

**Título: La proteína de fusión dominio III-cápsida del virus Dengue-2, en forma altamente agregada, induce una respuesta inmune funcional y protección en ratones.**

**Autores:** Iris Valdés ([iris.valdes@cigb.edu.cu](mailto:iris.valdes@cigb.edu.cu)), Lisset Hermida, Lídice Bernardo, Lázaro Gil, Alekis Pavón, Laura Lazo, Carlos López, Yaremis Romero, Ivón Menéndez, Viviana Falcón, Lázaro Betancourt, Jorge Martín, Glay Chinaea, Ricardo Silva, María G. Guzmán, Gerardo Guillén.

**Centro de procedencia:** División de Vacunas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

## INTRODUCCIÓN

La infección por dengue es actualmente una de las enfermedades más importantes transmitidas por artrópodos, las cuales causan hasta de 25 000 muertes por año. Esta enfermedad es endémica en regiones tropicales y subtropicales, las cuales carecen de un adecuado control del mosquito *Aedes* [1,2]. La Fiebre por Dengue y la Fiebre Hemorrágica por Dengue son causadas por cuatro virus relacionados serológica y genéticamente, denominados virus dengue (DEN) tipos 1-4, los cuales pertenecen al género *Flavivirus* y familia *Flaviviridae* [1]. En la actualidad no existen vacunas licenciadas contra esta enfermedad. Sin embargo, algunos programas de vacunas se han focalizado en el desarrollo de vacunas vivas atenuadas de dengue [3-5], no obstante estos tienen desventajas como el fenómeno de interferencia viral entre serotipos, la reactogenicidad y la necesidad de varias dosis, las cuales han demorado su desarrollo clínico [3,6].

Varios trabajos en la literatura describen subunidades recombinantes de proteínas como candidatos de vacunas para Dengue [7-13]. Muchos emplean fragmentos de la glicoproteína de la envoltura (E), la cual es la mayor proteína estructural en la superficie del virión maduro y contiene epitopos neutralizantes [14]. Específicamente, la región del dominio III de la proteína E se ha propuesto que participa en el proceso de reconocimiento del receptor celular [15]. Además, se ha demostrado la funcionalidad de proteínas de fusión que contienen el dominio III de la proteína E del virus DEN, en términos de inducción de anticuerpos neutralizantes y protección, en ratones y monos [10,13,16-18]. Por otra parte, la inmunidad mediada por células (IMC) recientemente se ha reconocido como un factor importante en la protección contra el virus DEN en ratones [19-21]. Por otra parte, también esta demostrada la capacidad de protección parcial de una fracción semipurificada de la proteína de la cápsida, expresada en *Escherichia coli*, en el modelo de encefalitis viral en ratones sin la inducción de una respuesta inmune humoral funcional [22].

Teniendo en cuenta que las evidencias sugieren que tanto la rama humoral como celular de la respuesta inmune deben ser estimuladas para lograr desarrollar una vacuna efectiva contra el dengue, hemos diseñado y obtenido la nueva proteína quimérica dominio III-cápsida, que contiene fragmentos antigénicos potencialmente inductores tanto de anticuerpos neutralizantes como de inmunidad mediada por células. La molécula se produjo eficientemente en *E. coli* y cuando se inmunizó en ratones en forma de agregados de partículas, esta indujo

anticuerpos antivirales y neutralizantes, inmunidad mediada por células, y confirió un nivel significativo de protección.

## **DISEÑO METODOLÓGICO**

### **Expresión y purificación de la proteína quimérica dominio III-cápsida**

La región correspondiente al dominio III de la proteína E del virus DEN-2 (cepa Jamaica) se amplificó por RT-PCR y se clonó en el vector pGEM-T vector (Promega, USA), seguidamente se digirió con la enzima *Bam*HI y clonó en el vector de expresión pDC-2. El plasmidio pDC-2 fue obtenido previamente por Lazo y cols. (2007) [22] y contiene la región correspondiente al gen codificante de la proteína de la cápsida en el vector de expresión pQE30. El plasmidio resultante se denominó pDomIII-Capsid2.

La cepa XL1-Blue de *E. coli*, se transformó con los plasmidios pDomIII-Capsid2 o pDC-2. Los transformantes obtenidos se crecieron en cultivo LBA con IPTG para la expresión de la proteína de interés. Seguidamente las células se colectaron y se sometieron a un proceso de ruptura en Prensa Francesa (Othake, Japan). El sobrenadante de la ruptura se empleó para la purificación de la proteína soluble por cromatografía de intercambio iónico empleando una resina *SP-Sepharose FF* (Pharmacia, Sweden). La matriz se lavó para la eliminación de las contaminantes, y la proteína se eluyó y renaturalizó usando una matriz de *Sephadex G-25*.

### **Reacción de ensamblaje *in vitro* y microscopía electrónica**

La fracción semipurificada de la proteína dominio III-cápsida se sometió a un proceso de ensamblaje *in vitro*, por un procedimiento similar al descrito por Lopez y cols., 2009 [23]. El proceso consistió en la incubación de 20 µg de la proteína dominio III-cápsida con ODNs de 50 b de simple cadena de secuencias aleatoria, en una relación molecular proteína:ácido nucleico 3:1 en tampón TE. La reacción se incubó por 30 min a 30°C y se almacenó a 4°C. Posteriormente se analizó por Microscopía Electrónica de tinción negativa.

### **Inmunizaciones y ensayo de protección**

Ratones hembras BALB/c (Bc, H-2d) de 5-6 semanas de vida, se inocularon por vía intraperitoneal (i.p) en los días 0, 15, y 30. Todas las formulaciones se realizaron en 150 µL y se prepararon en hidróxido de aluminio (alúmina) a 1,44 mg/mL. Los grupos del estudio fueron: Grupo 1 (Placebo): 3 µg de ODNs por animal, (n=20). Grupo 2: 22,5 µg de dominio III-cápsida en forma no agregada por animal, (n=20). Grupo 3: 22,5 µg de dominio III-cápsida en forma agregada por animal, (n=58). Grupo 4 (Control positivo): una dosis de virus DEN-2 sin adyuvante, (n=20), en el día 30. Un mes tras la última dosis a diez animales de cada grupo se sangraron para colectar el suero y además se les extrajo el bazo para ensayos inmunológicos.

A su vez, un mes después de la última dosis, a 48 de los animales del Grupo 3, lo que recibieron 22,5 µg de la forma agregada de dominio III-cápsida, se dividieron en cuatro subgrupos (A, B, C y D). Los subgrupos A y B se inocularon por vía i.p con 100 µg de los AcM anti-CD8<sup>+</sup> (clone YTS 169.4) o el anti-CD4<sup>+</sup> (clone YTS 191.1), respectivamente. Al subgrupo C se le administró una solución de PBS y el subgrupo D se inoculó con el AcM 2C4, el cual se empleó como un anticuerpo control de isotipo. Tres días después, a dos animales de cada subgrupo se les extrajo el bazo y se confirmó que más del 94% de las células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> fueron eliminadas.

Finalmente, a los restantes animales de cada grupo se les inyectó por vía intracraneal (i.c) con 20  $\mu$ L de virus DEN-2 (cepa A15) con 50 dosis letales medias y se observaron por 21 días para el seguimiento de la mortalidad.

### **Detección de anticuerpos antivirales y neutralizantes por ensayo inmunoenzimático**

Los anticuerpos IgG anti-DEN tras la inmunización se monitorearon por ELISA como describió Lazo y cols., (2007) [22]. Los títulos se definieron como la dilución del suero donde se obtuvo el doble del valor de absorbancia del suero control negativo.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes se midieron por el ensayo de neutralización por reducción de placas (del inglés, PRNT) en células BHK-21 como se describió previamente [24]. Los títulos de anticuerpos neutralizantes se identificaron como la mayor dilución del suero que redujo al 50% del número de placas virales.

### **Cultivo de células, estimulación viral y detección de citocinas**

Las células del bazo se obtuvieron en condiciones asépticas, el cultivo y la estimulación viral, así como la eliminación selectiva de poblaciones celulares *in vitro* se realizó según Gil y cols 2009.

A partir del sobrenadante de cultivo de los esplenocitos previamente estimulados con cada antígeno viral, se determinó la concentración de IFN- $\gamma$ , mediante un ELISA de captura según las recomendaciones del productor. El límite de detección de la citocina fue de 4 pg/mL.

### **Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.00 (GraphPad Software, USA, (<http://www.graphpad.com>)). A los datos obtenidos durante la experimentación se les comprobó la normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov (corrección Dallal-Wilkinson-Liliefors) y la homogeneidad de varianzas por la prueba de Bartlett. Cuando los datos directos o transformados siguieron una distribución normal se aplicó un análisis paramétrico y en caso contrario se aplicó un análisis no paramétrico. Todos los valores con \*, \*\* y \*\*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente.

## **RESULTADOS**

### **Expresión y caracterización de la proteína dominio III-cápsida**

La región correspondiente al dominio III, aminoácidos 286-426 de la proteína E del virus DEN-2 se amplificó a partir del genoma por RT-PCR y se clonó dentro del vector de expresión pDC-2 [22], el cual contiene el gen que codifica para la proteína de la cápsida del virus DEN-2. El plasmidio resultante se nombró pDomIII-Capsid2. Las células XL1-*Blue* se transformaron con el plasmidio resultante y la expresión de la proteína se analizó por electroforesis, como resultado una banda de ~30 kDa, se detectó e inmunoidentificó empleando un líquido ascítico hiperinmune anti-DEN-2 (Fig. 1A), la cual se denominó dominio III-cápsida. La proteína se expresó de forma soluble y se purificó por un proceso similar al previamente descrito por López y cols., 2009 [23], obteniéndose una pureza de un 65%.

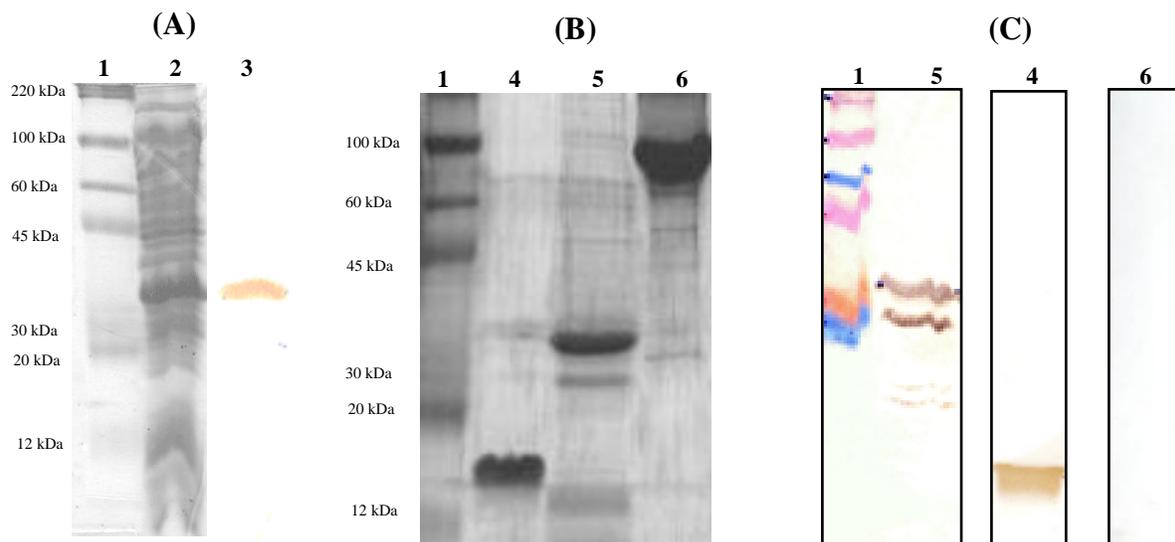
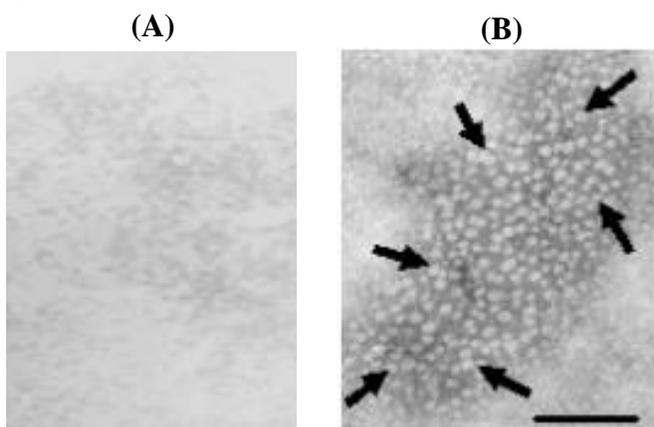


Figura 1. Expresión y caracterización antigénica de la proteína dominio III-cápsida. (A) Análisis por SDS-PAGE al 15% de la expresión del pDomIII-Capsid2. Líneas: (1) marcador de peso molecular; (2) sobrenadante de ruptura de las células transformadas con el plasmidio pDomIII-Capsid2; (3) *Western blot* del sobrenadante de ruptura con el LAH anti-DEN-2. (B) Análisis por SDS-PAGE al 12.5% de las proteínas controles y de la proteína dominio III-cápsida. Líneas: (1) marcador de peso molecular; (4) proteína de la cápsida; (5) proteína dominio III-cápsida; (6) proteína PD5 (P64k-dominio III del virus DEN-2). (C) *Western blotting* con anticuerpo monoclonal 8H8. Líneas: (1) marcador de peso molecular; (5) proteína dominio III-cápsida; (4) proteína de la cápsida; (6) proteína PD5.

El análisis de la proteína semipurificada dominio III-cápsida por SDS-PAGE mostró proteínas contaminantes de bajo peso (Fig. 2B). La identidad de estas bandas se examinó por *Western blot* usando el AcM 8H8. Como muestra la Fig. 2C, las bandas reaccionaron con el 8H8, sugiriendo que ellas son una consecuencia del proceso de degradación proteolítica.

### Proceso de ensamblaje in vitro

Con el objetivo de obtener estructuras particuladas de la proteína dominio III-cápsida, la preparación semipurificada se incubó con una mezcla de oligonucleótidos de ADN (ODNs) de 50 bases en una relación molar 3:1 proteína:oligonucleótido, similar al descrito por López y cols., (2009), [23] y la obtención de agregados se verificó por Microscopía Electrónica. Como se muestra en la Fig. 2, se observaron agregados que incluyen partículas solo en la muestra correspondiente a la reacción de ensamblaje. El diámetro de las partículas tuvo un rango de 20-22 nm.

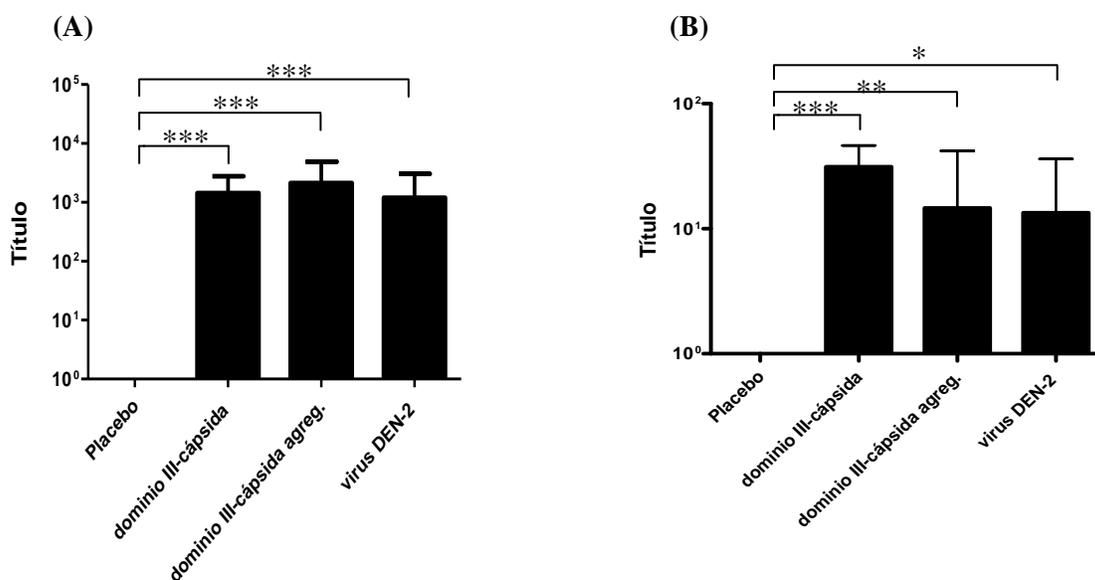


**Figura 2.** Caracterización de estructuras agregadas de la proteína dominio III-cápsida. La morfología y talla de los agregados de partículas se analizaron por Microscopía Electrónica de transmisión. (A) Muestra de proteína dominio III-cápsida sin ODNs; (B) Muestra de proteína dominio III-cápsida con ODNs. Las flechas negras indican las partículas de la proteína dominio III-cápsida. La barra representa 200 nm.

## Evaluación inmunológica de la proteína recombinante dominio III-cápsida

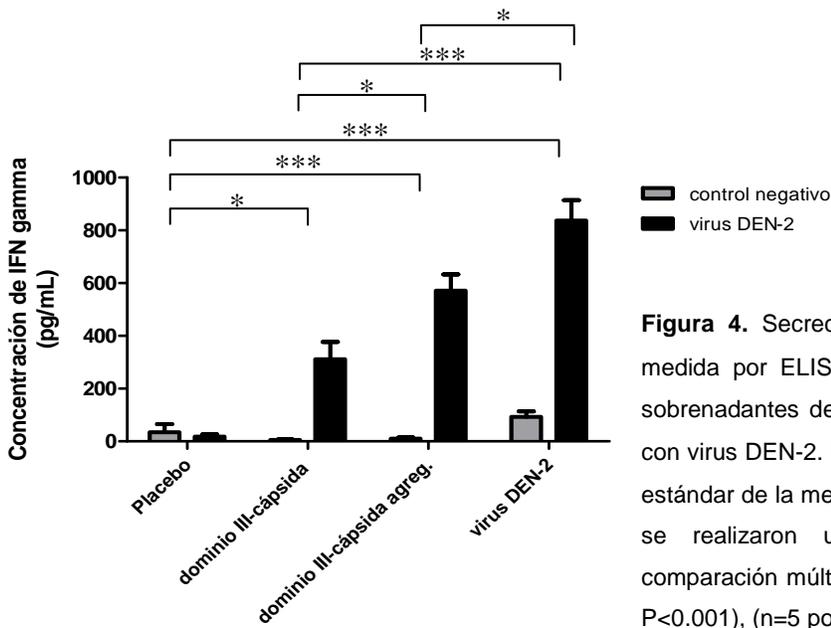
La inmunogenicidad de la proteína dominio III-cápsida en forma no agregada y agregada se evaluó en ratones en alúmina. Treinta días después de la tercera dosis, se determinó la respuesta inmune humoral y celular, y se evaluó la capacidad protectora inducida en respuesta al reto con virus DEN-2.

La evaluación por ELISA empleando el virus DEN-2 como antígeno mostró que todos los animales inmunizados tanto con la variante agregada o no agregada de la proteína desarrollaron una alta respuesta inmune humoral contra el virus DEN-2, ( $P < 0.001$ ) (Fig. 4A). La funcionalidad de estos anticuerpos se determinó además por un ensayo *in vitro* de neutralización. Similar a los resultados de ELISA, los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por ambas formulaciones, fueron similares entre ellos y a su vez, similares a los generados con el virus infeccioso (Fig. 4B).



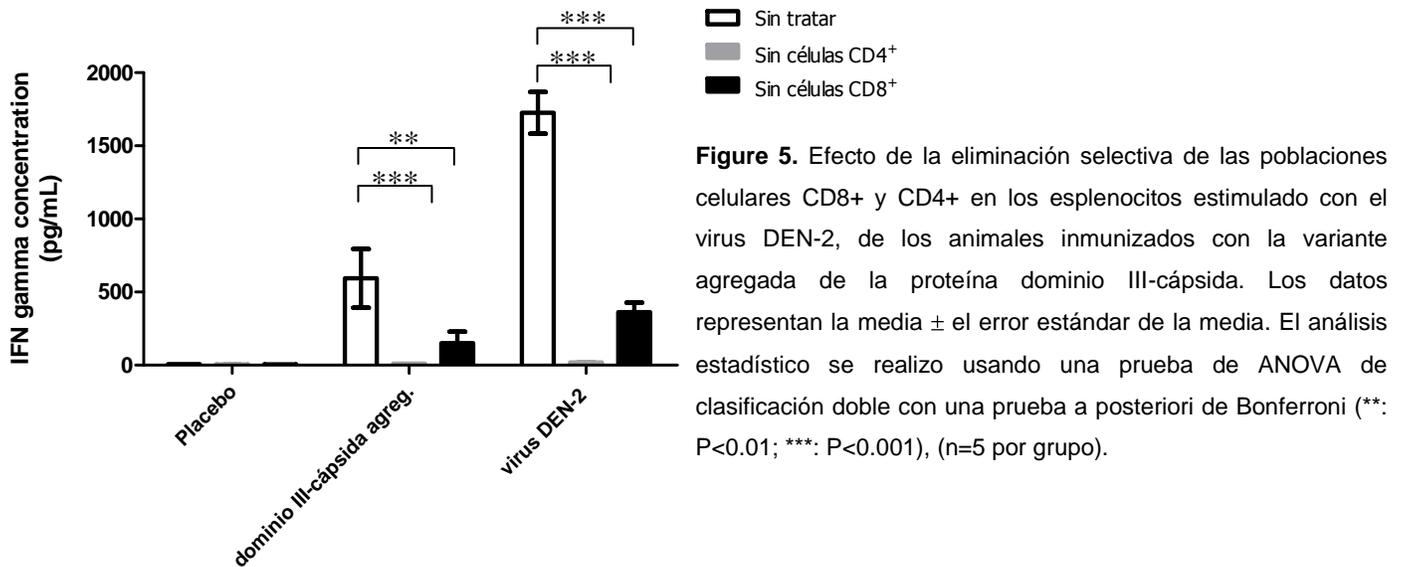
**Figura 4.** Respuesta inmune humoral en ratones inmunizados con la proteína dominio III-cápsida. (A) Respuesta de anticuerpos antivirales por ELISA. El análisis de los datos se realizó usando una prueba paramétrica de comparación múltiple de Tukey. Los datos representan la media geométrica  $\pm$  con el 95% de intervalos de confianza. (C) Respuesta de anticuerpos neutralizantes por PRNT. El análisis de los datos se realizó usando una prueba paramétrica de comparación múltiple de Tukey. Los datos representan la media geométrica  $\pm$  con el 95% de intervalos de confianza. (n=10 por grupo).

Los sobrenadantes de cultivo de las células del bazo de los animales inmunizados de cada grupo se evaluaron por ELISA para medir la concentración de IFN- $\gamma$ . Como se muestra en la Fig. 4, cuando se empleó el virus DEN-2 para la estimulación *in vitro*, los mayores niveles de secreción de IFN- $\gamma$  se obtuvieron en los esplenocitos de los animales inmunes a DEN-2 ( $837.0 \pm 154.6$  pg/mL), ( $P < 0.05$ ), con respecto a los restantes grupos. No obstante, los niveles de IFN- $\gamma$  secretados por los esplenocitos de los animales inmunizados con la forma agregada ( $570.9 \pm 124.33$  pg/mL) fueron superiores comparados con la forma no agregada ( $311.6 \pm 130.5$  pg/mL); ( $P < 0.05$ ).



**Figura 4.** Secreción de IFN- $\gamma$  tras estimulación *in vitro* medida por ELISA. (A) Concentración de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos estimulados con virus DEN-2. Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media. El análisis de los datos de los ELISA se realizaron usando una prueba paramétrica de comparación múltiple de Tukey (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ), ( $n = 5$  por grupo).

Teniendo en cuenta que la forma agregada de la proteína dominio III-cápsida generó los mayores niveles de secreción de IFN- $\gamma$ , realizamos un segundo experimento para determinar la contribución relativa de las poblaciones celulares CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en estos resultados. Como se muestra en la Fig. 5 y de acuerdo con los experimentos de estimulación viral *in vitro*, altos niveles de IFN- $\gamma$  fueron secretados por los esplenocitos de los animales inmunizados con la forma agregada de la proteína dominio III-cápsida. Estos niveles disminuyeron significativamente tras la depleción de las células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>; y un resultado similar se obtuvo para los esplenocitos de los animales inmunes a DEN-2 (Fig. 5).

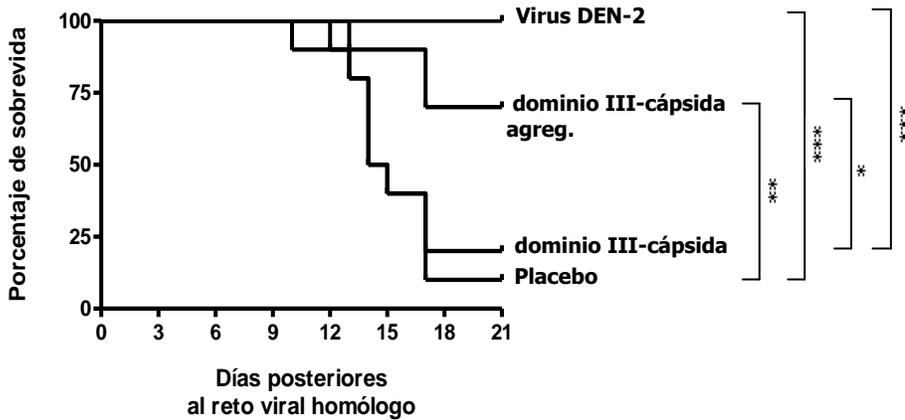


**Figure 5.** Efecto de la eliminación selectiva de las poblaciones celulares CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> en los esplenocitos estimulado con el virus DEN-2, de los animales inmunizados con la variante agregada de la proteína dominio III-cápsida. Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó usando una prueba de ANOVA de clasificación doble con una prueba a posteriori de Bonferroni (\*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ), ( $n = 5$  por grupo).

### Ensayo de protección

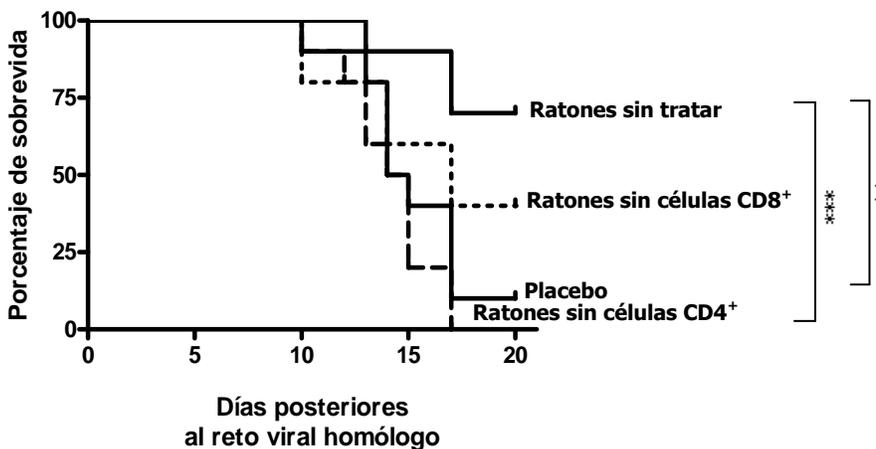
Con el objetivo de examinar la capacidad de conferir protección de las diferentes formulaciones, un mes tras la última dosis, 10 animales de cada grupo fueron inoculados por vía i.c con virus neuroadaptado de DEN-2. En la Fig. 6 se muestra los datos de mortalidad durante los 21 días de observación posterior al reto. La administración

de la forma no agregada, la proteína dominio III-cápsida fallo en proteger a los animales contra el reto neurovirulento, alcanzándose solo un 20% de sobrevivida. Interesantemente, la forma agregada de la formulación dominio III-cápsida protegió a 70% de los animales, esta protección fue estadísticamente significativa cuando se comparó con el control negativo ( $P < 0.01$ ) y a su vez fue similar a los altos niveles de protección que exhibió el grupo control positivo.



**Figure 6.** Estudio de protección. Los grupos de ratones se inmunizaron tanto con las siguientes formulaciones: placebo, las dos formas de la proteína dominio III-cápsida o la preparación infecciosa del virus DEN-2. Un mes tras la última inmunización, los animales se retaron intracranealmente con 50 LD<sub>50</sub> de virus DEN-2. Los datos de protección se analizaron por una prueba de Log-rank, (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ), (n=10 por grupo).

También se examinó el efecto producido por la depleción *in vivo* de las poblaciones celulares CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en la protección contra el reto con el virus DEN-2. Un mes tras la última dosis, un subgrupo de los animales inmunizados con la forma agregada se inoculó con anticuerpos monoclonales para eliminar las poblaciones CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, y seguidamente tres días después se retaron con virus neuroadaptado DEN-2. Posterior al periodo de observación, la tasa de sobrevivida disminuyó a 0% y 40% en los grupos donde se eliminaron las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, respectivamente, estos valores no mostraron diferencias con el grupo control negativo (Fig. 7). La tasa de sobrevivida en los grupos de ratones donde no se eliminaron estas poblaciones no se afectó por la inoculación del anticuerpo monoclonal 2C4, un anticuerpo control de isotipo (datos no mostrados). Además, la tasa de mortalidad en los ratones del grupo placebo no se afectó por la eliminación de las células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> (datos no mostrados).



**Figure 7.** Efecto de la eliminación selectiva *in vivo* de las poblaciones celulares CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> en la protección en los animales inmunizados con la forma agregada de la proteína dominio III-cápsida. El análisis estadístico se realizó por una prueba de Log-rank, (\*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ). (n=10 por grupo).

## DISCUSIÓN

Recientemente nuestro grupos demostró que la proteína semipurificada de la cápsida obtenida de forma recombinante en *E. coli*, confirió protección parcial en el modelo de encefalitis de ratón sin la inducción de una respuesta inmune humoral funcional [22]. Teniendo en cuenta que esta proteína se identificó como un blanco de la respuesta de células T-antiviral [25], se propone a esta molécula una participación de la inmunidad mediada por células. Por otra parte, también se demostró que las proteínas de fusión que contienen el antígeno P64k y el dominio III de la proteína E del virus DEN, puede inducir una respuesta de anticuerpos funcional, medida por la inducción de anticuerpos neutralizantes y protección en ratones y monos [10,13,16-18]. Dado que el dominio III también se ha visto que media la interacción del virus DEN con su posible receptor en las células blanco [14,15,26], decidimos obtener la nueva proteína quimérica dominio III-cápsida, como una molécula potencialmente capaz de inducir tanto respuesta inmune humoral como inmunidad mediada por células.

El producto quimérico se obtuvo en *E. coli* como una proteína soluble en el sobrenadante de ruptura, similar a la proteína de la cápsida [22]. La solubilidad de la proteína de fusión sugiere que la molécula se encuentra con una adecuada conformación, la cual es una importante condición para preservar la antigenicidad del fragmento del dominio III. La proteína dominio III-cápsida se obtuvo con un 65% después del proceso de purificación y se observaron contaminantes de bajo peso molecular durante el análisis por SDS-PAGE, los cuales se correspondieron con productos de degradación como reveló su reactividad con el 8H8.

La proteína parcialmente purificada se sometió a un proceso de particulación *in vitro* empleando ODNs para obtener una forma agregada con inmunogenicidad incrementada. Un proceso similar se empleó con anterioridad para el ensamblaje *in vitro* de la proteína de la cápsida, obteniéndose partículas semejantes a nucleocápsida (PSNs) con un diámetro aproximado de ~30 nm [23]. En el presente caso, el protocolo de particulación rindió especies altamente agregadas como reveló la Microscopia Electrónica, estos resultados permiten afirmar que la proteína de la cápsida es capaz de formar partículas incluso cuando tiene incluidos fragmentos de secuencias heterólogas en su estructura (~146 aminoácidos).

La evaluación inmunológica fue el último paso del presente trabajo. En la cual, las dos formulaciones de la proteína dominio III-cápsida, agregada y no agregada, se inocularon en ratones y se caracterizó la respuesta inmune inducida. El análisis de la respuesta humoral reveló la inducción de anticuerpos antivirales similar a los generados en el grupo inoculado con virus DEN-2. Estos anticuerpos neutralizaron al virus *in vitro*, lo cual confirmó la preservación de las características antigénicas del dominio III en la estructura quimérica. Interesantemente, la respuesta inmune humoral inducida por las dos formulaciones fue similar, lo que indicó que la conformación del dominio III no se modificó significativamente después de la agregación. Estos resultados constituyen una evidencia adicional de la capacidad del dominio III (como proteína de fusión) para inducir anticuerpos neutralizantes en ratones, hecho ya reportado anteriormente [7,16,17].

Por otra parte, el hecho de que las células del bazo provenientes de animales inmunizados secretaron altos niveles de IFN- $\gamma$  tras la estimulación *in vitro* con el virus DEN-2 reveló que el antígeno dominio III-cápsida es capaz de inducir inmunidad mediada por células. A diferencia de los resultados obtenidos para la respuesta inmune humoral, los esplenocitos de los animales inmunizados con la forma agregada mostraron mayores

niveles de secreción de IFN- $\gamma$  comparados con los del grupo que recibió la forma no agregada. Estos resultados son relevantes para el uso potencial de este antígeno como un candidato vacunal, dado que el IFN- $\gamma$  constituye un mediador de la respuesta inmune celular y se ha demostrado que tiene un rol clave en la actividad antiviral contra el dengue [21,27].

Los resultados del ensayo de protección contra en reto viral homólogo mostraron que la inmunización con la forma agregada de la proteína quimérica dominio III-cápsida lograron un nivel significativo de protección, el cual no fue detectable en la formulación no agregada. Estos resultados reflejan el comportamiento del ensayo de secreción *in vitro* descrito anteriormente, lo que sugiere que un elemento importante para la inducción de una respuesta inmune funcional en términos de IMC y protección lo fue la adición de los ODNs en la preparación parcialmente purificada de la proteína. Se conoce que las partículas o proteínas agregadas pueden ser mucho más eficientemente presentadas de forma cruzada que los antígenos solubles [28], pero por otra parte, hay diferentes estudios que muestran que los ODNs pueden tener capacidad adyuvante en la inducción de una inmunidad mediada por células a antígenos blancos [29]. Aunque los ODNs empleados en el estudio son una mezcla de diferentes secuencias no específicas de 50 b, de las cuales su capacidad adyuvante no se ha evaluado, se podría especular que la proteína dominio III-cápsida puede encapsularlos y favorecer su entrada en las células presentadoras de antígenos debido a su naturaleza agregada.

Finalmente, la contribución de las poblaciones celulares CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en la secreción de IFN- $\gamma$  *in vitro* así como en la protección, demuestra el papel funcional de la respuesta mediada por células inducida tras la inmunización, especialmente en el caso de la forma agregada de la proteína quimérica.

Teniendo en cuenta que previamente se han caracterizado varios subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> capaces de lisar a las células infectadas por enfermedades flavivirales [30], incluyendo el dengue [25,31-33], en el presente estudio se demostró que esta población de células estuvo directamente involucrada en proteger contra la enfermedad. Además, su papel como “células cooperadoras” podría considerarse. Por otra parte, las células CD8<sup>+</sup>, se conoce como una fuente de secreción de IFN- $\gamma$ , como se demostró consistentemente en el ensayo *in vitro*. Aunque en el experimento de eliminación de las poblaciones celulares *in vivo* no se alcanzó la significación estadística entre los grupos donde se eliminaron las células CD8<sup>+</sup> y el grupo control sin eliminar estas poblaciones, los porcentajes de supervivencia obtenidos posteriormente no mostraron diferencias estadísticas con respecto al grupo placebo, indicando que la protección obtenida no fue relevante. Esto significa que las células CD8<sup>+</sup> pueden influir en la protección del grupo donde no se eliminaron ambas poblaciones celulares. Basado en el fenómeno de presentación cruzada descrito profundamente para antígenos particulados, nosotros consideramos que la forma agregada de la proteína dominio III-cápsida es procesada por la vía MHC-I y los epitopos CD8<sup>+</sup> adecuadamente presentados, inducen una respuesta funcional de linfocitos T citotóxicos.

Es importante destacar que un futuro candidato vacunal basado en la presente molécula (dominio III-cápsida), probablemente deba contener una mezcla de los cuatro antígenos correspondientes a la región del dominio III de los serotipos 1-4, como una proteína de fusión, la cual induce anticuerpos serotipo-específicos [34]. Adicionalmente, nosotros también demostramos que la proteína de la cápsida del virus DEN-2 induce protección y secreción de IFN- $\gamma$  principalmente contra el serotipo homólogo (datos no publicados).

Nosotros podemos concluir que la nueva proteína quimérica dominio III-cápsida, como una construcción producida en *E. coli* y en forma altamente agregada por la adicción de oligonucleótidos, induce una respuesta inmune funcional e inmunidad mediada por células contra el virus DEN-2 y confiere protección en ratones.

## REFERENCIAS

- [1] Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 2002;33(4):330-42.
- [2] Stephenson JR. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bull World Health Organ* 2005;83(4):308-14.
- [3] Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P, Yoksan S, Forrat R, Attanath P, Sirivichayakul C, Pengsaa K, Pojjaroen-Anant C, Chokeyindachai W, Jagsudee A, Saluzzo JF, Bhamarapravati N. Safety and immunogenicity of tetravalent live-attenuated dengue vaccines in Thai adult volunteers: role of serotype concentration, ratio, and multiple doses. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66(3):264-72.
- [4] Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P, Yoksan S, Forrat R, Attanath P, Sirivichayakul C, Pengsaa K, Pojjaroen-Anant C, Chambonneau L, Saluzzo JF, Bhamarapravati N. Safety and immunogenicity of a three dose regimen of two tetravalent live-attenuated dengue vaccines in five- to twelve-year-old Thai children. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23(2):99-109.
- [5] Simasathien S, Thomas SJ, Watanaveeradej V, Nisalak A, Barberousse C, Innis BL, Sun W, Putnak JR, Eckels KH, Hutagalung Y, Gibbons RV, Zhang C, de la BR, Jarman RG, Chawachalalai W, Mammen MP, Jr. Safety and immunogenicity of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus naive children. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78(3):426-33.
- [6] Bhamarapravati N, Sutee Y. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 2000;18 Suppl 2:44-7.
- [7] 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(5):655-62.
- [8] Guzman MG, Rodriguez R, Rodriguez R, Hermida L, Alvarez M, Lazo L, Mune M, Rosario D, Valdes K, Vazquez S, Martinez R, Serrano T, Paez J, Espinosa R, Pumariega T, Guillen G. Induction of neutralizing antibodies and partial protection from viral challenge in *Macaca fascicularis* immunized with recombinant dengue 4 virus envelope glycoprotein expressed in *Pichia pastoris*. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69(2):129-34.
- [9] Putnak JR, Collier BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I, Bignami G, Houg HS, Chen RC, Barvir DA, Seriwatana J, Cayphas S, Garcon N, Gheysen D, Kanesa-Thasan N, McDonell M, Humphreys T, Eckels KH, Prieels JP, Innis BL. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine* 2005;23(35):4442-52.
- [10] Hermida L, Bernardo L, Martin J, Alvarez M, Prado I, Lopez C, Sierra BL, Martinez R, Rodriguez R, Zulueta A, Perez AB, Lazo L, Rosario D, Guillen G, Guzman MG. A recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue-2 envelope protein is immunogenic and protective in nonhuman primates. *Vaccine* 2006;24(16):3165-71.
- [11] Chen S, Yu M, Jiang T, Deng Y, Qin C, Qin E. Induction of tetravalent protective immunity against four dengue serotypes by the tandem domain III of the envelope protein. *DNA Cell Biol* 2007;26(6):361-7.
- [12] Babu JP, Pattnaik P, Gupta N, Shrivastava A, Khan M, Rao PV. Immunogenicity of a recombinant envelope domain III protein of dengue virus type-4 with various adjuvants in mice. *Vaccine* 2008;26(36):4655-63.
- [13] Valdes I, Hermida L, Martin J, Menendez T, Gil L, Lazo L, Castro J, Niebla O, Lopez C, Bernardo L, Sanchez J, Romero Y, Martinez R, Guzman MG, Guillen G. Immunological evaluation in nonhuman primates of formulations based on the chimeric protein P64k-domain III of dengue 2 and two components of *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2009;27(7):995-1001.

- [14] 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(6529):291-8.
- [15] Chen Y, Maguire T, Marks RM. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol* 1996;70(12):8765-72.
- [16] Hermida L, Rodriguez R, Lazo L, Silva R, Zulueta A, China G, Lopez C, Guzman MG, Guillen G. A dengue-2 Envelope fragment inserted within the structure of the P64k meningococcal protein carrier enables a functional immune response against the virus in mice. *J Virol Methods* 2004;115(1):41-9.
- [17] Hermida L, Rodriguez R, Lazo L, Bernardo L, Silva R, Zulueta A, Lopez C, Martin J, Valdes I, del RD, Guillen G, Guzman MG. A fragment of the envelope protein from dengue-1 virus, fused in two different sites of the meningococcal P64k protein carrier, induces a functional immune response in mice. *Biotechnol Appl Biochem* 2004;39(Pt 1):107-14.
- [18] Bernardo L, Izquierdo A, Alvarez M, Rosario D, Prado I, Lopez C, Martinez R, Castro J, Santana E, Hermida L, Guillen G, Guzman MG. Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue 1 envelope protein in non-human primates. *Antiviral Res* 2008;80(2):194-9.
- [19] van der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R, Strauss JH. Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *J Virol* 2000;74(17):8094-101.
- [20] Gil L, Lopez C, Blanco A, Lazo L, Martin J, Valdes I, Romero Y, Figueroa Y, Guillen G, Hermida L. The cellular immune response plays an important role in protecting against dengue virus in the mouse encephalitis model. *Viral Immunol* 2009;22(1):23-30.
- [21] Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, Qutubuddin A, Sidney J, Peters B, Prestwood TR, Sette A, Shresta S. A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol* 2009;182(8):4865-73.
- [22] Lazo L, Hermida L, Zulueta A, Sanchez J, Lopez C, Silva R, Guillen G, Guzman MG. A recombinant capsid protein from Dengue-2 induces protection in mice against homologous virus. *Vaccine* 2007;25(6):1064-70.
- [23] Lopez C, Gil L, Lazo L, Menendez I, Marcos E, Sanchez J, Valdes I, Falcon V, de la Rosa MC, Marquez G, Guillen G, Hermida L. In vitro assembly of nucleocapsid-like particles from purified recombinant capsid protein of dengue-2 virus. *Arch Virol* 2009;154(4):695-8.
- [24] Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 1985;22(2):250-4.
- [25] Gagnon 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(1):141-7.
- [26] Huerta V, China G, Fleitas N, Sarria M, Sanchez J, Toledo P, Padron G. Characterization of the interaction of domain III of the envelope protein of dengue virus with putative receptors from CHO cells. *Virus Res* 2008;137(2):225-34.
- [27] Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol* 2004;78(6):2701-10.
- [28] Ackerman AL, Giodini A, Cresswell P. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 2006;25(4):607-17.
- [29] Chaung HC. CpG oligodeoxynucleotides as DNA adjuvants in vertebrates and their applications in immunotherapy. *Int Immunopharmacol* 2006;6(10):1586-96.
- [30] Aihara H, Takasaki T, Matsutani T, Suzuki R, Kurane I. Establishment and characterization of Japanese encephalitis virus-specific, human CD4(+) T-cell clones: flavivirus cross-reactivity, protein recognition, and cytotoxic activity. *J Virol* 1998;72(10):8032-6.

- [31] Green S, Kurane I, Edelman R, Tacket CO, Eckels KH, Vaughn DW, Hoke CH, Jr., Ennis FA. Dengue virus-specific human CD4+ T-lymphocyte responses in a recipient of an experimental live-attenuated dengue virus type 1 vaccine: bulk culture proliferation, clonal analysis, and precursor frequency determination. *J Virol* 1993;67(10):5962-7.
- [32] Berrios V, Kurane I, Ennis FA. Immunomodulatory effects of IL-7 on dengue virus-specific cytotoxic CD4+ T cell clones. *Immunol Invest* 1996;25(3):231-40.
- [33] Gagnon SJ, Ennis FA, Rothman AL. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol* 1999;73(5):3623-9.
- [34] Izquierdo A, Bernardo L, Martin J, Santana E, Hermida L, Guillen G, Guzman MG. Serotype-specificity of recombinant fusion proteins containing domain III of dengue virus. *Virus Res* 2008;138(1-2):135-8.