

Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Biotecnología

*Inducción de Anticuerpos Protectores Contra
el Virus Dengue en Ratones Inmunizados con DNA*

TESIS

Que para obtener el título de
Doctor en Ciencias Bioquímicas
Presenta el C:

M. en C. Javier Mota Sánchez

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: JAVIER MOTA SÁNCHEZ

FECHA: 31/08/2007

FIRMA: [Firma]

Director de tesis:
Dr. Celso Ramos García



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Contenido

Título	Página
1. Resumen	4
2. Introducción	5
3. Epidemiología	7
4. El vector	10
5. El virus	13
6. Diagnóstico	21
7. Tratamiento	23
8. Prevención y control	24
9. Respuesta inmune y anticuerpos facilitadores	26
10. Vacunas	31
11. Hipótesis	47
12. Objetivo general	48
13. Objetivos específicos	49
14. Materiales y métodos	50
14.1 Virus, células e inmunofluorescencia indirecta (IFI)	50
14.2 Diseño de Oligonucleótidos	51
14.3 RT-PCR y PCR	53
14.4 Construcción de los plásmidos con el dominio III	54
14.5 Ensayos de transfección	57
14.6 Inmunizaciones y obtención de suero	58
14.7 Detección de anticuerpos por ELISA	59
14.8 Ensayos de protección en células BHK-21 y ratones neonatos	60
14.9 Análisis estadístico	61
15. Resultados	61
15.1 Obtención de los plásmidos recombinantes	61
15.2 Análisis de la expresión del dominio III recombinante	64
15.3 Respuesta de anticuerpos contra el virus dengue	64

15.4 Evaluación de anticuerpos protectores	75
16. Discusión y Perspectivas	80
17. Bibliografía	84
18. Anexo I	99
19. Anexo II	107
20. Anexo II (b)	115
21. Anexo III	116

1. Resumen

La fiebre por dengue (FD) y sus manifestaciones graves: Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) y el Síndrome de Choque por Dengue (SCD), es considerada la enfermedad viral transmitida por vector más importante a nivel mundial. A pesar de los esfuerzos, actualmente no existe una vacuna que pueda ser usada en humanos. El presente trabajo tiene como objetivo analizar el uso de la inmunización con DNA, para inducir la producción de anticuerpos protectores contra el virus dengue (VD) en un modelo de ratón; usando como antígeno al Dominio III (DIII) de la proteína de Envoltura (E) de los cuatro serotipos del VD. La región del DIII de la proteína E (aa 297-394), se amplificó por PCR y se clonó en el plásmido pcDNA 3. La expresión del DIII se analizó mediante ensayos de transfección transitoria en células COS-7 empleando anticuerpos monoclonales para cada serotipo. Los plásmidos obtenidos y purificados se emplearon para inmunizar ratones BALB/c con diferentes concentraciones, en forma individual o con diferentes dosis de una combinación tetravalente. La presencia de anticuerpos específicos contra el VD se analizó por ELISA. Los ensayos de protección se llevaron a cabo en células BHK-21 mediante el ensayo de inhibición del efecto citopático (ECP), así como también, en ratones lactantes retados intracranealmente con virus dengue-2. Los resultados mostraron que el DIII de cada uno de los serotipos se expresó correctamente en las células transfectadas; aproximadamente un 70-80 % de las células fueron positivas, mientras que las células tratadas con el vector vacío fueron negativas. Se observó que la inmunización en forma individual con los plásmidos con el DIII induce la producción de anticuerpos específicos contra el serotipo correspondiente; el título de anticuerpos anti-dengue no se incremento en forma significativa con los refuerzos administrados usando la misma dosis de plásmido. Cuando se inmunizó con la mezcla tetravalente, se observó la inducción de anticuerpos contra los cuatro serotipos, esta respuesta fue dosis-dependiente obteniéndose títulos similares a la inmunización individual cuando se usó la misma concentración de DNA. En los ensayos de inhibición del ECP, los resultados mostraron títulos de anticuerpos neutralizantes de 1:10, tanto en los ratones inmunizados en forma individual como con la combinación tetravalente, sin embargo el efecto protector de estos anticuerpos en los ensayos en ratones lactantes fue distinto, obteniéndose un 43 % de protección cuando se inmunizó en forma individual, mientras que cuando se inmunizó con los 4 plásmidos se alcanzó un 87 % de protección. Los resultados de este trabajo muestran que el DIII del VD puede ser usado como antígeno para inducir la producción de anticuerpos contra el VD mediante inmunización con DNA. Estos anticuerpos son específicos y neutralizantes; se demostró que se puede obtener mejores niveles de protección cuando se inmuniza con la mezcla tetravalente.

2. Introducción

La fiebre por dengue (FD) es un problema de salud pública a nivel mundial, se estima que millones de casos ocurren anualmente y la mayoría de las personas que viven en zonas endémicas se encuentra en riesgo de contraer la enfermedad (Monath, 1994; Gubler, 1995) (Figura 1). El agente etiológico de la FD es el virus dengue (VD) que incluye cuatro serotipos, Den-1 al 4 (Rosen, 1999). El VD pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* y es transmitido al humano mediante la picadura del mosquito vector *Aedes sp.* (Gubler, 1995).

El VD causa la enfermedad viral transmitida por vector más importante a nivel mundial (WHO, 1997), y en años recientes el número de casos de fiebre clásica o fiebre por dengue (FD), así como de sus manifestaciones más severas: la fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y el síndrome de choque por dengue (SCD) se han incrementado notablemente, en parte debido a la falla en las estrategias de control, basadas principalmente en el control del vector (Monath, 1994; Gubler, 1995; WHO, 1997; Rosen, 1999).

A pesar de los esfuerzos, en la actualidad no se cuenta con una vacuna o droga para controlar la enfermedad, aun cuando se han desarrollado exitosamente vacunas contra otros flavivirus como el virus de la fiebre amarilla (FA), el de la encefalitis japonesa (EJ) y el de la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG) (Barrett, 1997(a); Barrett, 1997(b); Barrett, 2001; Kinney, 2001; Halstead, 2002; Pugachev, 2003). Sin embargo, se han llevado a cabo diversas aproximaciones metodológicas para desarrollar una vacuna contra el VD, que incluyen el uso de virus vivos atenuados (Men, 1996; Bhamarapravati, 2000; Durbin, 2001; Kanesa-thasan, 2001; Rothman, 2001; Monath, 2002), virus quiméricos (Pletnev, 1992; Guirakhoo, 2001; Huang, 2003),

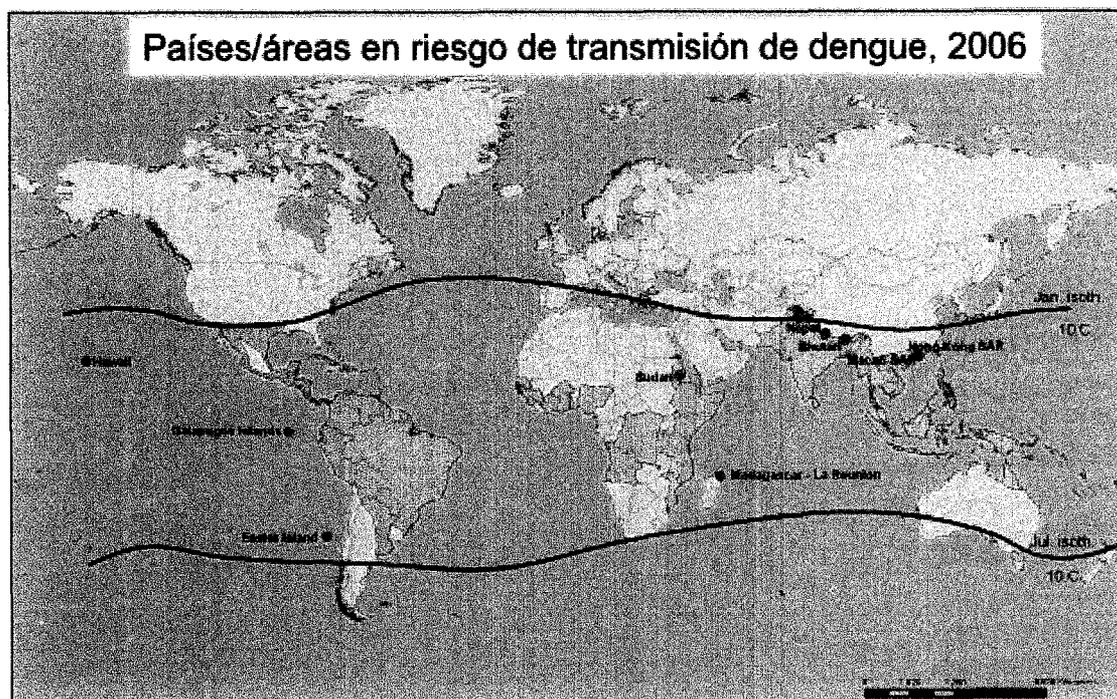


Figura 1. Mapa de la distribución de los países en riesgo de transmisión de dengue y dengue hemorrágico (www.denguenet.com; último acceso Mayo, 2007).

antígenos recombinantes y vacunas basadas en el uso de virus como vectores (Srivastava, 1995; Simmons, 1998; Stephenson, 1998; Men, 2000; Simmons, 2001(a); Simmons, 2001(b)), más recientemente, se han desarrollado candidatos a vacuna basados en el uso de DNA desnudo (Kochel, 1997; Porter, 1998; Konishi, 2000; Kochel, 2000; Puttikhunt, 2003; Raviprakash, 2003). En el diseño de una vacuna contra el VD es necesario tomar ciertas consideraciones, ya que en aquellas personas infectadas con VD y que sufrieron una infección previa con un serotipo distinto, existe el riesgo de desarrollar FHD/SCD debido a la presencia de anticuerpos de reacción cruzada inducidos en una primera infección; esto es conocido como la teoría de la facilitación

inmunológica (FI) (Halstead, 1970), por tal razón, una vacuna eficaz debe ser capaz de inducir una respuesta inmune protectora contra los cuatro serotipos.

3. Epidemiología

La fiebre por dengue constituye un importante problema de salud pública mundial, donde más de 2 mil millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad. El mapa de distribución de la enfermedad a nivel mundial se relaciona con la distribución del vector el mosquito *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) (Figura 2). Se estima que en las regiones endémicas se reportan anualmente más de 100 millones de casos de FD, de los cuales, 250 mil casos corresponden a FHD (WHO, 1997).

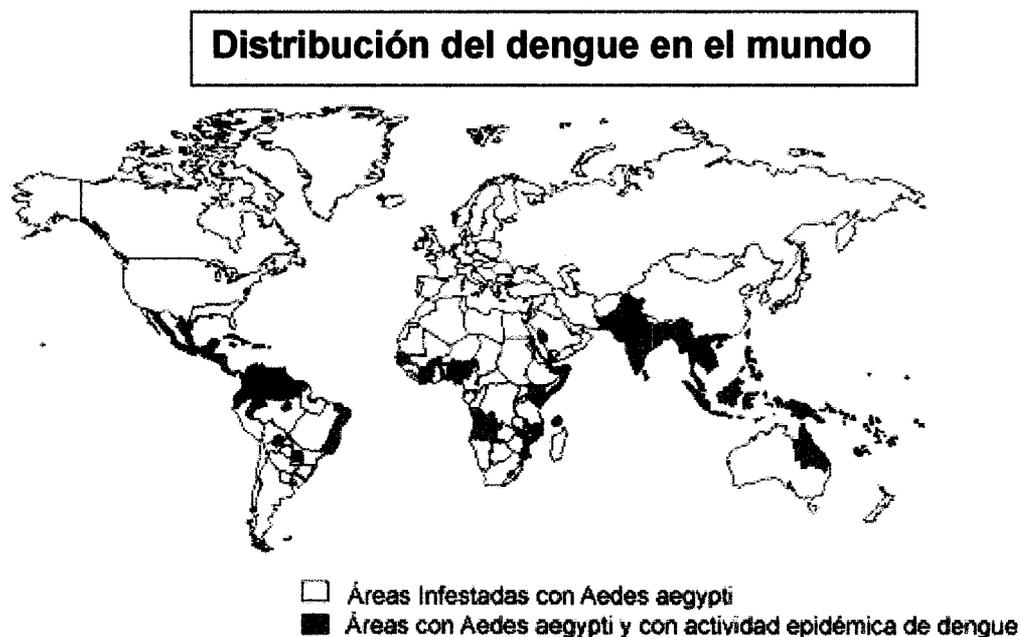


Figura 2. Relación entre las áreas infestadas con *Ae. aegypti* y casos de dengue en el mundo (www.cdc.com; ultimo acceso Mayo, 2007).

Los primeros casos de FHD fueron descritos durante epidemias de dengue clásico en Australia en 1897, en Grecia en 1928 y en Formosa en 1931 (Jonson, 1967). En 1954, en Manila ocurrió una epidemia de fiebre hemorrágica conocida como Fiebre Hemorrágica Filipina, que posteriormente se demostró, había sido causada por los serotipos 3 y 4 de dengue. Posteriormente la FHD fue descrita en diversos países del Sur Este Asiático, por ejemplo, en China la enfermedad fue reportada por primera vez en 1985 (Burke, 1988) y en el caso de las Américas, casos esporádicos de FHD se presentaron durante los años 70 y la primera epidemia fue reportada al inicio de los 80 (Halstead, 1989).

Los cuatro serotipos pueden causar FHD y SCD; en Tailandia, el serotipo 2 estuvo asociado predominantemente a estos síndromes hasta los años 80 cuando los serotipos 3 y 4 aparecieron como serotipos importantes (Burke, 1988). En América, en los países de Cuba, Venezuela y Brasil las epidemias de FHD ocurrieron cuando una cepa específica del serotipo 2 fue introducida 3 o 4 años después de una epidemia por Den-1. La secuencia de los serotipos infectantes, el intervalo entre las infecciones y las diferencias en la virulencia de las cepas pueden ser determinantes importantes de los patrones clínicos y epidemiológicos de la fiebre hemorrágica por dengue (Halstead, 1989), sin embargo, la falta de un modelo animal ha impedido aseverar o refutar estas preguntas, no obstante, existen evidencias experimentales con respecto a la capacidad replicativa del virus y diferencias en el genoma, que sugieren que factores asociados al propio virus pueden contribuir a la patogénesis de la FHD (Rico-Hesse, 1990).

El incremento en la incidencia y prevalencia de la enfermedad se deben principalmente a: A) El rápido crecimiento de la población mundial y del número de nuevos criaderos del vector; B) El crecimiento de las poblaciones del mosquito vector

Ae. aegypti y; C) Incremento de los movimientos poblacionales debidos principalmente al mejoramiento de los medios de transporte, lo cual facilita el contacto de hospederos virémicos con el vector (Monath, 1994). En áreas donde diversos serotipos del virus dengue se transmiten existe una mayor probabilidad de que se presenten los cuadros severos de la enfermedad, ya que se ha observado que segundas infecciones con un virus heterólogo es un factor de riesgo para FHD y SCD. Esta observación está basada en la teoría de la facilitación inmunológica (Halstead, 1970; 1988), la cual ha sido descrita ampliamente para el virus dengue y para otros flavivirus (ver sección 9 más adelante).

Los factores ambientales juegan un papel muy importante en la evolución de las enfermedades virales, principalmente en aquellas enfermedades zoonóticas donde el virus es transmitido por un vector y un ejemplo es la FD. El dengue es una de las enfermedades de más rápida emergencia en las regiones tropicales del mundo con millones de casos ocurriendo cada año. Por ejemplo en Puerto Rico, en los primeros 75 años de este siglo se presentaron 5 epidemias por dengue, sin embargo en los últimos 12 años el país ha experimentado 6 epidemias. De la misma forma países como Cuba, Brasil, Bolivia, Paraguay, Ecuador y Nicaragua han reportado grandes epidemias en menos de 50 años (Gubler, 1993; Monath, 1994; Gubler, 1995). Diversos serotipos han estado involucrados en estas epidemias y actualmente los cuatro serotipos circulan en las Américas, lo cual representa un mayor riesgo para la aparición de casos hemorrágicos, de hecho actualmente se reportan más de 3000 casos de FDH cada año.

4. El vector

Una de las razones para que el dengue sea considerada una de las principales enfermedades emergentes o reemergentes en la actualidad, tiene que ver con el control del vector, el mosquito urbano *Ae. aegypti* (Figura 3). Principalmente en los países en vías de desarrollo, las densidades de mosquito se incrementan debido a que los programas de control han sido insuficientes, debido a la falta de recursos económicos principalmente (Gubler, 1993); aunado a esto, el mosquito tigre del Sureste Asiático *A. albopictus* ha sido importado a América. Los hábitos de ambas especies son complementarios, mientras que *Ae. aegypti* ocupa sus nichos tradicionales dentro de las casas, *A. albopictus* se instala cerca en las zonas boscosas o con vegetación. Además de la emergencia de casos de dengue por las condiciones antes expuestas existe también el riesgo de la reemergencia de la fiebre amarilla, ya que si los programa de control del vector (que es el mismo para dengue que para fiebre amarilla: *Ae. aegypti*) fallan, las condiciones serían favorables para la transmisión de este virus (Monath, 1994).

Pertenece al subgénero *Stegomyia*, *Aedes aegypti*, es una especie que se originó probablemente en África, donde existen formas selváticas y domésticas mientras que en las Américas solo se encuentran estas últimas. La distribución del vector se restringe a las regiones tropicales y subtropicales, entre las latitudes 35° norte y 35° sur. Sin embargo, ha sido posible observar insectos hasta los 45° de latitud norte durante las estaciones calidas (OPS, 1995). La distribución de *Ae. aegypti*, está también limitada por la altitud, aunque generalmente no se encuentra por encima de los 1,000 metros, se ha observado a 2,121 metros en la India y a 2,2000 metros en Colombia, donde la temperatura anual media es de 17°C.

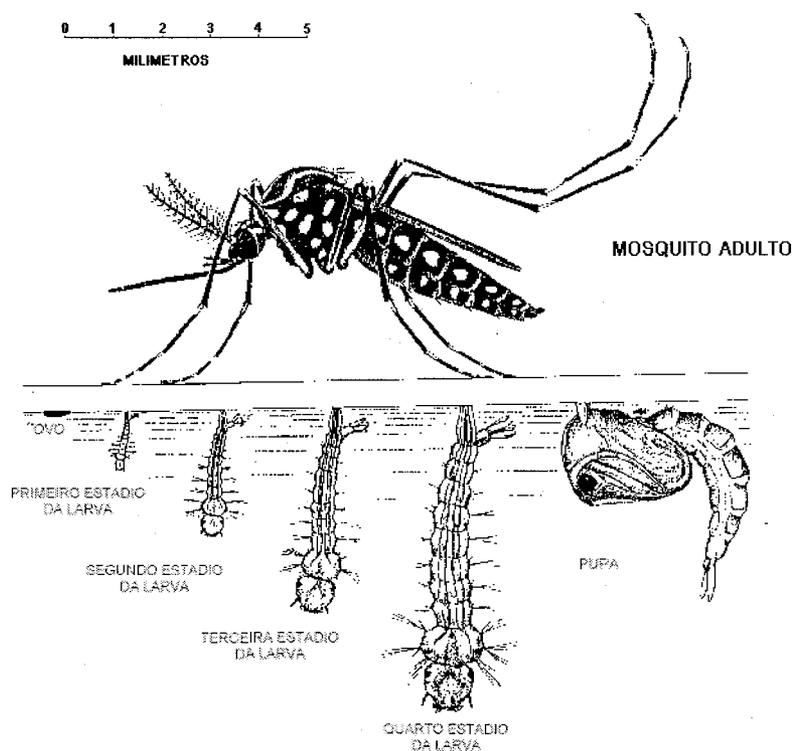


Figura 3. El virus dengue es transmitido por la picadura de hembras de mosquitos del subgénero *Stegomyia*. El principal vector es *Aedes aegypti*; una vez infectados los mosquitos permanecen así de por vida. Los mosquitos también pueden transmitir al virus de forma transovarica a su descendencia.

(www.prefeitura.unicamp.br/prefeitura/CA/DENGUE/AEDES2.gif; último acceso Mayo, 2007).

La densidad del vector y los factores que determinan la exposición al mosquito hembra infectado, es lo que determina el grado de transmisión de la enfermedad. Los

hábitos domésticos de *Ae. aegypti* aseguran que las infecciones se den dentro y alrededor de las viviendas humanas. Se ha observado que donde existen casos de dengue se han encontrado de 10 a 20 hembras por habitación, de las cuales del 5 al 10 % se encuentran infectadas (Ilkal, 1991). El comportamiento del mosquito comúnmente presenta periodos interrumpidos de alimentación, lo que le permite alimentarse de sangre en múltiples ocasiones y en posiblemente diferentes individuos, lo cual contribuye a la rápida transmisión del dengue y a la naturaleza explosiva de las epidemias (Ko, 1992).

Una de las razones en el incremento de la incidencia de casos de dengue a nivel mundial, tiene que ver con un incremento en la densidad de *Ae. aegypti*, provocado por la incontrolable expansión de las poblaciones humanas. En las últimas dos décadas el continente americano fue re-invasado por *Ae. aegypti* (Figura 4), lo que ha resultado en grandes epidemias y en el establecimiento de los cuatro serotipos en muchas áreas donde el dengue es endémico (Ehrenkranz, 1971; Gubler 1993; Gubler, 2002).

Como se mencionó antes, otras especies de *Aedes* pueden transmitir al virus, jugando un papel importante en la transmisión de la enfermedad. *Aedes albopictus* fue introducido al continente americano a Brasil y a los Estados Unidos en el año de 1985 y desde entonces se ha reportado el aislamiento de virus dengue en esta especie, sin embargo la importancia epidemiológica en la transmisión de la enfermedad, no ha sido estudiada adecuadamente (Gubler, 1993, Monath, 1994).

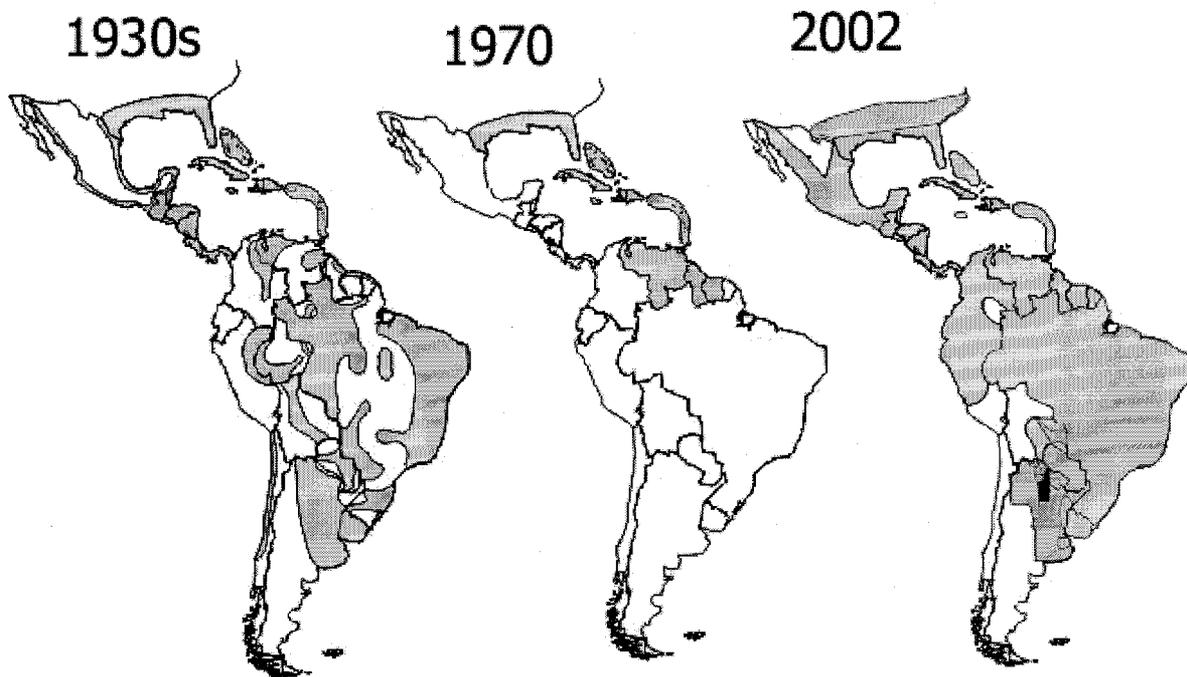


Figura 4. Distribución de *Aedes aegypti* en el continente Americano desde los años 30 hasta el 2002. La re-invasión del continente por el mosquito vector ocurrió a finales de la década de los 70 y a principios de la de los 80 debido principalmente al colapso de los programas de control y al incremento en los criaderos de larvas debido a la urbanización. (Gubler, 2002, OPS/OMS, 2002)

5. El virus

El virus dengue se clasifica dentro del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* (del latín *flafus* que significa amarillo) y forma parte de los más de 500 miembros del grupo de los arbovirus (virus transmitidos por artrópodos). Dentro de los arbovirus, los patógenos más importantes están comprendidos entre las familias de virus de RNA : *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae* y *Flaviviridae* (Karabatsos, 1985; Francki,

1991). Estos virus al tener genomas de RNA, que son más plásticos y adaptables debido a la tasa de mutaciones, pueden haber sido favorecidos hacia una transmisión mediada por artrópodos, ya que se necesitan periodos alternados de replicación entre hospederos vertebrados e invertebrados, lo que incrementa la posibilidad de acumular mutaciones que le confieran un fenotipo con mayor adaptación a sus distintos hospederos (Holland, 1991; Monath, 1996). Las epidemias más severas causadas por arbovirus han sido causadas por togavirus, alfavirus, flavivirus y bunyavirus. El virus de la fiebre amarilla, fue el primer flavivirus al cual se le comprobó una transmisión por artrópodos en el año de 1900 (Monath, 1988) y fue hasta el año de 1907 que el dengue fue reconocido como una enfermedad viral y desde entonces continúa siendo la causa principal de epidemias en la mayoría de las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo, donde se encuentra el vector (mosquito del género *Aedes*). La distribución del dengue incluye las Américas, África, Asia y el Sureste del Pacífico, donde millones de personas son infectadas anualmente (Baldrige, 1989; Monath, 1994).

El virus dengue es esférico de aproximadamente 50 nm de diámetro (Figura 5a), es un virus envuelto con un genoma de RNA de una sola cadena de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb, que contiene una región cap en el extremo 5' pero carece de una secuencia poli-A en su extremo 3' (Rice, 1989; Lindenbach, 2001). Las regiones 5' y 3' no traducidas (de 120 y 500 nt de largo, respectivamente) son esenciales para la replicación y traducción eficiente del RNA viral. La traducción del genoma resulta en la síntesis de un único precursor poli-proteico que contiene a las proteínas virales en el orden: C-prM/M-E-NS1-NS2A/2B-NS3-NS4A/4B-NS5 (Figura 5b), donde C corresponde a la proteína de la cápside, M a la proteína de membrana y E a la proteína de envoltu-

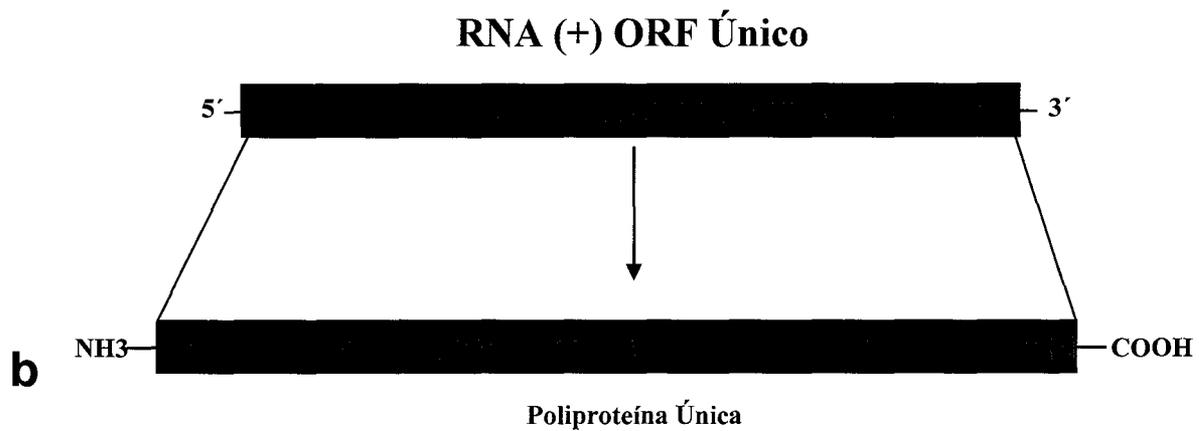
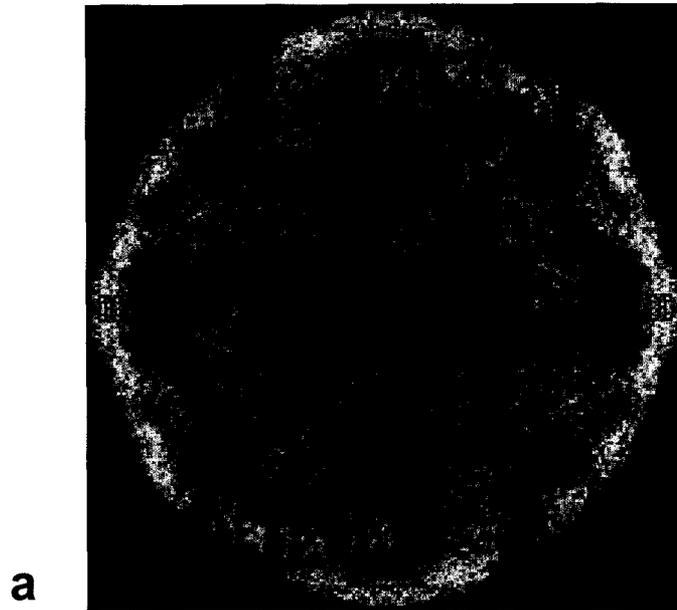


Figura 5. Estructura del viri3n y del genoma viral. (a) representaci3n del viri3n maduro en base a la estructura at3mica de la prote3na E, donde se muestran los dominios I (rojo), II (amarillo) y III (azul). (b) estructura del genoma del virus dengue. Las prote3nas estructurales se encuentran codificadas en el extremo 5', mientras que las no estructurales en el 3'.

ra, todas estas proteínas estructurales que conforman al virión maduro. La nomenclatura NS es utilizada para las diversas proteínas no estructurales que son usadas para la amplificación y expresión del genoma viral. La poli-proteína viral es procesada tanto por proteasas virales como de la célula huésped para dar como resultado final a las proteínas virales. La proteína prM, que es el precursor para la proteína M, junto con las proteínas E y NS1 son translocadas al lumen del retículo endoplasmático donde su región amino-terminal es generada mediante la acción de las enzimas de la célula huésped. La región carboxilo-terminal permanece anclada a la membrana (Rice, 1989; Lindenbach, 2001). La región amino-terminal de la proteína NS4B también es procesada por proteasas celulares. Por otro lado, la proteasa viral NS2B/NS3, que pertenece a la familia de las proteasas serin tripsin-like, lleva a cabo la mayoría del procesamiento de las proteínas NS restantes del virión, así como la forma madura de la proteína C (Yamshchikov, 1993; Amberg, 1999). La proteína C interacciona en el citoplasma con el RNA genómico nascente para formar la nucleocápside, los viriones inmaduros son formados entonces en el lumen del retículo endoplasmático y transportados hacia la superficie celular a través de la vía exocitosis. Durante este proceso las proteínas prM, E y NS1 son glicosiladas. La proteína prM es cortada para producir su forma madura (no glicosilada) poco antes de que los virus sean liberados, mediante la acción de una furina celular (Stadler, 1997). Existe la hipótesis de que la proteína prM tiene la función de proteger a la proteína E de cambios conformacionales (irreversibles) que pueden ocurrir durante el paso de los viriones inmaduros a través de los compartimientos celulares de naturaleza ácida (Lindenbach, 2001). La proteína prM se dobla rápidamente y es requerida para el doblamiento apropiado de la proteína E, lo que sugiere un papel de tipo chaperona (Lorenz, 2002). A

diferencia de lo que sucede en células de mosquitos, en células de mamíferos la proteína NS1 se localiza de forma intracelular y se piensa que juega un papel en el proceso de síntesis del RNA viral (Mason, 1989; Muylaert, 1997).

La glicoproteína E está presente en la superficie del virus y tiene diversas actividades biológicas. Participa en el ensamblaje del virión, induce la síntesis de anticuerpos neutralizantes, permite la unión a las células (fusión membranal) y la hemoaglutinación de eritrocitos (Rey, 1995; Lindenbach, 2001). No es de extrañar que mutaciones en esta proteína tengan efectos dramáticos en la patogénesis viral. La proteína E de los flavivirus es variable en ciertos dominios y muy conservadas en otros, los doce residuos de cisteínas en la proteína que forman enlaces disulfuro están altamente conservados. La proteína E de dengue está glicosilada, sin embargo, el papel que juegan los residuos N-glicosilados permanece sin esclarecerse completamente. La identificación de los epítopes neutralizantes de la proteína E del virus dengue es importante desde el punto de vista del diseño y desarrollo de una vacuna contra la enfermedad (Rey, 1995; Lorenz, 2002). Epítopes lineares de la proteína E han sido utilizados en experimentos de inmunización, sin embargo, la inducción de anticuerpos neutralizantes parece ser que depende mucho de la conformación nativa de la proteína. En base a la proteína E del virus transmitido por garrapatas (TBE), se identificaron 3 dominios antigénicos, mediante el uso de anticuerpos monoclonales, estos son los dominios A, B y C (Heinz, 1981). Recientemente se determinó la estructura tridimensional de la proteína E (la fracción soluble) y se determinó que el monómero está compuesto por tres dominios, I, II y III que corresponden a los dominios C, A y B descritos anteriormente (Rey, 1995) (Figura 6). En el caso del VD (Den-2) se ha demostrado que los determinantes antigénicos de neutralización se encuentran en el

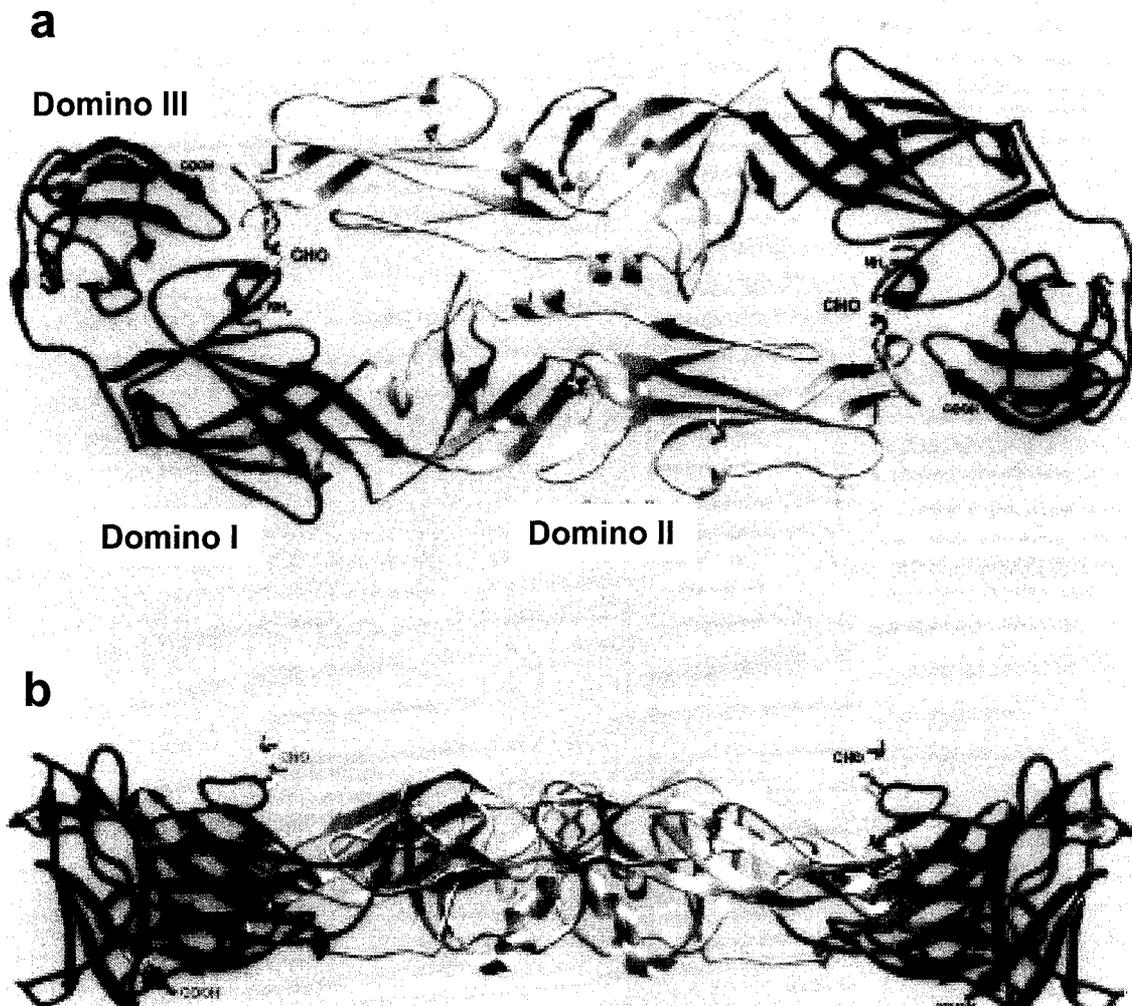


Figura 6. Representación del homodímero que forma la proteína de envoltura de los flavivirus en base a su estructura a nivel atómico. En (a) se muestra una vista frontal mientras que en (b) se presenta una vista lateral. Los dominios que conforman a cada proteína se muestran en rojo (dominio I), amarillo (dominio II) y azul (dominio III). (Rey, 1995).

dominio III (Henchal, 1982; Roehrig, 1998; Crill, 2001). Este dominio está compuesto por poco menos de 100 aminoácidos de la región carboxilo terminal de la proteína E y su estructura terciaria en forma de barril β formado por 7 laminas β antiparalelas le confiere una estructura similar a una inmunoglobulina. Esta forma globular en el virión hace que este dominio sobresalga más que cualquier parte de la proteína. Por otro lado se ha observado que la reactividad de anticuerpos neutralizantes contra esta región dependen de su conformación estructural, dada por el único enlace disulfuro del dominio (Rey, 1995).

Se ha sugerido que el dominio III participa en la unión al receptor celular (Rey, 1995), y se ha reportado que los anticuerpos neutralizantes en sueros de pacientes infectados con VD bloquean la unión del virus a su receptor en células Vero (He, 1995). Por otro lado los epítopes tipo o subtipo-específicos se encuentran en los dominios III y I, mientras que los epítopes de reacción cruzada con flavivirus se localizan en el dominio II (que es el que se encuentra más expuesto en el monómero) (Rey, 1995).

La variabilidad genética del virus dengue ha sido estudiada de diversas formas, la secuenciación de nucleótidos de regiones parciales o del gen entero de la proteína E ha sustituido a las técnicas tradicionales de "fingerprint de RNA", hibridaciones RNA-DNA, el análisis unidimensional con RNasa T1 (Kerschner, 1986), la hibridación con sondas de cDNA (Blok, 1989) y el uso de anticuerpos monoclonales.

Todas estas técnicas tienen ciertas desventajas como son el uso de radioisótopos, el alto costo, el tiempo que se necesita para obtener los resultados, la necesidad de grandes cantidades de virus, entre otras, que las hacen imprácticas en estudios de epidemiología molecular del virus dengue (Kerschner, 1986).

El estudio de asociaciones filogenéticas basadas en el uso de secuencias de nucleótidos, ha permitido la clasificación de los virus dengue en diversos "genotipos", los cuales generalmente se correlacionan con el origen geográfico de la cepa viral (Rico-Hesse, 1990). Esta clasificación genotípica ha sido de gran utilidad para determinar el origen y dispersión de las epidemias, ya que el análisis de los genotipos virales en una misma región geográfica puede permitir saber si un genotipo es autóctono o ha sido introducido de otra región endémica. Este procedimiento de introducción de cepas virales genotípicamente diferentes, puede llevarse a cabo por hospederos virémicos o por mosquitos infectados, debido a los grandes movimientos poblacionales que actualmente se realizan, gracias a la modernización de los medios de transporte (Rico-Hesse, 1997).

Las diferencias clínicas entre FD y FHD han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista inmunológico pero poco a nivel molecular. Los factores que determinan el amplio rango de manifestaciones clínicas de la enfermedad no están bien comprendidos (Rico-Hesse, 1997). Como se mencionó con anterioridad, la teoría de la facilitación inmunológica, ha sido postulada como la causa de las formas severas de la enfermedad, sin embargo, a pesar del gran número de infecciones secundarias en regiones endémicas, sólo una pequeña proporción de personas infectadas progresan hacia FHD. Otros elementos que pueden jugar un papel en el desarrollo de la patogénesis de la enfermedad son los factores virales. En el caso de Den-2, se han descrito varios subtipos genéticos o genotipos (Rico-Hesse, 1990), y se ha podido correlacionar la circulación del denominado genotipo asiático con el incremento en el número de casos de FHD en el continente americano (Leitmeyer, 1999). La introducción

del genotipo asiático en el hemisferio occidental ha desplazado rápidamente al genotipo americano autóctono.

6. Diagnóstico

El alto impacto en la salud pública que representa la fiebre por dengue hace necesaria una mejor calidad en la atención médica. Uno de los mayores retos de esta enfermedad es el poder reconocer a tiempo y de manera adecuada las características clínicas de la enfermedad, sobre todo en niños que puedan desarrollar el síndrome de FHD (Halstead, 2002).

El diagnóstico clínico diferencial se hace más complicado en aquellos casos de FD y FHD donde las manifestaciones clínicas son menos severas, donde es muy complicado diferenciarlos de muchas otras enfermedades virales. Debido a que estos casos de FHD ligera pueden evolucionar a cuadros más severos, es importante tener un diagnóstico temprano y acertado (Cao, 2002). La organización mundial de la salud, ha publicado los lineamientos para el diagnóstico y manejo de infecciones por dengue (WHO, 1997). Una de las pruebas que puede utilizarse para la definición de caso clínico de FHD es la de torniquete. Esta prueba refleja tanto la fragilidad capilar como la trombocitopenia y se considera positiva cuando se observan 20 o más petequias en un área de 2.5 cm². En individuos con piel clara, esta prueba representa un buen indicio de la enfermedad, sin embargo, la utilidad de esta prueba en el diagnóstico certero de FHD necesita ser reconsiderada en base a los resultados de trabajos que indican que esta prueba no es muy efectiva para diferenciar casos de dengue clásicos y FHD (Cao, 2002). En un estudio donde se analizaron 1136 niños vietnamitas, se evaluó la sensibilidad y especificidad de esta prueba de manera prospectiva. Los resultados

mostraron que la prueba de torniquete tiene solo un 41.6 % de sensibilidad, a pesar del 94.4 % de especificidad. Los valores predictivos positivos y negativos fueron de 98.3 % y 17.3 %, respectivamente. Solamente en el 5 % de los casos existía información adicional de sangrado, lo que ayudo a un mejor diagnóstico. En general, las conclusiones de este trabajo fueron que el torniquete es útil como una prueba de "screening" pero no debería formar parte de la definición de caso de FHD. Un valor positivo con esta prueba debe tomarse en cuenta para implementar una observación más cercana del paciente, pero un valor negativo no excluye el desarrollo de la infección y una progresión hacia un cuadro severo (Cao, 2002).

Para el aislamiento viral se dispone de diversas técnicas: a) inoculación de ratones lactantes por vía intracerebral, en los cuales la infección ocasiona parálisis y otros signos de alteración del sistema nervioso central; b) el uso de líneas celulares tanto de mamíferos como de mosquitos (Vero, LLCMK2, BHK-21 y C6/36, Ap-61, respectivamente) y c) la inoculación intratorácica de mosquitos *A. albopictus* y *Toxorhynchites amboinensis* (WHO, 1975, 1997).

Por otro lado, la identificación del virus se puede hacer mediante técnicas inmunológicas, así como moleculares. El virus puede ser identificado por inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando anticuerpos monoclonales contra cada serotipo (Henchal, 1982; 1983). Sin embargo el procedimiento para identificar al virus en cultivos celulares o mosquitos infectados puede llevar de días hasta semanas y no siempre es exitoso, debido a las pequeñas cantidades de virus viables presentes en el inóculo inicial de varios días, por lo que fue necesario desarrollar una metodología que pueda llevarse a cabo de manera rápida con una sensibilidad y especificidad suficiente para tener un uso clínico y epidemiológico. Con el desarrollo de la amplificación de

DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su siglas en inglés), facilitó el desarrollo de ensayos mediante el uso de la enzima transcriptasa reversa (RT por su siglas en inglés) para el diagnóstico del virus dengue (Lanciotti, 1992; Seah, 1995; Chien,2006)

Con respecto al diagnóstico serológico, existe el problema de la reactividad cruzada, debido a que dentro de los flavivirus muchos antígenos están compartidos o son muy similares. Esto sucede en las regiones endémicas donde los cuatro serotipos del virus dengue circulan, además de otros arbovirus como el del virus de la encefalitis Japonesa (Halstead, 2002). Sin embargo se han desarrollado diferentes ensayos de ELISA. Estos sistemas son económicos, rápidos y relativamente fáciles de implementar (Innis, 1989; Kuno, 1991). El ensayo de ELISA de captura de IgM constituye uno de los sistemas más importantes y útiles en diagnóstico y vigilancia del dengue ya que la detección de IgM es indicativo de una infección activa o reciente (Blacksell, 2006). También se han desarrollado sistemas de cromatografía de fase sólida para la detección de IgM e IgG en suero de pacientes, la cual permite tener un diagnóstico en 5 minutos con una sensibilidad y especificidad del 99 y 96 %, respectivamente (Sathish, 2002; Abhyankar, 2006).

Finalmente, se cuenta también con la prueba de neutralización por reducción de placas, la cual constituye un ensayo sensible y específico que permite la detección de anticuerpos neutralizantes (Russell, 1967[a]; Russell, 1967[b]).

7. Tratamiento

Las recomendaciones para el tratamiento de pacientes con dengue, sobre todo en aquellos con FHD/SCD, fueron hechas originalmente por la OMS en 1975 (WHO, 1975)

debido al marcado incremento en la morbilidad y mortalidad asociados con casos de FHD en el sureste asiático en los años 60.

Por muchos años ha existido la controversia sobre cuál es el mejor método para la reconstitución de líquidos en pacientes con shock, ya sea con el uso de soluciones cristaloides o coloideas. Este debate es de particular importancia para los pacientes con SCD, debido a la permeabilidad vascular. Aunado a esto, muchos de los pacientes con SCD viven en regiones de difícil acceso por lo que la atención médica especializada en hospitales adecuadamente equipados, queda fuera de su alcance (Ngo, 2001). De forma alternativa al uso de coloides y cristaloides, en las últimas 2 décadas se han desarrollado soluciones sintéticas coloideas, de las cuales algunas pueden ser de relevancia para el uso en el manejo de pacientes con SCD. Las soluciones gelatinosas se encuentran ampliamente distribuidas y actualmente se han usado también de forma empírica en algunos centros de salud en el mundo (Lan, 1995).

8. Prevención y control

Los programas de control del dengue están basados principalmente en el control del mosquito vector, sin embargo, es imposible sostener una única estrategia, que es además costosa y vertical. Actualmente se tiende a la descentralización tanto a nivel central como local. Se busca una mayor colaboración con los sectores de salud, con otras esferas gubernamentales, con organizaciones no gubernamentales (ONGs), así como también con la comunidad en general para el diseño, integración e implementación de programas de control adecuados donde se involucren diferentes estrategias de control: ambiental, biológico y químico (OPS/WHO, 1997).

Los esfuerzos de educación están orientados hacia aumentar el interés y los conocimientos de las personas sobre *Ae. aegypti* y el dengue. De acuerdo con este enfoque, la participación de la comunidad en el control de *Ae. aegypti* y otras actividades de salud tiene como objetivo máximo no sólo el control del dengue, sino, el desarrollo de la comunidad en sí, haciendo énfasis en aspectos relacionados a la autosuficiencia y la planificación, todo esto en respuesta a las necesidades expresadas por la propia comunidad.

Otra estrategia de control utilizada es la del saneamiento del medio ambiente, entendiéndose esto como cualquier modificación que impida o reduzca al mínimo la propagación de vectores o el contacto hombre-vector-organismo patógeno. El control de *Ae. Aegypti* en Cuba y Panamá a comienzos de este siglo se basó principalmente en este principio y numerosos programas en las Américas están retornando a este conjunto fundamental de tácticas. El saneamiento del medio ambiente es también parte del conjunto de medidas que se están aplicando actualmente para el control de *Ae. Albopictus* en los Estados Unidos. Muchas de estas medidas son aplicables en las regiones en las que el dengue es endémico (OPS/WHO, 1997).

Dentro de las actividades para el control de vectores se encuentra la reducción y/o reciclaje de desechos sólidos que actúan como criaderos de mosquitos. Estas actividades no sólo protegen la salud pública si no que también contribuyen a la conservación del medio ambiente.

Con respecto al control químico, su uso para el control de *Ae. Aegypti* se estableció a principios del siglo XX. En la primera campaña contra la fiebre amarilla realizada en Cuba y Panamá, además de los programas de limpieza, los criaderos fueron rociados con petróleo y las casas tratadas con piretrina en polvo. Cuando se

descubrieron las propiedades insecticidas del DDT en la década de los 40, este compuesto se convirtió rápidamente en el método principal empleado en los programas de erradicación de alcance continental de *Ae. Aegypti*. Cuando comenzó a surgir la resistencia al DDT en la década de los 60, ya se habían desarrollado insecticidas organofosforados y algunos de ellos, como el fenitón, el malatión, el fenitrotión y el temefós empezaron a usarse sucesivamente. En la actualidad se tiende a limitar el uso de los productos químicos para el tratamiento de contenedores que no puedan ser eliminados o tratados de otra forma y para situaciones de emergencia (OPS/WHO, 1997).

9. Respuesta inmune y anticuerpos facilitadores

La infección por el VD causa un amplio espectro de trastornos clínicos que van desde el cuadro clásico de FD (que se caracteriza por fiebre bifásica intermitente, escalofríos, cefalea, mialgias y artralgias), hasta las formas más severas de la enfermedad FHD/SCD y la muerte (Halstead, 1970; Rosen, 1999; Halstead, 2002). La fiebre por dengue se asocia con trombocitopenia y los pacientes frecuentemente experimentan pequeñas hemorragias, particularmente epistaxis; también se ha observado que pacientes enfermos con dengue y que presentan alguna patología gastrointestinal pueden sufrir hemorragias (Tsai, 1991). La aparición de las formas severas de la enfermedad FHD y SCD, parece estar asociada a factores que involucran al propio virus (cepa viral) y al hospedero (Figura 7). Actualmente poco es lo que se conoce acerca de la patogénesis de la enfermedad (Rosen, 1989; Rothman, 1999; Halstead, 2002). Las formas severas de la enfermedad FHD y SCD se presentan más

frecuentemente en niños del continente asiático con una frecuencia de muertes en un rango entre el 0.5 al 10%, dependiendo mucho esta cifra de la experiencia y de la

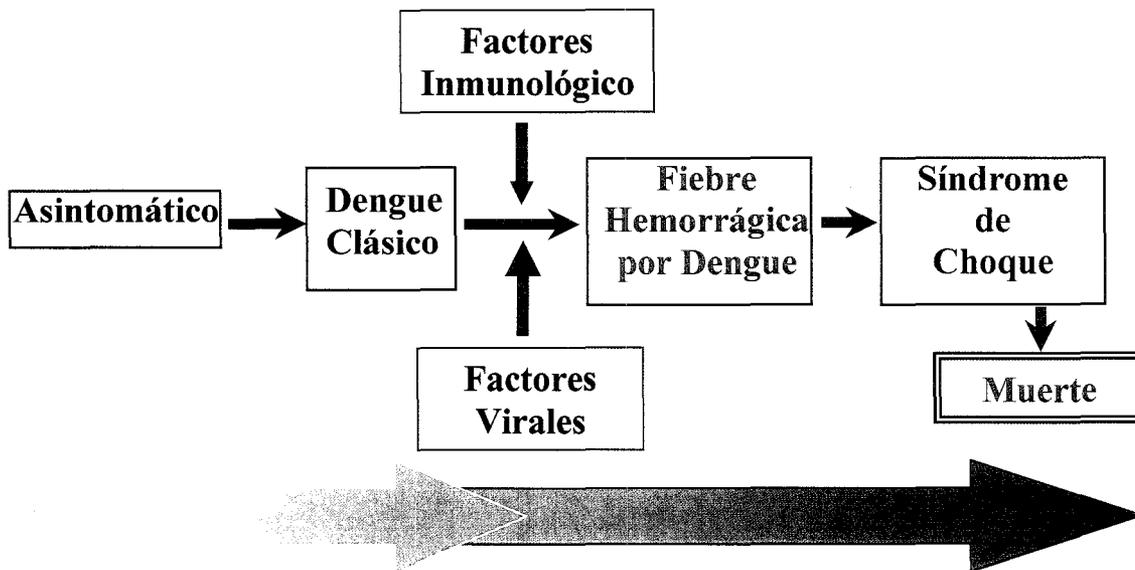


Figura 7. Desarrollo de las formas severas de la enfermedad. A partir de un caso asintomático, diversos factores pueden provocar que el paciente progrese hacia cuadros de fiebre hemorrágica, choque o incluso la muerte (Monath, 1996).

capacidad de manejo de este tipo de pacientes por parte del personal médico (Figura 8) (Shepard, 2004).

En el desarrollo de la patogénesis de FHS/SCD, tanto la respuesta humoral como la celular están involucradas. La proteína E del virión es el blanco principal para la

producción de anticuerpos neutralizantes específicos (Roehrig, 1998; Crill, 2001). Datos cristalográficos de la proteína E indican que previamente al evento de internalización, la

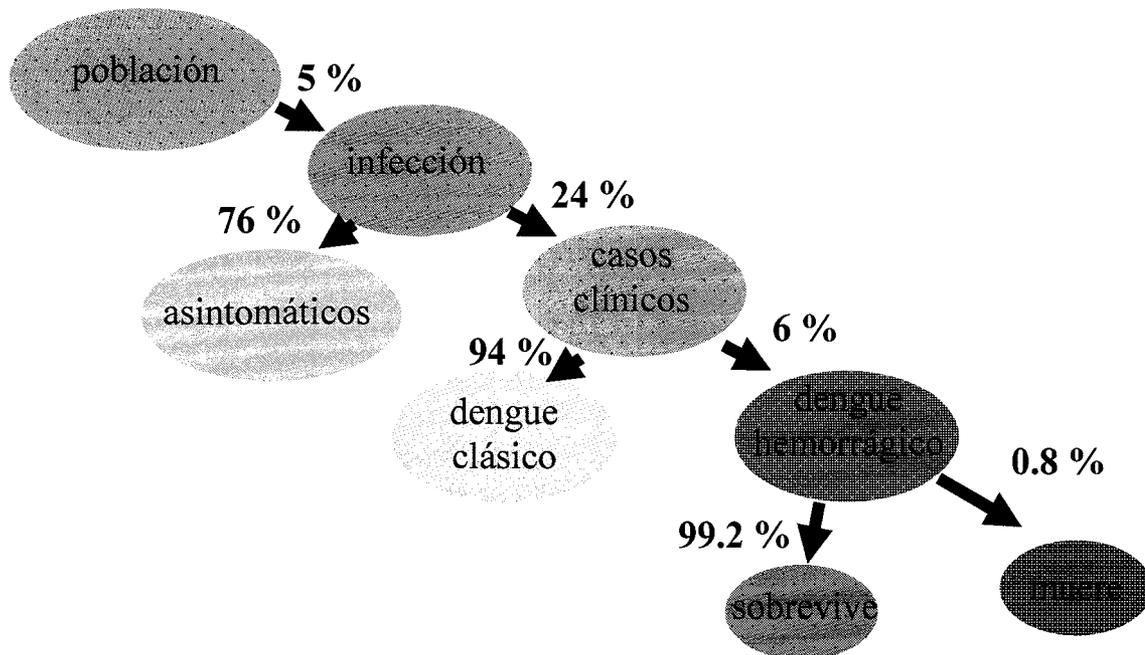


Figura 8. Dinámica de la infección por dengue. Ejemplo de porcentaje de casos por dengue que progresan hacia las formas severas de la enfermedad, en este caso en Sureste Asiático (Shepard, 2004).

proteína forma homodímeros en posición cabeza-cola a lo largo de la superficie del virion de forma paralela a la membrana de la envoltura viral. Los epítopes de anticuerpos dirigidos contra la proteína E se encuentran localizados principalmente en la cara externa del dímero (Rey, 1995). La exposición del virus a condiciones de pH ácido, como son aquellas encontradas en los endosomas después de la internalización del virus, resulta en cambios conformacionales irreversibles donde el dímero pasa a formar trímeros, lo que se piensa es un pre-requisito para la fusión de las membranas

virales y del endosoma celular que da como resultado final el desnudamiento del virus y la transferencia del genoma viral a la célula infectada (Heinz, 2001).

Se ha observado que el virus dengue se replica en altos títulos en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), siendo los monocitos la población celular más permisible a la infección. Se ha observado que en una infección secundaria por VD, los anticuerpos inducidos en la primer infección (anticuerpos de reacción cruzada-no neutralizantes o anticuerpos en concentraciones, donde la neutralización no ocurre), forman complejos con el virus, los cuales son tomados de forma más fácil por las células blanco que expresan receptores para Fc (Fc γ), tales como monocitos o macrófagos, iniciándose la replicación del virus dentro de la célula, más que su eliminación (Halstead, 1989; Morens, 1994). Este fenómeno denominado facilitación inmune, se ha hipotetizado que ocurre *in vivo* durante epidemias donde se presentan casos de FHS/SCD, y en este sentido, se ha demostrado que anticuerpos contra el VD inducidos en una infección previa por el virus dengue, pueden unirse a un nuevo serotipo en una segunda infección, pero no neutralizarlo.

Se ha observado en pacientes con SCD, que existen bajas cantidades de virus, pero grandes niveles de anticuerpos neutralizantes, así que, además al fenómeno de facilitación inmunológica la participación de la respuesta inmune celular es importante en el desarrollo de las fases severas de la enfermedad (Kurane, 1992).

La activación de células T juega también un papel en el desarrollo de la inmunopatología de la enfermedad. Clonas de reacción cruzada de células T CD4⁺ secretan interferón γ (IFN- γ) cuando son estimuladas *in vivo*, promoviendo un

incremento en la expresión de receptores Fc en macrófago, incrementando la infección mediada por anticuerpos facilitadores. Estos datos correlacionan con la presencia de altos niveles de IFN- γ en sueros de pacientes con dengue y con FHD/SCD (Kurane, 1989; Kurane, 1994).

Los niveles en suero de moléculas solubles que están involucradas en la activación de linfocitos T como, son CD4 solubles, IL-2, receptor para IL-2 soluble, e IFN- γ , se ven incrementadas en pacientes con FHD/SCD en comparación con los casos de dengue clásico, y lo mismo sucede con células CD8 (Kurane, 1991). Clonas de células T CD4⁺ y CD8⁺ establecidas en una infección primaria por dengue pueden ser estimuladas y secretar citoquinas y otros factores solubles para destruir extensivamente los macrófagos infectados. Esta actividad lítica puede ser aumentada por la regulación positiva mediada por elementos MHC inducidos por los altos niveles de IFN- γ presentes en pacientes con dengue clásico o con FHD/SCD. Los macrófagos infectados al ser lisados por las células T liberan grandes cantidades de mediadores de shock, de esta forma, la misma respuesta inmune que elimina al virus, también puede inducir el estado de shock (Bukowski, 1989; Kurane, 1991). Estas observaciones referentes a la participación de la respuesta inmune celular en la inmunopatogénesis de FHD/SCD se esquematizan en la Figura 9.

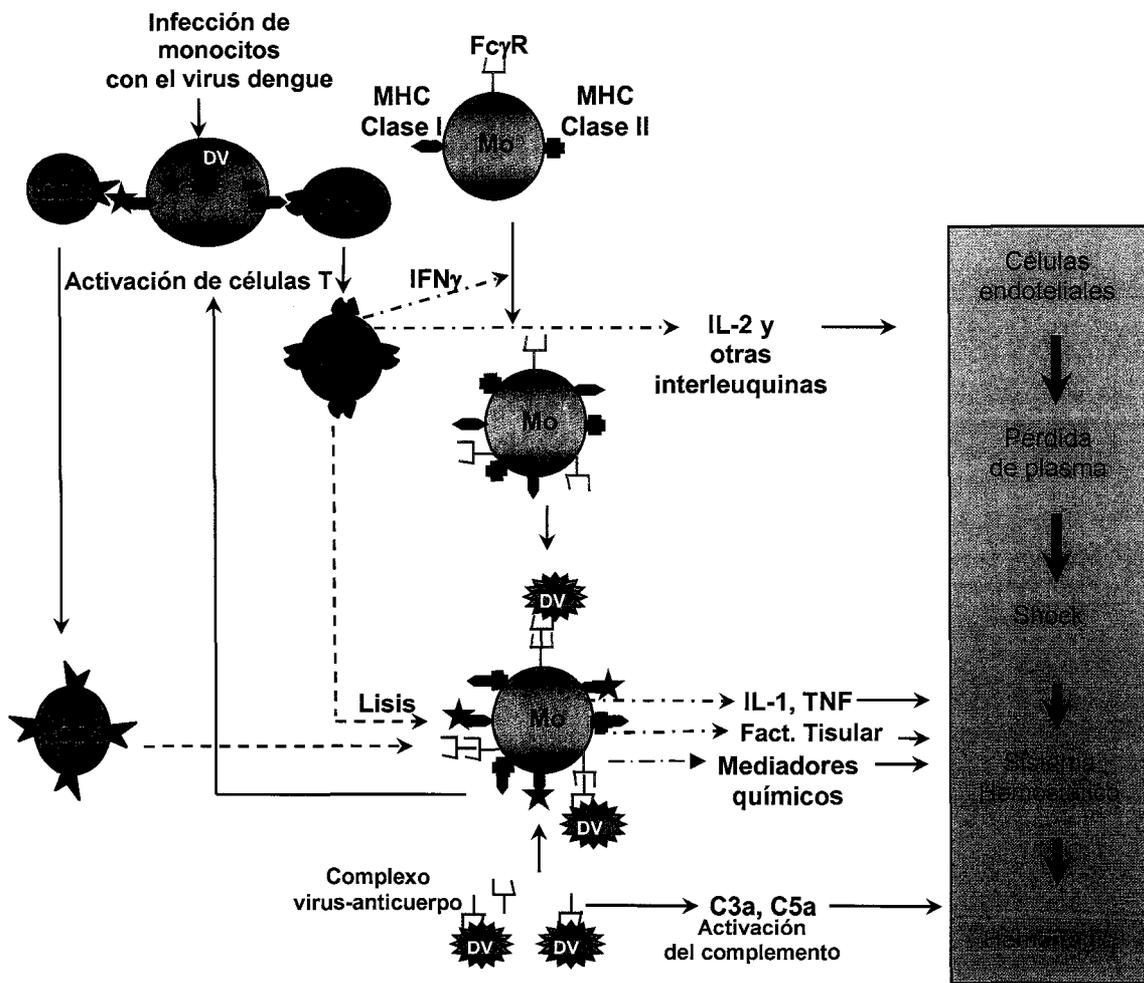


Figura 9. Resumen de la participación de elementos de la respuesta inmune que pueden estar involucrados en la patogénesis de las formas severas de la infección por dengue, FHD y SCD (Monath, 1996).

10. Vacunas

(Algunas secciones de este apartado son parte (con algunas modificaciones) de los artículos:

- Lopez-Antuñano FJ, **Mota J**. Desarrollo de agentes Inmunizantes Contra el Dengue. *Rev Panam Salud Pública/Pan Am J Public Health*; 2000 7(5):285-291.
- **Mota J**, Acosta M, Argotte R, Mendez A, Figueroa R, Ramos C. Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. *Vaccine*; 2005 16;23(26):3469-76.
- **Mota J**. Vacunas de DNA: inducción de la respuesta inmune. 2007. Enviado a la revista *Salud Pública de México*.

Y que han sido incluidos como **Anexo I**, **Anexo II** y **Anexo III**, respectivamente).

Uno de los acontecimientos más importantes en la historia de la medicina es la vacunación; el desarrollo e implementación de esquemas cotidianos de inmunización han permitido controlar exitosamente muchas enfermedades, e incluso han permitido la erradicación mundial de la viruela (CDC, 1999) y ha probado ser la estrategia más exitosa en términos de costo-beneficio (Kurstak, 2002), sin embargo, las enfermedades infecciosas continúan siendo una de las causas principales de muerte en el mundo. Se estima que alrededor del 25 % del total de muertes anuales en el mundo (aproximadamente 15 millones) son causadas por agentes infecciosos (Morens, 2004), no solamente por la aparición de nuevos patógenos, como el virus Ebola, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo, SARS (por sus siglas en inglés), si no también, debido a la re-emergencia de microorganismos causantes de enfermedades con altas tasas de morbilidad y mortalidad como las pandemias de influenza, la fiebre del Oeste del Nilo, la fiebre por dengue o el cólera (Kurstak, 2002; Morens, 2004). Por otro lado se encuentran también otras enfermedades emergentes como el paludismo, que se

asocian al incremento en la resistencia del parásito a los fármacos, o a los insecticidas usados para controlar a los vectores que la transmiten al humano (Morens, 2004). Para estas y muchas otras enfermedades no existe en la actualidad fármacos o vacunas, sin embargo muchos de los esfuerzos actuales se enfocan en la investigación y desarrollo de nuevos tratamientos o vacunas que sean eficaces y seguras.

La prevención y control de la FD/FHD se ha basado casi exclusivamente en el control del vector, sin embargo, la eficacia de estos métodos está sujeta a situaciones de índole económico-político. Además del costo, en términos económicos, hay que tomar en cuenta el costo por el deterioro del medio ambiente debido al uso de insecticidas. Por estas razones, actualmente una de las prioridades, es el desarrollo de una vacuna segura y eficiente contra el dengue (WHO, 1997).

Durante más de 50 años se ha llevado a cabo un gran número de investigaciones con el fin de desarrollar una vacuna contra el dengue. Sin embargo a la fecha no existe una vacuna eficiente (Halstead, 2002). Dos de los principales problemas que han retrasado el desarrollo de una vacuna eficaz contra el dengue son, la falta de un modelo animal y la necesidad de generar, con una sola vacuna, una respuesta inmune protectora contra los cuatro serotipos, esto debido a la posibilidad de la participación de la respuesta inmune en el desarrollo de las formas severas de la enfermedad (Hatstead, 2002; Jacobs, 2003; Stephenson, 2005).

El éxito de la vacuna contra la fiebre amarilla, la cual esta basada en el uso de virus atenuados, se relaciona con la capacidad del virus vacunal de replicarse en el huésped de forma similar al virus parental y de inducir una respuesta inmune tanto humoral como celular de larga duración contra diversos antígenos. En base a lo anterior se piensa que el desarrollo de una vacuna viva atenuada contra dengue, representa

una de las mejores estrategias y no es de sorprenderse que en la actualidad seis de las vacunas en etapas avanzadas de desarrollo, estén basadas en el uso de virus vivos atenuados (Barrett, 2001; Halstead, 2002; Jacobs, 2003).

Se han empleado distintas estrategias para desarrollar vacunas tetravalentes vivas atenuadas contra el dengue. Dos de estos candidatos a vacunas han sido elaboradas usando técnicas virológicas clásicas, en las cuales los cuatro serotipos del virus dengue son pasados varias veces en cultivos de células no humanas hasta desarrollar un fenotipo de atenuación deseado (Jacobs, 2003). Una de estas vacunas fue desarrollada por el grupo de la universidad de Mahidol en Bangkok y está patrocinada por Aventis Pasteur, Lyon, Francia. En esta vacuna, los virus Den-1, 2 y 4 fueron atenuados por pases en cultivos primarios de células de riñón de perro (PDK, por sus siglas en inglés), mientras que para Den-3, la atenuación se logró mediante pases en células de riñón del mono africano verde (células Vero) (Bhamarapavati, 1997). En los experimentos donde se administraron dos dosis de la vacuna en niños de 3-14 años de edad, se observó que el rango de seroconversión, medido por anticuerpos neutralizantes fue del 80-90 % (Bhamarapavati, 2000). De forma colateral, el grupo del Instituto Walter Reed Army, USA, desarrollo bajo el patrocinio de GlaxoSmithKline, Rixensart, Bélgica; una vacuna tetravalente, atenuada también mediante pases de los 4 serotipos en células PDK, pero con un pase adicional en células fetales de pulmón de monos rhesus (FRhL, por sus siglas en inglés). En un estudio en 50 voluntarios se administraron dos dosis de la vacuna y se observó que los vacunados desarrollaron anticuerpos neutralizantes de forma similar a la vacuna de Aventis Pasteur (80-90%) (Edelman, 2003).

Aunque estos resultados son prometedores, se han presentado problemas de interferencia en la replicación entre los serotipos, dando como resultado un desbalance

en la respuesta inmune, induciendo una protección parcial, lo que finalmente podría dar como consecuencia el desarrollar las formas graves de la enfermedad, mediada por anticuerpos facilitadores. Adicionalmente, la posibilidad de que las cepas vacunales reviertan a un fenotipo virulento mediante mutaciones o recombinación con virus silvestres, es también un motivo de preocupación (Seligman, 2004; Stephenson, 2005).

Una alternativa molecular para la generación de vacunas vivas atenuadas se basa en el uso de clonas infecciosas. A partir de un esqueleto de cDNA de un flavivirus atenuado, los genes estructurales prM y E pueden ser substituidos con los genes correspondientes de cada serotipo. Los virus atenuados se generan mediante la transfección de células con RNA viral obtenido mediante la transcripción *in vitro* a partir de cDNA. Los virus obtenidos, que solamente difieren en los genes estructurales antes mencionados son mezclados para producir la vacuna tetravalente (Jacobs, 2003).

El esqueleto de cDNA de varios virus ha sido usado para generar virus quiméricos. Se ha empleado una cepa de Den-2 adaptada a cultivo celular (Huang, 2003), virus Den-1 y Den-4 atenuados mediante ingeniería genética (Durbin, 2001; Markoff, 2002; Whitehead, 2003) y la cepa vacunal 17D del virus de la fiebre amarilla (Guirakhoo, 2001; 2002).

Por otro lado, otro tipo de candidato a vacuna que se ha explorado son las conocidas como vacunas de sub-unidades. En el caso del virus dengue, se han reportado vacunas de sub-unidades basadas en el uso de proteínas no estructurales, particularmente la proteína NS1. La proteína NS1 es blanco de la respuesta tanto humoral como celular en la infección natural por el virus dengue (Green, 1997). Debido a que la proteína NS1 es una proteína no estructural, es decir no forma parte de las partículas virales (sin embargo es expresada en la superficie de células infectadas), la

convierte en un antígeno atractivo ya que los anticuerpos contra esta proteína no podrían mediar la facilitación inmune. Sin embargo existen reportes donde se implican a anticuerpos anti- NS1 en la patogénesis de la FHD (Lin, 2002; 2005), por lo que se pone en entre dicho su utilidad para generar una vacuna tetravalente contra el virus dengue.

Recientemente se ha explorado el uso de las vacunas de DNA para desarrollar candidatos a vacunas contra el dengue. Una serie de observaciones al inicio de la década de los 90 demostró que con DNA desnudo (plásmidos) es posible transfectar células *in vivo* (Wolff, 1990), posteriormente se reportó que es posible inducir una respuesta humoral contra el antígeno codificado en el plásmido transfectado (Tang, 1992), pero no fue si no hasta 1993, a partir del reporte donde se demostró que se puede inducir una respuesta inmune protectora contra un reto letal con el virus de la influenza en ratones inmunizados con DNA (Ulmer, 1993), que se estableció firmemente el concepto de lo que se conoce hoy como vacunas de tercera generación o vacunas de DNA (Waine, 1995). Posteriormente, numerosas publicaciones demostraron que diversos antígenos (de bacterias, virus, parásitos o de origen tumoral) codificados en plásmidos pueden provocar una respuesta inmune en diversos modelos animales (Lewis, 1999; Babiuk, 2000).

Las vacunas de DNA, también conocidas como vacunas genéticas, vacunas de ácidos nucleicos o vacunas de DNA desnudo, entre otros términos, emplean una metodología relativamente simple que ha abierto una nueva era en la vacunología, con un alto potencial tanto como vacunas profilácticas, así como vacunas terapéuticas (Srivastava, 2003). Todo esto se debe a que combina muchas de las características deseables de las vacunas tradicionales, pero ofrece muchas ventajas con respecto a

éstas, como son: a) su seguridad en términos de no usar organismos vivos, b) su capacidad de inducir una respuesta inmune celular y humoral, d) la facilidad de modificar los antígenos codificados en los plásmidos (ver más adelante), e) un menor costo cuando se producen a gran escala y f) una vida media mayor, por lo que se tiene una mejor estabilidad en cuanto a la temperatura de almacenamiento y transporte, permitiendo prescindir de la cadena fría utilizada en las vacunas convencionales (Shedlock, 2000).

La unidad funcional de las vacunas de DNA son los vectores en los cuales son insertados los genes que codifican para las proteínas de interés; estos vectores son plásmidos bacterianos. En la figura 10 se esquematizan los elementos que componen un plásmido típico para su uso como vector en la vacunación con DNA. Los plásmidos bacterianos son moléculas de DNA circular que se autorepican de forma extra cromosomal en las bacterias y han sido utilizados ampliamente para la expresión de proteínas en sistemas de mamíferos (Kowalczyk, 1999). La capacidad autónoma de replicación de estos plásmidos permite su amplificación en cultivos de bacterias transformadas (Babiuk, 2000; Shedlock, 2000). Los genes codificados en estos plásmidos se encuentran bajo el control de promotores, generalmente de origen viral, como el del citomegalovirus humano (CMV), el virus del sarcoma de Rous (RSV) o el virus de simio 40 (SV40). Los promotores son secuencias cortas de DNA a la cual se unen diversos factores de transcripción que ayudan a guiar y activar a las polimerasas, estos factores transcripcionales se encuentran activos constitutivamente en la mayoría de las células eucariotas.

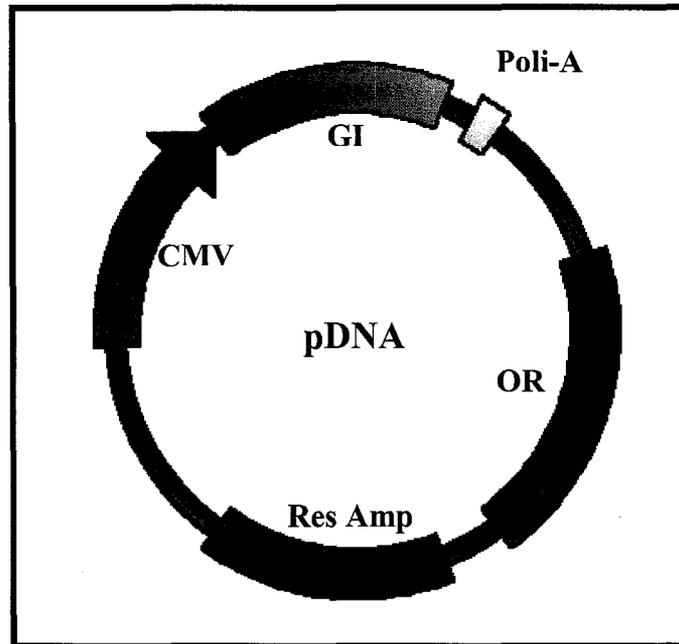


Figura 10. Representación esquemática de un vector típico de vacunas de DNA.

El plásmido contiene una región con el promotor (CMV), adyacente al gene que codifica para el antígeno de interés (GI), seguido de la señal de poli-adenilación. El vector incluye las regiones que corresponden al gen de resistencia a antibióticos (Res), en este ejemplo, a la ampicilina (Amp) y al origen de replicación en bacterias (OR).

En la actualidad el promotor más frecuentemente usado es el CMV (Babiuk, 2000; Reyes-Sandoval, 2001). Seguido del promotor se encuentra el gen de interés, que a su vez está seguido por una señal de poli-adenilación, por ejemplo: la región no traducida 3' del gen de la hormona bovina del crecimiento (BGH-3'-UTR), que contiene las secuencias apropiadas para estabilizar los transcritos del gen de interés. Todo lo anterior se encuentra insertado en el esqueleto de un plásmido bacteriano, con un

origen de replicación y diversos genes de resistencia a antibióticos, como son la ampicilina o la kanamicina, lo que permite su selección en cultivos de bacterias transformadas (Kowalczyk, 1999). Un elemento importante en los plásmidos es la presencia de motivos CpG bacterianos, que poseen propiedades inmunomoduladoras y que representan un elemento adjuvante intrínseco (Reyes-Sandoval, 2001; Huygen, 2005).

El sitio de inoculación, así como la forma en que el DNA es liberado en el organismo, juegan un papel importante en el éxito para inducir una respuesta inmune; se sabe que únicamente del 1-10% del total del DNA inoculado es procesado adecuadamente para expresar la proteína de interés (Watts, 1999; Reyes-Sandoval, 2001; Huygen, 2005). Las rutas de inoculación que han sido empleadas incluyen la piel, el músculo esquelético y las mucosas. Dependiendo del modelo animal que se emplee, el antígeno usado y la metodología para inocular el DNA es el grado de efectividad (Watts, 1999; Reyes-Sandoval, 2001; Huygen, 2005). Con respecto a la forma de inocular el DNA, la inyección es el método más usado ya que no requiere de entrenamiento especializado y su bajo costo en comparación con el uso de lo que se conoce como pistola génica (gene gun) que implica un costo elevado y hace improbable su uso en esquemas masivos de vacunación (Babiuk, 2003). Sin embargo, y a pesar de su mayor costo, esta última metodología produce los mejores resultados; la inoculación de DNA con este sistema emplea al DNA acoplado a esferas de oro o tungsteno que son bombardeadas hacia la dermis y capas subdérmicas con la ayuda de helio comprimido (Watts, 1999; Babiuk, 2003; Huygen, 2005), lo que permite la directa transfección de las células blanco. Esta metodología permite usar mucho menos DNA en comparación con la inyección con jeringa ya que es aproximadamente 100 veces

más eficiente (Babiuk, 2003). Finalmente, una forma no invasiva es la ruta de las mucosas, debido a que muchos de los patógenos tienen como vía de entrada las mucosas, el inducir una inmunidad protectora en éstas, representa la mejor estrategia (Watts, 1999).

El DNA que es introducido por la piel, es tomado principalmente por queratinocitos (por ejemplo cuando se usa la pistola génica), mientras que cuando se usa la inyección intramuscular, éste es tomado por células de músculo esquelético. Sin embargo se ha demostrado que el DNA es captado también por células presentadoras de antígeno profesionales (APCs, por sus siglas en inglés), siendo éstas, las únicas capaces de activar a las células del sistema inmune mediante la presentación de la proteína (Reyes-Sandoval, 2001). Estas células pueden capturar el DNA directamente por la inoculación (transfección) o pueden tomar el antígeno de otras células, como las de músculo esquelético o los keratinocitos, mediante fagocitosis, mecanismo denominado "presentación cruzada" (Kowalczyk, 1999; Srivastava, 2003; Huygen, 2005).

En el caso de la inmunización con vacunas de DNA, una vez que el plásmido es introducido en la célula, éste es translocado al núcleo donde se inicia la transcripción del transgene, posteriormente los transcritos son llevados al citoplasma donde son traducidos. Las proteínas recién sintetizadas son procesadas y presentadas al sistema inmune y pueden inducir una respuesta inmune de larga duración tanto a nivel humoral como celular. Básicamente es a través de los mismos mecanismos implicados en la respuesta inmune inducida por las vacunas tradicionales o la infección natural (Kowalczyk, 1999; Reyes-Sandoval, 2001).

Las proteínas exógenas que son endocitadas o fagocitadas (presentación cruzada, en la inmunización con DNA) entran a la vía endosomal donde son degradadas en pequeños péptidos de 12-25 aminoácidos que posteriormente son asociados con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II y translocados hacia la superficie de la célula donde son presentados y se unen a sus correspondientes receptores (TcRs) en los linfocitos T cooperadores ($CD4^+$); lo que tiene como consecuencia su activación y expansión (Tang, 1992; Shedlock, 2000; Huygen, 2005).

Por otro lado, las proteínas que son sintetizadas de novo (transfección, en la inmunización con DNA), son degradadas en el proteosoma en péptidos de 8-10 aminoácidos que son transportados hacia el retículo endoplásmico, mediante un sistema especializado de transporte que emplea proteínas transportadoras (TAPI y TAPII), una vez en el retículo son asociadas a moléculas de MHC clase I. Los péptidos de gran afinidad con su respectiva molécula de MHC I son estabilizados y entran en la vía secretoria, con lo que alcanzan la superficie celular, y al igual que con los complejos MHC II-péptido, estos encuentran sus respectivos TcRs, pero en este caso, en la superficie de los linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$) para inducir su activación (Tang, 1992; Waine, 1995; Shedlock, 2000).

De esta forma la unión del complejo MHC-péptido y TcR, en las APCs y linfocitos T, respectivamente, provee de lo que se conoce como la señal 1 de la activación de los linfocitos T. Sin embargo, esta señal 1 es insuficiente para generar una buena respuesta inmune y es necesario de una segunda señal para la completa activación de los linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$. (Kowalczyk, 1999; Reyes-Sandoval, 2001; Srivastava, 2003). La señal 2 es inducida mediante moléculas co-estimuladoras presentes en la

superficie de las APCs (mayoritariamente células dendríticas [CD]), como las proteínas de la familia B7. Previamente a esto, las CD necesitan de una señal para su activación inicial y maduración, esta señal denominada señal 0, o señal de alarma, es inducida por ciertas citocinas inflamatorias, proteínas de choque térmico (HSP) o los motivos CpG presentes en el DNA bacteriano. El resultado de la señal 0 es la sobre-expresión de moléculas del MHC y co-estimuladoras en su superficie, favoreciendo posteriormente, el proceso de presentación de antígeno (señal 1). En esta etapa, las CD activadas cambian su morfología y perfil de expresión de receptores para quimiocinas, dejando la periferia y migrando hacia los ganglios linfáticos donde participan en la activación de linfocitos T y B inmaduros (Tang, 1992 ; Shedlock, 2000; Reyes-Sandoval, 2001).

Posterior a la etapa de activación se inicia la etapa efectora, los linfocitos T activados dejan los ganglios linfáticos hacia la periferia siguiendo un gradiente de quimiocinas hasta llegar al lugar donde son requeridos y tras la unión de sus TcRs con los antígenos expresados en el contexto de MHC apropiado comienzan su etapa efectora mediante la secreción de sustancias tóxicas como las perforinas (células CD8⁺) o de interleucinas con actividad inflamatoria como el INF- γ (células CD4⁺) (Tang, 1992 ; Shedlock, 2000; Reyes-Sandoval, 2001).

Por otro lado, los linfocitos B son activados mediante su receptor (BcR) por los antígenos que son sintetizados y secretados o presentados en la superficie de las células que fueron transfectadas en la inmunización con el DNA. Cuando se trata de antígenos que nos son secretados o presentados en la superficie celular, la respuesta humoral es menos eficiente, sin embargo, es posible que el antígeno pueda ser tomado por las APCs mediante la fagocitosis de células transfectadas en estado apoptótico y

presentadas en el contexto de MHC II (Huygen, 2005). Posteriormente, aquellos linfocitos B activados cambian de isotipo; las secuencias que codifican para la región variable de las inmunoglobulinas sufren hipermutación y las clonas con un receptor con mayor afinidad por el antígeno son seleccionadas y se expanden. Los linfocitos B activados, eventualmente se diferencian hacia células de memoria o a células plasmáticas, éstas últimas pueden: a) continuar sintetizando anticuerpos, o b) pueden establecerse en la médula ósea y continuar también produciendo anticuerpos; por lo tanto es posible encontrar anticuerpos presentes en el suero y en mucosas por largos periodos (Reyes-Sandoval, 2001; Huygen, 2005). En la figura 11 se esquematizan las posibles rutas para la presentación de antígenos tanto a linfocitos B como T y su activación para realizar su acción efectora.

El uso de vacunas basada en la inmunización con DNA es una herramienta prometedora para el desarrollo de vacunas contra flavivirus. Esta aproximación metodológica ha sido empleada para desarrollar candidatos contra enfermedades causadas por flavivirus como son la encefalitis de San Luís, la encefalitis de primavera-verano de Rusia, la encefalitis de la Europa Central, la fiebre por dengue, la encefalitis del Valle de Murray, la encefalitis Japonesa y la fiebre del oeste del Nilo (Chang, 2001).

Los candidatos a vacunas de DNA contra dengue han utilizado los genes que codifican para las proteínas prM y E, que han demostrado ser inmunogénicas en modelos animales, induciendo una protección parcial o total cuando se retan con el serotipo heterólogo (Kochel, 1997; Porter, 1998; Kochel, 2000). Debido a que la vacunación con DNA da como resultado la síntesis intracelular de los antígenos, la presentación de los mismos vía MHC clase I es la predominante, favoreciendo la respuesta inmune celular. Sin embargo, no se conoce de manera certera la contribución

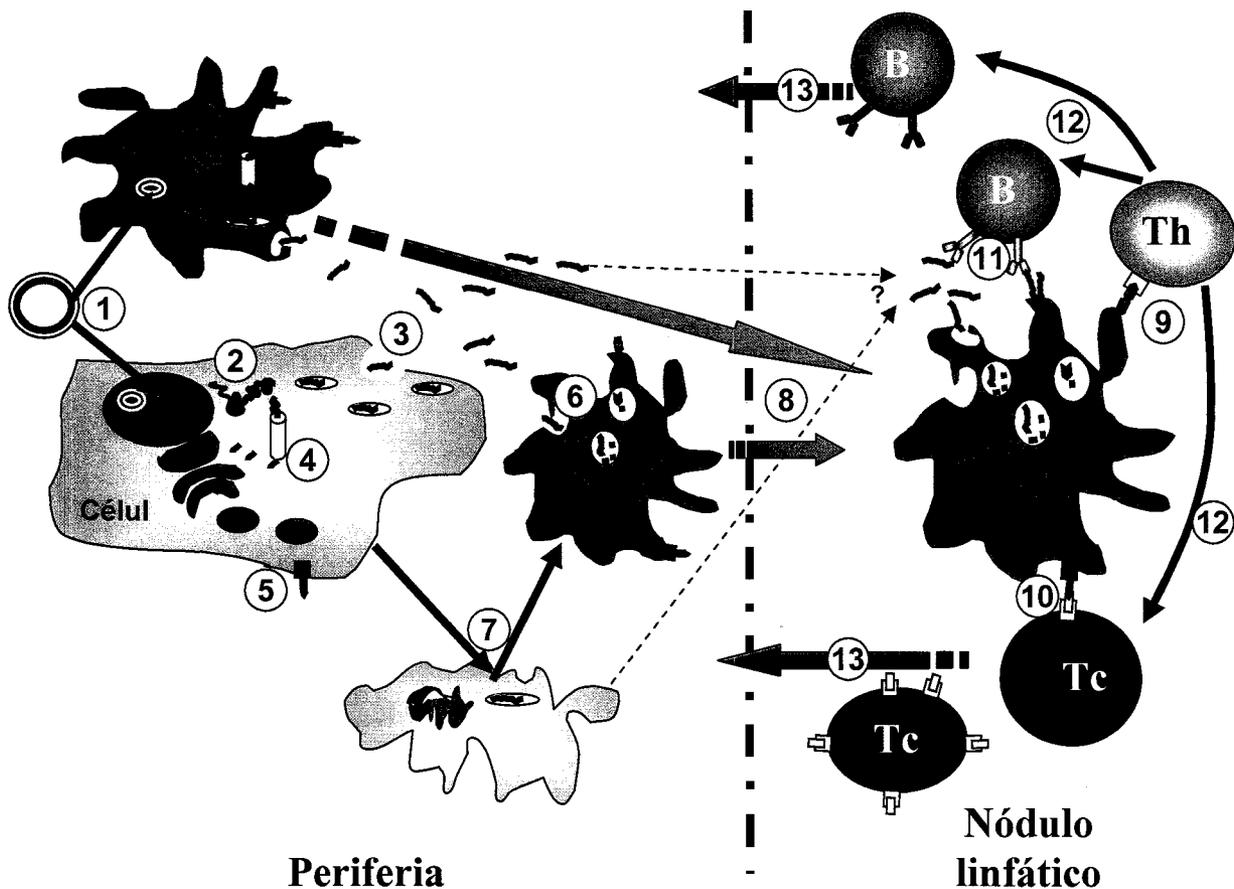


Figura 11. Posibles rutas de presentación de antígenos y activación de linfocitos B y T en la vacunación con DNA. (1) El plásmido es introducido al organismo y en las células transfectadas (una célula somática o una célula presentadora de antígeno profesional (APC, por sus siglas en inglés), este es translocado al núcleo, donde se produce el mRNA. (2) El mRNA es traducidos en los ribosomas y la proteína es: (3) secretada o (4) procesada en el proteosoma. Los productos son transportados a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi donde se acoplan a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I) (5). (6) Las proteínas solubles son fagocitadas por las APCs, procesadas en los endosomas donde se acoplan a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II). Las proteínas codificadas en los plásmidos pueden también ser tomadas vía fagocitosis de células transfectadas en estado apoptótico (7). (8) Las APCs con los antígenos adquiridos por la transfección o por fagocitosis, migran hacia los órganos linfoides secundarios donde son presentadas a los linfocitos T cooperadores (Th) en el contexto de MHC II (9) o por "presentación cruzada" (ver texto) en el contexto MHC I a los linfocitos T citotóxicos (Tc) (10). Los linfocitos B son activados por vía su BcR por las proteínas presentadas en la superficie de las APCs o por proteínas liberadas al medio debido a apoptosis o lisis de las APCs (11). Los linfocitos Th activados estimulan a los Tc y a los B (12), favoreciendo la sobre expresión de moléculas de superficie (co-estimuladoras), así como también el cambio de isotipo. Los linfocitos activados migran hacia la periferia donde llevan a cabo su actividad efectora (13).

de cada uno de los brazos de la respuesta inmune adaptativa, en la protección a largo plazo en las infecciones por dengue en humanos, pero se cree que la respuesta humoral juega un papel predominante (Jacobs, 2003). La tecnología de las vacunas basadas en DNA permite la co-administración de moléculas que pueden actuar como inmunomoduladores para mejorar cualitativa y cuantitativamente la respuesta inmune, esto incluye a los candidatos a vacunas de DNA contra el virus dengue. En el caso de Den-2 se diseñó una vacuna con el gene de la proteína E fusionada con la proteína de membrana asociada a lisosomas (LAMP, por sus siglas en inglés) (Raviprakash, 2001). La proteína LAMP señala a la proteína E para ser transportada hacia los compartimentos lisosomales, donde es degradada y queda accesible para ser cargada en las moléculas MHC clase II, esto con la intención de favorecer la respuesta de células T CD4+. En experimentos hechos en ratones, el antígeno de fusión fue capaz de inducir una mejor respuesta de anticuerpos neutralizantes, en comparación con la proteína nativa. Adicionalmente la respuesta se pudo mejorar aun más co-administrando el gene que codifica para el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) (Raviprakash, 2001).

El desarrollo de técnicas de inmunización con DNA ha dado pie al diseño de nuevas estrategias para la administración de vacunas vivas atenuadas en forma de DNA o RNA "infeccioso". Se ha observado que con menos de un nanogramo de RNA (transcrito *in Vitro*) del virus TBE, que ha sido atenuado mediante deleciones, es posible inducir una respuesta inmune protectora después de ser administrado mediante una pistola génica en modelo de ratón (Mandl, 1998). Posteriormente, usando el mismo virus como modelo se construyó un candidato a vacuna de RNA, usando un replicón que contiene toda la información necesaria para establecer la maquinaria de replicación

en la célula huésped, mimetizando la infección por el virus. Sin embargo, se introdujeron modificaciones en la región que codifica para la proteína de la cápside, impidiendo de esta forma el ensamble de partículas virales infecciosas y a la vez promoviendo la secreción de partículas sub-virales no infecciosas que estimulan la producción de anticuerpos (Kofler, 2004).

Debido a que las vacunas de DNA representan una estrategia prometedora, en el presente trabajo se utilizó esta aproximación metodológica para diseñar y probar un candidato a vacuna contra el virus dengue en un modelo de ratón, para lo cual se desarrollo la siguiente:

11. Hipótesis

El DIII de la proteína E del virus dengue juega un papel importante en la unión al receptor celular y en la inducción de anticuerpos protectores. Estas características lo convierten en un blanco ideal para ser usado como antígeno en un esquema de inmunización con DNA desnudo, para inducir una respuesta inmune protectora contra los cuatro serotipos del virus dengue, sin tener que usar al gene o a la proteína E completa o en conjunto con otras proteínas del virus. Con el empleo de únicamente la región que contiene los determinantes para anticuerpos neutralizantes se evitaría la inducción de anticuerpos de reacción cruzada, eliminando de esta forma la posibilidad de inducir las formas graves de la enfermedad mediada por anticuerpos facilitadores.

12. Objetivo general

Analizar la respuesta inmune humoral específica contra el virus dengue, inducida mediante la inmunización con DNA en un modelo de ratón, utilizando plásmidos que contengan la región que codifica para el dominio III de la proteína de envoltura de cada serotipo del virus, así como evaluar la capacidad de protección de los anticuerpos inducidos con los plásmidos individuales o en una formulación tetravalente en un modelo de infección en cultivos celulares y en el modelo de ratón lactante.

13. Objetivos específicos

13.1. Diseñar y construir plásmidos que contengan la región que codifica para el dominio III de la proteína de envoltura del virus dengue. Se diseñará una construcción para cada serotipo (Den-1, Den-2, Den-3 y Den-4).

13.2. Diseñar y construir un plásmido tetravalente que contenga las cuatro regiones que codifican para cada uno de los dominios III de la proteína de envoltura de los virus Den-1 a Den-4.

13.3. Analizar la expresión *in vitro* del dominio III clonado en los plásmidos, en cultivo de células COS-7.

13.4. Evaluar la capacidad de inducir anticuerpos específicos contra el virus dengue, de cada una de las construcciones que contienen al dominio III, en un modelo de ratón, mediante un esquema de inmunización con DNA desnudo.

13.5. Evaluar la capacidad de inducir anticuerpos específicos contra el virus dengue, mediante la inmunización con un esquema tetravalente, usando diferentes concentraciones de los cuatro plásmidos que contienen al dominio III de cada serotipo del virus dengue.

13.6. Medir la capacidad de inhibir el efecto citopático en cultivos de células, de los anticuerpos contra el virus dengue, inducidos mediante la inmunización con plásmidos con el dominio III.

13.7. Evaluar la presencia de anticuerpos protectores, inducidos con la inmunización con plásmidos con el dominio III del virus dengue, en un modelo de infección en ratones lactantes.

14. Materiales y métodos

14.1. Virus, células e inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Los virus prototipo Den-1, Den-2, Den-3 y Den-4 (cepas Hawaii, New Guinea C, H87 y H241, respectivamente) fueron mantenidos en cultivos de células de riñon de mono verde africano (células Vero) a 37°C con 5 % de CO₂, usando medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y un cóctel de antibióticos-antimicóticos.

Las células se crecieron en monocapa en frascos de cultivo de 25 y 75 cm² y cuando alcanzaron un 80-90% de confluencia se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 0.01-0.1 partículas formadoras de placas (PFU, por sus siglas en inglés) por célula; el serotipo fue confirmado mediante el uso del ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Henchal, 1982), usando los anticuerpos monoclonales D2-1F1-3 para Den-1, 3H5 para Den-2, D6-8A1-12 para Den-3 y 1H10 para Den-4. Los virus prototipo y los anticuerpos monoclonales (mAb's) fueron donados amablemente por el Dr. D. Gubler (Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Co. USA).

Para el ensayo de IFI, las células infectadas se cosecharon de 7-14 días post-infección. La monocapa se desprendió con tripsina-EDTA (0.05%), las células se lavaron dos veces con solución salina balanceada de Hank y la pastilla final se resuspendió en medio MEM. Las células se gotearon en portaobjetos con teflón y se fijaron con acetona fría durante 20 min. Posteriormente se agregó el anticuerpo monoclonal correspondiente (diluido 1:50) y se incubó 1 hr. a 37°C en una cámara

húmeda. Las células se lavaron 2 veces con PBS en agitación y se agregó el segundo anticuerpo (anti-ratón acoplado a fluoresceína) a una dilución de 1:200 y se incubaron 1 hr. a 37°C en una cámara húmeda. Finalmente, las células se lavaron 2 veces como se describió anteriormente y las laminillas se montaron usando una solución de glicerol al 90% en PBS. La fluorescencia se analizó utilizando un microscopio de inmunofluorescencia y contraste de fases.

Los sobrenadantes de las células infectadas fueron colectados y usados como stocks virales para la extracción de RNA. Los Virus fueron también concentrados y purificados mediante gradientes de sacarosa (Putnak, 1996) para ser usados como antígeno en los ensayos de ELISA.

Para la purificación del virus, los sobrenadantes de células infectadas se congelaron a -70°C hasta su uso posterior. Una vez descongelados, los sobrenadantes se concentraron con sulfato de amonio, posteriormente se agregaron a gradientes de sacarosa (20%-65%) y se ultracentrifugaron a 27,000 RPM durante una hora. Se colectó la interfase y se agregó a un nuevo gradiente de sacarosa (20%-55%) y se centrifugó a la misma velocidad pero el doble de tiempo. La banda correspondiente al virus purificado (aproximadamente 1.16 de densidad-37 % sucrosa) se colectó y se guardó a -70°C hasta su uso.

14.2. Diseño de Oligonucleotidos

Los oligonucleotidos usados como iniciadores para amplificar el dominio III de cada serotipo del VD se diseñaron usando el programa Oligo 4.0 (Nacional biosciences, Plymouth, Min; USA), basados en las secuencias publicadas de los virus prototipo Den-1, Den-2, Den-3 y Den-4 (GenBank: X76219, M29095, M93130 y S66064,

respectivamente). La secuencia para los sitios de restricción, las secuencias Kozak y el ATG inicial fueron incluidas en el diseño de cada oligonucleotido. La secuencia de cada oligonucleotido quedó de la siguiente manera:

Dengue 1

D1domIII-up

5'- CCC GGG GGC GGC CGC GCC ATG GCG CTG ACT TTA AAA GGG ATG TCA-3'

D1domIII-dw

5'- GGC CCC CTC GAG CTT GAA CCA GCT TAG TTT CAA AGC-3'

Dengue 2

D2domIII-up

5'-CCG GGG GGA TCC GCC ATG GCG CTA CAG CTC AAA GGA ATG TCA TAC TCT-3'

D2domIII-dw

5'-GGC CCC GAA TTC CTT AAA CCA GTT GAG CTT CAA-3'

Dengue 3

D3domIII-up

5'- CCG GGG GAA TTC GCC ATG GCG TTG AAA CTC AAG GGG ATG AGCTAT-3'

D3domIII-dw

5'- GGC CCC GAT ATC CCT GTA CCA GTT GAT TTT CAG-3'

Dengue 4

D4domIII-up

5'-CCG GGG AAG CTT GCC ATG GCG TTG AGA ATT AAG GGA ATG TCA-3'

D4domIII-dw

5'-CCC CGG GGT ACC CCT GAA CCA ATG GAG TGT TAA-3'

Para la construcción correspondiente al virus dengue 1, las secuencias subrayadas corresponden a los sitios Not I y Xho I, respectivamente, para dengue 2 corresponden a BamH I y EcoR I, para dengue 3, a EcoR I y EcoR V y finalmente para dengue 4, corresponden a los sitios *Hind III* y *Kpn I*. La región con las secuencias Kozak y el ATG inicial se muestran sombreadas en gris. Estos oligonucleotidos amplifican un producto de un tamaño aproximado de 330 pb.

14.3. RT-PCR y PCR.

Para los ensayos de reverso-transcriptasa (RT), se extrajo RNA total a partir de células infectadas con Den-1 y Den-3, usando isotiocianato de guanidina y fenol-cloroformo como se ha reportado previamente (Rico-Hesse, 1990). El RNA se resuspendió en agua destilada y la reacción de RT se llevó a cabo a 37°C por 1 hr en un volumen de reacción de 10 µl (5 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1U/µl de inhibidor de RNAasa, 2.5 U/µl de reverso transcriptasa MuLV, 400 µM de nucleótidos (Perkin Elmer, Norwalk, CT), y 1.2 µM del primer "reverse" (dw).

Un microlitro de la reacción de RT o 10 ng de DNA de plásmido (ver a continuación) fue usado para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). El volumen de reacción para PCR fue de 100 µl (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 200 µM de dNTP's, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U DNA polimerasa (Amplitaq; Perkin Elmer, Norwalk CT) y 0.5 µM de los primers "forward" (up) y dw. La reacción se llevó a cabo con un paso inicial de desnaturalización a 94°C seguida de 35 ciclos de amplificación: desnaturalización (94°C, 30 seg), alineamiento

(54°C to 58°C, 30 seg), y extensión (72°C, 30 seg), finalmente un paso de extensión final a 72°C, por 10 min.

Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (10µg/mL) en un transiluminador de luz UV.

14.4. Construcción de los plásmidos con el dominio III

Para facilitar la clonación del DIII en el vector pcDNA 3 (invitrogen), los oligonucleotidos se diseñaron introduciendo sitios para las enzimas de restricción contenidos en la secuencia de la región múltiple de clonación del vector. En este plásmido la expresión del gene clonado bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV) (Figura 12).

La región que codifica para el DIII de los virus Den-1 (nt 1794-2096) y Den-3 (nt 1802-2107) fue amplificada por RT-PCR a partir de virus obtenidos de cultivos celulares infectados (ver arriba), mientras que para Den-2 (nt 1801-2108) y Den-4 (nt 1812-2114) se amplificó por PCR usando como molde a los plásmidos pKT2.4 y P5'-2, respectivamente.

El plásmido pKT2.4 contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para las proteínas estructurales de la cepa New Guinea C (NGC) de Den-2 y fue donado por el Dr. R. Padmanabhan (Georgetown University, USA). El plásmido P5'-2 codifica para el gene de la proteína de envoltura de Den-4, y fue donado por el Dr. C.J. Lai (National Institute of Allergy and Infectious Diseases; NIH, USA). La figura 13 muestra la estrategia general de clonación del dominio III en el vector.

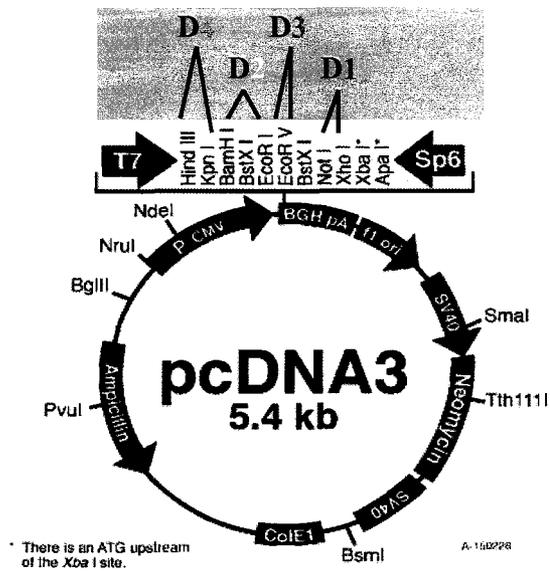


Figura 12. Clonación del dominio III de la proteína E de los virus dengue en el plásmido pcDNA 3. Se diseñaron oligonucleotidos que contenían sitios adecuados para la clonación en este vector, de acuerdo a la secuencia de cada serotipo. De esta forma cada dominio III fue clonado en los sitios indicados en al figura.

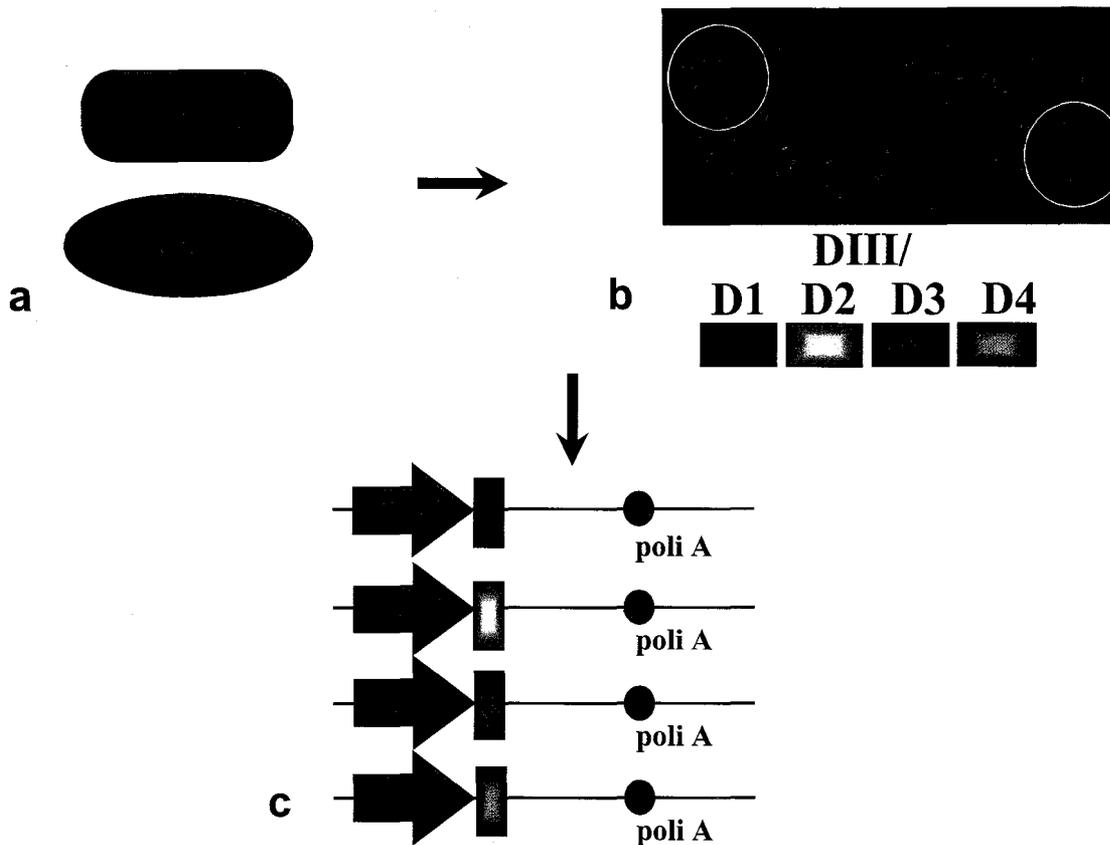


Figura 13. Estrategia general para la clonación del dominio III de cada serotipo del virus dengue. (a) el cDNA que se empleó como template se obtuvo de RNA obtenido de células infectadas o plásmidos con el gene E clonado (ver texto), a partir de este template se amplificó el dominio III de todos los serotipos (b) y se clonó en el vector correspondiente (C).

Los productos amplificados fueron purificados a partir del gel de agarosa utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Los productos purificados se cortaron con las enzimas correspondientes y fueron ligados al vector (previa digestión con las enzimas correspondientes). Posteriormente, la reacción de

ligación se utilizó para transformar bacterias DH5 α (GIBCO) mediante electroporación. Las bacterias transformadas fueron seleccionadas en medio con antibiótico y las colonias obtenidas se analizaron por PCR para determinar la presencia del dominio III. Las clonas seleccionadas fueron amplificadas en 2 mL de medio LB con antibiótico y el plásmido recombinante fue obtenido mediante un ensayo de "miniprep" para checar el inserto mediante el análisis de patrones de digestión. Una vez que las colonias recombinantes fueron analizadas por PCR y patrones de digestión con las enzimas de restricción correspondientes, las clonas seleccionadas fueron amplificadas en grandes volúmenes (50-100 mL de medio LB con antibiótico) y los plásmidos obtenidos, designados pDIII-D1, pDIII-D2, pDIII-D3 y pDIII-D4 fueron purificados con el Kit EndoFree de Qiagen (Qiagen Inc, USA), resuspendidos en un volumen adecuado (en PBS esteril) y almacenados a -20°C hasta su uso posterior.

14.5. Ensayos de transfección

Para evaluar la expresión del dominio III recombinante, se realizaron ensayos de transfección transitoria en células COS-7 con los plásmidos pDIII-D1, pDIII-D2, pDIII-D3 y pDIII-D4, usando como control al vector vacío. Estos ensayos se llevaron a cabo mediante el empleo de lípidos catiónicos (Lipofectamine 2000, Invitrogen/Life).

Las células se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) con 10 % de SFB sin antibióticos a 37°C, 5 % CO₂. El día anterior a la transfección las células fueron desprendidas con tripsina, como se mencionó anteriormente, y fueron sembradas en cajas de cultivo de 24 pozos a una densidad de 1×10^5 células/pozo, de tal forma que estuvieran en un 80-90 % de confluencia el día de la transfección.

La transfección se llevó a cabo agregando a la monocapa 100 μ l de medio de cultivo que contenía una mezcla del plásmido (0.8 μ g) y el reactivo lipofectamine (2 μ l). Las células se mantuvieron por 48 hrs y posteriormente se analizaron mediante IFA usando los mAb's correspondientes como se describió anteriormente.

14.6. Inmunizaciones y obtención de suero

Para evaluar la capacidad de los plásmidos, que contienen al dominio III del virus dengue, de inducir anticuerpos específicos, se inmunizaron grupos de ratones Balb/c (6-8 ratones/grupo), hembras de 6-8 semanas de edad. Para evaluar los plásmidos de forma individual, se utilizaron 100 μ g de cada una de las construcciones diluidas en 100 μ l de PBS estéril, mientras que para las formulaciones tetravalentes se utilizaron 3 grupos de ratones que fueron inmunizados con una mezcla de los plásmidos, usando 25 (T25), 50 (T50) or 100 (T100) μ g de cada construcción. La cantidad total de DNA inyectado fue 100, 200 y 400 μ g para cada grupo respectivamente. Los grupos control fueron inmunizados con 100, 200 o 400 μ g del plásmido pcDNA 3 vacío.

Las inmunizaciones se llevaron a cabo mediante una inyección por ruta intramuscular (IM) en la tibia de ambas extremidades anteriores, empleando una jeringa de insulina. Los plásmidos fueron administrados al día 0 y se les dio 2 refuerzos con la misma cantidad de DNA los días 15 y 30, en estos días y 2 semanas posteriores al último refuerzo se colectaron muestras de sangre de la vena central de la cola o por punción cardíaca, a partir de estas muestras se obtuvo el suero que fue congelado a -70°C hasta su uso posterior.

14.7. Detección de anticuerpos por ELISA

Para detectar anticuerpos específicos contra el virus dengue, se utilizó la técnica de ELISA como ha sido reportado con anterioridad (Innis, 1989). Se utilizaron placas de 96 pozos que se sensibilizaron con los antígenos específicos de cada serotipo del virus dengue (virus purificado por gradiente de sacarosa) a 4°C durante toda la noche, después de 3 lavados con PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T), las placas se bloquearon con una solución al 1 % de albumina sérica de bovino (BSA, por sus siglas en inglés) en PBS-T, durante 2 hrs a 37°C en una cámara húmeda. Posteriormente, los sueros previamente diluidos (1:100) en PBS fueron agregados por triplicado e incubados 1 hr a 37°C en una cámara húmeda, posteriormente las placas se lavaron 3 veces y se agregó el segundo anticuerpo, anti-ratón conjugado a peroxidasa diluido 1:200 y las placas se incubaron 1 hr a 37°C en una cámara húmeda. Después de 3 lavados se agregó el substrato (o-phenylenediamine/H₂O₂ en buffer de citratos 0.05 M). La placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y la reacción fue detenida usando H₂SO₄ 1M.

Todos los sueros obtenidos de los animales inmunizados con los plásmidos individuales o con las formulaciones tetravalentes se probaron individualmente contra los 4 antígenos virales y los resultados se graficaron como la media de la densidad óptica (DO) para cada grupo de ratones para cada tiempo analizado.

14.8. Ensayos de protección en células BHK-21 y ratones neonatos

El suero de los ratones inmunizados con las construcciones individuales o con la combinación tetravalente fueron empleados para analizar la presencia de anticuerpos neutralizantes en contra de Den-2 usando un ensayo en cultivo celular y en un modelo de protección en ratones lactantes. Para el ensayo en cultivo celular se adaptó el ensayo de inhibición del efecto citopático (ECP) reportado para el virus de la polio (Edevag, 1995; WHO (b), 1997) en células de riñón de hámster (BHK-21). Las células se crecieron y mantuvieron en botellas de cultivo de 75 cm² con medio MEM usando 4 % de SFB y antibióticos en una incubadora a 37°C / 5 % CO₂, posteriormente, el día del ensayo se despegaron como se describió previamente y se transfirieron a placas de 96 pozos a una densidad de 1 x 10⁴ células por pozo.

Las muestras de suero colectadas de cada grupo de ratones inmunizados con las construcciones del dominio III se utilizaron para elaborar "pools" que fueron a su vez empleados para preparar diluciones dobles seriadas, empezando a 1:5. Estas diluciones se mezclaron 1:1 con una suspensión de virus Den-2 de la cepa NGC que contenía 100 LD₅₀ (dosis infectiva media), la mezcla se incubó 1 hr a 37°C.

La solución virus-anticuerpo se agregó a las placas de 96 pozos y se incubaron a 37°C/ 5 % CO₂. Las placas fueron observadas diariamente para detectar ECP. El criterio para determinar el punto final del ensayo fue cuando el grupo control (solo virus) presento ECP en el 100 % de las células. Los títulos de neutralización se expresaron como la dilución máxima del suero a la cual se inhibe el 50 % del ECP.

Los ensayos de protección se llevaron a cabo en ratones Balb/c lactantes. Se utilizó una suspensión de virus con 100 MLD₅₀ (mouse lethal dose) que se mezcló 1:1 con el suero correspondientes a los grupos de ratones inmunizados con las diferentes

construcciones o formulaciones tetravalentes. La mezcla virus-suero se incubó 1 hr a 37°C y posteriormente se inoculó vía intracraneal (IC), cada grupo se observó diariamente y los datos de mortalidad fueron registrados. El grupo control consistió en ratones inoculados con la mezcla de virus más el suero obtenido de los ratones inmunizados con el plásmido vacío.

14.9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los experimentos de ELISA fueron analizados usando la prueba de T de student, mientras que en los ensayos de protección en ratones lactantes, se usó la prueba exacta de Fisher. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa estadístico SPSS 10.0 (SPSS, Inc., Chicago IL, USA).

15. RESULTADOS

15.1. Obtención de los plásmidos recombinantes

Los plásmidos individuales fueron construidos amplificando la región que codifica para el dominio III de cada uno de los serotipos del virus dengue. Como se mencionó anteriormente en el caso de Den-1 y Den-3, el RNA viral obtenido a partir de células infectadas con el serotipo correspondiente fue utilizado como molde en los ensayos de RT-PCR. En ambos caso se amplificó una banda del peso esperado (Figura 14 a). Los productos amplificados fueron extraídos del gel, purificados y clonados como se describe en la sección de materiales y métodos para obtener los plásmidos pDIII-D1 y pDIII-D3. Para los serotipos Den-2 y Den-4, los plásmidos pKT2.4 y P5'-2 fueron usados como molde para amplificar del dominio III. Al igual que para Den-1 y 3 los

productos amplificados fueron clonados para obtener los plásmidos pDIII-D2 y pDIII-D4 (Figura 14 b).

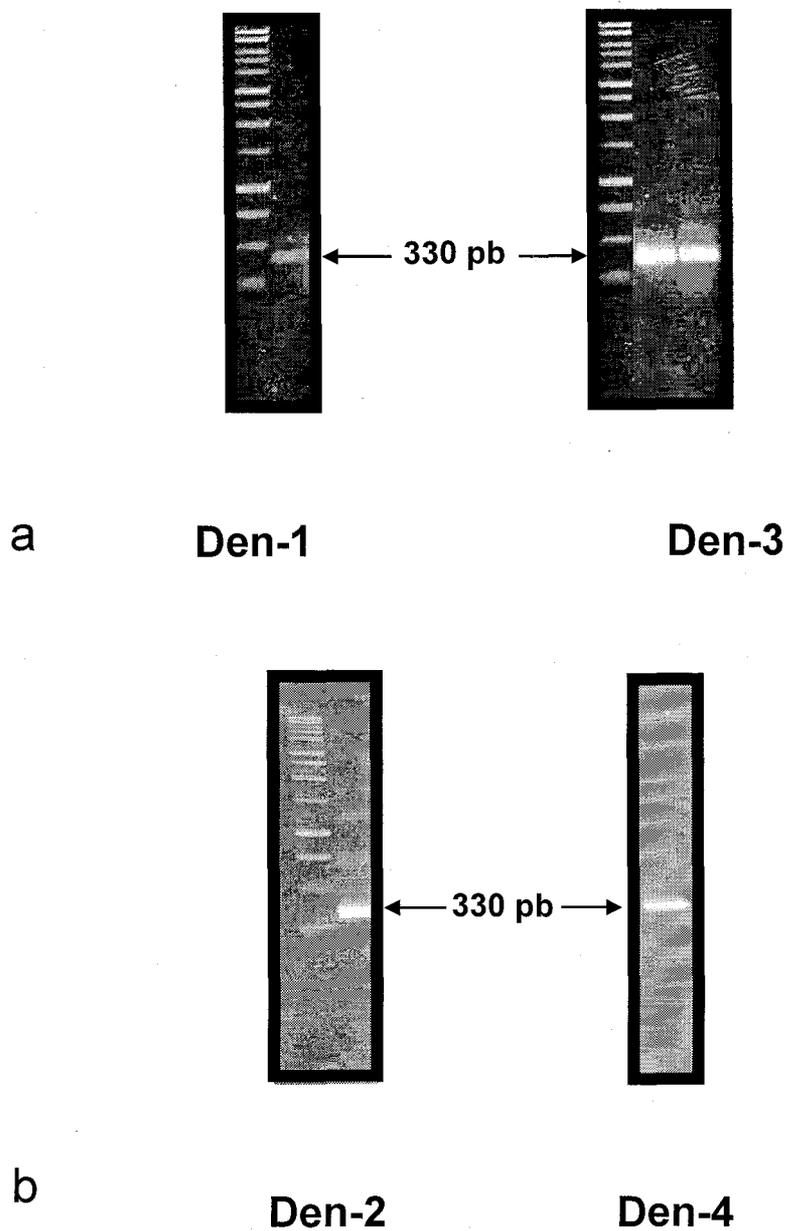


Figura 14. Amplificación de los dominios III del virus dengue. Para los Den-1 y 3 el dominio III se amplificó a partir de células infectadas (a), mientras que para Den-2 y 4, este se amplificó a partir de plásmidos (ver texto). Los productos amplificados fueron separados en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. El marcador de peso molecular es: 1Kb plus DNA ladder de Invitrogen.

Inicialmente se diseñó la construcción de un plásmido tetravalente, mediante la subclonación de cada uno de los fragmentos del dominio III en un solo plásmido. Sin embargo esto no fue posible, solo fue posible subclonar tres fragmentos (Figura 15). Después de clonar los fragmentos que correspondían a los dominios III de los serotipos 4, 2 y 3, la inserción del dominio III de Den-1 resultaba en una aparente situación tóxica para las bacterias, ya no se obtenían bacterias recombinantes. Por lo anterior se decidió suspender los experimentos para el plásmido tetravalente y usar mezclas de los cuatro plásmidos individuales en los ensayos de inmunización (ver más adelante).

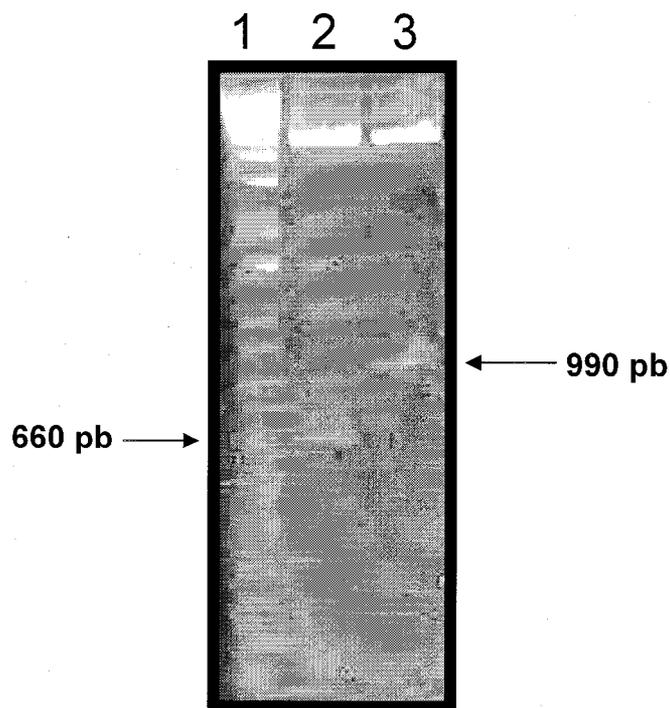


Figura 15. Construcción del plásmido divalente y tetravalente. Digestión del plásmido con la construcción divalente Den-4/Den-2 (carril 2) y del plásmido con la construcción trivalente Den-4/Den-2/Den-3 (carril 3). La banda de mayor peso molecular corresponde al vector linealizado. El marcado de peso molecular es: 1Kb plus DNA ladder de Invitrogen (carril 1).

15.2. Análisis de la expresión del dominio III recombinante

Para determinar la capacidad de las construcciones de expresar correctamente al dominio III, se llevaron a cabo ensayos de expresión en células COS-7 transfectadas con los plásmidos pDIII-D1, pDIII-D2, pDIII-D3 y pDIII-D4. Los resultados mostraron que la mayoría de las células (70-90 %), mostraban una señal positiva evidenciada por el reconocimiento específico con los MAb's. En todos los casos las células se cosecharon 48 hrs post infección y fueron procesadas como se describe en materiales y métodos para analizar la expresión del dominio III mediante el ensayo de IFI. En el caso de Den-1 el anticuerpo monoclonal usado fue D2-1F1-3 (Figura 16A), para Den-2 se usó el anticuerpo 3H5 (Figura 16B), el anticuerpo D6-8A1-12 para Den-3 (Figura 16C) y el anticuerpo 1H10 para Den-4 (Figura 16D). Células transfectadas con el plásmido pcDNA 3 vacío fueron usadas como controles negativos en todos los experimentos.

15.3. Respuesta de anticuerpos contra el virus dengue

Los resultados del análisis de los sueros obtenidos de los ratones inmunizados con cada uno de los plásmidos que expresan el dominio III (100 µg), mostraron que estos fueron capaces de inducir una respuesta de anticuerpos serotipo-específica. Cada grupo de sueros fue probado contra los cuatro antígenos de los diferentes serotipos del virus dengue; el reconocimiento del antígeno por el suero proveniente de los ratones inmunizados con el plásmido que contenía el dominio III homólogo, fue estadísticamente significativo ($p < 0.0001$).

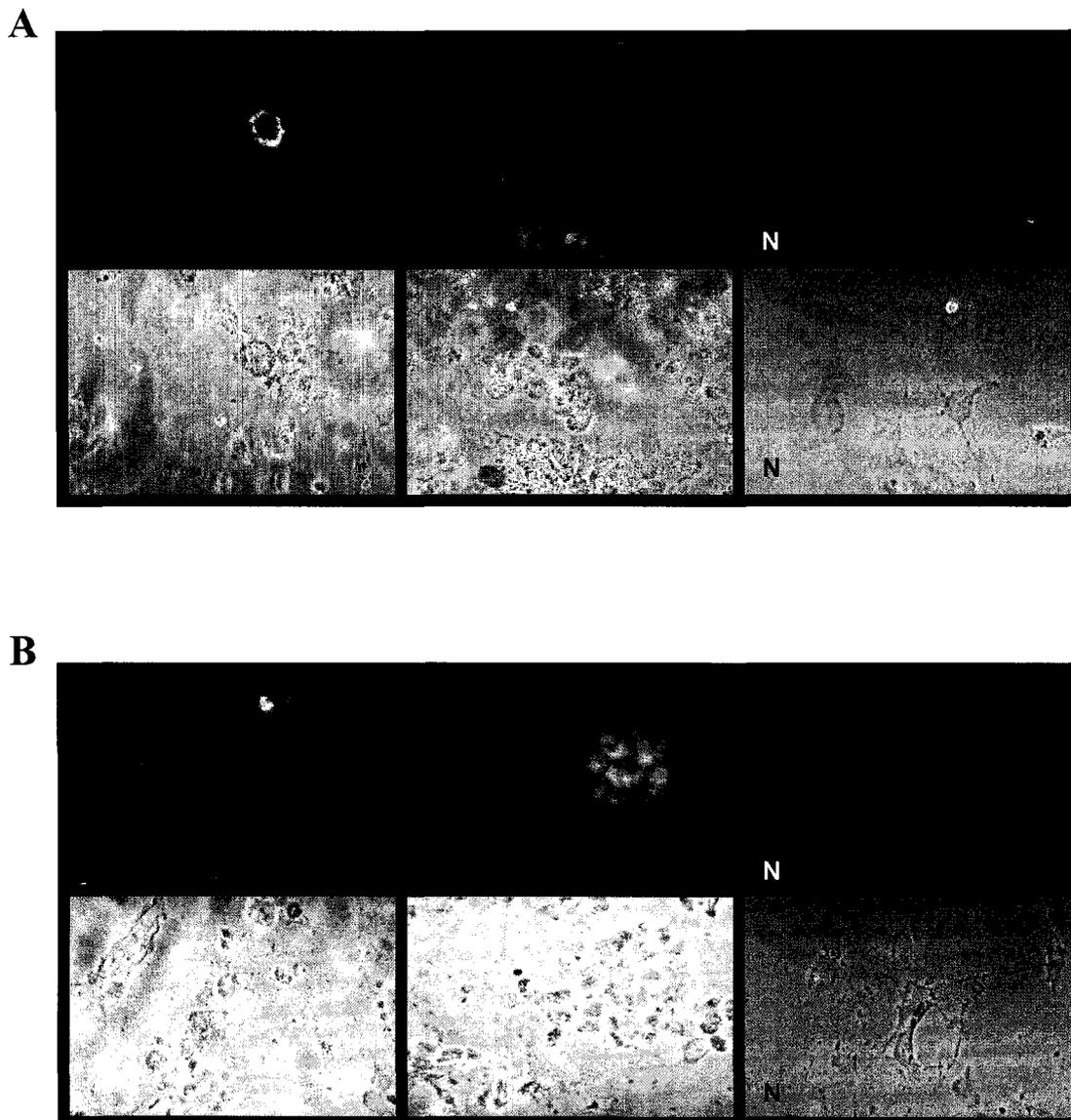
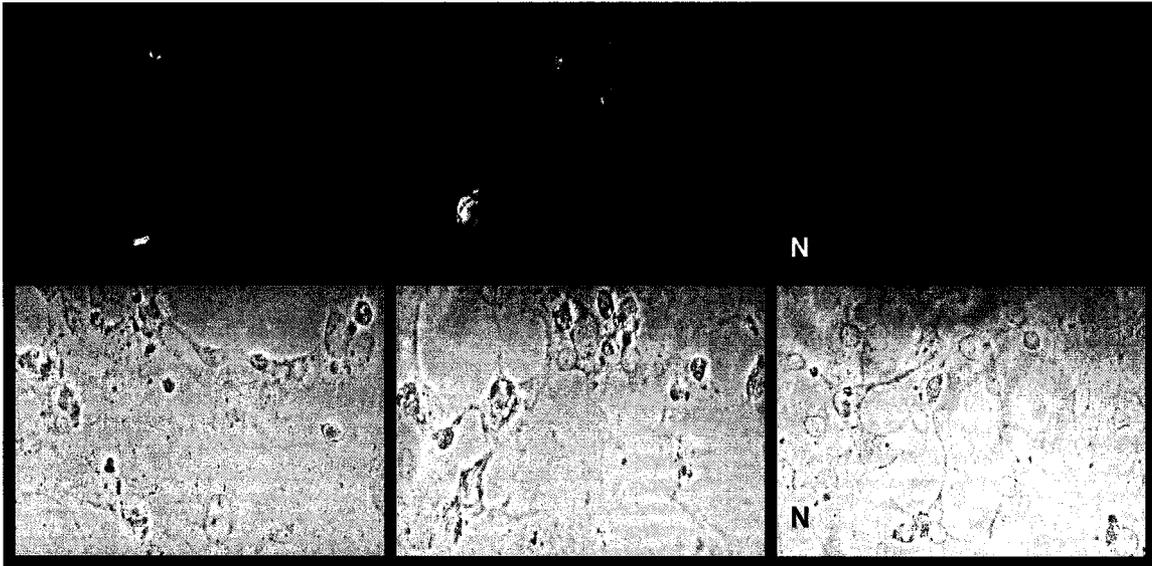


Figura 16. Ensayos de transfección en células COS-7. La expresión del dominio III de Den-1 por fluorescencia usando el anticuerpo monoclonal D2-1F1-3 se muestra en A), para Den-2 en B), para Den-3 en C) y para Den-4 en D). En todos los caso se muestran las imágenes en fluorescencia y la imagen correspondiente en campo claro. El control negativo esta indicado con N.

C



D

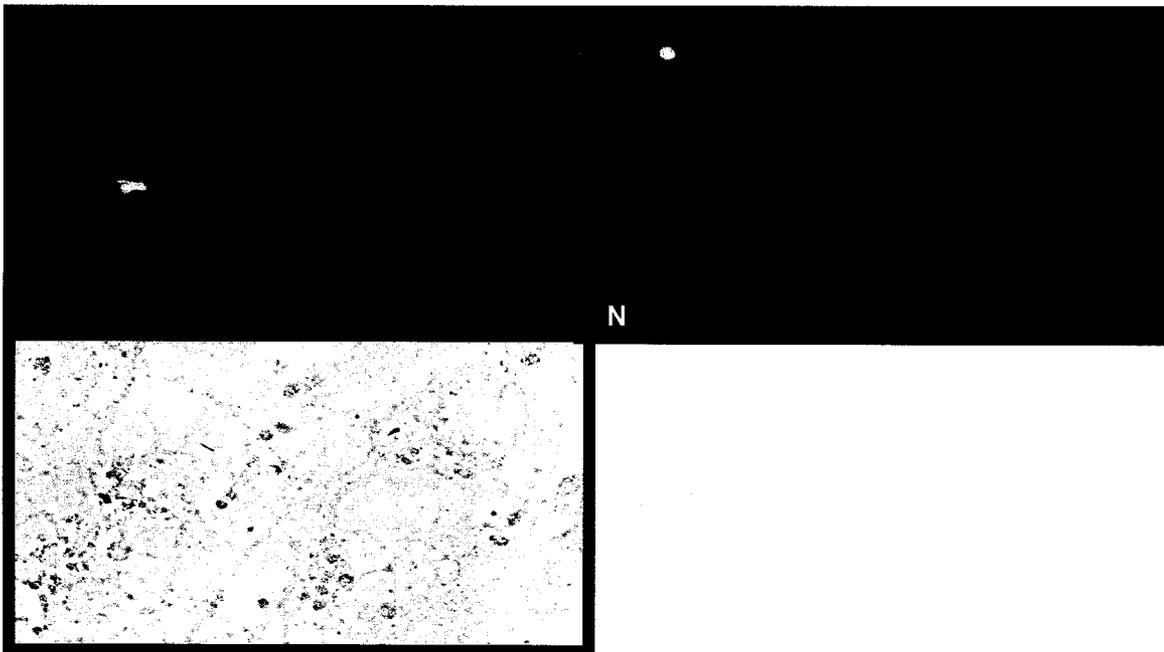


Figura 16. Continuación.

El suero de los ratones inmunizados con el plásmido pDIII-D1, fue positivo en el ensayo de ELISA con el antígeno (virus completo) (Figura 17), en este caso, el suero de este grupo experimental fue el que presentó la respuesta más baja (densidad óptica) y se observó reactividad con antígenos de otros serotipos, sobre todo con el de Den-4, sin embargo, como se mencionó antes, la especificidad contra el antígeno de Den-1 fue estadísticamente significativa. En el caso del grupo inmunizado con el plásmido pDIII-D2, la respuesta fue más robusta contra su antígeno correspondiente (Figura 18), siendo este grupo junto con los inmunizados con el plásmido pDIII-D4 (Figura 20), los que presentaron las respuestas más elevadas por ELISA. Finalmente el suero de los ratones inmunizados con el plásmido pDIII-D3, también presentó una buena respuesta de anticuerpos específica contra el antígeno de Den-3 (Figura 19). Al igual que en el caso del grupo inmunizado con el plásmido pDIII-D1, en este grupo se observó la presencia, aunque mínima, de anticuerpos de reacción cruzada, pero en este caso contra el antígeno de Den-1. En general, la respuesta de anticuerpos en los ratones inmunizados de forma individual con las construcciones del dominio III, fue similar. Se observó que no hubo diferencias significativas en la respuesta de anticuerpos anti-dengue medida por ELISA, entre la inmunización inicial y los refuerzos administrados con intervalos de 15 días. Los resultados del análisis de la respuesta de anticuerpos, contra el virus dengue, inducidos mediante el esquema de inmunización con las formulaciones tetravalentes T25, T50 y T100, mostraron, en todos los casos, que la inmunización con la mezcla de los cuatro plásmidos puede inducir la producción de anticuerpos contra los cuatro serotipos del virus dengue. La respuesta observada en este caso, y a diferencia de la inmunización con los plásmidos de forma individual, fue dosis-dependiente.

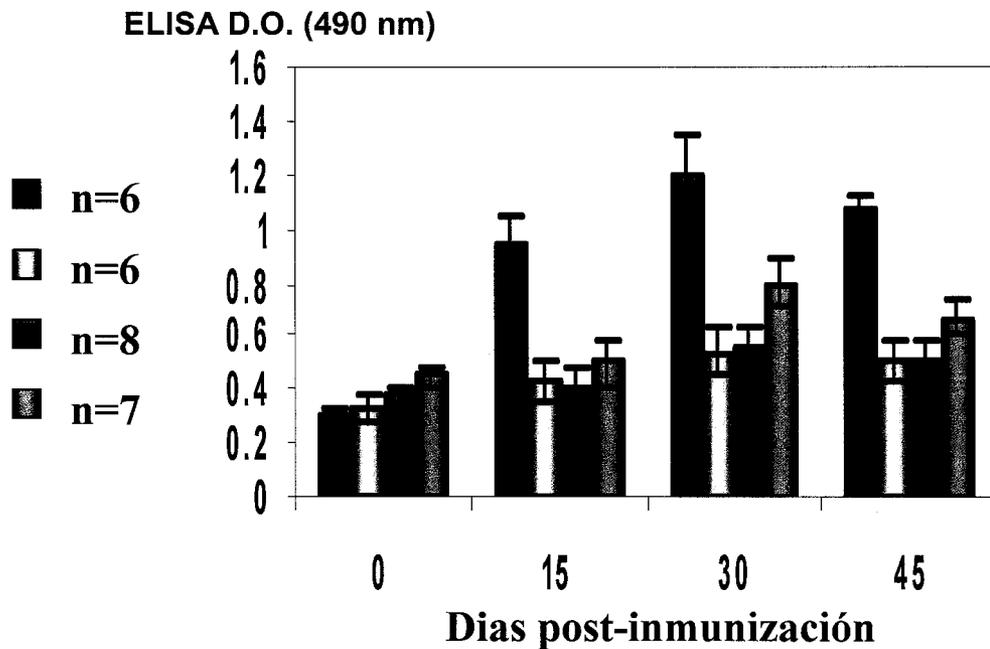


Figura 17. Presencia de anticuerpos específicos contra el virus dengue serotipo 1.

El suero de ratones inmunizados con la construcción pDIII-D1 (azul), pDIII-D2 (amarillo), pDIII-D3 (verde) y pDIII-D4 (naranja) se analizaron por ELISA usando como antígeno al virus Den-1. En el eje de las X se muestran los días post-inmunización en los cuales se tomaron muestras de sangre para obtener el suero y el número (n) de individuos en cada grupo inmunizado está indicado.

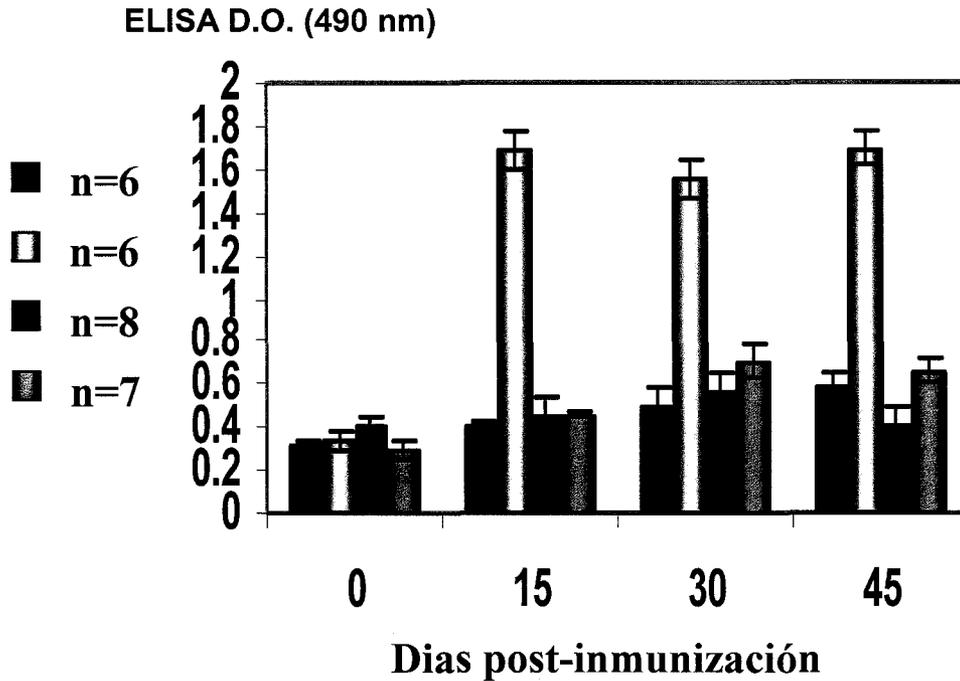


Figura 18. Presencia de anticuerpos específicos contra el virus dengue serotipo 2.

El suero de ratones inmunizados con la construcción pDIII-D1 (azul), pDIII-D2 (amarillo), pDIII-D3 (verde) y pDIII-D4 (naranja) se analizaron por ELISA usando como antígeno al virus Den-2. En el eje de las X se muestran los días post-inmunización en los cuales se tomaron muestras de sangre para obtener el suero y el número (n) de individuos en cada grupo inmunizado está indicado.

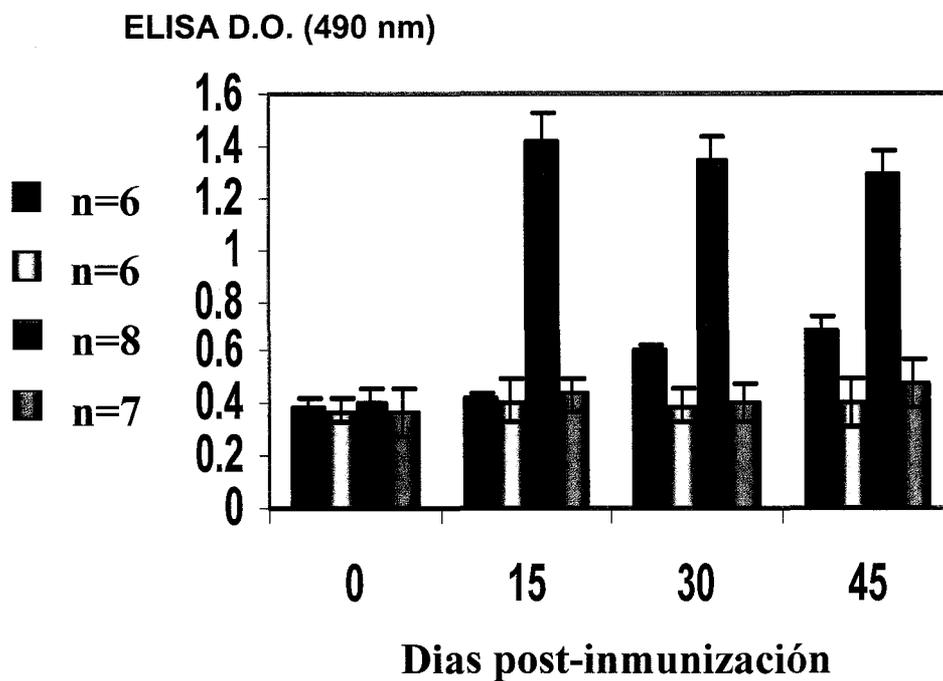


Figura 19. Presencia de anticuerpos específicos contra el virus dengue serotipo 3.

El suero de ratones inmunizados con la construcción pDIII-D1 (azul), pDIII-D2 (amarillo), pDIII-D3 (verde) y pDIII-D4 (naranja) se analizaron por ELISA usando como antígeno al virus Den-3. En el eje de las X se muestran los días post-inmunización en los cuales se tomaron muestras de sangre para obtener el suero y el número (n) de individuos en cada grupo inmunizado está indicado.

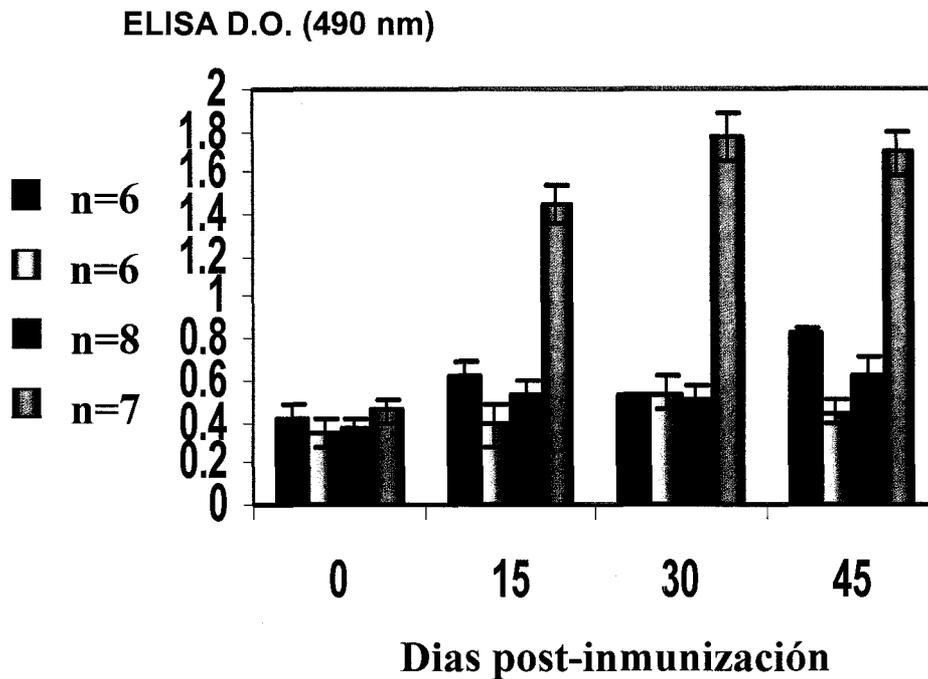


Figura 20. Presencia de anticuerpos específicos contra el virus dengue serotipo 4.

El suero de ratones inmunizados con la construcción pDIII-D1 (azul), pDIII-D2 (amarillo), pDIII-D3 (verde) y pDIII-D4 (naranja) se analizaron por ELISA usando como antígeno al virus Den-4. En el eje de las X se muestran los días post-inmunización en los cuales se tomaron muestras de sangre para obtener el suero y el número (n) de individuos en cada grupo inmunizado está indicado.

Cuando se inmunizó con la formulación T25, se pudo detectar anticuerpos contra los cuatro serotipos (Figura 21), sin embargo el título de anticuerpos fue muy bajo, en comparación con las respuestas obtenidas con los plásmidos individuales. La respuesta fue mejorando cuando se aumento la dosis de cada plásmido en la formulación T50 (Figura 22) hasta llegar a niveles similares a los de la vacunación individual cuando se uso una mezcla de plásmidos con una concentración de 100 µg c/u (Figura 23). En todos los casos, las respuestas de anticuerpos contra dengue fueron estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) y de forma similar a la inmunización individual, no se observaron diferencias significativas en el título de anticuerpos cuando se administraron los refuerzos.

15.4. Evaluación de anticuerpos protectores

Una vez que se comprobó que la inmunización con plásmidos que contienen al dominio III de los cuatro serotipos del virus dengue, ya sea en forma individual o tetravalente, pueden inducir la producción de anticuerpos específicos de serotipo, se decidió evaluar la capacidad protectora de estos anticuerpos contra la infección por el virus dengue 2 en cultivos de células BHK-21 y en el modelo de ratón lactante. Las células BHK-21 son muy sensibles a la infección y además desarrollan un efecto citopático ECP muy marcado, caracterizado por el cambio en la morfología celular y el desprendimiento de la monocapa; lo anterior ocurre en la mayoría de las células en la monocapa en un periodo de 5-7 días a un MOI de 0.001 PFU/célula.

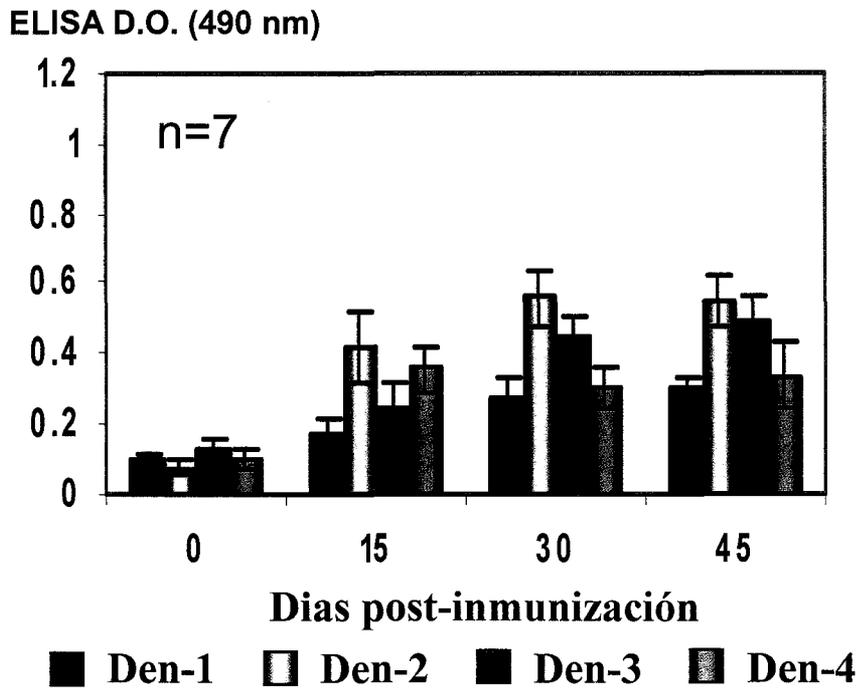


Figura 21. Inducción de anticuerpos específicos contra el virus dengue en ratones inmunizados con la formulación tetravalente T25. El suero de los ratones inmunizados con 25 μ g de cada plásmido que contiene el dominio III de los cuatro serotipos (100 μ g totales) se analizaron por ELISA utilizando como antígeno al virus Den-1 (azul), Den-2 (amarillo), Den-3 (verde) y Den-4 (naranja). En el eje de las X se muestran los días post-inmunización en los cuales se tomaron muestras de sangre para obtener el suero y el número (n) de individuos en cada grupo inmunizado está indicado.

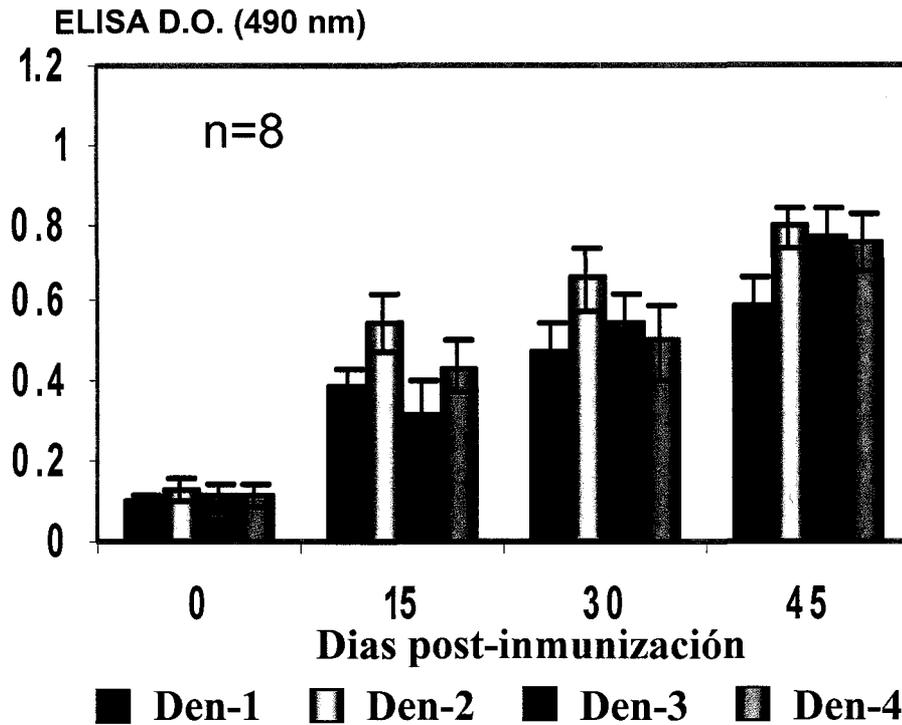


Figura 22. Inducción de anticuerpos específicos contra el virus dengue en ratones inmunizados con la formulación tetravalente T50. El suero de los ratones inmunizados con 50 μ g de cada plásmido que contiene el dominio III de los cuatro serotipos (200 μ g totales) se analizaron por ELISA utilizando como antígeno al virus Den-1 (azul), Den-2 (amarillo), Den-3 (verde) y Den-4 (naranja). En el eje de las X se muestran los días post-inmunización en los cuales se tomaron muestras de sangre para obtener el suero y el número (n) de individuos en cada grupo inmunizado está indicado.

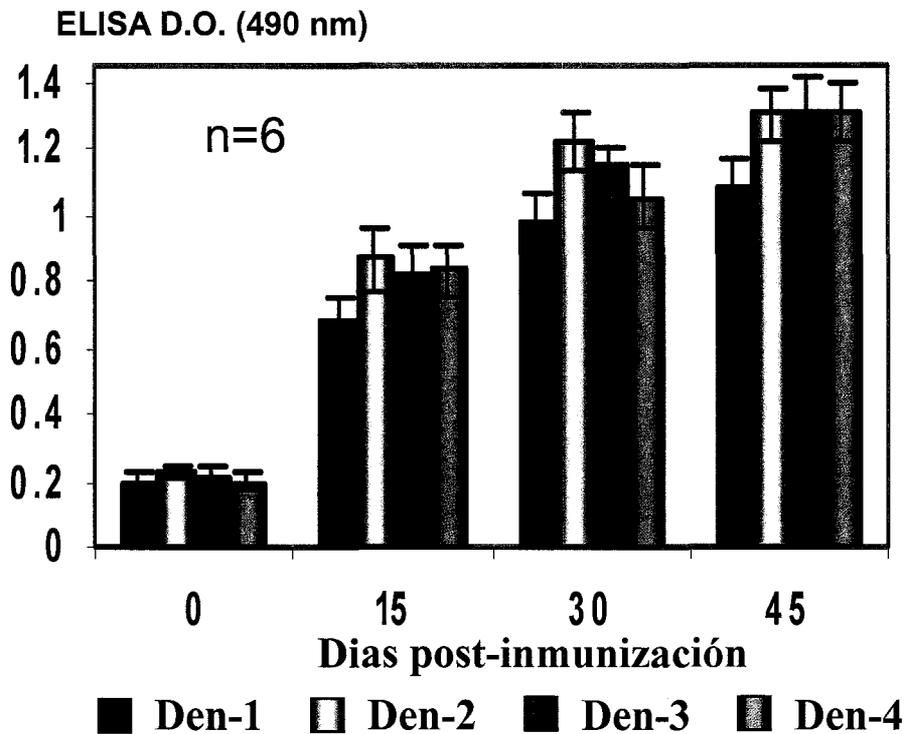


Figura 23. Inducción de anticuerpos específicos contra el virus dengue en ratones inmunizados con la formulación tetravalente T100. El suero de los ratones inmunizados con 100 μ g de cada plásmido que contiene el dominio III de los cuatro serotipos (400 μ g totales) se analizaron por ELISA utilizando como antígeno al virus Den-1 (azul), Den-2 (amarillo), Den-3 (verde) y Den-4 (naranja). En el eje de las X se muestran los días post-inmunización en los cuales se tomaron muestras de sangre para obtener el suero y el número (n) de individuos en cada grupo inmunizado está indicado.

El modelo de ratón lactante, representa una de las pocas alternativas para evaluar protección contra la infección por el virus dengue, ya que como se mencionó antes, no existe un modelo animal adecuado. La cepa NGC del virus dengue serotipo 2, produce una mortalidad en el 100 % de ratones neonatos (1-3 días de nacidos) cuando son inoculados intracranealmente con el virus.

Para llevar a cabo estos ensayos se emplearon los sueros obtenidos (Dos semanas después del último refuerzo) de los ratones inmunizados con el plásmido pcDIII-D2 y con las combinaciones tetravalentes.

Los ensayos de inhibición del ECP usando sueros obtenidos de los ratones inmunizados con la construcción T25, mostraron títulos de protección de 1:5 mientras que el suero de los ratones inmunizados con las construcciones pcDIII-D2, T50 y T100 tuvieron un título de 1:10. En la figura 24, se muestran los resultados obtenidos con el suero de los ratones inmunizados con la formulación T100.

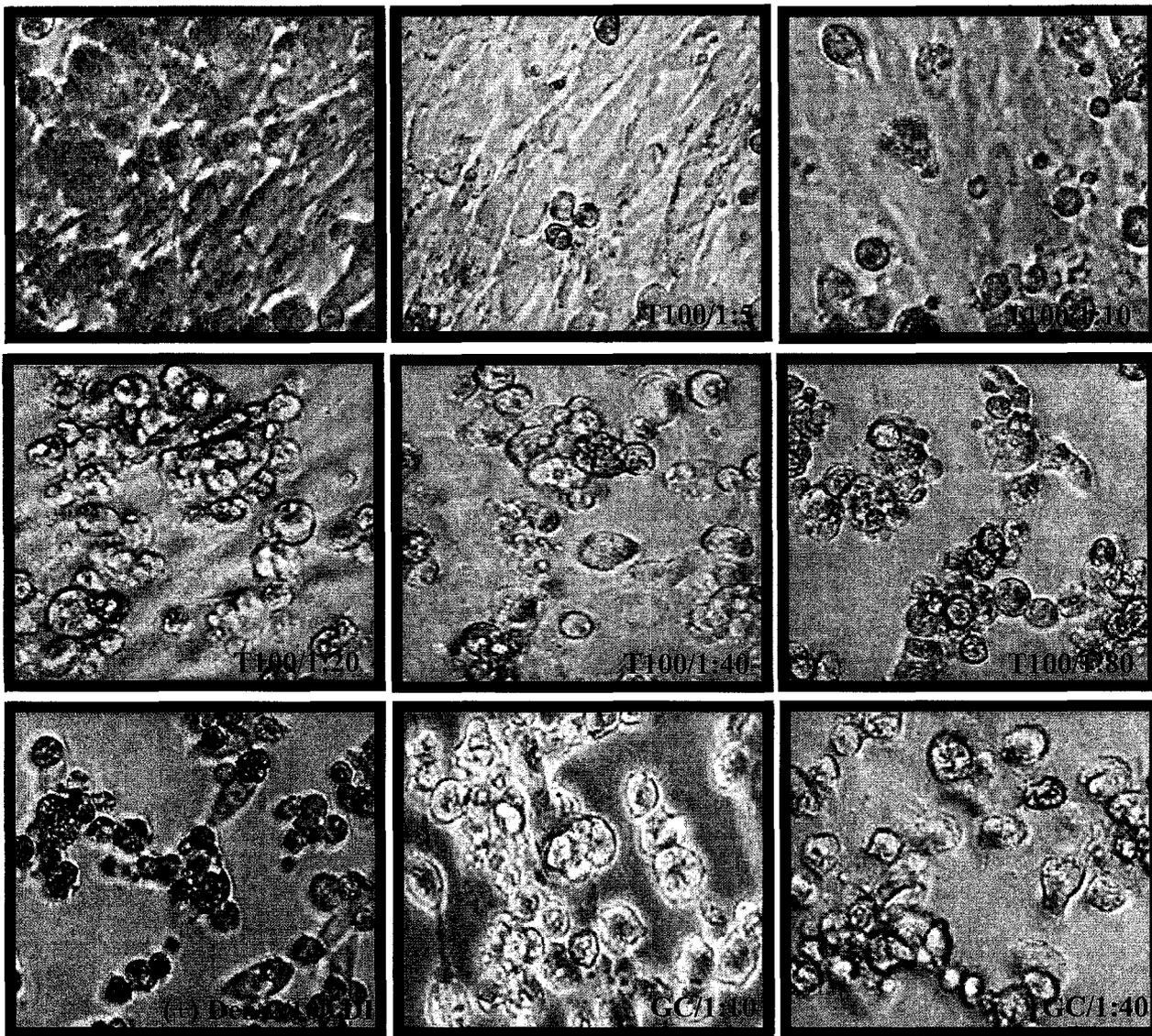


Figura 24. Inhibición del efecto citopático (ECP) en células BHK-21. El suero de los ratones inmunizados con la formulación tetravalente T100, se diluyó 1:5- 1:80 (indicado), se incubó con virus Den-2 (100 LD₅₀) y se inoculó en cultivos de células (ver texto). El efecto citopático se monitoreó diariamente y el experimento se paró cuando el ECP se observó en el 100 % de las células control (+). El control negativo (-) fueron células sin infectar y el grupo control (GC) fueron células inoculadas con virus y suero de ratones inmunizados con el plásmido vacío.

En los ensayos en ratones lactantes, cuando se empleó el suero de los ratones inmunizados con 100 μ g de la construcción pcDIII-D2, se observó un promedio de sobrevivencia del 43 %, mientras que con el suero de los ratones inoculados con la construcción T50 se obtuvo un 50 %. El mayor porcentaje de protección se obtuvo cuando se empleó el suero de los ratones inmunizados con la construcción T100, que fue 87 % de sobrevivencia, esta última fue estadísticamente significativa ($p=0.016$). El resumen de estos resultados junto con el título de anticuerpos protectores observado en los ensayos de inhibición de ECP se muestran en la figura 25.

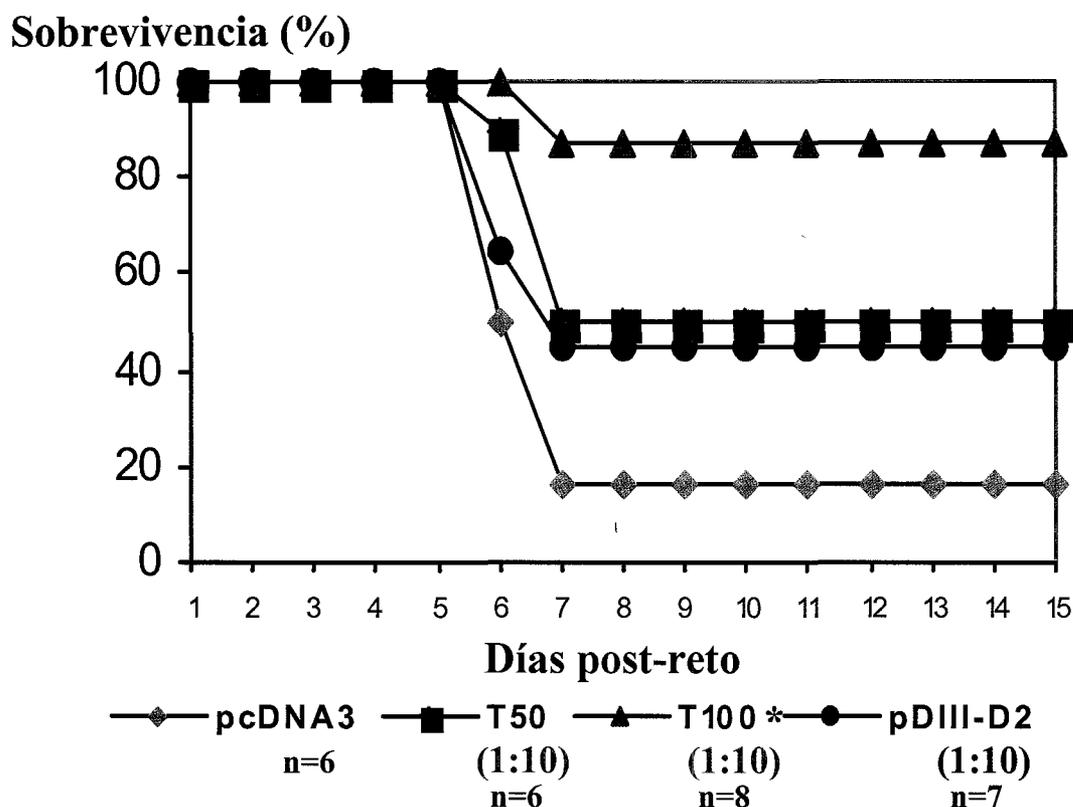


Figura 25. Ensayos de protección en ratones lactantes. El suero de los ratones inmunizados con la formulaciones tetravalentes T50 (verde) y T100 (gris), así como con la construcción individual pDIII-D2 (azul) se emplearon para incubarlos con virus Den-2 e inocular ratones neonatos por ruta IC (ver texto). La sobrevivencia se monitoreó diariamente y el porcentaje se muestra en el eje de las Y. El título obtenido por inhibición de ECP se muestra en paréntesis y el número (n) de ratones en cada grupo está indicado. La diferencia entre la protección en el grupo T100 con respecto a los demás fue estadísticamente significativa ($p=0.016$). El grupo control fue el suero de ratones inmunizados con el plásmido vacío (rojo).

16. Discusión

Las vacunas de DNA diseñadas contra flavivirus han evolucionado rápidamente en los últimos años, proporcionando con esto una estrategia promisoría para entender aspectos fundamentales involucrados en la inducción de una respuesta inmune eficiente contra estos virus. Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos por desarrollar vacunas basadas en la inmunización con DNA, virus vivos atenuados, virus quiméricos o proteínas recombinantes, en la actualidad, no existe una vacuna disponible contra el dengue. La inmunización con DNA desnudo ha sido investigada usando principalmente los genes estructurales prM-E (Kochel, 1997; Kochel, 2000; Chang, 2001) mientras que para otros flavivirus se han utilizado otros genes de proteínas no estructurales como NS1 y NS3. (Chen, 1999; Chang, 2001; Puttikhunt, 2003).

Se sabe que la proteína E, es el antígeno viral más importante y se ha reportado que la proteína prM es necesaria para su correcta expresión e inmunogenicidad (Kinney, 2001; Lorenz, 2002; Pugachev, 2003). No obstante, también existen trabajos donde se reportan candidatos a vacunas basados en proteínas recombinantes que contienen únicamente al DIII de Den-2. Estas vacunas han probado ser exitosas para inducir anticuerpos neutralizantes y protección en el modelo de ratón (Simmons, 1998; Simmons, 2001).

En el presente estudio reportamos el uso del DIII de los cuatro serotipos del virus dengue como un candidato a vacuna basada en inmunización con DNA para inducir anticuerpos neutralizantes y protección en ratón.

La correcta expresión de cualquier proteína recombinante depende de su conformación nativa, lo cual es un requisito indispensable para el desarrollo de una vacuna de DNA eficiente (Chang, 2001). En este estudio se generaron plásmidos con el

DIII de los cuatro serotipos del virus dengue que fueron capaces de ser expresados de manera correcta en las células transfectadas ya que los epítopes fueron reconocidos por anticuerpos monoclonales; estos epítopes, inducen anticuerpos neutralizantes (Roehrig, 1998). La inmunización con estas construcciones individuales, indujo una respuesta de anticuerpos específica después de una primera inmunización. Los ratones a los que se les administró un refuerzo con la misma cantidad de DNA, incrementaron el título de anticuerpos, sin embargo, no se observaron incrementos con refuerzos posteriores. El pico máximo en el título de anticuerpos se observó después de dos semanas posteriores a la primera inmunización, esto para Den-2 y Den-3, mientras que para Den-1 y Den-4 fue hasta dos semanas después del primer refuerzo.

Los títulos de anticuepos en los ensayos de ELISA para Den-2, obtenidos en este estudio, son similares a los reportados con la vacunación con el DIII recombinante de Den-2 (Simmons, 1998). Estos resultados demuestran que el DIII por si solo es inmunogénico, capaz de inducir anticuerpos como sucede cuando se emplea el gene E o los genes prM-E (Kochel, 1997; Porter, 1998; Konishi, 2000; Kochel, 2000; Puttikhunt, 2003; Raviprakash, 2003).

Para analizar el uso del DIII en forma tetravalente, se emplearon combinaciones de los 4 plásmidos. Se observó una respuesta de anticuerpos que fue dosis-dependiente. Únicamente cuando se empleó la dosis máxima (T100), se obtuvieron títulos similares a la inmunización con los plásmidos individuales. No existieron diferencias significativas en la respuesta de anticuerpos (serotipo-específicas) en los ratones inmunizados con cualquiera de las dosis empleadas. Aun cuando se emplearon grandes concentraciones de DNA, no se observaron efectos adversos en los grupos de ratones que incidieran en la respuesta de anticuerpos. Sin embargo, este

fenómeno en el cual la respuesta de anticuerpos es dosis-dependiente, como se ha reportado para otros virus (Chow, 1997; Cazeaux, 2002), la gran cantidad de DNA empleado para inducir anticuerpos neutralizantes constituye una desventaja, por lo que es probable que la respuesta inmune inducida por los plásmidos con el DIII pueda ser optimizada mediante la modificación de ciertas variables como son la ruta de inmunización, la forma de liberación del antígeno o la inclusión de moléculas adyuvantes. Esto permitirá usar concentraciones menores de DNA sin afectar la calidad de la respuesta inmune (Babiuk, 2003).

En los ensayos de neutralización en células BHK-21 y de protección en ratones lactantes, se empleó una cepa de Den-2 adaptada a ratón, debido a su gran virulencia y capacidad de inducir ECP en estas células, así como la alta mortalidad producida en los ratones neonatos inoculados por vía IC. Los títulos de protección obtenidos con la construcción pcDIII-D2 y con las formulaciones T50 y T100 (1:10 para todos), no correlacionaron con los datos de protección en el modelo de ratón lactante (43%, 50%, y 87%, respectivamente), sin embargo, existe una correlación entre la cantidad de DNA inoculado y los datos de protección, es decir, a mayor cantidad de DNA mayor sobrevivencia de los ratones. Es posible que los anticuerpos neutralizantes, no sean las únicas moléculas presentes en el suero de ratones inmunizados, que están jugando un papel en la protección. Otras moléculas, tales como citoquinas o quimiocinas que pueden ser inducidas por dinucleótidos no-metilados (motivos CpG) presentes en el DNA plasmídico. Los motivos CpG pueden directamente activar a macrófagos, monocitos, células dendríticas e inducir la secreción de IL-12, IL-6 e INF- γ (Klinman, 1996). Los plásmidos incorporados por las APCs puede ejercer su actividad adyuvante

mediante los CpGs a través de la interacción con receptores intracelulares tipo Toll, por ejemplo el receptor tipo Toll 9 (TLR-9 por sus siglas en inglés), que se encuentra presente en la superficie de los endosomas tempranos (Huygen, 2005). El DNA bacteriano interacciona con el TLR-9 mediante el motivo de seis bases compuesto por el CpG no metilado, flanqueado por dos purinas en el extremo 5' y dos pirimidinas en el extremo 3'(GACGTT). A diferencia de lo que sucede en las células dendríticas humanas, donde únicamente las células de origen plasmocitoide expresan TLR-9; en el ratón, todas las células dendríticas lo expresan. La presencia de motivos CpG en la gran cantidad de DNA empleada en la formulación T100 (400µg), pudo inducir la producción de altos niveles de IL-12, IL-6 e INF- γ , contribuyendo con los anticuerpos neutralizantes a la protección observada en los ratones retados con Den-2.

La inducción de anticuerpos específicos contra los cuatro serotipos del virus dengue, nos indica que el dominio III expresado en las construcciones fue presentado de manera adecuada a los linfocitos B. Sin embargo solo podemos especular la forma en la cual el antígeno llega al receptor de estos linfocitos, ya que en el diseño de las construcciones no se incluyó ninguna señal para llevar estos antígenos a la superficie de las células transfectadas, o para ser excretados. Es probable que las proteínas hayan sido liberadas de las células transfectadas mediante lisis celular, o ser transportadas a los ganglios linfáticos y posteriormente excretadas por las propias APCs (Figura 11).

Por otro lado, el dominio III debe contener epítopes que sean presentados por las APCs en el contexto de MHC clase II, para ser presentados a las células T

cooperadoras, activarlas y de esta forma inducir la secreción de interleukinas que estimulen de forma adecuada a los linfocitos B (Figura 11, números 9-12).

Para evaluar la presencia de epítopes de células Tc en la secuencia del dominio III de los cuatro serotipos del virus dengue, se llevó a cabo un análisis para predecir la presencia de epítopes de células T cooperadoras presentados por el MHC II, para lo cual se usaron programas que utilizan algoritmos basados en matrices cuantitativas obtenidas a partir de bases de datos que contienen secuencias de péptidos que se unen o no a más de 50 alelos de MHC II estudiados (Singh, 2001). Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 1. Para todos los serotipos del virus dengue, se encontraron regiones en el dominio III que tienen una gran afinidad por moléculas de MHC II de distintos alelos. Para cada serotipo se escogieron los péptidos con el mayor puntaje (score) usando dos distintos programas (Tabla 1), lo que indicaba la mayor probabilidad de unión.

De forma interesante se observó que para los cuatro serotipos existe un péptido en la posición 86 del dominio III (87 en el caso de dengue 3), con gran afinidad para varios alelos (Figura 26). Debido a que se ha reportado que la región del dominio III que corresponde a este péptido puede estar involucrado en la unión al receptor celular (Crill, 2001), se hizo un modelaje de la estructura tridimensional del dominio III de los cuatro serotipos del virus dengue para ubicar de forma precisa, mediante el programa SWISS-MODEL (Schwede, 2003; Jürgen, 2004) disponible en <http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html> y los resultados fueron refinados usando el programa POV-Ray disponible en el sitio :

Tabla 1. Predicción¹ de epítopes en el dominio III del virus dengue, que pueden unirse con alta afinidad a moléculas MHC clase II.

Serotipo	Péptido	Posición ²	Alelos MHC II
Dengue 1	YVMCTGSFK	8	
	VMCTGSFKL	9	HLA-DRB1*0101; *0401;
	VLVQVKYEG	29	*0421; *0703; *1301; *1327;
	VKYEGTDAP	33	*1328.
	YIVVGAGEK	86	HLA-DRB5*0101; *0101
Dengue 2	LQLKGMSYS	1	
	YSMCTGKFK	8	HLA-DRB1*0305; *0309;
	VVKEIAETQ	17	*0401; *0402; *0405; *0408;
	IVIRVQYEG	29	*0410; *0421; *0426; *0801;
	YEGDGSPCK	35	*0802; *0804; *0806; *0813;
	FEIMDLEKR	46	*0817; *1101; *1128; *1301;
	VNPIVTEKD	63	*1305; *1321; *1327; *1328.
	YIIIGVEPG	86	HLA-DRB5*0101; *0105.
	IIGVEPGQL	88	
	YAMCLNTFV	8	
Dengue 3	FVLKKEVSE	15	HLA-DRB1*0306; *0307;
	LKKEVSETQ	17	*0308; *0311; *0401; *0408;
	IVIGIGDKA	87	*0426; *0801; *0817; *1107.
	IGIGDKALK	89	
	LRIKGMSYT	1	HLA-DRB1*0305; *0306;
Dengue 4	IEIRDVNKE	46	*0307; *0308; *0309; *0311;
	VVGRIISST	56	*0401; *0405; *0408; *0801;
	YTNSVTNIE	69	*0802; *0804; *0806; *0813;
	YIVIGVGDS	86	*0817; *1101; *1128; *1304;
	IVIGVGDSA	87	*1305; *1307; *1321.

1.- La predicción se llevó a cabo usando los programas ProPred (www.imtech.res.in/raghava/propred/) y HLA Pred (www.imtech.res.in/raghava/hlapred/index.html).

2.- Posición en la secuencia del dominio III.

<http://www.povray.org>. Los resultados se muestran en la Figura 27 y corroboraron que este péptido corresponde a un “loop” externo en el dominio III, mismo que ha sido implicado en la unión al receptor celular, ya que anticuerpos dirigidos contra esta región bloquea la unión a células Vero (Crill, 2001). En otro trabajo, se reportó que anticuerpos dirigidos contra un péptido localizado en la misma región en el dominio III de la proteína E del virus dengue 2, bloquea la unión a células de mosquito (C6/36), pero no en células BHK-21 (Hung, 2004).

Estos resultados muestran que esta región en el dominio III del virus dengue constituye además de un epítotope de células B, también un epítotope de células T, capaz de unirse a diferentes alelos del MHC II, lo que lo convierte en un blanco atractivo en el diseño de vacunas contra el dengue.

En este análisis de predicción de epítotospes, se observó también que el dominio III contiene epítotospes que se predicen pueden unirse a moléculas del MHC clase I (datos no mostrados). Sin embargo, en nuestros experimentos para evaluar el efecto de la inmunización con los plásmidos con DIII sobre la respuesta inmune celular, no fue posible detectar proliferación en células obtenidas del bazo de los ratones inmunizados. Es probable que la población de linfocitos T pueda ser escasa en el órgano analizado, por lo que la sensibilidad del ensayo no fue suficiente para poder detectarlas. Es probable que se puedan obtener mejores resultados si se emplean linfocitos obtenidos de los ganglios más cercanos al sitio de inoculación del DNA. Sin embargo, también se ha sugerido que los epítotospes de células T citotóxicas pueden estar presentes en otras proteínas tales como la proteína C (Konishi, 2000).

	80	90	100	
Den-1:	EKPVNIEAEP	PFGENYIVVG	AGEKALKLSW	FK
Den-2:	DSPVNIEAEP	PFGDSYIIIIG	VEPGQLKLNW	FK
Den-3:	EKPVNIEAEP	PFGESNIVIG	IGDKALKINW	YR
Den-4:	NSVTNIELEP	PFGDSYIVIG	VGDSALTLHW	FR

Figura 26. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región común a los cuatro serotipos del virus dengue, que contiene el péptido de unión al MHC II.

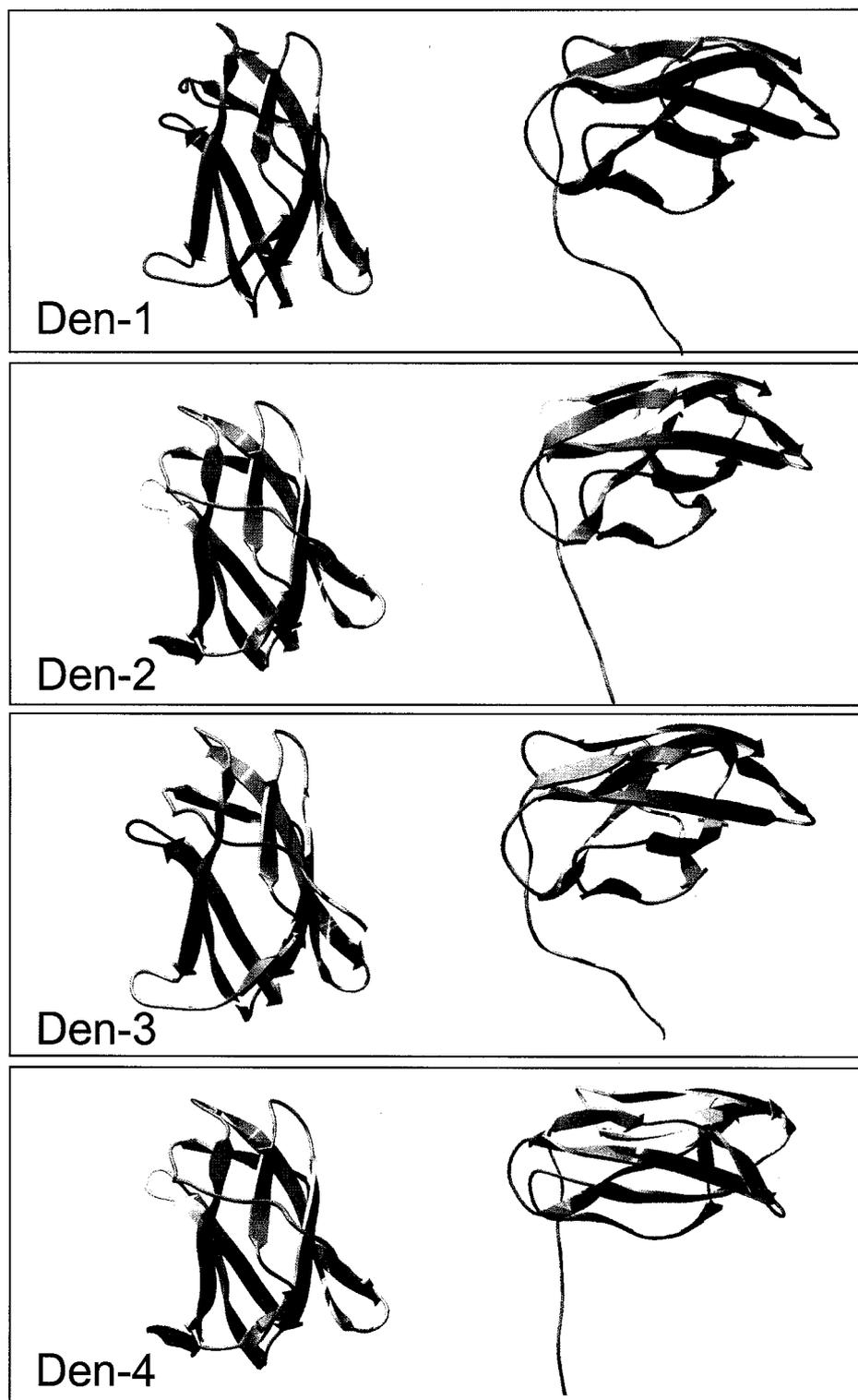


Figura 27. Modelo tridimensional del dominio III de los cuatro serotipos del virus dengue, donde se muestra el péptido de unión al MHC II.

Los resultados presentados en este trabajo, demuestran que el DIII puede ser usado como candidato a vacuna de DNA, para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes y protección contra el virus dengue en el modelo de ratón **lactante**, y representa el primer reporte de un candidato a vacuna de DNA tetravalente. **Posteriormente, otro candidato a vacuna tetravalente contra el virus dengue basado en inmunización con DNA fue reportado (Konishi, 2006).** En este trabajo se utilizaron cuatro plásmidos que contenían los genes que codifican para las proteínas prM/E de los cuatro serotipos. La inmunización de ratones con la mezcla de estos cuatro plásmidos indujo la producción de anticuerpos neutralizantes y células de memoria contra los cuatro serotipos.

Como se mencionó con anterioridad, el dominio III del virus dengue contiene distintas características biológicas que lo posicionan como un antígeno atractivo para el diseño de vacunas. Entre estas características podemos mencionar que su doblaje independiente de los otros dominios (I y II) en forma de inmunoglobulina le confiere una gran estabilidad y su posición en la proteína E permite estar accesible para el reconocimiento de anticuerpos o para la unión al receptor celular. Además muchos de los determinantes para anticuerpos específicos y neutralizantes se encuentran en este dominio.

El dominio III ha sido empleado como proteína recombinante para inducir anticuerpos contra el virus dengue (Simmons, 1998; Khanam, 2006a) y aunque resulta difícil comparar los resultados de estos trabajos y el presente estudio por la naturaleza del antígeno, las formas de inmunización y de evaluar los anticuerpos neutralizantes, los resultados en conjunto sirven para señalar, como se mencionó anteriormente, que el dominio III puede inducir una respuesta de

anticuerpos específicos y neutralizantes, de la misma forma que cuando se emplean a la proteína E o prM/E, pero disminuyendo la probabilidad de inducir anticuerpos de reacción cruzada.

Recientemente, el dominio III del virus dengue 2 ha sido empleado para la construcción de un adenovirus recombinante. En conjunto con un plásmido que expresa el mismo dominio se ha empleado de manera exitosa para inducir una respuesta inmune tanto humoral como celular en un modelo murino, empleando una estrategia de inmunización/refuerzo con el adenovirus recombinante y con DNA, respectivamente (Khanam, 2006b).

Este mismo grupo ha reportado, con una estrategia similar, la construcción de un adenovirus recombinante y un plásmido que expresan una proteína quimérica, compuesta por dominio III de los virus dengue serotipos 2 y 4 unidos covalentemente (Khanam, 2007). En este trabajo se logró inducir anticuerpos neutralizantes, así como una respuesta celular contra ambos serotipos.

La estrategia del uso del dominio III como un candidato a vacuna, también ha sido explorada para otros flavivirus como el Virus del Oeste del Nilo (WNV, por sus siglas en inglés). En un trabajo reciente se construyó un dominio III recombinante del WNV y en conjunto con DNA bacteriano (motivos CpG) se inmunizaron ratones, logrando la inducción de altos títulos de anticuerpos neutralizantes, específicos contra el WNV. También se observó una respuesta celular en los experimentos de proliferación.

Lo anterior, en conjunto con los resultados de este trabajo ponen de manifiesto que el uso del dominio III del virus dengue, representa un candidato atractivo para el desarrollo de una vacuna. Sin embargo, se requieren estudios

adicionales para evaluar la capacidad protectora de este candidato tetravalente contra los otros serotipos del virus dengue.

Al igual que en el trabajo con el adenovirus recombinante (**Khanam, 2007**), el **presente candidato a vacuna tetravalente**, podría ser usado en combinación con proteínas recombinantes **expresadas en bacterias o con adenovirus** o virus vaccinia recombinantes para mejorar la respuesta inmune, tanto humoral como celular.

Finalmente, **es importante señalar que es necesario estandarizar los procedimientos para evaluar cualquier candidato a vacuna**, para de esta forma tener mejores herramientas de comparación. Un de los obstáculos para lograr este objetivo es la falta de un modelo animal para la fiebre por dengue. Recientemente se reporto que la infección del ratón inmunodeficiente-diabético (**NOD/SCID**), transplantado con células progenitoras hematopoyéticas, derivadas de cordón umbilical humano, con el virus dengue 2; desarrolla síntomas clínicos característicos de la fiebre por dengue como son la fiebre, rash y la trombocitopenia (**Bente, 2005**). Estos resultados sugieren que este modelo de ratón puede ser una herramienta muy útil para la evaluación de vacunas.

17. Conclusiones

- 1. Se diseñaron y construyeron plásmidos que expresan al dominio III de los cuatro serotipos del virus dengue.**
- 2. Se determinó que el dominio III de los cuatro serotipos se expresó correctamente en células COS-7 transfectadas con los plásmidos correspondientes.**
- 3. Se indujo una respuesta de anticuerpos específica contra el virus dengue inmunizando ratones con las construcciones individuales que expresan al dominio III de los cuatro serotipos del virus dengue.**
- 4. Se emplearon formulaciones tetravalentes para inducir anticuerpos específicos contra los cuatro serotipos del virus dengue.**
- 5. La inmunización de ratones con las construcciones individuales o con las formulaciones tetravalentes, estimuló la producción de anticuerpos neutralizantes.**
- 6. Los anticuerpos inducidos con la inmunización con las construcciones individuales o las formulaciones tetravalentes, protegen contra el reto letal en el modelo de ratón lactante.**

18. Perspectivas

- 1. Construir un plásmido tetravalente que exprese una proteína quimérica que contenga al dominio III de los cuatro serotipos del virus dengue.**
- 2. Optimizar las dosis de DNA usado para inmunizar ratones, mediante el empleo de distintas estrategias para la inoculación del DNA como son la pistola génica.**
- 3. Mejorar la respuesta inmune tanto humoral como celular mediante el empleo de una estrategia de inmunización/ refuerzo, utilizando proteínas o virus recombinantes.**
- 4. Evaluar el uso del dominio III como candidato a vacuna en el modelo de ratón NOD/SCID.**

19. Bibliografia

- Abhyankar AV, Dash PK, Saxena P, Bhargava R, Parida MM, Jana AM, Sahni AK, Rao PV. Comparison of a dipstick dot-ELISA with commercial assays for anti-dengue virus IgM antibodies. *Viral Immunol.* 2006 Winter;19(4):630-6.
- Amberg SM, Rice CM. Mutagenesis of the NS2B-NS3-mediated cleavage site in the flavivirus capsid protein demonstrates a requirement for coordinated processing. *J Virol.* 1999 Oct;73(10):8083-94.
- Babiuk LA, Babiuk SL, Loehr B, van Drunen Littel-van den Hurk S. Nucleic acid vaccines: research tools or commercial reality. *Vet Immunol Immunopathol* 2000;76:1-23.
- Babiuk LA, Pontarollo R, Babiuk S, Loehr B, van Drunen Littel-van den Hurk S. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. *Vaccine* 2003;21(7-8):649-658.
- Baldrige GD, Beaty BJ, Hewlett MJ. Genomic stability of La Crosse virus during vertical and horizontal transmission. *Arch Virol.* 1989;108(1-2):89-99.
- Barret AD. Current status of flavivirus vaccines. *Ann NY Acad Sci* 2001;951:262-271.
- Barrett AD. Japanese encephalitis and dengue vaccines. *Biologicals* 1997;25: 27-34.
- Barrett AD. Yellow fever vaccines. *Biologicals* 1997;25:17-25.
- Bente DA, Melkus MW, Garcia JV, Rico-Hesse R. Dengue fever in humanized NOD/SCID mice. *J Virol.* 2005 Nov;79(21):13797-9.
- Bhamarapravati N, Sutee Y. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 2000;18:44-47.
- Blacksell SD, Doust JA, Newton PN, Peacock SJ, Day NP, Dondorp AM. A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of rapid immunochromatographic assays for the detection of dengue virus IgM antibodies during acute infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Aug;100(8):775-84. Epub 2006 Mar 23.
- Blok J; et al. 1989. variation of the nucleotide and encoded aminoacid sequences of the envelope gene from eighth dengue 2 viruses. *Arch Virol* 105:39-53.

- Bray M, et al. Construction of intertypic chimeric dengue viruses by substitution of structural proteins genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88 :10342-10346.
- Bray M, et al. Dengue virus premembrane and membrane proteins elicit a protective immune response. *Virology* 1991;185 :505-508.
- Bukowski JF, et al. Dengue virus-specific cross-reactive CD8+ human cytotoxic T lymphocytes. *J Inf Dis* 1989;63 :5086-5091.
- Bukowski JF, Kurane I, Lai CJ, Bray M, Falgout B, Ennis FA. Dengue virus-specific cross-reactive CD8+ human cytotoxic T lymphocytes. *J Virol.* 1989 Dec;63(12):5086-91.
- Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg.* 1988 Jan;38(1):172-80.
- Cao XT, Ngo TN, Wills B, Kneen R, Nguyen TT, Ta TT, Tran TT, Doan TK, Solomon T, Simpson JA, White NJ, Farrar JJ; Dong Nai Paediatric Hospital Study Group. Evaluation of the World Health Organization standard tourniquet test and a modified tourniquet test in the diagnosis of dengue infection in Viet Nam. *Trop Med Int Health.* 2002 Feb;7(2):125-32.
- Cazeaux N, Bennasser Y, Vidal PL, Li Z, Paulin D, Bahraoui E. Comparative study of immune responses induced after immunization with plasmids encoding the HIV-1 Nef protein under the control of the CMV-IE or the muscle-specific desmin promoter. *Vaccine* 2002;20:3322-3331.
- CDC. Achievements in Public Health, 1900–1999. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 1999 48, 243–248.
- Cecilia D, Gould EA. Nucleotide Changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization-resistant mutants. *Virology* 1991;181:70-77.
- Chambers TJ; et al.. Flavivirus genome organization, expression and evolution. *Ann Rev Microbiol* 1990;44:649-688.
- Chang GJ, Davis BS, Hunt AR, Holmes DA, Kuno G. Flavivirus DNA vaccines: current status and potential. *Ann NY Acad Sci* 2001;951:272-285.
- Chaturvedi UC, Shrivastava R, Nagar R. Dengue vaccines: problems and prospects. *Indian J Med Res.* 2005 May;121(5):639-52.

- Chen HW, Pan CH, Liao MY, Jou R, Tsai CJ, Wu HJ, Lin YL, Tao MH. Screening of protective antigens of Japanese encephalitis virus by DNA immunization: A comparative study with conventional viral Vaccines. *J Virol* 1999;73:10137-10145.
- Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 1997;3:866-871.
- Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol.* 2006 Apr;44(4):1295-304.
- Chow YH, Huang WL, Chi WK, Chu, YD, Tao MH. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. *J Virol* 1997;71:169-178.
- Chu MC; et al. Genetic relatedness among structural protein genes of dengue 1 virus strains. *J Gen Virol* 1989; 70:1701-1712.
- Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to vero cells. *J Virol* 2001;75:7769-7773.
- Delenda C, Staropoli I, Frenkiel MP, Cabanie L, Deubel V. Analysis of C-terminally truncated dengue 2 and dengue 3 virus envelope glycoproteins: processing in insect cells and immunogenic properties in mice. *J Gen Virol.* 1994 Jul;75 (Pt 7):1569-78.
- Durbin AP, Karron RA, Sun W, Vaughn DW, Reynolds MJ, Perreault JR, Thumar B, Men R, Lai CJ, Elkins WR, Chanock RM, Murphy BR, Whitehead SS. Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:405-413.
- Eckels KH, et al. 1994. Immunization of monkeys with baculovirus-dengue type 4 recombinants containing envelope and nonstructural proteins : evidence of priming and partial protection. *Am J Trop Med Hyg* 50 :472-478.
- Edelman R, Wasserman SS, Bodison SA, Putnak RJ, Eckels KH, Tang D, Kanesa-Thanan N, Vaughn DW, Innis BL, Sun W. Phase I trial of 16 formulations of a

- tetravalent live-attenuated dengue vaccine. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Dec;69(6 Suppl):48-60. Erratum in: *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Mar;70(3):336.
- Edevag G, Wharen B, Osterhaus AD, Sundqvist VA, Granstöm M. Enzyme-linked immunosorbent assay-based inhibition test for neutralizing antibodies to polioviruses as an alternative to the neutralization test tissue culture. *J Clin Microbiol* 1995;33:2927-2930.
- Ehrenkranz NJ, Ventura AK, Cuadrado RR, Pond WL, Porter JE. Pandemic dengue in Caribbean countries and the southern United States--past, present and potential problems. *N Engl J Med.* 1971 Dec 23;285(26):1460-9.
- Fonseca BAL, et al. 1994. Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. *Vaccine.*
- Francki RI; et al. Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol Suppl* 1991;2:223-233.
- Galler R. 1993. Molecular approach to the development of flavivirus vaccines. *J of the Brazilian Assoc Adv Science* 45:263-268.
- Gollins SW, et al. 1984. Flavivirus infection enhancement in macrophages : radioactive and biological studies on the effect of antibody on viral fate. *J Gen Virol* 65 :1261-1272.
- Green S, Kurane I, Pincus S, Paoletti E, Ennis FA. Recognition of dengue virus NS1-NS2a proteins by human CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones. *Virology.* 1997 Aug 4;234(2):383-6.
- Gritsun TS; et al. 1995. Analysis of flavivirus envelope proteins reveals variable domains that reflect their antigenicity and may determine their pathogenesis. *Virus Research* 35:307-321.
- Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue haemorrhagic fever : The emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995;1:55-57.
- Gubler DJ, Suharyono W, Tan R, Abidin M, Sie A. Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bull World Health Organ.* 1981;59(4):623-30.
- Gubler DJ, Trent DW. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infect Agents Dis.* 1993 Dec;2(6):383-93.

- Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, Georgakopoulos K, Catalan J, Ocran S, Soike K, Ratterree M, Monath TP. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol* 2001;75:7290-7304.
- Guirakhoo F, Pugachev K, Arroyo J, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, Georgakopoulos K, Catalan J, Ocran S, Draper K, Monath TP. Viremia and immunogenicity in nonhuman primates of a tetravalent yellow fever-dengue chimeric vaccine: genetic reconstructions, dose adjustment, and antibody responses against wild-type dengue virus isolates. *Virology*. 2002 Jun 20;298(1):146-59.
- Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med* 1970;42:311-328.
- Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypothesis and discussion. *Yale J Biol Med* 1970; 42:350-362.
- Halstead SB, et al. Dengue virus and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 1977; 146 :201-217.
- Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*. 1988 Jan 29;239(4839):476-81.
- Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis*. 1989 May-Jun;11 Suppl 4:S830-9.
- Halstead SB, Deen J. The future of dengue vaccines. *Lancet* 2002;360:1243-1245.
- Halstead SB. Dengue. *Curr Opin Infect Dis*. 2002 Oct;15(5):471-6.
- Halstead SB. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XI. Dengue *Rev Infect Dis* 1984; 6:251-264.
- He RT, Innis BL, Nisalak A, Usawattanakul W, Wang S, Kalayanarooj S, Anderson R. Antibodies that block virus attachment to Vero cells are a major component of the human neutralizing antibody response against dengue virus type 2. *J Med Virol*. 1995 Apr;45(4):451-61.
- Heinz FX, Allison SL. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr Opin Microbiol*. 2001 Aug;4(4):450-5.

- Heinz FX. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Virus Res* 1986; 31:103-186.
- Heinz FX; et al. Antigenic and immunological properties of defined physical forms of thick-borne encephalitis virus structural proteins. *Infect Immunol* 1981; 33:250-257.
- Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 1982;31:830-836.
- Henchal EA, McCown JM, Seguin MC, Gentry MK, Brandt WE. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am J Trop Med Hyg*. 1983 Jan;32(1):164-9.
- Henchal EA; et al. Identification of an antigenic and genetic variant of dengue-4 virus from the Caribbean. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35:393-400.
- Holland JJ, de la Torre JC, Clarke DK, Duarte E. Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J Virol*. 1991 Jun;65(6):2960-7.
- Huang CY, Butrapet S, Tsuchiya KR, Bhamarapavati N, Gubler DJ, Kinney RM. Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. *J virol* 2003;77:11436-11447.
- Hung JJ, Hsieh MT, Young MJ, Kao CL, King CC, Chang W. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol* 2004;78:378-388.
- Huygen K. Plasmid DNA vaccination. *Microbes Infect* 2005;7(5-6):932-938.
- Ilkal MA, Dhanda V, Hassan MM, Mavale M, Mahadev PV, Shetty PS, Guttikar SN, Banerjee K. Entomological investigations during outbreaks of dengue fever in certain villages in Maharashtra state. *Indian J Med Res*. 1991 May;93:174-8.
- Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, Puttisri P, Hoke CH. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg*. 1989 Apr;40(4):418-27.
- Jacobs M, Young P. Dengue vaccines: preparing to roll back dengue. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003 Feb;4(2):168-71.

- Johnson KM, Halstead SB, Cohen SN. Hemorrhagic fevers of Southeast Asia and South America: a comparative appraisal. *Prog Med Virol.* 1967;9:105-58.
- Jürgen K, Torsten S. The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models *Nucleic Acids Research* 2004; 32:D230-D234.
- Kanesa-thasan N, Sun W, Kim-Ahn G, Albert SV, Putnak JR, King A, Raengsakulrach B, Christ-Schmidt H, Gilson K, Zahradnik JM, Vaughn DW, Innis BL, Saluzzo JF, Hoke CH. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Avantis Pasteur) in human volunteers. *Vaccine* 2001;19:3179-3188.
- Kaplan JE; et al. Epidemiologic investigations of dengue infection in México, 1980. *Am J Epidemiol* 1983; 1127:335-343.
- Karabatsos N. International catalog of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. San Antonio, Texas. Am Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1985 ;1147.
- Kerschner JH; et al. Genetic and epidemiological studies of dengue type 2 viruses by hybridization using synthetic deoxyoligonucleotides as probes. *J Gen Virol* 1986;67:2645-2661.
- Khanam S, Etemad B, Khanna N, et al. Induction of neutralizing antibodies specific to dengue virus serotypes 2 and 4 by a bivalent antigen composed of linked envelope domains III of these two serotypes *American Journal Of Tropical Medicine and Hygiene* 2006a; 74 (2): 266-277.
- Khanam S, Khanna N, Swarninathan S. Induction of neutralizing antibodies and T cell responses by dengue virus type 2 envelope domain III encoded by plasmid and adenoviral vectors. *Vaccine* 2006b; 24 (42-43): 6513-6525.
- Khanam S, Rajendra P, Khanna N, et al. An adenovirus prime/plasmid boost strategy for induction of equipotent immune responses to two dengue virus serotypes. *BMC Biotechnology* 2007; 7:10.
- Kinney RM, Huang CY. Development of new vaccines against dengue fever and japanese encephalitis. *Intervirology* 2001;44:176-197.
- Klinman DM, Yi A, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12 and interferon γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2879-2883.

- Ko YC, Chen MJ, Yeh SM. The predisposing and protective factors against dengue virus transmission by mosquito vector. *Am J Epidemiol.* 1992 Jul 15;136(2):214-20.
- Kochel T, Wu SJ, Raviprakash K, Hobart P, Hoffman S, Porter K, Hayes C. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 1997;15:547-552.
- Kochel TJ, Raviprakash K, Hayes CG, Watts DM, Russell KL, Gozalo AS, Phillips I, Ewing DF, Murphy GS, Porter K. A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys. *Vaccine* 2000;18:3166-3173.
- Kofler RM, Aberle JH, Aberle SW, Allison SL, Heinz FX, Mandl CW. Mimicking live flavivirus immunization with a noninfectious RNA vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Feb 17;101(7):1951-6. Epub 2004 Feb 9.
- Konishi E, et al. A highly attenuated host range-restricted vaccinia virus strain, NYVAC, encoding the prM/M, E, and NS1 genes of Japanese encephalitis virus prevents JEV viremia in swine. *Virology* 1992;190 :454-458.
- Konishi E, et al. Mice immunized with a subviral particle containing the Japanese encephalitis virus prM/M and E proteins are protected from lethal JEV infection. *Virology* 1992;188 :714-720.
- Konishi E, Yamaoka M, Kurane I, Mason PW. A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. *Vaccine* 2000;18:1133-1139.
- Konishi E, Kosugi S, Imoto JI. Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice *Vaccine* 2006 24 (12): 2200-2207.
- Kowalczyk DW, Ertl HC. Immune responses to DNA vaccines. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(5):751-770.
- Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods.* 1991 Jun;33(1-2):101-13.
- Kurane I, Ennis FE. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol.* 1992 Apr;4(2):121-7.

- Kurane I, et al. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. En *Viral Pathogenesis*. Neal Nathanson. 1997. Lippincott-Raven Publishers. USA.
- Kurane I, et al. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch Virol* 1994;9 :59-64.
- Kurstak E. Abstracts of the Third World Congress on Vaccines and Immunisation, WCVI 2002, Infections Control World Organization (ICWO), June 4–9, 2002. p. 92.
- Lai C-J, et al. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88 :5139-5143.
- Lan NT, Diem N. Treatment of Dengue shock syndrome with modified fluid gelatin. *International Journal of Intensive Care* 1995; Autumn:76-80.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992 Mar;30(3):545-51.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos de Chacon I, Ramos C, Rico-Hesse R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 1999;73:4738-4747.
- Lewis PJ, Babiuk LA. DNA vaccines: a review. *Adv Res* 1999;94:129–188.
- Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiao AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC, Lin YS. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol.* 2005 Jan 1;174(1):395-403.
- Lin CF, Lei HY, Shiao AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC, Chiu SC, Lin YS. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol.* 2002 Jul 15;169(2):657-64.
- Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae*: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*, Vol 1. Philadelphia Pa, Lippincott Williams & Wilkins 2001: 991-1042.
- Lobigs M, Usha R, Nestorowicz A, Marshall ID, Weir RC, Dalgarno L. Host cell selection of Murray Valley encephalitis virus variants altered at an RGD sequence in the envelope protein and in mouse virulence. *Virology* 1990;176:587-595.

- Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 2002;76:5480-5491.
- Mandl CW, Aberle JH, Aberle SW, Holzmann H, Allison SL, Heinz FX. In vitro-synthesized infectious RNA as an attenuated live vaccine in a flavivirus model. *Nat Med*. 1998 Dec;4(12):1438-40.
- Markoff L, Pang X, Hough HS, Falgout B, Olsen R, Jones E, Polo S. Derivation and characterization of a dengue type 1 host range-restricted mutant virus that is attenuated and highly immunogenic in monkeys. *J Virol*. 2002 Apr;76(7):3318-28.
- Mason PW, et al. Japanese encephalitis virus-vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection. *Virology* 1991;180 :294-305.
- Mason PW. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology*. 1989 Apr;169(2):354-64.
- Men R, Bray M, Clark D, Chanock RM, Lai CJ. Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3'noncoding region of the RNA genome: Analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in Rhesus monkeys. *J Virol* 1996;70:3930-3937.
- Men R, Wyatt L, Tokimatsu I, Arakaki S, Shameem G, Elkins R, Chanock RM, Moss B, Lai CJ. Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type2 challenge. *Vaccine* 2000;18:3113-3122.
- Monath TP, McCarthy K, Bedford P, Johnson CT, Nichols R, Yoksan S, Marchesani R, Knauber M, Wells KH, Arroyo J, Guirakhoo F. Clinical Proof of principle for chimerivaxtm: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. *Vaccine* 2002;20:1004-1018.
- Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994;91:2395-2400.
- Monath TP. Yellow Fever. En: Monath, TP ed. *The arboviruses: epidemiology and ecology*. Vol 5 Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988:139-241.

- Monath TP; et al. Ontogeny of yellow fever 17D vaccine: RNA oligonucleotide fingerprint and monoclonal antibody analyses of vaccine produced world-wide. *J Gen Virol* 1983;4:627-637.
- Monath, T. P. & Heinz, F. X. Flaviviruses. En *Fields Virology*, 3rd edn, p. 961±1034. Editado por B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott±Raven 1996.
- Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*. 2004 Jul 8;430(6996):242-9.
- Morens DM. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis*. 1994 Sep;19(3):500-12.
- Muylaert IR, Galler R, Rice CM. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. *J Virol*. 1997 Jan;71(1):291-8.
- Ngo NT, Cao XT, Kneen R, Wills B, Nguyen VM, Nguyen TQ, Chu VT, Nguyen TT, Simpson JA, Solomon T, White NJ, Farrar J. Acute management of dengue shock syndrome: a randomized double-blind comparison of 4 intravenous fluid regimens in the first hour. *Clin Infect Dis*. 2001 Jan 15;32(2):204-13.
- OPS/OMS 2002. (www.paho.org/common/Display.asp?Lang=S&RecID=4117). Ultimo acceso Mayo, 2007.
- OPS/WHO. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Washington, 1997.
- Phillpotts RJ, et al. Immunisation with DNA polynucleotides protects mice against lethal challenge with St. Louis encephalitis virus. *Arch Virol* 1996;141 :743-749.
- Pletnev AG, Bray M, Huggins J, Lai CJ. Construction and characterization of chimeric tick-borne encephalitis/dengue type 4 viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10532-10536.
- Pletnev AG, et al. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses : Effects of mutations on neurovirulence in mice. *J Virol* 1993;67 :4956-4963.
- Porter KR, Kochel TJ, Wu SJ, Raviprakash K, Phillips I, Hayes CG. Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immuno-stimulatory motifs on antibody responses. *Arch Virol* 1998;143:997-1003.

- Pugachev KV, Guirakhoo F, Trent DW, Monath TP. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. *Int J Parasitol* 2003;33:567-582.
- Putnak R, Barvir DA, Burrous JM, Dubois DR, D'Andrea VM, Hoke CH, Sadoff JC, Eckels KH. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J Infect Dis* 1996;174:1176-1184.
- Puttikhunt C, Kasinrerak W, Srisa-ad S, Duangchinda T, Silakate W, Moonsom S, Sittisombut N, Malasit P. Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. *J Virol Methods* 2003;109:55-61.
- Raviprakash K, Ewing DF, Simmons M, Porter KR, Jones TR, Hayes CG, Stout R, Murphy GS. Needle-free biojector injection of a dengue virus type 1 DNA vaccine with human immunostimulatory sequences and the GM-CSF gene increases immunogenicity and protection from virus challenge in Aotus monkeys. *Virology* 2003;315:345-352.
- Raviprakash K, Marques E, Ewing D, Lu Y, Phillips I, Porter KR, Kochel TJ, August TJ, Hayes CG, Murphy GS. Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. *Virology*. 2001 Nov 10;290(1):74-82.
- Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 1995;375:291-298.
- Reyes-Sandoval A, Ertl HC. DNA vaccines. *Curr Mol Med* 2001;1(2):217-243.
- Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol*. 1989 Dec;1(3):285-96.
- Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990;174:001-0015.
- Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus Jamaica. *Virology* 1998;246:317-328.
- Rosen L. Comments on the epidemiology, pathogenesis and control of dengue. *Med Trop* 1999;59:495-498.

- Rothman AL, Kanesa-thasan N, West K, Janus J, Saluzzo JF, Ennis FA. Induction of T lymphocyte responses to dengue virus by a candidate tetravalent live attenuated dengue virus vaccine. *Vaccine* 2001;19:4694-4699.
- Rothman AL, Kurane I, Lai CJ, Bray M, Falgout B, Men R, Ennis FA. Dengue virus protein recognition by virus-specific murine CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 1993;67:801-806.
- Russell PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona S. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J Immunol.* 1967 [a] Aug;99(2):285-90.
- Russell PK, Nisalak A. Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test. *J Immunol.* 1967 [b] Aug;99(2):291-6.
- Sanchez IJ, Ruiz BH. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol* 1996;77:2541-2545.
- Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol.* 1984 Nov;120(5):653-69.
- Sathish N, Manayani DJ, Shankar V, Abraham M, Nithyanandam G, Sridharan G. Comparison of IgM capture ELISA with a commercial rapid immunochromatographic card test & IgM microwell ELISA for the detection of antibodies to dengue viruses. *Indian J Med Res.* 2002 Feb;115:31-6.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 2003; 31: 3381-3385.
- Seah CL, Chow VT, Tan HC, Can YC. Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers. *J Virol Methods.* 1995 Feb;51(2-3):193-200.
- Seligman SJ, Gould EA. Live flavivirus vaccines: reasons for caution. *Lancet.* 2004 Jun 19;363(9426):2073-5.
- Shapiro D; et al. Change involving a viral membrane glycoprotein during morphogenesis of group B arboviruses. *Virology* 1972;50:906-911.
- Shedlock DJ, Weiner DB. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol* 2000;68(6):793-806.

- Shepard DS, Suaya JA, Halstead SB, Nathan MB, Gubler DJ, Mahoney RT, Wang DN, Meltzer MI. Cost-effectiveness of a pediatric dengue vaccine. *Vaccine*. 2004 Mar 12;22(9-10):1275-80.
- Shroff KE, Smith LR, Baine Y, Higgins TJ. Potential for plasmid DNAs as vaccines for the new millennium. *Pharm Sci Technol Today* 1999; May;2(5):205-212.
- Simmons M, Murphy GS, Hayes CG. Short report: antibody responses of mice immunized with a tetravalent dengue recombinant protein subunit vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:159-161.
- Simmons M, Murphy GS, Kochel T, Raviprakash K, Hayes CG. Characterization of antibody responses to combinations of a dengue-2 DNA and dengue-2 recombinant subunit vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:420-426.
- Simmons M, Nelson WM, Wu SJ, Hayes CG. Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58:655-662.
- Singh,H, Raghava GPS. ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics* 2001; 17(12):1236-37.
- Srivastava AK, Putnak JR, Warren RL, Hoke CH, Mice immunized with a dengue type 2 virus E and NS1 fusion proteins made in *Escherichia coli* are protected against lethal dengue virus infection. *Vaccine* 1995;13:1251-1258.
- Srivastava IK, Liu MA. Gene vaccines. *Ann Intern Med* 2003 ;138(7):550-559.
- Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol*. 1997 Nov;71(11):8475-81.
- Stephenson J. Defective adenoviruses as a novel vaccines for the Flaviviridae. *Clin Diagn Virol* 1998;10:187-194.
- Stephenson JR. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bull World Health Organ*. 2005 Apr;83(4):308-14.
- Stollar V. Studies on the nature of dengue viruses. IV. The structural proteins of type 2 dengue virus. *Virology* 1969;39:426-438.
- Sumiyoshi H, Tignor GH, Shope RE. Characterization of highly attenuated Japanese encephalitis virus generated from molecularly cloned cDNA. *J Infect Dis* 1995;171:1144-1151.

- Sweet BH; et al. Properties and antigenic relationships of hemagglutinins associated with dengue virus. *J Immunol* 1954;73:363-373.
- Tang DC, DeVit M, Johnson SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992;356:152-154.
- Trent DW; et al. 1983. Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology* 128:271-284.
- Trirawatanapong T; et al. Mapping of a region of dengue virus type-2 glycoprotein required for binding by a neutralizing monoclonal antibody. *Gene* 1992;139-150.
- Tsai CJ, Kuo CH, Chen PC, Changcheng CS. Upper gastrointestinal bleeding in dengue fever. *Am J Gastroenterol.* 1991 Jan;86(1):33-5.
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993;259:1745-1749.
- Veza AC; et al. Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1980;29:643-652.
- Vordam V; et al. A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes. *J Virol Methd* 1994;48:237-244.
- Waine GJ, McManus DP. Nucleic acids: vaccines of the future. *Parasitol Today* 1995;11:113-116.
- Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, Weaver SC. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol* 2000;74:3227-3234.
- Watts AM, Kennedy RC. DNA vaccination strategies against infectious diseases. *Int J Parasitol* 1999;29(8):1149-1163.
- Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, Halstead SB. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet.* 1999 Oct 23;354(9188):1431-4.
- Whalen RG. DNA vaccines for emerging infectious diseases: What if ?. *Emer Infect Dis* 1996;2 :168-182.
- Whitehead SS, Falgout B, Hanley KA, Blaney Jr JE Jr, Markoff L, Murphy BR. A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in

- the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. *J Virol*. 2003 Jan;77(2):1653-7.
- Winkler G, et al. Characterization of a disulfide bridge-stabilized antigen domain of tick-borne encephalitis virus structural glycoprotein. *J Gen virol* 1987;68 :2239-2244.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247:1465-1468.
- World Health Organization. Technical guides for diagnosis, treatment, surveillance, prevention and control of dengue haemorrhagic fever. Geneva: World Health Organization, 1975.
- World Health Organization. Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control, 2nd edn. World Health Organization, 1997 [a], Geneva.
- World Health Organization. Manual for the virological investigation of polio. WHO/EPI/GEN/97.01, 1997 [b].
- Yamshchikov VF, Compans RW. Regulation of the late events in flavivirus protein processing and maturation. *Virology*. 1993 Jan;192(1):38-51.
- Zhao B; et al. 1986. Cloning full-length dengue type 4 viral DNA sequences: Analysis of genes coding for structural proteins. *Virology* 155:77-88.

Desarrollo de agentes inmunizantes contra el dengue

Francisco J. López Antuñano¹ y Javier Mota²

RESUMEN El complejo de los cuatro flavivirus del dengue es transmitido principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*. Se han atribuido epidemias a la actividad de *A. albopictus*, *A. polynesiensis* y a varias especies del complejo *A. scutellaris*. Los factores de riesgo que determinan la probabilidad de enfermarse o morir por dengue están relacionados tanto con el huésped (características genéticas, estado inmunitario, forma de vida y condiciones de salud, saneamiento básico de la vivienda y abastecimiento de agua potable) como con el virus (variabilidad genética de cepas entre y dentro de los serotipos, diferente capacidad patógena y distribución geográfica). A pesar de la falta de conocimiento sobre la inmunopatología del dengue, se han hecho importantes avances para conseguir una respuesta inmunitaria protectora con virus atenuados y con antígenos obtenidos por medio de tecnologías recombinantes. Desde los años 40, se ha intentado desarrollar vacunas contra el dengue. La inmunidad que se adquiere por infección natural es específica para cada serotipo y se han documentado infecciones por tres serotipos diferentes en la misma persona, por lo que probablemente sea necesaria una vacuna tetravalente. En voluntarios se han probado vacunas contra los cuatro serotipos que han sido inmunógenas y seguras. Aunque las vacunas con virus atenuados son prometedoras, son necesarios nuevos estudios sobre su eficacia y seguridad. Actualmente están en curso estudios para producir vacunas contra el virus del dengue mediante tecnologías de ADN recombinante y otras técnicas de biología molecular, utilizando como antígenos proteínas estructurales (principalmente la glicoproteína E) y no estructurales. Con el mismo propósito se han usado varios vectores de expresión, como *Escherichia coli*, baculovirus, virus de la vacuna y virus de la fiebre amarilla. Lamentablemente, no se han obtenido resultados satisfactorios en el hombre. La necesidad de desarrollar vacunas eficaces contra el dengue tiene especial importancia si se toma en cuenta la magnitud del problema de la transmisión de los cuatro serotipos en el mundo. La inmunización efectiva contra el dengue contribuirá a su prevención y la relación costo-beneficio será positiva. El hecho de que el dengue endémico afecte a niños de corta edad hace necesaria su inmunización, aprovechando la oportunidad que ofrece el Programa Ampliado de Inmunización.

El dengue, que constituye un grave problema de salud pública en regiones tropicales y subtropicales, es una enfer-

medad infecciosa aguda caracterizada por fiebre bifásica, cefalea, dolor en varias partes del cuerpo, prostración, erupción cutánea, linfadenopatía y leucopenia. En las formas graves o complicadas los pacientes presentan una enfermedad febril caracterizada por alteraciones de la hemostasis e incremento de la permeabilidad vascular que, en algunas ocasiones, puede causar choque hipovolémico. Existen cua-

tro serotipos de virus del dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3, y DEN-4), con numerosas cepas en todo el mundo. En 1998 el dengue era la enfermedad tropical más importante después de la malaria, con un número estimado de 100 millones de casos de dengue "clásico", 500 000 de dengue hemorrágico (DH) y 25 000 muertes por año (1, 2). A pesar de que las estrategias tradicionales de control del principal vector,

¹ Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México. Toda la correspondencia debe ser enviada a: Francisco J. López Antuñano, Dirección postal: Avenida Universidad No. 655, Colonia Santa María Ahuacatitlan, 62508 Cuernavaca, Morelos, México. Correo electrónico: alantu@insp.insp.mx

² Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México.

Aedes aegypti, han mostrado gran eficacia, la organización de programas permanentes sustentados por la participación social para el manejo integrado del ambiente y el control del vector sigue siendo un objetivo importante (3). El desarrollo de vacunas y su empleo combinado con el control del vector de la enfermedad ofrece la posibilidad de prevenir o eliminar las epidemias en el ser humano (4). Además de las consideraciones inmunológicas para obtener la mayor eficacia y seguridad de las vacunas en los seres humanos, para la inmunización universal hay que tener en cuenta la factibilidad industrial, el propósito de las nuevas vacunas y el tiempo deseado de protección, a fin de simplificar los esquemas de inmunización. Se ha otorgado prioridad a la búsqueda de formulaciones de inmunógenos que sean compatibles con estos objetivos y se esperan cambios significativos a corto plazo en los programas de prevención (5).

En la actualidad se dispone de diversos enfoques metodológicos para producir vacunas contra virus: virus vivos atenuados, virus completos inactivados o subunidades víricas, vectores víricos recombinantes, péptidos, proteínas recombinantes y vacunas de ADN. Sin embargo, la eficacia de una vacuna depende en gran medida de la inmunobiología de la infección vírica en cuestión y de la tecnología disponible para el tipo de antígeno seleccionado. En este artículo se presentan los resultados de estrategias recientes, con el objetivo de que el lector en general, y el salubrista en particular, dispongan de información actualizada para juzgar el grado de desarrollo de las vacunas contra el dengue.

LA RESPUESTA INMUNITARIA Y LAS ESTRATEGIAS PARA DESARROLLAR VACUNAS CONTRA EL DENGUE

La búsqueda de solución a los problemas relacionados con las causas y la patogenia del DH se ha analizado desde el punto de vista epidemiológico desde los años 70. Las hipótesis incluyen la mutación o selección del

virus, el efecto sinérgico de infecciones debiles con dos serotipos del virus del dengue o con el virus del dengue y otro agente infeccioso aún no identificado, o infecciones dobles por virus del dengue que ocasionen una recombinación o mezcla fenotípica de virus que origine cepas más virulentas. La sensibilización del huésped humano por infecciones previas puede ser también un factor determinante del síndrome de choque o del DH (6), como se demostró en Cuba, en 1997, durante la segunda epidemia de dengue por el virus DEN-2, genotipo Jamaica. La infección secundaria fue uno de los principales factores de riesgo de DH y se observó la posibilidad de contraer DH tras una infección secundaria 16 a 20 años después de la primoinfección (7). La transmisión de la enfermedad y la frecuencia de las epidemias causadas por múltiples serotipos en Asia han aumentado la circulación de los virus hacia otras regiones, dando por resultado un aumento drástico del dengue epidémico, la hiperendemicidad (co-circulación de varios serotipos) y la emergencia del DH en las islas del Pacífico, del Caribe y en los países de Centroamérica y América del Sur. En menos de 30 años, tanto los países tropicales de América como las islas del Pacífico pasaron de no tener dengue a tener un problema importante de dengue/DH en 1998 (8). La eficacia de una vacuna contra el virus del dengue depende de que la intensidad del estímulo permita obtener un alto nivel de anticuerpos neutralizantes (9), consiga proteger durante largos períodos de tiempo a las personas vacunadas y no represente un riesgo para la salud, ya sea por la producción de viremia o por la inducción de anticuerpos no neutralizantes que potencien infecciones subsecuentes por virus heterólogos (10).

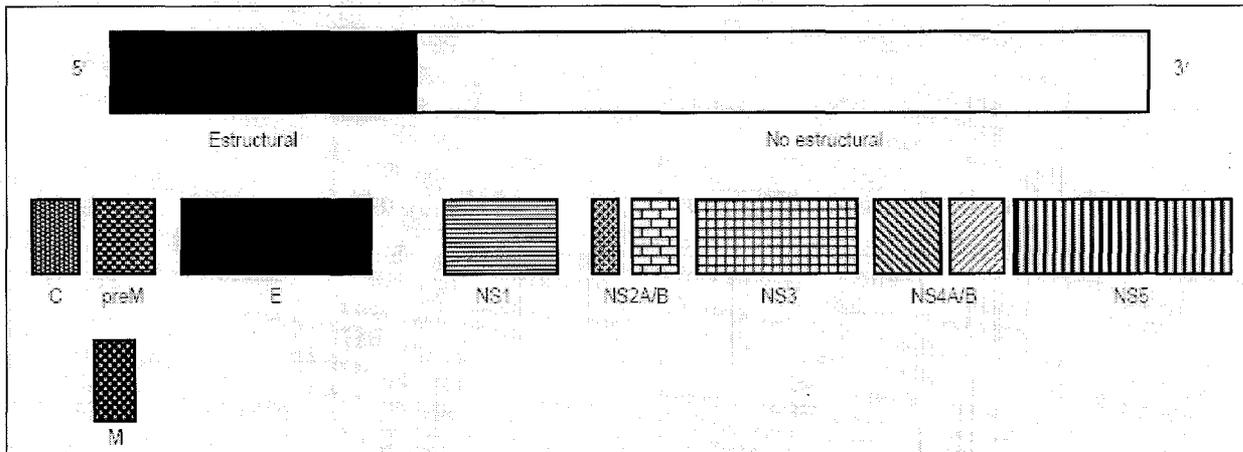
La respuesta inmunitaria celular desempeña un papel crítico en las infecciones víricas en general, y en el dengue en particular, ya que los linfocitos T (LT) son activados por la infección *in vivo*, primero los LT CD4⁺, durante el período de viremia, y después los LT CD8⁺. La activación de los LT *in vivo* puede contribuir a controlar la fase aguda de la infección (11). Para la

producción de vacunas eficaces y seguras contra los virus del dengue es requisito *sine qua non* conocer bien la respuesta inmunitaria *in vivo* en la fase aguda de la infección.

La complicación más grave de la infección, el DH, parece ser mediada inmunológicamente y podría ser desencadenada por los LT citotóxicos específicos para los virus del dengue, junto con las características genéticas del huésped humano (12). También es probable que esos LT citotóxicos específicos sean importantes para la recuperación de la infección. Es indispensable disponer de mayor información sobre la respuesta de los LT citotóxicos con memoria para determinar la diversidad de la respuesta a los virus del dengue y para identificar las proteínas inmunodominantes. Para eso, Mathew et al. (13) usaron leucocitos mononucleares de sangre periférica (LMSP) de voluntarios sanos que habían recibido vacunas monovalentes con virus vivos atenuados de los cuatro serotipos. Los donantes mostraron proliferación de LT específicos para el virus del dengue y para otros flavivirus probados. Se generaron LT citotóxicos a partir de los LMSP estimulados de todos los donantes y en la mayoría de los casos estudiados se demostró actividad de los LT citotóxicos CD8⁺ específica frente al virus del dengue. Aunque no de manera uniforme, los LT citotóxicos CD8⁺ reconocieron las proteínas no estructurales NS3 y NS1.2A y la proteína E (de la envoltura). Todas las células de los donantes reconocieron NS3 o NS1.2A y en un donante que había recibido DEN-4 se encontraron por primera vez LT citotóxicos contra la proteína pre-M (precursora de la membrana) en cultivo policlonal. La respuesta de LT citotóxicos usando LMSP puede ser tanto seroespecífica como de reacción cruzada. En un donante la respuesta de LT citotóxicos específica para las proteínas E, NS1.2A, y NS3 fue restringida por HLA-B44. Para otros tres donantes los potenciales aleles de restricción de la proteína NS3 fueron B38, A24, o B62 y B35.

Estos estudios indican que la respuesta de los LT CD8⁺ citotóxicos humanos tras la inmunización con un serotipo de virus del dengue son diversas

FIGURA 1. Organización genómica del virus del dengue y sus proteínas estructurales y no estructurales



Proteínas estructurales: C – de la cápside; preM – premembrana; M – de la membrana, y E – de la envoltura.
 Proteínas no estructurales: NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B y NS5

y dirigidas contra varias proteínas. Aunque se ha sugerido que se consideren las proteínas C (de la cápside), preM, E, NS3 y NS1.2A para el diseño de subunidades de vacunas contra el dengue, habría que confirmar la presencia de otros inmunógenos igualmente importantes.

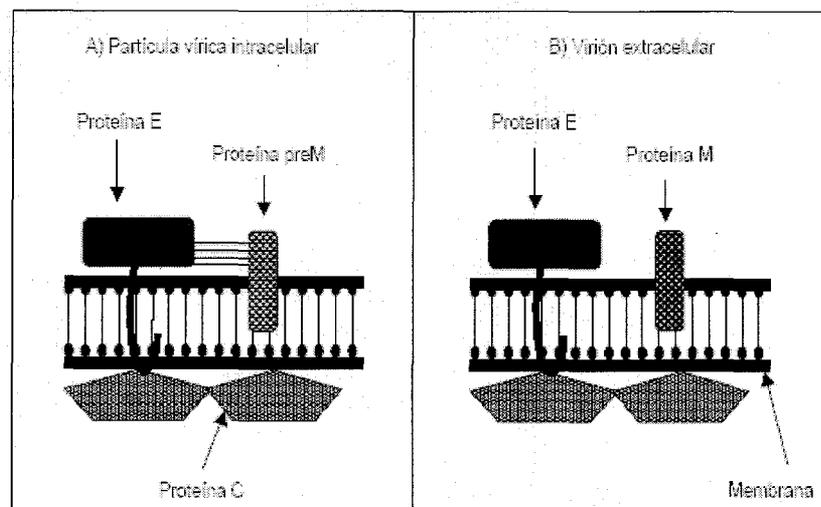
Los avances en las técnicas de biología molecular han permitido caracterizar mejor el genoma del virus del dengue y definir regiones antigénicas en proteínas estructurales (C, preM y E) y no estructurales (por ejemplo: NS3 y NS1.2A) (figuras 1 y 2). En el ser humano, la respuesta inmunitaria contra el virus del dengue es variada y está dirigida frente a diversos epítomos de las proteínas víricas. Estos epítomos, específicos para cada serotipo, pueden utilizarse para el diseño y creación de una vacuna polivalente que proteja contra los cuatro serotipos y garantice su calidad (13).

La proteína E es el componente más abundante de la envoltura del virión y en ella residen las propiedades biológicas más importantes del virus, como la unión al receptor celular o los epítomos que definen el serotipo y el tropismo celular. Los anticuerpos dirigidos contra la proteína E son los primeros en ser detectados en la infección por virus

del dengue y los antígenos de esta proteína son los responsables de la respuesta inmunitaria de más larga duración. Al igual que la proteína E, las proteínas C y M han sido probadas en la inmunización de ratones y son capaces de proporcionarles protección

frente a la exposición a dosis letales de virus del dengue (14). Los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la proteína E pertenecen al isotipo IgG2a. Los anticuerpos no neutralizantes, llamados "facilitadores", pertenecen a otro isotipo aún no identificado.

FIGURA 2. A) Proceso de maduración de las proteínas estructurales del virus dengue dentro de la célula huésped. La proteína preM mantiene estable a la proteína E. B) Desarrollo de la partícula vírica completa, madura e infecciosa. La conformación final del virión extracelular contiene los epítomos antigénicos funcionales



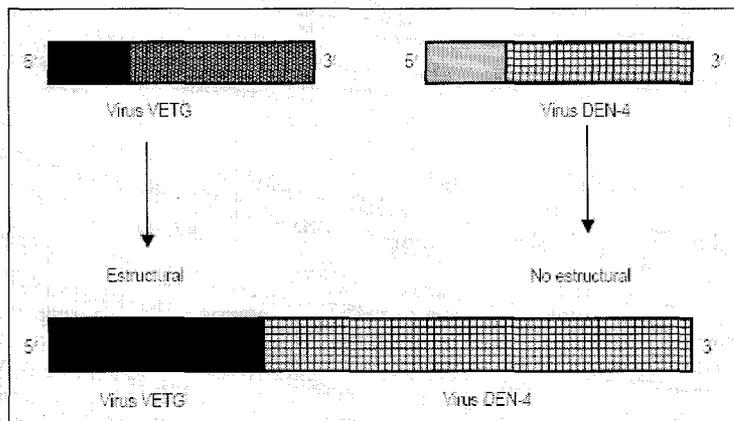
Las proteínas no estructurales, como NS1 y NS3, son capaces de inducir una respuesta inmunitaria protectora en modelos murinos y, como no están asociadas con partículas víricas libres, no existe el riesgo de que la infección sea potenciada por anticuerpos facilitadores. Esta característica las hace buenas candidatas para ser incluidas en el desarrollo de vacunas contra el dengue.

A continuación se hace un resumen de los avances conseguidos en el desarrollo de vacunas contra el dengue con virus atenuados, expresión de antígenos del virus del dengue en levaduras, vacunas con virus inactivados, vacunas recombinantes y vacunas de ADN.

Vacunas con virus atenuados

No es fácil producir una vacuna contra el virus del dengue con virus atenuados. Con la subatenuación, los virus pueden conservar su virulencia y con la sobreatenuación la respuesta inmunitaria es escasa en términos de seroconversión. Existen varios agentes inmunizantes candidatos con virus atenuados derivados de distintas cepas. En un estudio comparativo de la totalidad de las secuencias de nucleótidos de la cepa original West Pac 74 y de sus derivadas 45AZ5 PDK-O, virulenta, y 45AZ5 PDK-27, candidata a vacuna atenuada, Puri et al. (15) sugirieron que los cambios de nucleótidos observados, a pesar de alterar las propiedades biológicas del virus, podrían no ser importantes para la atenuación. En el caso de la cepa atenuada PDK-53, la comparación de la secuencia de aminoácidos con la cepa original DEN-2 16681 mostró cambios a lo largo del genoma. Estos cambios incluyeron C por T en la región 5' no traducida, Asp por Val en preM²⁹, Gly por Asp en NS1⁵³, Leu por Phe en NS2A¹⁸¹, Glu por Val en NS3²⁵⁰ y Gly por Ala en NS4A⁷⁵, además de tres mutaciones silenciosas. En los ensayos *in vitro* se observó que la mutación Glu-Val en NS3²⁵⁰ afecta a la capacidad replicativa del virus, que presenta placas más pequeñas y difusas, e incrementa su sensibilidad a la temperatura, pero estos factores no son

FIGURA 3. Virus quimérico VETG/DEN-4 (virus de la encefalitis transmitida por garrapatas/dengue-4)



determinantes importantes para la atenuación del virus PDK-53 en ratones lactantes (16). Una vacuna con virus atenuados DEN-2 (cepa 16681 PDK 53), administrada por vía subcutánea a dosis de 10^4 unidades formadoras de placa, demostró ser altamente inmunógena, ya que los 10 voluntarios receptores desarrollaron anticuerpos inmunizantes que persistieron dos años (17).

En otro estudio se evaluó en *Macaca fascicularis* la seguridad de la cepa atenuada PGMK 33 (DEN-3), derivada de la cepa 16562 DEN-3, para su uso como vacuna. No se observaron diferencias entre los efectos de los virus originales y los vacunales y se concluyó que ninguno de los dos es neurovirulento para estos mones (18).

Gagnon et al. (19) analizaron la respuesta de los LT CD4⁺ de un donante que había recibido una vacuna experimental con virus DEN-4 vivos atenuados. Los resultados obtenidos indicaron que el paciente presentaba una respuesta de LT CD4⁺ con memoria dirigida frente a la proteína C y sugieren que esta respuesta es dominante no solo *in vitro* a nivel clonal, sino también en la respuesta de los cultivos policlonales. Como estudios anteriores han indicado que la respuesta de los

LT citotóxicos a la infección por virus del dengue pareció estar dirigida particularmente contra las proteínas de la envoltura (E) y la proteína no estructural NS3, estos resultados fueron los primeros en indicar que la proteína de la cápside del virus del dengue también es diana de la respuesta inmunitaria antiviral de los LT.

Otra forma de atenuar la patogenia del virus del dengue consiste en la producción de quimeras, substituyendo secuencias que codifican algún factor virulento por los genes homólogos de un virus que no contenga en su genoma dichas secuencias. Así, por ejemplo, Pletnev y Men (20) produjeron una quimera substituyendo los genes correspondientes del virus DEN-4 por los genes de las proteínas estructurales del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (VETG). La quimera VETG/DEN-4 (figura 3) se utilizó para crear clones infecciosos de ADN con las que se inmunizaron ratones por vía intraperitoneal y se observó que no presentaron ninguna de las características de neurovirulencia asociadas con el VETG. Se han discutido ampliamente las implicaciones de estas observaciones para el desarrollo de una vacuna con virus vivos atenua-

dos quiméricos que contengan genes del virus del dengue.

Chen et al. (21) construyeron una quimera DEN-3/DEN-4 que contiene los genes *C-preM-E* de DEN-3 y expresa especificidad antigénica contra el virus DEN-3 en ratones. Se produjeron dos cambios de aminoácidos Thr-Leu⁴³⁵ y Glu-Lys⁴⁰⁶ en estos virus quiméricos, los cuales son análogos a los cambios que, en ratones, confieren neurovirulencia a DEN-4 y DEN-2 respectivamente. Además, la inoculación intracerebral en el ratón lactante reveló que la mutación Glu-Lys⁴⁰⁶ en la quimera es neurovirulenta, mientras que su contraparte silvestre de DEN-3 no lo es. También se ha empleado ADN complementario de longitud completa de DEN-4 para construir un virus quimérico viable DEN-1 o DEN-2 con antigenicidad específica que contenga las proteínas estructurales *C-preM-E* de DEN-1 o DEN-2, sustituyendo los genes correspondientes de DEN-4 (22). Esos virus quiméricos pueden ser usados para expresar antígenos específicos para cada serotipo en una vacuna tetravalente de virus quiméricos para uso en seres humanos.

Expresión de antígenos de virus del dengue en levaduras

Un abordaje distinto para expresar proteínas estructurales del virus del dengue con el fin de producir partículas pseudovirales (PPV) consiste en utilizar los sistemas de expresión en levaduras. Las ventajas de estos sistemas están relacionadas con la facilidad de producción y la seguridad de los antígenos derivados de levaduras para su uso farmacológico o en vacunas. Fujita et al. (23) demostraron que la proteína E del virus de la encefalitis japonesa expresada en *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes. En el caso del virus del dengue, Sugrue et al. (24) utilizaron *Pichia pastoris* para generar PPV utilizando las proteínas estructurales (*C-preM-E*) de DEN-1. Los resultados de este trabajo demostraron que la expresión de las proteínas estructurales de DEN-1

en *Pichia pastoris* permitió generar PPV similares a los viriones y que las características bioquímicas y biológicas de las proteínas expresadas son similares a las de las proteínas nativas; además se demostró que estas PPV son inmunógenas y capaces de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes.

Vacunas con virus inactivados y vacunas recombinantes

Putnak et al. (25, 26) exploraron la factibilidad de una vacuna purificada e inactivada producida en células Vero. A partir de una cepa candidata para vacuna de DEN-2 se cultivaron los virus, que fueron purificados e inactivados con formalina al 0,05% a 22 °C. En ensayos de inmunización en ratones y *Macaca mulatta* con dosis tan bajas como 0,15 mg (con un refuerzo) y 0,25 mg (con 2 refuerzos), respectivamente, se demostró que las vacunas purificadas e inactivadas son inmunógenas en ambos modelos animales. Se indujeron altos títulos de anticuerpos neutralizantes anti-DEN-2 y, en el caso de los ratones, estos quedaron protegidos completamente al ser expuestos al virus homólogo. En los menos vacunados se eliminó o redujo el período de viremia después de la exposición.

El empleo de subpartículas víricas recombinantes representa otra opción para el desarrollo de vacunas contra el dengue a base de virus vivos inactivados o atenuados. Para establecer la combinación más inmunógena, Fonseca et al. (27) crearon cuatro virus de la vacuna recombinantes que expresaban diferentes porciones del genoma del virus DEN-1 (*C-preM-E-NS1-NS2A-NS2B*; *preM-E*; *preM-E-NS1-NS2A-NS2B*; y *NS1-NS2A*). Los dos virus recombinantes productores de proteínas *preM* y *E* en ausencia de *C* indujeron la síntesis de formas extracelulares de *E in vitro* y cuando se inocularon a ratones indujeron la producción de anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación contra DEN-1. Los otros dos virus de la vacuna recombinantes no produjeron formas extracelulares de *E* ni indu-

jeron respuesta inmunitaria específica. Estos resultados, que demuestran la importancia de la coexpresión de las proteínas *preM* y *E* para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación para su posible uso en una vacuna contra el virus del dengue, apoyan los estudios previos sobre el diseño de vacunas con flavivirus-virus de la vacuna.

Staropoli et al. (14) crearon un baculovirus recombinante que produce la proteína E del virus DEN-2. La proteína recombinante se purificó a partir del sobrenadante de los cultivos de células del insecto *Spodoptera frugiperda* infectadas con el baculovirus recombinante. Los ratones inoculados con la proteína E purificada mezclada con hidróxido de aluminio como adyuvante mostraron una respuesta inmunitaria humoral IgM e IgG (IgG1, IgG2a e IgG2b), con anticuerpos neutralizantes, similar a la obtenida tras la inmunización con virus DEN-2 purificados e inactivados. Los ratones que recibieron la proteína purificada recombinante presentaron buena protección contra 200 dosis letales medias de virus DEN-2. Esta estrategia parece prometedora para la producción de partículas proteínicas inmunógenas, especialmente proteínas de los cuatro serotipos de virus del dengue, y el desarrollo de una nueva generación de vacunas.

Srivastava et al. (28) expresaron en *Escherichia coli* un fragmento de gen que codifica 204 aminoácidos de la región C-terminal de la proteína E y 65 aminoácidos de la porción N-terminal de la proteína no estructural NS1 de DEN-2, como proteína de fusión con proteína A estafilocócica. La proteína recombinante de fusión se purificó y se analizó para evaluar su antigenicidad e inmunogenicidad, así como su capacidad para proteger a los ratones contra la exposición letal a virus DEN-2. La proteína reaccionó con anticuerpos monoclonales y policlonales anti-DEN-2. Los ratones inmunizados produjeron anticuerpos anti-DEN-2 que se demostraron mediante pruebas de inhibición de la hemaglutinación y neutralización, y fueron protegidos

contra la exposición letal a virus DEN-2 inoculado por vía intracraneal.

Es importante conocer el tipo de subclases de inmunoglobulinas que se generan después de la inmunización con vacunas contra el virus del dengue, ya que la inmunización de ratones con virus vivos origina una respuesta predominantemente de IgG2a, que puede ser la más eficaz para resistir exposiciones futuras. Simieny et al. (29) midieron las respuestas específicas de las diferentes subclases de IgG en ratones BALB/c inmunizados con virus vivos o con una proteína E recombinante parcialmente purificada de DEN-2. Las respuestas de las distintas subclases de IgG tras la inmunización con virus vivos presentaron el siguiente orden de magnitud: IgG2a > IgG1 > IgG2b > IgG3, y tras la inmunización con proteína E recombinante, IgG1 > IgG2a > IgG2b > IgG3. Los niveles de casi todas las subclases (excepto IgG1) y los niveles de anticuerpos neutralizantes fueron mayores con los virus vivos que con la proteína E recombinante. Después de purificar las cuatro subclases de IgG por cromatografía, la fracción IgG2a mostró la mayor actividad neutralizante. Los resultados de este trabajo indican que la inmunización con virus vivos y con la proteína E recombinante induce un patrón distinto de subclases de IgG, son compatibles con estudios realizados con otros virus y proteínas víricas y podrían tener implicaciones para el desarrollo de nuevas vacunas eficaces contra el dengue.

El gen que codifica la glicoproteína E de la envoltura del virus DEN-2 se clonó en un baculovirus (virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica*). El virus recombinante contenía el gen entero de la proteína E precedido por 38 nucleótidos de la región C-terminal de preM y seguido por los 83 primeros nucleótidos de la proteína NS1. Cuando se expresó en células de *Spodoptera frugiperda* (Sf 9), se obtuvo aproximadamente 1 mg de antígeno E recombinante por 10^9 células. Este antígeno fue reconocido por anticuerpos policlonales anti-DEN-2 y por anticuerpos monoclonales neutralizantes específicos frente a DEN-2. A pesar de

haberse producido títulos < 10 de anticuerpos neutralizantes de reducción de placa contra virus DEN-2, los ratones BALB/c vacunados se inmunizaron parcialmente y se redujo su morbilidad y mortalidad tras la exposición intracraneana a virus DEN-2 virulentos (30).

Por último, se han utilizado virus de la vacuna recombinantes que contienen proteínas del virus del dengue para evaluar la respuesta de los LT CD4⁺ citotóxicos en donantes inmunizados con prototipos de vacunas. Green et al. (31), demostraron que las clonas de LT CD4⁺ citotóxicos de sangre periférica de un donante inmunizado con una vacuna experimental contra el virus DEN-1 reconocen, específicamente o en reacción cruzada con DEN-3, epítopos de las proteínas NS1 y NS2a. Además, los resultados del análisis de la restricción por el complejo mayor de histocompatibilidad mostraron que las clonas específicas están restringidas por HLA-DRI y las de reacción cruzada por HLA-DPw3. Estos resultados indican que las proteínas NS1 y NS2a, al igual que las proteínas C, E y NS3, contienen epítopos que son reconocidos por LT CD4⁺ específicos contra el virus del dengue y, por lo tanto, deben ser consideradas en el diseño de una vacuna.

Vacunas de ADN

Las vacunas de ADN representan una técnica novedosa que expresa antígenos *in vivo* para estimular la respuesta inmunitaria humoral y celular. Estas vacunas promisorias se han probado en modelos experimentales, principalmente en animales de laboratorio, desde 1993. Esas pruebas han incluido la inmunización contra diversas enfermedades producidas por virus, bacterias y protozoos. En el caso del virus del dengue, Kochel et al. (32) evaluaron la respuesta inmunitaria humoral contra el virus DEN-2 en ratones inmunizados con plásmidos que contienen los genes de preM y de E (2% de la proteína E de DEN-2 (cepa de Nueva Guinea C). Los resultados mostraron que los ratones inmunizados

produjeron anticuerpos capaces de neutralizar el virus *in vitro*. En un segundo estudio, Porter et al. (33) evaluaron la capacidad protectora de esta vacuna de ADN utilizando un modelo de exposición letal intracraneal en ratones. Además, examinaron el efecto inmunestimulante de los motivos CpG presentes en el plásmido pUC19 sobre la respuesta humoral. Los resultados revelaron que los motivos CpG incrementan significativamente la respuesta de anticuerpos a pequeñas dosis (3.1 µg) de la vacuna y que 60% de los ratones coimmunizados con la vacuna y con pUC19 sobrevivieron después de la exposición. Estos estudios ilustran que la inmunización con ADN es un abordaje viable para el desarrollo de una vacuna contra el dengue y que los motivos inmunestimulantes CpG podrían servir para reducir la dosis mínima requerida de vacuna necesaria para producir una respuesta de anticuerpos.

CONCLUSIONES

Sobre la base de los avances actuales en el conocimiento de la patogenia de la infección/enfermedad, deben definirse prioridades y trazarse estrategias para acelerar el desarrollo de agentes inmunizantes seguros, eficaces, estables y accesibles que prevengan la neurovirulencia, el síndrome de choque y las manifestaciones hemorrágicas del dengue y otras flavivirus. En este sentido, las vacunas deben incluir una respuesta inmunitaria que tenga las siguientes características:

- producir anticuerpos citolíticos o no líticos bloqueantes de la replicación del virus,
- activar LT específicos,
- estimular la secreción de citoquinas para suprimir la replicación del virus,
- neutralizar y eliminar los virus extracelulares y las toxinas,
- ayudar a la diferenciación, expansión y maduración de los LT citotóxicos y de los linfocitos B,
- englobar, procesar, fragmentar y presentar péptidos a los receptores respectivos del complejo mayor

de histocompatibilidad (MCH I y MCH II), y

- no inducir LT citotóxicos ni citoquinas de estas células que actúen a favor de la infección por virus del dengue.

La diseminación de los cuatro serotipos del virus del dengue ha aumentado la incidencia notificada de DH. Con 2.5 mil millones de habitantes en riesgo, deben acelerarse los esfuerzos para desarrollar una vacuna segura y eficaz contra el dengue. Pueden aprenderse las lecciones que sobre patogenicidad nos dan los estudios clásicos en el campo y trasladarlos al contexto actual del conocimiento de la epidemiología molecular del virus del dengue. El diseño de vacunas con subunidades o con virus completos llama particularmente la atención sobre el fenómeno de la potenciación dependiente de anticuerpos y, en general, de la inmunopotenciación de la enfermedad. Deben hacerse mayores esfuerzos para comprender las bases de la patogenicidad del DH, a fin de diseminar el conocimiento sobre la protección contra la infección por el virus del dengue y sobre la recuperación de la enfermedad producida por el mismo (34).

Para obtener la vacuna contra el dengue es necesario identificar antígenos que produzcan inmunidad protectora para toda la vida y contra los cuatro serotipos del virus. Deben con-

siderarse las diferentes estrategias, desde la atenuación convencional del virus hasta las vacunas de segunda generación (immunización con proteínas) y tercera generación (immunización con ADN), las proteínas estructurales de envoltura y de membrana y las proteínas no estructurales NS1 y NS3. A pesar de los avances realizados, aún se necesita información sobre la pureza, estabilidad, seguridad, presentación, vía de administración y proceso de producción, control y garantía de la calidad, antes de disponer de un producto final eficaz durante la primera década de este siglo (35).

Las estrategias actuales para la inmunización contra el dengue favorecen el uso de vacunas que contengan antígenos inmunodominantes contra los cuatro serotipos. El reto consiste en usar proteínas estructurales, no estructurales o ambas, expresadas mediante la tecnología de proteínas recombinantes.

Se han probado en voluntarios posibles vacunas contra los cuatro serotipos que han sido inmunógenas y seguras. Aunque las vacunas con virus atenuados son prometedoras, son necesarios nuevos estudios sobre su eficacia y seguridad. Lamentablemente, todavía no se han obtenido resultados satisfactorios en el ser humano.

Las vacunas con ADN pueden inducir intensas respuestas humorales y celulares sin adyuvante adicional. Estu-

dios recientes indican que los dinucleótidos no metilados CpG (motivos) incorporados a las vacunas de ADN estimulan la respuesta inmunitaria y ejercen una actividad adyuvante endógena esencial. Estos motivos CpG pueden agregarse deliberadamente al ADN junto con el antígeno que se quiere expresar para potenciar la respuesta inmunitaria Th1 (36, 37).

Es necesario fomentar la vigilancia epidemiológica de la enfermedad, incluido el establecimiento de una red de laboratorios de diagnóstico y centros de referencia, a fin de caracterizar la circulación del virus. Durante las epidemias de dengue pueden aparecer mutantes antigénicos. Aunque estos mutantes no reflejen un aumento de la virulencia, podría ser útil conocerlos para seleccionar las cepas más adecuadas para la elaboración de la mejor vacuna en la Región. La necesidad de desarrollar vacunas eficaces contra el dengue tiene especial importancia si se toma en cuenta la magnitud del problema de la circulación de los cuatro serotipos en el mundo. Una vacuna eficaz contra el dengue contribuirá a su prevención y control y la relación costo-beneficio será positiva. El hecho de que el dengue endémico afecte a niños de corta edad subraya la necesidad de inmunizarlos, aprovechando la oportunidad que ofrece el Programa Ampliado de Inmunización.

REFERENCIAS

1. Henchal EA, Putnak IR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:376-396.
2. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:486-496.
3. López Arriano E. Epidemiology and control of malaria and other arthropod borne diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992;87(Supl 3):105-114.
4. Shope RE. Concepts of control of Japanese encephalitis and dengue. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997;28(Supl 2):131-134.
5. Lambert PH. Les vaccins de l'an 2000. *Bull Soc Pathol Exot* 1997;90:233.
6. Hammon WM. Dengue hemorrhagic fever: Do we know its cause? *Am J Trop Med Hyg* 1973; 22:82-91.
7. Vakkés L, Guzmán MG, Kouri G, Delgado J, Carbonell I, Cabrera MV, et al. La epidemiología del dengue y del dengue hemorrágico en Santiago de Cuba, 1997. *Rev Panam Salud Publica* 1999;6:16-25.
8. Gubler DJ. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1998;4:442-450.
9. Ellis RW. The new generation of recombinant viral subunit vaccines. *Curr Opin Biotechnol* 1996;7:646-652.
10. Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 1977;146:201-217.
11. Kurane I, Irimis BL, Hoke CH Jr, Eckels KH, Meager A, Janus J, et al. T cell activation in vivo by dengue virus infection. *J Clin Lab Immunol* 1995;46:35-40.
12. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988; 239(4829):476-81.
13. Mathew A, Kurane I, Rothman AL, Zeng LL, Brinton MA, Ennis FA. Dominant recognition by human CD8+ cytotoxic T lymphocytes of dengue virus nonstructural proteins NS3 and NS1.2a. *J Clin Invest* 1996;98:1684-1691.
14. Staropoli J, Frenkel MF, Megret F, Deubel V. Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. *Vaccine* 1997;15:1946-1954.
15. Pari B, Nelson WM, Henchal EA, Hoke CH, Eckels KH, Dubois DR, et al. Molecular analysis of dengue virus attenuation after serial passage in primary dog kidney cells. *J Gen Virol* 1997;78:2287-2291.
16. Kinney RM, Putrapet S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapravati N, et al. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenu-

- ated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology* 1997;236:390-398.
17. Vaughn DW, Heke CH Jr, Yoksan S, LaChance R, Innis BL, Rice RM, et al. Testing of a dengue 2 live-attenuated vaccine (strain 16681 PDK 53) in ten American volunteers. *Vaccine* 1996;14:329-336.
 18. Angsubhakorn S, Yoksan S, Prademsrwoong A, Nitapattana N, Sahaphong S, Bhanarapavati N. Dengue-3 (16562) PGMK 33 vaccine: neurovirulence, viremia and immune responses in Macaca fascicularis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1994;25:554-559.
 19. Cagnon SJ, Zeng W, Kurane I, Ennis FA. Identification of two epitopes on the dengue 4 virus capsid protein recognized by a serotype-specific and a panel of serotype-cross-reactive human CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol* 1996;70:141-147.
 20. Pletnev AG, Men R. Attenuation of the Langkat tick-borne flavivirus by chimerization with mosquito-borne flavivirus dengue type 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1746-1751.
 21. Chen W, Kawano H, Men R, Clark D, Lai CJ. Construction of intertypic chimeric dengue viruses exhibiting type 3 antigenicity and neurovirulence for mice. *J Virol* 1995;69:5189-5196.
 22. Bray M, Men R, Lai CJ. Monkeys immunized with intertypic chimeric dengue viruses are protected against wild-type virus challenge. *J Virol* 1996;70:4162-4166.
 23. Fujita H, Sumiyoshi H, Mori C, Marabe S, Takagi M, Yoshida I, et al. Studies in the development of Japanese encephalitis vaccine: expression of virus envelope glycoprotein E (E) gene in yeast. *Bull World Health Organ* 1987;65:303-308.
 24. Sugrue RJ, Fu J, Howe J, Chan Y-C. Expression of the dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. *J General Virol* 1997;78:1861-1866.
 25. Putnak R, Barvir DA, Burrous JM, Dubois DR, D'Andrea VM, Hoke CH, et al. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J Infect Dis* 1996;174:1176-1184.
 26. Putnak R, Cassidy K, Conforti N, Lee R, Solazzo D, Truong T, et al. Immunogenic and protective response in mice immunized with a purified, inactivated dengue-2 virus vaccine prototype made in fetal rhesus lung cells. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55:504-510.
 27. Fonseca EA, Pincus S, Shope RE, Paoletti E, Mason PW. Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 1994;12:279-285.
 28. Srivastava AK, Putnak JR, Warren RL, Hoke CH Jr. Mice immunized with a dengue type 2 virus E and NS1 fusion protein made in *Escherichia coli* are protected against lethal dengue virus infection. *Vaccine* 1995;13:1251-1258.
 29. Smutycki JJ, Kelly EP, McCarthy PO, King AD. Murine immunoglobulin G subclass responses following immunization with live dengue virus or a recombinant dengue envelope protein. *Am J Trop Med Hyg* 1995;53:432-437.
 30. Feighny R, Burrous J, Putnak R. Dengue type-2 virus envelope protein made using recombinant baculovirus protects mice against virus challenge. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50:322-328.
 31. Green S, Kurane I, Pincus S, Paoletti E, Ennis FA. Recognition of dengue virus NS1-NS2a proteins by human CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones. *Virology* 1997;234:383-386.
 32. Kochel T, Wu S-J, Raviprakash K, Hobart P, Hoffman S, Porter K, et al. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 1997;15:547-552.
 33. Porter KE, Kochel TJ, Wu SJ, Raviprakash K, Phillips I, Hayes CG. Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immunostimulatory motifs on antibody responses. *Arch Virol* 1998;143:997-1003.
 34. Cardoso MJ. Dengue vaccine design: issues and challenges. *Br Med Bull* 1998;54:395-405.
 35. Guzman MG. Avances en el desarrollo de una vacuna contra dengue. *Acta Cient Venez* 1998;49(Supl 1):39-45.
 36. Krieg AM, YlAK, Schorr J, Davis HL. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trend Microbiol* 1998;6:23-27.
 37. Krieg AM. CpG DNA: a novel immunomodulator. *Trend Microbiol* 1999;7:64-65.

Manuscrito recibido el 2 de noviembre de 1999 y aceptado para publicación, tras revisión, el 3 de abril de 2000.

ABSTRACT

Development of immunizing agents against dengue

The four serotypes of dengue flaviviruses are transmitted mainly by the *Aedes aegypti* mosquito, and some epidemics have been attributed to *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis*, and various species of the *Ae. scutellaris* complex. The risk factors involved in dengue mortality and morbidity are related to the human host (genetic characteristics of infected persons; lifestyles, immune status, and health conditions of people; basic sanitation of dwellings; and water supply) and to the virus (genetic variability between and among serotypes, different pathogenicities, and geographic distribution). Notwithstanding the lack of knowledge of the immunopathobiology of dengue fever, important advances have been made in terms of a protective immune response, using attenuated dengue viruses or antigens produced by means of recombinant technologies. Efforts have been made since the 1940s to develop dengue vaccines. Immunity acquired from natural infection is specific for each serotype, and as many as three different serotype infections have been reported in one individual. For this reason, a tetravalent vaccine may likely be needed. Candidate vaccines against the four serotypes have been tested in volunteers and have proven to be immunogenic and safe. Although attenuated live virus vaccines are promising, more study is needed regarding their effectiveness and safety. Currently, several studies are ongoing to develop dengue vaccines using antigens from structural proteins (particularly E glycoprotein) and nonstructural proteins, with recombinant DNA technology and other biomolecular technologies. With the same goal, various expression systems are being used, including *Escherichia coli*, baculovirus, vaccinia virus, and yellow fever virus. Unfortunately, no satisfactory results have been obtained in humans. The need for effective dengue vaccines is great, given the serious worldwide problem of the transmission of the four serotypes. Effective immunization against dengue would contribute to its prevention, with a positive cost-benefit relationship. Endemic dengue affects young children, and they should be immunized through the Expanded Program on Immunization.



Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein

Javier Mota*, Maribel Acosta, Rocio Argotte, Raymunda Figueroa,
Armando Méndez, Celso Ramos*

*Departamento de Arbovirus, Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública,
Av. Universidad No. 855, Col. Santa Mañá Ahuacatitlán, CP 62508 Cuernavaca Morelos, México*

Received 4 June 2004; received in revised form 20 December 2004; accepted 21 December 2004
Available online 23 February 2005

Abstract

Dengue fever is a growing public health concern around the world and despite vaccine development efforts, there are currently no effective dengue vaccines. In the present study we report the induction of protective antibodies against dengue virus by DNA immunization with domain III (DIII) region of the envelope protein (E) in a mouse model. The DIII region of all four dengue virus serotypes were cloned separately into pcDNA 3 plasmid. Protein expression was tested in COS-7 cells. Each plasmid, or a tetravalent combination, were used to immunize BALB/c mice by intramuscular route. Presence of specific antibodies was evaluated by ELISA, and neutralizing antibodies were tested using a cytopathogenic effect (CPE) inhibition assay in BHK-21 cells, as well as in newborn mice challenged intracranially with dengue 2 virus. Mice immunized with individual DIII constructs or the tetravalent formulation developed antibodies against each corresponding dengue serotype. Antibody titers by ELISA were similar for all serotypes and no significant differences were observed when boosters were administered, although antibody responses were dose-dependent. CPE inhibition assays using Den-2 virus showed neutralization titers of 1:10 in mice immunized with individual DIII plasmid or those immunized with the tetravalent formulations. 43% of newborn mice challenged with Den-2 in combination with sera from mice immunized with Den-2 DIII plasmid were protected, whereas sera from mice immunized with the tetravalent formulation conferred 87% protection. Our results suggest that DIII can be used as a tetravalent DNA formulation to induce neutralizing and protective antibodies against dengue virus.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Dengue; DNA immunization; Domain III

1. Introduction

Dengue fever (DF) is a worldwide public health problem; it has been estimated that millions of cases occur annually and that most people living in endemic areas are at risk [1,2]. The etiologic agent of DF is dengue virus (DV) which includes four antigenically different serotypes, Den-1 to Den-4 [3] and it is transmitted to humans via mosquitoes (*Aedes* spp.) [1]. DV is responsible for the most important viral vector-borne disease in the world [4], with increasing cases of classical DF and the more severe manifestations,

dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). Control strategies for dengue transmission are based principally on the vectors [1–4]. No vaccines or drugs are available for DV, despite the development of successful vaccines for other related flaviviruses such as yellow fever (YF), Japanese encephalitis (JE), and tick-borne encephalitis (TBE) [5–10]. Several approaches to develop a dengue or flavivirus vaccine have been evaluated, including live attenuated viruses [11–16], chimeric viruses [17–19], recombinant subunit antigens, expression vector-based vaccines [20–25], and DNA vaccines [26–31,58]. Due to the risk of developing DHF/DSS in those dengue-infected individuals who have high titers of cross-reactive antibodies as a result of a previous heterologous dengue infection (antibody-dependent enhancement or ADE) [32], an effective vaccine must

* Corresponding authors. Tel.: +52 777 161 2907; fax: +52 777 317 3485.
E-mail addresses: jmota@insp.mx (J. Mota), cramos@insp.mx (C. Ramos).

be capable of inducing protective immunity to all four serotypes. DV is a positive-sense RNA virus that belongs to the *Flavivirus* genus of the *Flaviviridae* family. The viral genome codes for three structural proteins present in mature virions: a core nucleocapsid protein (C), the transmembrane protein (M), and the major envelope glycoprotein (E) [33]. Crystallographic studies of E protein from DV and other flaviviruses have revealed that it contains three domains (I–III) [34,35]. Domain III (DIII) is coded from the C-terminal region of the protein, has a IgG-like fold and participates in most of the relevant biological events, such as, virulence and/or neurovirulence which determinants are in DIII [36–41]. DIII of dengue virus is implicated in the emergence of urban epidemics, six of the eight amino acid changes that accompanied virus endemic emergence of dengue cases are within DIII [42]. DIII is also involved in binding host receptors [43,44] and it contains type and subtype-specific epitopes that elicit only neutralizing antibodies [45]. In the present study we used DIII as antigen in a tetravalent DNA-based immunization to induce protective immune responses against dengue virus in mice. Even though DIII represents only a fraction of the E protein, the absence of other epitopes which elicit non-neutralizing, cross-reactive antibodies could have advantages in reducing risk for developing ADE.

2. Material and methods

2.1. Viruses

Prototype dengue viruses, Den-1, Den-2, Den-3, and Den-4 (Hawaii strain, New Guinea C strain, H87 strain, and H241 strain, respectively) were amplified and maintained in Vero cell cultures at 37 °C in a humidified incubator using 5% CO₂ Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and an antibiotic–antimycotic cocktail (Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA). Cell monolayers of 25 and 75 cm² culture flasks (Corning Corp., Texas, USA) were infected (MOI=0.01–0.1 PFU/cell) with the above viral strains; virus serotype was confirmed by using an indirect immunofluorescent assay [46] with monoclonal antibodies (mAbs) D2-1F1-3 for Den-1, 3H5 for Den-2, D6-8A1-12 for Den-3 and 1H10 for Den-4. Prototype viruses and mAbs were kindly donated by Dr. D. Gubler (Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins Co., USA). Harvested cell culture supernatants were used as viral stocks for RNA extracts. Dengue virus was also concentrated and purified using sucrose gradients for ELISA assays as described previously [47].

2.2. Oligonucleotide design

Primers to amplify DIII of the envelope protein gene of each dengue virus were designed using the Oligo 4.0 computer software (National Biosciences, Plymouth, MN, USA), based on the published nucleotide sequences of proto-

type viruses: Den-1 Hawaii strain (GenBank: X76219), Den-2 New Guinea C strain (GenBank: M29095 and P14340), Den-3 H-87 strain (GenBank: M93130 and L11423) and Den-4 H-241 strain (GenBank: S66064). Sequences for restriction enzymes, Kozak sequences and initial ATG site were included upstream of the DIII sequence. Primer sequences for Den-1 were designed as: D1domIII-up (5'-CCC GGG GGC GGC CGC GCC ATG GCG CTG ACC CTG AAA GGT ATG TCC-3', the underlined sequence is the *Nor*I site) and D1domIII-dw (5'-GGC CCC CTC GAG TTT GAA CCA GGA CAG TTT-3', the underlined sequence is the *Xba*I site); for Den-2, D2domIII-up (5'-CCG GGG GGA TCC GCC ATG GCG CTA CAG CTC AAA GGA ATG TCA TAC TCT-3', the underlined sequence is the *Bam*HI site) and D2domIII-dw (5'-GGC CCC GAA TTC CTT AAA CCA GTT GAG CTT CAA-3', the underlined sequence is the *Eco*R I site); for Den-3, D3domIII-up (5'-CCG GGG GAA TTC GCC ATG GCG CTG AAA CTG AAA GGT ATG TCC-3', the underlined sequence is the *Eco*R I site) and D3domIII-dw (5'-GGC CCC GAT ATC ACG GTA CCA GTT GAT TTT-3', the underlined sequence is the *Eco*R V site); and for Den-4, D4domIII-up (5'-CCG GGG AAG CTT GCC ATG GCG TTG AGA ATT AAG GGA ATG TCA-3', the underlined sequence is the *Hind* III site) and D4domIII-dw (5'-CCC CGG GGT ACC CCT GAA CCA ATG GAG TGT TAA-3', the underlined sequence is the *Kpn*I site). All primers amplified a 330 bp fragment encompassing DIII of each dengue virus serotype.

2.3. RT-PCR and PCR assays

For reverse transcriptase (RT) assays, total RNA from infected cells with Den-1 and Den-3 viruses were extracted with guanidine thiocyanate and phenol–chloroform as previously described [48]. The RNA was resuspended in distilled water and RT reaction was carried out at 37 °C for 1 h in a reaction mixture (10 µl) containing 5 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 100 mM Tris–HCl, pH 8.3, 1 U/µl of RNase inhibitor, 2.5 U/µl of MuLV reverse transcriptase, 400 µM of nucleotides (Perkin-Elmer, Norwalk, CT), and 1.2 µM of the reverse primer. One microliter of RT reaction mixture or 10 ng of plasmid DNA (see below) was used for cDNA amplification by the polymerase chain reaction (PCR). The PCR mixture reaction (100 µl) contained 500 mM KCl, 100 mM Tris–HCl pH 8.4, 200 µM of nucleotides, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U DNA polymerase (Amplitaq; Perkin-Elmer) and 0.5 µM of forward and reverse primers. PCR was performed by an initial DNA denaturing step at 94 °C followed by 35 cycles of denaturation (94 °C, 30 seg), annealing (54–58 °C, 30 seg), and extension (72 °C, 30 seg), and a final extension step at 72 °C, for 10 min.

2.4. Plasmid constructs

To facilitate cloning into the vector polylinker, restriction sites were inserted into the primer sequences, as described above. The amplified DIII region of the envelope

protein gene of each dengue serotype was cloned into the pcDNA 3 vector (Invitrogen), where their expression is under control of the cytomegalovirus (CMV) promoter. DIII sequences for Den-1 virus (nt 1794–2096) and Den-3 virus (nt 1892–2107) were amplified by RT-PCR from infected cell cultures with prototype viruses. Den-2 (nt 1801–2108) and Den-4 (nt 1812–2114) were amplified by PCR using plasmids pKT2.4 and P5'-2, respectively. Plasmid pKT2.4 contains the nucleotide sequence for structural proteins of Den-2 (New Guinea C strain) and was kindly donated by Dr. R. Padmanabhan (Georgetown University, Washington, DC, USA). Plasmid P5'-2 encodes nucleotide sequence of the envelope protein gene of Den-4, and was kindly donated by Dr. C. J. Lai (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, Maryland, USA). All amplified products were purified, digested with appropriate restriction enzymes, and ligated into vectors using standard methods. The constructs, designated pDIII-D1, pDIII-D2, pDIII-D3 and pDIII-D4 were amplified in electroporated *Escherichia coli* DH5 α cells (Invitrogen), purified with the Qiagen endofree plasmid purification kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA), resuspended in an adequate volume of phosphate buffered saline (PBS), and stored at -20°C until used.

2.5. Cell transfection and Immunofluorescence assay (IFA)

To evaluate the expression of DIII in all constructions, COS-7 (African green monkey kidney) cells were transfected by separate with all four plasmids or with an empty vector, using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10% FBS without antibiotic at $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$. One day before transfection, cultured cells were trypsinized and plated at a density of 1×10^5 cells/well on 24-well plates, so that they were 80–90% confluent on the day of transfection. For each construct, 1 μg of DNA was used, and transfection was performed according to manufacturer's instructions. At 48 h post-transfection, cells were analyzed by IFA with monoclonal antibodies as described previously [46]. Briefly, cells were washed twice with PBS, air dried, fixed with ice-cold acetone, and incubated with a 1:100 dilution of monoclonal antibodies for 1 h at 37°C . Positive cells were detected with fluorescein-conjugated goat IgG anti-mouse IgG under epillumination with a fluorescent microscope.

2.6. DNA injection and antibody detection

Groups of six-week-old female BALB/c mice (six to seven mice/group) were inoculated with 100 μg of one of the purified DIII constructs diluted in 100 μl of PBS, or with a tetravalent mixture using 25, 50 or 100 μg of each DIII plasmid (constructions T25, T50 and T100, respectively), corresponding to a total of 100, 200 and 400 μg of injected DNA; the control group was inoculated with 100 μg of empty vector or with the highest plasmid concentration for tetravalent

group (100, 200 and 400 μg , respectively). Injections were given intramuscularly (i.m.) in the anterior limb muscle using an insulin syringe. Mice were injected on day 0 and boosted on days 15 and 30. On each of these days (0, 15, 30) and two weeks after the last boost, a blood sample from each mouse was collected from the central tail vein or by cardiac puncture, and sera were obtained by centrifugation of coagulated blood samples and stored at -70°C until used. Sera were tested for anti-dengue antibodies by ELISA as described previously [49]. Briefly, dengue antigens purified by sucrose gradient, diluted in PBS (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were coated onto 96-well microplates at 4°C overnight; after three washes with PBS–0.05% Tween 20 (PBS–T), plates were blocked with 1% BSA in PBS–T for 2 h at 37°C . Diluted sera (1:100 in PBS) from mice immunized with plasmid constructs or with empty vector (pcDNA 3) were tested in duplicate, and incubated for 1 h at 37°C . Peroxidase-conjugated goat IgG anti-mouse IgG, diluted 1:5000 in PBS–T, was used as second step and incubated for 1 h at 37°C . After three washes with PBS–T, 50 μl of OPD substrate (*o*-phenylenediamine H_2O_2 in 0.05 M citrate buffer pH 5) was added and the color reaction was allowed to develop for 30 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 50 μl of 1 M H_2SO_4 . All serum samples were assayed individually against all four dengue antigens and results are plotted as the mean OD for each group of mice inoculated with the respective plasmid construction plus a standard deviation.

2.7. Protection assay in BHK cells and suckling mice

Sera from mice immunized with individual plasmid constructs or with the tetravalent plasmid dose combination were assayed for neutralizing antibodies against Den-2 virus using cell culture and a mouse protection assay. To assess the presence of neutralizing antibodies in cell culture, a modified inhibition of cytopathogenic effect (CPE) assay described previously for polio virus [50,51] was performed on BHK-21 (Baby Hamster Kidney) cells. Briefly, cells were grown and maintained in 75 cm^2 culture flasks in MEM medium with 4% of FBS and antibiotic at $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$, cells were trypsinized and transferred to 96-well plates at a density of 1×10^4 cells per well. Two weeks after the last boost, serum samples (collected as described above) were pooled and used, without heat inactivation, to prepare two-fold serial dilutions starting at 1:5. Diluted sera were mixed 1:1 with Den-2 suspension containing 100 CID_{50} (50% cell infectious doses) and incubated for 1 h at 37°C . The serum–virus solution was added to cells, incubated at $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$, and observed daily under a light microscopy to evaluate CPE. The end point was evaluated when CPE occurred in 100% of infected control cells, usually at day 4. Plates were then photographed, cells were washed with PBS, and fixed with 10% formaldehyde for 20 min. The cells were washed once again with PBS and stained with 0.2% of crystal violet for 10 min. The proportion of cells presenting CPE was estimated using both unstained and stained well-plate photographs. Neutralization titers were

expressed as the maximum serum dilution that inhibits 50% of CPE.

Mouse protection assays were done using newborn BALB/c mice: 100 LD₅₀ (50% mouse lethal doses) of Den-2 New Guinea C strain was prepared from infected suckling mouse brain suspensions and mixed 1:1 with undiluted pooled sera (prepared as described above) from mice immunized with DIII plasmid constructs (single or tetravalent combinations). The virus–serum mixture was incubated for 1 h at 37 °C and inoculated intracranially (IC) into mice. Mouse groups were observed daily and mortality was recorded.

2.8. Statistical analysis

Data obtained from ELISA experiments were analyzed using a *t*-test to evaluate significance of antibody titers. For the mouse challenge experiments, protection significance was evaluated using Fisher's exact test. All statistical analyses were performed using SPSS version 10.0 statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. *In vitro* analysis of plasmid constructs

All DIII plasmids (pDIII-D1, pDIII-D2, pDIII-D3 and pDIII-D4) were correctly expressed in transfected cells, as evidenced by epitope recognition with serotype-specific mAbs. Approximately 70–90% of cells were transfected, and a strong fluorescent signal was observed in all transfected cells. A representative experiment is shown in Fig. 1, in which cells were transfected with pDIII-D2 construct and after 48 h post-transfection, Den-2 antigen was detected with mAb 3H5. Control experiments with COS-7 cells transfected with empty plasmid were negative (data not shown).

3.2. Antibody response against dengue virus

Immunization of mice with each individual plasmid induced an antibody response specific for each serotype of dengue virus that corresponded to the DIII-plasmid initially used to immunize mice (Fig. 2), specificity of antibody responses induced by each DIII plasmid against all four dengue antigens was evaluated by a *t*-test, in all cases, antibody responses were statistically significant ($p < 0.0001$). IgG antibody responses were similar for all serotypes and no significant differences in specific dengue antibody responses were observed following boosters. Antibody responses were also evaluated in mice immunized with tetravalent combinations T25, T50 and T100 of DIII-plasmids that correspond to the use of 25, 50 or 100 µg of each plasmid in the tetravalent formulation. Results showed that all mice immunized with tetravalent combinations developed antibodies against all dengue serotypes (Fig. 3); induced level of antibodies by each tetravalent formulations when

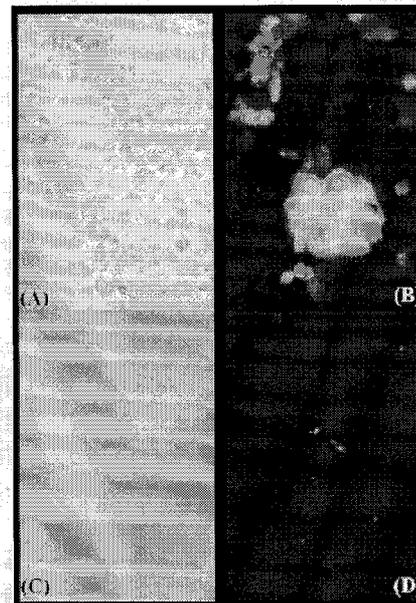


Fig. 1. Domain III is expressed in transfected cells. Binding of 3H5 Mab to pDIII-D2 transfected COS-7 cells (B); transfected cells with empty vector as negative control (D). Corresponding light microscope images A (for B) and C (for D), magnification at 40 \times .

compared with respective control groups were, in all cases, statistically significant ($p < 0.0001$); higher responses were obtained when 100 µg of each plasmid (T100) were used. There were no significant differences in antibody titers following booster administration, although, the magnitude of the immune response was dose-dependent (Fig. 3).

3.3. Cell and mouse protection assays

Two weeks after the last boost, sera from mice immunized with pDIII-D2 plasmid or with the tetravalent combination were used to assess the presence of neutralizing and/or protective antibodies. CPE inhibition assays in BHK-21 cells showed neutralization titers of 1:5 for sera from mice immunized with T25, whereas sera from mice immunized with 100 µg of pDIII-D2 or with T50 and T100 had titers of 1:10. In the mouse challenge assay, sera from mice immunized with 100 µg of pDIII-D2 plasmid confers 43% protection, while sera from mice immunized with the T50 formulation protected 50% of challenged mice. The highest protection (87%), was observed when serum samples of mice immunized with the tetravalent formulation T100 were used (Fig. 4). The level of protection in the T100 group was statistically significant ($p = 0.016$) when compared with control group (pcDNA3); whereas protection levels of T100 group compared with T50 and pDIII-D2 groups was not significant ($p = 0.280$ and 0.217 , respectively).

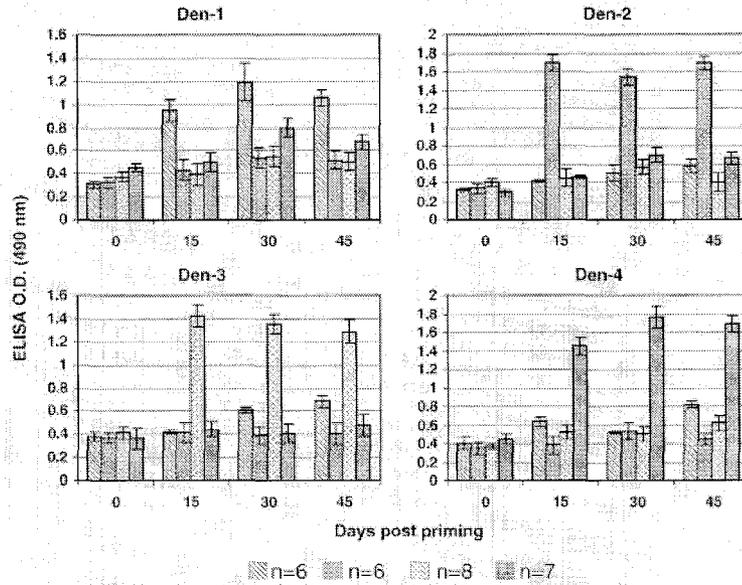


Fig. 2. Inoculation of DIII constructs induces anti-dengue antibodies. Specific IgG antibodies against dengue viruses measured by ELISA. Individual serum samples of mice immunized with 100 μ g of pDIII-D1 (▨), pDIII-D2 (▤), pDIII-D3 (▥) or pDIII-D4 (■) plasmids were tested against each indicated dengue antigen. Mice in each group are indicated, and results are plotted as the mean of the optical density (O.D.) values plus a standard deviation.

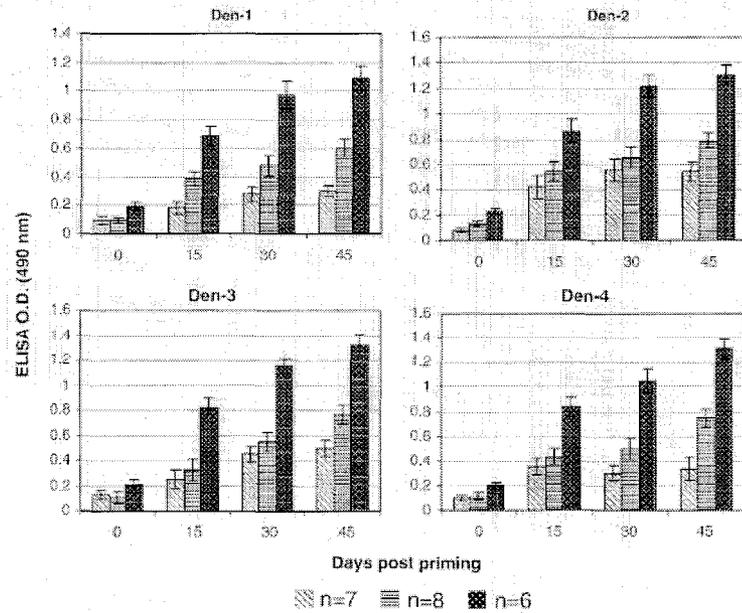


Fig. 3. Immunized mice with trivalent formulations developed anti-dengue antibodies. Mice were immunized with T25 (▨), T50 (▤) and T100 (■) formulations, and sera were tested against all four dengue antigen (indicated). Results are the mean O.D. of each mouse group with the respective antigen. Standard deviation values are indicated as well as the number of mice in each group.

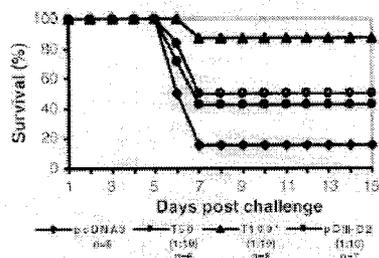


Fig. 4. Sera from immunized mice with DIII constructs protects newborn mice from lethal challenge. Serum samples from mice immunized with T50, T100 and with 100 μ g of pDIII-D2 were pre-incubated with Den-2 NGC strain and inoculated into newborn mouse brain, mortality was recorder. Virus pre-incubated with sera from mice inoculated with empty pcDNA3 was included as a negative control. Neutralization titers by CPE are indicated by parenthesis, mice in each group are indicated. (*) Survival of mice inoculated with virus plus sera from T100 group was statistically significant ($p=0.016$) when compared with control group.

4. Discussion

DNA vaccines against flaviviruses have evolved in the last years, providing a promising approach to understanding key factors involved in the induction of efficient immune responses. However, despite efforts to develop DNA-based vaccines, live attenuated virus vaccine candidates, intertypic chimeric or subunit molecules, there is no a safe and effective vaccine available against dengue virus infection. Immunization with naked DNA has been tested for dengue virus, mainly using the structural genes prM-E [26–29,58], while for other flaviviruses, genes of non-structural proteins such as NS1 and NS3 have also been used for DNA vaccines [30,53,58]. It is generally accepted that E protein is the most important viral immunogen, and it has been reported that prM protein is necessary for its correct expression and immunogenicity of E protein [8,9,54]. However, a recombinant subunit vaccine using just the DIII of Den-2 was successful in inducing neutralizing antibodies and protecting mice [21–23]. In the present study, we report the use of DIII from all dengue serotypes as a DNA vaccine candidate to induce neutralizing antibodies and protection in a mouse model.

Correct and efficient synthesis of any subunit protein depends on expression in its native conformation, which is indispensable for the development of an effective DNA vaccine [58]. We generated DIII plasmids for each dengue virus serotype, which were capable of being expressed adequately in transfected cells, and which also contained neutralizing epitopes [52]. Immunization with these constructs induced a specific antibody response after primary immunization. Mice boosted once with the same DNA dose increased antibody titers, although no further anamnestic response was observed. Maximum antibody levels were detected two weeks after the initial immunization with Den-2 and Den-3 and two weeks after the first boost for Den-1 and Den-4, similar to the antibody and protection levels previously reported with recombinant DIII vaccination [21]. Our results using DIII DNA constructs

are similar to those using the complete E gene or the prM-E cassette in DNA-based vaccine candidates [26–31].

In order to analyze the use of DIII as a tetravalent vaccine we used a combination of all four DIII constructs to evaluate induction of dengue antibodies. There was a dose-dependent antibody response, and only when the highest dose of each plasmid was used (T100), antibody responses was similar to that obtained with single plasmid immunization (100 μ g); no significant differences in antibody responses (serotype-specific) in mice immunized with any concentration of tetravalent DIII formulations was observed. Despite the use of high DNA concentrations, there were no adverse effects on mice or regarding their antibody responses. As has been reported for other viruses [55,56], immunization with naked DNA is dose-dependent. By varying antigen delivery, route of immunization, or inclusion of adjuvant molecules, immune responses induced with DIII tetravalent formulation could be optimized, perhaps even for the use of lower DNA concentrations.

For neutralization assays on BHK-21 cells and protection in suckling mice we used a mouse-adapted Den-2 (NGC), because our observations of its high virulence and capacity to induce CPE in BHK cells, and the high mortality in mice when inoculated IC. Neutralization titers from the CPE inhibition assays for pcDIII-D2, T50, and T100 constructs (1:10 for all) did not correlate with protection in newborn mice (43%, 50%, and 87%, respectively), although there was a correlation with DNA concentration. Neutralizing antibodies may not be the only immune modulatory molecules present in serum samples of immunized mice, playing a role in protection. Such other molecules may include cytokines or chemokines induced by unmethylated CpG dinucleotides (CpG motifs) present in plasmids constructs. CpG motifs can directly activate macrophages, monocytes, dendritic cells, and induce the secretion of IL-12, IL-6 and INF- γ [57]. The high number of CpG motifs in the T100 formulation could have induced the production of high levels of such molecules contributing to mouse protection upon challenge.

In order to evaluate the effect of DIII construct vaccination on cellular responses, we measured lymphocyte proliferation in response to specific dengue antigens (data not shown). There was no detectable cell proliferation in immunized mice, in agreement with results reported by Konishi et al. [28], suggesting that cellular responses induced by the DIII plasmids are not stronger to be detected in the proliferation assays or that T cell epitopes could be located outside the prM and E proteins, specifically in the C protein and nonstructural proteins [59].

The present study demonstrates the efficacy of a DIII DNA-based vaccine to induce neutralizing antibodies and protection against dengue virus type 2 in the mouse model, and represents the first report of a tetravalent dengue DNA-based vaccine candidate. A tetravalent DIII DNA vaccine could be used in conjunction with recombinant proteins or recombinant vaccinia virus which include other DV antigens in order to improve protective long-lasting immune

responses against dengue virus infection. However, additional studies are required to test neutralizing activity against the other dengue serotypes and further studies using non-human primates will be required to improve doses, delivery system, and to assess the efficacy and safety of this vaccine approach.

Acknowledgements

The authors thank to Drs. Janine Ramsey and Yvonne Rosenstein for helpful discussion and assistance with manuscript preparation; to M.Sc. Miguel A. Sánchez-Alemán for assistance in the statistical analysis. This work was supported in part by CONACYT with a fellowship to Javier Mota.

References

- Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue haemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995;1:55–7.
- Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3395–400.
- Rosen L. Comments on the epidemiology, pathogenesis and control of dengue. *Med Trop* 1999;59:495–8.
- World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever. Geneva: WHO Publications; 1997.
- Barrett AD. Yellow fever vaccines. *Biologicals* 1997;25:17–25.
- Barrett AD. Japanese encephalitis and dengue vaccines. *Biologicals* 1997;25:27–34.
- Barrett AD. Current status of flavivirus vaccines. *Ann N Y Acad Sci* 2001;951:262–71.
- Pugachev KV, Guirakhoo F, Trent DW, Monath TP. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. *Int J Parasitol* 2003;33:567–82.
- Kimney RM, Huang CY. Development of new vaccines against dengue fever and Japanese encephalitis. *Intervirology* 2001;44:176–97.
- Halstead SB, Deen J. The future of dengue vaccines. *Lancet* 2002;360:1243–5.
- Men R, Bray M, Clark D, Chancock RM, Lai CJ. Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3′ noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viraemia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. *J Virol* 1996;70:5930–7.
- Bhambhaniyavati N, Sures Y. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 2000;18:44–7.
- Durbin AP, Karan RA, Sun W, Vaughn DW, Reynolds MJ, Perreault JR, et al. Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 60 nucleotide deletion in its 3′ untranslated region. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:405–13.
- Kanessa-thason N, Sun W, Kim-Ahn G, Albert SV, Punak JR, King A, et al. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Avanas Pasteur) in human volunteers. *Vaccine* 2001;19:3179–88.
- Rothman AL, Kanessa-thason N, West K, Janus J, Saluzzo JF, Ennis FA. Induction of T lymphocyte responses to dengue virus by a candidate tetravalent live attenuated dengue virus vaccine. *Vaccine* 2001;19:4694–9.
- Monath TP, McCarthy K, Bedford P, Johnson CT, Nichols R, Yoksan S, et al. Clinical Proof of principle for chimericTM recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. *Vaccine* 2002;20:1004–18.
- Pletnev AG, Bray M, Huggins J, Lai CJ. Construction and characterization of chimeric tick-borne encephalitis/dengue type 4 viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10532–6.
- Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weitzin R, et al. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol* 2001;75:7290–304.
- Huang CY, Bunraper S, Tsuchiya KR, Bhambhaniyavati N, Gubler DJ, Kimney RM. Dengue 2 PDX-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. *J virol* 2003;77:11436–47.
- Srivastava AK, Punak JR, Warren KL, Hoke CH. Mice immunized with a dengue type 2 virus E and NS1 fusion proteins made in *Escherichia coli* are protected against lethal dengue virus infection. *Vaccine* 1995;13:1251–8.
- Simmons M, Nelson WM, Wu SJ, Hayes CG. Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:655–62.
- Simmons M, Murphy GS, Kochel T, Raviprakash K, Hayes CG. Characterization of antibody responses to combinations of a dengue-2 DNA and dengue-2 recombinant subunit vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:420–6.
- Simmons M, Murphy GS, Hayes CG. Short report: antibody responses of mice immunized with a tetravalent dengue recombinant protein subunit vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:159–61.
- Stephenson J. Defective adenoviruses as a novel vaccines for the Flaviviridae. *Clin Diagn Virol* 1993;10:187–94.
- Men R, Wyatt L, Tokimatsu I, Arakaki S, Shamsen G, Ellans R, et al. Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 challenge. *Vaccine* 2000;18:3113–22.
- Kochel T, Wu SJ, Raviprakash K, Hobart P, Hoffman S, Porter K, et al. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 1997;15:547–52.
- Porter KR, Kochel TJ, Wu SJ, Raviprakash K, Phillips I, Hayes CG. Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immunostimulatory motifs on antibody responses. *Arch Virol* 1998;143:997–1003.
- Konishi E, Yamacka M, Kuwane I, Mason PW. A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus pre membrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. *Vaccine* 2000;18:1153–9.
- Kochel TJ, Raviprakash K, Hayes CG, Watts DM, Rustell KL, Gozalo AS, et al. A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys. *Vaccine* 2000;18:3166–73.
- Pattikhan C, Kasmerik W, Srisa-ad S, Duangchanda T, Srikate W, Moonont S, et al. Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. *J Virol Methods* 2003;109:55–61.
- Raviprakash K, Ewing DE, Simmons M, Porter KR, Jones TR, Hayes CG, et al. Needle-free biojector injection of a dengue virus type 1 DNA vaccine with human immunostimulatory sequences and the GM-CSF gene increases immunogenicity and protection from virus challenge in Aotus monkeys. *Virology* 2003;315:345–52.
- Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med* 1970;42:311–28.
- Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*, vol. 1. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 991–1042.
- Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2.8 Å resolution. *Nature* 1995;375:291–8.

- [35] Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *PNAS* 2003;100:6986–91.
- [36] Cecilia D, Gould EA. Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization-resistant mutants. *Virology* 1991;181:70–7.
- [37] Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos de Chacon I, Ramon C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 1999;73:4733–47.
- [38] Lobigs M, Usha R, Nesterowicz A, Marshall ID, Weir RC, Dalgarno L. Host cell selection of Murray Valley encephalitis virus variants altered at an RGD sequence in the envelope protein and in mouse virulence. *Virology* 1990;176:587–95.
- [39] Pietnev AG, Bray M, Lai CJ. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. *J Virol* 1993;67:4956–63.
- [40] Sanchez JJ, Ruiz BH. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol* 1996;77:2541–5.
- [41] Suniyoshi H, Tignor GH, Shope RE. Characterization of highly attenuated Japanese encephalitis virus generated from molecularly cloned cDNA. *J Infect Dis* 1995;171:1144–51.
- [42] Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol* 2000;74:3227–34.
- [43] Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Luthardt RJ, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 1997;3:666–71.
- [44] Huang JJ, Hsieh MT, Young MJ, Kao CL, King CC, Chang W. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol* 2004;78:373–88.
- [45] Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to vero cells. *J Virol* 2001;75:7769–73.
- [46] Henschal EA, Gearty MK, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 1982;31:330–6.
- [47] Punnak R, Barvir DA, Barous JM, Dubois DR, D'Andrea VM, Hoke CH, et al. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J Infect Dis* 1996;174:1176–84.
- [48] Roco-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990;174:601–15.
- [49] Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongwastdi V, Sunayakorn S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:418–27.
- [50] World Health Organization. Manual for the virological investigation of polio. WHO/EPI/GEN/97.01; 1997.
- [51] Edeavag G, Wharen B, Osterhaus AD, Sundquist VA, Granström M. Enzyme-linked immunosorbent assay-based inhibition test for neutralizing antibodies to polioviruses as an alternative to the neutralization test tissue culture. *J Clin Microbiol* 1995;33:2927–30.
- [52] Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus Jamaica. *Virology* 1993;246:317–28.
- [53] Chen HW, Pan CH, Liu MY, Jou R, Tsai CJ, Wu HJ, et al. Screening of protective antigens of Japanese encephalitis virus by DNA immunization: a comparative study with conventional viral vaccines. *J Virol* 1999;73:10137–45.
- [54] Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins pM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 2002;76:3480–91.
- [55] Chow YH, Huang WL, Chi WK, Chu YD, Tso MH. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interferon- α 2. *J Virol* 1997;71:166–73.
- [56] Cazeaux N, Bennisser Y, Vidal PL, Li Z, Paulin D, Bahraoui E. Comparative study of immune responses induced after immunization with plasmids encoding the HIV-1 Nef protein under the control of the CMV-IE or the muscle-specific desmin promoter. *Vaccine* 2002;20:3322–31.
- [57] Kimmann DM, Yi A, Beaucauge SL, Conover J, Erieg AM. CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12 and interferon γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2879–83.
- [58] Chang GJ, Davis BS, Hunt AR, Holmes DA, Kuno G. Flavivirus DNA vaccines: current status and potential. *Ann N Y Acad Sci* 2001;951:272–85.
- [59] Rothman AL, Kurane I, Lai CJ, Bray M, Falgout B, Men R, et al. Dengue virus protein recognition by virus-specific murine CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 1993;67:801–6.

22. Anexo II (b)

Citaciones al artículo:

Mota J, Acosta M, Argotte R, et al. Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein VACCINE 23 (26): 3469-3476 MAY 16 2005.

Times Cited: 8

1. Throsby M, Ter Meulen J, Geuijen C, Goudsmit J, de Kruif J. Mapping and analysis of West Nile virus-specific monoclonal antibodies: prospects for vaccine development. **Expert Rev Vaccines. 2007 Apr;6(2):183-91.**
2. Raja NU, Holman DH, Wang DH, et al. Induction of bivalent immune responses by expression of Dengue virus type 1 and type 2 antigens from a single complex adenoviral vector. **American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene 76 (4): 743-751 Apr 2007.**
3. Khanam S, Rajendra P, Khanna N, et al. An adenovirus prime/plasmid boost strategy for induction of equipotent immune responses to two dengue virus serotypes. **BMC Biotechnology 7: art. no. 10 Feb 15 2007**
4. Khanam S, Khanna N, Swarninathan S. Induction of neutralizing antibodies and T cell responses by dengue virus type 2 envelope domain III encoded by plasmid and adenoviral vectors. **Vaccine 24 (42-43): 6513-6525 Oct 30 2006.**
5. Lowe DB, Shearer MH, Kennedy RC DNA vaccines: Successes and limitations in cancer and infectious disease **JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY 98 (2): 235-242 MAY 15 2006.**
6. Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR, et al. Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics **VIRAL IMMUNOLOGY 19 (1): 10-32 SPR 2006.**
7. Konishi E, Kosugi S, Imoto JI. Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice **VACCINE 24 (12): 2200-2207 MAR 15 2006.**
8. Khanam S, Etemad B, Khanna N, et al. Induction of neutralizing antibodies specific to dengue virus serotypes 2 and 4 by a bivalent antigen composed of linked envelope domains III of these two serotypes **AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE 74 (2): 266-277 FEB 2006.**

Vacunas de DNA: Inducción de la Respuesta Inmune

Título breve: Vacunas de DNA y respuesta inmune

Javier Mota Sánchez, M. en C.

Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas

Instituto Nacional de Salud Pública

Cuernavaca Morelos.

e-mail: jmota@insp.mx

Resumen

La efectividad de las vacunas y la inmunización, en la prevención de las enfermedades infecciosas, es uno de los grandes avances de la medicina. En la actualidad, con el acceso a tecnología de punta en el área de la genómica y la proteómica, es posible acelerar el desarrollo de nuevas vacunas con características mejoradas en aspectos fundamentales como son su inmunogenicidad y seguridad. A casi dos décadas del primer reporte, en el cual se demostró que un gene puede ser expresado mediante la inyección directa de DNA desnudo, las vacunas de DNA han probado ser eficientes para inducir una respuesta inmune protectora contra parásitos, virus y bacterias en diversos modelos animales. Esta revisión tiene por objetivo el presentar un panorama general de lo que son las vacunas de DNA, y de cuales son los mecanismos mediante los cuales se induce la respuesta inmune después de la inmunización con antígenos insertados en vectores de DNA (plásmidos).

Palabras clave: vacunas, DNA, respuesta inmune.

Abstract

The effectiveness of vaccines and immunization in the prevention of infectious diseases is one of the greatest successes in medicine. In recent years, with access to cutting edge genomic and proteomic technology, it is possible to accelerate the development of new and improved vaccines with better characteristics of immunogenicity and safety. Since the first report, almost two decades ago, where it was demonstrated that gene expression is possible by directed injection of naked DNA, DNA vaccines have been proved to induce protective immune responses against parasites, virus and bacterium in diverse animal disease models. This review aims to present an overview about DNA vaccines and the mechanisms of which immune responses are induced after immunization with plasmid DNA-encoded antigens.

Key word: Vaccines, DNA, immune response.

Introducción

Uno de los acontecimientos más importantes en la historia de la medicina es la vacunación, el desarrollo e implementación de esquemas cotidianos de inmunización han permitido controlar exitosamente muchas enfermedades, e incluso han permitido la erradicación mundial de la viruela (1). La vacunación ha probado ser la estrategia más exitosa en términos de costo-beneficio (2). Sin embargo, las enfermedades infecciosas continúan siendo una de las causas principales de muerte en el mundo. Se estima que alrededor del 25 % del total de muertes anuales en el mundo (aproximadamente 15 millones) son causadas por agentes infecciosos (3), no solamente por la aparición de nuevos patógenos, como el virus Ebola, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo SARS (por sus siglas en inglés), si no también, debido a la re-emergencia de microorganismos causantes de enfermedades con altas tasas de morbilidad y mortalidad como las pandemias de influenza, la fiebre del Oeste del Nilo, la fiebre por dengue o el cólera (3, 4). Por otro lado se encuentran también otras enfermedades emergentes como el paludismo, que se asocian al incremento en la resistencia del parásito a los fármacos, o a los insecticidas usados para controlar a los vectores que la transmiten al humano (4). Para estas y muchas otras enfermedades no existe en la actualidad fármacos o vacunas, sin embargo muchos de los esfuerzos actuales se enfocan en la investigación y desarrollo de nuevos tratamientos o vacunas que sean eficaces y seguras.

En la actualidad, debido a los recientes y excepcionales avances en las ciencias básicas y médicas, relacionadas con la genómica y la proteómica, se están desarrollando vacunas con nuevas y mejores características inmunogénicas y de seguridad. Las nuevas aproximaciones de la "vacunología reversa" (*reverse vaccinology*), basadas en metodologías de genómica ha revolucionado la investigación en el área de la patogénesis de microorganismos y el diseño de vacunas (5)

Las primeras vacunas fueron producidas de manera empírica, sin un conocimiento detallado de la naturaleza del agente causal y los efectos en los

individuos vacunados. Por ejemplo, las observaciones en las que una infección leve de viruela protegía de la enfermedad en exposiciones subsecuentes, dieron como resultado el uso de pus seca como una forma de inóculo aplicado en la piel, o en forma intranasal, para prevenir la enfermedad, lo que en el año de 1798 finalmente culminó en la publicación del trabajo de Edward Jenner sobre la vacunación con el virus de la viruela, y que es conocido como el nacimiento de la inmunología (6). Posteriormente, el avance en el conocimiento de la microbiología, principalmente el desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos, permitió el desarrollo sistemático de vacunas contra muchas enfermedades y más aún, se han desarrollado esquemas de inmunización utilizando vacunas polivalentes como la vacuna triple contra la difteria-tétanos-tosferina, conocida como DTP (7). Esto dio como resultado un menor requerimiento de inyecciones múltiples; en base a este racionamiento, recientemente se demostró la eficacia e inmunogenicidad de una vacuna hexavalente que contiene además de DTP, hepatitis B, polio y *Haemophilus influenzae* tipo B (8). A pesar del aparente éxito de esta vacuna hexavalente existe la preocupación acerca de su seguridad en su uso masivo (9).

Actualmente, el conocimiento acumulado en el último siglo en disciplinas como la virología, la biología molecular así como de la inmunología misma, nos ha permitido comprender mejor el éxito y los errores de las vacunas usadas en el pasado, así como también, el contar con nuevas herramientas y estrategias para el diseño y desarrollo de nuevas y mejores vacunas (6, 10).

Vacunas de DNA

En la historia de la vacunología, las primeras vacunas exitosas fueron las vacunas atenuadas, que fueron hechas básicamente con virus vivos atenuados mediante múltiples pases en cultivos de tejidos, un ejemplo es el virus de la viruela, o el virus de la polio arriba mencionados. Otro tipo de vacunas atenuadas se basaron en la inactivación química o por calor de los patógenos, el éxito de estas vacunas se basa en su capacidad de inducir una respuesta inmune tanto humoral como celular (11), no obstante, en el caso de la inactivación química o por calor, debido a que el microorganismo no puede replicarse, la respuesta celular no es muy potente. Desafortunadamente, siempre existe el riesgo de obtener, a partir de las cepas vacunales, organismos que re-adquieran su capacidad virulenta y patogénica (revertantes); para algunos virus como el VIH sería muy riesgoso usarlos como virus vivos atenuados (11, 12). Para tratar de evitar esta situación de riesgo se han empleado microorganismos muertos y más recientemente, con el advenimiento de la tecnología de DNA recombinante, fue posible el desarrollo de vacunas utilizando sub-unidades antigénicas más que organismos completos. En este tipo de vacunas se han empleado diversos antígenos, como son las proteínas recombinantes purificadas, carbohidratos bacterianos, péptidos sintéticos, anticuerpos anti-idiotipo, virus y bacterias recombinantes (10-12). A pesar que estas vacunas basadas en organismos muertos o en sub-unidades han tenido cierto éxito como vacunas profilácticas, ninguna de estas dos aproximaciones metodológicas es capaz de inducir una respuesta celular adecuada, por lo que nuevas metodologías para desarrollar candidatos a vacunas con

estas cualidades, pero sin el riesgo que implica el uso de patógenos vivos, continúan en proceso de investigación (12).

Una serie de observaciones al inicio de la década de los 90's demostraron que con DNA desnudo (plásmidos) es posible transfectar células *in vivo* (13), posteriormente se reportó que es posible inducir una respuesta humoral contra el antígeno codificado en el plásmido transfectado (14), pero no fue sino hasta 1993, a partir del reporte donde se demostró que se puede inducir una respuesta inmune protectora contra un reto letal con el virus de la influenza en ratones inmunizados con DNA (15), que se estableció firmemente el concepto de lo que se conoce hoy como vacunas de tercera generación o vacunas de DNA (16). Posteriormente, numerosas publicaciones demostraron que diversos antígenos (de bacterias, virus, parásitos o de origen tumoral) codificados en plásmidos pueden provocar una respuesta inmune en diversos modelos animales (17, 18).

Las vacunas de DNA, también conocidas como vacunas genéticas, vacunas de ácidos nucleicos o vacunas de DNA desnudo, entre otros términos, emplean una metodología relativamente simple que ha abierto una nueva era en la vacunología, con un alto potencial tanto como vacunas profilácticas, así como vacunas terapéuticas (19). Todo esto se debe a que combina muchas de las características deseables de las vacunas tradicionales, pero ofrece muchas ventajas con respecto a estas, como son: a) su seguridad en términos de no usar organismos vivos, b) su capacidad de inducir una respuesta inmune celular y humoral, d) la facilidad de modificar los antígenos codificados en los plásmidos (ver más adelante), e) un menor costo cuando se producen a gran escala y f) una vida media mayor, por lo que se tiene una mejor estabilidad en cuanto a la temperatura de almacenamiento y transporte, permitiendo prescindir de la cadena fría utilizada en las vacunas convencionales(20).

Plásmidos o Vectores

La unidad funcional de las vacunas de DNA son los vectores en los cuales son insertados los genes que codifican para las proteínas de interés, estos vectores son plásmidos bacterianos. En la figura 1 se esquematizan los elementos que componen un plásmido típico para su uso como vector en la vacunación con DNA. Los plásmidos bacterianos son moléculas de DNA circular que se autorepican de forma extra cromosomal en las bacterias y han sido utilizados ampliamente para la expresión de proteínas en sistemas de mamíferos (21). La capacidad autónoma de replicación de estos plásmidos permite su amplificación en cultivos de bacterias transformadas (18-21). Los genes codificados en estos plásmidos se encuentran bajo el control de promotores, generalmente de origen viral, como el del citomegalovirus humano (CMV), el virus del sarcoma de Rous (RSV) o el virus de simios 40 (SV40). Los promotores son secuencias cortas de DNA al cual se le unen diversos factores de transcripción que ayudan a guiar y activar a las polimerasas, estos se encuentran activos constitutivamente en la mayoría de las células eucariotas; en la actualidad el promotor más frecuentemente usado es el CMV (10, 18). Seguido del promotor se encuentra el gen de interés, que a su vez está seguido por una señal de poli-adenilación, por ejemplo: la región no traducida 3' del gen de la hormona bovina del crecimiento (BGH-3'-UTR), que contiene las secuencias apropiadas para estabilizar los transcritos del gen de interés. Todo lo anterior se encuentra insertado en el esqueleto de un plásmido bacteriano, con un origen de replicación y diversos genes de resistencia a antibióticos,

como son la ampicilina o la kanamicina, lo que permite su selección en cultivos de bacterias transformadas (21). Un elemento importante en los plásmidos es la presencia de motivos CpG bacterianos, que poseen propiedades inmunomoduladoras y que representan un elemento adjuvante intrínseco (19-22).

Rutas y formas de inoculación

El sitio de inoculación, así como la forma en que el DNA es liberado en el organismo, juega un papel importante en el éxito para inducir una respuesta inmune; se sabe que únicamente del 1-10% del total del DNA inoculado es procesado adecuadamente para expresar la proteína de interés (10, 21-23). Las rutas de inoculación que ha sido empleadas incluyen la piel, el músculo esquelético y las mucosas. Dependiendo del modelo animal que se emplee, el antígeno usado y la metodología para inocular el DNA es el grado de efectividad (20, 21-23). Con respecto a la forma de inocular el DNA, la inyección es el método más usado ya que no requiere de entrenamiento especializado y su bajo costo en comparación con el uso de lo que se conoce como pistola génica (gene gun) que implica un costo elevado y hace improbable su uso en esquemas masivos de vacunación (9, 18-20, 24). Sin embargo, y a pesar de su mayor costo, esta última metodología produce los mejores resultados; la inoculación de DNA con este sistema emplea al DNA acoplado a esferas de oro o tungsteno que son bombardeadas hacia la dermis y capas subdermicas con la ayuda de helio comprimido (10, 20, 22, 23), lo que permite la directa transfección de las células blanco. Esta metodología permite usar mucho menos DNA en comparación con la inyección con jeringa ya que es aproximadamente 100 veces más eficiente (24). Finalmente, una forma no invasiva es la ruta de las mucosas, debido a que muchos de los patógenos tienen como vía de entrada las mucosas, el inducir una inmunidad protectora en estas, es la mejor estrategia (20-23).

El DNA que es introducido por la piel, es tomado principalmente por keratinocitos (por ejemplo cuando se usa la pistola génica), mientras que cuando se usa la inyección intramuscular, este es tomado por células de músculo esquelético. Sin embargo se ha demostrado que el DNA es captado también por células presentadoras de antígeno profesionales (APCs, por sus siglas en inglés), siendo estas, las únicas capaces de activar a las células del sistema inmune mediante la presentación de la proteína (10, 11). Estas células pueden capturar el DNA directamente por la inoculación (transfección) o pueden tomar el antígeno de otras células, como las de músculo esquelético o los keratinocitos, mediante fagocitosis, mecanismo denominado "presentación cruzada" (11, 19, 22).

Inducción de la respuesta inmune

En el caso de la inmunización con vacunas de DNA, una vez que el plásmido es introducido en la célula, éste es translocado al núcleo donde se inicia la transcripción del transgene, posteriormente los transcritos son llevados al citoplasma donde son traducidos. Las proteínas recién sintetizadas son procesadas y presentadas al sistema inmune y pueden inducir una respuesta inmune de larga duración tanto a nivel humoral como celular. Básicamente es a través de los mismos mecanismos implicados en la respuesta inmune inducida por las vacunas tradicionales o la infección natural (10, 19-23).

Las proteínas exógenas que son endocitadas o fagocitadas (presentación cruzada, en la inmunización con DNA) entran a la vía endosomal donde son

degradadas en pequeños péptidos de 12-25 aminoácidos que posteriormente son asociados con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II y translocados hacia la superficie de la célula donde son presentados y se unen a sus correspondientes receptores (TcRs) en los linfocitos T cooperadores ($CD4^+$); lo que tiene como consecuencia su activación y expansión (14,16,20, 22).

Por otro lado, las proteínas que son sintetizadas de novo (transfección, en la inmunización con DNA), son degradadas en el proteosoma en péptidos de 8-10 aminoácidos que son transportados hacia el retículo endoplásmico, mediante un sistema especializado de transporte que emplea proteínas transportadoras (TAPI y TAPII), una vez en el retículo son asociadas a moléculas de MHC clase I. Los péptidos de gran afinidad con su respectiva molécula de MHC I son estabilizados y entran en la vía secretoria, con lo que alcanzan la superficie celular, y al igual que con los complejos MHC II-péptido, estos encuentran sus respectivos TcRs, pero en este caso, en la superficie de los linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$) para inducir su activación (14,16,20, 22).

De esta forma la unión del complejo MHC-péptido y TcR, en las APCs y linfocitos T, respectivamente, provee de lo que se conoce como la señal 1 de la activación de los linfocitos T. Sin embargo, esta señal 1 es insuficiente para generar una buena respuesta inmune y es necesario de una segunda señal para la completa activación de los linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$. (10, 19, 21). La señal 2 es inducida mediante moléculas co-estimuladoras presentes en su superficie de las APCs (mayoritariamente células dendríticas [CD]), como las proteínas de la familia B7. Previamente a esto, las CD necesitan de una señal para su activación inicial y maduración, esta señal denominada señal 0, o señal de alarma, es inducida por ciertas citocinas inflamatorias, proteínas de choque térmico (HSP) o los motivos CpG presentes en el DNA bacteriano. El resultado de la señal 0 es la sobre-expresión de moléculas del MHC y co-estimuladoras en su superficie, favoreciendo posteriormente, el proceso de presentación de antígeno (señal 1). En esta etapa, las CD activadas cambian su morfología y perfil de expresión de receptores para quimiocinas, dejando la periferia y migrando hacia los ganglios linfáticos donde participan en la activación de linfocitos T y B inmaduros (10, 14, 20, 22).

Posterior a la etapa de activación se inicia la etapa efectora, los linfocitos T activados dejan los ganglios linfáticos hacia la periferia siguiendo un gradiente de quimiocinas hasta llegar al lugar donde son requeridos y tras la unión de sus TcRs con los antígenos expresados en el contexto de MHC apropiado comienzan su etapa efectora mediante la secreción de sustancias tóxicas como las perforinas (células $CD8^+$) o de interleucinas con actividad inflamatoria como el $INF-\gamma$ (células $CD4^+$) (10,14, 21, 22).

Por otro lado, los linfocitos B son activados mediante su receptor (BcR) por los antígenos que son sintetizados y secretados o presentados en la superficie de las células que fueron transfectadas en la inmunización con el DNA. Cuando se trata de antígenos que nos son secretados o presentados en la superficie celular, la respuesta humoral es menos eficiente, sin embargo, es posible que el antígeno pueda ser tomado por las APCs mediante la fagocitosis de células transfectadas en estado apoptótico y presentadas en el contexto de MHC II (22). Posteriormente, aquellos linfocitos B activados cambian de isotipo; las secuencias que codifican para la región variable de las inmunoglobulinas sufren hipermutación y las clonas con un receptor con mayor afinidad por el antígeno son seleccionadas y se expanden. Los linfocitos B activados,

eventualmente se diferencian hacia células de memoria o a células plasmáticas, estas últimas pueden: a) continuar sintetizando anticuerpos, o b) pueden establecerse en la médula ósea y continuar también produciendo anticuerpos; por lo tanto es posible encontrar anticuerpos presentes en el suero y en mucosas por largos periodos (10, 22). La figura 2, esquematiza las posibles rutas para la presentación de antígenos tanto a linfocitos B como T y su activación para realizar su acción efectora.

Optimización de las vacunas de DNA

A pesar de que las vacunas de DNA han probado ser eficientes en inducir respuestas inmunes en modelos murinos, se ha observado que cuando son probadas en animales superiores y primates no-humanos, la respuesta inmune es débil (25), por lo que se han desarrollado diversas estrategias para potenciar la capacidad de este tipo de vacunas (25, 26). Una de las primeras formas de incrementar la eficiencia de las vacunas de DNA fue la co-administración (proteínas recombinantes) o co-expresión (adyuvantes genéticos) de moléculas como las interleucinas. Existe una larga lista de interleucinas que han sido utilizadas con este propósito, y de las cuales se destacan el factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), que ayuda a reclutar células dendríticas y aumenta la respuesta de células T y B. De la misma forma muchas interleucinas de tipo Th₁ han sido utilizadas, como IL-12, INF- γ , IL-15 e IL-18, entre otras, así como también de tipo Th₂, tales como IL-4, IL-10 e IL-13, entre otras (10, 25, 26).

Por otro lado, se ha observado que las vacunas de DNA pueden ser utilizadas en combinación con otro tipo de vacunas, como las basadas en proteínas recombinantes, para mejorar la respuesta inmune. Se ha demostrado que cuando se inmuniza con DNA utilizando un antígeno específico y posteriormente se administra un refuerzo con el mismo antígeno pero como proteína recombinante (o virus recombinantes, como vaccinia), se obtienen respuestas inmunes más robustas (10, 20, 22, 26) en comparación con el uso individual de DNA o de la proteína recombinante.

Ensayos en modelos animales y en humanos

Basados en los prometedores resultados iniciales de la inmunización con DNA, diversos modelos preclínicos de enfermedades han sido utilizados para evaluar la eficiencia de las vacunas de DNA; estos incluyen diversas enfermedades virales como la influenza, la hepatitis B y C, herpes, ebola, HIV, etc., así como también contra patógenos bacterianos: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pulmonis*, *Clostridium tetanii*, *Chlamydia trachomatis* y *Salmonella typhii* entre otros; de la misma forma se han evaluado contra enfermedades causadas por parásitos como la malaria, la toxoplasmosis, la oncocercosis, la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, entre otros (10, 19, 22).

Para todas estas enfermedades, la vacunación con DNA ha probado ser muy eficiente en inducir respuestas inmunes tanto a nivel humoral como celular en modelos animales, la mayoría en el modelo de ratón. Estos trabajos se han desarrollado en apenas en un periodo de no-más de 10 años (10).

Dentro de los ensayos preclínicos en las enfermedades virales, destaca el caso del virus de la inmunodeficiencia humana o HIV, en el cual candidatos a vacuna de DNA han sido evaluado en el especie más cercana a los seres humanos, los chimpancés (27-30). En animales sanos vacunados con proteínas del HIV, se demostró

la inducción de una respuesta inmune tanto humoral como citotóxica, que fue capaz de proteger contra el reto con un virus heterólogo (27, 28). En otro estudio con chimpancés, se utilizó la vacunación con DNA con fines terapéuticos. En animales previamente infectados se observó que la inoculación de plásmidos que contenían los genes que codifican para las proteínas *Env* y *Rev* de una cepa heteróloga de HIV, indujo un incremento en los títulos de anticuerpos, reducción de la carga viral y la normalización de los niveles de células CD28⁺ (29). Basados en los resultados de los ensayos en los modelos animales, se llevaron a cabo los primeros ensayos clínicos en humanos (Fase I) para evaluar la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna contra el HIV-1 usando la construcción *env/rev*, tanto en personas infectadas como no infectadas (31-35). Los resultados mostraron en general que esta vacuna de DNA fue bien tolerada por los pacientes, es segura, ya que no hay evidencias de integración del DNA, generación de respuestas anti-inmunes o tolerancia inmunológica (31-35). En los ensayos con personas no infectadas (seronegativas), se observó la proliferación de linfocitos de manera antígeno-específica, y la producción de interferon γ y quimioquinas β , sin embargo, estas respuestas fueron débiles y no persistentes (34). En el caso de los ensayos en las personas seropositivas, el uso de la vacuna *env/rev* reforzó la producción de anticuerpos anti gp120, los títulos se correlacionaron con la dosis usada, sin embargo, la actividad citotóxica de los linfocitos T no fue modificada en gran medida y la carga viral no se vio modificada después de la vacunación (31-33).

Otro ejemplo de ensayos clínicos, después de una serie de trabajos preclínicos en diversos modelos animales con relativo éxito (36, 37), es el caso de las vacunas de DNA contra el paludismo; en ensayos preclínicos hechos para el modelo de *Plasmodium berghei*, en ratón, se obtuvo una protección completa cuando se inmunizó con una vacuna de DNA y se administraron refuerzos con el mismo antígeno pero expresado en el virus vaccinia recombinante (36). En un ensayo hecho en monos rhesus, se logró inducir una respuesta citotóxica antígeno-específica cuando se inmunizó con una mezcla de cuatro plásmidos que codificaban para cuatro antígenos de *P. falciparum*, este fue el primer trabajo donde se demostraba que las vacunas de DNA podían inducir una respuesta inmune en primates no humanos en contra del parásito de la malaria (37). Aunque limitado, se llevó a cabo el primer ensayo clínico de fase I para una vacuna de DNA contra el paludismo (38), en este trabajo hecho en voluntarios sanos, se emplearon 10 antígenos distintos, los individuos inmunizados con los respectivos plásmidos desarrollaron respuestas celulares citotóxicas, estas fueron específicas para cada antígeno usado y restringida por múltiples alelos (HLA-I) en el mismo individuo. Más reciente, otro ensayo de fase I se llevó a cabo en voluntarios sanos utilizando una vacuna de DNA que codifica para la proteína circumsporozoítica (CSP) de *P. falciparum* (39). En este ensayo se utilizaron diversas dosis de DNA, en general la vacuna fue bien tolerada y se obtuvieron excelentes respuestas de células citotóxicas, sin embargo no se pudo inducir (al menos de manera detectable) la producción de anticuerpos específicos en ninguno de los individuos vacunados (39).

Estos estudios y muchos otros han demostrado que las vacunas de DNA pueden inducir respuestas inmunes en humanos, los resultados de la inmunización con plásmidos ha demostrado ser segura y bien tolerada en los voluntarios; los efectos adversos más comúnmente reportados se limitan a la presencia de enrojecimiento en el lugar de la inmunización y/o dolor (10). En adición a los ejemplos de HIV y paludismo,

actualmente se llevan a cabo ensayos de fase I y II con vacunas de DNA en el área del cáncer (melanomas, linfomas, cáncer de próstata, etc), influenza, herpes, hepatitis, así como también estudios adicionales de HIV y paludismo (10).

Conclusiones

Las vacunas de DNA representan una estrategia altamente versátil y segura, lo que las coloca en posición de re-emplazar o complementar a las vacunas actuales. Sin embargo, todavía queda mucho por investigar para poder alcanzar en humanos, el éxito obtenido en los modelos de ratón, o primates no humanos. El gran potencial de las vacunas de DNA reside en su gran versatilidad, ya que pueden diseñarse plásmidos de acuerdo a el tipo de enfermedad/patógeno contra la cual se quiera inducir una respuesta inmune, se pueden optimizar los antígenos utilizados, las rutas de inmunización, el tipo de adyuvantes y los esquemas de inmunización, para obtener el tipo de respuesta deseada.

Finalmente, hay que tomar en cuenta que la aplicación de la tecnología basada en la vacunación con DNA, sobre todo en países en vías de desarrollo, donde definitivamente tendrían un mayor impacto, puede representar (al igual que cualquier otra tecnología de punta en sus fases iniciales) un alto costo económico. A pesar de lo anterior, las vacunas de DNA representan una poderosa y atractiva herramienta para el diseño y desarrollo de nuevas estrategias en la lucha contra las enfermedades infecciosas.

Agradecimientos

El autor agradece a la Dra. Judith González Christen y al Dr. Fernando R. Esquivel por sus comentarios y revisión del manuscrito.

Referencias

- 1.-CDC. Achievements in Public Health, 1900–1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999; 48:243–248.
- 2.- Kurstak E. Abstracts of the Third World Congress on Vaccines and Immunisation, WCVI 2002, Infections Control World Organization (ICWO), 2002;4–9:92.
- 3.- Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 2004;430(6996):242-249.
- 4.- World Health Organization. *The World Health Report 2004* (World Health Organization, Genève, 2004).
- 5.- Kurstak E. Towards the new global vaccinology era in prevention and control of diseases. *Vaccine* 2003;21(7-8):580-581.

- 6.- Wilson CB, Marcuse EK. Vaccine safety--vaccine benefits: science and the public's perception. *Nat Rev Immunol* 2001;1(2):160-165.
- 7.- Edwards KM, Decker MD. Combination vaccines: hopes and challenges. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13(5):345-347.
- 8.- Zepp F, Knuf M, Heininger U, Jahn K, Collard A, Habermehl P, Schuerman L, Sanger R. Safety, reactogenicity and immunogenicity of a combined hexavalent tetanus, diphtheria, acellular pertussis, hepatitis B, inactivated poliovirus vaccine and *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine, for primary immunization of infants. *Vaccine* 2004;22(17-18):2226-2233.
- 9.- Zinka B, Rauch E, Buettner A, Rueff F, Penning R. Unexplained cases of sudden infant death shortly after hexavalent vaccination. *Vaccine* 2006;24(31-32):5779-5780.
- 10.- Reyes-Sandoval A, Ertl HC. DNA vaccines. *Curr Mol Med* 2001;1(2):217-243.
- 11.- Shroff KE, Smith LR, Baine Y, Higgins TJ. Potential for plasmid DNAs as vaccines for the new millennium. *Pharm Sci Technol Today* 1999; May;2(5):205-212.
- 12.- Giese M. DNA-antiviral vaccines: new developments and approaches: a review. *Virus Genes* 1998;17(3):219-232.
- 13.- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247:1465-1468.
- 14.- Tang DC, DeVit M, Johnson SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992;356:152-154.
- 15.- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dworki VJ, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993;259:1745-1749.
- 16.- Waine GJ, McManus DP. Nucleic acids: vaccines of the future. *Parasitol Today* 1995;11:113-116.
- 17.- Lewis PJ, Babiuk LA. DNA vaccines: a review. *Adv Res* 1999;94:129-188.
- 18.- Babiuk LA, Babiuk SL, Loehr B, van Drunen Littel-van den Hurk S. Nucleic acid vaccines: research tools or commercial reality. *Vet Immunol Immunopathol* 2000;76:1-23.
- 19.- Srivastava IK, Liu MA. Gene vaccines. *Ann Intern Med* 2003 ;138(7):550-559.
- 20.- Shedlock DJ, Weiner DB. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol* 2000;68(6):793-806.

- 21.- Kowalczyk DW, Ertl HC. Immune responses to DNA vaccines. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(5):751-770.
- 22.- Huygen K. Plasmid DNA vaccination. *Microbes Infect* 2005;7(5-6):932-938
- 23.- Watts AM, Kennedy RC. DNA vaccination strategies against infectious diseases. *Int J Parasitol* 1999;29(8):1149-1163.
- 24.- Babiuk LA, Pontarollo R, Babiuk S, Loehr B, van Drunen Littel-van den Hurk S. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. *Vaccine* 2003;21(7-8):649-658.
- 25.- Scheerlinck JY. Genetic adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine* 2001;19(17-19):2647-2656.
- 26.- Berzofsky JA, Ahlers JD, Belyakov IM. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. *Nat Rev Immunol* 2001;1(3):209-219.
- 27.- Boyer JD, Wang B, Ugen KE, Agadjanyan M, Javadian A, Frost P, Dang K, Carrano RA, Ciccarelli R, Coney L, Williams WV, Weiner DB. In vivo protective anti-HIV immune responses in non-human primates through DNA immunization. *J Med Primatol* 1996; 25(3):242-250.
- 28.- Boyer JD, Ugen KE, Wang B, Agadjanyan M, Gilbert L, Bagarazzi ML, Chattergoon M, Frost P, Javadian A, Williams WV, Refaeli Y, Ciccarelli RB, McCallus D, Coney L, Weiner DB. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med* 1997;3(5):526-532.
- 29.- Boyer JD, Ugen KE, Chattergoon M, Wang B, Shah A, Agadjanyan M, Bagarazzi ML, Javadian A, Carrano R, Coney L, Williams WV, Weiner DB. DNA vaccination as anti-human immunodeficiency virus immunotherapy in infected chimpanzees. *J Infect Dis* 1997;176(6):1501-1509.
- 30.- Nath BM, Schumann KE, Boyer JD. The chimpanzee and other non-human-primate models in HIV-1 vaccine research. *Trends Microbiol* 2000;8(9):426-431.
- 31.- MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, et al. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J Infect Dis* 1998;178:92-100.
- 32.- MacGregor RR, Boyer JD, Ciccarelli RB, Ginsberg RS, Weiner DB. Safety and immune responses to a DNA-based human immunodeficiency virus (HIV) type I env/rev vaccine in HIV-infected recipients: follow-up data [Letter]. *J Infect Dis* 2000;181:406.

- 33.- Calarota S, Bratt G, Nordlund S, Hinkula J, Leandersson AC, Sandström E, et al. Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. *Lancet* 1998;351:1320-1325.
- 34.- Boyer JD, Cohen AD, Vogt S, Schumann K, Nath B, Ahn L, et al. Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines. *J Infect Dis* 2000;181:476-483.
- 35.- MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Tebas P, Higgins TJ, Baine Y, Ciccarelli RB, Ginsberg RS, Weiner DB. Plasmid vaccination of stable HIV-positive subjects on antiviral treatment results in enhanced CD8 T-cell immunity and increased control of viral "blips". *Vaccine* 2005;23(17-18):2066-2073.
- 36.- Schneider J, Gilbert SC, Blanchard TJ, Hanke T, Robson KJ, Hannan CM, Becker M, Sinden R, Smith GL, Hill AV. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med* 1998;4(4):397-402.
- 37.- Wang R, Doolan DL, Charoenvit Y, Hedstrom RC, Gardner MJ, Hobart P, Tine J, Sedegah M, Fallarme V, Sacci JB Jr, Kaur M, Klinman DM, Hoffman SL, Weiss WR. Simultaneous induction of multiple antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonhuman primates by immunization with a mixture of four *Plasmodium falciparum* DNA plasmids. *Infect Immun* 1998;66(9):4193-4202.
- 38.- Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Coonan KM, Charoenvit Y, Jones TR, Hobart P, Margalith M, Ng J, Weiss WR, Sedegah M, de Taisne C, Norman JA, Hoffman SL. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 1998;282(5388):476-480.
- 39.- Le TP, Coonan KM, Hedstrom RC, Charoenvit Y, Sedegah M, Epstein JE, Kumar S, Wang R, Doolan DL, Maguire JD, Parker SE, Hobart P, Norman J, Hoffman SL. Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine* 2000;18(18):1893-1901.

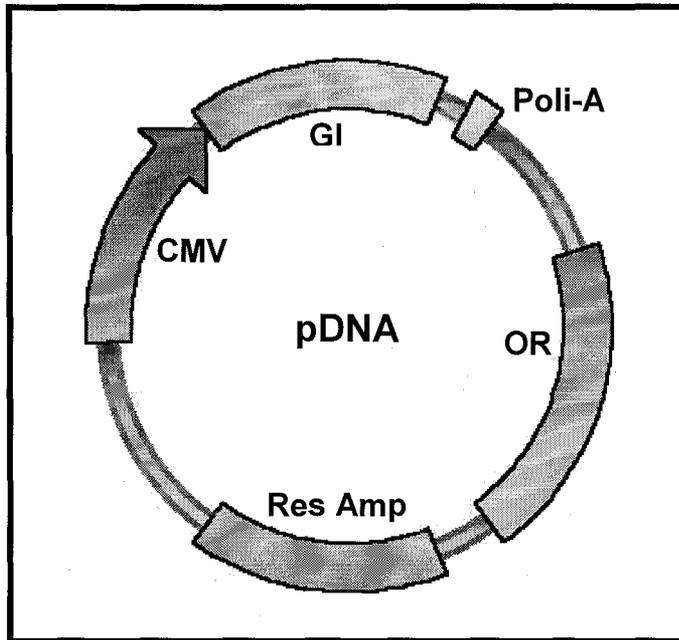


Figura 1. Representación esquemática de un vector típico de vacunas de DNA. El plásmido contiene una región con el promotor (CMV), adyacente al gene que codifica para el antígeno de interés (GI), seguido de la señal de poli-adenilación. El vector incluye las regiones que corresponden al gen de resistencia a antibióticos (Res), en este ejemplo, a la ampicilina (Amp) y al origen de replicación en bacterias (OR).

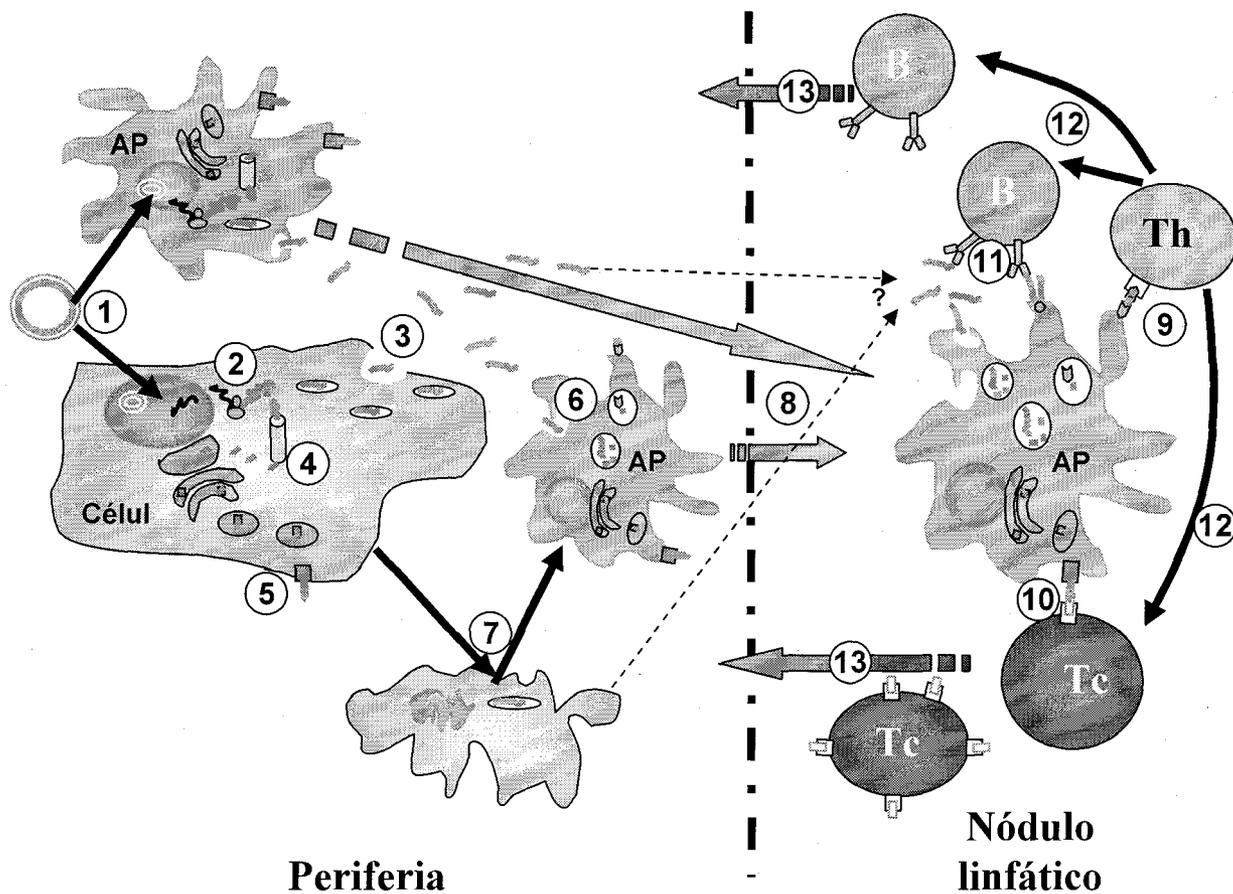


Figura 2. Posibles rutas de presentación de antígenos y activación de linfocitos B y T en la vacunación con DNA. (1) El plásmido es introducido al organismo y en las células transfectadas (una célula somática o una célula presentadora de antígeno profesional (APC, por sus siglas en inglés), este es translocado al núcleo, donde se produce el mRNA. (2) El mRNA es traducidos en los ribosomas y la proteína es: (3) secretada o (4) procesada en el proteosoma. Los productos son transportados a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi donde se acoplan a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I) (5). (6) Las proteínas solubles son fagocitadas por las APCs, procesadas en los endosomas donde se acoplan a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II). Las proteínas codificadas en los plásmidos pueden también ser tomadas vía fagocitosis de células transfectadas en estado apoptótico (7). (8) Las APCs con los antígenos adquiridos por la transfección o por fagocitosis, migran hacia los órganos linfoides secundarios donde son presentadas a los linfocitos T cooperadores (Th) en el contexto de MHC II (9) o por "presentación cruzada" (ver texto) en el contexto MHC I a los linfocitos T citotóxicos (Tc) (10). Los linfocitos B son activados por vía su BcR por las proteínas presentadas en la superficie de las APCs o por proteínas liberadas al medio debido a apoptosis o lisis de las APCs (11). Las líneas punteadas indican que las proteínas solubles o contenidas dentro de las células apoptóticas (no APCs) podrían llegar al BcR de linfocitos B por alguna otra vía no conocida. Los linfocitos Th activados estimulan a los Tc y a los B (12), favoreciendo la sobre expresión de moléculas de superficie (co-estimuladoras), así como también el cambio de isotipo. Los linfocitos activados migran hacia la periferia donde llevan a cabo su actividad efectora (13).