

Estudio Pre-Clínico para el Desarrollo de una Vacuna contra el Virus del Dengue (DENV) utilizando Vectores

*Damaris Laboy Fernández
Master in Manufacturing Competitiveness
Advisor: Rafael Nieves, PharmD.
Industrial Engineering Department
Polytechnic University of Puerto Rico*

Abstracto — *Diferentes tipos de investigaciones se enfatizan al área de la confirmación de que el virus del dengue (DENV) tiene un mecanismo donde se ve la inhibición en las acciones del grupo de proteínas señaldadores producidas y secretadas por las células hospedera. Esta primera línea de defensa del sistema inmunológico mejor conocida como el sistema innato (IFN) α / β son los intermediarios claves de la respuesta antivirales. Descubrir las interacciones de las moléculas de RNA por parte del virus del dengue nos daría las herramientas para entender más en específico su mecanismo de patogénesis. Abriendo oportunidades en el campo de la invención de productos que se pueden llevar al campo de la manufactura tales como: mejora en tratamientos terapéuticos, inmunización para combatir el virus.*

Términos Claves — *DENV, HEK 293/RIG-1 ATCC, Patógenos, Sistema Inmunológico, Virus.*

INTRODUCCIÓN

Este escrito busca presentar dos perspectivas distintas, dirigido tanto a la industria manufacturera como al campo de las ciencias. Ambos conceptos comparten un mismo fin, el estudio y desarrollo científico que aporte a la protección y prevención de la salud pública. Estas herramientas de investigaciones científicas nos dan como resultado la invención de medicamento o vacuna y dispositivos médicos. Detrás de un producto que sale al mercado con el propósito de la prevención, tratamiento y en muchas ocasiones para dar por terminada cualquier condición de la salud existe un periodo de investigación. Algunos de estos ejemplos son: equipos médicos, fármacos, dispositivos médicos, entre otros productos nos debemos preguntar: ¿Cómo surgió este producto? ¿Cómo se aprueban estos productos? ¿Existen

regulaciones para los mismos? ¿Podría encontrar suficiente información que confirme la efectividad de dichos productos?

Los Estado Unidos utilizan una agencia reguladora se conoce como la FDA por sus siglas en inglés “Food and Drugs Administration”. Dicha agencia está encargada de velar por la protección del consumidor. La FDA establece unas regulaciones antes de los productos salir al mercado, pero no solo eso es suficiente para el consumidor o cliente. Se establecen regulaciones para la manufactura del producto una vez ya aprobado por la agencia reguladora. De esta forma podemos encontrar una correlación entre la manufactura y la ciencia que se esconde detrás de esta. Para que ocurra la manufacturación de un producto, tiene que existir una necesidad y para poder suplir la necesidad se realizan investigaciones. La salud es una de las áreas más importantes para mantener una sociedad sana. Descubrir cómo prevenir o eliminar cualquier patógeno infeccioso a través de medicamentos, equipos médicos entre otros productos que se llevan al mercado a través de la manufactura, es lo que lleve al campo de las ciencias a suplir esa necesidad para una mejor calidad de vida.

Descripción del Proyecto

La inmunología estudia los mecanismos fisiológicos que los seres humanos y otros animales usan para defenderse de la invasión por otros organismos. Todas las células del sistema inmunológico se originan de la médula ósea, pero en algún momento salen para circular en la sangre, entrar en otros tejidos y para pasar a formar parte de los tejidos linfoides especializados encargados de nuestras defensas. El conocimiento de la organización genética de un patógeno proporciona

el fundamento para definir la biología de su patogenicidad y de sus interacciones con el sistema inmunológico [1]. Eso quiere decir que puedo medir y diseñar la manipulación directa de los genes del patógeno para producir cepas atenuadas con las propiedades requeridas para una vacuna.

Objetivos

Los objetivos de este proyecto incluyen:

- Entender los mecanismos de evasión del sistema inmunológico para la protección y prevención de la salud pública.
- Determinar la función del grupo de proteínas secretadas por las células hospederas en respuesta de identificación de patógenos. Identificando los patógenos como todo aquello que puede provocar daños o enfermedades al huésped ejemplo de estos más comunes son: virus, bacterias, hongos entre otros.
- Reconocer si hay algún tipo de correlación entre el grupo de proteínas identificadoras de los patógenos (IFN) y la patogenicidad del causante de la enfermedad.
- Identificando las respuestas del sistema inmunológico evasor de patógenos podemos mejorar la seguridad en la producción de medicamentos, tratamientos terapéuticos y los diferentes tipos de vacunas.

Contribuciones

Las principales contribuciones de esta investigación son:

- Mejoramiento del sistema de la salud.
- La finalidad o creación terapéutica para enfermedades que aún no tiene cura.
- Actualización en la forma de combatir patógenos.
- Reducción en los gastos del sistema público de salud.

REVISIÓN DE LITERATURA

Todos estamos constantemente expuestos a lo que son las enfermedades ocasionados por diferentes organismos también conocidos como patógenos. Los patógenos son divididos en cuatro clases: bacterias, virus, hongos y parásitos, esta

última clasificación se utiliza para los protozoos y los vermes. Las bacterias son unos de esos microorganismos procariotas causantes de muchas enfermedades infecciosas en los seres humanos y otros animales. Los virus son patógenos compuestos por un genoma de ácido nucleico esta información se encuentra en una envoltura proteica o membranosa llamada “cápside” [2]. Estos organismos sub-microscópicos (virus) solo se replican en células vivas estos no tienen la capacidad ni los mecanismos para las reacciones metabólicas que le permitan sobrevivir de forma independiente. Lo que podemos clasificar como un tipo de parasitismo. Una partícula viral se llama “virión” [1]. Un hongo puede ser unicelular de una sola unidad, pero también pueden ser multicelular más de una célula estos cuentan con un núcleo definido y una membrana exterior que los protege por tal razón están clasificados como organismos eucariotas. Bajo el reino de los hongos están las levaduras y los mohos con una gran capacidad de causar diferentes tipos de enfermedades. El parásito se define como protozoos unicelulares y vermes multicelulares que infectan a los animales y seres humanos viviendo dentro de ellos [1].

La inmunología es asociada a la medicina ya que sus principios estaban basados en observaciones. En tiempos pasados estas observaciones se sustentaban cuando las enfermedades que presentaban varios pacientes al mismo tiempo describían los mismos síntomas y eran repetitivas en un lugar en común. De ahí que coincidían síntomas, tiempo y espacio con los avances de las ciencias es conocido entonces como enfermedades infecciosas [2]. Es interesante mencionar que una vez el paciente presentaban estas enfermedades epidémicas se podía enfrentar a la misma y no se enfermaban nuevamente si no que tenían una resistencia a la enfermedad esto es “inmunidad”.

Pero nuestro cuerpo funciona como una maquina perfecta y para estos patógenos tiene su propio sistema que ayuda a combatirlos y hasta llegar a eliminarlos del cuerpo. El sistema inmunológico se encarga de los mecanismos

fisiológicos que los seres humanos y otros animales utilizan para defenderse de la invasión de agentes infecciosos “patógenos”. Es muy importante este sistema para la subsistencia de los seres humanos. Edward Jenner tiene una de las contribuciones más grandes en el campo de la inmunología, Jenner era conocido como un médico rural inglés, desarrollo un auténtico interés en el estudio de las ciencias y la naturaleza que practico a lo largo de su vida. Edward Jenner quien observo a finales del siglo XVIII que la enfermedad de “cowpox” o “vacinnia” viruela de vaca enfermedad descubierta en algunos sectores de Inglaterra; Específico para el área occidental en las regiones de Gloucestershire y Known. Este nombre fue dado por el nombre de la vaca que es “vaccinia”. Jenner quien determino que la enfermedad “cowpox” o “vacinnia”; Nota: (viruela en vaca, tiempo más tarde presente en otros animales como el cerdo) parecía conferir protección contra la enfermedad fatal de la viruela “smallpox” (viruela en humanos). En 1796, Jenner demostró que la inoculación con “cowpox” podría proteger contra “smallpox” creando así una inmunización. Este experimento Jenner lo llevo a cabo con su hijo de 8 años; inoculó a su hijo con viruela de cerdo y luego viruela de sepa humana en 1789 como resultado de esto el niño no desarrolló la enfermedad. Su hipótesis de que la infección con vacuna contra la viruela protege contra la infección posterior con la viruela fue todo un éxito probada experimentalmente. Aunque el audaz experimento de Jenner fue exitoso, casi dos siglos más tarde fue que la vacunación contra la viruela se hizo universal, por los avances que permitieron a la Organización Mundial de la Salud anunciar en 1979 que la viruela había sido erradicada esto posiblemente fue uno de los mayores triunfos de la medicina moderna. Edward Jenner le llamo a este procedimiento “vaccination” en español vacunación desde entonces este término es utilizado en el campo de la medicina, aunque para las ciencias es un concepto muy amplio que envuelve el estudio del sistema inmunológico [3]. Cuando Jenner introdujo la vacunación no sabía nada de los agentes infecciosos que causan las enfermedades.

No fue hasta finales del siglo XIX que Robert Koch demostró que las enfermedades infecciosas son causadas por microorganismos, cada uno responsable de una enfermedad en particular. El descubrimiento de Koch y otros grandes microbiólogos del siglo XIX extendieron la estrategia de Jenner de la vacunación en otras enfermedades. En 1880, Louis Pasteur ideó una vacuna contra el cólera en pollos y desarrolló una vacuna contra la rabia que demostró un éxito espectacular en su primera prueba en un niño mordido por un perro rabioso. Estos triunfos prácticos condujeron a la búsqueda del mecanismo de protección y al desarrollo de la ciencia de la inmunología.

De ahí que podemos identificar que el sistema inmune de los vertebrados reconoce la entrada o posible exposición a los microorganismos que no forman parte de nuestro sistema regularmente. Impide que este patógeno logre esparcirse a través de los tejidos; impidiendo su replicación para que no de paso a infecciones o enfermedades. Patógenos con potencial de desarrollar enfermedades graves que pueden llegar hacer mortales tienden a mejorar progresivamente hacia una adaptación a sus huéspedes. De igual forma el huésped desarrolla un grado de resistencia genética característico contra el patógeno causante de las enfermedades frecuentes, además de adquirir inmunidad de por vida contra las enfermedades endémicas como resultado de la infección. La piel y la mucosa son la primera defensa del cuerpo contra las infecciones. El sistema inmune está dividido en bajo dos tipos de respuesta estos son:

- **Sistema Inmune Innato** - Funciona como un conjunto de mecanismo en defensa del huésped que actúan al comienzo de una infección y no está dirigido contra patógenos en particular. Esto quiere decir que la respuesta de defensa no es específica. Una vez que el huésped identifica un patógeno una cantidad limitada de receptores y proteínas secretadas que están codificadas en la línea germinal (es la información que permite la replicación) y que reconocen características comunes a muchos

patógenos. Nacemos con una predisposición “innata” de protección son los genes transmitidos por nuestros padres, que no es adquirido como consecuencia de enfermedades anteriores.

- Sistema Inmune Adaptativo** - una respuesta adaptativa es activada e inducido cuando una infección supera el mecanismo de defensa innata. el patógeno continúa replicándose y aculando anticuerpos contra sí mismo “antígenos”. este sistema comienza con la activación y accionamiento de las células b y las células t. las células b son linfocitos dedicados a producir inmunoglobulinas y anticuerpos. los linfocitos son partes de los glóbulos blancos de la sangre conocidos como leucocitos. los linfocitos, granulocitos y los monocitos que todos estos son leucocitos que encontramos en la sangre. las células t son linfocitos que se desarrollan en el timo estos son responsables de la inmunidad medida por células. están contiene unos receptores que reconocen antígenos llamados receptores de células t.

Los plásmidos son una herramienta de transporte secuencial del material genético en pedazos. El plásmido no necesita de los cromosomas son “epigenético”, contienen el material genético ácidos nucleicos ADN o ARN que aparecen en el citoplasma de algunos procariotas. El plásmido es variable en su tamaño y se replica una vez dentro de la bacteria. Las bacterias pueden tener más de uno al mismo tiempo. Su forma puede ser lineal, circular o de forma desorganizada de círculos y lineal. (Nota: hay diferentes tipos de plásmidos). Es importante exponer estos términos ya que los mismos nos permiten conocer las partes de un vector.

El plásmido utilizado durante la investigación es conocido en el campo de la ingeniería genética son llamados vectores. El vector es la herramienta utilizada para sintetizar en grandes cantidades las proteínas de interés (virus del dengue), mediante un procedimiento conocido como transformación. La transformación es el proceso por el cual se utiliza el

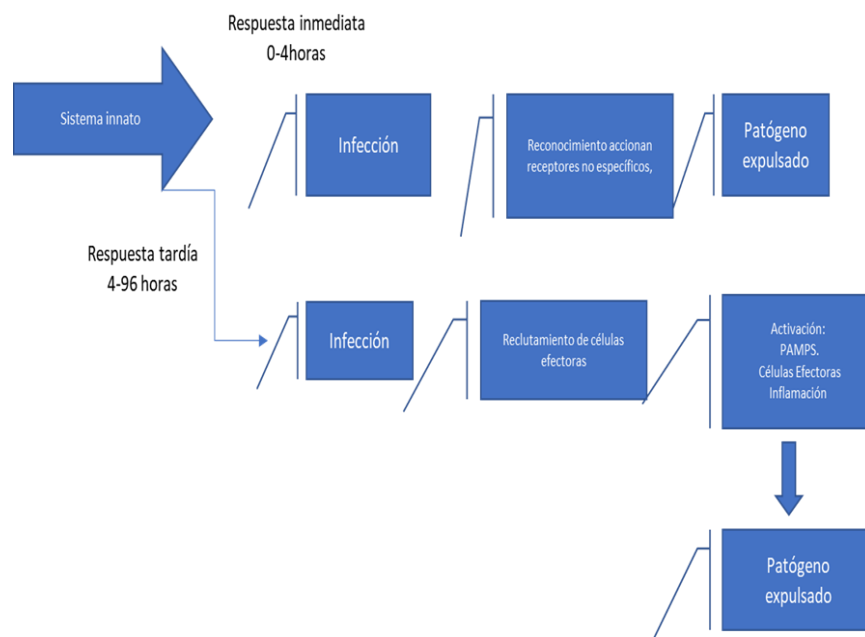


Figura 1
Diagrama Sistema Innato

método de la electroporación que es la introducción del material genético por medio de células electrocompetentes. Comenzamos con la selección del plásmido más eficiente, en el que se introducen los genes que se quieren expresar con protocolos específicos que usan enzimas de restricción y DNA ligasa. Completado el proceso de selección se transforma un tipo de bacteria en nuestro caso E-coli con el plásmido modificado. Estas bacterias son inoculadas en placas con medio de crecimiento para bacterias “agar” se seleccionan una de las colonias bacterianas transformada que produzcan las sustancias deseadas. Estas bacterias pueden ser cultivadas en sistemas de tipo biorreactores para su crecimiento en grandes cantidades en caso de la producción de medicamentos sintéticos como la insulina. En este proceso se eligen plásmidos con características de genes de resistencia a antibióticos o con genes de enzimas que sintetizan algún compuesto deseado.

METODOLOGÍA

El propósito principal de este estudio es contribuir a través de ensayos, las pruebas que confirman la inhibición del virus del dengue en el sistema de interferón, línea de defensa utilizada por el sistema inmunológico para evitar la replicación del virus en el cuerpo. Este material busca aportar al desarrollo de una vacuna para el virus del dengue más eficaz y capaz a la ya existente. Para lograr las métricas descritas por los objetivos la metodología a seguir será la estrategia de mejora de “six sigma”, DMADV. Esta estrategia consiste en cinco (5) fases:

- **Definir:** Esta es la primera fase de la metodología DMADV. En esta fase se busca establecer y definir de forma clara el problema. El planteamiento permitirá el diseño estructural para el desarrollo del problema, la meta del estudio, el alcance, los recursos y las partes interesadas.
- **Medir:** El propósito principal de esta fase es conocer lo que el sistema necesita. Esta fase es esencial para establecer el punto de partida que

comenzara a buscar mejoras para poder satisfacer las necesidades del problema. Una herramienta eficaz para buscar lo que está causando el problema es un mapa de flujo de valor, diagrama de causa y efecto. Es muy importante identificar lo que realmente necesita para medir y establecer el plan de recopilación de datos.

- **Análisis:** En esta fase los datos recopilados de las observaciones son analizados y evaluados para determinar o buscar opciones que permitan alcanzar los objetivos. El propósito de esta fase es ver qué te dicen los datos. Muchas herramientas y opciones pueden usarse para entender los datos y encontrar la verdadera causa raíz del problema con el fin de buscar una solución para iniciar un plan de mejora. Herramientas como "Diagrama de Causa y Efecto" y Diagrama de “fishbone” también se pueden usar en esta fase identificando las causas más significativas que afectan el proceso.
- **Diseño:** El objetivo de esta fase es diseñar una solución para resolver la verdadera causa del problema. Es importante saber cómo resolver el problema. Las herramientas útiles para tomar una decisión para la mejor solución pueden ser una lluvia de ideas, una matriz de decisión o una matriz de criterios ponderados. Una implementación exitosa requiere una planificación cuidadosa.
- **Verificación:** En esta fase el objetivo principal es verificar el desempeño y los resultados del diseño para demostrar que el diseño propuesto proporciona los resultados esperados y alcanza los objetivos establecidos. Esta fase determina si el diseño propuesto funciona como se esperaba.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para desarrollar este proyecto, la metodología de DMADV se define en esta sección.

Define

La primera línea de defensa es el sistema inmunológico cuya función es el reconocimiento de microorganismos invasores. El sistema inmunológico busca impedir la dispersión o replicación y finalmente la eliminación del patógeno en el cuerpo. Los patógenos han desarrollado adaptaciones especiales que les permite invadir a su huésped. Podemos mencionar que el sistema inmunológico es fundamental para la supervivencia humana. Si hay una ausencia de sistema inmunológico podemos decir que hasta las infecciones menores pueden convertirse en una amenaza para las especies. En los estudios del sistema inmunológico las observaciones llevaron a la ciencia a triunfar sobre enfermedades graves creando así lo que hoy conocemos como vacunación o inmunización y medicamentos. ¿Qué ocurre si esta primera línea de defensa no logra eliminar dicho patógeno del cuerpo?

El dengue es un Flavivirus transmitido por el mosquito hembra “aedes aegypti”. El mismo está clasificado en 4 diferentes serotipos (DNEV 1 a 4) esto quiere decir que las partículas virales presente en la superficie celular presentan diferentes antígenos. La inhibición del virus del dengue en el sistema inmunológico presenta una resistencia donde las proteínas con actividad antiviral comienzan a ser secretadas produciendo un bloqueo al sistema de interferón (IFN). El virus del dengue con proteínas no estructurales NS1 y NS3 inhibe la producción de $INF-\alpha$ encargadas de que dicho virus se multiplique. Utilizaremos como demostración de respuestas del sistema inmunológico al virus del dengue y su comportamiento a través de ensayos y cultivos de células HEK 293/RIG-1 y A549. Se recogerá información compartida de diferentes estudios relacionados a dicho virus y algunas de sus comparaciones con otros virus que son transmitidos por el mismo mosquito “aedes aegypti”. Es la inhibición del virus del dengue en el sistema de inmunológico el problema que buscamos definir.

Las observaciones nos llevan a terminar a través de los años junto con los estudios las

funciones y comportamientos de diferentes enfermedades. El clima y nuestra ubicación geográfica nos exponen a diferentes enfermedades transmitidas por mosquitos. Plantear dicho estudio nos lleva al triunfo máximo de la medicina la inmunización mejor conocida como vacunas. Llevadas al campo de la manufactura para la prevención y curación de estas enfermedades.

Medición

Para verificar el diseño propuesto, la forma en que funciona el sistema se describe de la siguiente manera:

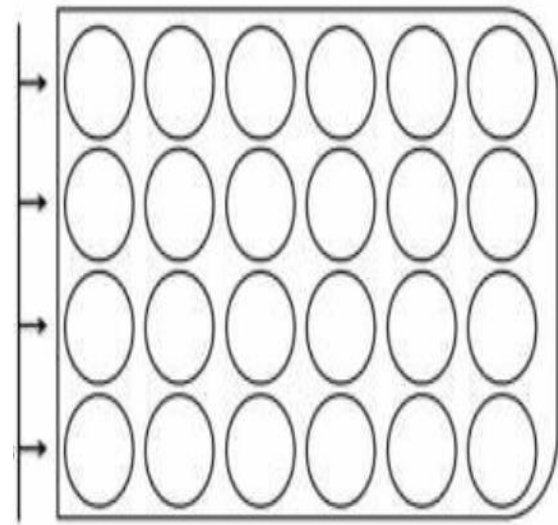


Figura 2
Cultivo Celular 24 Pozos “Wells”



Figura 3
Primer Protocolo de Transfección

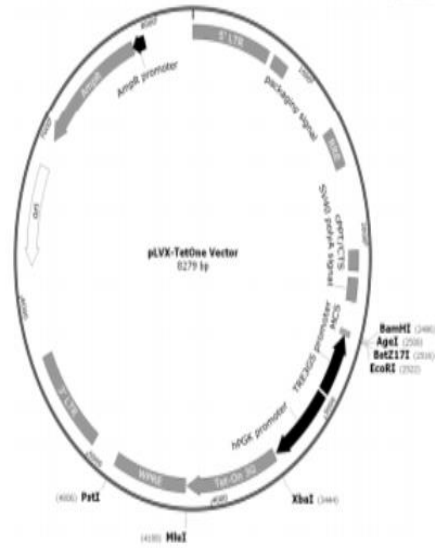


Figura 4
Mapa del Vector

Tabla 1
Descripción de Células e Infección

HEK293 10ng sin filtro		
Well	Status	Run Time
A3	OK	2/26/18 2:19 PM
A4	OK	2/26/18 2:19 PM

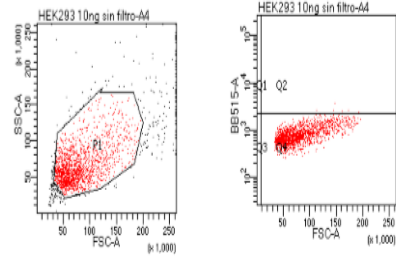
HEK293 100ng sin filtro		
Well	Status	Run Time
A5	OK	2/26/18 2:19 PM
A6	OK	2/26/18 2:19 PM

HEK293 filtrada		
Well	Status	Run Time
A7	OK	2/26/18 2:19 PM
A8	OK	2/26/18 2:19 PM

HEK293 10ng filtradas		
Well	Status	Run Time
A9	OK	2/26/18 2:19 PM
A10	OK	2/26/18 2:19 PM

HEK293 100ng filtradas		
Well	Status	Run Time
A11	OK	2/26/18 2:19 PM
A12	OK	2/26/18 2:19 PM

BD FACSDiva 8.0.1.1



BD FACSDiva 8.0.1.1

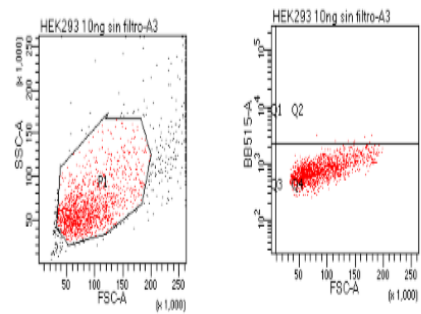


Figura 5
Diferenciación de Partículas Virales en las Células Infeccionadas

Tabla 2
Continuación Descripción de las Celulas e Infección

HEK293 TET free		
Well	Status	Run Time
B1	OK	2/26/18 2:20 PM
B2	OK	2/26/18 2:20 PM

HEK 293 TET free 10ng		
Well	Status	Run Time
B3	OK	2/26/18 2:20 PM
B4	OK	2/26/18 2:20 PM

HEK293 TET free 100ng		
Well	Status	Run Time
B5	OK	2/26/18 2:20 PM
B6	OK	2/26/18 2:20 PM

A549 TET free		
Well	Status	Run Time
B7	OK	2/26/18 2:20 PM
B8	OK	2/26/18 2:20 PM

A549 TET 10 ng		
Well	Status	Run Time
B9	OK	2/26/18 2:20 PM
B10	OK	2/26/18 2:20 PM

A549 TET 100ng		
Well	Status	Run Time
B11	OK	2/26/18 2:21 PM
B12	OK	2/26/18 2:21 PM

Análisis

En la fase de medición se realizó un análisis utilizando la técnica de citometría de flujo. Comenzando con el desarrollo de sistemas de expresión de genes. Que pueden ser utilizados en células de mamíferos. Esta información fue transferida por medio de un vector cuyo plásmido es específico para el virus del dengue. Utilizando un procedimiento comercial de “Clontech laboratorios, Inc A Takara Bio Company”. Una vez cultivadas las células necesarias para el resto del experimento. Estas crecen en un medio de cultivo antes mencionado llamado DMEM 10 donde el número representa la concentración. Se realiza la titulación del virus. De esta medida podemos calcular el MOI del virus.

MDI también conocido por sus siglas en inglés (MOI) es el índice múltiple de infección esto es la cantidad de virus que se agregan por células durante la infección. Se utiliza para saber la cantidad en específico de células infectadas. Un ejemplo sería que, si añadiéramos un millón de virus a un millón de células, la MOI es uno.

Luego del cultivo de células a las mismas se les transfiere el vector de interés. Se utilizó el gen de interés añadiendo a cada pozo 5µg a cada pozo. Para mantener un mayor control del mismo se utilizaron controles negativos las mismas placas con las mismas condiciones, pero sin el DOX (Doxiciclina) reactivo que va a provocar la reacción que estamos buscando. Este primer análisis se trabajó con la concentración del DOX a 10ng. De acuerdo con la concentración pudimos observar la expresión del virus en las células.

Uno de los objetivos es probar la capacidad de inhibición del virus quiere decir que el virus logra pasar por nuestra primera línea de defensa y replicarse. Esta inhibición donde teníamos el control de un señalador se mide a través del citómetro de flujo en las células HEK 293/ RIG-1 que se infectaron con el virus diluido en serie y se verificaron 24hrs más tarde según el protocolo comercial utilizado (Clontech laboratorios, Inc A Takara Bio Company) una vez teñidas las células

observamos la inhibición en la expresión [4]. Cada punto rojo representa las células infectadas.

Ese resultado nos lleva a querer buscar más de las especificaciones del virus para poder evaluar una respuesta más específica y conocer las proteínas de este virus. Esto nos ocurre con todos los virus para crear un tratamiento ya sea medicinal o de vacunación.

Todas las moléculas de STAT son fosforiladas y esto causa la activación que les permite ser el factor de transcripción. Activadas por los IFN asociándose a los receptores formando así el complejo de STAT1 y STAT2.

Diseño

Para la mejora de este proceso experimental el conocimiento de la organización genética de este virus o cualquier otro patógeno nos brinda la capacidad de definir el estudio de la vida del patógeno y como este interacciona con el sistema inmunológico del ser humano.

Utilizando la metodología de DMADV la solución de evitar la inhibición del virus del DENV por medio de la creación de una vacuna, está en las continuas modificaciones de factores de control en el manejo de la infección experimental. La concentración del reactivo señalador DOX a concentraciones mas alta de 10ng buscando así optimizarlo. Trabajar con la cantidad del conteo de partículas infectadas MOI. Como control de comparación podemos añadir un segundo flavivirus como lo es el virus del Zika.

Verificación

Después de recopilar los datos sobre la fase de medición, los datos se analizaron utilizando la técnica de citometría mostrada a continuación.

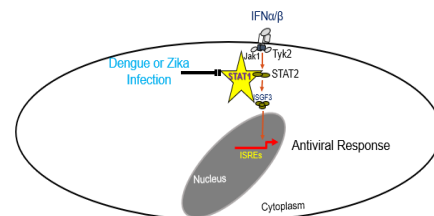


Figura 6
Señal del IFN

Diagrama de descripción

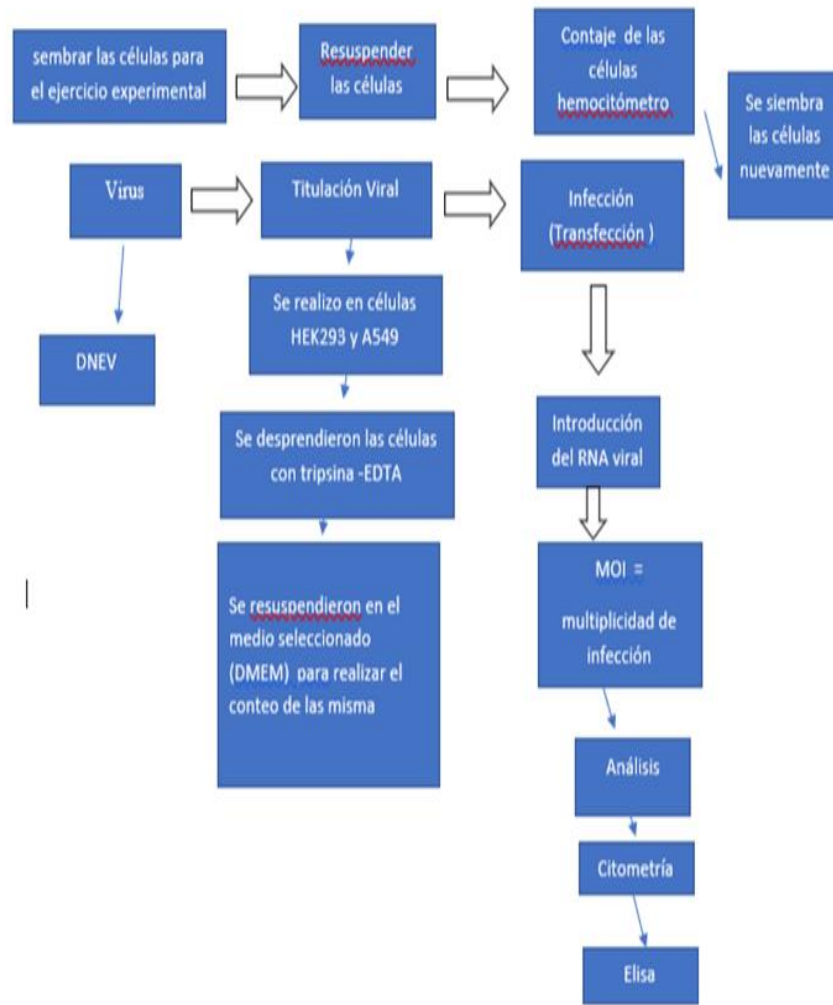


Figura 7
Diagrama de Descripción

La capacidad del virus del dengue inhibición sistema inmunológico está demostrada en las gráficas a continuación.

Por medio de este experimento llegamos a la confirmación del potencial de inhibición del virus del dengue. La inhibición de IFN α/β proteínas de señalización se mantiene.

Aunque podemos observar variaciones en las concentraciones la inhibición esta presente. La doxiciclina es un derivado sintético de tetraciclina que es la molécula efectora que nos permite prender y apagar la activación de la expresión en su

presencia provoca la unión específica que buscamos del virus y activa las transcripciones.

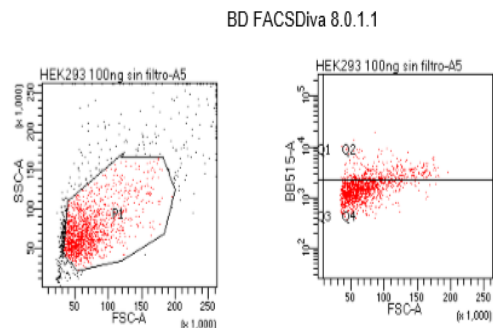
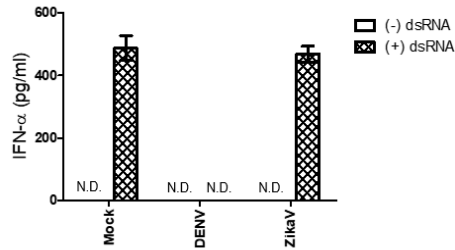


Figura 8
STAT Fosforilado con DENV. HEK293/RIG-1



N.D. = not detected

Figura 9

DENV y Zika inhiben la Producción de Interferón IFN α/β

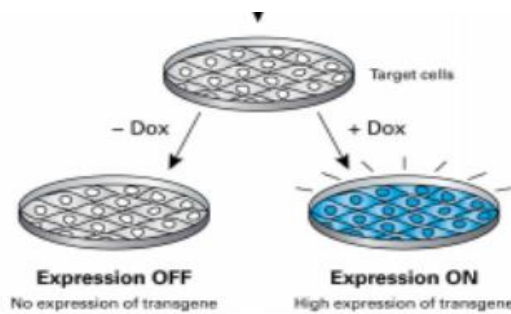


Figura 10

Células Inducidas para Expresión [4]

CONCLUSIONES

En cumplimiento con cada uno de los objetivos podemos mencionar que los mismos fueron exitosamente completados. El virus del dengue tiene la capacidad de inhibir las señales de las proteínas señaladores de patógenos en el cuerpo (IFN). Con la excepción de la creación de la vacuna en este punto del experimento se debería explorar más con cada uno de los factores variables del sistema inmunológico el conocimiento del comportamiento del virus está presente, pero es necesario llevarlo a las variaciones clínicas. El punto de partida ideal para el diseño de una vacuna sería el conocimiento exhaustivo de la forma en que el sistema inmunológico humano responde a sea infección en particular y de los mecanismos que permiten eliminar el virus rápidamente del cuerpo. De ahí que con la información obtenida de esta investigación y artículos que sustenta lo estudiado

podemos decir que estamos cerca de la invención de una próxima vacuna eficiente.

REFERENCIAS

- [1] P. Parham, *Inmunología -2ad-* Buenos Aires: Medica Panamericana, 2006.
- [2] S. Aguirre, A. M. Maestre, S. Pagni, J. R. Patel, T. Savage, D. Gutman, K. Maringer, D. Bernal-Rubio, R. S. Shabman, V. Simon, et al., *DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING*, PLoS Pathog. 8, e1002934, 2012.
- [3] F. Medina, J. F. Medina, C. Colon, E. Vergne, G. A. Santiago, et al., *Dengue virus: isolation, propagation, quantification, and storage*, Curr Protoc Microbiol Chapter 15: Unit 15D 12, 2012.
- [4] Takara Bio's Tet Systems were developed in cooperation with Dr. Bujard and his colleagues at the Center for Molecular Biology in Heidelberg (ZMBH) and in Dr. Wolfgang Hillen's laboratory at the University of Erlangen, Germany. Additional background information on Tet-regulated gene expression systems and an extensive bibliography are available at the website maintained by TET Systems: <http://www.tetsystems.com>.