

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Comportamiento biológico de 3 cepas del virus dengue-2 en 2 líneas celulares de mosquitos

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

RESUMEN

Las cepas A-15 (aislada en Cuba, 1981), Jamaica (aislada en Jamaica en 1981) y Nueva Guinea "C" (estándar) del virus dengue-2 fueron comparadas atendiendo al tiempo de aparición del efecto citopático (ECP), tiempo de aparición de la fluorescencia específica y a la cinética de multiplicación viral, al ser inoculadas en las líneas celulares AP-61 (*Aedes pseudoscutellaris*) y C6//36 HT (*Aedes albopictus*). Los resultados mostraron que el ECP de mayor intensidad y más temprana aparición fue para A-15, seguido por Jamaica y Nueva Guinea "C" (NGC). AP-61 parece favorecer el ECP de Jamaica respecto al de la misma cepa en C6/36 HT. La fluorescencia fue más temprana para Jamaica y A-15, y resultó más intensa para la última, mientras que NGC se manifestó tardíamente. Este comportamiento fue similar en los 2 sistemas celulares. Los mayores títulos durante la cinética de multiplicación viral se obtuvieron de A-15 en ambas líneas, aunque en AP-61 tienden a igualarse a partir del 4to. día. La cepa A-15 mostró un comportamiento particular de estas propiedades biológicas al compararla con las otras cepas en estudio, lo que pudiera estar relacionado con cambios encontrados en su secuencia nucleotídica.

Descriptor DeCS: DENGUE; AEDES; EFECTO CITOPATOGENICO VIRAL/inmunología; TECNICA DEL ANTICUERPO FLUORESCENTE INDIRECTA/métodos.

En las últimas 4 décadas los virus del dengue han emergido como el problema de salud mayor para muchas áreas tropicales del mundo,^{1,2} especialmente para las áreas urbanas donde el virus es mantenido mediante un ciclo, en el cual el hombre es el principal reservorio y el mosquito *Aedes aegypti*, el principal vector. Se estima que cada año ocurren en el mundo más de 50 000 000 de casos de dengue con uno de los 4 serotipos virales causales de la enfermedad (Den-1, Den-2, Den-3, Den-4).³

La fiebre del dengue (FD) y la fiebre hemorrágica del dengue (FHD) o síndrome del choque del dengue (SCD) son causadas por los 4 serotipos virales, que están muy relacionados antigénicamente.⁴

Se han identificado genéticamente en las Américas 3 genotipos de dengue 2: el genotipo americano integrado por cepas aisladas desde los años 50 y no relacionadas con FHD; el genotipo Jamaica integrado por cepas aisladas en Brasil,

¹ Licenciado en Microbiología. Investigador Agregado. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), Cuba.

² Máster en Virología. Licenciada en Microbiología. Laboratorio de referencia y diagnóstico de dengue y otras enfermedades virales (LARDIDEV). Maracay, Venezuela.

³ Doctora en Ciencias Médicas. IPK.

⁴ Máster en Virología. Licenciada en Microbiología. IPK.

⁵ Doctor en Ciencias Médicas. LARDIDEV.

Venezuela y Colombia asociadas con FHD, y el genotipo Nueva Guinea (NG"C") aislado en 1981 en Cuba, asociado con la epidemia más severa ocurrida en la región.^{5,6}

El patrón heterogéneo entre cepas de dengue se ha demostrado serológica y molecularmente, pero no está claro cuáles cambios genómicos se relacionan con la virulencia en una cepa particular;^{7,8} de esto se desprende que la identificación de cambios genómicos que se puedan relacionar con la expresión de alguna propiedad biológica resulta de gran importancia en la caracterización completa de cepas de dengue (biológica, antigénica y molecular) que se utiliza en el establecimiento de las estrategias del control de la enfermedad.⁹

En el presente trabajo se evalúa la aparición del efecto citopático, la detección del antígeno por inmunofluorescencia y la cinética de multiplicación viral de 3 cepas de serotipo dengue 2 en las líneas celulares de mosquito C6/36HT y AP-61. En estudios previos estas cepas ya habían mostrado diferencias al evaluarse por restricción enzimática y secuenciación nucleotídica, además de otras diferencias biológicas reportadas anteriormente.⁵

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 sangre de un paciente con diagnóstico FD, con 2 pases en mosquito y 2 pases en C6/36; y la cepa estándar NG"C", con 23 pases en ratón y 4 pases en C6/36.

Se utilizaron las líneas celulares BHK-21 clono 15, donada por el profesor S.B. Halstead (Fundación Rockefeller), crecidas a 37 °C en *medio mínimo esencial* (MEM), 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 AP-61 (*Aedes pseudoscutellaris*) donada por el profesor M.G.R. Varma del *London School of Tropical Medicine and Hygiene*, la cual crece a 28 °C en medio MM/VP-12, suplementado con SFBI 10 %. El medio de mantenimiento de dichas células consistió en medio L-15 con 10 % de una solución de caldo triptosa fosfato 2,9 %¹⁰ y SFBI 2 %. La línea celular C6/36-HT (*Aedes albopictus*)¹¹ donada por el doctor Javier Díaz (Laboratorio Departamental de Medellín, Colombia), multiplicada a 33 °C con MEM, aminoácidos no esenciales, 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.¹² Las cepas se inocularon por triplicado y cada experimento se repitió 2 veces.

EFFECTO CITOPÁTICO EN LAS LÍNEAS CELULARES C6/36-HT Y AP-61

Los tubos con monocapa confluyente de las células C6/36-HT y AP-61 de 24 a 48 h de sembradas, fueron inoculados con las 3 cepas a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0,01. Luego de 1 h de adsorción a sus temperaturas respectivas, se adicionó 1 mL de medio de mantenimiento y posteriormente fueron incubadas durante 7 d a las temperaturas correspondientes de acuerdo con la línea celular. Los tubos fueron observados diariamente a través de un microscopio invertido Olympus CK con aumento 40x para detectar la aparición del efecto citopático (ECP), con el objetivo de relacionarlo con la cinética de multiplicación viral.

INMUNOFLUORESCENCIA

Se prepararon las células de ambas líneas de la misma forma que para la detección del ECP y se inocularon como se describió. Diariamente, a partir de las 24 hasta las 96 h, las células se

fijaron en acetona a + 4 °C. La inmunofluorescencia indirecta se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal específico de dengue 2 y un anticuerpo policlonal de ratón anti-dengue 2.

CINÉTICA DE MULTIPLICACIÓN VIRAL

Diariamente, a partir del tercero hasta el séptimo día los tubos de ambas líneas celulares inoculados con las cepas en estudio fueron congelados a -70 °C, para ser después titulados según el método descrito.¹³

RESULTADOS

Los ECP observados consistieron en la formación de sincitios característicos descritos para cada una de las líneas utilizadas sin diferencias entre las cepas dentro de las mismas células.

Al evaluar la cinética de multiplicación viral, se pudo observar que en la línea celular C6/36 HT, la cepa A15 mostró los mayores títulos virales desde el primer día de cosecha (3er. día posinoculación); mientras que la cepa Jamaica presentó

los menores valores durante el período de estudio (fig. 1).

Estos resultados concuerdan con los observados en el desarrollo del ECP donde la cepa A15 presentó una mayor intensidad y rapidez en la aparición de los ECP: pues a las 72 h se observaron sincitios en 30 % de la monocapa, y llegó a 100 % a los 5 d posinoculación. Las cepas Jamaica y NC"C" comenzaron el ECP a los 6 d.

Ninguna cepa mostró fluorescencia específica a las 24 h. A las 48 h se observó una fluorescencia intensa de la cepa A15 y mucho más tenue y con menor porcentaje de células positivas en la Jamaica. A las 72 h comenzó la señal de fluorescencia de la cepa NC"C". El comportamiento fue similar en AP-61 en lo que respecta a IF.

En cuanto a la cinética en la línea celular AP-61, aunque la cepa A15 de nuevo muestra los mayores títulos el primer día de cosecha viral, los valores de estos en las 3 cepas fueron similares a partir del 4to. y 5to. días (fig. 2).

A diferencia de lo ocurrido en C6/36HT, la cepa Jamaica en AP-61 produjo sincitios desde los 4 d y se mantuvo estable hasta el 7mo. en esta línea.

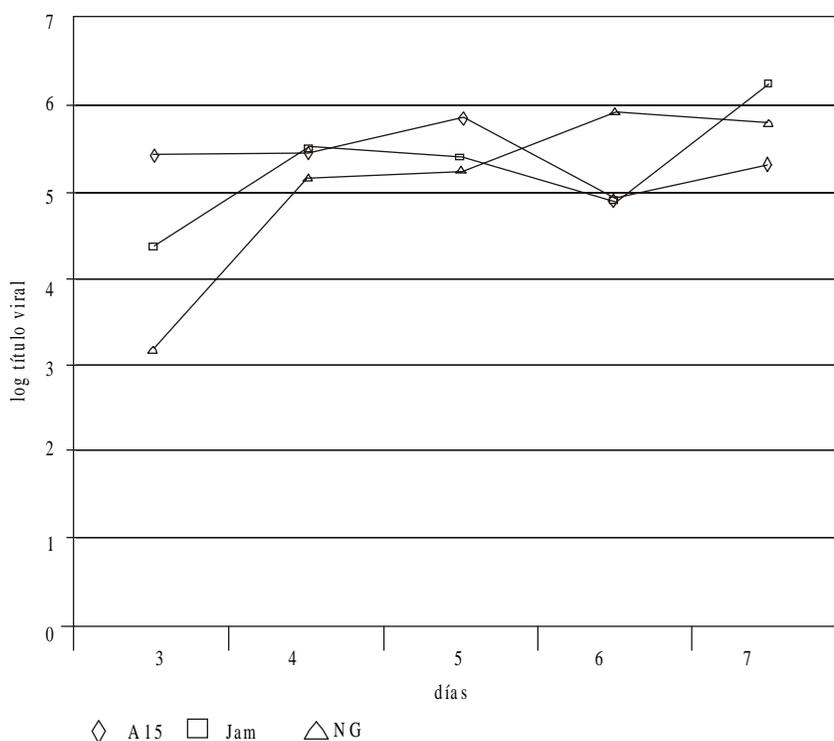


Fig. 1. Cinética de multiplicación viral en la línea celular C6/36 HT.

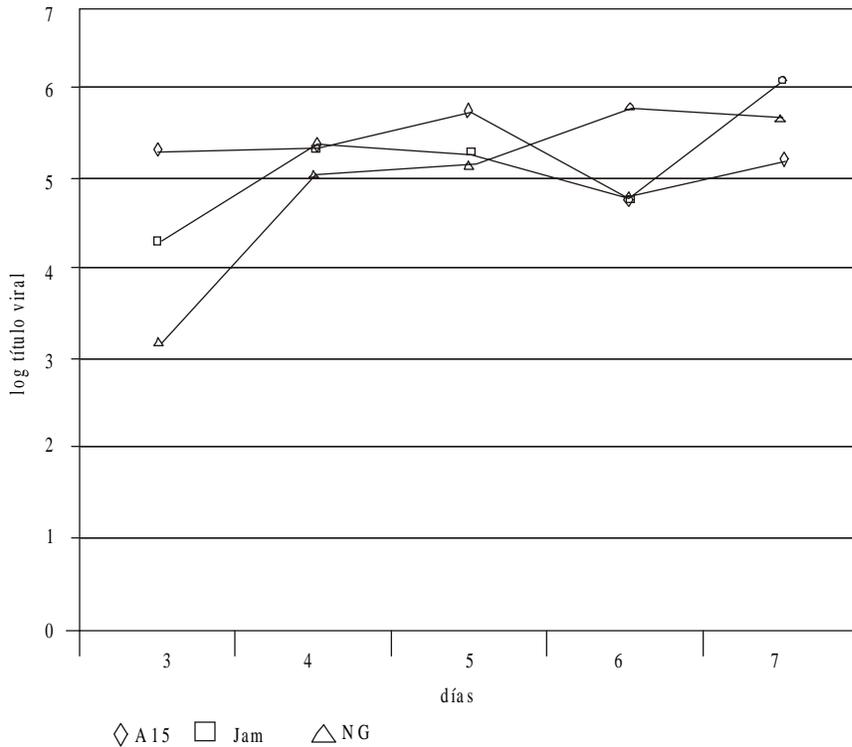


Fig. 2. Cinética de multiplicación viral en la línea celular AP-61.

DISCUSIÓN

A pesar de la aparición de reportes de líneas celulares linfocíticas para la multiplicación de virus dengue, siguen siendo las líneas de células de mosquito las más utilizadas para aislamientos y multiplicación de los virus transmitidos por artrópodos y el comportamiento de los virus en las mismas ofrece, por lo tanto, datos a la caracterización de estos.¹³⁻¹⁵

La manifestación de estas cepas de dengue 2 en diferentes sistemas celulares sensibles a su multiplicación puede permitir hacer interrelaciones que completen los estudios de caracterización biológica, antigénica y molecular.^{5,16}

Antes de analizar las cinéticas de multiplicación, resulta de interés el resultado de la inoculación de las cepas en los 2 sistemas celulares, donde la línea AP-61 favoreció la expresión de la cepa Jamaica manifestada por la aparición temprana de sincitios. Ninguna de las cepas tuvo pases previos en AP-61 y sólo Jamaica mostró diferencias. Esto coincide con lo reportado por *Camacho* y otros, quienes enuncian que la aparición del ECP depende de características inherentes a las cepas,⁵ en este caso

está apoyado por el comportamiento particular de A15, la cual evidenció su multiplicación en ambos sistemas por encima de las 2 cepas restantes.

En la cinética de multiplicación viral utilizando la línea C6/36HT, la cepa A15 mostró mayores títulos que las cepas Jamaica y NG"G"; estos resultados están de acuerdo con los obtenidos al observar el desarrollo de los ECP y la detección de la inmunofluorescencia específica.

En la línea AP-61, la cepa A15 exhibió igualmente los mayores títulos el primer día de cosecha, aunque los títulos virales de las 3 cepas tienden a ser similares al 4to. y 5to. días p.i. A partir del 5to. día se observó un comportamiento particular en las curvas de replicación de las 3 cepas pues hubo una disminución de los títulos seguida de un aumento. Esto puede deberse a características de las células AP-61, que han presentado la capacidad de reponerse a la infección viral y las células no infectadas pueden reproducirse, dando lugar a infecciones persistentes. También puede influir la estabilidad del pH del medio de inoculación de AP-61, que tiene mayor capacidad tampón que el de C6/36HT y por lo tanto, puede permitir a las primeras, mayores condiciones de sobrevivencia.^{10,17}

La inmunofluorescencia brindó patrones de comportamiento similares para ambas líneas celulares respecto a cada cepa en estudio; se manifestaron primero las cepas A15 y Jamaica y luego, tardíamente la NG"C".

Al tomar en cuenta todos los resultados obtenidos: títulos virales en las cinéticas de multiplicación en las 2 líneas celulares, tiempos de aparición de los ECP y de la detección de los antígenos por inmunofluorescencia, se evidencia que existe un comportamiento biológico particular de la cepa A15; esto induce a pensar que algunas diferencias en zonas genómicas pudieran conferirle tales propiedades e indican hacia la misma dirección de investigaciones anteriores sobre igual cepa.^{5,7} Además, existen como premisa datos no publicados sobre 7 cambios aminoacídicos en la proteína de envoltura de la cepa A15 respecto a las cepas Jamaica y NG"C", en zonas posiblemente relacionadas con la actividad biológica (comunicación personal, Guzmán MG, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí").

Resta aún por determinar en futuros estudios las relaciones entre la expresión de propiedades biológicas y su origen genético y la posible relación con la virulencia de las cepas, lo que al final incidirá decisivamente en las estrategias para el control del dengue y la obtención de una posible vacuna.^{8,18,19}

SUMMARY

Strains A-15 (isolated in Cuba, 1981), Jamaica (isolated in Jamaica, 1981) and Nueva Guinea "C" (standard) from dengue-2 virus were compared according to the time of appearance of the cytopathic effect (CPE), to the time of appearance of specific fluorescence and to the kinetics of viral multiplication on being inoculated in the cell lines AP-61 (*Aedes pseudoscutellaris*) and C6/36 HT (*Aedes albopictus*). The results showed that the CPE of highest intensity and earliest appearance was for A-15, followed by Jamaica and Nueva Guinea "C" (NGC). AP-61 seems to favor the CPE of Jamaica with respect to that of the same strain in C6/36 HT. The fluorescence was earlier for Jamaica and A-15 and more intensive for the latter, whereas NGC manifested late. This behaviour was similar in the 2 cellular systems. The greatest titres during the kinetics of viral multiplication were obtained from A-15 in both lines, although in AP-61 they tend to be equal from the 4th day on. The strain A-15 showed a particular behaviour of these biological properties on comparing them with the other strains under study, which may be related to changes found in its nucleotide sequence.

Subject headings: DENGUE, AEDES; CYTOPATHOGENIC EFFECT, VIRAL/immunology; FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE, INDIRECT/methods.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Monath TP. Dengue: The risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2395-400.
2. Halstead SB. The XXth century dengue pandemic: need of surveillance and research. *World Health Stat Q* 1992;45:292-8.
3. Rigau-Pérez J, Clark G, Gubler D, Reiter P, Sanders E, Vorndam V. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1998;352:971-7.
4. Murphy FA, Kiley MP, Fisher-hoch SP. *Flavivirus*. En: *Fields virology*. 3ra. ed. United Kingdom: Lippincott-Raven, 1996: 291-306.
5. Camacho D, Guzmán M, Morier L, Álvarez M, Rodríguez R, Comach G. Estudio de algunas propiedades biológicas de 3 cepas de dengue 2 con diferencias en sus secuencias nucleotídicas. *Rev Cubana Med Trop* 1999;51(3):177-80.
6. Rosario D. Detección del serotipo de virus del Dengue. *Rev Panam Salud Pública* 1988;4(1):174-8.
7. Guzmán M, Deubel V, Pelegrino JL, Rosario D, Marrero M, Sariol C, *et al.* Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-2 strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. *Am J Med Hyg* 1995;52(3):241-6.
8. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990;174(2):479-93.
9. Organización Panamericana de la Salud. *Dengue y dengue hemorrágico en Las Américas: guías para su prevención y control*. Washington DC: OPS, 1995: (Publicación Científica; 548).
10. 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 Roy Soc Trop Med Hyg* 1974;68:374-82.
11. Zhu Guan-fu. Dengue virus microculture. *Dengue virus mirol*, 1982;7(3):139-41.
12. Morens D, Halstead S, Repik P, Ravithat, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21. *Virology* 1990;174(2):492-504.
13. Morens D, Marchete NJ, Chu MC, Halstead S. Growth of dengue type 2 virus isolates in human blood leukocytes correlates with severe and wild Dengue disease. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45(5):644-51.
14. 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.
15. Kurane I, Mady BJ, Ennis FA. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Med Virol* 1991;2:211-21.
16. 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.
17. Gibco BRL. *Catalogue and reference guide 1993-1994*. Gaithersburg: Live Technologies. 1990:1-43.
18. Vaughn D, Hoke C, Yoksan S, La Chance R, Innis B, Rice R, *et al.* Testing of a dengue 2 live attenuated vaccine (strain 16681 PDK 53) in ten American volunteers. *Vaccine* 1996;14:329-36.
19. Holzman H, Heinz FX, Mandi CW, Guirakhoo F, Kunz C. A single amino acid substitution in envelope protein E of tick-borne encephalitis virus leads to attenuation in mouse model. *J Virol* 1990;64:5156-9.

Recibido: 9 de diciembre de 1999. Aprobado: 5 de mayo del 2000.

Lic. *Luis Morier*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: ciipk@ipk.sld.cu