

## Evaluación de una Vacuna de DNA contra la Infección del Virus de la Parotiditis Humana (MuV).

Emma del Carmen Herrera Martínez y Blanca Lilia Barrón.

*Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Carpio y Plan de Ayala S/N, Casco de Santo Tomás, México D.F. 11340, México.*

E mail.: blue\_emma79@hotmail.com; blbr49@yahoo.com

**Palabras clave:** vacuna de DNA, parotiditis, HN

**Keywords:** DNA vaccine, mumps, HN

### RESUMEN

La parotiditis o “paperas” es un síndrome causado por el virus de la parotiditis humana (MuV), este virus pertenece al género *Rubulavirus* familia Paramixoviridae. Es un virus envuelto que mide de 100 a 600 nm, su material genético es RNA de cadena sencilla que codifica para siete proteínas virales. La proteína HN es el principal determinante antigénico del virus y además es la responsable de reconocer al receptor celular (ácido sialico) y de prevenir la autoagregación de la progenie viral. Hasta el momento se reconoce un solo serotipo de MuV, sin embargo, se han encontrado al menos diez genotipos en base a la secuencia de aminoácidos de la proteína viral SH. En los últimos años se ha presentado un aumento en el número de casos de parotiditis, principalmente por la falla en la aplicación de los esquemas completos de inmunización y cocirculación de diferentes genotipos en poblaciones vacunadas y no vacunadas. Además, se han asociado algunos casos de meningitis y encefalitis con los virus de las cepas vacunales. Ante esta situación se buscan nuevas opciones de vacunación, como pueden ser las vacunas de DNA. El presente proyecto plantea desarrollar una vacuna de DNA que contenga el gen de la proteína HN, la cual es indispensable para la infección viral. La secuencia que se eligió del gen HN para el desarrollo de esta vacuna proviene de una zona muy conservada entre los distintos genotipos de MuV. Esta construcción transfectada en células Vero expresó una proteína que fue reconocida por un suero hiperinmune anti-paperas, la cual mostró también actividad de hemaglutinina y de neuraminidasa. Bajo estas consideraciones, actualmente estamos evaluando la capacidad inmunogénica de esta vacuna de DNA, utilizando el modelo de infección de paperas en hamster.

### ABSTRACT

Mumps is an illness caused by the mumps virus (MuV), which belongs to the *Rubulavirus* genus, Paramixoviridae family. It measures 100 to 600 nm and contains a single stranded negative RNA, which codifies seven viral proteins. The HN protein is the main antigenic determinant and also responsible of cellular binding protein recognition (sialic acid) and prevention of viral progeny aggregation. Nowadays, only one serotype has been recognized, nevertheless it has been classified in ten genotypes based on amino acids sequence from the SH viral protein. In the last years there has been an increase in the number of mumps cases, mainly due to incomplete vaccine schedule application and probably to cocirculation of different genotypes in vaccinated and unvaccinated population. In addition, some cases of meningitis and encephalitis are related to the viral vaccine strains. In order to solve these problems it is necessary to look for new mumps vaccine. The aim of this project is to develop a DNA vaccine based on expression of the mumps HN gene, which is necessary for a successful viral infection. The HN gene sequence was analyzed and a highly conserved region among different genotypes of MuV was chosen and amplified. The transfected construction in Vero cells expressed a protein that was recognized by a hyperimmune anti-mumps serum. In addition it showed haemagglutinin and neuraminidase activities. Due to these results, nowadays we are assessing the immunogenic properties of this DNA vaccine, by using a hamster model for mumps viral infection.

## INTRODUCCIÓN

En el año 460 AC Hipócrates en su libro “Sobre las epidemias ” describió a la parotiditis como “la intumescencia pre-auricular unilateral o bilateral no supurativa del cuello, que se presenta en niños y jóvenes que concurren al gimnasio” (Laval, 2005). Actualmente se define a la parotiditis o “paperas” como la inflamación de las glándulas salivales que se encuentran en la parte inferior del oído; éstas presentan una consistencia blanda, están agrandadas y tienen un color marrón rojizo; microscópicamente el intersticio glandular está edematoso con infiltración de histiocitos, linfocitos y células plasmáticas (Robins, 1998). La parotiditis puede causar varias complicaciones entre ellas: sordera, pancreatitis, orquitis, ooforitis y miocarditis (*Wkly epidemiol report*, 2005). En el sistema nervioso central (SNC) las complicaciones más importantes son la encefalitis y la meningitis viral ([www.who.int/el](http://www.who.int/el)) y afortunadamente la mayoría de estos casos se resuelven sin secuela.

La naturaleza contagiosa de la enfermedad se describió en el siglo XVIII por Langhi y Mangor y fue hasta 1945 que Habel aisló el virus que produce dicha enfermedad (Laval, 2005). El virus de la parotiditis humana (MuV) pertenece a la familia Paramyxoviridae género *Rubulavirus*. Es un virus envuelto que mide de 100 a 600 nm, su material genético es una hebra simple de RNA con sentido negativo que contiene siete genes en el siguiente orden, *N-P-M-F-SH-HN-L*, los cuales codifican para las proteínas virales de nucleocápside, fosfoproteína, matriz, fusión, SH, hemaglutinina-neuraminidasa y la subunidad mayor de la polimerasa, respectivamente (Carbone *et al.*, 2001; Robins, 1998)

La proteína HN es el determinante antigénico más importante del virus y se le han asignado tres funciones principales: a) Hemaglutinina (HA), para el reconocimiento del receptor (ácido siálico) que se encuentra en la membrana celular, b) Neuraminidasa (NA), para la remoción del ácido siálico de la progenie viral para prevenir la autoaglutinación y c) participación activa en la fusión del virus a la célula (Crennell *et al.*, 2000). Sin esta proteína no existiría la unión del virus a la célula y por lo tanto no se llevaría a cabo la infección viral. Además de los dominios de HA y NA, posee un

dominio transmembranal con el cual se ancla a la membrana viral.

El virus se disemina a través de las gotitas de saliva de las personas infectadas, se replica en la nasofaringe y presenta un periodo de incubación de 18 a 21 días que puede extenderse hasta 35 días (<http://gsbs.utmd.edu/microbook>). Durante este tiempo el virus se multiplica en las vías respiratorias altas, se disemina a los nódulos linfáticos cercanos y provoca una viremia (Carbone *et al.*, 2001), que afecta a tejidos glandulares, nerviosos y diversos órganos (<http://gsbs.utmd.edu/microbook>). Después de este periodo de incubación se presenta la etapa aguda de la infección, donde aparecen los síntomas y signos característicos del síndrome de parotiditis. El único hospedero que se le conoce al MuV es el hombre, se calcula que en poblaciones no vacunadas existen brotes de esta enfermedad cada 5 a 10 años (Carbone *et al.*, 2001; John, 2004; Reyes *et al.*, 2002), infecta preferentemente a los varones ya que estos representan el 63.5% del total de los casos (Kanra *et al.*, 2004)

EL MuV es un virus de distribución mundial (Carbone *et al.*, 2001) y hasta la fecha se considera que hay un solo serotipo, pero con base en la secuencia de aminoácidos de las proteínas SH y HN, se ha clasificado en diversos genotipos. A estos genotipos se les ha designado con letras de la A a la L, basándose en la posición de los aminoácidos 28, 29 y 30 de la proteína SH (Jin *et al.*, 1999; Love *et al.*, 1985; Palacios *et al.*, 2005) y de la A a la D con base en diferentes combinaciones de aminoácidos en la proteína HN (Teclé *et al.*, 2002; Yates *et al.*, 1996). La coexistencia de los diversos genotipos de MuV es un fenómeno bien documentado en muchos países, por ejemplo en Dinamarca se han reportado los genotipos D, H, G, E, C, F, B, I, A y J (Teclé *et al.*, 2001), en Japón los subtipos B, D, G, J, K y L (Inou *et al.*, 2004) y en Inglaterra los genotipos B, C, D, F, G, H, J y K (Savage *et al.*, 2005).

El tratamiento que se sigue para la infección por este virus es sintomático; es decir, solo se tratan los síntomas de la enfermedad; es por ello, que la mejor opción para evitar esta infección es la vacunación de la población para así detener la diseminación del virus ([www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx)).

La vacunación en contra del MuV se ha practicado desde 1970 utilizando diversas cepas virales. En el año 2000 por ejemplo, 106 países reportaron el uso de vacunas contra este virus. Sin embargo, en algunas regiones solo unos cuantos países poseen un esquema de vacunación formal. Por ejemplo en África, solo Egipto tiene este tipo de esquemas; mientras que en Asia, solo Singapur y Tailandia ([www.who.int/el](http://www.who.int/el)). Países como Polonia en donde en el 2002 informaron de 39,978 casos de parotiditis (Janaszek-Seydlitz *et al.*, 2005) y la India con 301 casos de parotiditis entre 1999 a 2003 en el distrito de Calcuta, han expresado la necesidad de vacunar a su población (Geeta & Kumar, 2004).

Algunas de las cepas vacunales que se han desarrollado hasta el momento se muestran en la Tabla 1. Sin embargo, no todas las cepas son adecuadas para su uso como vacunas, por ejemplo la cepa vacunal Rubini posee un rango de seroconversión del 6.3% por lo que la OMS no la recomienda para los esquemas nacionales de inmunización (Wkl epidemiol report, 2001).

Tabla 1. Cepas vacunales contra el virus de la parotiditis humana.

Cepa	Año de introducción	País de origen	Área de distribución	Rango de seroconversión
Jeryl Lynn	1977	EU	Mundial	63 – 91 % <sup>1</sup>
Leningrado-3	1980	USSR	Rusia	89 – 98 % <sup>2</sup>
L-Zagreb	1988	Croacia	Mundial	> 90 % <sup>2</sup>
Urabe AM9	1979	Japón	Mundial	84 – 97 % <sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Bonnet *et al.*, 2006) <sup>2</sup> (Wkl epidemiol report, 2001)

El empleo de estas cepas vacunales se ha asociado con la presentación de brotes de meningitis y encefalitis. Por ejemplo, en la aplicación de la cepa L-Zagreb se presentaron 49 casos de meningitis por 100,000 dosis aplicadas; con la cepa Urabe 7 casos de meningitis por 100,000 dosis; mientras que la Jeryl-Lynn presenta 0.1 casos/100,000 dosis aplicadas (Bonnet *et al.*, 2006). Si bien con la aplicación de la cepa vacunal Jeryl-Lynn se han presentado el menor número de casos de meningitis (Schlegel *et al.*, 1999), su inconveniente es su costo, ya que hasta el año 2004 el precio de la vacuna con dicha cepa era de 2.50 dólares por dosis (Bonnet *et al.*, 2006;

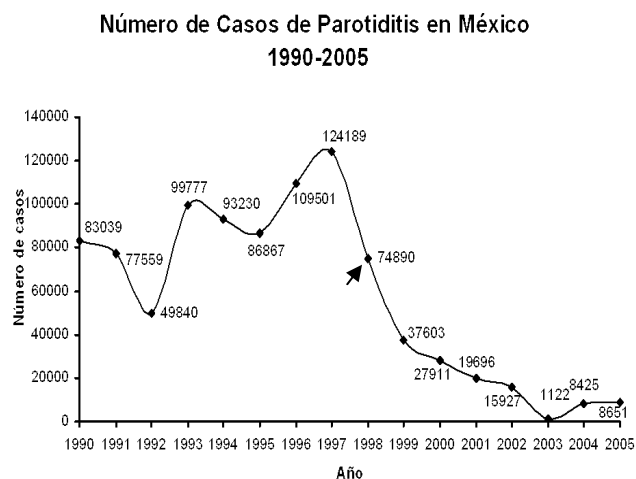
Fullerton & Reef, 2002), lo que representa un egreso alto para los países en vías de desarrollo.

A pesar de la aplicación de estas vacunas aun se presentan casos de parotiditis en todo el mundo y de hecho ha habido un aumento en los últimos años. La OMS reportó en el año 2002 un total de 477,079 casos de parotiditis a nivel mundial; para 2003 un total de 334,063 y para 2004 un total de 654,216 (Wkl epidemiol report, 2005). El aumento en el número de casos de parotiditis está relacionado con deficiencias en la aplicación de los esquemas completos de vacunación. Entre el año 2004 y el 2005 Inglaterra y Wales reportaron un total de 56,390 casos en personas cuyas edades estaban comprendidas entre los 15 y 25 años, las cuales no recibieron el refuerzo de la vacuna contra este virus (MMWR, 2006). Un caso similar se presentó en Escocia en las primeras 24 semanas del 2005 donde se reportaron 1,241 casos en adolescentes. Al igual que en el Reino Unido, estos casos están relacionados con la falta de una segunda dosis de la vacuna (Donaghy *et al.*, 2006).

Por otro lado, debido a la circulación de diferentes genotipos en la población vacunada y a la existencia de brotes asociados a un solo genotipo, se ha sugerido que las vacunas no originan la misma protección contra los diversos genotipos de MuV (Rubin *et al.*, 2006; Savage *et al.*, 2005; Teclé *et al.*, 2001). En Estados Unidos (EU) se reportó un brote de parotiditis en 10 estados, con un total de 2,597 casos hasta mayo del año 2005. Al realizar la genotipificación de doce de estos virus provenientes de seis estados, se identificó que los virus causantes de estos brotes son del genotipo G (MMWR, 2006), cabe destacar que la vacuna que se utiliza en EU es del genotipo A.

En nuestro país la vacuna triple viral (MMR) que contiene a la vacuna contra la parotiditis se aplica desde el año 1998 ([www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx)) y desde entonces los casos de parotiditis han descendido considerablemente (Fig. 1). En esta figura se muestran los números de casos en los últimos quince años; la flecha indica el año de 1998, año en el que se inició la aplicación de la vacuna triple viral (sarampión, rubéola y paperas) dentro del esquema nacional de vacunación ([www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx)). Sin embargo, en el año 2005

México reportó 8,653 casos de parotiditis en todo el país (Fig. 2) ([www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx)). Es importante señalar que en el caso de la parotiditis en nuestro país no existe una genotipificación de los virus circulantes, o un análisis del impacto de la vacunación contra este virus.



A pesar de que la parotiditis no es una enfermedad cuyos síntomas y signos sean mortales, es importante resaltar que en términos de horas-hombre, las paperas constituyen una pérdida de ingresos importantes. Tan solo en EU se menciona que por cada dólar gastado en las campañas de vacunación se ahorran 26 dólares asociados a cuidados médicos (Bonnet *et al.*, 2006). Hasta el momento la vacunación sigue siendo la mejor opción ante la infección de MuV y la ONU menciona que la elección de las cepas vacunales dependerá de los estudios costo-beneficio de cada país y se tomando en cuenta la posibilidad de que las cepas vacunales puedan o no ser la causa de casos de meningitis viral (Bonnet *et al.*, 2006).

Debido a las complicaciones vinculadas a la vacunación contra el virus de la parotiditis humana, así como también a la falta de certeza de que una cepa vacunal pueda proteger contra todos los genotipos del MuV que circulan, se buscan nuevas opciones para inmunizar a la población y así erradicar los casos de parotiditis, meningitis y encefalitis asociadas a la infección por este virus. Una de estas opciones podría ser una vacuna no constituida por el virus completo atenuado, sino utilizando la vacunación con un DNA que codifique para las proteínas virales relacionadas con la inducción de la respuesta inmune protectora contra el virus de la parotiditis, ya que se ha mostrado que las

vacunas de DNA inducen tanto la respuesta celular como la respuesta humoral en el organismo, además de ser termoestables y con un costo de producción bajo (Reyes & Pinto, 2002).



**Fig. 2.** Distribución de casos de parotiditis en México, 2005. Los casos totales reportados en el país fueron 8,653. ([www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx))

El uso de estas vacunas representaría una ventaja para los países en vías de desarrollo en donde las condiciones para el mantenimiento de la cadena fría que requieren las vacunas de virus atenuados no siempre es posible.

En el caso particular de la parotiditis, el desarrollo de una vacuna de DNA podría resolver el problema de los casos de meningitis y encefalitis asociados a la vacunación con las cepas que actualmente se utilizan, así como también los generados por la infección con las cepas silvestres, las cuales puede ser de genotipos diferentes a la cepa vacunal empleada.

Ante esta problemática, el presente proyecto busca desarrollar una vacuna de DNA que codifique para la proteína HN del MuV, que es la proteína viral indispensable para el inicio de la infección (reconocimiento del receptor celular) y es el principal blanco contra el que se desarrolla la respuesta inmune protectora. Para ello, se eligió la región del gen de la hemaglutinina que está altamente conservada entre los diferentes genotipos de MuV, este DNA fue introducido en el vector de expresión pcDNA3.1(+). La construcción al ser transfectada en células Vero expresa un péptido que es reconocido por un anticuerpo policlonal anti-paperas y además conserva las propiedades de hemaglutinar glóbulos rojos de cobayo y

de neuraminidasa, lo que significa que el péptido tiene dos de las funciones importantes de la HN viral (reconocimiento de ácido siálico y neuraminidasa).

Basándonos en estas evidencias proponemos que este péptido es capaz de estimular al sistema inmune y por lo tanto inducir la protección contra la infección del virus de la parotiditis humana. Para cumplir con este objetivo se llevará a cabo la estandarización del modelo de infección del MuV en hámster, debido a que se ha demostrado que en muchos aspectos la patogénesis de la infección del MuV en el modelo de hámster neonato es parecida a lo que se presenta en infantes (Wolinsky *et al.*, 1976). En este modelo se probarán diversos esquemas de inmunización para así evaluar la eficacia de la vacuna frente al reto con el MuV.

## REFERENCIAS

- Bonnet MC, Dutta A, Weinberger C & Plotkin SA (2006) Mumps vaccine virus strains and aseptic meningitis. *Vaccine*, 24: 7037-7045.
- Carbone K & Wolinsky S. (2001) Mumps virus. In Knipe D & Howley P (eds), *Fields Virology*. 4th ed. Lippincott- Williams & Wilkins, pp. 1381-1400.
- Crennell S, Garman E, Laver G, Vimr E & Taylor G (2000) Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat. Struct. Biol.* 7: 1068-1074.
- Donaghy M, Cameron JC & Friederichs V (2006) Increasing incidence of mumps in Scotland: options for reducing transmission. *J. Clin. Virol.* 35: 121-129.
- Fullerton KE & Reef SE. (2002) Commentary: Ongoing debate over the safety of the different mumps vaccine strains impacts mumps disease control. *Int. J. Epidemiol.* 31: 983-984.
- Geeta MG & Kumar PK. (2004) Mumps-need for urgent action. *Indian Pediatr.* 41: 1181-1182.
- Inou Y, Nakayama T, Yoshida N, Uejima H, Yuri K, Kamada M, Kumagai T, Sakiyama A, Miyata H, Ochiai T, Ihara T, Okafuji T, Okafuji T, Nagai E, Suzuki K, Shimomura Y, Ito Y & Miyazaki C (2004) Molecular epidemiology of mumps virus in Japan and proposal of two new genotypes. *J. Med. Virol.* 73: 97-104.
- Janaszek-Seydlitz W, Bucholc B, Gorska P & Slusarczyk J (2005) Mumps in Poland since 1990 to 2003; epidemiology and antibody prevalence. *Vaccine*, 23: 2711-2716.
- Jin L, Beard S & Brown DW. (1999) Genetic heterogeneity of mumps virus in the United Kingdom: identification of two new genotypes. *J. Infect. Dis.* 180: 829-33.
- John TJ. (2004) An outbreaks of mumps in Thiruvananthapuram district. *Indian Pediatr.* 41: 298-300.
- Kanra G, et al. (2004) Complementary findings in clinical and epidemiologic features of mumps and mumps meningoencephalitis in children without mumps vaccination. *Pediatr. Int.* 46: 663-668.
- Laval RE. (2005) Notes about epidemic parotitis mumps). *Rev. Chilena Infectol.* 22: 282-284.
- Love A, et al. (1985) Hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein as a determinant of pathogenicity in mumps virus hamster encephalitis: analysis of mutants selected with monoclonal antibodies. *J. Virol.* 53: 67-74.
- MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2006) Update: multistate outbreak of mumps-United States. 55: 559-563.
- MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* (2006) Mumps epidemic-United kingdom, 2004-2005. 55: 173-175.
- Palacios G, et al. (2005) Molecular identification of mumps virus genotypes from clinical samples: standardized method of analysis, *J Clin Microbiol.* 43: 1869-1878.
- Reyes A & Pinto A. (2002) Vacunas de DNA. En: Rocha-Gracia. R. del C., Martínez-Laguna, I. y López-Olguín, J. F. (Eds.). 2002. Temas de Actualidad en Microbiología, Ambiente y Salud. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México, pp. 327-342
- Reyes J, Santos G, Hernández J, Espinosa B, Borraz MT, Ramírez H, Vallejo V & Zenteno E (2002) Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el Rubulavirus porcino. *Mensaje bioquímico* 26: 99-127.
- Robins SL (1998) Patología estructural y Funcional. 5 ed. 1998, México: Mc Graw Hill., pp. 1442-1443.

- Rubin S, Mauldin J, Chumakov K, Vanderzanden J, Iskow R & Carbone K (2006) Serological and phylogenetic evidence of monotypic immune responses to different mumps virus strains. *Vaccine*, 24: 2662-2668.
- Savage E, Ramsay M, White J, Stuart Beard S, Lawson H, Hunjan R & Brown D (2005) Mumps outbreaks across England and Wales in 2004: observational study. *BMJ*. 330: 1119-1120.
- Schlegel M, Osterwalder JJ, Galeazzi RL & Vernazza PL (1999) Comparative efficacy of three mumps vaccines during disease outbreak in Eastern Switzerland: cohort study. *BMJ* 319: 352.
- Teclé T, Bottiger B, Orvell C & Johansson B (2001) Characterization of two decades of temporal co-circulation of four mumps virus genotypes in Denmark: identification of a new genotype. *J. Gen. Virol.* 82: 2675-26780.
- Teclé T, Mickiene A, Johansson B, Lindquist L & Orvell C (2002) Molecular characterization of two mumps virus genotypes circulating during an epidemic in Lithuania from 1998 to 2000. *Arch. Virol.* 147: 243-53.
- Wkly Epidemiol Rec.* (2001) Mumps virus vaccines. 76: 346-55.
- Wkly Epidemiol Rec.* (2005) Global status of mumps immunization and surveillance. 80: 418-424.
- Wolinsky JS, Klassen T & Baringer JR (1976) Persistence of neuroadapted mumps virus in brains of newborn hamsters after intraperitoneal inoculation. *J. Infect. Dis.* 133: 260-267.
- Yates PJ, Afzal MA & Minor PD (1996) Minor, Antigenic and genetic variation of the HN protein of mumps virus strains. *J. Gen. Virol.* 77: 2491-2497.