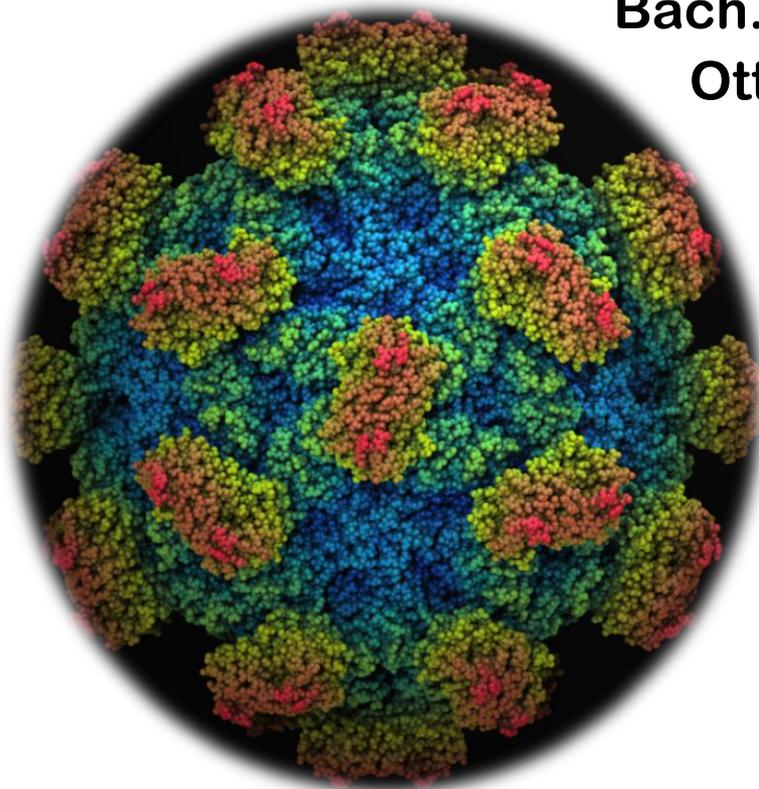


# **Expresión del dominio antigénico mínimo del ORF2 de HEV en un sistema de VLP basado en la proteína Z del virus Junín y caracterización preliminar**

**Bach. Florencia  
Ottonelli**



**Licenciatura en  
Ciencias  
Biológicas**

**Orientación  
Biología  
Molecular**

**Tutor: Dr. Santiago Mirazo**

**Co-tutor: Dr. Juan Arbiza**

**2016**



# Índice

---

● 1- RESUMEN .....	Pág. 5
● 2- INTRODUCCIÓN .....	Pág. 7
● 2.1- Taxonomía .....	Pág. 7
● 2.2- Historia .....	Pág. 7
● 2.3- Epidemiología .....	Pág. 8
● 2.4- Distribución de genotipos.....	Pág. 10
• 2.4.1- Situación a nivel mundial.....	Pág. 10
• 2.4.2- Situación a nivel regional.....	Pág. 12
● 2.5- Características de la enfermedad.....	Pág. 13
● 2.6- Modos de transmisión .....	Pág. 14
● 2.7- Zoonosis.....	Pág. 17
● 2.8- Estructura viral, genoma y proteínas .....	Pág. 18
● 2.9- Dominios de ORF2 .....	Pág. 23
● 2.10- Virus-like particles (VLPs) .....	Pág. 26
● 2.11- Sitios antigénicos neutralizantes y vacunas .....	Pág. 27
• 2.11.1- Sitios antigénicos neutralizantes .....	Pág. 27
• 2.11.2- Vacunas .....	Pág. 30
● 2.12- Proteína Z del virus Junin .....	Pág. 32
● 3- OBJETIVOS .....	Pág. 35
● 4- ESTRATEGIA DE TRABAJO .....	Pág. 36
● 5- MATERIALES Y MÉTODOS .....	Pág. 38
● 5.1- Diseño de primers y amplificación de E2s por PCR..	Pág. 38
• 5.1.1- Primers y amplificación de E2s .....	Pág. 38
• 5.1.2- Clonado en pSG1 .....	Pág. 40
● 5.2- Construcción de plásmidos pZ-E2s y controles .....	Pág. 40
• 5.2.1- Ligación y transformación.....	Pág. 40
• 5.2.2- Electroforesis en gel de agarosa .....	Pág. 42
• 5.2.3- Extracción de plásmidos por MAXIPREP .....	Pág. 43
● 5.3- Transfección en células HEK 293.....	Pág. 45
• 5.3.1- Cultivo celular .....	Pág. 45
• 5.3.2- Transfección .....	Pág. 46

• 5.4- Evaluación de la expresión .....	Pág. 46
• 5.5- Purificación de las VLPs .....	Pág. 47
• 5.6- Evaluación de la expresión de E2s.....	Pág. 47
• 5.6.1- Dot Blot .....	Pág. 47
• 5.6.2- Microscopía electrónica de transmisión ..	Pág. 48
● <b>6- RESULTADOS</b> .....	Pág. 49
• 6.1- Amplificación de E2s por PCR .....	Pág. 49
• 6.2- Construcción del plásmido pZ-E2s .....	Pág. 49
• 6.3- Transfección de células HEK 293 .....	Pág. 50
• 6.4- Evaluación de la expresión de E2s en un sistema eucariota	Pág. 51
• 6.5- Purificación de las VLPs y evaluación de la expresión de E2s	Pág. 52
• 6.5.1- Dot Blot .....	Pág. 52
• 6.5.2- Microscopía electrónica de transmisión ....	Pág. 53
● <b>7- DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN</b> .....	Pág. 55
● <b>8- PERSPECTIVAS</b> .....	Pág. 58
● <b>9- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	Pág. 59
● <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	Pág. 69





# Abreviaturas

---

• A	Armstrong	• $\mu\text{g}$	Microgramo
• aa	aminoácidos	• min	Minuto
• ADN	Ácido desoxirribonucleico	• $\mu\text{L}$	Microlitro
• ARN	Ácido ribonucleico	• mL	Mililitro
• BSA	Seroalbúmina bovina	• mM	Milimolar
• Cap	caperuza	• M	Molar
• DAM	Dominio antigénico mínimo	• nm	Nanometro
• DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol	• nt	Nucleótidos
• dNTPs	desoxinucleótidos	• ORF	Marco abierto de lectura
• Dominio M	Dominio Middle	• pb	Pares de bases
• Dominio P	Dominio Protruding	• PBS	Fosfato buffer salino
• Dominio S	Domino Shell	• PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
• EDTA	Ácido etilendiaminotetracético	• r.p.m	Revoluciones por minuto
• FBS	Suero fetal bovino	• RpRd	ARN polimerasa ARN dependiente
• g	gramos	• seg	Segundos
• GFP	Green fluorescent protein	• s/t	Sin transfectar
• GTE	Glucosa tris EDTA	• T	Triangulación
• HEV	Virus de la Hepatitis E	• TA	Temperatura ambiente
• hr	hora	• TAE	Tris acetato EDTA
• HVR	región hipervariable	• v/v	Volumen volumen
• Kb	Kilo base	• VLP	Partículas similares a virus
• KDa	Kilo Dalton	• w/v	Masa volumen



# 1- Resumen

---

El virus de la Hepatitis E (HEV), único miembro de la familia *Hepeviridae*, fue identificado por primera vez en 1980 como el agente causal de la enfermedad Hepatitis E, distinguiéndolo mediante tests serológicos de la Hepatitis A y B. Actualmente HEV, presenta una amplia distribución geográfica mundial, con predominancia de formas epidémicas en regiones endémicas como el sudeste de Asia, Medio Oriente y parte de África; y formas no epidémicas causantes de los casos esporádicos encontrados en los países desarrollados y regiones sub desarrolladas no endémicas. Los genotipos 1, 2, 3 y 4 se han detectado en humanos, además de animales, mientras que los genotipos 5 y 6 se han detectado solo en animales como jabalí, rata, conejo y aves. Ésta, es la única de las hepatitis virales que posee mamíferos no humanos como reservorio, pero éstos, a diferencia de los humanos, son asintomáticos. En Uruguay la hepatitis E es una enfermedad emergente donde circulan cepas del genotipo 3 y 1.

La partícula de HEV es esférica con simetría icosaédrica y sin envoltura, resistente a las condiciones ácidas y alcalinas del tracto digestivo, lo que facilita su transmisión fecal-oral. El genoma está compuesto por una hebra simple de ARN polaridad positiva, de 7,2 Kb y posee tres ORF (ORF1, ORF2 y ORF3) parcialmente solapados. A su vez El ORF2 posee tres dominios: S que forma la cápside y los dominios M y P implicados en la interacción virus-célula huésped. El dominio P forma las protrusiones de la cápside y es allí donde mapea E2s, una secuencia interna de ORF2 que codifica el mínimo dominio antigénico del virus; éste está conservado en los primeros cuatro genotipos de HEV, por lo

que presenta un único serotipo. Hasta la fecha, dos tipos de vacunas basadas en proteínas ORF2 recombinantes del genotipo 1, han sido probadas clínicamente, con éxito en seres humanos; una basada en el sistema de expresión de baculovirus y otra en partículas p239 expresadas en *E.coli*, pero son necesarios más estudios para determinar la duración de la protección por la vacuna, necesidad de *boosters* y su eficacia en prevenir la enfermedad cuando se administra luego de la exposición a HEV.

El objetivo de este trabajo consistió en desarrollar un sistema de expresión del antígeno E2s, empleando las características biológicas de la proteína Z del virus Junín. Esta proteína es la fuerza principal de brotamiento del virus y se ha demostrado que su expresión es suficiente para liberar partículas virales con envoltura lipídica, aún en ausencia de otras proteínas virales. De este modo generamos un sistema de VLPs las cuales confieren ventajas a la hora de generar vacunas contra hepatitis E debido a que, aunque sean más pequeñas, comparten propiedades morfológicas antigénicas con el virión nativo, y al estar vacías son completamente no infecciosas. Para generar estas VLPs se realizó una transfección en células HEK 293 con el plásmido pZ-E2s construido previamente en este trabajo mediante técnicas de PCR y clonación; se purificaron y fueron verificadas mediante ensayos inmunoenzimáticos, de fluorescencia y microscopía electrónica. Las VLPs generadas estuvieron acordes en forma y tamaño a lo reportado previamente en este sistema.





## 2- Introducción

---

### 2.1- Taxonomía

El virus de la Hepatitis E inicialmente fue adjudicado a la familia *Picornaviridae* (Quintana y González, 2003), ya que cuando fue detectado el agente etiológico no-A, no-B, se asumió que pertenecía a la misma familia que el virus de la Hepatitis A (Balayan et al., 1983; Miller, 1995). Luego 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* (Kabrani-Lazizi et al., 2001). Posteriormente, en el séptimo reporte del Comité Internacional de Taxonomía Viral, se ubicó al HEV en una familia aparte, *Hepeviridae* (Berke y Metson, 2000). Posteriormente, Smith et al., (2014) propone un esquema taxonómico en el cual la familia *Hepeviridae* se divide en los géneros *Orthohepevirus* y *Piscihepevirus*.

### 2.2- Historia

La primera epidemia de infección causada por el virus de Hepatitis E (HEV) ocurrió en la India (Nueva Delhi) en 1955. Dicha epidemia se debió a la contaminación fecal ampliamente diseminada en el agua de consumo de la ciudad y tuvo como consecuencia unos 29.000 casos identificados. Entre 1955 y 1956 se volvieron a observar presuntas epidemias de hepatitis E en la Unión

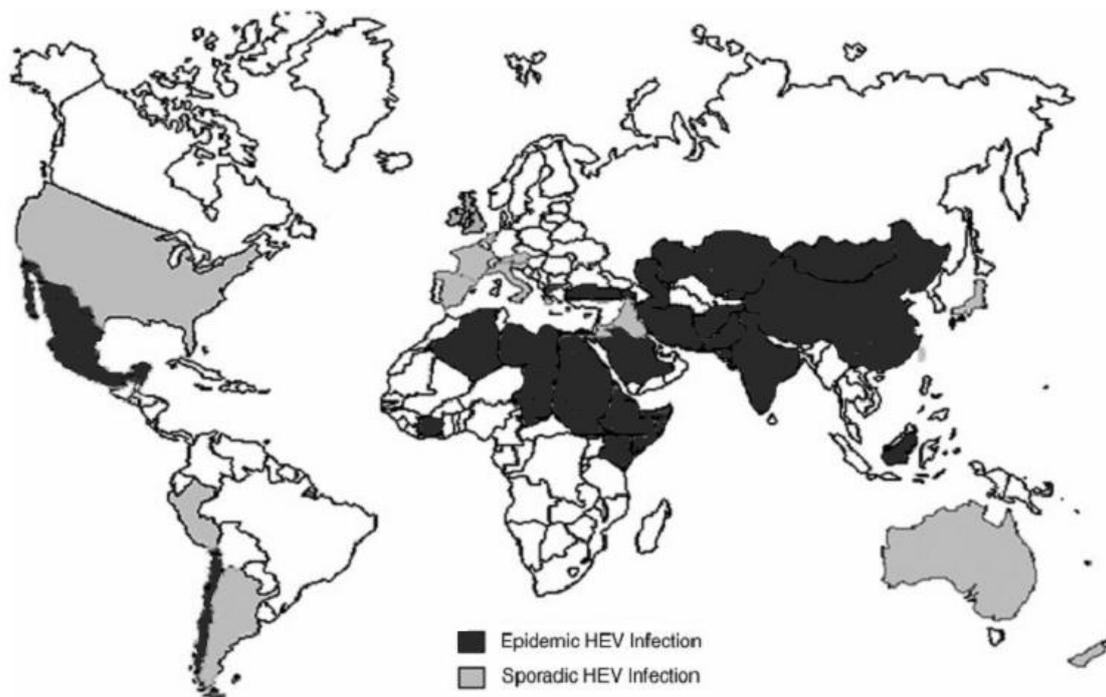
Soviética y el Sudeste Asiático (Hillis et al., 1973; Mynt et al., 1985). Pero esta epidemia no fue reconocida como una enfermedad humana en sí misma hasta 1980, cuando tests serológicos para el diagnóstico de Hepatitis A y Hepatitis B fueron aplicados en muestras colectadas y almacenadas durante la epidemia en India (Khuroo, 1980; Wong et al., 1980). Recién en 1983 se designa Hepatitis E al nuevo virus, identificado como la causa de la transmisión entérica de Hepatitis no-A, no-B (nAnB) (Balayan, 1983) y se lo denomina así, por entérico y epidémico (Rodríguez-Frias et al., 2012).

Este virus, fue identificado por primera vez en 1983 y transmitido a un voluntario humano y a monos *Cynomolgus*, estableciéndose su rol etiológico en la transmisión entérica nAnB (ET-nAnB) de la hepatitis (Balayan et al., 1983). En 1990, el genoma de HEV fue clonado directamente desde muestras obtenidas de un humano durante un brote ocurrido en China, (Sheng-Li et al., 1993) y los antígenos virales codificados en el genoma ARN fueron expresados por tecnología de ADN recombinante (Reyes et al., 1990).

## **2.3- Epidemiología**

Actualmente HEV presenta una amplia distribución geográfica mundial, con predominancia de formas epidémicas en regiones endémicas (Centro y Sudeste de Asia, Medio Oriente y parte de África) y formas no epidémicas, siendo estas últimas a su vez las causantes de los casos esporádicos encontrados en los países desarrollados (Fig. 1) (González, 2003; Quintana, 2003). La enfermedad representa alrededor de un 1% de los casos informados de hepatitis viral aguda, asociados con viajes a zonas endémicas, aunque cada

vez son más frecuentes aquellos casos que no tienen historia de viajes (Pérez-Gracia M, 2003; Rodríguez, 2003). La infección por el HEV ha sido asociada a cerca del 50% de los casos esporádicos de hepatitis viral aguda reportados en países en desarrollo (Clemente-Casares et al., 2003). En contraste con la incidencia geográfica de la enfermedad causada por HEV, la prevalencia geográfica de anticuerpo anti-HEV es ampliamente distribuida, encontrándose las prevalencias más altas en países donde la enfermedad fue endémica (Purcell y Emerson, 2008).



**Figura 1.** Distribución geográfica de HEV. Países que han reportado infecciones por HEV epidémicas o esporádicas. Extraído de Panda et al, 2006.

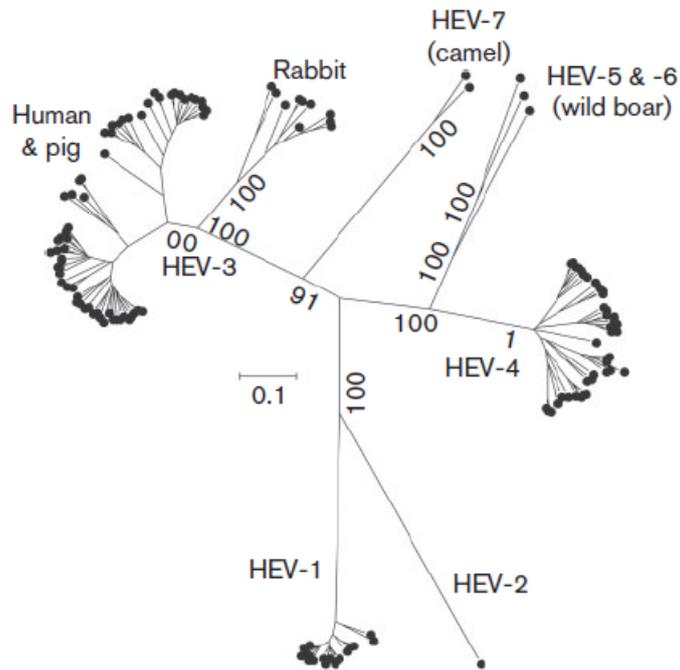
La primera evidencia serológica de la infección por HEV en América del Sur se encontró en Venezuela en 1994 (Pujol et al., 1994). La región exhibe un endemismo moderado al HEV. Las tasas mayores de prevalencia se reportaron en poblaciones urbanas y rurales, entre 1 y 10% y no hay evidencia de

diferencias en la prevalencia entre las diferentes regiones (América central y el Caribe, La cuenca Amazónica y el cono Sur) (Echevarría, 2013). En Nicaragua se detectó una prevalencia de anticuerpos anti-HEV de 4,6 y 8%, mientras que en Cuba se reportó una prevalencia de 5,3%. En Uruguay la hepatitis E es una enfermedad emergente y la prevalencia es de 1,2% (Quintana et al., 2005). Las prevalencias de anticuerpos anti-HEV más altas de Latino América se reportan en Bolivia (León et al., 1999).

## **2.4- Distribución de genotipos**

### **2.4.1- Situación a nivel mundial**

Aunque se ha propuesto un único serotipo (Purcell, 1994), las cepas de HEV presentan una muy amplia diversidad genómica a lo largo de todo el genoma (Okamoto, 2007). Smith et al, (2014) presenta un consenso taxonómico para la clasificación de estas variantes de HEV (Fig. 2), tomando en cuenta relaciones filogenéticas, extensión de secuencia y rango de huésped. En dicha clasificación incluye cuatro genotipos, previamente descritos de acuerdo al análisis del genoma completo y/o regiones parciales que son variables en ORF1 y ORF2 (Schlauder et al., 2001; Zanetti et al., 1999); genotipo 1, 2, 3, 4, capaces de infectar humanos y los genotipos 5 y 6 recientemente asignados a HEV aviar, de rata (Johne et al., 2010), jabalí (Oliveira-Filho et al., 2013) y conejo (Geng et al., 2011; Zhao et al., 2009).



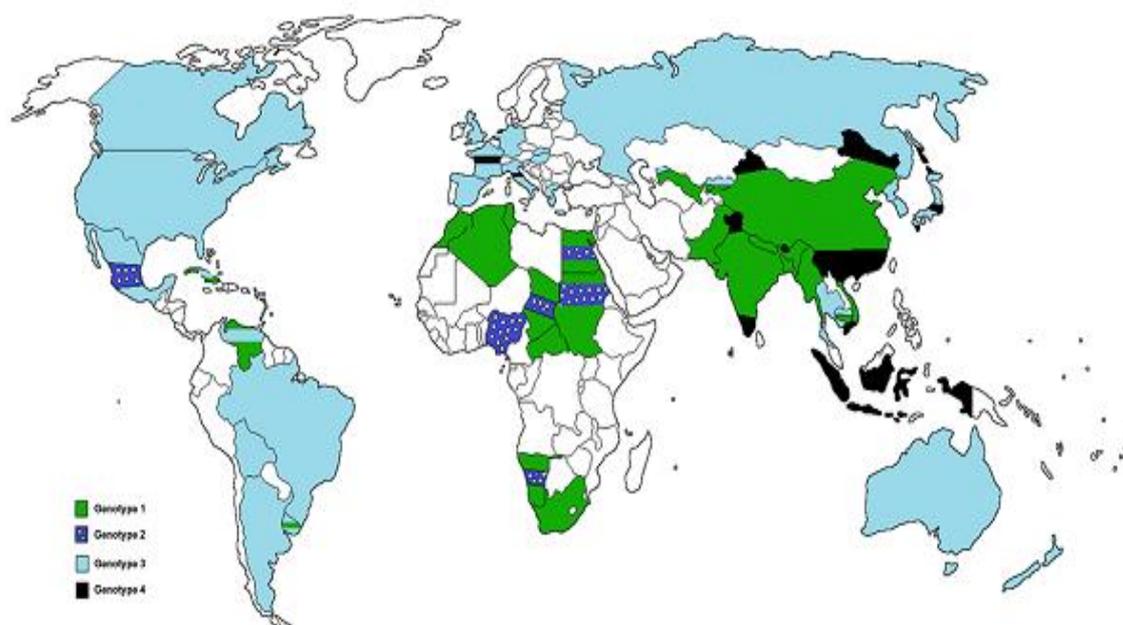
**Figura 2.** Análisis filogenético de la familia *Hepeviridae* y secuencias de HEV-like. Los árboles de Máxima Verosimilitud se realizaron en base a las secuencias de los ORF1 y 2, excluyendo la región hipervariable (HVR). Se indican valores de *bootstrap* mayores al 70%. Pig: cerdo; Rabbit: conejo; Camel: camello; wild boar: jabalí. Extraído de Smith et al., 2014.

De acuerdo con el sistema actualmente aceptado de clasificación, los cuatro genotipos principales de HEV se subclasifican en subtipos definidos en las bases de cinco reconstrucciones filogenéticas: 5'ORF1, 3'ORF1, 5'ORF2, 3'ORF2 y el genoma completo (Fig. 3) (Lu et al., 2006).

Los genotipos 1 (subtipos 1a-e) y 2 (subtipos 2a y 2b) están restringidos a primates, son transmitidos predominantemente por vía fecal-oral y se limitan a regiones tropicales/templadas (Purdy y Khudyakov, 2011).

El genotipo 3 (subtipos 3a-j) infecta varias especies de mamíferos, puede ser transmitido a humanos a través de la ingestión de carne cruda y se distribuye mundialmente (Meng, 2011).

El genotipo 4 (subtipos 4a-g) se comporta de forma similar al genotipo 3. Se pensaba que se restringía solo a Asia, pero recientemente fue identificado en aislados de humanos y suinos europeos (Nishizawa et al., 2003).



**Figura 3.** Distribución geográfica de los genotipos del virus de hepatitis E. Los genotipos 1 y 2 consisten en casos epidémicos reportados en Asia, varios países de Latino América y África; los genotipos 3 y 4 comprenden casos zoonóticos y han sido aislados de casos esporádicos de infección por hepatitis E aguda en varios reservorios animales, particularmente cerdos domésticos y salvajes; el genotipo 3 se distribuye en todo el mundo en humanos y cerdos mientras que el genotipo 4 fue reportado en Asia del Este y Europa Central. Extraído de Mirazo, 2014.

### 2.4.2- Situación a nivel regional

En Latinoamérica los orígenes de las cepas que circulan varía, las cepas circulantes en Argentina y Brasil se asocian con genotipos de América del Norte y Europa, mientras que los genotipos de HEV en México y el Caribe, se asocian a los responsables de epidemias en Asia y África (Echevarría et al., 2013). Estudios genotípicos a partir de la secuenciación de muestras de ARN en sueros, han determinado que pertenecen a los genotipos 1 y 3 las que

circulan en la población humana de México y el Caribe. Casos importados de HEV de genotipo 1 fueron detectados en viajeros internacionales en Argentina (Munné et al, 2011) y casos autóctonos pertenecientes al genotipo 3 fueron encontrados en Argentina, Brasil y Uruguay (Mirazo et al., 2011).

Recientemente, se ha detectado en Uruguay, el primer caso de hepatitis E autóctono perteneciente al genotipo 1 asociado a cepas de origen Indio, emparentadas a su vez con aislados de Cuba y Venezuela. Cabe destacar, que en estos países latinoamericanos dónde se reportaron aislados de HEV asociados al genotipo 1, son mayormente cepas autóctonas (Mirazo et al., 2014).

## **2.5- Características de la enfermedad**

Durante los brotes, las tasas de incidencia fueron de 1-15% en personas de entre 15 y 40 años de edad (Kane et al., 1984), franja etaria donde se observa la enfermedad sintomática con mayor frecuencia (Purcell y Emerson, 2008). La infección varía en severidad, desde subclínico, a hepatitis fulminante. Los casos más agudos de HEV tienen un curso clínico silencioso, y los pacientes manifiestan anticuerpos rápidamente (Rein et al., 2012; Zhu et al., 2010). Algunos estudios han sugerido una alta susceptibilidad de niños a la infección por HEV (Aggarwal et al., 1997; Arora et al., 1999). Las tasas de casos fatales durante las epidemias fueron de 0,2 y 4%, siendo mayores que la de Hepatitis A (Rodríguez-Frias et al., 2012). Se registra una tasa significativamente alta de entre 10-20% en mujeres embarazadas, que sufren falla hepática inexplicable, especialmente en el tercer trimestre (Arankalle et al., 1988; Khuroo et al., 1981;

Khuroo et al., 2003). El 60% de los casos de mujeres embarazadas infectadas con HEV se asociaron con incremento en la mortalidad de las gestantes, complicaciones obstétricas, nacimientos prematuros así como con la muerte de los neonatos. Aunque se desconocen los mecanismos por detrás de estos brotes, se piensa que puede ser por transmisión vertical (Patra et al., 2007).

## 2.6- Modos de transmisión

Tanto el genotipo 1 como el genotipo 2 se asocian a grandes epidemias de hepatitis E relacionadas con el consumo de agua contaminada y condiciones sanitarias desfavorables. En cambio, los casos esporádicos de infección por HEV en regiones no endémicas son menos entendidos (Purcell et al., 2008).

Existen varias vías de transmisión del HEV (Tabla 1): vía fecal-oral; transmisión persona-persona; vía parenteral; vía vertical; transmisión zoonótica; (revisado por Mirazo et al., 2014).

- **Fecal-oral** asociado a fuentes de agua contaminada en un contexto de condiciones sanitarias poco favorables y están asociadas al genotipo 1 y 2 en todos los casos. También se ha reportado la presencia de ARN viral en fuentes de agua pertenecientes a criaderos suinos y en aguas residuales en países industrializados (Clemente-Casares et al., 2003; Lopes dos Santos et al., 2011).
- **Persona-persona**, esta vía de transmisión no tiene un papel preponderante durante la aparición de brotes epidémicos

(Aggarwal et al., 1992). Ciertos hábitos de falta de higiene pueden contribuir en la transmisión del virus de un humano a otro.

- **Parenteral**, existe evidencia de contagio entre donantes y pacientes durante transfusiones de sangre en países de Europa y Japón, considerados no endémicos para HEV (Colson et al., 2007). Esta vía supone un potencial riesgo para la población en países industrializados y en vías de desarrollo.
- **Vertical** la transmisión madre a hijo se asocia exclusivamente a cepas de genotipo 1 (Kar et al., 2008).
- **Zoonosis** la Hepatitis E es la única entre las hepatitis virales que posee animales no humanos como reservorios, los cuales se presentan asintomáticos a diferencia de los humanos (Pavio et al., 2010).

**Tabla 1.** Características epidemiológicas y clínicas de los cuatro Genotipos (1-4) de HEV.

<b>Genotipo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Hospedero</b>	Humano y aislados de cerdo	Humano	Humanos, cerdos y otras especies mamíferas	
<b>Vías de Transmisión</b>	Fecal-oral, Persona-Persona Materno-Fetal Genotipo 1, probablemente zoonótico		Zoonótico, consumo de carne de animales reservorio cruda o mal cocida. Ambiental (mariscos), a la fecha reportado exclusivamente para genotipo 3 Parenteral.	
<b>Distribución Geográfica</b>	Asia y Latinoamérica (Cuba, Venezuela y Uruguay)	México y varios países Africanos	Mundial	Este de Asia y Europa central
<b>Características Epidemiológicas</b>	Endémico en Asia y Cuba Genera brotes epidémicos y casos esporádicos. Más frecuente en personas jóvenes y viajeros.	Endémico en México? Genera brotes y casos esporádicos en regiones subdesarrolladas. Frecuente en personas jóvenes	Causa casos autóctonos en regiones industrializadas y países no endémicos. Mayor tasa de ataque en adultos y adultos mayores. Mayor letalidad, comparado con genotipo 1.	
<b>Presentación Clínica en Humanos</b>	Asintomática en la mayoría de los casos Hepatitis aguda, autolimitada, de gravedad moderada. Mayor letalidad en pacientes embarazadas, y/o con enfermedades hepáticas crónicas subyacentes.	Infección asintomática en la mayoría de los casos. Hepatitis aguda autolimitada de gravedad moderada.	Hepatitis aguda, autolimitada de gravedad moderada. Puede derivar en cronicidad en pacientes transplantados (hasta la fecha exclusivamente reportado en genotipo 3) e inmunocomprometidos	

Extraído de Mirazo, 2014

## 2.7- Zoonosis

En 1997 en Estados Unidos, se detectó Hepatitis E en cerdos, país que hasta ese momento se consideraba no endémico para HEV (Meng et al., 1997). Posteriores análisis realizados por Meng et al., (1998) sugirieron por primera vez que los suinos serían potencialmente reservorio de HEV.

Una vez establecido el potencial rol del cerdo como reservorio, varios estudios se comenzaron a llevar a cabo para determinar la prevalencia de anticuerpos anti-HEV en piaras de América del sur. En Uruguay, el estado serológico de HEV en suinos, continúa desconocido (Mirazo et al., 2012). Actualmente, en estudios realizados en distintas regiones del mundo se han detectado anticuerpos anti-HEV en numerosas especies animales; entre ellos: cerdos, jabalíes, ratas, perros, gatos, mangostas, vacas, ciervos, ovejas, cabras, conejos, caballos y especies aviares (Pavio et al., 2010). Además, se ha identificado ARN perteneciente a HEV de los genotipos 3 y 4 tanto en cerdos como en jabalíes, ciervos, mangostas y conejos (Pavio et al., 2010). Se demostró que estos genotipos están cercanamente emparentados con cepas humanas, lo que sugiere una posible transmisión interespecies (Meng et al., 1997; Pavio et al., 2010). La expansión en el rango de huésped y nuevos animales reservorio identificados, revelan un problema sanitario de mayor preocupación (Mirazo et al., 2012).

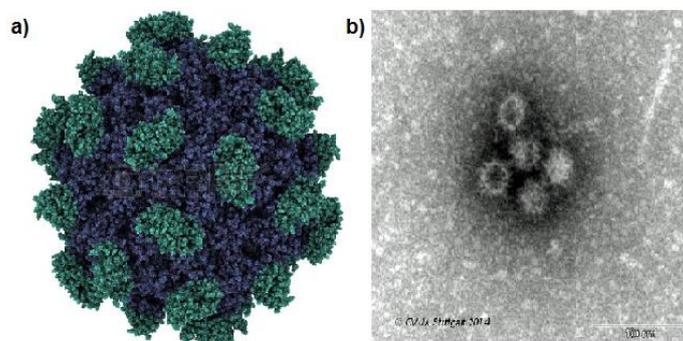
Existe evidencia de la transmisión de HEV a través del consumo de carne contaminada de animales reservorio (Meng et al., 2013; Yazaki et al., 2003) y se ha identificado la transmisión de HEV por consumo de productos cárnicos derivados de animales infectados (Colson et al., 2010). El virus de la Hepatitis

E permanece infeccioso hasta los 60°C, sugiriendo la posibilidad de transmisión por consumo de alimentos crudos o ligeramente cocinados (Yugo y Meng, 2013).

Como el HEV suino, el HEV aviar también está relacionado al HEV humano genéticamente y antigénicamente. Este hallazgo ofrece la posibilidad de estudiar los mecanismos de infección de HEV por especies cruzadas y tropismo tisular (Huang et al., 2005).

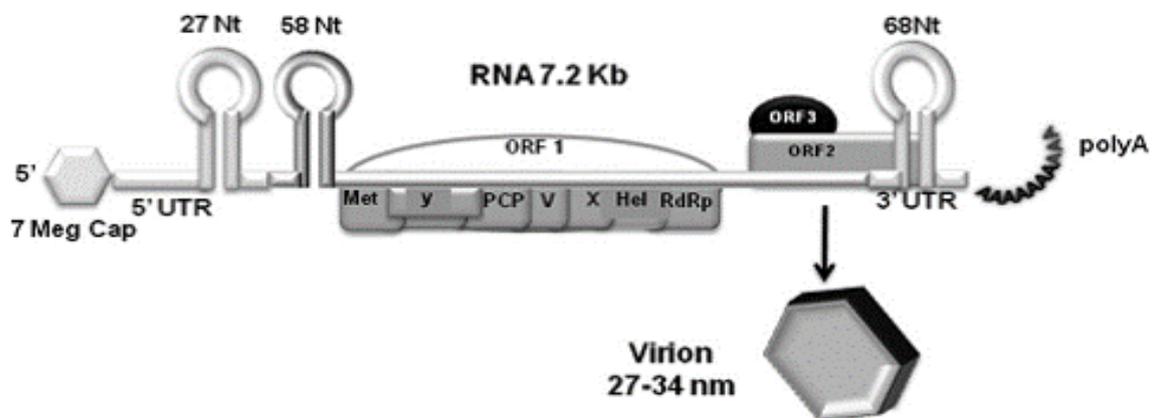
## 2.8- Estructura viral, genoma y proteínas

El HEV es una partícula esférica de 27 a 34 nm de diámetro, de simetría icosaédrica, sin envoltura (Quintana y González, 2003) y en su cápside posee espículas en forma de copa como los *Calicivirus* (Fig. 4), motivo por el cual, en un principio, se los incluyó en esta familia (Feinstone et al., 1973; Bradley et al., 1987; Arankalle et al., 1988). HEV es resistente a la inactivación por las condiciones ácidas y alcalinas leves del tracto intestinal, facilitando la vía de transmisión fecal-oral (Rodríguez-Frias et al., 2012).



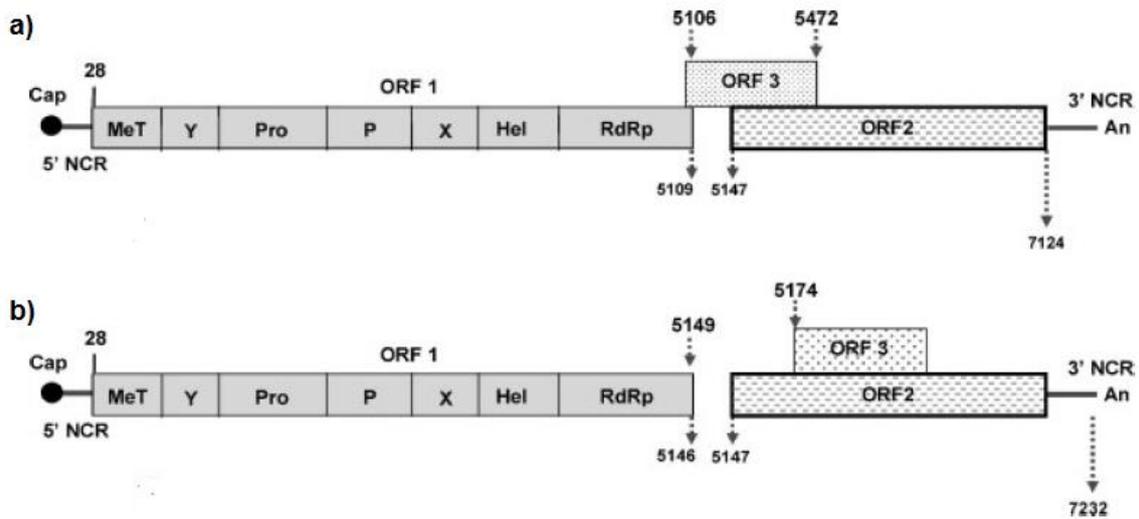
**Figura 4.** a) Representación de HEV. b) Visualización de HEV mediante microscopía electrónica. Extraído de <http://www.ua-bw.de>

El genoma viral, está formado por una sola hebra de ARN de sentido positivo de 7,2 Kb con tres marcos abiertos de lectura (ORF) parcialmente solapados: ORF1, ORF2 y ORF3 (Tam et al., 1991) flanqueadas en los extremos 5' y 3' por dos regiones no codificantes. Hacia el extremo 5' se encuentra un Cap de metil-guanina, éste, además de auxiliar en la traducción a través del reconocimiento del ribosoma, podría ser importante protegiendo al virus de la respuesta innata del huésped (Imran et al., 2011), también se encuentra una secuencia conservada de unos 58 nt que se pliega en forma de estructuras tallo-bucle, esenciales para la replicación y transcripción del virus (Tam et al., 1996). Hacia el extremo 3' se encuentra un segmento poli (A) (Fig. 5) (Tam et al., 1991).



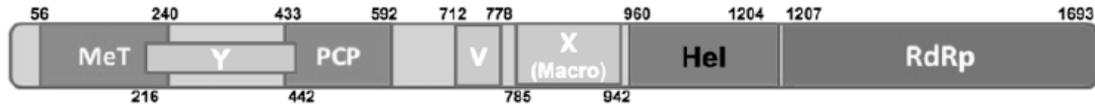
**Figura 5.** Organización del genoma de HEV. Posee tres marcos abiertos de lectura ORF1, ORF2 y ORF3. Se observan las regiones no codificantes, 5' Cap de metil-guanina y 3' poli (A) y estructuras conservadas cerca del 5' con conformación de tallo-bucle. Extraído de Echevarría et al., 2013.

Tres proteínas virales son codificadas por los ORF1, ORF2 y ORF3 del genoma viral (Fig. 6). Su presencia durante la infección por HEV es confirmada por la producción de anticuerpos contra estas proteínas en humanos y animales experimentales (Khudyakov et al., 1994; Panda et al., 1995).



**Figura 6. Distribución genómica de HEV a) genotipo 1 – 3 b) genotipo 4.** Extraído de Panda et al., 2006

El **ORF1** (Fig. 7) de unos 5000 nt, codifica una poliproteína de 1693 aa, la cual está implicada en las funciones virales no estructurales (Koonin et al., 1992). Los dominios funcionales identificados en la poliproteína incluyen (comenzando del N-terminal): metil-transferasa (MeT), cisteín-proteasa, ARN helicasa (muchos virus ARN de polaridad positiva la codifican y es esencial para la replicación del genoma viral) (Imran et al., 2011) y ARN polimerasa ARN dependiente (enzima fundamental, encontrada en todos los virus de ARN, implicada en la replicación del genoma, que utiliza un ARN de polaridad negativa como intermediario) (Rehman et al., 2008).



**Figura 7. Dominios de ORF1.** **MeT:** Metil-transferesa, **PCP:** Cisteín proteasa, **Hel:** Helicasa, **RdRp:** ARN polimerasa ARN dependiente. **Dominios Y, X:** no del todo caracterizados. Extraído de Imran et al., 2012.

Además el ORF1 posee dominios no del todo caracterizados: el dominio Y y el dominio X o “macro”, conservado en varios virus animales de hebra ARN de polaridad positiva, posiblemente esté implicado en la replicación y transcripción (Neuvonen y Ahola, 2009).

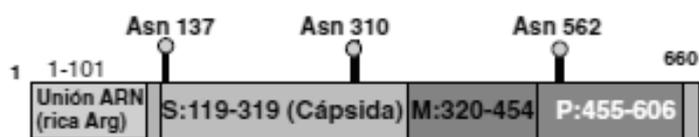
Dentro del ORF1 se encuentra la región hipervariable (HVR) de HEV, que se solapa a la secuencia localizada entre el dominio X y la porción C-terminal de la cisteín- proteasa (Koonin et al., 1992). Las HVR varían en secuencia y longitud entre los diferentes HEV, y se demostró que la infectividad de HEV puede tolerar pequeñas deleciones en el HVR siendo estos residuos aminoacídicos dispensables para la infectividad del virus (Pudupakan et al., 2009), por lo tanto, aunque tolere las deleciones, estas secuencias podrían interactuar con factores virales y del huésped modulando la eficiencia de la replicación de HEV (Pudupakan et al., 2011).

La región entre el final del ORF1 y el comienzo de ORF3/ORF2 parece contener elementos regulatorios (Imran et al., 2012).

El **ORF2** (Fig. 8) de unos 2000 nt codifica la proteína de la cápside de HEV, la cual posee 660 aa y es la encargada de encapsidar el genoma viral (Purdy et al., 1993). Contiene hacia el N-terminal una secuencia señal que transloca la proteína al retículo endoplásmico donde se glicosila (Jame et al., 1996).

Mutaciones en los sitios de glicosilación de ORF2 previenen la formación de partículas virales infecciosas (Graff et al., 2008).

La proteína codificada por el ORF2 contiene tres dominios lineales (Xing et al, 2010): el dominio Shell (S) (aa 119-319) que forma la cápside y los dominios Middle (M) (aa 320-454) y Protruding (P) (aa 320-606), que se relacionan con la interacción virus-célula huésped. El dominio P queda expuesto al exterior de la cápside y es el sitio de unión de anticuerpos neutralizantes (Ahmad et al., 2011).



**Figura 8. Dominios de ORF2.** S: Shell, M: Middle P: Protruding. Asn 137, 310, 562: sitios de glicosilación. Extraído de Rodríguez-Frias et al., 2012

El **ORF3** (Fig. 9) de unos 370 nt, se encuentra casi totalmente solapado a ORF2. Se sugirió que la proteína ORF3 se traduce a partir de un ARN subgenómico bicistrónico con dos codones AUG, y codifica una fosfoproteína de unos 114 aa que se asocia al citoesqueleto (Zafrullah et al., 1997). La región C-terminal, posee varios dominios multifuncionales: dominios hidrofóbicos D1 y D2.

El dominio D1 se une a una fosfatasa, evitando cambios conformacionales en la misma (Kar-Roy et al., 2004) de este modo se activa de forma prolongada la quinasa regulada extracelularmente (Erk), constituyendo una posible señal de supervivencia y proliferación celular (Moin et al., 2007). D2 interacciona con

una glucoproteína de fase aguda, cuyos niveles plasmáticos descienden en infectados por HEV (Taneja et al., 2009).

ORF3 también posee dos regiones ricas en prolina P1 y P2; P1 está asociado a la salida del virus de la célula (Imran et al., 2012).

Las interacciones de ORF3 pueden favorecer la replicación viral, alargando la vida de las células infectadas al atenuar la vía intrínseca de muerte y regular negativamente la respuesta inmune innata por la reducción de expresión de proteínas de fase aguda (Chandra et al., 2008). Algunos estudios también sugieren un rol en el egreso del virus (Rodríguez-Frias et al., 2012).

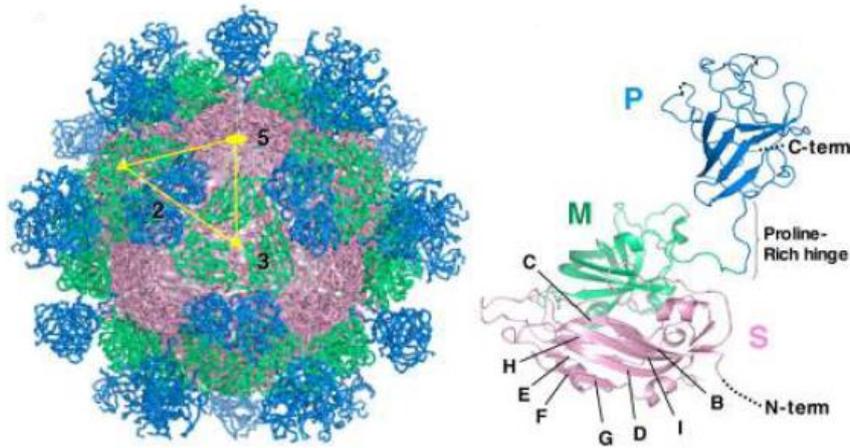


**Figura 9. Dominios de ORF3.** D1 y D2: dominios hidrofóbicos de unión al citoesqueleto y Erk, activan señal de supervivencia celular. P1 y P2: regiones ricas en prolina, asociadas a la salida del virus de la célula. Extraídos de Imran et al., 2012.

## 2.9- Dominios de ORF2

Como se mencionó anteriormente, los monómeros de la proteína ORF2 contienen tres dominios diferentes: S, M, y P (Fig. 10). 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; 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 de una parte de M, y P completo, es capaz de unirse a la membrana de varias líneas celulares, sugiriendo que el

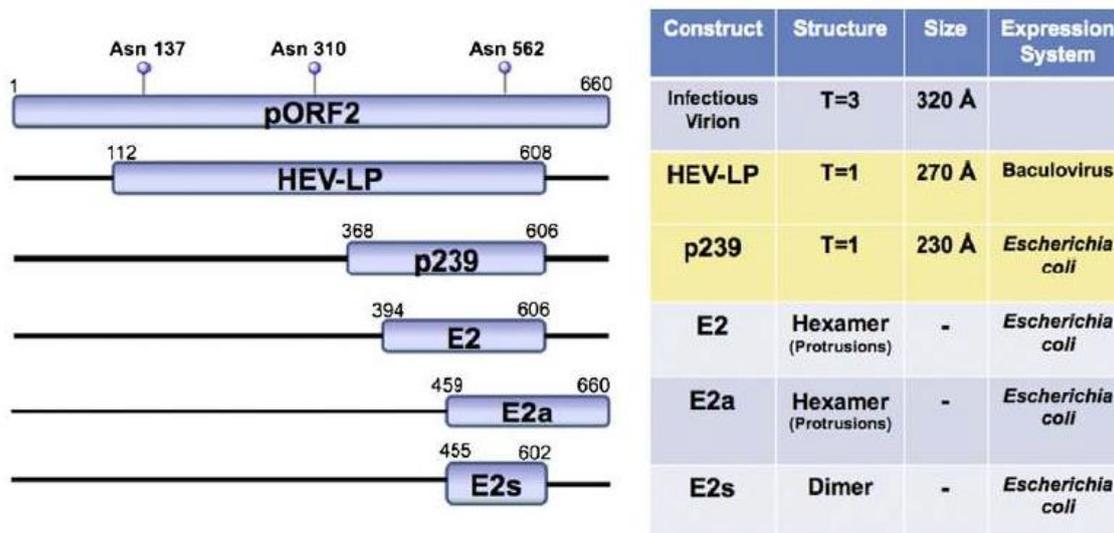
dominio P, además de estar implicado en la unión con moléculas receptoras, está involucrado en la unión a receptores celulares (Yamashita et al., 2009).



**Figura 10. a)** Estructura cristalográfica de HEV VLP, **b)** Diagrama de cintas representa los dominios S, M y P de la proteína de la cápside. Extraído de Yamashita et al., 2009.

Las proteínas ORF2 recombinantes expresadas en *E. coli* han demostrado ensamblarse en estructuras de orden superior; p239 (aa 368-606), E2 (aa 394-606) y E2a (aa 459-660), las cuales se conservan predominantemente como homodímeros, bajo condiciones ligeramente disociantes, modelan los determinantes antigénicos dominantes y los sitios de neutralización de HEV (Li et al., 2009) (Fig. 11). La estructura cristalográfica de la proteína E2s (aa 455-602) muestra que forma un homodímero compacto esencial para la interacción HEV con la célula huésped, y a su vez contiene el sitio de reconocimiento de anticuerpos neutralizantes de HEV. Es, de hecho el dominio antigénico mínimo (DAM) de la proteína de cápside. Este dominio proteico no parece mostrar ninguna secuencia o estructura homóloga con otras proteínas virales conocidas (Li et al., 2009). A su vez, E2s es la construcción más pequeña entre las E2

que pueden dimerizar y reconocer anticuerpos anti-HEV. Contiene los residuos más conservados para la dimerización de la región E2. Se sugiere que E2s está presente en la superficie de las protrusiones de HEV según se visualiza mediante microscopía electrónica (Li et al., 2009).



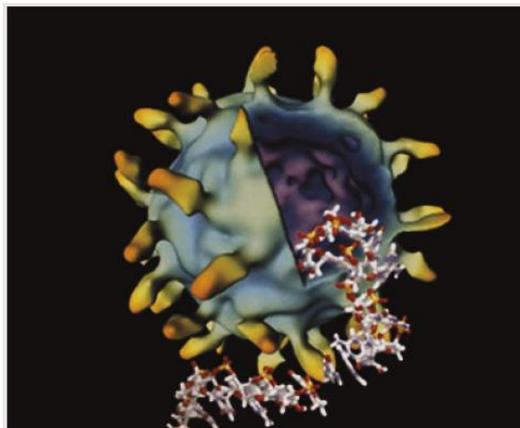
**Figura 11. Proteína de cápside ORF2 de HEV:** Una proteína truncada de 56 kDa (aa 112-607) se auto-ensamblan en células de insectos para formar partículas similares a virus. Construcciones más cortas: p239 formada a partir de interacciones diméricas, E2s y E2a forman protuberancias hexaméricas en la superficie. E2s se ha propuesto como el dominio de dimerización. Extraído de Imran AR., et al., 2012; Yamashita et al., 2009

Se ha demostrado que anticuerpos monoclonales son capaces de neutralizar *in vitro* e *in vivo* la infección por HEV (Shofield et al., 2003; Emerson et al., 2006) y muchos de ellos, reconocen epítopes conformacionales de la cápside proteica (Yamashita et al., 2009). Por otra parte, anticuerpos monoclonales contra epítopes lineales localizados en los aminoácidos 423-438 y 423-443 del dominio M de la cápside del genotipo 1, neutralizaron la unión del péptido de la cápside a las células (He et al., 2008), sugiriendo la importancia de M en el paso de unión.

## 2.10- Virus-Like Particles (VLPs)

Con la intención de estudiar técnicas con el fin de traducir el ORF2 de HEV a una proteína que contenga una secuencia señal putativa y sitios de glicosilación (Tam et al., 1991; Jameel et al., 1996), se ha expresado *in vitro* mediante sistemas heterólogos de expresión, incluyendo *E.coli* (Panda et al., 1995), plásmidos en células de mamíferos (Jameel et al., 1996), vectores alfavirus (Torresi et al., 1997; Torresi et al., 1999), sistema de expresión basada en baculovirus (Robinson et al., 1998; Mc Atee CP., et al., 1996), vaccinia virus recombinante (Carl et al., 1994) y levadura (Tyogi et al., 2001a,b).

Mediante estas técnicas se ha logrado producir partículas recombinantes de HEV autoensambladas, sus estructuras tridimensionales fueron resueltas por microscopía crioelectrónica en una resolución de 22 Å y reconstrucción de imagen tridimensional observándose que la cápside está dominada por dímeros que definen las 30 unidades morfológicas (Fig. 12) (Xing et al., 1999).



**Figura 12. Partícula del virus de Hepatitis E:** Estructura tridimensional resuelta a 22 Å mediante microscopía crioelectrónica y reconstrucción de imagen. Extraído de Panda et al., 2006.

Los métodos de microscopía electrónica y reconstrucción de imagen mostraron un VLP de estructura T=1 con dímeros que protruyen en los ejes de doble simetría icosaédrica de manera que los 60 monómeros se organizan como 30 unidades morfológicas (Xing et al., 1999). Xing et al., (2010) produjo un virión de gran tamaño (T=3) y uno pequeño (T=1), expresando la proteína de ORF2 en células de insecto con o sin el aa 111 del N-terminal, respectivamente. La partícula del virión T=3 contenía 2 Kb de ARN derivado del ORF2, mientras que T=1 no encapsidaba ARN. Incluso el ORF2 truncado es capaz de autoensamblarse en partículas similares a virus (VLPs) en células Tn5, sin necesidad de ORF1 y ORF3 de estar incluidos en el constructo recombinante de HEV; demostrándose que no son esenciales para el ensamblaje de la partícula (Xing et al., 1999).

Las ventajas de las partículas similares a virus, radican en que éstas comparten propiedades morfológicas antigénicas con el virión nativo aunque están vacías y son más pequeñas (Xing et al., 1999). También, en la alta productividad, en combinación con la antigenicidad retenida en las partículas; haciendo de éstas, candidatas ideales para las vacunas contra hepatitis E.

## **2.11- Sitios antigénicos neutralizantes y vacunas**

### **2.11.1- Sitios antigénicos neutralizantes**

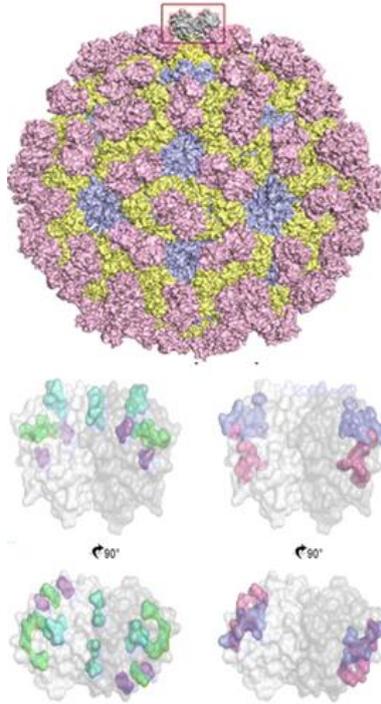
Como se mencionó anteriormente, solo hay un único serotipo identificado (Khuroo et al., 2008), sugiriendo que el dominio de HEV inmunodominante está altamente conservado entre genotipos. Confirmando este hecho se logró

observar que las características estructurales del dominio E2s son compartidas por los cuatro genotipos humanos, (Zhao et al., 2012) y como consecuencia, los anticuerpos de cualquiera de estos, pueden reaccionar de forma cruzada con los epítopes de la cápside proteica del genotipo 1 (Emerson et al., 2006).

Debido a la carencia de un cultivo celular adecuado para la replicación de HEV, nuestro entendimiento de la inmunología, se basa principalmente en estudios que utilizan proteínas recombinantes expresadas en *E.coli* (Ridell et al., 2000) o VLPs utilizando sistemas de expresión como baculovirus (Li et al., 1997; Robinson et al., 1998).

Anticuerpos contra péptidos sintéticos y proteínas recombinantes cortas de 100 aa, no neutralizan HEV, sugiriendo que los epítopes de neutralización de este virus son conformación-dependientes. En tales casos, los epítopes neutralizantes pueden ser modelados solo con fragmentos de proteínas que contengan toda la información necesaria para dirigir el plegamiento correcto (Meng et al., 2001). El péptido mínimo requerido para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes de HEV corresponde a la región de 148 residuos de ORF2, desde el aa 459 al 607 (Zhou et al., 2005) que como se mencionó anteriormente, corresponde al E2s (Fig. 13) ubicado en el dominio P.

La mayoría de los ensayos serológicos para diagnosticar HEV usa proteínas recombinantes derivados de ORF2 y/o ORF3, pero se ha reportado que los anticuerpos anti-ORF2, pueden reaccionar inespecíficamente (Panda et al., 1995). Los ensayos serológicos comerciales están basados en los genotipos 1 y 2 y podrían ser menos sensibles para detectar genotipos 3 o 4 (Herremans et al., 2007; Wang et al., 2001).



**Figura 13. Estructura dimérica de E2s:** sitios neutralizantes identificados mapeados en el dominio E2s. Extraído de Zhao et al., 2012

La alta inmunorreactividad en las muestras de suero fue demostrado contra ORF2 recombinante, particularmente en la forma dimérica, pero no en forma monomérica (Zhao et al., 2013).

Estudios realizados en monos *Rhesus* infectados experimentalmente con diferentes genotipos de HEV (Zhang et al., 2003) demostraron que anticuerpos IgM e IgG específicos contra el dominio E2 de ORF2, se desarrollaban rápidamente a altos niveles luego de la infección, pero mientras que los anticuerpos IgG persistieron en los animales por 86 semanas o más, los anticuerpos IgM disminuyeron luego de la fase aguda de la infección.

El hecho de que E2 pudiera proteger monos luego de la infección con HEV, implica que el péptido es capaz de modelar los sitios de neutralización y

serviría como péptido candidato para una potencial vacuna (Li et al., 2005). Hasta la fecha, todos los sitios neutralizantes fueron conformacionales y mapearon en el dominio E2s de ORF2 (Zhao et al., 2012). Wei et al. (2014) realizaron estudios mediante la técnica de ELISA “sandwich”, donde inmovilizaron p239 (239 aa, desde 368 al 606, capaz de formar partículas similares a virus que mantienen los epítopes neutralizantes en la superficie) o E2s (148 aa, desde el 455 al 606, necesarios para la formación de dímeros) en una superficie sólida y observaron buena actividad de unión en diluciones seriadas con anticuerpo 8C11 en ambos antígenos, indicando dímeros similares en los epítopes. Este anticuerpo de tipo IgG1 se une a dominios extracelulares de N-cadherina. Las diferencias encontradas radican en que E2s solo posee dos dímeros, mientras que las VLPs generadas con p239 poseen varios dímeros de unión (Zhao et al., 2012).

### **2.11.2- Vacunas**

Dos vacunas contra HEV se han sometido a pruebas clínicas con éxito en seres humanos. Éstas se basan en proteínas ORF2 recombinantes del genotipo 1.

La primera expresa una proteína recombinante de 56 KDa en células de insecto mediante el sistema de expresión de baculovirus y se confirma que los epítopes neutralizantes están presentes en la cápside. Este péptido fue altamente inmunogénico en monos *Rhesus* y *Cynomolgus* protegiendo a los animales contra cepas de genotipo homólogo y heterólogos (Tsarev et al., 1994; Tsarev et al., 1997).

Esta vacuna ha sido sometida a estudios de seguridad y eficacia en seres humanos que se desarrollaron en tres etapas de inmunización de la proteína recombinante junto con adyuvante de aluminio con un posterior seguimiento de dos años (Shrestha et al., 2007). En dicho estudio se concluyó que la vacuna no mostraba ninguna protección después de una dosis. Luego de dos dosis sin embargo, se mejoraba la protección, pero no se lograba establecer con certeza debido a la discordancia de los resultados obtenidos. Los niveles de anticuerpo crecieron con la segunda dosis y luego declinaron hasta que se aplicó la tercera y última, pero la protección persistió. A partir de la tercer dosis, el nivel de anticuerpos anti-HEV aumentó en un factor de diez (Shrestha et al., 2007), evidenciando que se habría generado memoria inmunológica con las dos primeras inmunizaciones.

La segunda vacuna se basa en p239 expresada como partículas en *E. coli*. Este péptido tiene 26 aa de extensión desde el N-terminal del E2 y comparten tanto características estructurales como antigénicas, pero p239 es altamente inmunogénico, presumiblemente por su naturaleza particulada (Li et al., 2005). La antigenicidad de ambos péptidos, como ya se mencionó, está asociada con su forma dimérica (Zhang et al., 2005; Li et al., 2005).

La eficacia de esta vacuna, es comparable con la de la proteína recombinante de 56 kDa, aunque los niveles de anticuerpos inducidos por ésta, son mayores (Li et al., 1997).

Son necesarios más estudios para determinar la duración de la protección por la vacuna, la necesidad de *boosters* y su eficacia en prevenir la enfermedad cuando se administra luego de la exposición a HEV (Zhao et al., 2013), así

como estudios sobre la seguridad de esta vacuna en mujeres embarazadas, niños y personas con enfermedad hepática crónica. Por otra parte deberían incluir los Genotipos 3 y 4, responsables de los casos autóctonos esporádicos en todo el mundo, y con el mayor potencial zoonótico (Mirazo, 2014).

## **2.12- Proteína Z del virus Junin**

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. 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) y un péptido estable que sirve como señal para clivar la GP (Eichler et al., 2003); mientras que la hebra L de ARN codifica para la ARN polimerasa ARN dependiente 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., 1989 a,b).

La proteína Z contiene un motivo en forma de anillo con actividad de unión a estructuras de 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 ocho aa. Están altamente conservados y se ha demostrado que median la interacción con las proteínas de las células

huésped. Análisis mutagénicos revelaron que ambos son necesarios para la mediación del brotamiento, una de las funciones atribuidas a esta proteína. Pérez et al., (2003) evidenció esta proteína, como la fuerza principal para el brotamiento de los *Arenavirus*.

Otras funciones descritas para la proteína Z son: efecto inhibitorio de la replicación del ARN viral y transcripción a través de su interacción con proteínas tardías (Wildo et al., 2008; López et al., 2001), capacidad de interactuar en el reclutamiento de la nucleoproteína viral (Neuman et al., 2005; Shtauno et al., 2010), 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 para el ensamble y liberación de VLPs y que sólo ésta es capaz de unirse fuertemente a la membrana como proteína de matriz. También demostraron que la expresión de la proteína Z recombinante en ausencia de otras proteínas virales es suficiente para liberar las partículas virales con envoltura lipídica.

Recientemente se ha confirmado que las proteínas de la matriz viral juegan roles críticos en las últimas etapas de replicación de virus ARN, y cuando se expresan en células por sí solas, éstas liberan VLPs (Parent et al., 1995; Wills et al., 1994), pero para la producción de VLPs infecciosas es necesario además de la presencia de la proteína Z, la GP (Lee et al., 2002). Se ha reportado, que la inserción de epítopes en la secuencia de pZ con una longitud de 20-30 aa sigue permitiendo la formación de los VLPs sin interferir con la actividad de brotamiento (Chackeiran B., 2007).

En síntesis, es sabido que las vacunas particuladas son más seguras que las atenuadas o las inactivadas, pero a menudo cuando se expresa y purifica una única proteína en ausencia de otros componentes virales, estos son menos inmunogénicos que aquellos que se incorporan en partículas infecciosas. En este sentido, las vacunas basadas en VLPs son altamente efectivas como vacunas particuladas, porque mimetizan la estructura superficial de las partículas virales en ausencia de ácido nucleico, siendo absolutamente no infecciosas (Roy y Noad, 2008). Este tipo de vacuna por lo general no necesita de la administración de adyuvante, sustancia responsable del aumento de la respuesta inmunológica contra el antígeno. Los mecanismos de activación varían de acuerdo con cada tipo de VLP, tamaño, estructura, vía de administración, presencia o ausencia de adyuvante (Kushinir et al., 2012; Levine et al., 2009). Estas propiedades han sido utilizadas previamente para desarrollar un sistema de expresión de antígenos heterólogos el cual puede inducir respuesta de anticuerpos incluso en ausencia de adyuvante (Borio et al., 2012, Mareze et al., 2015).

Este trabajo pretende utilizar las ventajas del sistema de VLPs descrito, para expresar el dominio antigénico E2s del ORF2 de HEV en células eucariotas y analizar la formación de VLPs, las cuales al mimetizar las características estructurales del virus en ausencia del ácido nucleico, son mucho más seguras que otras vacunas como las atenuadas o inactivadas; y es por ello que se eligió este sistema con el cual, eventualmente poder desarrollar vacunas para la prevención de la infección por HEV.



## 3- Objetivos

---

### Objetivo general

Diseñar, desarrollar y evaluar en forma preliminar un sistema de expresión del antígeno E2s de HEV basado en la estrategia de Virus – like particles (VLPs) empleando las características biológicas de la proteína Z del virus Junin, para su potencial uso como estrategia inmunoprotectora en la prevención de la infección por HEVs.

### Objetivos específicos

- Diseñar y poner a punto las técnicas de biología molecular necesarias para amplificar la secuencia de E2s dentro del gen codificado por el ORF2 viral.
- Construir, obtener y verificar los plásmidos a ser empleados, mediante técnicas de ADN recombinante y biología molecular.
- Diseñar e implementar la transfección de los plásmidos en células HEK 293 y la expresión de las Virus Like Particles (VLPs).
- Implementar un método de obtención y purificación de las VLPs obtenidas en el sobrenadante de la transfección de las células HEK 293.
- Observar las VLPs empleando técnicas de microscopía electrónica de transmisión.
- Evaluar la expresión de E2s mediante técnicas inmunoenzimáticas.



## 4- Estrategia de trabajo

---

En análisis preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio se evaluó la capacidad de un sistema de expresión de antígeno basado en la tecnología VLP, en células eucariotas, utilizando las propiedades biológicas del virus Junin para expresar el ORF2 de HEV (Mirazo, 2014).

En este trabajo (Fig. 14) se escogió utilizar el mismo sistema para expresar el dominio mínimo antigénico, incluido dentro de la región codificante del ORF2 (aa 455-602), E2s un segmento de 500 nt y 148 aa. Para ello se deberá amplificar el segmento deseado mediante PCR a través del diseño de un par de primers que incluyan sitios de reconocimiento de enzimas de restricción. Posteriormente se clonará primeramente en un vector comercial de clonado, y luego, empleando las enzimas de restricción apropiadas, en el vector que contiene el gen de la proteína Z del virus Junín (pZ-N3). Una vez obtenido el plásmido se realizará la transfección de células eucariotas HEK 293 y se purificarán las VLPs obtenidas en el sobrenadante. La generación de las VLPs y la correcta expresión de E2s se verificará por microscopía electrónica, ensayos inmunoenzimáticos y de fluorescencia.

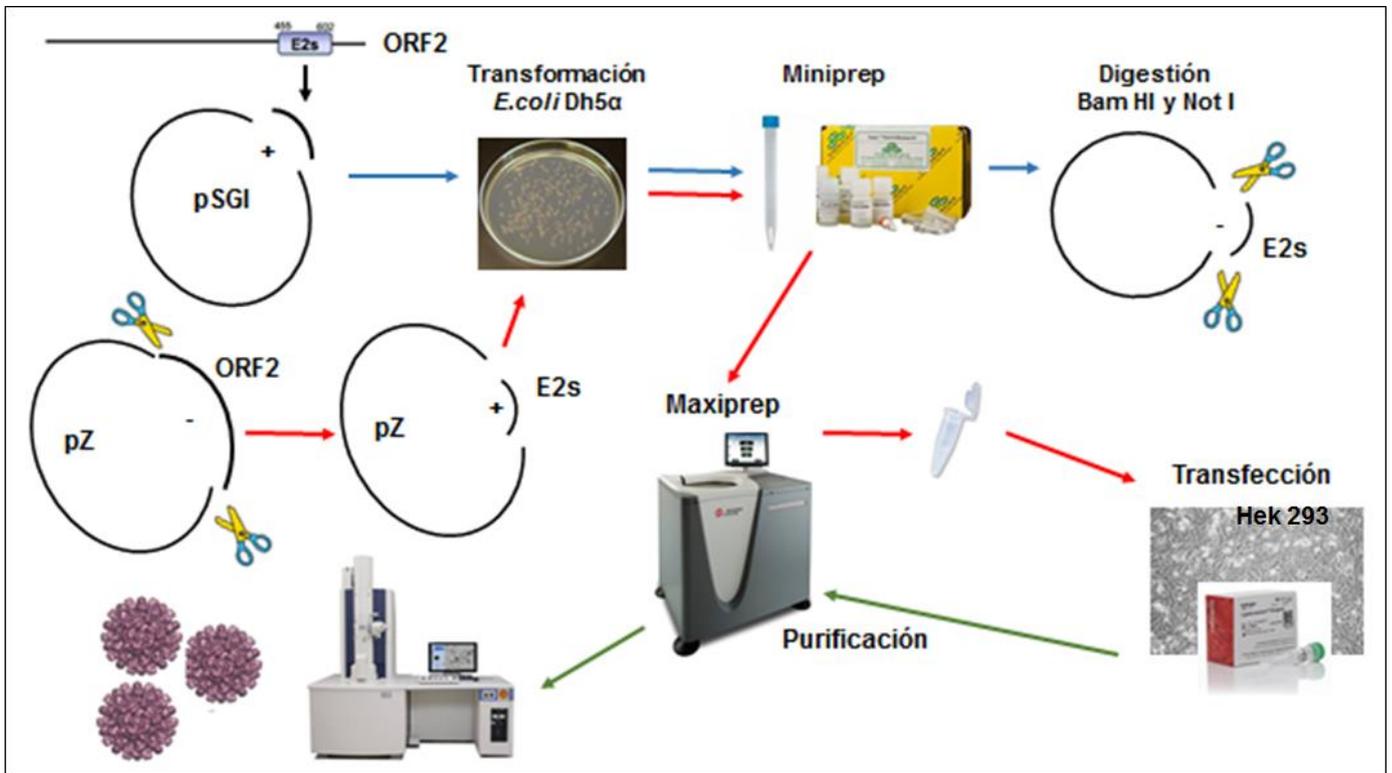


Figura 14. Esquema de la estrategia de trabajo



# 5- Materiales y Métodos

## 5.1- Diseño de primers y amplificación de E2s por PCR

### 5.1.1- Primers y amplificación de E2s

Con el objetivo de amplificar la secuencia E2s incluida en el segmento ORF2 de HEV se diseñaron primers específicos, indicados en la Tabla 2. Éstos fueron posteriormente modificados para contener los sitios de restricción para las enzimas *Bam HI* y *Not I* (Fermentas Thermo Scientific, Estados Unidos) en los primers forward y reverse, respectivamente.

**Tabla 2.** Primers y ciclado para la amplificación de E2s

Polaridad	Secuencia	Tm	Ciclado	Ciclos
-	GATAAC CAA CATGAA CAA GAC <u>gGatCc</u> ACG CCT	64,4°C	95(45") 58(1') 72(1')	35
+	CATCAA AAG TAP GGG <u>CGgccG</u> CAG GGT TAAC	65,5°C		

+ polaridad positiva, - polaridad negativa.

Las bases modificadas para generar un sitio de restricción (subrayado) se muestran en minúscula

Se realizó una PCR convencional para amplificar el segmento de 500 pb correspondiente al segmento que codifica el mínimo dominio neutralizante, E2s. Ésta se realizó en un volumen final de 50 µL y se colocaron 34,6 µL de H<sub>2</sub>O estéril, 5 µL de Buffer Taq 10X, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de primer E2s F (50 mM) y E2s R (50 mM), 3 µL de ADN plasmídico pZ-ORF2 (530 µg/mL), 0,4 µL de Taq<sup>TM</sup> DNA Polimerasa (Fermentas, Life

Sciences, Estados Unidos). El ciclado corresponde a un primer paso de 5 min a 98°C de desnaturalización, 30 ciclos de 45 seg a 95°C, 1 min a 58°C y 1 min a 72°C; una última etapa de extensión se realiza a 72°C durante 10 min. Para visualizar la correcta amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1,5 % y se purificó la muestra mediante Nucleospin® Gel and PCR clean up (Macherey-Nagel, Alemania), según las indicaciones del fabricante.

### **5.1.2- Clonado en pSGI**

Para la construcción del primer plásmido, el fragmento correspondiente a E2s purificado fue clonado en un vector pSGI (Promega, Estados Unidos) de 4,2 Kb. Para ello, se realizó la ligación en un volumen final de 20 µL agregándose, en un primer paso, 1 µL de enzima Blunting (Fermentas Thermo Scientific, Estados Unidos), 2 µL de Buffer 10X, 11 µL del producto purificado E2s (13 µg/mL), y 4 µL de H<sub>2</sub>O estéril y dejándose 5 min a 70°C. Posteriormente se procedió a agregar 1 µL de enzima ligasa T4 (Fermentas Thermo Scientific, Estados Unidos) y 1 µL del vector pSGI (50 µg/mL) y se dejó la mezcla terminada, 1 hr a 22°C.

Una vez obtenido el inserto ligado con el plásmido se procedió a transformar bacterias competentes *E.coli* Dh5α (New England Biolabs, Estados Unidos) mediante tratamiento de shock térmico según el siguiente protocolo: se mezclaron 3 µL del producto de ligación con 25 µL de bacterias en un eppendorf de 1,5 mL y se lo colocó en hielo durante 30 min. Ulteriormente se colocó a 42°C durante 45 seg y nuevamente en hielo por 5 min. Se adicionó al *mix* 250 µL de medio SOC y se dejó 1 hr a 37°C y 220 r.p.m.

Finalmente las bacterias fueron sembradas en placas de Petri, en medio LB agar con ampicilina (100 µg/mL) con el objetivo de obtener colonias resistentes que hayan incorporado el plásmido.

Se dejaron 24 hrs 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 r.p.m durante 18-20 hrs. Luego de ese período se extrajo el plásmido empleando el kit Zyppy™ Plasma Miniprep Kit (Zymo Research, Estados Unidos) tal lo dicta el fabricante.

Para verificar la correcta inserción del fragmento, se realizó restricción de los plásmidos extraídos, con las correspondientes enzimas en un volumen final de 20 µL, en el cual se colocó 3 µL de H<sub>2</sub>O estéril, 2 µL de Buffer *Bam*HI 10X, 1 µL de enzimas *Bam* HI y *Not* I (Fermentas, Thermo Scientific, Estados Unidos), ADN plasmídico pSGI-E2s (270 µg/mL). Posteriormente se colocó la mezcla a 37°C durante 2 hrs y finalmente 15 min a 80°C con el fin de inactivar las enzimas. La correcta escisión del fragmento se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.

## **5.2- Construcción de plásmidos pZ-E2s y controles**

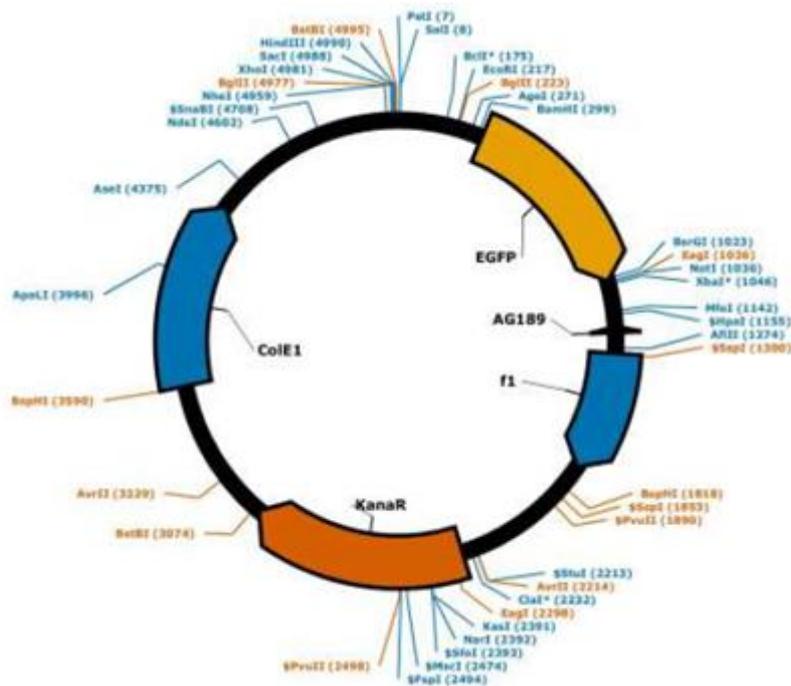
### **5.2.1- Ligación y transformación**

En forma paralela se dejaron crecer bacterias *E.coli* conteniendo los plásmidos control pZ-N3 y pZ-EGFP, el cual contiene una proteína reportera (*Green Fluorescent Protein*, GFP) (cedidos por la Dra. Cristina Borio de la Universidad Nacional de Quilmes), en 3 mL de medio LB líquido con kanamicina (50 µg/mL)

durante 18 hrs a 37°C y 220 r.p.m. Luego se les realizó la extracción del ADN plasmídico mediante kit Zyppy™ Plasma Miniprep Kit (Zymo Research, Estados Unidos) según las indicaciones del fabricante.

Los plásmidos control pZ-EGFP y pZ-N3, fueron obtenidos mediante diferentes técnicas de extracción de plásmido: Maxiprep *in house* y por Kit según las indicaciones del fabricante Nucleobond® Xtra Maxi Plus (Macherey-Nagel, Alemania). Estas técnicas de Maxiprep, a diferencia de las técnicas de extracción por Miniprep, se realizan con el objetivo de obtener ADN plasmídico ultra puro, en alta concentración, para inmunizar animales y/o transfectar células en gran escala.

Una vez obtenido el plásmido pZ-EGFP, fue digerido con *Bam HI* y *Not I* con el fin de liberar la secuencia correspondiente a GFP y generar extremos cohesivos en el plásmido pZ-N3 (Fig. 15). Lo mismo se realizó con el plásmido pSGI-E2s para liberar el inserto, purificarlo empleando un kit comercial Nucleospin® Gel and PCR clean up (Macherey-Nagel, Alemania) y ligarlo con el plásmido pZ-N3 según el siguiente protocolo: en un volumen final de 20 µL, se agregó 10 µL de H<sub>2</sub>O, 2 µL de Buffer 10X, 1 µL de ligasa T4 (Fermentas Thermo Scientific, Estados Unidos), 1 µL de plásmido pZ-N3 (45 µg/mL) y 6 µL del producto de purificación de E2s (17 µg/mL), previamente escindido del plásmido pSGI. Una vez finalizada la muestra, se lo dejó 1 hr a 22°C. Ulteriormente se procedió con la transformación de bacterias *E.coli* Dh5α (New England Biolabs, Estados Unidos) siguiendo el mismo protocolo que se mencionó anteriormente.



**Figura 15.** Mapa del plásmido que codifica la proteína Z del virus Junín en marco de lectura con la proteína verde fluorescente (GFP, Green protein fluorescent). Fue escindido con *Bam HI* y *Not I* el segmento GFP para poder clonar ORF2 y luego se escindió éste para clonar E2s. Extraído de Mirazo, 2014

## 5.2.2- Electroforesis en gel de agarosa

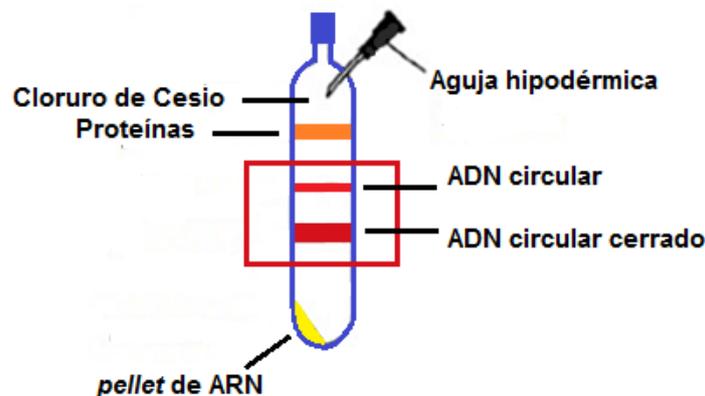
La visualización de las bandas de 500 pb para el caso de la amplificación del E2s y de 5000 pb en el caso de la proteína pZ-N3, se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio. Para esto se colocaron 500 mg de Agarosa (Amresco, Estados Unidos) en 50 mL de buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X y posteriormente se añadieron 2,5 µL de Bromuro de Etidio (Invitrogen™ Life Technologies, Estados Unidos). A las muestras se les agregó 2 µL de buffer de carga 6X (Fermentas, Life Technologies, Estados Unidos). Además de las muestras pZ-E2s y el control negativo pZ-N3 se incluyó en la corrida electroforética al marcador de peso

molecular de 100 pb y de 1 Kb (DNA Ladder, Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos).

### **5.2.3- Extracción de plásmidos por Maxiprep**

Para realizar este procedimiento para la extracción de plásmidos en grandes cantidades, se colocaron en un tubo Falcon de 15 mL, estéril, 5-6 mL de medio líquido LB con el antibiótico apropiado, en este caso, kanamicina, ya que pZ-E2s, pZ-N3 y pZ-EGFP poseen resistencia a este antibiótico y se agregaron 20  $\mu$ L de bacterias *E.coli* conteniendo dichos plásmidos, dejándose en estufa a 37°C agitando durante 7 u 8 hrs. Posteriormente, para 500 mL de cultivo, se colocaron en dos frascos de medio litro, 230-250 mL de medio LB líquido con kanamicina (25  $\mu$ g/mL), se agregó 1 mL del preinóculo y se dejó agitando a 37°C cerca de 16 hrs. Para la resuspensión del pellet se transfirieron las bacterias a tubos de centrifuga autoclavados de 250 mL y se centrifugó 20 min a 4°C a 5000 r.p.m. Se resuspendió en 18 mL de buffer GTE (glucosa 50 mM, Tris 25 mM, EDTA 10 mM) y se adicionaron 2 mL de solución de lisozima (10 mg/mL en Tris 10 mM fresca) para luego incubar durante 5 minutos a TA. Luego se agregaron 40 mL de solución de lisis (NaOH 0,2 N, SDS 1% fresca). Se incubó 10 min a temperatura ambiente y por último se adicionaron 20 mL de Acetato de potasio 3 M frío, y se mezcló. Se incubó en hielo durante 10 min antes de transferirlo a 3 tubos Falcon de 50 mL que se centrifugaron 1 hr a 5000 r.p.m a 4°C. Se filtró el lisado con gasa y se añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol. Se incubó 1 hr a TA y se centrifugó durante 30 min a la misma temperatura. El pellet fue resuspendido en 8 mL de agua y guardado a 4°C hasta la ultracentrifugación.

Para realizar la ultracentrifugación en colchón de Cloruro de Cesio (CsCl), se debió agregar a cada tubo 8,6 g de CsCl, 100  $\mu$ L de Bromuro de Etidio (10 mg/mL) y se transfirió a los tubos de ultracentrífuga con jeringa, completando el volumen con CsCl (43 g / 4 mL de agua). La ultracentrifugación se realizó a 96000 r.p.m, durante 18-20 hrs a 20-25°C. Se retiraron los tubos de la ultracentrífuga e inmediatamente se colectaron las bandas correspondientes al ADN plasmídico (Fig. 16) con jeringa (aguja 40/12-hipodérmica); se adicionaron v/v de alcohol isoamílico y se agitó por inversión varias veces. Luego se centrifugó a 2500 r.p.m. Se aspiró la fase alcohólica (fase superior), repitiendo este paso tres veces. Para poder realizar la diálisis, se debió calentar la membrana y lavarla con agua. Se transfirió el contenido del tubo de la ultracentrífuga a ella (evitando formar bolas de aire). Se dejó dializando por agitación a 4°C con buffer Tris 0,01 M y EDTA 0,01M. Se transfirió el ADN desde la membrana a un tubo Falcon de 15 mL al cual se le agregó 0,1 volumen de Acetato de potasio 3 M pH=6,0, se vortexeó y se agregó 2 volúmenes de etanol 70%, dejándose *overnight* a 20°C.



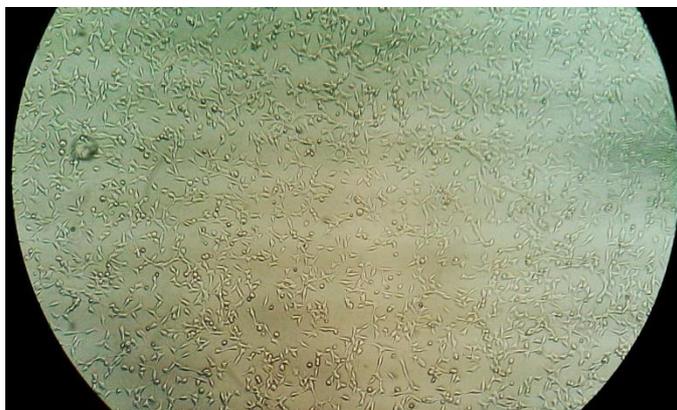
**Figura 16.** Tubo de ultracentrífuga después de la purificación de ADN plasmídico en Cloruro de Cesio

Para finalizar, se realizó una primera centrifugación a 5000 r.p.m a 4<sup>o</sup>C durante 1 hr y se descartó con pipeta el sobrenadante. Se hicieron lavados con etanol 70% mantenido a -20<sup>o</sup>C y se efectuó una segunda centrifugación durante 10 minutos en las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante con pipeta y se dejó secar el pellet hasta quedar transparente. Se resuspendió con solución salina 0,9% guardada a 4<sup>o</sup>C. El producto final se mantuvo a -20<sup>o</sup>C.

## **5.3- Transfección en células HEK 293 con pZ-E2s, pZ-EGFP y pZ-N3**

### **5.3.1- Cultivo celular**

Para poder realizar la transfección celular con los plásmidos pZ-E2s, pZ-N3 y pZ-EGFP previamente construidos, se propagaron células HEK 293 (Fig. 17) en medio de Dulbecco-Eagle (DMEM), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 100 µg/mL de estreptomicina a 37<sup>o</sup>C en una atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub>.



**Figura 17. Células Hek 293 40x.**

### **5.3.2- Transfección**

Para proceder con la transfección, el día previo a realizarse la misma, se sembraron células HEK 293 en placas de Petri (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 especificidades 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-E2s, pZ-EGFP, pZ-N3, fueron cosechados y las células transfectadas fueron observadas bajo microscopía de fluorescencia con el objetivo de evaluar la eficiencia de transfección.

### **5.4- Evaluación de la expresión**

Para poder verificar la expresión del plásmido pZ-E2s, se realizó inmunofluorescencia mediante el siguiente protocolo: se permeabilizó las membranas celulares con detergente Tritón en PBS 0,1% durante 10 min. Entre cada paso se realizan tres lavados con PBS. Primero se incubó el anticuerpo primario anti-ORF2 generado en ratón en una dilución de 1:200 y luego con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) en una dilución de 1:1000, ambos durante 1 hr a TA. Por último se realizó la tinción nuclear con DAPI (4',6'-diamina-2-fenilindol) un marcador fluorescente que se une a regiones enriquecidas en Adenina y Timina en secuencias de ADN.

## 5.5- Purificación de las VLPs

Una vez puesta a punto la transfección y verificada la expresión de E2s se procedió a producir VLPs en placa de Petri de 90mm (Greiner, España). Para la purificación de las VLPs a partir del sobrenadante de las células transfectadas se realizó una primera centrifugación a 4000 r.p.m 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 al 30 % w/v (Fig. 18) a 96000 r.p.m durante 2 hrs a 4°C. Los *pellets* se resuspendieron en PBS y almacenaron a 4°C.



**Figura 18. Ultracentrifugación de VLPs:** Tubos de 26,9 mL. Colchón de sacarosa 30%

## 5.6- Evaluación de la expresión de E2s

### 5.6.1- Dot blot

Con el fin de evaluar la expresión de las VLPs producidas con los plásmidos pZ-E2s, pZ-N3 y pZ-EGFP se realizó el inmunoensayo Dot Blot, para el cual se

sembraron 3  $\mu$ L de la muestra y los controles, en una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Estados Unidos). Se bloqueó con PBS-BSA 0,5% durante 30 min y se incubó el anticuerpo primario anti-ORF2 (AbCam, Estados Unidos) que reconoce epítopes conformacionales, en una dilución 1:500 durante 2 hrs a TA. 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).

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

### **5.6.2- Microscopía electrónica de transmisión**

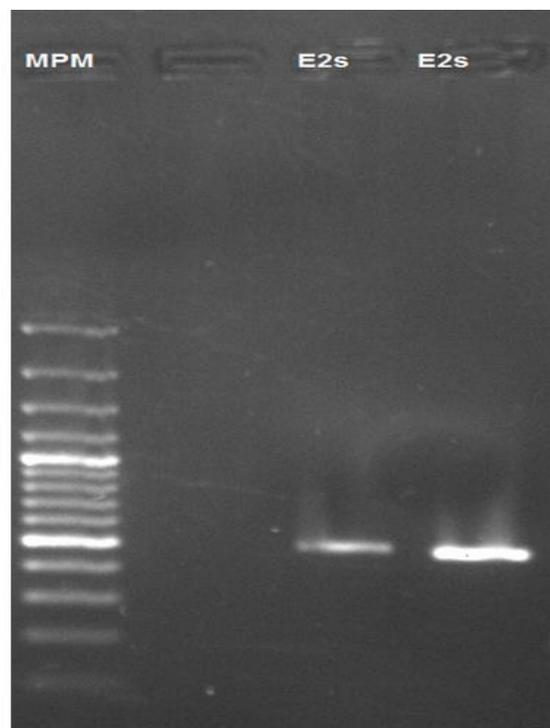
Con el objetivo de visualizar bajo microscopía electrónica las VLPs purificadas, se colocó 5  $\mu$ L de la suspensión sobre una rejilla de cobre recubierta de Formvar de 100 mesh durante 5 min. Luego las muestras se tiñeron negativamente con ácido fosfotúngstico 2% durante 5 min, se drenó el exceso y se dejó secar durante 10 min. Posteriormente se examinaron con la asistencia del personal del servicio de microscopía de la Facultad de Ciencias UdelaR.



## 6- Resultados

### 6.1- Amplificación de E2s por PCR

Mediante PCR convencional se logró amplificar correctamente, utilizando los primers diseñados específicamente, la secuencia E2s de 500 pb (Fig. 19), correspondiente al DAM de HEV, a partir del plásmido pZ-ORF2.

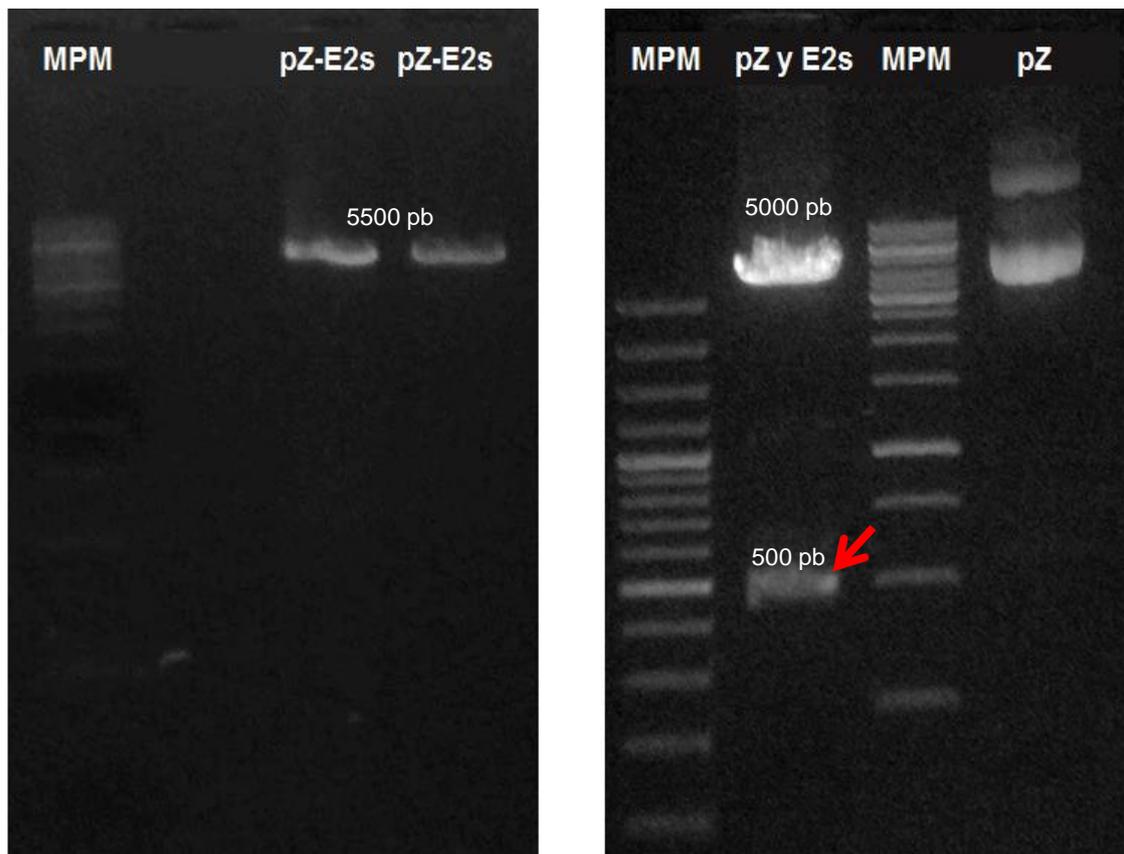


**Figura 19:** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% y visualización del producto de 500 pb de la PCR realizado en base a ORF2. E2s1 y E2s2, MPM Genruler (Thermoscientific, Estados Unidos) de 100 pb

### 6.2- Construcción del plásmido pZ-E2s

El producto purificado de E2s fue clonado en el vector pSGI en primera instancia y luego en el plásmido conteniendo el gen Z (pZ con GFP escindida),

generando así el vector de expresión pZ-E2s. Para la verificación de la correcta inserción del segmento E2s de 500 pb en el plásmido pZ de 5000 pb (Fig. 20), se realizó restricción con enzimas *Bam* HI y *Not* I (Fermentas, Thermo Scientific, Estados Unidos).

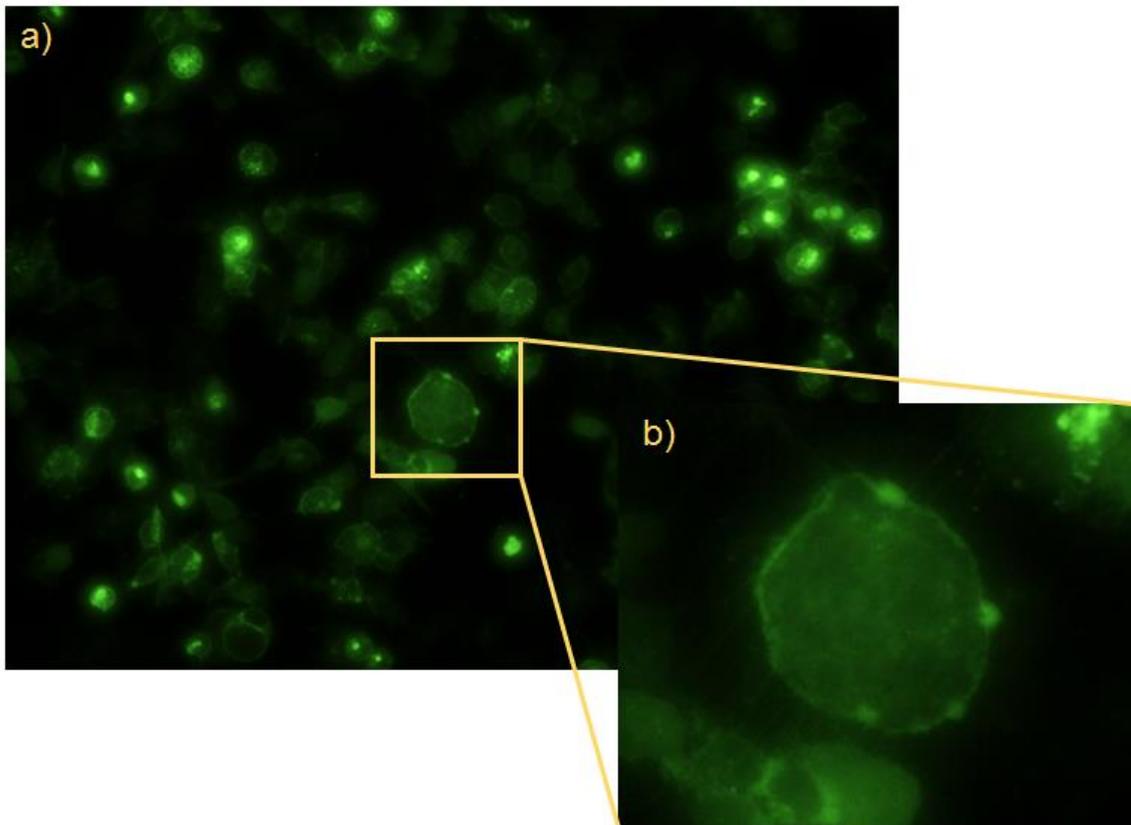


**Figura 20:** Electroforesis en gel de agarosa 1x **a)** producto de digestión con la enzima *Bam* HI del plásmido pZ-E2s purificado. MPM de 1 Kb. **b)** Digestión de pZ-E2s, a modo de escindir E2s con las enzimas *Bam* HI y *Not* I y pZ (control). MPM Genruler (ThermoScientific, Estados Unidos) de 100 pb y 1 Kb.

### 6.3- Transfección de células HEK 293

La transfección de las células HEK 293 se realizó con el plásmido de interés pZ-E2s y los plásmidos control pZ-N3 y pZ-EGFP. Según los resultados del análisis por microscopía de fluorescencia de las células transfectadas con el vector control pZ-EGFP, se determinó que fue exitosa. En la Figura 21 se

observa que la expresión de GFP se detecta fundamentalmente en la membrana y de forma polarizada.

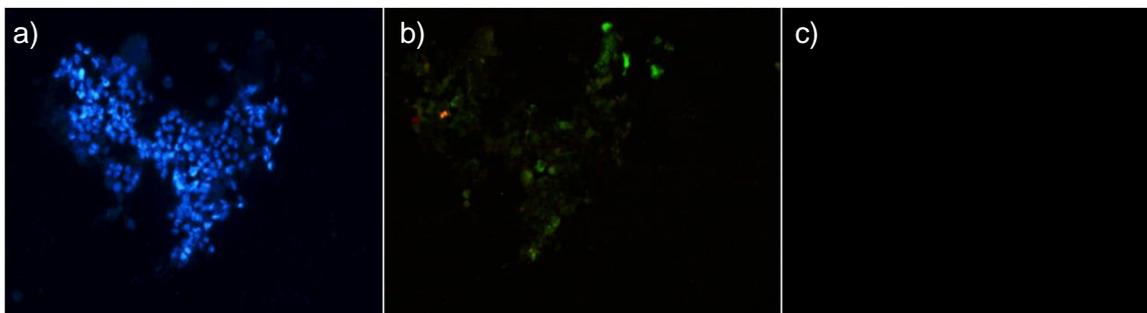


**Figura 21.** Microscopía de fluorescencia de la transfección de pZ-EGFP en células HEK 293 48 horas post transfección. Se transfectaron en cada caso 18  $\mu\text{g}$  de ADN en una relación 1:2 con el reactivo Lipofectamine® LTX with PLUS<sup>TM</sup>. **a)** Imagen panorámica 40X, **b)** ampliación de célula con expresión de GFP a nivel de membrana.

## 6.4- Evaluación de la expresión de E2s en un sistema eucariota

Se realizó inmunofluorescencia a las células HEK293 transfectadas con el plásmido pZ-E2s para evaluar la expresión del mismo. Para ello se empleó anticuerpo primario anti-ORF2 y anticuerpo secundario anti-igG de ratón y se realizó la tinción con DAPI. En la Figura 22b se logra observar células con

diferente intensidad de fluorescencia; la mayor intensidad indica mayor expresión de la proteína fusionada.



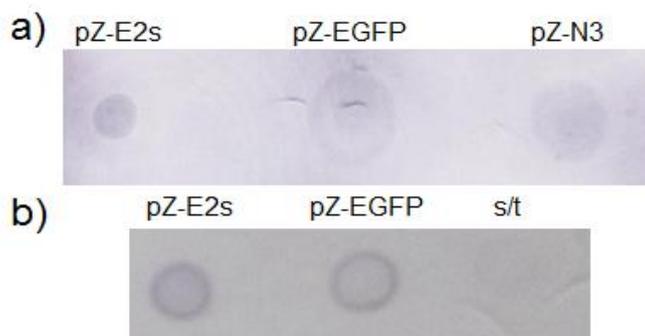
**Figura 22:** Microscopía de fluorescencia de la transfección realizada con pZ-E2s **a)** Tinción nuclear con DAPI **b)** Transfección de pZ-E2s en HEK 293 **c)** control. **a,b y c)** 10X

## **6.5- Purificación de las VLPs y evaluación de la expresión de E2s**

### **6.5.1- Dot blot**

Una vez confirmada la expresión de E2s fusionada a pZ-N3 mediante inmunofluorescencia, se procedió a la purificación de las VLPs generadas con el plásmido pZ-E2s a partir del sobrenadante de las células transfectadas. Lo mismo se realizó con las VLPs producidas con los plásmidos control pZ-N3 y pZ-EGFP. El proceso de purificación de las VLPs fue llevado a cabo correctamente y la identidad de las proteínas expresadas en el sistema de células HEK 293 pudo ser corroborada por el Dot blot con el anticuerpo anti-ORF2, revelando una reacción positiva con la muestra pZ-E2s. Asimismo, se pudo observar una reacción inespecífica con los controles de pZ-N3 y pZ-EGFP (Fig. 23a). Para comprobar la inespecificidad de esta señal, en paralelo

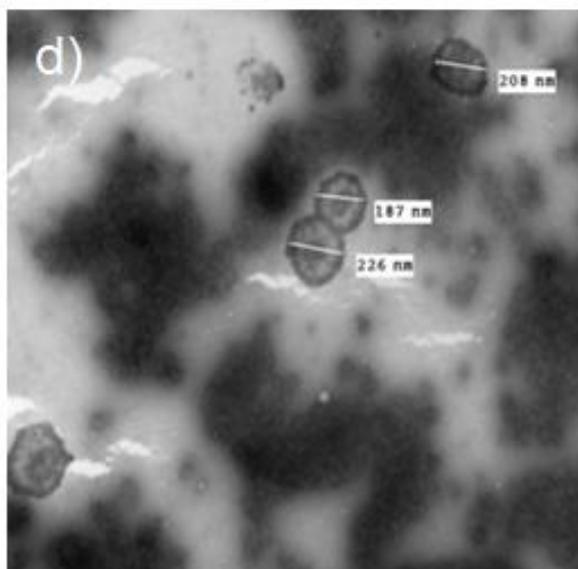
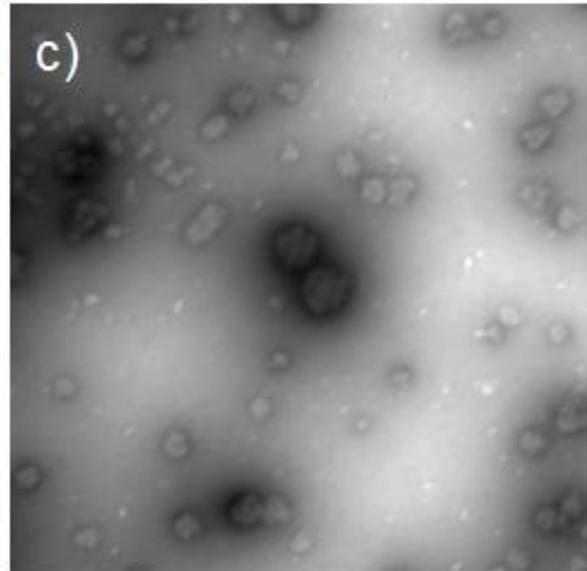
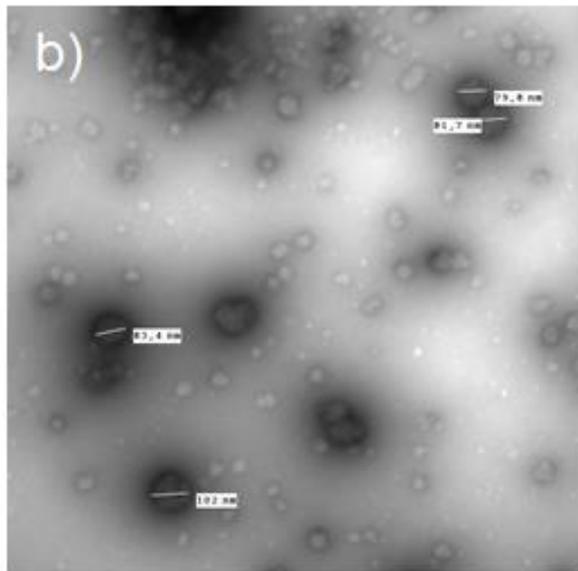
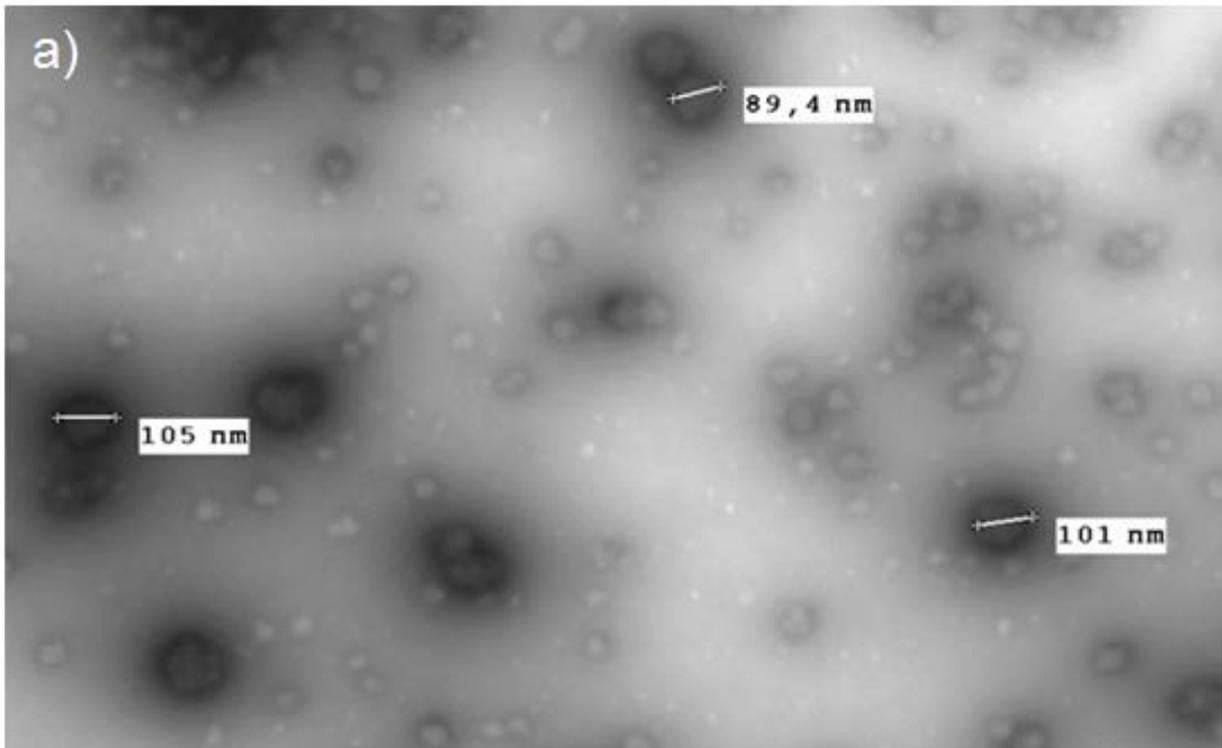
se realizó un Dot blot control con anticuerpo primario anti-pZ (Fig. 23b) y no se observó reacción inespecífica con el control negativo.



**Figura 23.** Dot blot a las VLPs purificadas. Evaluación de la identidad de la proteína con anticuerpo primario anti-ORF2 1:500 y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a una fosfatasa alcalina. **a)** Se observa reacción pZ-E2s y se observa reacción inespecífica con los controles pZ-EGFP y pZ-N3. **b)** Control con anti-Z: muestra pZ-E2s, control pZ-EGFP y control con células sin transfectar (s/t), no se observa reacción inespecífica.

### 6.5.2- Microscopía electrónica de transmisión

Luego de la purificación de las VLPs estas pudieron ser visualizadas por microscopía electrónica de transmisión. En el producto purificado del sobrenadante de la transfección realizada con plásmidos pZ-E2s, se observaron partículas con diámetro variable de entre 70 y 150 nm. Mientras que en el producto purificado del sobrenadante de las células transfectadas con pZ-N3 se logró observar partículas que alcanzaban diámetros de 230 nm. (Fig. 24).



**Figura 23.** Microscopía electrónica de transmisión de las VLPs generadas por la transfección de HEK 293 con pZ-E2s (a, b y c) y el control pZ-N3 (d) y purificadas por ultracentrifugación en colchón de sacarosa. Se observan estructuras de entre 70 y 150 nm generadas a partir del plásmido pZ-E2s, mientras que para las generadas a partir de pZ-N3 se logran observar tamaños mayores que alcanzan los 230 nm. a) 30000X, b) 50000X, c) 80000X, d) 25000X



## 7- Discusión y conclusión

---

En este trabajo se pretendió desarrollar un sistema de expresión del antígeno E2s de HEV mediante la estrategia de VLP empleando las características biológicas de la proteína Z del virus Junín. Para ello se debió amplificar E2s y clonarlo en el vector de interés conteniendo el gen Z. Una vez construido el plásmido pZ-E2s, se procedió a transfectar células HEK 293 y lo mismo se realizó con los plásmidos control pZ-N3 y pZ-EGFP. Para evaluar la eficiencia de la transfección se analizaron por microscopía de fluorescencia las células transfectadas con el plásmido control pZ-EGFP. El tipo de expresión fue la esperada para el vector empleado, a nivel de membrana y de forma polarizada debido a la brotación de Z una vez expresado en las células (Borio et al., 2012). La evaluación de los plásmidos se realizó mediante inmunofluorescencia a la transfección realizada con pZ-E2s y se logró observar un alto nivel de expresión. Habiendo determinado que la transfección de células HEK 293 fue exitosa, se procedió a la purificación de las VLPs contenidas en el sobrenadante de las células transfectadas. Para evaluar la concentración, morfología y pureza de dichas partículas, se las observó por microscopía electrónica. Las VLPs producidas a partir del plásmido pZ-E2s presentaron diámetros variables que van desde 70 a 150 nm, mientras que las VLPs generadas a partir del plásmido control pZ-N3, poseen tamaños mayores que alcanzan los 230 nm. Todas ellas estuvieron acordes en forma y tamaño a lo reportado previamente en este sistema (Borio et al., 2012, Mareze et al., 2015 y Mirazo, 2014). A través del Dot blot realizado a las VLPs generadas a partir de

pZ-E2s, y los controles pZ-N3 y pZ-EGFP, se observó reacción inespecífica con los controles, definida por una señal más tenue y mucho más dispersa en la membrana. A pesar de que se realizaron modificaciones en las condiciones del ensayo, esta reacción no pudo ser eliminada. Sin embargo, este tipo de problema ha sido observado para otro tipo de antígenos de HEV (Mirazo., 2014). Por este motivo se realizó un Dot blot control con pZ-E2s, pZ-EGFP y células sin transfectar. En este caso se utilizó anticuerpo primario anti-pZ por lo que se observó reacción con esta proteína en las muestras pZ-E2s y el control pZ-EGFP y no hubo reacción inespecífica en el control de células sin transfectar. La reacción positiva del ensayo, habiendo utilizado anticuerpos que reconocen epítopes conformacionales, verifica la correcta expresión de las proteínas purificadas (Mareze, 2015).

Los resultados obtenidos permiten ser optimistas ya que este sistema de VLPs que utiliza las características de la proteína Z del virus Junin y el DAM del HEV, podrá ser utilizado potencialmente como estrategia inmunoprotectora.

En investigaciones previas (Mirazo, 2014) se utilizó este sistema para la expresión del ORF2 de HEV completo, pero los resultados indicaron que, al ser esta secuencia la que codifica para la cápside viral, se autoensambla y forma una VLP rodeada de la bicapa lipídica resultante del brotamiento desde la célula, afectando su capacidad antigénica e induciendo una baja respuesta de anticuerpos.

En este trabajo se propuso utilizar la secuencia interna de ORF2, E2s, la cual codifica para el DAM viral y las VLPs que se generan expresan este epítipo. Para inducir la producción de anticuerpos, la proteína debe ser expuesta, así

puede ser reconocida por linfocitos B y esto podría suceder por una interrupción parcial en la membrana de las VLPs que exponga el antígeno y así estimular directamente las células B (Borio et al., 2012), e inducir una respuesta inmune capaz de generar anticuerpos específicos contra el antígeno.

Debido a los resultados obtenidos con las vacunas en fase de estudios clínicos, se consideró necesario comenzar a desarrollar nuevas estrategias que permitieran alcanzar mayores niveles de protección, sostenidas a lo largo del tiempo y que incluyeran los genotipos 3 y 4, responsables de los casos autóctonos esporádicos en todo el mundo y con el mayor potencial zoonótico (Mirazo, 2014). Por este motivo se eligió la secuencia E2s, correspondiente al DAM, cuyas características estructurales se conservan en los cuatro genotipos humanos. Su efectividad antigénica se debe a su capacidad para formar dímeros compactos (Zhao et al., 2012), sitios de neutralización (Li et al., 2005) que son reconocidos por anticuerpos conformación-dependiente. Por estas características es que esperamos, cuando se lleve adelante en el futuro próximo, obtener altos títulos de anticuerpos en respuesta a inmunizaciones con este sistema de expresión de antígeno basado en la estrategia de VLPs.



## 8- Perspectivas

---

En este trabajo se pretendió diseñar un sistema de expresión del antígeno E2s de HEV, basado en la estrategia de VLPs. Una vez cumplido este objetivo se pretende continuar esta investigación del siguiente modo:

- Utilizar la técnica de inmunogold descrita por Borio et al, (2012) a las VLPs purificadas y visualizarlas mediante Microscopía electrónica de transmisión.
- Inmunizar animales de laboratorio para evaluar la respuesta inmune inducida.
- Diseñar un sistema animal para eventualmente efectuar desafíos con HEV y evaluar la protección inmune generada por las VLPs.





## 9- Bibliografía

---

Aggarwal R, Naik SR: **Hepatitis E: does person-to-person spread occur?** Indian J Gastroenterol 1992, 11: 109-112.

Aggarwal R, Shahi H, Naik S, Yachha SK, Naik SR: **Evidence in favour of high infection rate with hepatitis E virus among young children in India.** J Hepatol 1997, 26: 1425-1426

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, 1: 87-101

Arankalle V, Ticehurst J, Sreenivasan M, et al.: **Aetiological association of a virus-like particle with enterically transmitted non-A, non-B hepatitis.** Lancet 1988, 1: 550-554

Arora NK, Panda SK, Nanda SK, et al.: **Hepatitis E infection in children: study of an outbreak.** J gastroenterol Hepatol 1999, 14: 572-577

Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinzkaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VE: **Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route.** Intervirology 1983, 20: 23-31

Banks MR, Bendall S, Grierson G, Health J, Mitchel y H Dalton. **Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom.** Emerg Infect Dis 2004, 10: 953-955

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

Borden KL, Campbell Dwyer EJ, 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, 72; 1: 758-766

Bradley D, Krawczynski K, Cook EJ, et al.: **Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease-associated 27- to 23-nm viruslike particles.** Proc Natl Acad Sci USA 1987, 84: 6277-6281

Carl M, Isaacs SN, Kaur M, et al.: **Expression of hepatitis E virus putative structural proteins in recombinant vaccinia viruses.** Clin Diagn Lab Immunol 1994, 1: 253-256

Chackerian B: **Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development.** Expert Rev Vaccines 2007. 6, 3: 381-390

- Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S. **Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus.** J Biosci 2008, 33: 451-464
- Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, et al.: **Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries.** Emerg Infect Dis 2003, 9: 448-449
- Colson P, Coze C, Gallian P, Henry M, De Micco P, Tamalet C: **Transfusion-associated hepatitis E, France.** Emerg Infect Dis 2007, 13: 648–649
- Echeverría JM, González JE, Lewis-Ximenez LL, et al.: **Hepatitis E virus infection in Latin America: a review.** J Med Virol 2013, 6: 1037-1045
- 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
- Emerson SU, Anderson D, Arankelle A, Meng XJ, Purdy M, Schlauder GG, et al: **Virus taxonomy. Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** London UK Elsevier/Academic Press 2005, 851-855
- Emerson SU, et al.: **Putative neutralization epitopes and broad cross genotype neutralization of Hepatitis E virus confirmed by a quantitative cell-culture assay.** J Gen Virol 2006, 87: 697-704
- Feinstone S, Kapikian A, Purcell R: **Hepatitis E: detection by immunoelectron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness.** Science 1973, 182: 1026-1028.
- Galiana C, Fernández-Barredo S, García A, Gómez M, Pérez-Gracia M: **Short Report: Occupational Exposure to Hepatitis E Virus (HEV) in Swine Workers.** Am J Trop Med Hyg 2008, 6: 1012–1015
- Hakze-van der Honing RW, van Collie E, Antonis AF, van der Poel WH: **First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in The Netherlands and Belgium.** PloS One 2011 8: e22673
- He S, et al.: **Putative receptor-binding sites of hepatitis E virus.** J Gen Virol 89: 245-249
- Herremans M, Bakker J, Duizer E, Vennema H y Koopmans MP: **Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity.** Clin Vaccine Immunol 2007, 14: 562-568
- Hillis A, Shreshta SM, Saha NK. **An epidemic of infectious hepatitis in the Kathmandu Valley.** J Nepal Med Assoc. 1973:11-51
- Huang FF, Pierson FW, Toth TE Meng XJ: **Construction and characterization of infectious cDNA clones of a chicken strain of hepatitis E virus (HEV), avian HEV.** J Gen Virol 2005, 86: 2585-2593
- Imran AR, Prasida H, Shahid J: **Molecular virology of Hepatitis E virus.** Sem Liver Dis 2012, 1: 3-14

- Jameel S, Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK: **Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins.** J Virol Methods 1997, 70: 207-216
- 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
- Kane M, Bradley D, Shrestha S, et al: **Epidemic non-A, non-B hepatitis in Nepal. Recovery of a possible etiologic agent and transmission studies in marmosets.** JAMA 1984, 252: 3140-3145
- 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.
- Kar-Roy A, Korkaya H, Oberoi R, Lal SK, Jameel S: **The hepatitis E virus open reading frame 3 protein activates ERK through binding and inhibition of the MAPK phosphatase.** J Biol Chem 2004, 279: 28345-28357
- Khudyakov YE, Favorov MO, Jue DL, Hine TK, Fields HA: **Immunodominant antigenic regions in a structural protein of the Hepatitis E virus.** Virology 1994, 198: 390-393
- Khuroo MS, Teli MR, Skiidmore S, Sofi MA, Khuroo MI: **Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy.** Am J Med 1981, 70: 252-255
- Khuroo M, Kamili S: **Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy.** J Viral Hepat 2003, 10: 61-69
- Khuroo MS, y Khuroo MS: **Hepatitis E virus.** Curr Opin Infect Dis 21: 539-543
- Koonin EV, Gobalenya 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 ARN plant and animal viruses.** Proc Nat Acad Sci USA. 1992, 89: 8259-8263
- Korkaya H, Jameel S, Gupta D, Tyagi S, Kumar R, Zafrullah M, Mazumdar M, Lal SK, et al.: **The ORF3 protein of hepatitis E virus binds to Src homology 3 domains and activates MAPK.** J Biol Chem 2001, 276: 42389-42400
- León P, Venegas E, Bengoechea L: **Prevalencia de las Infecciones por virus de las hepatitis B, C, D y E en Bolivia.** Rev Panam Salud Pública 1999, 5: 144-152
- Li SW, Zhang J, Li YM, Ou SH, Huang GY, He ZQ, Ge SX, Xian YL, Pang SQ, NG MH, et al.: **A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates.** Vaccine 2005, 23: 2893-2901
- Li SW, Tang X, Seetharaman J, Yang C, Gu Y, Zhang J, Du H, Shih JW, Hew CL, Sivaraman J, et al.: **Dimerization of hepatitis E virus capsid protein E2s domain is essential for virus–host interaction.** PLoS Pathog 2009, 5, e1000537

Li TC, Yamakawa Y, Suzuki K, Tatsumi M, Azeez Razak MA, Uchida T, Takeda N, Miyaura T: **Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus.** Amer Soc For Micr 1997, 7207-7213

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, 79: 12999-13006

Lopes dos Santos DR, Lewis-Ximenez LL, Figueira Marques da Silva M, Fonseca de Sousa PS, Coimbra Gaspar AM, Alves Pinto M: **First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil.** J of Clin Virol 2011, 47: 276–279.

Lopez 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

Lu L, Li C, Hagerdon CH: **Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis.** Rev Med Virol 2006, 1: 5-36

Mansuy JM, Peron F, Abravanel H, Poirson M, Dubois M, Miedouge F, Vischi L, Alric L, Vinel JP, Izopet J: **Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area.** J Med Virol 2004, 74: 419-424

Mareze Va, Borio Cs, Bilen Mf, Fleith R, Mirazo S, Mansur DS, Arbiza J, Lozano ME, 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 Biotech 2015, 100: 125-133.

Matsubayashi K, Kang JH, Sakata H, Takashi K, Shindo M, Kato M, Sato S, Kato T, Nishimori H, Tsujj K, Yoshida J, Maekubo H, Mishiro S, Ikeda H: **A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route.** Transf 2008, 7: 1368-1375

McAtee CP, Zhang Y, Yarbough PO, Bird T, Fuerst TR: **Purification of a soluble hepatitis E open reading frame 2-derived protein with unique antigenic properties.** Protein Expr Purif 1996, 8: 262-270

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 155: 445-455

Meng XJ, Halbur PG, Lehman JR, Webb TS, Sareva JS, Haynes BJ, Hacker T and Emerson SU: **A novel virus in swine is closely related to de human hepatitis E virus.** Med Science 1997, 94: 9860-9865.

Meng XJ, Halbur PG, Shapiro MS, Govindarajan S, Bruna JD, Mushahwar IK, Purcell RH, Emerson SU: **Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus.** J Virol 1998, 12: 9714–9721.

Meng XJ: **Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk.** Vet Microbiol 2010, 140: 256-265

Meng XJ, Dai X, Chang JC, Lopareva E, Pillot J, Fields HA, Khudyakov YE: **Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus.** *Virology* 2001, 288: 203-211.

Meng XJ, Yugo DM: **Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus.** *Semin Liver* 2013, 33: 41–49.

Miller M: **Viral taxonomy.** *Clin Infect Dis* 1995, 21: 279-280

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

Mirazo S, Ramos N, Russi JC, Gagliano G, Arbiza J: **Detection and molecular characterization of sporadic cases of acute human hepatitis E virus infection in Uruguay.** *Arch Virol* 2011, 156: 1451-1454

Mirazo S, Ramos N, Arbiza J: **Molecular epidemiology of hepatitis E virus (HEV) in South America: current status.** *Vir Rev Res* 2012, 10: 50-59

Mirazo S, Mainardi V, Ramos N, Gerona S, Rocca A and Arbiza J: **Indigenous Hepatitis E Virus Genotype 1 Infection, Uruguay.** *Emerg Infect Dis* 2014, 20: 171-173

Moin SM, Chandra V, Arya R, Jameel S: **The hepatitis E virus ORF3 protein protects cells from mitochondrial depolarization and death.** *J Biol Chem* 2007, 282: 21124-21133

Moraes dos Santos DC, Doutra Souto FJ: **Seroepidemiological markers of enterically transmitted viral hepatitis A and E in individuals living a community located in the north area of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002, 97: 37-40

Munné MS, Altabert NR, Vladimirov SN, Moreira R, Mares LO, Soto SS, Brajterman LS, Castro RE, González JE: **Identifications of polyphyletic variants in acute hepatitis suggest an underdiagnosed circulation of hepatitis E virus in Argentina.** *J Clin Virol* 2011, 52: 138-141

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.

Neuman BW, Adair BD, Burns JW, Miligan RA, Buchmeier MJ, Yeager M: **Complementarity in the supramolecular design of arenavirus and retroviruses revealed by electron cryomicroscopy and image analysis.** *J Virol* 2005, 6: 3822-3830

Neuvonen M, Ahola T: **Differential activities of cellular and viral macro domain proteins in binding of DP-ribose metabolites.** *J Mol Biol* 2009. 385: 212-225

- Oliveira-Filho EF, König M & Thiel HJ: **Genetic variability of HEV isolates: inconsistencies of current classification.** *Vet Microbiol* 2013, 165: 148–154.
- Okamoto H: **Genetic variability and evolution of Hepatitis E virus.** *Virus Res* 2007, 127: 216-228
- 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, 33: 2653-2659.
- Patra, S, Kumar A, Trivedi SS, Puri M, Sarin SK: **Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection.** *Ann Intern Med* 2007, 1: 28-33
- Pavio N, Meng XJ, Renou C: **Zoonotic hepatitis: animal reservoirs and emerging risk.** *Vet Res* 2010, 140: 256-265
- 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
- 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
- Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R: **HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain.** *J Hepatol* 2000, 33: 826-833
- Pudupakam RS, et al: **Deletion 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
- Pudupakam RS, Kenney SP, Córdoba L, et al.: **Mutational analysis of the hypervariable region of hepatitis E virus reveals its involvement in the efficiency of viral ARN replication.** *J Virol* 2011, 19: 10031-10040
- Pujol FH, Favorov MO, Marcano T, Este´ 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, 42: 234–236
- Purcell RH: **Hepatitis Viruses: changing patterns of human disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 7: 2401-2406
- Purdy M, Tam A, Huang C, Yarbough P, Reyes G: **Hepatitis E virus: a non-enveloped member of the ‘alpha-like’ RNA virus supergroup.** *Sem Virol* 1993, 4: 319-326

- Quintana A, Sanchez L, Larralde O, Anderson D: **Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in residents of district in Havana, Cuba.** J Med Virol 2005, 76: 69-70
- Quintana J, González A: **Virus de la Hepatitis E.** Rev Biomed 2003, 14: 165-89
- Rehman S, Kapur N, Durgapal H, Panda SK: **Subcellular localization of hepatitis E virus (HEV) replicase.** Virology 2008, 370: 77-92
- Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Witternborn JS, Wiersma ST: **The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005.** Hepatology 2012, 4: 988-997
- Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luck KC, Young LM, Fry KE, Bradley DW: **Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis.** Science 1990, 247: 1335-1339
- Ridell MA, Li F, Anderson DA: **Identification of immunodominant and conformational epitopes in the capsid protein of Hepatitis E virus using monoclonal antibodies.** J Virol 2000, 74: 8011-8017
- Robinson RA, Burgess WH, Emerson SU, et al.: **Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells.** Protein Expr Purif 1998, 12: 75-84
- Rodríguez-Frías F, Jardi R, Buti M: **Hepatitis E: virología molecular, epidemiología y patogénesis.** Elsevier 2012, 10: 624-634
- Rodríguez-Iglesias M, Pérez-Gracia MT: **Nuevos conceptos sobre el virus de la hepatitis E y su importancia creciente en los países desarrollados.** Enf Emerg 2003, 5: 105-112
- Roy P, Noad R: **Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts.** Hum Vaccin 2008, 1: 5-12
- Salvato M, Shimomaye E, Oldstone MB: **The primary structure of the lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase.** Virology 1989a, 169: 377-384
- Salvato M, Shimomashe 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
- 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
- Sánchez DA, Gutiérrez C: **Virus de la hepatitis E. Características biológicas y epidemiológicas.** Rev Soc Ven Micro 2012, 32: 6-12

Sheng-Li Bi, Purdy MA, McCaustland KA, Margolis HS, Bradley DW: **The sequence of hepatitis E virus isolated directly from a single source during and outbreak in China.** *Virus Res* 1993, 28: 233-247

Shofield DJ, Purcell RH, Nguyen HT, Emerson SU: **Monoclonal antibodies that neutralize HEV recognize an antigenic site at the carboxyterminus of an ORF2 protein vaccine.** *Vaccine* 2003, 22: 257-267

Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, et al.: **Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine.** *N Engl J Med* 2007, 356: 895–903.

Smith DB, Purdy MA, Simmonds P: **Genetic variability and the classification of hepatitis E virus.** *J Virol* 2013, 8: 4161-4169

Smith DB, Simmonds P, members of the International Committee on the Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group et al.: **Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae.** *J Gen Virol* 2014, 95: 2223-2232.

Stanko O, Imai M, Goto H, Lukashevich IS, Neuman G, Watanabe T, Kawaoka Y: **A role for the C terminus of Mopeia virus nucleoprotein in its incorporation into Z protein-induced virus-like particles.** *J Virol* 2010, 10: 5415-5422

Strecker T, Eichler R, Meulen J, et al.: **Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected].** *J Virol* 2003, 19: 10700-10705

Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, et al.: **Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome.** *Virology* 1991, 185: 120-131

Tam AW, White R, Reed E, Short M, Zhang Y, Fuerst TR, et al.: **In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes.** *Virology* 1996, 215: 1-9

Taneja S, Sen S, Gupta VK, Aggarwal R, Jameel S: **Plasma and urine biomarkers in acute viral hepatitis E.** *Proteome Sci* 2009, 7: 39

Torresi J, Meanger J, Lambert P, Li F, Locarnini SA, Anderson DA: **High level expression of the capsid protein of hepatitis E virus in diverse eukaryotic cells using the Semliki Forest virus replicon.** *J Virol Methods* 1997, 69: 81-91

Torresi J, Li F, Locarnini SA, Anderson DA: **Only the non-glycosylated fraction of hepatitis E virus capsid (open reading frame 2) protein is stable in mammalian cells.** *J Gen Virol* 1999, 80: 1185-1188

Tsarev SA, Tssareva TS, Emerson SU, et al.: **Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 21: 10198-10202

Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, et al.: **Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge.** *Vaccine* 1997, (17-18): 1834-1838

- Tyagi S, Jameel S, Lal SK: **Self-association and mapping of the interaction domain of hepatitis E virus ORF3 protein.** J Virol 2001a, 75: 2493-2498
- Tyagi S, Jameel S, Lal SK: **A yeast two-hybrid study on self-association of the ORF2 protein of hepatitis E virus.** Biochem Biophys Res Commun 2001b, 284: 614-621
- Wei M, Zhang X, Yu H, Tang ZM, Wang K, Li Z, Zheng Z, Li S, Zhang J, Xia N, Zhao Q: **Bacteria expressed hepatitis E virus capsid proteins maintain virion-like epitopes.** Vaccine 2014, 32: 2859-2865
- Wills JW, Cameron CE, Wilson CB, Xiang Y, Bannett RP, Leis J: **An assembly domain of the Rous sarcoma virus Gag protein required late in budding.** J Virol 1994, 68: 6605-6618
- Xing L, Kato K, Li T, et al.: **Recombinant hepatitis E protein self-assembles into a dual-domain T=1 particle presenting native virus epitopes.** Virology 1999, 265: 35-45
- Xing L, Kato K, Li T, Takeda N, Miyamura T, Hammar L, Cheng RH: **Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T=1 particle presenting native virus epitopes.** Virology 1999, 265: 35-45
- Xing L, Li TC, Mayakaki N, Simon MN, Wall JS, Moore M, et al.: **Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway.** J Biol Chem 2010, 285: 33175-33183
- Wang Y, Zhang H, Gu W, Lan H, Hao W, Ling R, Li H, Harrison TJ: **Detection of sporadic cases of Hepatitis E virus (HEV) infection in China using immunoassays based on recombinant open reading frame 2 and 3 polypeptides from HEV genotype 4.** J Clin Microbiol 2001, 39: 4370-4379
- Wilda 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
- Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, Shima R, Moriishi K, Tsukihara T, Li TC, et al.: **Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure.** Proc Natl Acad Sci USA 2009, 106: 12992-12997
- Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y: **Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food.** J Gen Virol 2003, 84: 2351-2357.
- Yugo DM, Meng XJ: **Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission.** Int J Environ Res Public Health 2013, 10: 4507-4533

Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, Jameel S: **The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton.** J Virol 1997, 71: 9045-9053

Zanetti AR, Schlauder GG, Romano L, et al.: **Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy.** J Med Virol 1999, 4: 356-360

Zhang JZ, Ng MH, Xia NS, Lau SH, Che XY, Chau TN, et al.: **Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein.** J Med Virol 2001, 2: 125-132

Zhang J, Ge SX, Huang GY, et al.: **Evaluation of antibody-based and nucleic acid-based assays for diagnosis of hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model.** J Med Virol 2003, 4: 518-526

Zhang J, Gu Y, Ge SX, et al.: **Analysis of hepatitis E virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein.** Vaccine 2005, 23: 2881-91

Zhao C, Ma Z, Harrison TJ, Feng R, Zhang C, Qiao Z, Fan J, Ma H, Li M, et al.: **A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China.** J Med Virol 2009, 81: 1371– 1379.

Zhao Q, Zhang J, Wu T, Li SW, Ng MH, Xia NS, Shih J: **Antigenic determinants of hepatitis E virus and vaccine-induced immunogenicity and efficacy.** Journ Gastro 2013, 48: 159-168

Zhou YH, Purcell R, Emerson S: **A truncated ORF2 protein contains the most immunogenic site on ORF2: antibody responses to non-vaccine sequences following challenge of vaccinated and nonvaccinated macaques with hepatitis E virus.** Vaccine 2005, 23: 3157-3165

Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, et al.: **Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large scale, randomized, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial.** Lancet 2010, 9744: 895-902





# Agradecimientos

---

Dr. Santiago Mirazo

Simplemente gracias por abrirme las puertas y confiar en mí desde el comienzo, por ser un gran tutor y consejero.

Dr. Juan Arbiza

Gracias por permitirme ser parte de este laboratorio, que me brindó momentos y experiencias hermosas.

Lic. Natalia Ramos

Gracias por tu ayuda, tus aportes y tu tiempo.

“Resto” del Lab

Gracias por dejarme ser parte de este equipo tan lindo

Tribunal

Gracias por sus aportes al corregir esta tesina

UFSC (Universidad Federal de Santa Catarina)

Dr. Oscar Bruña-Romero, Mg. Vania Mareze

Gracias por la simpatía y el cariño con el que me trataron.

Servicio Microscopia

Gaby, Gabriela, Marcie y Fefa

Gracias por el tiempo, la ayuda y el ánimo

Pasteur UNi Biof Prot

## ANII

Lu, Romi, Darío, Flo

Gracias a ustedes por hacerme vivir los momentos más lindos dentro y fuera del laboratorio, por ponerle risas y música a los resultados negativos y más aún a los positivos. Gracias por llegar a mi vida en el momento justo. Soy feliz por haberlos cruzado en este proceso.

Amigos de la Vida

Gracias por aún estar. Por haber bancado mis negativas a salir por los parciales o los exámenes, por estar al pie del cañón para festejar, pero sobre todo cuando me sentía mal por tropezar. Gracias a todos los que me apoyaron siempre en este camino tan largo.

Por último, pero más importante mi FAMILIA

Gracias por darme la oportunidad de hacer esto que me gusta sin tener que preocuparme por nada más. Gracias Mamá por darme todo siempre para que hoy esté alcanzando la meta, por ser la piedra fundamental de quién soy hoy.

