

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Estudio de algunas propiedades biológicas de 3 cepas de dengue 2 con diferencias en sus secuencias nucleotídicas

Dra. Daría Elena Camacho,¹ Dra. María G. Guzmán,² Lic. Luis Morier,³ Dra. Mayling Álvarez,⁴ Dra. Rosmari Rodríguez⁴ y Dr. Guillermo Comach⁵

RESUMEN

Se estudiaron algunas propiedades biológicas de las cepas de dengue 2: A-15 (aislada en Cuba en 1981), Jamaica (aislada en Jamaica en 1981) y la cepa estándar Nueva Guinea "C" (NG"C") que presentan diferencias en sus secuencias nucleotídicas. Los resultados mostraron que la aparición del efecto citopático en la línea celular C6/36 HT fue más temprano para la cepa A-15 y la fluorescencia se detectó primero en las cepas Jamaica y A-15, esto parece indicar que la rapidez de la detección de las cepas no guarda relación con su historia de pases ni con el sistema de aislamiento original. A-15 y NG"C" mostraron un patrón heterogéneo de placas grandes y pequeñas; la talla promedio fue menor en la segunda. Jamaica sólo presentó placas pequeñas. La capa más neurovirulenta en ratones fue la NG"C" seguida por A-15, mientras que Jamaica no fue neurovirulenta. Estos resultados sugieren que A-15 tiene un comportamiento biológico distinto, probablemente por causa de diferencias intrínsecas. Se debe considerar que se hallaron 7 cambios aminoacídicos en la proteína de envoltura que pudieran haber afectado la expresión de algunas propiedades biológicas.

Descriptores DeCS: VIRUS DEL DENGUE/genética; SECUENCIA DE BASES.

El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante del mundo. La incidencia de esta enfermedad ha tenido un incremento dramático en las últimas décadas.¹ La fiebre del dengue (FD) y la fiebre hemorrágica del dengue/síndrome del choque por dengue (FHD/SCD) es causada por 4 serotipos virales (Den-1, Den-2, Den-3, Den-4) antigénicamente muy relacionados.

De acuerdo con estudios genéticos realizados en la región de las Américas, se han identificado hasta el momento 3 genotipos de dengue 2: el genotipo americano integrado por cepas aisladas desde la década de los años 50 hasta la actualidad y no relacionadas con la producción de FHD; el genotipo Jamaica integrado por cepas aisladas en Brasil, Venezuela y Colombia asociadas con FHD, y el genotipo Nueva Guinea aislado en el año 1981 en Cuba, asociado con la epidemia de mayor severidad ocurrida en la región.^{2,3} Estudios recientes han demostrado que a

partir del año 1994, comenzaron a detectarse en la región y en Tailandia otras cepas de dengue 2 del genotipo Nueva Guinea relacionadas con FHD⁸, que dieron como resultado un incremento constante en la incidencia de la enfermedad con un aumento de la actividad epidémica y la circulación de al menos 2 ó 3 serotipos en un mayor número de países.⁴

El patrón heterogéneo entre cepas de dengue se ha demostrado serológica y molecularmente; sin embargo, no está claro cuáles cambios genómicos pueden relacionarse con la virulencia de una cepa en particular.^{5,6} Es por ello que la identificación de los cambios genómicos que puedan relacionarse con la expresión de alguna propiedad biológica o antigénica resulta de gran importancia, al considerar que la información obtenida de estos estudios resultaría de interés para establecer estrategias de control de la enfermedad, a partir de la caracterización completa (biológica, antigénica y molecular) de las cepas del virus dengue.

¹ Máster en Ciencias. Laboratorio Regional de diagnóstico e investigaciones del dengue y otras enfermedades virales. Venezuela.

² Doctora en Ciencias Médicas. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

³ Licenciado en Microbiología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

⁴ Máster en Ciencias. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

⁵ Doctor en Ciencias Médicas. Laboratorio Regional de diagnóstico e investigaciones del dengue y otras enfermedades virales. Venezuela.

En este estudio se presentan los resultados obtenidos al evaluar el comportamiento biológico de 3 cepas del serotipo dengue 2; las cuales al ser evaluadas previamente por *restricción enzimática* y secuenciación nucleotídica mostraron diferencias que es probable pudieran relacionarse con la expresión de algunas de las propiedades biológicas evaluadas.

MÉTODOS

Virus y líneas celulares

Las cepas virales utilizadas fueron; la cepa *A-15* aislada del suero de un paciente con FD durante la epidemia cubana de FHD en 1981, con 5 pases en ratón y 5 pases en la línea celular C6/36; cepa *Jamaica* aislada en Jamaica en 1981 a partir de la sangre de un paciente con diagnóstico FD (donada por el doctor *Robert Shope*, Universidad de Texas); con 2 pases en mosquito y 2 pases en la línea celular C6/36; y la cepa estándar *NG" C"* (Nueva Guinea "C") con 23 pases en ratón y 4 pases en la línea celular C6/36.

Las líneas celulares utilizadas fueron: *BHK-21 clono 15*, donadas por el profesor *S.B. Halstead* (Fundación Rockefeller), fueron multiplicadas a 37 °C en medio mínimo esencial (MEM), suplementadas con 1 % de una solución de aminoácidos no esenciales y suero fetal bovino inactivado (SFBI) 10 %. El medio de mantenimiento consistió en medio de crecimiento, pero suplementado con SFBI 2 %. La línea celular *C6/36-HT (Aedes albopictus)*,⁷ donada por el doctor *Javier Díaz* (Laboratorio Departamental de Medellín, Colombia), multiplicada a 33 °C con MEM, aminoácidos no esenciales, 1 % de una solución 200 mM de glutamina y SFBI 10 %. El medio de mantenimiento consistió en el medio de crecimiento, suplementado con SFBI 2 %.

TITULACIÓN VIRAL

Se siguió el método descrito por *Morens* y otros (1985),⁸ para la titulación en BHK-21 clono 15 por formación de placas. Las cepas se inocularon por triplicado y cada experimento fue repetido 2 veces.

EFFECTO CITOPÁTICO EN LA LÍNEA CELULAR C6/36-HT

Los tubos con monocapa confluyente de la célula C6/36-HT; se inocularon por duplicado con las 3 cepas; a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0,01. Luego de 1 h de adsorción; se adicionó 1 mL de medio de

mantenimiento y después fueron incubadas durante 7 d a 33 °C. El efecto citopático (ECP) se observó diariamente.

DETERMINACIÓN DE LA INMUNOFUORESCENCIA

Todos los días, a partir de las 24 hasta las 96 h, las células se fijaron en acetona fría. La inmunofluorescencia indirecta se realizó con un anticuerpo monoclonal específico de dengue 2 y un anticuerpo policlonal de ratón anti-dengue 2 (donado por el profesor *Robert Shope* de la Universidad de Texas, EE.UU.).

TAMAÑO DE LAS PLACAS

Las placas obtenidas⁸ fueron evaluadas, se consideraron placas pequeñas las de diámetro ≤ 1 mm y placas grandes, las de un tamaño > 1 mm.

DETERMINACIÓN DE LA NEUROVIRULENCIA EN RATONES LACTANTES

Se inocularon por vía intracerebral, grupos de 9 ratones lactantes de 24 h de nacidos, con diluciones seriadas en base 10 de las 3 cepas diluidas en medio 199 con 2 % de SFBI. Los ratones se observaron diariamente por 21 d en busca de cualquier signo de enfermedad o muerte. El título viral se calculó con el método de Reed y Muench.⁹ La neurovirulencia se consideró de acuerdo con la relación DL_{50} /título infectivo (ufp/mL).¹⁰ Las muertes ocurridas en las primeras 24 a 48 h no fueron consideradas a los efectos del estudio.

RESULTADOS

El ECP observado consistió en la formación de sincitios, característico en esta línea celular. La cepa A15 presentó una mayor intensidad y rapidez en la aparición y desarrollo del ECP; pues al tercer día de observación evidenciaba la formación de sincitios en casi 25 % de la monocapa celular con una expresión máxima al séptimo día posinoculación (p.i.). En cuanto a las cepas Jamaica y NGC, el ECP se inició al sexto día p.i.

La detección de antígenos virales por inmunofluorescencia se realizó diariamente durante los 4 d p.i. De acuerdo con los resultados obtenidos; a las 24 h no se observó fluorescencia para ninguna de las cepas. A las 48 h ésta sólo se observó para las cepas Jamaica y A15, fue más evidente para esta última; mientras que la cepa NGC presentó fluorescencia a las 72 h. Las cepas Jamaica y NGC mostraron un nivel estable de inmunofluorescencia a pesar de los días p.i.

En lo que respecta al tamaño de las placas; las cepas A15 y NGC mostraron un patrón de placas grandes y pequeñas, predominaron las primeras. En cuanto al tamaño promedio de las placas; la cepa A15 mostró un promedio mayor que la cepa NGC con resultados de 2,28 mm y 1,69 mm, respectivamente; mientras que la cepa Jamaica sólo mostró placas pequeñas. El momento de aparición de las placas fue similar para las 3 cepas (5to. día p.i.). La neurovirulencia en ratones se evaluó sobre la base de la mortalidad y se calculó la relación DL_{50}/ufp . Las cepas NGC y A15 mostraron índices de 0,01 y 0,002, respectivamente. La cepa Jamaica no mostró efectos de neurovirulencia, al no observarse signos de la enfermedad en los animales inoculados, a pesar de que el estudio se repitió en 2 ocasiones.

DISCUSIÓN

La infección de cultivos celulares de mosquito con diferentes flavovirus puede manifestar un marcado ECP caracterizado por una extensa fusión,⁷ aunque no todas las cepas de dengue son capaces de producir sincitios.¹¹ Las 3 cepas estudiadas inoculadas con igual m.o.i. mostraron los ECP característicos, pero su velocidad de aparición para cada una no parece estar influenciada por su sistema original de aislamiento o por su historia de pases, ya que si esto fuera cierto debió verse favorecido el ECP de la cepa Jamaica por similitud con el sistema celular. Si dependiese de la historia de pases o de su número, era de esperar una ventaja para la cepa NG "C". Sin embargo, fue A15 la cepa que más rápido evidenció ECP, por lo que pudiera decirse que éste depende de características inherentes a las cepas.

La detección de antígenos virales por inmunofluorescencia se incrementó de acuerdo con el número de días posinoculación. Aunque la m.o.i. fue la misma en todos los casos, el tiempo de aparición de la inmunofluorescencia fue diferente para cada una de las cepas, manifestándose primero para las cepas Jamaica y A15 con marcado incremento para esta última de acuerdo con los días posinoculación; mientras que la cepa NGC presentó inmunofluorescencia de forma tardía. Las cepas Jamaica y NGC mantuvieron un nivel estable de inmunofluorescencia independientemente de los días posinoculación. Estos resultados concuerdan con las características de tiempo de aparición e intensidad del ECP.

En cuanto a la evaluación de las placas, es de destacar que la cepa NGC mostró un tamaño promedio de placas menor que la cepa A15. Al respecto, es importante señalar que las placas pequeñas han sido consideradas por algunos autores como un posible marcador de

atenuación, que puede resultar usual en cepas que han sufrido un elevado número de pases.^{11,12} Esto pudiera explicar el valor obtenido en el tamaño promedio de las placas en la cepa NGC, si se tiene en cuenta que ésta presentaba un alto número de pases en otros sistemas de aislamiento al iniciar el estudio; sin embargo por el contrario, la cepa Jamaica presentó un patrón de placas pequeñas, lo que parece sugerir que no siempre resulta posible relacionar las placas pequeñas con la atenuación,^{13,14} si se tiene en cuenta su presencia en una cepa capaz de producir cuadros severos de FHD.

La neurovirulencia en ratones lactantes fue menor para la cepa A15 que para la cepa NGC; lo que podría estar posiblemente relacionado con el alto número de pases que en dicho sistema presentaba esta última. Por otra parte, la cepa Jamaica no produjo neurovirulencia en los ratones lactantes; quizás porque nunca se ha multiplicado en este sistema. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que la diferencia observada respecto a la neurovirulencia se pueda relacionar con características inherentes a las cepas; se debe tener en cuenta que datos no publicados demostraron que 2 cepas de dengue 2 aisladas en Cuba en el año 1997 en líneas celulares de mosquitos, no fue posible aislarlas en ratones lactantes; y considerar además que son productoras de placas pequeñas y pertenecen molecularmente al genotipo Jamaica. Por otra parte, tampoco resulta factible excluir la posibilidad de que la dificultad de aislamiento de la cepa Jamaica en los ratones lactantes se relacione con la baja sensibilidad de este sistema para la multiplicación del virus dengue; a pesar de que se recomienda como sistema de aislamiento viral cuando no existen otros de mayor sensibilidad disponibles.¹⁵

Los resultados sugieren que la cepa A15 posee un comportamiento distinto a las demás cepas, respecto a las propiedades biológicas evaluadas; lo que pudiera indicar que esta cepa posee diferencias en zonas genómicas probablemente involucradas en conferirles tales propiedades. Estos hallazgos al parecer son apoyados por estudios no publicados donde se han encontrado 7 cambios aminoacídicos en la proteína de envoltura de la cepa A15 respecto a las cepas Jamaica y NGC en zonas posiblemente relacionadas con la actividad biológica de la cepa A15 (doctora María Guadalupe Guzmán T. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Ciudad de La Habana, Cuba, comunicación personal). Esto parece sugerir que tal vez las divergencias encontradas en algunas de las propiedades biológicas de las mencionadas cepas puedan estar relacionadas con los cambios hallados en dichos estudios; pues aunque la patogenicidad de los flavovirus depende de una variedad de factores del hospedero, hay elementos en la secuencia de la proteína de envoltura que han sido

postulados como determinantes del tropismo tisular.^{16,17} Por lo tanto, resulta indispensable la realización de estudios adicionales de caracterización biológica de las cepas virales involucradas en procesos patológicos como los causados por el virus del dengue, para tratar de establecer las posibles relaciones entre la expresión de las propiedades biológicas, su posible origen genético y lo más significativo, establecer una posible relación con la virulencia de dicho virus.

SUMMARY

Some biological properties of Dengue-2 strains such as A-15 (isolated in Cuba in 1981); Jamaica (isolated in Jamaica in 1981) and New Guinea "C" (NG"C") standard strain differing in their nucleotide sequences were studied. The results showed that the cytopathic effect in C6/36 HT cell line occurred earlier in A-15 strain and that fluorescence was first detected in Jamaica and A-15 strains. This seems to indicate that rapid detection of strains does not have any relation to neither their history of passage nor the original isolation system. A-15 and NG"C" strains exhibited a heterogeneous pattern formed by big and small plaques but average size of plaques in NG"C" was lower whereas Jamaica showed only small plaques. The most neurovirulent strain in mice was NG"G" followed by A-15 whereas Jamaica was not neurovirulent at all. These results indicate that A-15 has a different biological behaviour which is probably due to intrinsic differences. It should be taken into account that 7 amino acid changes were found in the envelope protein which may have affected the expression of some biological properties.

Subject headings: DENGUE VIRUS /genetics; BASE SEQUENCE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Murphy F, Nathanson N. The emergence of new virus diseases: an overview. *Virology*; 1994;5:87-102.
- Guzmán M, Deubel V, Pelegrino JL, Rosario D, Marrero M, Sariol C. Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four Dengue-2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. *Am J Med Hyg* 1995;52(3):241-6.
- Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990;174(2):479-93.
- Gubler D. Dengue and dengue haemorrhagic fever in the Americas. Monograph on Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: World Health Organization. Regional Office for South-East Asia, New Dehli. *Regional Publication*. SEARO 1993;22:9-22.
- Sánchez I, Ruiz B. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol* 1996;77:2541-5.
- Després P, Frenkiel MP, Deubel V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology* 1993;196:209-19.
- Zhu Guan-fu. Dengue virus microculture. Institute of Microbiology & Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 1982;7(3):139-141.
- Morens D, Halstead S, Repik P, Ravithat, Rayboure N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK. *Virology* 1990;174(2):494-504.
- Reed L Muench H. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am J Hyg* 1938;27:493-7.
- Eckels K, Brandt W, Harrison V, McCown J, Russell P. Isolation of a temperature sensitive dengue 2 virus under conditions suitable for vaccine development. *Infect Immun* 1976;14:1221-7.
- Suitor EC Jr, Paul FJ. Syncytia formation of mosquito cell cultures mediated by type 2 dengue virus. *Virology* 1969;38:482-5.
- Eckels KH, Harrison VR, Summers PL, Russell PK. Dengue-2 vaccine: preparation from a small-plaque virus clone. *Infect Immun* 1980;27:175-80.
- Halstead SB, Eckels KH, Putvatana R, Larsen LK, Marchette NJ. Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells IV. Characterization of a vaccine candidate in fetal rhesus lung cells. *Am J Trop Med Hyg* 1984;36:435-42.
- Morens D, Halstead S. Measurement of antibody-dependent infection enhancement of four dengue virus serotypes by monoclonal and polyclonal antibodies. *J Gen Virol* 1990;71:2909-14.
- Varma MG, Pudney M, Leake CJ. Cell lines from larvae of *Aedes (Stegomyia) malayensis* Colless and *Aedes (S.) pseudoscutellaris* (Theobald) and their infection with some arboviruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1974;68:374-82.
- Hasegawa H, Yoshida M, Shiosaka T, Fujita S, Kobayashi Y. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology* 1992;191:158-65.
- Lobigs M, Usha R, Nestorowicz A, Marshall ID, Weir RC, Dalgarno L. Host cell selection of Murray Valley encephalitis virus variants altered at an RDG sequence in the envelope protein and in mouse neurovirulence. *Virology* 1990;176:587-95.

Recibido: 12 de julio de 1999. Aprobado: 4 de octubre de 1999.
Dra. *Daríá Elena Camacho*. Laboratorio Regional de diagnóstico e investigaciones del dengue y otras enfermedades (LARDIDEV). Maracay, Venezuela.