

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

Detección de respuesta linfoproliferativa en monos inoculados con virus dengue 4

Lic. Gissel García,¹ Lic. Mailing Álvarez,² Lic. Elaine Santana,³ Dr. José Rafael Martínez,⁴ Dr. Alejandro Álvarez,⁵ Lic. Rosmary Rodríguez⁶ y Dra. María G. Guzmán⁷

RESUMEN

Se inmunizó con virus dengue 4 (cepa estándar H247), un grupo de 6 monos *Cynomolgus* y, 60 d después de la inoculación, se midió la proliferación celular frente al mismo serotipo, así como frente a los serotipos heterólogos 1 y 2. Se detectó una respuesta proliferativa predominantemente serotipo específica y alguna reactividad cruzada. Estos resultados evidencian un comportamiento de los primates en alguna medida similar al de humanos y ratones, en la respuesta serotipo específica y serotipo cruzada al virus dengue.

DeCS: VIRUS DEL DENGUE/inmunología; DENGUE/inmunología; MACACA FASCICULARIS; MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD; LINFOCITOS T/inmunología.

Los progresos para entender la inmunopatogénesis del dengue han sido lentos por la ausencia de un modelo animal que la reproduzca. El estudio de la respuesta inmune a virus dengue se ha llevado a cabo en humanos y ratones. Así, por ejemplo, se ha estudiado en ambas especies la respuesta de linfocitos T CD4+ y CD8+; se encontró que esta en ratones, es cualitativamente similar a la que tiene lugar en los humanos, caracterizándose por una fuerte respuesta específica y respuesta de reactividad cruzada. Estos resultados fueron las bases para la elaboración de una hipótesis sobre el papel que podrían desempeñar estas células en el desarrollo de la forma severa de la enfermedad. *Kurane* y otros plantearon que, durante una infección secundaria por virus dengue, la respuesta de linfocitos T podría inducir la pérdida de plasma,

tanto directa como indirectamente a través de la liberación de citoquinas vasoactivas y otros mediadores.¹

Estudios filogenéticos de diferentes aislamientos de virus dengue sugieren que este circula de forma natural en un reservorio de la selva, probablemente en primates no humanos,² por lo que pudiera esperarse que estas especies proveyeran un modelo útil para su estudio. Con este objetivo, varios primates no humanos han sido infectados experimentalmente y se ha comprobado en ellos el desarrollo de una viremia similar a la que tiene lugar en el hombre, pero con bajos títulos de anticuerpos y los animales generalmente no muestran signos de la enfermedad.³ Sin embargo, la respuesta linfoproliferativa no ha sido muy estudiada en estas especies animales.

¹ Máster en Virología. Licenciada en Bioquímica. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

² Máster en Virología. Licenciada en Microbiología. IPK.

³ Máster en Virología. Licenciada en Microbiología. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

⁴ Médico Veterinario. CIGB.

⁵ Máster en Infectología. Especialista de I Grado en Inmunología. IPK.

⁶ Máster en Virología. Licenciada en Radio Química. IPK.

⁷ Doctora en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Microbiología. IPK.

TABLA. Datos previos de los monos que componen el estudio

	Monos adultos			Monos jóvenes		
	A-1	A-2	A-3	J-1	J-2	J-3
Edad	> 4 años	> 4 años	> 4 años	2 años	1 año	1 año
Peso (kg)	2,70	8,81	8,79	2,13	1,98	2,01
Título de anticuerpos a los 60 d por ELISA	1/160	< 1/20	1/80	1/20	1/40	1/20

MÉTODOS

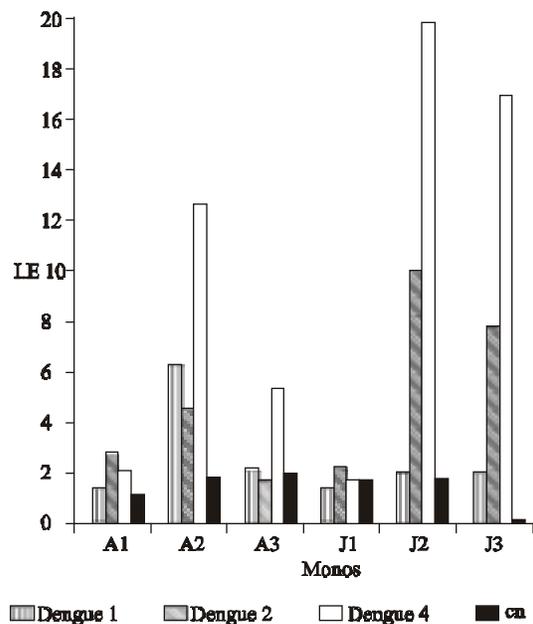
Un grupo de 6 monos *Cynomolgus* (*Maccaca fascicularis*), 3 jóvenes y 3 adultos, fueron inoculados con virus dengue 4 (D4) (cepa standard H247) por vía subcutánea, a una concentración de 10^5 PFU (del inglés *plaque formed unit*). Los monos, en su mayoría (5 monos), desarrollaron títulos de anticuerpos (tabla). Se les extrajo, 60 d después, 10 mL de sangre total a los 6 animales para los ensayos de linfoproliferación (ELP).

La sangre heparinizada fue diluida en solución de Hank modificada (sin calcio y magnesio) (Sigma), para el aislamiento de las células mononucleares según el método estándar descrito.⁴ La suspensión celular se incubó en presencia de los antígenos de dengue 1 (cepa Hawii), dengue 2 (cepa Nueva Guinea C) y dengue 4 (cepa H242), a las concentraciones de $1,845 \mu\text{g/mL}/2,1 \times 10^3$ PFU, $260 \mu\text{g/mL}/4,5 \times 10^3$ PFU y $930 \mu\text{g/mL}/10^5$ PFU, respectivamente; durante 6 d para el ELP y por un tiempo de 48 h para el fenotipaje celular. La timidina tritiada, a la concentración de $1 \mu\text{Ci}$, fue añadida 6 h antes de culminar el cultivo, en los pozos destinados a la proliferación. Tras 6 h, las placas fueron congeladas a -70°C hasta su cosechamiento y posterior conteo de emisiones β (cpm). Los resultados se expresaron en *índice de estimulación* ($\text{IE} = \text{media cpm}/\text{media control cerebro}$). Se consideraron positivos aquellos que cumplieron con la condición $\text{IE} \geq 2$.

RESULTADOS

Los resultados de este trabajo evidenciaron en los monos utilizados, pertenecientes al género *Maccaca*, especie *fascicularis* (*Maccaca fascicularis*), una respuesta linfoproliferativa específica al virus dengue 4, agente causal de la

viremia, así como respuestas reactivas cruzadas marcadas, en 3 de los casos, frente a los serotipos heterólogos. La respuesta específica, como puede observarse en la figura, tuvo una tendencia a ser mayor en los monos jóvenes en comparación con los monos adultos. Esta tendencia también puede observarse en el caso de la respuesta de reactividad cruzada frente al serotipo 2.



A: adulto J: joven

Fig. Respuesta linfoproliferativa frente a los antígenos virales y el control de cerebro.

DISCUSIÓN

Estos resultados obtenidos en macacos, guardan relación con los hallados por el grupo de *Kurane* y *Rothman* en humanos y en ratones, en

1989.^{5,6} Estos investigadores, en ambas especies, encontraron linfocitos T de memoria CD4+ específicos a virus dengue después de una infección primaria, así como células T de reactividad cruzada a otros serotipos virales. De los resultados de aquellos estudios se concluyó que, en teoría, los linfocitos T podrían ser capaces de responder con acelerada cinética durante una infección secundaria por virus dengue.⁷ En los experimentos en humanos, la respuesta predominante fue al serotipo viral frente al cual el donador había sido infectado, pero la respuesta *cross*-reactiva a los serotipos heterólogos mostró una variación entre sujetos. Como puede observarse en la figura, la variación en la respuesta cruzada entre individuos también es apreciable en el presente trabajo. Otra coincidencia viene porque fue el serotipo 2 el de mayor reconocimiento cruzado. Esto podría explicarse debido a que, entre las células que proliferan en este experimento se encuentran de clones linfocitos T, los que reconocen con más frecuencia epítopes sobre las proteínas no estructurales altamente conservadas. Un ejemplo en ese sentido parece ser el caso de la serina proteasa del virión NS3 que, al parecer, constituye un blanco para estos linfocitos⁸⁻¹⁰ y posee una gran similitud entre los serotipos 2 y 4.¹¹

Por otra parte, los resultados de este estudio muestran que la respuesta proliferativa fue más evidente y acentuada en los monos jóvenes, lo cual guarda cierta similitud con lo que ocurre en humanos. Se plantea que en individuos jóvenes, se encuentran aumentadas las condiciones para una óptima y mantenida activación de las células T.¹²

Si bien esta especie no constituye un modelo animal que permita descifrar el enigma que encierra el desencadenamiento de la enfermedad por dengue, se puede decir que, los resultados obtenidos guardan similitud a lo estudiado previamente en humanos. Un estudio más profundo en monos de esta especie, que conlleve a establecer correlaciones con los humanos, podría ser de mucha utilidad para explicar con mayor certeza los resultados obtenidos.

SUMMARY

A group of 6 *Cynomolgus* monkeys was immunized with dengue 4 virus (H247 standard strain). 60 days after inoculation the

cellular proliferation against the same serotype as well as against heterologous serotypes 1 and 2 was measured. A proliferative response predominantly of the specific serotype and some cross reactivity were detected. These results showed a behavior of primates similar in some extent to that of human beings and mice regarding the specific serotype and cross serotype response to dengue virus.

Subject headings: DENGUE VIRUS/immunology; DENGUE/immunology; MACACA FASCICULARIS; DISEASE MODELS, ANIMAL: T-LYMPHOCYTES/immunology.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rothman AL, Ennis FA. Toga/Flaviviruses: Immunopathology En Effects of Microbes on the Immune System. Ed. by N.Wcunningham and R.S.Fujinami. 2000.
- Rico-Hesse, R. Molecular evolution and distribution of dengue virus type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990;174:479-93.
- Halstead SB, Shotwell H, Casals J. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys.II. Clinical laboratory response to heterologous infection. *J Inf Dis* 1973; 128:15-22.
- Boyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Isolation of mononuclear cell by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Lab Invest* 1968;21:77-89.
- Rothman AL, Kurane I, Zhang YM, Lai CJ, Ennis FA. Dengue virus-specific murine T-lymphocyte proliferation: serotype specificity and response to recombinant viral proteins. *J Virol* 1989;63:2486-91.
- Kurane I, Kontny U, Janus J, Ennis FA. Dengue-2 virus infection of human mononuclear cell lines and establishment of persistent infections. *Arch Virol* 1990;110:91-101.
- Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *Virology* 1999;257:1-6.
- 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- γ in sera of children with dengue. *J Clin Invest* 1991;88:1473-80.
- Kurane I, Brinton MA, Samson AL, Ennis FA. Dengue virus-specific, human CD4+ CD8- cytotoxic T cell clones. Multiple patterns of virus cross-reactivity recognized by NS3- specific T cell clones. *J Virol* 1991;65:1823-8.
- 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;98:1684-94.
- Murthy HM, Clum S, Padmanabhan. Dengue Virus NS3 serine protease. *J Biol Chem* 1999;274:5573-80.
- Abbas AK. Effector mechanism of immune response in cellular and molecular immunology.3.ed.1997:250-76.

Recibido: 14 de marzo de 2001. Aprobado: 15 de agosto de 2002.

Lic. *Gissel García*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf", Autopista Novia del Mediodía, km 6 ½, La Lisa, Apartado Postal 601. Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: ciipk@ipk.sld.cu