

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Ensayo de linfoproliferación antígeno específico al virus dengue con células T humanas

*Dra. Ana Beatriz Pérez Díaz,<sup>1</sup> Dra. Beatriz Sierra Vázquez,<sup>2</sup> Lic. Iselys Delgado Hernández,<sup>3</sup> Lic. Rosemary Rodríguez Roche<sup>4</sup> y Dra. María G. Guzmán Tirado<sup>5</sup>*

### RESUMEN

Son cada vez más los trabajos encaminados a estudiar la respuesta inmune frente a la infección por virus dengue y el papel que pudiera desempeñar esta en la patogénesis de la fiebre hemorrágica del dengue. En este trabajo se estudió la respuesta de memoria de células T humanas en individuos con antecedentes de infección por dengue en la epidemia cubana, para una evaluación posterior de la antigenicidad de proteínas virales. Para esto se incubaron células mononucleares de sangre periférica de individuos inmunes a dengue y un grupo de individuos controles con antígenos virales. Se obtuvo una respuesta proliferativa significativa de linfocitos de individuos con antecedentes de infección frente al virus dengue 2 con respecto a individuos controles. Se comprobó de esta forma la respuesta de memoria de células T CD4<sup>+</sup> específicas al virus dengue en los individuos estudiados.

**Descriptores DeCS:** FIEBRE DENGUE HEMORRAGICA/inmunología; ANTIGENOS HLA-D; LINFOCITOS TCD4-POSITIVOS/inmunología; ANTIGENOS VIRALES/inmunología.

La infección por virus dengue es considerada en la actualidad un azote para países en áreas tropicales y subtropicales del mundo.<sup>1</sup> Se calcula que un aproximado de 80 000 000 de personas son afectados anualmente por esta enfermedad.<sup>2</sup>

Se ha estudiado la respuesta inmune al virus dengue en humanos, ratones y monos. Es sabido el papel de los anticuerpos en la protección y en la patogénesis de la enfermedad. A estos se atribuye la neutralización del virus y la lisis de células infectadas mediada por complemento y por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)<sup>3-5</sup> y también el fenómeno de amplificación

de la infectividad viral en las células diana, involucrado en el desencadenamiento de la *fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de shock por dengue* (FHD/SSD).<sup>6,7</sup>

Sin embargo, comparada con la respuesta humoral, la respuesta inmune celular ha sido menos estudiada. Se reporta la inducción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria específicos al virus tras una infección primaria en humanos.<sup>8</sup> Estos linfocitos proliferan en respuesta a diferentes serotipos virales, se observa gran reactividad cruzada entre serotipos, pero las respuestas mayores son generadas contra el serotipo causante de la infección.<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Especialista de I Grado en Inmunología.

<sup>2</sup> Máster en Ciencias. Especialista de I Grado en Inmunología.

<sup>3</sup> Máster en Ciencias. Licenciada en Microbiología.

<sup>4</sup> Máster en Ciencias. Licenciada en Radioquímica. Aspirante a Investigadora.

<sup>5</sup> Doctora en Ciencias Biológicas. Especialista de II Grado en Microbiología.

Está demostrado el papel rector de las células T CD4<sup>+</sup> en el desencadenamiento de la respuesta inmune,<sup>9</sup> así como el papel decisivo de las células T CD8<sup>+</sup> en la eliminación de células infectadas por virus y el aclaramiento viral.<sup>10,11</sup> De ahí que se le dé cada vez más peso a la identificación de las proteínas diana del reconocimiento de estas células y de secuencias inmunodominantes para su empleo en el diseño de futuros inmunógenos.<sup>12</sup> Existen varios trabajos encaminados a esta finalidad con la utilización de células T de ratones.<sup>13-15</sup> y humanas<sup>16-18</sup> con antígenos de virus dengue.

En Cuba ocurrió una epidemia en 1977 donde fue aislado el virus dengue 1.<sup>19</sup> El serotipo 2 viral se identificaba 4 años más tarde como el causante de una gran epidemia con un reporte de 344 203 casos entre dengue y dengue hemorrágico.<sup>20</sup> En 1997 se reporta una nueva epidemia de dengue 2 circunscrita al municipio Santiago de Cuba también con casos de FHD (Curso Internacional Avances en el conocimiento del dengue y dengue hemorrágico. Ciudad de La Habana, Cuba. 18 al 29 de agosto, 1997).

Para emprender trabajos encaminados a conocer la antigenicidad de proteínas y péptidos virales para células T humanas, así como estudiar el papel de estas células en la patogénesis de la FHD/SSD, el propósito de este trabajo fue normalizar un ensayo de linfoproliferación de células procedentes de individuos con antecedentes de infección por dengue en las epidemias cubanas, y enfrentarlas *in vitro* con antígenos del virus dengue 2.

## MÉTODOS

### MUESTRA

Se incluyeron en el estudio 13 individuos con antecedentes de infección por dengue en 1977 o 1981, procedentes de Ciudad de La Habana, en un rango de edad entre 20 y 48 años, de los cuales 9 eran mujeres y 4 hombres. Se estudió un grupo similar de sujetos controles sin antecedentes de infección clínica por dengue y se constató una ausencia de anticuerpos séricos al virus.

## DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS ANTI-DENGUE

Se empleó para la detección de anticuerpos séricos específicos al virus dengue un método inmunoenzimático ELISA de inhibición validado en el departamento.<sup>21</sup> Se titularon los sueros en diluciones dobles a partir de 1/20 valores en que son expresados los resultados de acuerdo con la última dilución de suero en que se detectó más de 50 % de inhibición.

### VIRUS

La cepa A15 del virus dengue 2 aislada en la epidemia cubana de 1981 fue inoculada en células de mosquito C6/36 y cultivada por 6 d en medio mínimo esencial suplementado con 2 % de suero fetal bovino (SFB) (Gibco). Se resuspendieron las células en su sobrenadante de cultivo y se procedió a una centrifugación a 10 000 rpm durante 30 min a 4 °C. El precipitado de células fue congelado y descongelado varias veces y centrifugado nuevamente a 10 000 rpm, 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se unieron y se concentraron los virus por precipitación con polietilenglicol 7 % con centrifugación en condiciones similares. El botón fue resuspendido en tampón fosfato salino (PBS) y centrifugado sobre gradiente continuo de sacarosa (20-60 % p/v) en tampón TNE (Tris Cl 50 mmol pH 7,4, NaCl 150 mmol, EDTA 10 mmol) a 28 000 rpm, 6 h a 4 °C.<sup>22</sup> Se colectó la banda visible de virus. El virus fue titulado por el método de placas<sup>23</sup> e inactivado posteriormente por incubación a 56 °C durante 1 h. Se estimó la concentración de proteínas por el método Lowry.<sup>24</sup> Fue preparado antígeno control con idéntico procedimiento con la utilización de células C6/36 no infectadas.

### ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN

Se extrajeron 10 mL de sangre venosa periférica a los individuos involucrados en el estudio, se empleó heparina (12 U/mL) como anticoagulante. La sangre fue diluida en solución Hank modificada (sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>) (Sigma) y se procedió al aislamiento de células mononucleares por centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Paque

(Histopaque-1077, Sigma).<sup>25</sup> Se extrajo el anillo de células y se lavaron estas, 3 veces con solución Hank. Finalmente fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con L-glutamina 100 mmol, penicilina-estreptomicina (100 UI/mL y 100 µg/mL) y 10 % de SFB. Se contaron y ajustaron las células a 10<sup>6</sup>/mL en el mismo medio y se dispensaron en placas de 96 pozos de cultivo, fondo U (Costar) a razón de 10<sup>5</sup> células por pozo. Se añadieron los antígenos virales a diferentes concentraciones: 5, 10, 20 y 40 µg/mL y se incluyó un control de mitógeno: phytohemaglutinina (PHA) a 5 µg/mL. También se incluyeron 2 concentraciones de control de C6/36. Cada prueba se montó por triplicado. Tras 6 d de cultivo a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda, las células fueron pulsadas con 1 µCi por pozo de timidina tritiada (Amersham; 2 Ci/mmol = 74 GBq/mmol) por 6 h en iguales condiciones. Las células fueron cosechadas sobre papel de fibra de vidrio (Skatron) con un cosechador de células (Skatron) y las emisiones β fueron medidas en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan en conteos por minuto (cpm) y en índice de estimulación (IE), que es el resultado del cociente de la media de los cpm de cada prueba entre la media de los cpm del control de síntesis espontánea de ADN. Fueron consideradas respuestas significativas aquellas cuyo IE fue > 2,0. Se rechazaron los valores de cpm de los triplicados que tenían un coeficiente de variación > 15 %. la comparación estadística de los resultados obtenidos entre los 2 grupos de estudio (muestra y controles) se realizó por la prueba t de Student con un criterio de significación aceptado para p < 0,05. Se aplicó *test* de correlación entre las variables título de anticuerpos e índice de estimulación de los linfocitos.

## RESULTADOS

### DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS ADENGUE

Se realizó la determinación de anticuerpos específicos a dengue en los sueros de los individuos evaluados. Se detectaron títulos variables: 3 con 1/20, 2 con 1/40, 1 con 1/80 y 7 con un título de 1/160.

### RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA DE CÉLULAS T

Se empleó en el estudio un control de proliferación con mitógeno (PHA), y se obtuvieron en todos los casos índices de estimulación normales (> 20).

La respuesta al antígeno viral fue constatada en todos los casos en que fueron detectables anticuerpos en el suero, resultó esta significativa (p < 0,01) a concentraciones de 10, 20 y 40 µg/mL, no así de 5 µg/mL (p = 0,07) al ser comparados los resultados con los del grupo control. No hubo respuesta proliferativa frente a antígenos celulares de C6/36 (tabla).

La respuesta proliferativa óptima fue observada para concentraciones del virus entre 20 y 40 µg/mL, no se evidenció diferencia significativa en los índices de estimulación entre ambas concentraciones (fig.).

La estimulación obtenida fue variable entre los individuos inmunes estudiados y mostró coeficientes de variación altos en este grupo (tabla).

Las células mononucleares de individuos no inmunes a dengue no proliferaron en respuesta al virus ni al control celular, a ninguna de las concentraciones empleadas en el ensayo.

Se comprobó la correlación entre los niveles de anticuerpos séricos de los individuos inmunes y los índices de estimulación de los linfocitos frente

**TABLA.** Respuesta proliferativa de células T humanas *in vitro* al virus dengue a diferentes concentraciones

Grupo de estudio	Proliferación al virus (IE)								Proliferación al control celular (IE)	
	5		10		20		40		20	
Concentración (µg/mL)	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
Individuos inmunes al dengue	3,2	2,7	6,6	6,2	9,4	8,7	9,3	8,3	1,7	0,5
Individuos no inmunes	1,4	0,2	1,5	0,3	1,5	0,3	1,6	0,3	1,6	0,6

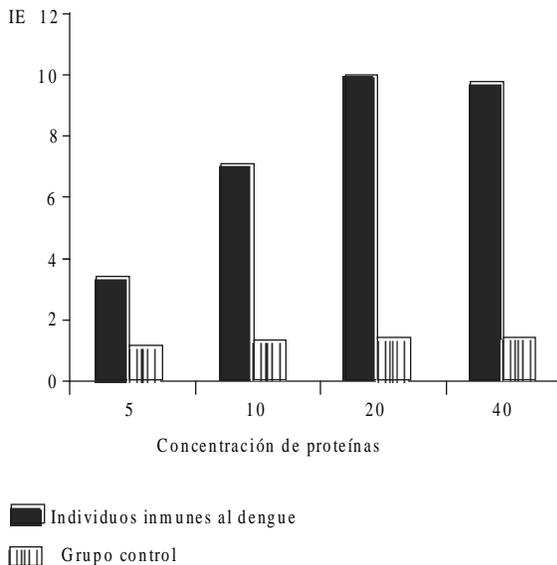


Fig. Índices de estimulación (IE) de linfocitos T procedentes de individuos con antecedentes de infección por dengue y de individuos controles, al ser enfrentados en cultivo a antígenos del virus dengue 2.

al virus, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,74 con  $p < 0,05$ .

## DISCUSIÓN

El conocimiento de los mecanismos de la respuesta inmune que participan en la defensa contra infecciones virales y de cuáles son las regiones inmunorrelevantes de los virus involucradas en el desencadenamiento de esa respuesta, son tópicos de gran interés que constituyen objetivos de muchas investigaciones en la actualidad.

En la infección por virus dengue se ha constatado respuesta de memoria de células T en individuos con antecedentes de infección primaria. Estas células son capaces de reconocer epitopes y proliferar frente a diferentes serotipos del virus de forma cruzada.<sup>8</sup>

El estudio de la respuesta de linfoproliferación a antígenos de virus dengue fue de gran utilidad en este caso para explorar el estado de memoria de células T CD4<sup>+</sup>, en individuos que sufrieron la infección por el virus en una epidemia de hace más de 15 años y, en segundo lugar, por la necesidad de contar con una técnica útil para medir la antigenicidad para células T humanas de proteínas y péptidos virales en el laboratorio.

En el presente ensayo la variable principal es la concentración del antígeno estimulante con vistas a fijar una concentración óptima de trabajo, pues las condiciones generales como son el tiempo de incubación del cultivo (6 d), la cantidad de células por pozo, la cantidad de timidina y el tiempo de pulso con esta, fueron variables prefijadas por ser bastante conservadas en los estudios con muestras de células mononucleares humanas de sangre periférica en ensayos de blastogénesis con antígenos.<sup>26</sup>

Con el objetivo de comprobar el estado de inmunocompetencia de las células T de los individuos de la muestra en respuesta a mitógeno, se incluyó el control de proliferación a PHA.

La estimulación óptima se logró a concentraciones de proteínas en el orden de las decenas de microgramos (20 µg/mL), comparables con las reportadas en otros trabajos, que refieren valores entre 1 y 10 µg/mL.<sup>14,15</sup>

Los IE obtenidos del cultivo de las células de los individuos con antecedentes de infección con los antígenos virales demuestran una vez más la persistencia de células T de memoria específicas al virus en estos sujetos, y que no alcanzan valores significativos en el grupo control. La historia previa de infección: serotipo viral 1, 2 ó ambos y el número de infecciones sufridas (en una o en las 2 epidemias), además de las particularidades genéticas individuales, son causas de variación en los IE entre individuos. Es recomendable clasificar a los individuos según estos parámetros con la finalidad de conocer la influencia de estos en la respuesta.

La correlación entre los niveles de anticuerpos séricos y la respuesta proliferativa anamnésica de los linfocitos T *in vitro* de los individuos inmunes, demuestra una correspondencia en intensidad entre las respuestas inmunes humoral y celular ante el reto antigénico<sup>27</sup> y parece estar sujeto al hecho del diferente grado de comprometimiento del sistema inmune de cada individuo durante la(s) infección(es) previa(s) y el tiempo transcurrido desde esta(s).

En los últimos años se han identificado proteínas del virus que contienen epitopes para células T humanas, también se demostró el reconocimiento por células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de péptidos de las proteínas E,<sup>14,15</sup> NS3<sup>18,28</sup> y C.<sup>29</sup>

El papel de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la infección está aún por aclarar, no obstante se sugiere que su

función pudiera relacionarse con la patogénesis de la enfermedad. Se han detectado niveles solubles de CD4 y otros marcadores de activación de estas células en sueros de pacientes con FHD a niveles mucho mayores que los detectados en la FD.<sup>30</sup> Además, las células T activadas secretan linfoquinas que pudieran contribuir también al agravamiento del cuadro clínico de la enfermedad.<sup>31</sup>

Serán necesarios estudios que contribuyan al esclarecimiento de estas interrogantes y precisen mejor las dianas fundamentales de la respuesta protectora en humanos.

Este estudio permite concluir que es detectable una respuesta inmune de memoria específica a virus dengue después de más de 15 años de haber padecido la infección, esto permitirá futuros estudios en Cuba sobre la inmunopatogenia de la infección por dengue y la antigenicidad de proteínas virales.

#### SUMMARY

Papers dealing with the study of the immune response to dengue virus infection and with the role it may play in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever are increasingly important. The memory human T cell response in individuals with history of dengue infection during the Cuban epidemic was studied in this paper for a further evaluation of the antigenicity of viral proteins. To this end, mononuclear cells of peripheral blood from individuals immune to dengue and from a group of control subjects with viral antigens were incubated. It was obtained a significant proliferative response of lymphocytes from individuals with history of infection against dengue virus type 2 compared with control subjects. It was proved this way the dengue virus-specific memory T CD4<sup>+</sup> cell response in the individuals under study.

**Subject headings:** DENGUE HEMORRHAGIC FEVER/immunology; HLA-D ANTIGENS; CD4-POSITIVE T-LYMPHOCYTES/immunology; ANTIGENS, VIRAL/immunology.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gubler DG, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic 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;91:2395-400.
- Gentry MK, Henchal EA, McCown JM, Brandt WE, Dairymple JM. Identification of distinct antigenic determinants on dengue-2 virus using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1982;31:548-55.
- Falgout B, Bray M, Schlesinger JJ, Lai CJ. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J Virol* 1990;64:4356-63.
- Kurane I, Hebblewaite D, Ennis FA. Characterization of monoclonal antibodies of human lymphocytes active in natural killing and antibody-dependent cell mediated cytotoxicity of dengue virus-infected cells. *Immunology* 1986;58:429-36.
- Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis* 1989;11:S830-9.
- Morens DM. Antibody dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis* 1994;19:500-12.
- Kurane IE. Immunity and immunopathology in dengue virus infection. *Immunology* 1992;4:121-7.
- Barnaba V, paroli M, Franco A. The role of T-helper lymphocyte subsets in antiviral immunity. *Res Virol* 1993;144:259-61.
- Mossman TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th<sub>1</sub>, Th<sub>2</sub> and more. *Immunol Today* 1996;17:138-46.
- Zinkernagel RM. Immunity to viruses. In: William EP. *Fundamental Immunology*. 3 ed. New York: Raven, 1993:1211-47.
- Arnon R, Regenmortel MHV van. Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines. *The FASEB J* 1992;6:3265-74.
- Rothman AL, Kurane I, Lai CJ, Bray M, Falgout B, Men R, et al. Dengue virus protein recognition by virus-specific murine CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 1993;67:801-6.
- Leclerc C, Deriaud E, Megret F, Briand JP, Regenmortel MHV van, Deubel V. Identification of helper T cell epitopes of dengue virus E-protein. *Mol Immunol* 1993;30:613-25.
- Roehrig JT, Risi PA, Brubaker JR, Hunt AR, Beaty BJ, Trent DW, et al. T-helper cell epitopes on the E-glycoprotein of dengue 2 Jamaica virus. *Virology* 1994;198:31-8.
- Bukowski JF, Kurane I, Lai CJ, Brav M, Falgout B, Ennis FA. Dengue virus-specific cross-reactive CD8<sup>+</sup> human cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 1989;63:5066-91.
- Kurane I, Brinton MA, Samson AL, Ennis FA. Dengue virus-specific, human CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cell clones multiple patterns of virus cross-reactivity recognized by NS3-specific T-cell clones. *J Virol* 1991;65:1823-8.
- Livingston PG, Kurane I, Dai LC, Okamoto Y, Lai CJ, Men R, et al. Dengue virus-specific, HLA-B35-restricted, human CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones. *J Immunol* 1995;22:1287-95.
- Más P. Dengue fever in Cuba in 1977: some laboratory aspects. In: Pan American Health Organization. *Dengue in the Caribbean*. Washington DC, 1977;40-3 (PAHO Scientific Publication;375).
- Guzmán MG, Kourí G, Soler M, Morier L, Vázquez S. Aislamiento del virus dengue 2 en sueros de pacientes utilizando el ratón lactante y cultivo de células LLCMK2. *Rev Cubana Med Trop* 1984;36:4-10.
- Vázquez S, Fernández R. Utilización de un método de inhibición de ELISA en el diagnóstico serológico de dengue. Reporte preliminar. *Rev Cubana Med Trop* 1989;41:18-26.
- Gould EA, Clegg JCS. Growth, titration and purification of alphaviruses and flaviviruses. A practical approach in *Virology*, 1991;68-72.
- Morens DM, Halstead S. 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;22:250-6.
- Lowry O, Roselrough NJ, Farr LA. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Bio Chem* 1951;193:265-75.
- Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1966;21:77-81.
- Knight SC. Lymphocyte proliferation assays. In: *Lymphocytes: a practical approach*. Ed. GGG Klaus. IRL Press Limited, 1987; 189-207.
- Janeway CA Jr, Travers P. Host defense against infection. In: *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 2<sup>nd</sup> ed. Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc., 1996;9:1-9:41.
- Kurane I, Dai LCh, Livingston PG, Reed E, Ennis FA. Definition of HLA-DPw2- Restricted epitope on NS3, recognized by a dengue virus serotype-cross-reactive human CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cell clone. *J Virol* 1993;67:6285-8.

29. Gagnon SJ, Zeng W, Kurane I, Ennis FA. Identification of two epitopes on dengue 4 virus capsid protein recognized by a serotype-specific and a panel of serotype-cross-reactive human CD4<sup>+</sup> cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol* 1996;70:141-7.
30. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, *et al.* Activation of T lymphocytes in dengue virus infections: high levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2 and interferon- $\gamma$  in sera of children with dengue. *J Clin Invest* 1991;88:1473-8.

31. Kurane I, Ennis FA. Cytokines in dengue virus infections: role of cytokines in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Semin Virol* 1994;4:43-8.

Recibido: 18 de enero del 2000. Aprobado: 14 de junio del 2000.  
Dra. *Ana Beatriz Pérez Díaz*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: [ciipk@ipk.sld.cu](mailto:ciipk@ipk.sld.cu)