, van der Eijk AA, Pas SD, Hunter JG, Madden RG, Tio-Gillen AP, Dalton HR, Jacobs BC: **Guillain-Barré syndrome associated with preceding hepatitis E virus infection**, Neurology, 2014, 82:491-497, <https://doi.org/10.1212/WNL.000000000000111> , PMID: 24415572

Vina-Rodriguez A, Schlosser J, Becher D, Kaden V, Groschup MH, Eiden M: **Hepatitis E virus genotype 3 diversity: Phylogenetic analysis and presence of subtype 3b in wild boar in Europe**, Viruses, 2015, 7:2704–2726, doi.org/10.3390/v7052704 PMID:26008708

Walczak M, de Mare A, Riezebos-Brilman A, Regts J, Hoogeboom BN, Visser JT, Fiedler M, Jansen-Dürr P, van der Zee A, Nijman H, Wilschut J, Daemen T: **Heterologous Prime-Boost Immunizations with a Virosomal and an Alphavirus Replicon Vaccine**, Mol Pharmaceutics, 2011, 8, 1, 65–77, <https://doi.org/10.1021/mp1002043> , PMID: 20825215

Wang B, Harms D, Yang XL, Bock CT: **Orthohepevirus C: An expanding species of emerging hepatitis E virus variants**, Pathogens, 2020, 9(3):154, <https://doi.org/10.3390/pathogens9030154> , PMID: 32106525

Wang B, & Meng XJ: **Hepatitis E virus: host tropism and zoonotic infection**, Current Opinion in Microbiology, 2021a, 59, 8–15, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.07.004> , PMID: 32810801

Wang B, Meng XJ: **Structural and molecular biology of hepatitis E virus**, *Comput Struct Biotechnol J*, 2021b, 19:1907–1916, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.03.038> , PMID: 33995894

Wang B, & Yang XL: **Chirohepevirus from Bats: Insights into Hepatitis E Virus Diversity and Evolution**, *Viruses*, 2022, 14(5), 905, <https://doi.org/10.3390/v14050905>, PMID: 35632647

Wang L, Teng JLL, Lau SKP, Sridhar S, Fu H, Gong W, Li M, Xu Q, He Y, Zhuang H, Woo PCY & Wang L: **Transmission of a Novel Genotype of Hepatitis E Virus from Bactrian Camels to Cynomolgus Macaques**, *Journal of Virology*, 2019, 93(7):e02014-18, <https://doi.org/10.1128/JVI.02014-18> , PMID: 30700602

Wedemeyer H, Pischke S, Manns MP: **Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection**, *Gastroenterology*, 2012, 142:1388-1397, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.014> , PMID: 22537448

WiBing MH, Brüggemann Y, Steinmann E, Todt D: **Virus–Host Cell Interplay during Hepatitis E Virus Infection**, *Tr in Microb*, 2021, 29(4):309-319, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.07.002> , PMID: 32828646

Wildo M, López N, Casabona K, Franze-Fernández MT: **Mapping of the tacaribe arenavirus Z-protein binding sites on the L protein identified both amino acids within the putative polymerase domain and a region at the N-terminus of L that are critically involved in binding**, *J Virol* 2008, 22:11454-11460, <https://doi.org/10.1128/JVI.01533-08> , PMID: 18799569

Wills JW, Cameron CE, Wilson CB, Xiang Y, Bennett RP, Leis J: **An assembly domain of the Rous sarcoma virus Gag protein required late in budding**, *J Virol*, 1994, 68:6605-6618, <https://doi.org/10.1128/JVI.68.10.6605-6618.1994> , PMID: 8083996

Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, Meng XJ: **Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model**. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(9):3040-61, <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3040-3046.2001> , PMID: 11526125

World Health Organization. **Waterborne outbreaks of hepatitis E: recognition, investigation and control**. Technical report. 2014. Available from: <https://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/HepE-manual/en/>

Wu T, Wu XL, Ou SH, Lin CX, Cheng T, Li SW, Ng MH, Zhang J, Xia NS: **Difference of T cell and B cell activation in two homologous proteins with similar antigenicity but great distinct**

immunogenicity, Mol Immunol, 2007, 44(12):3261-3266, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.01.002> , PMID: 17408743

Wu X, Chen P, Lin H, Hao X, Liang Z: **Hepatitis E virus: Current epidemiology and vaccine**, Hum Vaccin Immunother, 2016, 12(10):2603-2610, <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1184806> , PMID: 27184971

Xing L, Li TC, Mayazaki N, Simon MN, Wall JS, Moore M, Wang CY, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Cheng RH: **Structure of hepatitis E virionsized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway**, J. Biol. Chem, 2010, 285(43):33175-33183. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.106336> , PMID: 20720013

Xu M, Behloul N, Wen J, Zhang J, Meng J: **Role of asparagine at position 562 in dimerization and immunogenicity of the hepatitis E virus capsid protein**, Infect Genet Evol, 2016, 37:99–107, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.11.006> , PMID: 26584510

Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, Shima R, Moriishi K, Tsukihara T, Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y: **Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure** Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(31):12986-12991, <https://doi.org/10.1073/pnas.0903699106> , PMID: 19620712

Yin X, Ambardekar C, Lu Y, Feng Z: **Distinct entry mechanisms for non-enveloped and quasi-enveloped hepatitis E viruses**, J Virol, 2016, 90(8):4232-4242, <https://doi.org/10.1128/JVI.02804-15> , PMID: 26865708

Yin X, Ying D, Lhomme S, Tang Z, Walker CM, Xia N, Zheng Z, Feng Z: **Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection**, Proc. Natl, 2018, Acad Sci USA, 115, 4773–4778, <https://doi.org/10.1073/pnas.1721345115> , PMID: 29669922

Yin, X. and Feng, Z: **Hepatitis E virus entry**, Viruses, 2019, 11,883, <https://doi.org/10.3390/v11100883> , PMID: 31547135

Yip CCY, Lo JYC, Sridhar S, Lung DC, Luk S, Chan KH, Chan JFW, Cheng VCC, Woo PCY, Yuen KY & Lau SKP: **First Report of a Fatal Case Associated with EV-D68 Infection in Hong Kong and Emergence of an Interclade Recombinant in China Revealed by Genome Analysis**, International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(5):1065. <https://doi.org/10.3390/ijms18051065> , PMID: 28509856

Yugo DM, Meng XJ: **Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission**, Int J Environ Res Public Health, 2013, 10:4507-4533, <https://doi.org/10.3390/ijerph10104507> , PMID: 24071919

Zanotto C, Paolini F, Radaelli A, De Giuli Morghen C: **Construction of a recombinant avipoxvirus expressing the env gene of Zika virus as a novel putative preventive vaccine**, Virol J, 2021, 18(1):50, <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01519-x> , PMID: 33663531

Zhang M, Emerson SU, Nguyen H, Engle R, Govindarajan S, Blackwelder WC, Gerin J, Purcell RH: **Recombinant vaccine against hepatitis E: Duration of protective immunity in rhesus macaques**, Vaccine, 2002, 20(27-28):3285-3291, [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00314-6](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00314-6) , PMID: 12213398

Zhang J, Gu Y, Ge SX, Li SW, He ZQ, Huang GY, Zhuang H, Ng MH, Xia NS: **Analysis of hepatitis E virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein**, Vaccine, 2005, 23(22):2881-2892, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.11.065> , PMID: 15780737

Zhang J, Liu CB, Li RC, Li YM, Zheng YJ, Li YP, Luo D, Pan BB, Nong Y, Ge SX, Xiong JH, Shih JW, Ng MH, Xia NS: **Randomized-controlled phase II clinical trial of a bacterially expressed recombinant hepatitis E vaccine**, Vaccine, 2009, 27(12):1869-1874, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.12.061> , PMID: 19168109

Zhang J, Shih JW, Wu T, Li SW, Xia NS: **Development of the hepatitis E vaccine: from bench to field**, Semin Liver Dis, 2013, 33:79-88, <https://doi.org/10.1055/s-0033-1338116> , PMID: 23564392

Zhang J, Zhang XF, Huang SJ, Wu T, Hu YM, Wang ZZ, Wang H, Jiang HM, Wang YJ, Yan Q: **Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine**, N Engl J Med, 2015, 372:914-922, <https://doi.org/10.1056/NEJMc1504302> , PMID: 26039604

Zhang J, Zhao QJ, Xia NS: **Prophylactic hepatitis E vaccine**, Adv. Exp. Med. Biol, 2016, 223-246, https://doi.org/10.1007/978-94-024-0942-0_13 , PMID: 27738988

Zhang S, Qu C, Wang Y, Wang W, Ma Z, Peppelenbosch MP, Pan Q: **Conservation and variation of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein**, Gene, 2018, 675:157-164, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.06.108> , PMID: 30180962

Zhao Q, Zhang J, Wu T, Li SW, Ng MH, Xia NS, Shih JW: **Antigenic determinants of hepatitis E virus and vaccine-induced immunogenicity and efficacy**, J Gastroenterol, 2013, 48(2):159-168, <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0701-1> , PMID: 23149436

Zheng M, Jiang J, Zhang X, Wang N, Wang K, Li Q, Li T, Lin Q, Wang Y, Yu H, Gu Y, Zhang J, Li S, Xia N. **Characterization of capsid protein (p495) of hepatitis E virus expressed in Escherichia coli and assembling into particles in vitro**, *Vaccine*, 2018, 36(16):2104-2111, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.03.005> , PMID: 29544686

Zhou Z, Xie Y, Wu Ch, Nan Y: **The Hepatitis E Virus Open Reading Frame 2 Protein: Beyond Viral Capsid**, *Front in Micro*, 2021, 12:739124. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.739124> , PMID: 34690982

Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, Wang H, Yang CL, Jiang HM, Cai JP, Wang YJ, Ai X, Hu YM, Tang Q, Yao X, Yan Q, Xian YL, Wu T, Li YM, Miao J, Ng MH, Shih JW, Xia NS: **Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial**, *Lancet*. 2010, 376(9744):895-902, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61030-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61030-6) , PMID: 20728932