

UNIVERSIDAD DE CARABOBO, VENEZUELA

## Propiedades biológicas de cepas venezolanas de DENV-2 aisladas de pacientes con fiebre de dengue y fiebre hemorrágica del dengue

Daríá Elena Camacho García,<sup>1</sup> Mergiory Bracho-Labadie,<sup>2</sup> Francisco Manuel Rodríguez Henríquez,<sup>3</sup> Luis Morier Díaz,<sup>4</sup> María Guadalupe Guzmán Tirado<sup>5</sup> y Guillermo Alfredo Comach Pérez<sup>6</sup>

### RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** el virus del dengue es responsable de un creciente problema de salud pública, sin que se haya dilucidado aún el papel de algunos atributos biológicos en la virulencia y(o) patogenicidad de los serotipos virales. **OBJETIVO:** evaluar propiedades biológicas *in vitro* e *in vivo* de 4 cepas venezolanas de DENV2 (LAR1693, LAR19094, LAR2303, INH35262) causantes de fiebre de dengue y fiebre hemorrágica del dengue y la cepa (16681) aislada de un paciente con fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque del dengue. **MÉTODOS:** las cepas evaluadas fueron aisladas de sueros de pacientes virémicos con fiebre de dengue y fiebre hemorrágica del dengue. La titulación se realizó mediante el ensayo de titulación en placas en la línea celular BHK-21, esta metodología permitió determinar el tamaño de placa y la cinética de multiplicación viral. Se determinó el tiempo y la intensidad del efecto citopático e inmunofluorescencia específica en la línea celular C6/36-HT mediante las técnicas de microscopía óptica y de fluorescencia, respectivamente. De manera adicional, se emplearon las metodologías de citometría de flujo para cuantificar la replicación viral en las células C6/36-HT y la inoculación en ratones lactantes para la determinación de neurovirulencia. **RESULTADOS:** las cepas, excepto 16681, produjeron placas pequeñas (m.o.i.: 0,01). La replicación viral en C6/36-HT fue mayor para 16681. El efecto citopático permitió clasificar las cepas en baja (LAR19094 y LAR2303), moderada (INH35262 y 16681) y alta citopatogenicidad (LAR1693). El primer día posinoculación se detectó inmunofluorescencia entre 5 y 50 %, excepto para 16681. La neurovirulencia en ratones lactantes inoculados con 10<sup>4</sup> ufp/mL causó 77,5 % (INH35262) a 100 % (LAR1693 y 16681) de mortalidad, con variabilidad en los días de supervivencia. La replicación viral (24, 36 y 48 h posinoculación) mediante citometría de flujo fue desde 3,33 % hasta 90,3 %. **CONCLUSIONES:** los resultados permitieron concluir que el comportamiento de las cepas virales no fue evidencia suficiente para correlacionar estos atributos biológicos *in vitro* e *in vivo* con la severidad de los cuadros clínicos.

**Palabras clave:** dengue virus, propiedades biológicas, placas líticas, efecto citopático, replicación viral, neurovirulencia.

### INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad infecciosa causada por cualquiera de los serotipos del virus dengue (DENV) -DENV1, DENV2, DENV3, DENV4- estrechamente relacionados, pero

antigénicamente distintos.<sup>1</sup> El DENV es endémico en más de 100 países, con un registro de 50 millones de infectados cada año, incluidos 500 000 casos de FHD/SCD que requieren hospitalización.<sup>2</sup> En muchos países de Asia y América Latina, la FD ha sido reemplazada por epidemias de casos

<sup>1</sup> Magister en Ciencias. Investigador Asociado. Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Virales, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (LARDIDEV/BIOMED-UC), Maracay, Venezuela.

<sup>2</sup> Magister en Ciencias. Investigador Asociado. LARDIDEV/BIOMED-UC, Maracay, Venezuela.

<sup>3</sup> Doctor en Ciencias. Investigador Principal. Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC), Maracay, Venezuela.

<sup>4</sup> Máster en Ciencias. Profesor Titular. Investigador Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>5</sup> Especialista de I Grado en Microbiología. Doctor en Ciencias. Profesor Titular. Investigador Titular. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>6</sup> Magister en Ciencias. Investigador Principal. LARDIDEV/BIOMED-UC. Maracay, Venezuela.

severos; tal como se observó en 1981 en Cuba con la ocurrencia de la primera epidemia de FHD/SCD en la región de las Américas, la cual se extendió a Venezuela a finales de 1989, donde se reportaron más de 6 000 casos de FHD y 73 muertes, en la cual estuvieron involucrados los serotipos DENV1, DENV2 y DENV4. Los casos fatales se asociaron a DENV2.<sup>3</sup>

La patogénesis de las infecciones por DENV se ha tratado de explicar mediante hipótesis, como el papel de la inmunoamplificación dependiente de anticuerpos en el desarrollo de FHD/SCD, en pacientes que presentan una infección secundaria por un serotipo heterólogo.<sup>4</sup> Alternativamente, se ha sugerido que algunas cepas con un determinado potencial de virulencia pueden incrementar su tasa de replicación en determinadas células humanas,<sup>5</sup> y que algunos genotipos virales están asociados a la ocurrencia de FHD,<sup>6</sup> lo cual indicaría que las cepas quizás presenten alguna característica asociada con incremento en el riesgo de presentación de casos severos, que determinan por sí mismas la gravedad de la enfermedad.<sup>7</sup> Sin embargo, se ha dificultado la determinación de los factores contribuyentes en el incremento de los casos severos, entre otras causas por la falta de un modelo animal adecuado que permita evaluar la patogénesis de FHD/SCD y(o) los factores que participan en su desarrollo.<sup>7</sup> En este estudio se evaluaron propiedades biológicas *in vitro* e *in vivo* de cepas de DENV2 venezolanas aisladas de pacientes con FD y(o) FHD, para finalmente asociarlas con el comportamiento clínico de la enfermedad según su severidad.

## MÉTODOS

### CEPAS VIRALES

Se emplearon 3 aislados de DENV2 procedentes del estado Aragua (LAR1693, LAR2303 y LAR19094), un aislado del estado Barinas (INH35262) donado por el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" y la cepa 16681 (IBS-C, 8LLC-MK<sub>2</sub>, 1Mr, 2Mo, 7C6/36, 5C6/36-HT), empleada como control, donada por el *US Naval Medical Research Center of Detachment* (NMRCD) de Lima, Perú, los cuales fueron amplificados en C6/36-HT (1- 5 pasajes [1P – 5P] *in*

*vitro*) preparados en alícuotas de 0,5 uL y almacenados para su uso a - 70 °C.

### CONCENTRACIÓN DE LAS CEPAS VIRALES

Las cepas con títulos menores que 10<sup>5</sup> UFP/mL (LAR1693, LAR2303, LAR19094 e INH35262) fueron subcultivadas en C6/36-HT y luego concentradas mediante centrifugación con el uso de membranas Centricon® Plus-70 (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA).

### TITULACIÓN DE LAS CEPAS

Antes y después de su concentración con Centricon® Plus-70 se realizó la titulación viral de cada una de las cepas.<sup>8</sup> Brevemente, diluciones seriadas (desde 1:10 hasta 1:2 560) en medio mínimo esencial suplementado con 2 % de suero fetal bovino (MEM 2% SFB) de cada una de las cepas, se inocularon (por triplicado) en placas de 24 pozos que contenían células BHK-21 clono 15. Las placas se incubaron en 5 % CO<sub>2</sub>, a 37 °C por 5 d, para ser teñidas con azul negro de naftol. Las placas líticas producidas se contaron para calcular los títulos virales expresados en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL).

### TAMAÑO DE PLACA

Se midieron los diámetros (mm) de las placas producidas por la replicación viral en células BHK-21 clono 15, a los 5 d posinoculación (d.p.i.).<sup>8</sup> Se consideraron placas grandes, medianas y(o) pequeñas, aquellas que tuvieran diámetros de ≥ 5 mm, 2-4 mm y ≤ 1 mm, respectivamente.<sup>9</sup>

### CINÉTICA DE MULTIPLICACIÓN VIRAL

Se inocularon las diferentes cepas a una multiplicidad de infección (m.o.i.: 0,01) en la línea celular C6/36-HT y los sobrenadantes se colectaron durante 7 d.p.i., para preparar alícuotas y almacenarlas a - 70 °C para su titulación en BHK-21 clono 15. Los títulos virales se expresaron en logaritmos base 10 UFP/mL.<sup>8</sup>

#### TIEMPO DE APARICIÓN E INTENSIDAD DEL EFECTO CITOPÁTICO (ECP)

Las células C6/36-HT inoculadas a una m.o.i.: 0,01 con cada una de las cepas, fueron observadas diariamente durante 7 d. El ECP se reportó en porcentajes, se consideró desde la presentación en forma de sincitios celulares hasta la destrucción total de la monocapa.

#### TIEMPO DE APARICIÓN E INTENSIDAD DE LA INMUNOFLORESCENCIA (IF) ESPECÍFICA

Se determinó con el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -DEN2 (AcMc 3H5)<sup>10</sup> en cada uno de los d.p.i. de C6/36-HT inoculadas a una m.o.i.: 0,01. Los resultados se registraron de acuerdo con el porcentaje de células infectadas.

#### DETERMINACIÓN DE LA REPLICACIÓN VIRAL MEDIANTE LA TÉCNICA DE CITOMETRÍA DE FLUJO (CF)

Células C6/36-HT fueron infectadas con las cepas virales a una m.o.i.: 0,01. A las 24 h, 36 h y 48 h posinfección, las células fueron desprendidas y lavadas con MEM (2 % STF, 0,01 %  $\text{NaN}_3$ ) y con PBS, pH: 7,2. El sedimento se resuspendió en PHA (4 %) y se incubó a temperatura ambiente (TA) en oscuridad por 5 min, se lavaron con PBS y resuspendieron en Tritón X-100 (0,1 %), para su incubación a TA en oscuridad por 5 min. Poste-

riormente, se marcaron con anticuerpo anti-Dengue 2 (AcMc 3H5) y luego con un conjugado anti-ratón diluido 1:100 en MEM (10 % suero de conejo, 0,01 %  $\text{NaN}_3$ ) para ser incubadas a 37 °C por 30 min. Finalmente, fueron lavadas y el sedimento se resuspendió en 500 uL de PBS para la lectura en citómetro de flujo (Beckman-Coulter, modelo Epics XL<sup>TM</sup>).<sup>11</sup> El resultado de cada análisis por CF se expresó según el porcentaje de células fluorescentes.

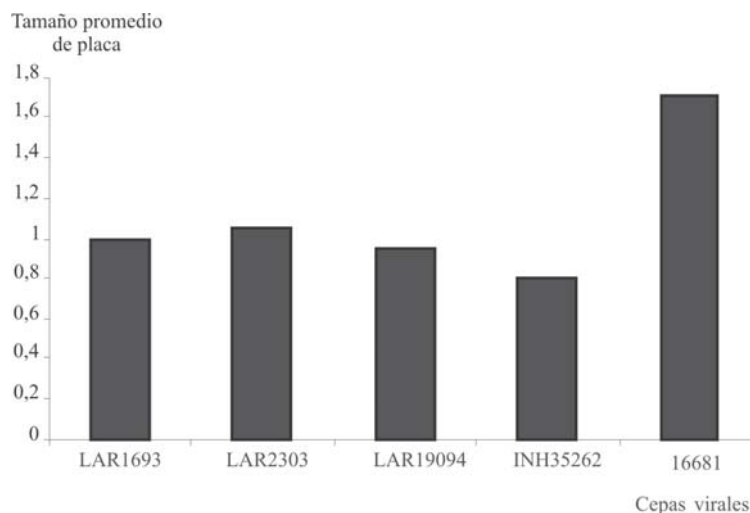
#### NEUROVIRULENCIA EN RATONES LACTANTES

Se inocularon ratones Balb/c lactantes intracerebralmente (i.c.) con  $10^4$  UFP/mL de las cepas en estudio. Los ratones fueron observados durante 21 d para registrar signos neuropatológicos, ganancia/pérdida de peso, porcentaje de mortalidad y promedio de días de supervivencia (PDS).

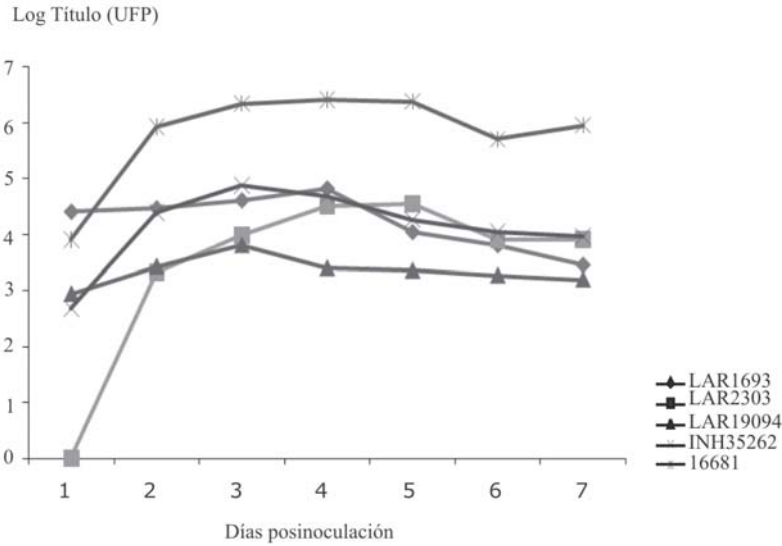
## RESULTADOS

#### TAMAÑO DE PLACA

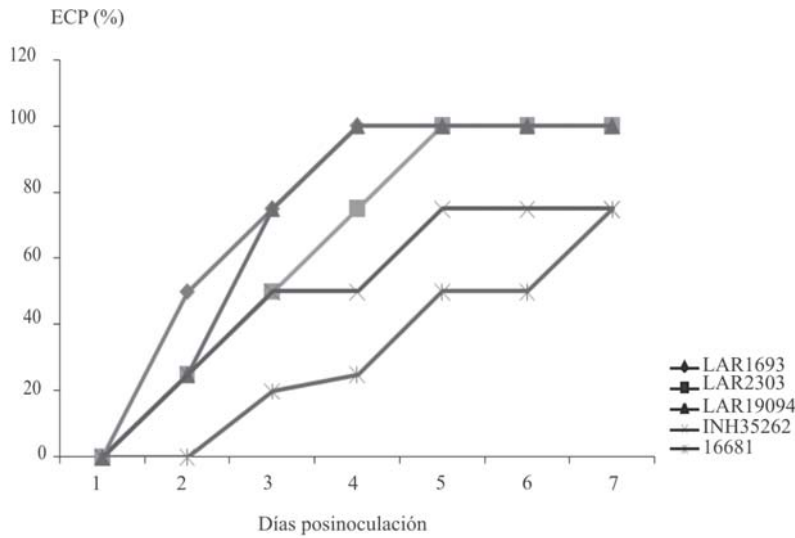
Basados en los criterios de definición del tamaño de las placas líticas<sup>9</sup> se observó que las cepas autóctonas (LAR1693, LAR2303, LAR19094, e INH35262) presentaron placas pequeñas (diámetro  $\leq 1$  mm) en lugar de las placas de tamaño moderado (1,7 mm) observadas en los cultivos de la cepa 16681 (Fig. 1).



**Fig. 1.** Tamaño promedio de placa producida por la replicación de las cepas de DENV-2 en la línea celular BHK-21.



**Fig. 2.** Cinética de multiplicación viral de las cepas LAR1693, LAR2303, LAR19094, INH35262 y 16681 en la línea celular BHK-21 a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0,01.



**Fig. 3.** Tiempo de aparición e intensidad (%) del efecto citopático (ECP) de las cepas LAR1693, LAR2303, LAR19094, INH35262 y 16681 en la línea celular C6/36-HT a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0,01.

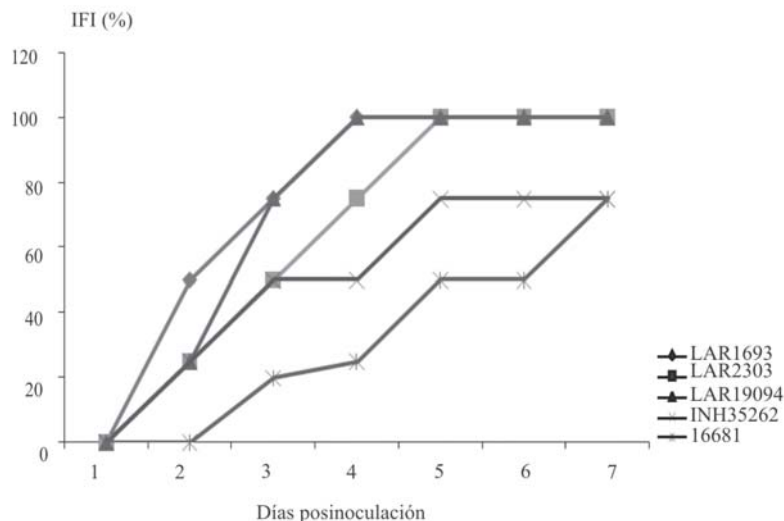
**CINÉTICA DE MULTIPLICACIÓN VIRAL**

Los títulos virales (título 10<sup>2</sup>-10<sup>4</sup> UFP/mL) se evidenciaron a partir del primer día posinoculación (d.p.i.) en las células inoculadas con las cepas LAR1693, LAR19094, INH35262 y 16681, y al segundo d.p.i. con la cepa LAR2303. Los títulos virales máximos se obtuvieron al tercer (LAR19094 e INH35262), cuarto (LAR1693 y 16681) y quinto (LAR2303) d.p.i. Destacan los títulos obtenidos con la cepa 16681 que fueron significativamente más altos (1-2 log) que los alcanzados por las demás cepas (Fig. 2).

**TIEMPO DE APARICIÓN E INTENSIDAD DEL EFECTO CITOPÁTICO (ECP)**

Se observaron diferencias que permitieron la segregación de cepas en 2 grupos según el grado de citopatogenicidad para las células C6/36-HT: el primero, de alta citopatogenicidad con destrucción total de la monocapa celular al quinto d.p.i, conformado por las cepas LAR1693, LAR2303 y LAR19094; el segundo, de citopatogenicidad moderada integrado por las cepas INH35262 y 16681 que ocasionaron 75 % ECP al quinto y séptimo d.p.i., respectivamente (Fig. 3).

**Fig. 4.** Tiempo de aparición e intensidad (%) de la inmunofluorescencia específica de las cepas LAR1693, LAR2303, LAR19094, INH35262 y 16681 en la línea celular C6/36-HT a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0,01.



#### TIEMPO DE APARICIÓN E INTENSIDAD DE LA INMUNOFLUORESCENCIA (IF) ESPECÍFICA

La IF específica, con diferentes grados de intensidad (5-50 %), se detectó en las cepas autóctonas a partir del primer d.p.i. Por otro lado, con la cepa Tailandesa 16681, la IF se detectó a partir del segundo d.p.i. con una intensidad de 10 % (Fig. 4). La máxima intensidad de fluorescencia (100 % de células infectadas) se observó en el segundo d.p.i. con las cepas LAR1693 y LAR19094, el tercer d.p.i. con la cepa INH35262 y el cuarto d.p.i. con las cepas LAR2303 y 16681.

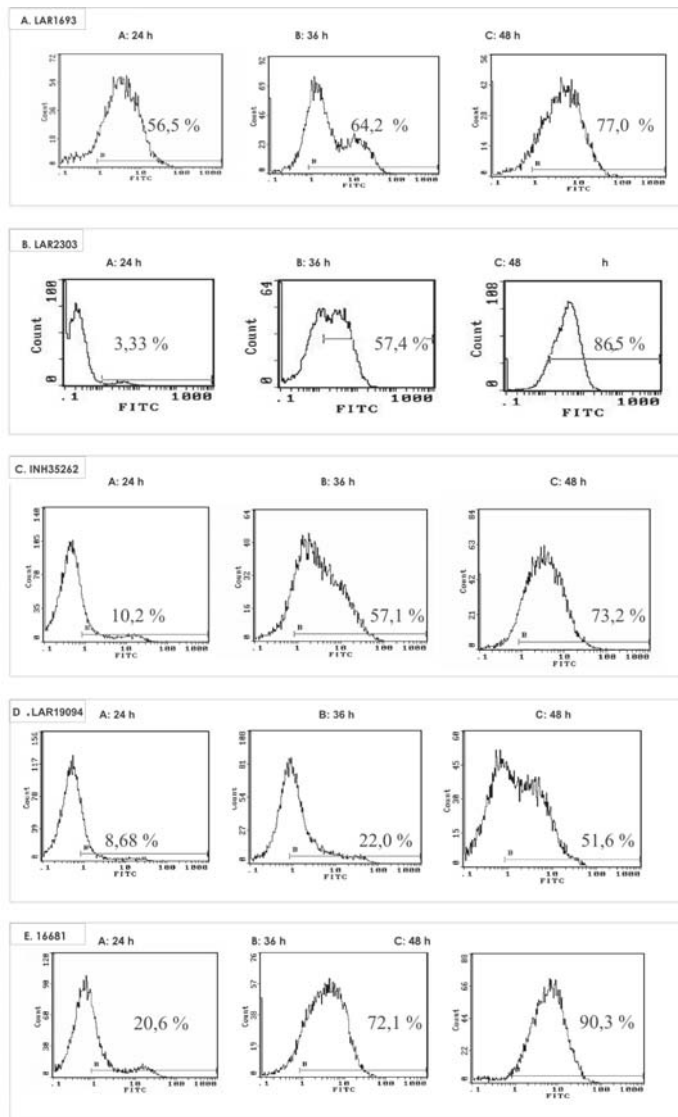
#### CUANTIFICACIÓN DE LA REPLICACIÓN VIRAL MEDIANTE LA TÉCNICA DE CITOMETRÍA DE FLUJO (CF)

La CF de los controles de células no infectadas marcadas (CNIM) con el anticuerpo monoclonal específico reveló porcentajes de células fluorescentes entre 0,92 y 3,43 %, a diferentes tiempos posinfección (t.p.i.). Partiendo de los valores de IF basales de las CNIM (resultados no mostrados), las células infectadas mostraron diferentes valores de fluorescencia en los distintos t.p.i. evaluados (24 h, 36 h y 48 h). La cepa LAR1693 mostró valores constantemente elevados en todos los t.p.i. (56,5-77 %) (Fig. 5A). La cepa LAR2303 destacó por producir un bajo porcentaje de células fluorescentes (3,33 %) a las 24 h posinfección (p.i.), para aumentar abruptamente a 57,4 y 86,5 % a las

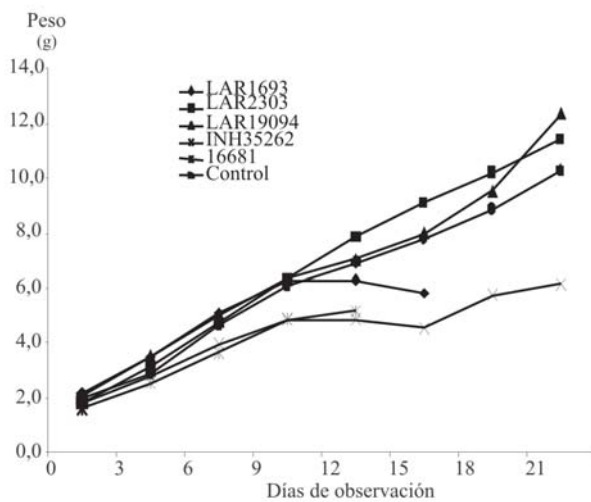
36 y 48 h p.i., respectivamente (Fig. 5B). El mismo comportamiento se observó con las cepas INH35262 y LAR19094, las cuales produjeron bajos porcentajes de células fluorescentes a las 24 h p.i. (10,2 y 8,68 %, respectivamente) seguidos de incrementos significativos a las 36 h (57,1 y 22 %, respectivamente) y 48 h (73,2 y 51,6 %, respectivamente) p.i. (Fig. 5C y 5D). Por último, destaca la capacidad replicativa de la cepa 16681, al producir 20,6 % de células fluorescentes a las 24 h p.i. y luego aumentar notoriamente a 72,1 y 90,3 % a las 36 y 48 h p.i.; respectivamente (Fig. 5E).

#### NEUROVIRULENCIA EN RATONES LACTANTES

Esta propiedad representa el comportamiento biológico de las cepas *in vivo*. Los resultados obtenidos permitieron agrupar las cepas según la neurovirulencia producida, así como determinar los valores de ganancia/pérdida de peso durante el período de observación (tabla) (Fig. 6). El primer grupo correspondió a cepas no virulentas (LAR2303 y LAR19094) que no produjeron los signos neuropatológicos característicos de la infección viral (paresia, caída del tren posterior y/o ataxia y erizamiento del pelo), y con ganancia de peso similares al grupo control. Otro grupo de cepas virulentas (INH35262, LAR1693 y 16681), que produjeron la neurovirulencia característica de la infección viral, acompañados de pérdida de peso a partir del noveno día y de una mortalidad variable (77,5 %-100 %).



**Fig. 5.** Porcentaje de células fluorescentes como medida de la replicación viral *in vitro* de las cepas VDEN-2 LAR1693 (A), LAR2303 (B), LAR19094 (C), INH35262 (D) y 16681 (E).



**Fig. 6.** Ganancia/pérdida de peso promedio de los ratones inoculados por vía intracerebral con las cepas de DENV-2 LAR1693, LAR2303, LAR19094, INH35262 y 16681.

## DISCUSIÓN

Se evaluaron 5 cepas de DENV2, aisladas en pacientes con diferentes presentaciones clínicas de la enfermedad (FD y FHD), con el fin de caracterizar su comportamiento *in vitro* e *in vivo*, en cultivos celulares de C6/36-HT y ratones lactantes, respectivamente. La primera de las características evaluadas fue el tamaño de placa, el cual se presentó moderado para la cepa 16681, mientras que el resto de las cepas, independiente de la condición clínica de los pacientes de los que fueron aisladas, produjeron placas pequeñas ( $\leq 1$  mm) (Fig. 1). Clásicamente, el fenotipo de placa pequeña ha sido considerado como un atributo biológico (marcador) de atenuación, porque se había observado que en estas disminuía el tamaño en la medida que sufrían varios pasajes en determinadas líneas celulares, como GMK (células de riñón de mono verde africano) y PDK (células de riñón de perro).<sup>12-16</sup>

El ejemplo clásico de la relación entre el fenotipo tamaño de la placa y la atenuación lo constituye la cepa vacunal de DEN2 en PDK53.<sup>17</sup> Esta fue producida mediante 53 subpasajes de la cepa “salvaje” 16681 en células PDK y presenta, además del fenotipo de placas líticas pequeñas, otros marcadores de atenuación como son la sensibilidad a la temperatura, pérdida de la neurovirulencia para los ratones lactantes y producción de viremias decrecientes en monos. En este estudio, no se obtuvo ninguna evidencia de que el fenotipo de placa lítica pequeña pudiera ser considerado marcador de atenuación (o virulencia), porque ese fue el atributo biológico predominante en las cepas estudiadas, indistintamente del cuadro clínico de los pacientes de los cuales fueron aisladas. Además, las cepas tenían una historia de subcultivos baja (máximo 5 pasajes en C6/36-HT), en comparación con la cepa 16681 —evaluada también en este trabajo— que ha tenido numerosos subpasajes *in vitro* (varias líneas celulares) e *in vivo* (monos y mosquitos), lo que haría suponer que en este estudio no cabría concluir que la placa pequeña como fenotipo pueda ser considerada como un contundente marcador de atenuación y(o) virulencia de las cepas de DENV2.

Otro hallazgo importante fue reportado en un estudio similar realizado con la cepa cubana A-15

y las cepas Jamaica y NG“C”, donde se observó que la cepa Jamaica era capaz de producir placas pequeñas en la línea celular BHK-21 en relación con las otras cepas; este no pudo ser atribuido al elevado número de pasajes en otros sistemas de aislamiento, porque para el momento del estudio solo contaba con 2 pasajes en mosquito y 2 pasajes en la línea celular C6/36, a diferencia de la cepa NG“C” cuya historia de pasajes era suficientemente elevada como para asociarlo con la producción de placas pequeñas, lo cual no fue exactamente así, puesto que mostró placas de un tamaño algo mayor que la cepa Jamaica.<sup>18</sup> Estos hechos y los encontrados en este estudio sugieren que no siempre es posible relacionar las placas pequeñas con un marcador de atenuación, y tampoco establecer una relación contundente con los cuadros clínicos del paciente, que en este estudio también se observó una relación inversa al observarse placas pequeñas en una cepa causante de FD (Jamaica).

En el seguimiento de la multiplicación viral de las cepas de DENV2, resalta la diferencia observada entre la cinética de la replicación de las cepas autóctonas y 16681, porque esta última mostró títulos virales más altos durante todo el período de observación. Este hecho sugiere que la historia de pasajes de la cepa 16681 pudo haber influido en la mayor capacidad replicativa de esta cepa en la línea celular C6/36-HT, a pesar de que hay reportes de líneas celulares como la AP-61 que favorecen la replicación de cepas de DENV2 inoculadas de igual forma en C6/36-HT. Este hecho fue descrito por Morier y otros (2000) quienes atribuyen que la mayor infección viral y la capacidad de persistencia pudiera deberse a mejores condiciones de supervivencia para las partículas virales, quizás por una mayor capacidad amortiguadora del medio de crecimiento empleado en las AP-61, lo cual favorece la estabilidad para el mantenimiento del pH.<sup>19</sup> Ahora bien, en lo que respecta a los cuadros clínicos estos resultados no hicieron posible la segregación de cepas en grupos que pudieran considerarse más o menos patogénicos y(o) virulentos, a pesar de que fueron capaces de causar FD y(o) FHD en los pacientes de donde fueron aislados; este hecho quizás estuvo influenciado por la línea celular empleada para su multiplicación, si se tiene en cuenta que se ha sugerido que cepas consideradas virulentas presentan incremento en su tasa

de replicación viral cuando son inoculadas en células humanas.<sup>20</sup> De acuerdo con estos hechos es posible sugerir que la multiplicación viral, así como el tamaño de placa, no es una propiedad que pudiera relacionarse directamente con la capacidad de las cepas de producir cuadros severos o no de la enfermedad por DENV.

El ECP mostró cepas con alta citopatogenicidad (LAR1693, LAR19094 y LAR2303), y cepas de moderada citopatogenicidad (INH35262 y 16681), en dependencia de la formación de polikariones en la monocapa celular. Algunos autores<sup>21</sup> sugieren que la formación de sincitios en células de mosquitos infectadas con DENV puede iniciarse con la liberación de viriones, que se fusionan con la membrana plasmática de células vecinas infectadas o no, por lo que los cambios fenotípicos como pérdida de la capacidad fusogénica pueden ser el resultado de una densidad subóptima de partículas infecciosas en los cultivos celulares, pero se observa cómo la cinética de multiplicación viral de la cepa 16681 demuestra claramente que presentó títulos virales superiores respecto a las otras cepas, sin producir ningún ECP, por ejemplo, al segundo d.p.i., mientras el resto presentaba entre 25 y 50 % de ECP, mayor aún con un título más elevado en el cuarto d.p.i (10<sup>6</sup> UFP/mL) solo fue capaz de producir 25 % de ECP en comparación con 50 y 100 % producido por los demás aislados. Estos hallazgos concuerdan con los descritos por Camacho y otros (1999), quienes observaron cómo el tiempo y la intensidad de presentación del ECP fueron diferentes para cada una de las cepas evaluadas e independiente de la historia de pases y del sistema celular empleado para su replicación. De forma destacada, reportan cómo la cepa cubana A-15 causante de un cuadro de FD mostró de forma temprana evidencias de ECP marcado, mientras que en este estudio la cepa 16681 aislada de un paciente con FHD/SCD presentó el menor ECP al compararla con las cepas autóctonas; lo que indica que a pesar de la clasificación de estas cepas según su potencial de causar ECP en C6/36-HT no es posible asociarlo con la severidad de la enfermedad causada en los pacientes de los cuales fueron aislados.<sup>18</sup> Asimismo, la intensidad de la fluorescencia específica de las células infectadas con las diferentes cepas, presentó un patrón variado los primeros 2 d.p.i., para luego hacerse más uni-

forme a partir del tercer d.p.i. En el caso de 16681, la detección de viriones por IF se observa 1 d después si se compara con el resto de las cepas y con una intensidad mucho menor. De nuevo se observa cómo la cepa 16681, presenta un comportamiento distinto a lo analizado en otro reporte<sup>18</sup> sobre cepas causantes de FD, como es el caso de la cepa A-15 cuyo patrón de fluorescencia se hace evidente de forma temprana y con una mayor intensidad al ser comparada con el resto de las cepas evaluadas.

El análisis mediante CF de C6/36-HT infectadas con las diferentes cepas permitió la detección de antígenos virales de una forma más fiable y real de la capacidad replicativa *in vitro* de estas cepas, al realizar este ensayo de una manera automatizada y no de la forma convencional con el uso de microscopía de fluorescencia, donde hay que considerar la subjetividad que puede tener el observador al momento de reportar la intensidad de la fluorescencia celular. De acuerdo con los hallazgos observados, se presentaron diferentes patrones de replicación viral, en relación con los porcentajes de células infectadas y detectadas por el citómetro de flujo. En tiempos determinados de la infección viral con la mayoría de las cepas estudiadas, ninguno de los valores de IF determinados por CF concordó con la IF específica estimada por microscopía de fluorescencia (MF) por simple observación, lo cual podría atribuirse a lo que se ha referido antes en relación con la subjetividad que genera la lectura por microscopía. Ahora bien, la replicación viral es una característica muy propia de cada cepa, porque destaca el hecho de que todas las cepas van aumentando de manera proporcional su replicación, pero con diferentes porcentajes de fluorescencia, sin que sea posible establecer un patrón de comportamiento para cada cepa (Fig. 5).

En cuanto a la valoración *in vivo*, la inoculación intracerebral en ratones lactantes dejó ver que solo 3 cepas (LAR1693, INH35262 y 16681) produjeron neurovirulencia y se manifestó por signos neuropatológicos (paresia, caída del tren posterior y(o) ataxia y erizamiento del pelo), pérdida de peso y mortalidad de grado variable (77,5 % la cepa INH35262 y 100 % las cepas LAR1693 y 16681). Se ha descrito<sup>18</sup> que el elevado número de pasajes de las cepas virales en determinados sistemas de



aislamiento, incluidos los ratones lactantes, favorece su multiplicación, hecho que no se observa en este estudio porque las cepas LAR1693 e INH35262 mostraron un comportamiento similar a la cepa 16681, cuya historia de pases es mucho mayor que para las mencionadas cepas. Así se observa que a pesar de lo descrito acerca de la baja sensibilidad de los ratones lactantes como sistema de aislamiento, no parece ser una conclusión que pueda tomarse de manera contundente cuando se observa que cepas autóctonas con baja historia de pases, especialmente LARD1693 causantes de cuadros leves de la enfermedad (FD) y que nunca antes fueron subcultivadas en este sistema murino, sean capaces de causar 100 % de mortalidad. Se ha reportado además que cepas de DENV2 adaptadas al crecimiento en ratones contienen múltiples sustituciones de aminoácidos en las proteínas estructurales y que un cambio o más de esta naturaleza son responsables de la neurovirulencia en ratones lactantes, en dependencia del serotipo viral.<sup>22</sup> Este hecho sugiere que la cepa LAR1693 presenta características que la hacen destacar del resto de las cepas, lo cual sugiere la realización de estudios en relación con otros atributos biológicos, incluida la secuenciación nucleotídica de su genoma completo y su comparación con otras cepas. En estudios de diversidad genética,<sup>23</sup> la cepa LARD1693 ha sido clasificada dentro del genotipo americano/asiático por secuenciación del gen E, y es calificada como una cepa con potencial de causar cuadros severos por poseer la sustitución nucleotídica en la posición E-390, descrita por *Leitmeyer* y otros (1999) como determinante de patogenicidad.<sup>24</sup> Este hecho, aunado a lo observado en este estudio, son hallazgos que de forma contundente favorecen la continuación de estudios sobre esta cepa (LARD1693).

Finalmente, aunque la patogenicidad de los flavivirus está relacionada con una variedad de factores virales y del hospedero, estos hallazgos no permiten hacer una correlación entre expresión de ciertos atributos biológicos y la severidad o no de la enfermedad, por lo que, bajo las condiciones experimentales del presente estudio, el comportamiento *in vitro* e *in vivo* de cada una de las cepas estudiadas es independiente de la severidad de la enfermedad que producen. Por lo tanto, ninguna de estas propiedades biológicas podría interpretarse

como atributo biológico de atenuación o virulencia de estas, lo que genera la necesidad de continuar ejecutando estudios relacionados con la caracterización de cepas de todos los serotipos virales asociadas con diferentes presentaciones clínicas. Para ello resulta indispensable ampliar este tipo de análisis, haciendo uso de otras líneas celulares (incluidas células de origen humano), mediante el seguimiento sobre pasajes sucesivos de estas; y haciendo uso de herramientas de avanzada como la secuenciación nucleotídica, que permitan no solo clasificar genotípicamente y prever el impacto epidemiológico, sino obtener hallazgos al nivel nucleotídico que puedan ser relacionados con su expresión fenotípica.

#### **Biological properties of Venezuelan DENV-2 isolated from patients with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever**

##### **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** the dengue virus causes a growing public health problem, but it has not been possible yet to determine the role of some biological attributes in the virulence and /or pathogenicity of viral serotypes. **OBJECTIVE:** to evaluate the *in vitro* and *in vivo* biological properties of 4 Venezuelan DENV-2 strains (LAR1693, LAR19094, LAR2303, INH35262) responsible for dengue fever and dengue hemorrhagic fever and the reference strain (16681) isolated from a patient suffering dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. **METHODS:** the evaluated strains were isolated from sera of viremic patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. They were then subjected to the plaque titration assay in BHK-21 cell line in order to determine the plaque size and kinetics of viral replication. The length of time and intensity of cytopathic effect and specific immunofluorescence on the C6/36-HT cell line was evaluated by optical microscopy and fluorescence respectively. Additionally, the flow cytometry to quantify viral replication in C6/36-HT cells and the intracerebral inoculation in newborn mice to find out neurovirulence were both used. **RESULTS:** all strains, except for 16681, showed small plaques at 0.01 m.o.i. The viral replication in C6/36-HT was higher for 16681 strain. Through cytopathic effect observations the strains were classified with low (LAR19094 and LAR2303), mild (INH35262 y 16681) and high (LAR1693) cytopathogenicity. The specific immunofluorescence ranged 5 to 50 % in the first day post inoculation, except for 16681 strain. The neurovirulence in newborn mice inoculated with 10<sup>4</sup> pfu/mL yielded 77,5 (INH35262) to 100 % (LAR1693 y 16681) mortality rate and variability during survival days. The viral replication at 24, 36 and 48 hours after inoculation was assessed by flow cytometry, ranging from 3,33 to 90,3 %. **CONCLUSIONS:** the results led to the conclusion that viral strain behaviors were not sound evidence to correlate these *in vitro* e *in vivo* biological attributes with the severity of the clinical pictures.

**Key words:** dengue virus, biological properties, lithic plaques, cytopathic effect, viral replication, neurovirulence.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gubler D. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480-96.
2. World Health Organization. Dengue y dengue hemorrágico [serie en Internet]. [citado 03 Ene 2009]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>
3. Pan American Health Organization. Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiol Bull.* 1990;11:7-9.
4. Halstead SB. Immune enhancement of viral infection. *Prog Allergy.* 1982;31:301-64.
5. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003;59:315-41.
6. Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65:180-3.
7. Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology.* 1999;25;257(1):1-6.
8. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicromethods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol.* 1985;22(2):250-4.
9. Halstead S, Marchette, N. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69(6 Suppl):5-11.
10. Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg.* 1982;31(4):830-6.
11. Kao ChL, Wu MC, Chiu YH, Lin JL, Wu YCh, Yueh Y et al. Flow Cytometry Compared with Indirect Immunofluorescence for Rapid Detection of Dengue Virus Type 1 after Amplification in Tissue Culture. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3672-7.
12. Singh KRP, Paul SD. (1969). Isolation of dengue viruses in *Aedes albopictus* cell cultures. *Bulletin WHO.* 1969;40:982-3.
13. Eckels KH, Harrison VR, Summers PL, Russell PK. Dengue-2 vaccine: preparation from a small-plaque virus clone. *Inf Imm.* 1980;27(1):175-80.
14. McKee KT, Bancroft WH, Eckels KH, Redfield RR, Summers PL, Russell PK. Lack of attenuation of a candidate dengue 1 vaccine (45AZ5) in human volunteers. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36(2):435-42.
15. Innis BL, Eckels KH, Kraiselburd E, Dubois DR, Meadors GF, Gubler DJ et al. Virulence of a live dengue virus vaccine candidate: a possible new marker of dengue virus attenuation. *J Inf Dis.* 1988;158(4):876-80.
16. Sánchez IJ, Ruiz BH. 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.
17. Yoksan S, Bhamarapravati N, Halstead SB. Dengue virus vaccine development: study on biological markers of uncloned dengue 1-4 viruses serially passaged in primary kidney cells, p. 35-38. In T. D. St. George, B. H. Kay, and J. Blok (ed.), *Arbovirus research in Australia. Proceedings of the Fourth Symposium.* CSIRO/QIMR, Brisbane, Australia; 1986.
18. Camacho DE, Guzmán MG, 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.
19. Morier L, Camacho DE, Guzmán MG, Álvarez M, Rodríguez R, Comach G. Comportamiento biológico de 3 cepas del virus dengue-2 en dos líneas celulares de mosquitos. *Rev Cubana Med Trop.* 2000;52(3):215-9.
20. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003;59:315-41.
21. Randolph VB, Stollar V. Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. *J Gen Virol.* 1990;71(Pt 8):1845-50.
22. Bray M, Men R, Tokimatsu I, Lai Ch. Genetic determinants responsible for acquisition of Dengue type2 virus mouse neurovirulence. *J Virol.* 1998;72(2):1647-51.
23. Uzcátegui NY, Camacho D, Comach G, Cuello de Uzcátegui R, Holmes EC, Gould EA. The Molecular Epidemiology of Dengue-2 Virus in Venezuela: Evidence for *in situ* virus evolution and recombination. *J Gen Virol.* 2001;82(Pt 12):2945-53.
24. Leitmeyer K, Vaughn D, Watts D, Salas R, Villalobos I, Ramos C, Rico-Hesse R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* 1999;4738-47.

Recibido: 27 de febrero de 2009. Aprobado: 15 de abril de 2009.  
 M. C. *Guillermo Alfredo Comach Pérez*. Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Virales, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (LARDIDEV/BIOMED-UC), Maracay, Venezuela. 00-58-243-242.58.22/59.9/fax: 00-58-243-242.53.33. Correo electrónico: gcomach@yahoo.com