

**COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REPLICACIÓN IN VITRO,
SUSCEPTIBILIDAD A NEUTRALIZACIÓN POR ANTICUERPOS Y TIPO
GENÉTICO ENTRE UNA CEPA DE VIRUS DENGUE SEROTIPO 3 DE
COLOMBIA Y UNA DEL SUR DE ASIA.**

FLOR ANGELA TORRES PIMIENTO

**Tesis de Grado como requisito para optar al título de
Bióloga**

Directora: RAQUEL E. OCAZONEZ PhD.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2008**

**COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REPLICACIÓN IN VITRO,
SUSCEPTIBILIDAD A NEUTRALIZACIÓN POR ANTICUERPOS Y TIPO
GENÉTICO ENTRE UNA CEPA DE VIRUS DENGUE SEROTIPO 3 DE
COLOMBIA Y UNA DEL SUR DE ASIA.**

FLOR ANGELA TORRES PIMIENTO

**Tesis de Grado como requisito para optar al título de
Bióloga**

Directora: RAQUEL E. OCAZONEZ PhD.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2008**

Y me ha dicho: Bástate mi gracia; por que mi poder se perfecciona en la debilidad. Por tanto, de buena gana me gloriaré más bien en mis debilidades para que repose sobre mí el poder de Cristo. 2^{da} de Corintios 12:9

*A Dios por dármele todo
A mi papá por su ejemplo de persistencia
A mi familia por su perseverancia
A Sergio por llenar mi vida de amor y felicidad
A mis amigos por su apoyo incondicional*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme realizar este sueño.

A la doctora Raquel E. Ocazonez, directora del Laboratorio de Arbovirus del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) por la oportunidad de acercarme a la excelencia, por su valiosa dirección, confianza y compromiso.

A Sergio Y. Gómez por su ayuda incondicional, colaboración científica y técnica.

A Fabián M. Cortés por su asesoría y respaldo.

A Henry Bautista por su apoyo moral, científico y consejos siempre muy acertados.

A Rocío Meneses por su cooperación y amistad.

Al laboratorio de Arbovirus por la financiación de mi trabajo de grado.

Al CINTROP por sus instalaciones y préstamo de equipos.

	pág.
1.INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVO	16
3. MARCO TEÓRICO	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 VIRUS	21
4.2 CÉLULAS	21
4.3 SUEROS	22
4.4 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD)	22
4.5 CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS (TÍTULO VIRAL)	22
4.6 ENSAYO PARA COMPARAR REPLICACIÓN IN VITRO DEL VIRUS	23
4.7 ENSAYO DE NEUTRALIZACIÓN	23
4.8 SUBTIPO GENÉTICO	23
5. RESULTADOS	24
5.1 REPLICACIÓN DEL VIRUS	24
5.2 NEUTRALIZACIÓN POR SUERO HUMANO	25

5.3 SUBTIPO GENÉTICO (RSS-PCR)	27
6. DISCUSION	29
7. CONCLUSIONES	32
8. BIBLIOGRAFIA	33

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Título viral en cultivos de células de mosquito <i>Aedes aegypti</i> (clon C6/36) infectados con la cepa colombiana y asiática de virus dengue serotipo 3.	22
Tabla 2. Magnitud de la neutralización de la cepa colombiana del virus dengue serotipo 3 por suero humano homólogo comparada con la asiática.	24

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Ausencia de efecto citopático sobre células de mosquito <i>Ae. albopictus</i> (clon C6/36) por la cepa colombiana de virus dengue serotipo 3 comparada con la asiática y la prototipo del serotipo.	21
Figura 2. Magnitud de la neutralización del virus dengue serotipo 3 por suero humano homólogo según el resultado de la inmunofluorescencia (IFD).	23
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa mostrando productos de amplificación de secuencias genómicas para enzimas de restricción (RSS-PCR) de cepas del VDEN-3.	25

COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REPLICACIÓN IN VITRO, SUCEPTIBILIDAD A NEUTRALIZACIÓN POR ANTICUERPOS ANTI DENGUE Y TIPO GENÉTICO ENTRE UNA CEPA DE VIRUS DENGUE SEROTIPO 3 DE COLOMBIA Y UNA DEL SUR DE ASIA.

AUTORES: TORRES PIMIENTO Angela**, OCAZONEZ JIMÉNEZ, Raquel Elvira***

PALABRAS CLAVES: Dengue, Colombia, Sri. Lanka, efecto citopático, neutralización, tipificación molecular.

RESUMEN

El virus dengue serotipo 3 introducido en Colombia en 2001 ha causado epidemias de dengue pero casos severos han sido infrecuentes. Al contrario, la circulación del virus en Asia se ha asociado con dengue hemorrágico. En este estudio se comparó la replicación *in vitro*, susceptibilidad a neutralización por anticuerpos anti dengue y tipo genético entre una cepa del virus aislada en Santander y una de Sri-Lanka.

Se infectaron cultivos de células (C6/36) con preparaciones de 10.000, 100, 50 or 25 TCID₅₀ del virus a 32°C. durante 8 días. El efecto citopático (ECP) se registró diariamente y se determinó el título viral en el sobrenadante. Para neutralización, el virus fue incubado 2 h at 37°C con suero positivo o no para anticuerpos anti dengue-3 y la mezcla se adicionó a cultivos celulares. Se consideró neutralización positiva la ausencia de antígeno viral o disminución de células que lo expresaban usando un ensayo de inmunofluorescencia. Para tipificación genética, se utilizó un protocolo de la reacción en cadena de polimerasa (RSS-PCR).

La cepa Colombiana fue menos eficiente para replicarse en cultivos C6/36 que la Asiática. La primera no produjo ECP en las células en ningún día de replicación y en cultivos infectados con 100, 50 o 25 TCID₅₀ el título viral fue menor ($10^{2.2}$, $10^{1.5}$ or 0 vs $10^{3.5}$, $10^{1.5}$ or $10^{1.5}$ TCID₅₀). La neutralización con suero anti dengue-3 fue más eficiente para el virus colombiano que el asiático (dilución $10^{-4.5}$ vs $10^{-2.0}$ para neutralización total), sugiriendo diferencias antigénicas. Ambos virus resultaron subtipo C y no se observaron diferencias en el número de fragmentos amplificados.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Carrera de Biología

*** Facultad de Salud. PhD. Director tesis

TITLE: COMPARISON OF THE CAPACITY OF REPLICATION IN VITRO, SUSCEPTIBILITY TO NEUTRALIZATION BY DENGUE ANTIBODIES AND GENETIC SUBTYPE BETWEEN TWO DENGUE VIRUS SEROTYPE 3 STRAINS ISOLATED IN COLOMBIA AND ASIA.

AUTHORS: TORRES PIMIENTO Flor Angela**, OCAZIOINEZ JIMÉNEZ, Raquel Elvira***

KEY WORDS: Dengue, Colombia, Sri. Lanka, Citopatic effect, neutralization, molecular typing.

ABSTRACT

The dengue virus serotype 3 introduced in Colombia in 2001 had caused dengue epidemics but severe cases have been infrequent. In contrast, the circulation of the virus in Asia have been associated with hemorrhagic dengue. In this study was compared the replication *in vitro*, susceptibility to neutralization by dengue antibodies and genetic subtype between one virus strain isolated in Santander and one virus from Sri-Lanka.

Cell cultures (C6/36) were infected with virus preparations with 10.000,100, 50 or 25 TCID₅₀ during 8 days at 32°C. Daily the citopatic effect (CE) was registered, and the viral titer was determined in the supernatant. For neutralization, virus was incubated 2 h at 37°C in the presence of serum positive or not to dengue-3 antibodies, and the mixture was added to C6/36 cultures. The absence of viral antigen or diminution of cells that expressed it by immunofluorescence assay was considered positive neutralization. For genetic subtyping a restricción site-especific-polymerase chain reaction (RSS-PCR) protocol was used.

Colombian strain was less efficient to replicate in C6/36 cells than asian strain. The first do not produced CP on cells any day during the replication, and the virus reached less viral titer in culture infected with 100, 50 or 25 TCID₅₀ ($10^{2.2}$; $10^{1.2}$ or 0 vs $10^{3.5}$, $10^{1.5}$ or $10^{1.5}$ TCID₅₀). Serum positive for dengue-3 antibodies neutralized more efficiently colombian virus strain than asian virus strain (dilution $10^{-4.5}$ vs $10^{-2.0}$ to total neutralization), suggesting antigenic differences. Both viruses resulted subtype C and differences in the number of amplified fragments was not observed.

* Graduate thesis.

** Faculty of Science. Biology School . Graduate Biology Programme

*** Faculty of Health, Raquel Elvira Ocazionez Jiménez, Director thesis.

1. INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad causada por el virus del mismo nombre (VDEN) el cual se trasmite a los humanos a través de la picadura del mosquito del género *Aedes*. Se considera la enfermedad viral transmitida por un insecto más frecuente en países de América y Asia. Existen cuatro serotipos del virus conocidos como VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4 y la infección con cualquiera de ellos puede resultar asintomática o en enfermedad que varía desde un síndrome febril autolimitado conocido como dengue clásico (DC) hasta la forma hemorrágica (DH) en algunos casos con choque hipovolémico (DH/SCH) el cual puede llevar a la muerte (Gubler 1998, Henchal & Putnak 1990). Se estima que más de 50 millones de personas se infectan anualmente de las cuales 500.000 sufren DH/SCH y de estas 25.000 y 50.000 mueren (WHO 2002). En Colombia el dengue es endémico con epidemias cada 2-3 años, entre 2002-2005 se reportaron al Ministerio de la Protección Social 116.952 casos de los cuales 12.163 fueron hemorrágicos (Ministerio de Protección Social 2006). En Santander entre 1998 y 2004 la Secretaría de Salud Departamental informó 45.823 casos de los cuales 4.634 se consideraron hemorrágicos (Álvarez et al. 2004).

Cualquier serotipo del VDEN puede causar DH o DH/SCH pero el DEN-2 y DEN-3 son los que con mayor frecuencia lo inducen ocasionando muertes (Nisalak et al. 2003, Vaugh et al. 2000). Antes de 1989 el DH fue común en el sureste de Asia pero raro en la India y Sri-Lanka a pesar de la circulación de los cuatro serotipos. Después de 1989 este patrón de la enfermedad cambió, epidemias de DH se vienen reportando en ambos países desde entonces y una variante genética del VDEN-3 (subtipo III) ha sido la cepa aislada de la mayoría de los casos severos (Dash et al. 2006, Messer et al. 2003, Vitarana et al. 1993).

El VDEN-3 apareció por primera vez en América en 1963 diseminándose a varios países y permaneció hasta 1977 cuando se aisló por última vez en Colombia (Pinheiro & Corber 1997, Boschell et al. 1986). En este primer período se reportaron epidemias causadas por este serotipo del virus y los casos fueron de DC (Neff et al. 1967). Luego de 17 años de ausencia el virus reapareció, por primera vez en Nicaragua y Panamá en 1994 y de aquí se diseminó a países vecinos como México, Puerto Rico, Guatemala, El Salvador y otros (PAHO 2000, Pinheiro & Corber 1997). En el 2000 se reportó su entrada a Suramérica simultáneamente a Venezuela (Uzcategui et al. 2001) y Brasil (Nogueira et al. 2001) de donde se diseminó a los otros países. La reaparición del VDEN-3 en esos países se asoció con epidemias de tiempo prolongado pero la mayoría de los casos fueron de DC (Ocazionez et al. 2006, Mamani et al. 2006, Aquino et al. 2003). Una excepción fue Brasil, en este país produjo la mayor epidemia de

DH registrada hasta la fecha con varias muertes y el virus continua aislándose de casos severos (Nogueira et al. 2005). Desde 1994 el VDEN-3 viene circulando de manera permanente en varios países del Continente americano causando brotes. Varios autores han comparado genéticamente cepas del virus aisladas en los años 70 y después de 1994 (Aquino et al. 2003, Messer et al. 2003, Uzcategui et al. 2001, Lanciotti et al. 1994). Los estudios permitieron concluir que son diferentes, las primeras se agruparon junto a cepas de Tahití y otras del genotipo IV y las segundas resultaron similares a virus del mismo serotipo que han circulado en Sri-Lanka e India desde 1989. Debido a esto último se considera que la cepa reintroducida en 1994 es oriunda de esa región asiática.

En Colombia los 4 serotipos del VDEN circulan permanentemente desde la entrada del virus en 1971 aunque entre 1977-2000 el VDEN-3 al parecer desapareció ya que aislamientos de este serotipo no se reportaron en ese período (Boschell et al. 1986). En el año 2001 el VDEN-3 reaparece nuevamente y es en el Departamento de Santander donde se reporta el primer aislamiento. El mismo fue realizado en el Laboratorio de Arbovirus del CINTROP (UIS) a partir del suero de un paciente que sufrió DC (Ocazonez et al. 2006). En los años siguientes el virus se detecta en el Norte, Occidente y Sur del país en varios departamentos donde el dengue es endémico y la introducción en las localidades coincidió con brotes (Ospina 2004, Ministerio de Salud y Protección Social 2002, Bernal et al. 2002). La reaparición del virus en Santander en 2001 causó una epidemia que se extendió hasta el 2003 pero la severidad fue baja: de los infectados con el virus 84% desarrollaron DC y de los casos de DH se aisló el VDEN-2 (Ocazonez et al. 2006). Este patrón de virulencia contrasta con el observado en Brasil, Sri-Lanka e India donde el virus ha causado muertes y su dominancia se ha asociado con incremento del DH (Miagostovich et al. 2006, Lanciotti et al. 1994, Messer et al. 2003).

La diferencia de virulencia de cepas de VDEN del mismo serotipo se ha relacionado con características biológicas, inmunológicas y genéticas. Entre estas:

1. Capacidad de replicación en la célula huésped lo cual determina la magnitud de la viremia conocida también como carga o título viral y cuanto mayor en un individuo infectado mayor riesgo de sufrir DH/SCH (Vaughn et al. 2000). Se ha encontrado que ciertas cepas se replican más fácilmente en cultivos de células humanas o de mosquito detectándose elevadas concentraciones de unidades formadoras de placa (UFP) en el sobrenadante (Diamond et al. 2000). En este sentido se ha observado que cepas de VDEN-2 asiáticas aisladas de casos de DH muestran mayor capacidad para replicarse in vitro en células humanas y especies de mosquito que las que causan DC (Raymond & Rico-Hesse 2003). Las diferencias de capacidad de replicación de cepas de VDEN se ha explicado por variación en la conformación estructural de las regiones no codificantes (RNC NCR) del genoma viral y de la glicoproteína E de las cepas

que causan DH, las cuales influyen en la transcripción de RNA mensajeros y el reconocimiento de la célula huésped (Leitmeyer et al. 1999).

2. Efecto citopático (ECP) el cual se considera una consecuencia de la replicación del virus. El ECP varía según el tipo de célula infectada, en monocapas de células de mosquito (C6/36) cultivadas in vitro e infectadas con VDEN se detectan células gigantes, refringentes formando conglomerados a manera de sincitios. Esta alteración morfológica es observada en células infectadas por los cuatro serotipos del virus pero no con todas las cepas (Camacho et al. 1999). Variación en la capacidad de producir ECP se ha reportado con aislados de VDEN-2 (Diamond et al. 2000) pero lo mismo no se observó con VDEN-3 (Lee et al. 1993).

3. Diversidad antigénica evidenciada por variación en la capacidad de sueros inmunes humanos para neutralizar el virus. Pavón-Oro et al (2004) encontraron diferencias en el título neutralizante de sueros frente a cepas de VDEN-3 aisladas durante dos brotes diferentes ocurridos en Cuba en 2000 y 2001-2002. Con VDEN-2 se encontró que la cepa americana fue más susceptible a la neutralización por anticuerpos contra VDEN-1 que la cepa asiática (Kotchel et al. 2002), sugiriendo características antigénicas que probablemente están asociadas con diferencias genéticas teniendo en cuenta que los virus se agrupan en diferente subtipo.

4. Diversidad genética. La contribución de la diversidad genética del VDEN a la patogénesis de la enfermedad ha sido evaluada en diferentes estudios. En Venezuela, el incremento de casos severos en los últimos 10 años se ha asociado con una diversificación genética del virus DEN-2 asiático introducido al país en los años 80 (Uzcategui et al. 2003). Al comparar cepas de VDEN-3 subtipo III aisladas de pacientes venezolanos con DC o DH se encontraron diferencias en secuencias de nucleótidos pero no se asociaron con severidad de la enfermedad. Con cepas del Brasil, se encontró un cambio de aminoácido en la posición 391 de la proteína E de una cepa aislada de un caso fatal cuando se comparó con una aislada de un caso de DC pero no se pudo establecer asociación con severidad (Miagostovich et al. 2006). Lo mismo se reportó con cepas de VDEN-2 del genotipo asiático III que circularon en Cuba entre 2000-2002, se detectó cambio en 15 nucleótidos del genoma viral entre aislados de diferentes epidemias pero no se asociaron con la severidad de la enfermedad (Rodríguez & Guzman 2005).

A pesar de que se han identificado factores relacionados con el virus que pueden explicar la capacidad de éste para causar enfermedad severa aún no existe consenso sobre el tema. Aún más, la información que existe está referida casi en su totalidad al VDEN-2 y poco o nada se conoce de los otros serotipos. Como consecuencia, el estudio de las diferencias biológicas, genéticas e inmunogénicas entre aislados de VDEN provenientes de casos de pacientes que sufrieron DH con respecto a aislados de casos de DC permite conocer el comportamiento del virus. Esto es de gran importancia para

establecer estrategias de control de la enfermedad que impacten en la disminución de casos severos y muertes (Guzman & Deubel 1995).

2. OBJETIVO

En este estudio se pretendió aportar al conocimiento sobre diferencias biológicas, inmunológicas y genéticas entre cepas del VDEN-3 con diferente capacidad para causar DH. Específicamente, se comparó la capacidad de replicación en células de mosquito, la susceptibilidad a neutralización por anticuerpos homólogos y el subtipo genético de una cepa colombiana aislada en 2001 y una de Sri-Lanka de 1990. Esto para explorar causas que puedan en parte explicar la baja frecuencia de DH durante la dominancia de ese serotipo en Santander.

3. MARCO TEÓRICO

El virus del dengue pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *flavivirus*, donde se agrupan otros virus transmitidos por mosquitos (Lindenbach et al. 1990). Los *flavivirus* son virus ARN con cápside icosaédrica y envoltura. El ARN de ~11 kb es una hebra de sentido positivo limitada por terminaciones 5' y 3' no codificantes el cual transcribe una poliproteína, que por acción de proteasas virales y celulares se fragmenta en 10 proteínas en el siguiente orden : 5'-C-M-E-NS1-NS2A-NS2-B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'. Las proteínas C, M y E se denominan estructurales y conforman la cápside, matriz y el principal componente viral de la envoltura, respectivamente. Las restantes 7 se encuentran en la célula infectada participando en la morfogénesis del virus y se conocen como no-estructurales (NS). La proteína E se considera la de mayor importancia biológica: es el receptor a través del cual el virus se fusiona con la membrana celular y el principal antígeno inductor de anticuerpos neutralizantes que intervienen en la defensa del huésped (Chambers et al. 1990).

Las cepas de cada serotipo del VDEN divergen en la secuencia de nucleótidos del ARN viral. El polimorfismo genético se ha estudiado comparando secuencias de regiones genómicas tales como E-NS1, M-E y fragmentos o totalidad de los genes E, M o NS1. De esta manera se han construido árboles filogenéticos identificándose varios genotipos, subtipos de estos y quasispecies dentro de un mismo serotipo. De los serotipos dos y uno se conocen cinco genotipos (Rico-Hesse R, 1990), del tres, cuatro (Lanciotti et al. 1994) y del cuatro, dos (Lanciotti et al. 1997).

La variación genética del VDEN-3 fue reportada por primera vez por Chungue et al. (1993) comparando una secuencia de 194 nucleótidos del gen E de aislados de Asia y Centroamérica. Divergencia > 6% permitió agruparlos en 4 genotipos: en los tres primeros (I – III) se agruparon virus de Asia y en el genotipo número cuatro (IV) VDEN-3 de América y la Polinesia Francesa. Lanciotti et al. (1994) compararon la secuencia de los genes prM-E de cepas de otras localidades, agrupándolos igualmente en 4 genotipos. En los primeros tres se ubicaron virus del Asia, entre estos, aislados de Sri-Lanka, India, Samoa y África conformaron el genotipo III y virus de América que circularon entre 1963-1965 se agruparon en el IV. Recientemente, Wittke et al. (2002) analizaron un amplio número de cepas de varios continentes proponiendo un nuevo genotipo o V donde se agruparon solamente virus de América aislados entre 1963 – 1977.

En países de América las epidemias de VDEN-3 por el genotipo V fueron frecuentes en los años 60-70 en Puerto Rico (1963) y Tahití (1965) causando DC sin que se confirmaran casos de DH (Neef et al. 1967) y lo mismo ocurrió en 1977 durante una nueva epidemia en Puerto Rico (López et al. 1978). Entre 1977–1993 ningún país reportó aislamientos de ese serotipo y en 1994 lo hizo nuevamente Nicaragua seguido por otros países de Centroamérica en los años

siguientes y de Suramérica 6 años después de su re-introducción en el Continente. Desde entonces el virus ha circulado de manera permanente y su dominancia temporal se ha asociado con epidemias de DC o DH dependiendo del país. Al comparar secuencias nucleotídicas de cepas virales de diferentes países, se encontró que virus de los años 70 son similares a cepas del subtipo IV de Lanciotti et al. o V de Wittke et al. y los aislados desde 1994 a cepas del subtipo III muy cercanos filogenéticamente a virus que circulan en la isla de Sri-Lanka desde los años 80 (Ocazonez et al. 2006, Manami et al. 2005, Uzcategui et al. 2003, Messer et al. 2003, Wittke et al. 2002, Guzmán et al. 1995, Lanciotti et al. 1994).

La contribución de la cepa del virus a la severidad del dengue fue formulada por primera vez por Rosen en 1986 al observar DH o DC en individuos que se infectaban por primera vez con el mismo serotipo. Uno de los eventos epidemiológicos que respaldan este concepto es la aparición de epidemias de DH en América luego de la introducción en el Continente del VDEN-2 asiático genotipo III (Rico-Hesse & Harrison 1997). En contraste, en Perú no hubo casos de DH durante epidemias causadas por el genotipo americano del mismo serotipo (Watts et al. 1999). Ahora se conoce que cualquier serotipo puede causar DH pero las cepas se diferencian en la frecuencia a la que lo hacen. Las cepas de VDEN-2 del genotipo III son las más aisladas de casos severos seguidas por cepas del mismo genotipo del VDEN-3 y al contrario, las del genotipo I o americano del VDEN-2 han causado solamente casos de DC (Messer et al. 2003, Guzmán et al. 2002, Rico-Hesse & Harrison et al. 1997, Lanciotti et al. 1994).

La identificación de marcadores de virulencia de los VDEN se ha realizado mayormente comparando a nivel molecular VDEN-2. Se ha encontrado diferencias estructurales en la región de la proteína E que interactúa con el receptor celular y en las regiones no-codificantes del genoma. Cuando se comparó el VDEN-2 nativo de América (genotipo I) con el de Asia (genotipo III) se encontró que el aminoácido 390 de la proteína E es diferente, esto es, ácido aspártico en las cepas asiáticas y asparagina en las otras. Se cree que el cambio de este aminoácido puede incrementar la fuerza de unión de la proteína viral con el receptor celular y esto podría favorecer la infección celular (Raymond & Rico-Hesse 2003, Leitmeyer et al. 1999). Secuencias nucleotídicas en las regiones no-codificantes del genoma viral en los extremos 3' y 5' (3'-NC y 5'-NC) también fueron comparadas. Algunos autores han encontrado hasta 30 cambios de nucleótidos en la región 3'NC entre virus DEN-2 aislados de casos leves y severos. Al comparar una cepa del genotipo americano versus una del asiático se encontró sustituciones de 2 nucleótidos y 10 deleciones en el extremo 5' y 3', en la segunda. Como estos cambios modifican la estructura de la región, se postula que se favorece la unión de proteínas que contribuyen a la replicación del virus (Leitmeyer et al. 1999; Rauscher et al. 1997). Se ha sugerido que las diferencias genéticas y en la conformación estructural de la proteína E entre cepas de VDEN determinan que algunas se repliquen más

fácilmente produciendo viremias más elevadas. Varios estudios han mostrado asociación entre severidad y concentración plasmática del virus. Individuos infectados con VDEN-2 que sufren DH tienen mayores títulos (10^9 mol/ml) comparados con los que desarrollan DC (10^7 mol/ml). Igualmente, concentraciones mayores de RNA viral se detectan en infecciones secundarias ($>10^6$ mol/ml) versus primarias ($< 10^3$ mol/ml) (Wang et al. 2003, Vaugh et al. 2000, Laue et al. 1999).

En relación con marcadores de virulencia de cepas del VDEN-3 existen pocos estudios. Al comparar una cepa de Nueva Caledonia aislada de un caso de DC con una de la Polinesia Francesa de un paciente con DH no se logro demostrar diferencias genéticas consistentes con la severidad de la enfermedad (Chungue et al. 1993). Con cepas venezolanas del genotipo III aisladas en los años 2000-2001 se encontraron algunas diferencias de nucleótidos del gen E, pero las mismas no permitieron agruparlas en relación con la severidad del caso de donde se aislaron (Uzcategui et al. 2003). Por otra parte, se detectaron varios cambios de nucleótidos en las regiones NC en aislados brasileños y paraguayos pero estos al parecer no influyen en la estructura secundaria de la región y se pueden observar en cepas de casos leves y severos. Cuando se comparó la secuencia de aminoácidos de la proteína E de un virus paraguay que causó DC con uno de Brasil aislado de un paciente que sufrió DH se encontraron dos cambios de aminoácidos en la región 383 y 391 (Aquino et al. 2006). No obstante, estos cambios no se encontraron en una cepa cubana aislada de un caso fatal (Rodríguez & Guzmán 2005). No se encontraron estudios comparando cepas del genotipo III de América y Sri-Lanka en relación con características biológicas o genéticas que puedan explicar diferencias en el potencial virulento.

La infección secuencial con serotipos diferentes del VDEN se considera el factor más asociado a la severidad del dengue. Fue sugerido por primera vez por Halstead en 1970 al observar que en países asiáticos el DH era más frecuente en pacientes que se infectaban secuencialmente con serotipos diferentes del virus. Varios estudios epidemiológicos y clínicos en diferentes países han confirmado esa asociación (Vaugh et al. 2000, Graham et al. 1999, Kouri et al. 1989, Kilks et al. 1988, Eram et al. 1979). La evidencia sugiere que los anticuerpos de la infección primaria se ligan al virus de la secundaria formando un complejo que es internalizado por el macrófago a través del receptor Fc- γ , un fenómeno conocido como incremento dependiente del anticuerpo (Halstead 1970).

En el Departamento de Santander se han aislado los cuatro serotipos del VDEN con dominancia temporal de serotipo. El VDEN-2 ha circulado de manera permanente en los últimos 15 años, el VDEN-1 y VDEN-4 por períodos

de 1-2 años y el VDEN-3 desde el 2001 luego de 23 años ausente. Al entrar el VDEN-3 a la ciudad de Bucaramanga se esperaba un aumento del número de casos de DH debido al incremento de infecciones secundarias por la circulación de los otros serotipos. No obstante, este hecho no se observó, al contrario, la frecuencia del DH disminuyó en la medida que el virus se hizo dominante. Por otro lado, 84% de los pacientes que sufrieron dengue por este serotipo desarrollaron la forma clásica y fueron infecciones primarias (Ocazonez et al. 2007). Lo último no se esperaba y presupone que anticuerpos de infecciones pasadas podrían proteger de una nueva por VDEN-3. Al contrario de lo que se observó en Colombia, la entrada del VDEN-3 en Brasil en el 2002 produjo una epidemia en la cual se reportaron 288.245 casos con 1.831 de DH y 62 fatales (Nogueira et al. 2005).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 VIRUS

Se incluyeron las siguientes cepas de VDEN-3 obtenidas del stock del Laboratorio de Arbovirus del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP), Universidad Industrial de Santander:

- *Colombiana (Santander 2002-271)*: aislada en el año 2002 de un caso de dengue clásico residente en la ciudad de Bucaramanga, Santander. Solo se eligió esta cepa de 70 cepas locales cultivadas en el laboratorio teniendo en cuenta que todas mostraron un compartimiento homogéneo en cultivo.
El serotipo y severidad del dengue se determinó por anticuerpo monoclonal y según parámetros de la Organización Mundial de la Salud, respectivamente (Ocazonez et al. 2006).
- *Asiática (Sri-Lanka 1990)*: donada al Laboratorio de Arbovirus del CINTROP por el CDC, Atlanta (EUA). Esta cepa se ha asociado con epidemias de DH en Sri-Lanka (Lanciotti et al. 1994, Messer et al. 2003)
- *Prototipo (Filipinas 1956 H-87)*: donada al Laboratorio de Arbovirus del CINTROP por el CDC, Atlanta (EUA).

Los virus se replicaron en células de *Aedes albopictus* (clon C6/36) por pases seriados y el sobrenadante de los cultivos se distribuyó en viales (250 µl) que se almacenaron a -70°C hasta su uso. Cada una de las cepas contó con múltiples pases en esta línea celular. Las células fueron analizadas por inmunofluorescencia directa como se describe adelante para confirmar de nuevo el serotipo del virus.

4.2 CELULAS

Línea de *Aedes albopictus* (clon C6/36) mantenida en medio de cultivo Leibozt's (L-15, GIBCO,BRL) suplementado con 2-10% de suero bovino fetal (SBF) y 10% de triptosa fosfato. Las células se pasaron cada 3 a 4 días siguiendo el procedimiento estándar. Brevemente, la monocapa crecida en una caja de 25 cm² se lavó con tampón de fosfatos (PBS) pH 7.2, las células se desprendieron mecánicamente por raspado y se resuspendieron en medio de cultivo. La concentración celular en la suspensión se determinó usando conteo en cámara de Neubauer y se hizo una preparación de 80.000 células/ml en un volumen total de 4.5 ml de medio L-15, SBF10% que se adicionó a una caja de 25 cm². Los cultivos se incubaron a 28°C por 3-4 días hasta cuando se observó por microscopía la monocapa completa y el procedimiento de pase se repitió. En los ensayos, las células se sembraron en tubos de vidrio usando 500 µl de la preparación.

4.3 SUERO

- Homólogo inmune a dengue (n = 2): colectado de pacientes que sufrieron infección primaria por VDEN-3 lo cual se confirmó por aislamiento del virus en células C6/36 y ausencia de IgG anti-dengue en los primeros 3 días de la infección confirmado por el ELISA. Los sueros se colectaron durante la convalecencia para un estudio con otros fines que desarrolló el grupo de Arbovirus del CINTROP (Ocazonez et al. 2006) y permanecieron almacenados a -70°C .
- No inmune a *flavivirus* (n = 1): colectado de individuo sano no vacunado contra la fiebre amarilla (FA), sin historia de dengue y residente en el municipio de Mutiscua (Norte de Santander) donde no se ha documentado transmisión de *flavivirus*. La ausencia de anticuerpos anti dengue y anti FA se confirmó por la prueba de neutralización (Gómez & Ocazonez 2007).

4.4 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD)

Esta prueba se usó para detectar la presencia de antígeno viral en cultivos de células C6/36 infectadas con los virus, siguiendo el procedimiento previamente descrito (Ocazonez et al 2005). Brevemente, 8 μl de una suspensión celular se adicionaron a cada pozo de una lámina de 12, se dejó secar al ambiente y luego las células se fijaron con acetona fría por 20 min. Para detectar el antígeno se adicionó un anticuerpo policlonal anti dengue marcado con fluoresceína (M29341; CDC, Puerto Rico) por 35 min, luego se lavó con PBS pH 7.2 por 10 min y finalmente las láminas se observaron al microscopio. La presencia de antígeno (virus) se confirmó cuando se observaron células fluorescentes (verde) en contraste con células no fluorescentes (rojo) en el control negativo (no infectadas).

4.5 CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS (TÍTULO VIRAL)

Se siguió el procedimiento originalmente descrito por Reed & Muench (1938) con algunas modificaciones. Brevemente, 100 μl de sobrenadante de cultivos infectados con el virus (diluciones base 10 desde 10^{-1} hasta 10^{-7}) se adicionaron por triplicado a monocapas de células C6/36 crecidas en tubos de vidrio y los cultivos se incubaron a 28°C durante 1 h para adsorción del virus. Luego, las monocapas se lavaron varias veces con PBS pH 7.2 para eliminar el virus no adsorbido, enseguida se adicionaron 400 μl de medio L-15, con 2% de SBF y los tubos se incubaron nuevamente a la misma temperatura. Al quinto día post infección se cosecharon células de cada tubo para buscar antígeno viral por IFD como se describió arriba. Se determinó la proporción de tubos positivos y negativos por cada dilución para calcular la dosis infecciosa 50 para cultivo de tejido (TCID₅₀: 50% tissue culture infectious dose) usando la fórmula descrita por los autores. El título viral se expresó como TCID₅₀ anti lo

4.6 ENSAYO PARA COMPARAR REPLICACIÓN IN VITRO DEL VIRUS

Monocapas de células C6/36 cultivadas en tubos de vidrio se infectaron o no con 100 µl de sobrenadante de cultivos con diferente título de cada cepa viral: 10.000, 100, 50 y 25 TCID₅₀ (6 tubos por sobrenadante). Después de 1 h de adsorción las células se lavaron con PBS pH 7.2, se adicionaron 400 µl de medio L-15; SBF 2% y los tubos se incubaron a 28°C. La mitad de los cultivos se observaron diariamente durante 8 días al microscopio invertido para identificar cambios en la monocapa: desprendimiento y/o alteración de la morfología de las células. Del resto de cultivos se cosechó el sobrenadante al quinto día post infección para determinar el título viral como se describió arriba. El experimento bajo las mismas condiciones se repitió una vez.

4.7 ENSAYO DE NEUTRALIZACIÓN

Cada cepa del virus (2500 TCID₅₀) se incubó 2 h a 37°C con diluciones (10^{-2} , 10^{-3} , $10^{-3.5}$, 10^{-4} , $10^{-4.5}$, 10^{-5}) de suero homólogo anti dengue o no inmune, luego la mezcla se adicionó por triplicado a tubos de cultivos celulares por 1 h a 37°C, enseguida las monocapas celulares se lavaron para retirar el virus no adsorbido y se adicionó medio L-15, SBF 2%. Los cultivos se incubaron a 28°C por 5 días cuando las células se cosecharon para análisis de IFD en busca del virus. La ausencia de antígeno viral (IFD negativa) se consideró neutralización del virus por anticuerpos del suero. El experimento bajo las mismas condiciones se repitió una vez.

4.8 SUBTIPO GENÉTICO

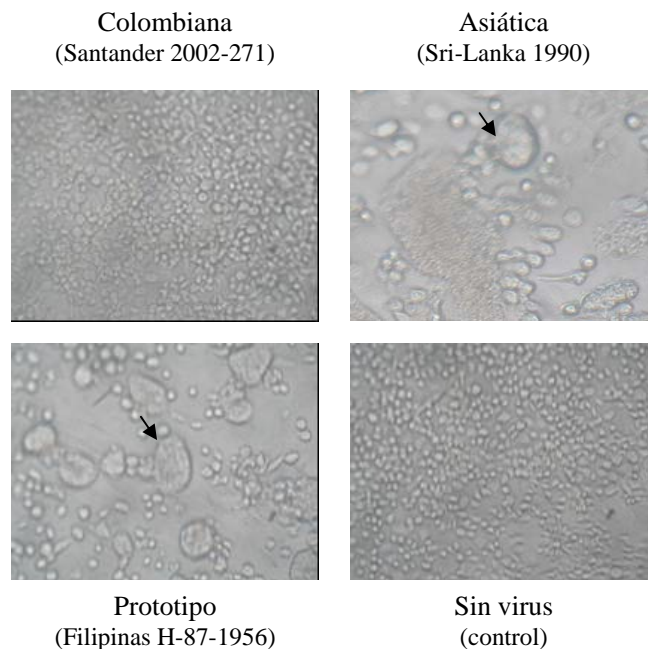
Se determinó según el patrón de fragmentos reconocidos por enzimas de restricción amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (RSS-PCR: Restriction Specific Site- Polymerase Chain Reaction). Se siguió un protocolo modificado del original de Harris et al. (1999) que ha sido previamente descrito (Ocazonez et al 2006). Brevemente, el ARN viral extraído del sobrenadante de cultivos infectados se usó para síntesis de ADN por transcripción reversa usando 0,25 U de enzima *Tth* DNA Polimerasa (*Promega*) y 0,5 – 1,0 µM de iniciador anti-sentido, 10 µl de ADN se amplificaron en una mezcla de reacción de 50 µl que contenía la misma enzima y dos pares de iniciadores a la misma concentración. La amplificación se realizó por 32 ciclos de 94°C por 1 min, 54°C por 1min y 72°C por 2 min con una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (2%) coloreada con bromuro de etidio. En el mismo experimento se amplificó simultáneamente ARN de las dos cepas incluidas en el estudio y de la cepa prototipo del serotipo y se hizo una réplica para confirmar el resultado. Las diferencias entre las cepas se establecieron según el tamaño y número de fragmentos amplificados.

5. RESULTADOS

5.1 REPLICACIÓN DEL VIRUS

En cultivos infectados con 10.000 TCID₅₀ de la cepa colombiana del VDEN-3 no se detectó efecto citopático, es decir, las monocapas permanecieron adheridas al soporte y no se detectó cambio morfológico celular a lo largo de 8 días de observación microscópica. Lo mismo ocurrió en los cultivos a los que no se adicionó virus. Al contrario, en cultivos infectados de la misma manera con la cepa asiática se observaron agrupamientos anormales de células en 50 - 75% de la monocapa desde el quinto día post infección con apariencia de grandes conglomerados a manera de sincitios. Este mismo efecto citopático se observó con la cepa prototipo de ese serotipo (Filipinas 1956 / H87) desde el tercer día post infección (Figura 1).

Figura 1. Ausencia de efecto citopático sobre células de mosquito *Ae. albopictus* (clon C6/36) por la cepa colombiana de VDEN-3 comparada con la asiática y la prototipo del serotipo.



Monocapas de células C6/36 fueron infectadas con 10.000 TCID₅₀ de cada una de las cepas (ver detalles en Materiales y Métodos). Se observa efecto citopático con los virus asiáticos (Sri-Lanka y Filipinas) como desprendimiento de la monocapa (espacios sin células) y grandes sincitios señalados con flecha. El resultado corresponde al día quinto y lo mismo se observó en el octavo día.

Cuando se comparó la capacidad de replicación in vitro de los virus, la cepa colombiana resultó menos productiva que la asiática. Esto es, en cultivos de la primera el título viral (TCID₅₀) en el sobrenadante fue menor con cualquier concentración del virus en la preparación que se usó para infectar las monocapas. Cuando se hizo con 100 y 50 TCID₅₀ la diferencia de título viral comparado con la asiática fue 20 y 2 veces, respectivamente, mientras que con 25 TCID₅₀ no se detectó infección con la cepa colombiana pero sí con la otra (Tabla 1).

Tabla 1. Título viral en cultivos de células de mosquito *Aedes aegypti* (clon C6/36) infectados con la cepa colombiana y asiática de virus DEN-3.

TCID ₅₀ [¶]	Título viral (anti-log TCID ₅₀) *	
	Colombiana (Santander 2002-271)	Asiática (Sri-Lanka 1990)
100	158	3162
50	15	31
25	0 [†]	31

¶: Concentración del virus en el sobrenadante usado para infectar los cultivos. *: En el sobrenadante del cultivo colectado al cuarto día post infección. †: No se detectó antígeno viral por inmunofluorescencia directa (IFD).

5.2 NEUTRALIZACIÓN POR SUERO HUMANO

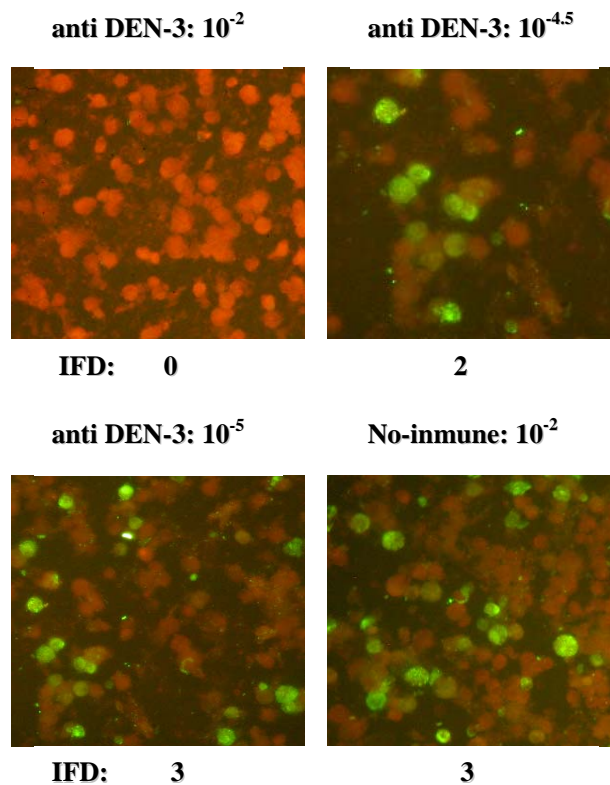
El efecto neutralizante se evidenció por ausencia o disminución de células que expresaron antígeno viral, detectado por IFD en cultivos infectados con virus preincubado con suero. La magnitud de la neutralización se relacionó con la frecuencia de células fluorescentes (Figura 2) y se definieron 4 categorías:

- Total: cuando no se observaron células fluorescentes (con antígeno) en más de 10 campos microscópicos observados, o IFD = 0.
- Parcial: se observaron hasta 6 células fluorescentes por campo, o IFD = 2
- Mínima: se observaron entre 10-15 células fluorescentes por campo, o IFD = 3

- Ninguna: se observaron más de 20 células fluorescentes por campo o IFD = 4. En este caso la frecuencia de células fluorescentes fue igual al control.

La cepa colombiana de VDEN-3 fue más susceptible que la asiática a la neutralización por 1 de los 2 sueros anti VDEN-3 (homólogo) de individuos colombianos. Se observó neutralización total de la primera con suero más diluido ($10^{-4.5}$ vs 10^{-3}) sugiriendo mayor afinidad de los anticuerpos por la cepa local. No obstante, con el otro suero se observó neutralización total de ambas cepas a la misma dilución (10^{-3}). Por otro lado, el suero no inmune neutralizó parcialmente ambas cepas cuando se usó a la menor dilución (10^{-2}), en tanto que más diluido (10^{-4}) no tuvo efecto neutralizante sobre la asiática pero sí sobre la otra (Tabla 2). Los resultados sugieren que la cepa colombiana del VDEN-3 podría portar determinantes antigénicos con mayor afinidad por cierto tipo de anticuerpos homólogos o componentes presentes en el suero humano.

Figura 2. Magnitud de la neutralización de VDEN-3 por suero humano de acuerdo a la frecuencia de células fluorescentes detectadas en el ensayo de inmunofluorescencia directa (IFD).



Cultivos de C6/36 se infectaron con el virus previamente incubado 2 h a 37°C con la dilución de sueros señalada y 5 días después las células se analizaron por IFD. 0: ausencia de células verde fluorescente (con antígeno viral) o neutralización total. 2: hasta 6 células fluorescentes

por campo o neutralización parcial. 3: entre 10–15 células fluorescentes por campo o 4: neutralización mínima: más de 20 células fluorescentes por campo.

5.3 SUBTIPO GENÉTICO (RSS-PCR)

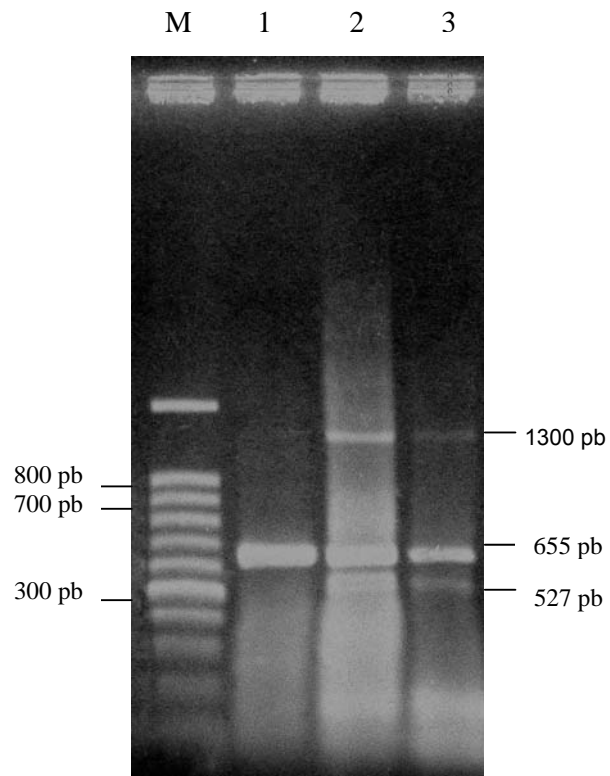
No se encontraron diferencias genéticas entre la cepa colombiana y asiática del VDEN-3 usando amplificación simultánea de secuencias para enzimas de restricción (RSS-PCR), esto es, del ARN de ambas se amplificaron 3 fragmentos de 1300, 655 y 527 pb. Este patrón corresponde al subtipo C del VDEN-3 o genotipo III descrito por Harris et al (1999), diferente al de la cepa prototipo que correspondió al subtipo B2 como fue descrito por los mismos autores (Figura 3).

Tabla 2. Magnitud de la neutralización de la cepa colombiana del VDEN-3 por suero humano homólogo comparada con la asiática.

Suero	dilución	Colombiana (Santander 2002-271)		Asiática (Sri-Lanka 1990)	
		Neutralización	IFD	Neutralización	IFD
Anti DEN-3 105 [†]	10 ⁻²	Total	0	Total	0
	10 ⁻⁴	Total	0	Parcial	2
	10 ^{-4.5}	Total	0	Parcial	2
	10 ⁻⁵	Parcial	2	Mínima	3
Anti DEN-3 065 [†]	10 ⁻²	Total	0	Total	0
	10 ⁻³	Total	0	Total	0
	10 ^{-3.5}	Total	0	Total	0
	10 ⁻⁴	Parcial	2	Parcial	2
	10 ^{-4.5}	Parcial	2	Parcial	2
	10 ⁻⁵	Mínima	3	Mínima	3
No inmune *	10 ⁻²	Parcial	2	Parcial	2
	10 ⁻⁴	Mínima	3	Ausente	4
Ninguno	-	Ausente	4	Ausente	4

El virus (2500 TCID₅₀) preincubado con el suero se adicionó a monocapas de células C6/36 y al quinto día se buscó antígeno viral por inmunofluorescencia (IFD). La relación entre neutralización e IFD se detalla en el texto y se muestra en la Figura 2.

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa mostrando productos de amplificación de secuencias genómicas para enzimas de restricción (RSS-PCR) de cepas del VDEN-3.



M: marcador de peso molecular 100 pb (GIBCO-BRL). 1: prototipo (Filipinas 1956- H-87), RSS-PCR patrón B2. 2: Asiática (Sri-Lanka 1990), RSS-PCR patrón C. 3: Colombiana (Santander 2002-271), RSS-PCR patrón C.

5. DISCUSIÓN

El espectro de las manifestaciones del dengue en humanos incluye infección subclínica, síndrome febril autolimitado y dengue hemorrágico severo. Estudios epidemiológicos y clínicos han sugerido que factores virales y del individuo influyen en la severidad de la enfermedad (Vaugh et al. 2000, Halstead 1970). Los resultados de este estudio demuestran que la cepa del virus dengue serotipo 3 aislada en Colombia es diferente comparada con la cepa del mismo serotipo de Sri-Lanka en cuanto a replicación *in vitro* y antigenicidad a pesar que ambas pertenecen al subtipo genético C o III, el que más causa DH. No se encontraron estudios similares, pero se ha comparado secuencias nucleóticas de cepas aisladas en el 2000 en Brasil y Venezuela de casos de DC vs DH. Estos estudios mostraron que no había diferencias consistentes entre secuencias del gen E que se pudieran asociar a la severidad de la enfermedad (Miagostovich et al. 2006, Uzcategui et al. 2003).

Estudios previos han sugerido que los VDEN se diferencian en la manera como se replican en la célula. Por ejemplo, cepas de DEN-2 aisladas de pacientes con diferentes grados de severidad variaron en la cantidad de virus infeccioso producido en células LLC-MK2 (Mangada & Igaraschi 1998), monocitos (Diamond et al. 2000), leucocitos de sangre periférica y células C6/36 (Morens et al. 1991). Resultado similar encontraron Diamond et al. (2000) cuando compararon cepas de VDEN-2 asiáticas (Thai C0477 y K0049) con una americana (Nicaragua N9622) aisladas de casos de DH y DC respectivamente, las cuales mostraron diferencias significativas en la cantidad de antígeno viral expresado en la línea celular HepG2. Lo mismo fue reportado por Morier et al. (2000) y Camacho et al (1999) con aislados del mismo serotipo de diferentes países.

La línea celular C6/36 derivada del mosquito *Aedes albopictus* es la más utilizada para replicación *in vitro* de virus del dengue y demás miembros del género *flavivirus*. Esto por su alta sensibilidad a la infección y la formación de efecto citopático que permite presumir la presencia del virus cuando se intenta aislar del suero de un paciente (Igaraschi 1978). Cada una de las cepas comparadas en este estudio contó con múltiples pases en esta línea celular. Cuando monocapas se infectaron con la cepa colombiana el título viral en el sobrenadante del cultivo fue hasta 30 veces menor que las infectadas con el virus asiático (Tabla 1) y el efecto citopático no fue visible (Figura 1). Es frecuente observar diferencias en la capacidad de cepas de VDEN-3 para formar sincitios con virus aislados de Santander y que vienen circulando desde 2001 (Sergio Gómez, Laboratorio de Arbovirus, CINTROP. Comunicación personal).

Las causas que expliquen las diferencias de replicación *in vitro* entre cepas de VDEN aún no están claramente identificadas. Diamond et al. (2000) demostraron que aislados de VDEN-2 variaron en su capacidad de infectar *in vitro* el mismo tipo de célula y esta característica se correlacionó con la acumulación de cadenas negativas de ARN viral. Cepas con altos niveles de estas cadenas produjeron mayor concentración de antígeno viral y secretaron más virus infeccioso. La mayor capacidad de replicación *in vitro* se correlaciona con la habilidad del virus para infectar y diseminarse en mosquitos. Las cepas de VDEN-2 más infecciosas que se han identificado han sido las asiáticas o del genotipo III incluyendo las que circulan en Venezuela (Armstrong & Rico-Hesse 2003). No hay información documentada sobre diferencias de replicación *in vitro* de cepas de VDEN-3.

Los virus dengue poseen diferentes proteínas con propiedades antigénicas, es decir, que inducen respuesta de anticuerpos lo cual constituye un mecanismo de defensa contra la infección por parte del infectado (Kurane et al.1990). Las cepas de un mismo serotipo pueden variar en número y conformación de determinantes antigénicos de una proteína lo cual se refleja en diferente magnitud de neutralización por suero de individuos que han sufrido dengue. En este estudio, la cepa colombiana de VDEN-3 fue más susceptible que la asiática a la neutralización por suero humano de un paciente con infección primaria por el mismo serotipo o aún por suero de un individuo sin antecedentes de infección por el virus (Tabla 2) sugiriendo que las cepas son antigénicamente diferentes. Esas diferencias de susceptibilidad a la neutralización se han reportado con cepas de VDEN-2, sueros que contenían anticuerpos anti VDEN-1 neutralizaron más eficientemente cepas del genotipo americano que del asiático. Los autores concluyeron que por esta propiedad el VDEN-2 asiático escaparía a la neutralización cruzada por los anticuerpos contra el otro serotipo haciéndolo más virulento. Al contrario sucedería con la cepa americana y esto podría explicar la ausencia de DH en Perú cuando este genotipo del DEN-2 circuló simultáneamente con el DEN-1 (Kochel et al. 2002). Como resultado, se ha propuesto que la envoltura del VDEN-2 americano podría ser muy similar a la del VDEN-1 y la estructura de la misma sería diferente en el virus asiático (Halstead et al. 2003).

Como se esperaba, el virus colombiano resultó del mismo subtipo genético que el de Sri-Lanka y lo mismo ha sido reportado con otras cepas de VDEN-3 aisladas en Santander entre 2000-2004 (Ocazonez et al. 2006). En este estudio no se evidenciaron diferencias genéticas entre las cepas usando la técnica de la RSS-PCR (Figura 3), es decir, no se visualizaron fragmentos adicionales en la colombiana que resultara en un patrón electroforético distinto. Por lo tanto no se pudo correlacionar diferencias genéticas con diferencias biológicas y antigénicas. Lo mismo reportaron Balmaseda et al. (1999) quienes usaron la RSS-PCR para analizar VDEN-3 aislados en Nicaragua en 1988. No obstante, lo contrario observaron con cepas de VDEN-2 del mismo país, que resultaron con fragmentos amplificados adicionales a los de la cepa prototipo

sugiriendo diferencias genéticas. El resultado de la RSS-PCR no descarta que la cepa colombiana diverja genéticamente de la asiática considerando las limitaciones del método, el cual permite comparar una pequeña región del genoma comprendida entre los nucleótidos 1131 - 1276 (Harris et al. 1999). Cuando secuencias genómicas de aislados en países de América y en Sri-Lanka de VDEN-3 se han usado para construir árboles filogenéticos las cepas se ubican en ramas diferentes sugiriendo diferencias genéticas entre ellas (Messer et al. 2003).

La virulencia de cepas de VDEN depende no solamente de sus propiedades genéticas y antigénicas sino de otros factores relacionados con el hospedero tales como edad, sexo, raza y tipo de respuesta inmune determinada por la genética individual (Halstead et al. 2006). Los casos más severos son individuos que se infectan secuencialmente con serotipos del virus diferente a intervalo de 10 años o más (Guzmán et al. 2002). Esto porque anticuerpos de infecciones pasadas sirven de puente para la entrada del nuevo virus produciendo la infección de un mayor número de células y como consecuencia liberación de sustancias que incrementan la permeabilidad vascular (Halstead 1970). Debido a que en Santander circulan desde inicio de los años 80 los serotipos 1,2 y 4, un alto porcentaje de pobladores portan anticuerpos contra el dengue. Por lo tanto, se esperaba un número significativo de casos severos por infección secundaria por VDEN-3, es decir, quienes habían sufrido dengue previamente por otro serotipo. No ocurrió así, la mayoría fueron individuos que se infectaron por primera vez y el 83% sufrieron DC (Ocazonez et al. 2006). Este hallazgo sugiere que la carga inmune contra los otros serotipos podría contribuir a la protección contra dengue severo por VDEN-3. Esto porque anticuerpos contra los otros serotipos podrán neutralizar el virus impidiendo su replicación. Aunque en este estudio no se incluyeron sueros con anticuerpos para serotipos diferentes al VDEN-3, la mayor susceptibilidad a neutralización por suero de inmune o no inmune a dengue de la cepa colombiana del estudio comparada con la asiática podría presumir alta susceptibilidad de virus de Santander a neutralización por anticuerpos contra los serotipos uno, dos o cuatro. Si es así, se podría explicar en parte la alta frecuencia de infecciones primarias en Santander luego de la reaparición del VDEN-3.

Los hallazgos de este estudio confirman que cepas del mismo serotipo del VDEN varían en sus propiedades biológicas y antigénicas, las cuales pueden determinar la capacidad virulenta. El conocimiento de estas características en otras cepas es de gran utilidad para identificar el potencial virulento de los virus que expliquen los cambios en la severidad de las epidemias de dengue y por qué algunos individuos desarrollan formas severas y otros no. Por lo tanto, es necesario analizar un mayor número de aislados y de los otros serotipos para llegar a conclusiones más cercanas al comportamiento de los virus en la naturaleza y en particular en Colombia.

6. CONCLUSIONES

La cepa colombiana del VDEN-3 aislada en Santander en el 2002 (2002-271) resultó con menos capacidad para replicarse en células de mosquito que una cepa del mismo serotipo aislada en Sri-Lanka en 1990 (SK 698) y al parecer posee determinantes antigénicos diferentes. Ambas cepas resultaron del mismo tipo genético (Subtipo C / RSS-PCR) y diferencia genética no fue evidente por el método utilizado.

BIBLIOGRAFIA

Álvarez A, Martínez H, Millán S, López L. Diagnóstico de la situación de Salud en Santander. 2ª.Ed. Secretaría de Salud de Santander 2004; 56-60.

Aquino V, Anatriello E, Gonçalves P, Da Silva E, Vasconcelos P, Vieira D, et al. Molecular Epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002–2004. *American Journal of Tropical Medicine and Higiene* 2006; 75:710–715.

Armstrong and Rico-Hesse R. Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Higiene* 2003; 68:539-544.

Balmaseda A, Sandoval E, Perez L, Gutierrez C, Harris E. Application of Molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in nicaragua. *The American Journal of Tropical Medicine and Higiene* 1999; 61:893-897

Bernal M, Méndez J, de Calvache D. Circulación de virus dengue serotipo 3 en Colombia, 2002. II Congreso Nacional de Investigación y Salud. *Biomédica* 2002; 22:147p

Boschell J, Groot H, Gacharna M, Márquez G, González M, Gaitán M et al. Dengue en Colombia. *Biomédica* 1986; 6: 101-102.

Camacho D, Guzmán M, Morier L, Álvarez M, Rodríguez R y Comacho G. Estudio de algunas propiedades biológicas de 3 cepas de dengue 2 con diferencias en sus secuencias nucleotídicas. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 1999; 51(3):177-80.

Chungue E, Deubel V, Cassar O, Laille M, and Martin P. Molecular epidemiology of dengue 3 viruses and genetic relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue fever in French Polynesia. *Journal of General Virology* 1993; 74: 2765-2770.

Chambers J, Hahn C, Galler R, Rice C. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annual Review of Microbiology* 1990; 44:649-688.

Dash P, Parida M, Saxena P. Reemergence of dengue virus type-3 (subtype III) in India: implications for increased incidence of DHF & DSS. *Virology Journal* 2006; 3:55-65.

Diamond M, Edgil D, Roberts's G, Lu B, Harris E. Infection of Human Cells by Dengue Virus Is Modulated by Different Cell Types and Viral Strains. *Journal of Virology* 2000; 74: 7814–7823.

Eram S, Setyabudi T, Sadono T, Sutrisno D, Gubler J and Sulianti S. Epidemic dengue hemorrhagic fever in rural Indonesia: clinical studies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1979; 28:711-716.

Graham R, Jufrie M, Tan R, Hayes C, Laksono I, Ma`roef, et al. A prospective seroepidemiologic study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia I. Studies in 1995-1996. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1999; 61:412-419.

Gubler D. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11:480-496.

Guzman M, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Vázquez and Halstead S. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Pan American Journal of Public Health* 2002; 11:223-227.

Guzman M, Deubel V, Pelegrino J, Rosario D, Marrero M, Sariol C. Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope nonstructural protein1 gene junction of four Dengue- 2 virus strains isolated during 1981 Cuba epidemic. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1995; 52:241-246.

Halstead S. Dengue in the Americas and Southeast Asia: Do they differ? *Revista Panamericana de Salud Publica* 2006; 407-415.

Halstead S. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Advances in virus research* 2003; 60:421-467

Halstead S, Nimmannitya S, Cohen S. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale Journal of Biology and Medicine* 1970; 42: 311-328.

Harris E, Sandoval E, Xet-Mull A, Johnson M, Riley L. Rapid subtyping of dengue viruses by restriction site-specific (RSS)-PCR. *Virology* 1999; 253:86-95.

Henchal E and Putnak R. The dengue viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 1990; 3:376-396.

Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and Chikungunya viruses. *Journal General Virology* 1978; 40:431-444.

Kilks S, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke D. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1988; 38:411-419.

Kochel T, Watts J, Halstead S, Hayes A, Espinoza V, Felices R et al. Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 2002; 360:310–312.

Kouri G, Guzman M, Bravo J, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ* 1989; 67:375-380.

Kurane I, Innis B, Nimmannitya S, Nisalak A, Rothman A, Livingston P et al. Human Immune responses to virus dengue. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health* 1990; 21:658-662.

Lanciotti R, Lewis J, Gubler D, Trent D. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *Journal of General Virology* 1994; 75: 65- 75.

Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *Journal of General Virology* 1997; 78:2279-2284.

Laue T, Emmerich P, Schmitz H. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37:2543-2547

Lee E, Gubler D, Weir R and Dalgarno. Genetic and biological differentiation of dengue 3 isolates obtained from clinical cases in Java, Indonesia, 1976-1978. *Archives of virology* 1993; 133:113-125.

Leitmeyer K, Vaughn D, watts D, Salas R, Villalobos I, Ramos C, and Rico-Hesse R. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis *Journal Genetic Virology* 1999; 75:65-75.

Lindenbach B, Jurgenthie H and Rice C. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. *Fields virology* 2007; 33:1103-1113.

Mangada M and Igarashi A. Molecular and in vitro analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. *Virology* 1998; 244:458-466.

Messer WB, Gubler DJ, Harris E, et al. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerging Infectious Diseases* 2003; 9:800-809.

Miagotovich M, dos Santos F, Guimaraes F, da Costa E, Tavares F, Coelho J et al. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 2006; 101:307-313.

Ministerio de Salud y Protección Social. Instituto Nacional de Salud. Vigilancia Viroológica del dengue en Colombia 2002. URL/ [http:// www. Ins.gov.co/pdf_ dengue](http://www.Ins.gov.co/pdf_dengue).

Ministerio de Salud y Protección Social. Instituto Nacional de Salud 2006. Guía de atención al dengue. URL/ [http:// www. Ins.gov.co/pdf_ dengue](http://www.Ins.gov.co/pdf_dengue).

Morens D, Marchette N, Chu M, Halstead S. Growth of dengue type 2 virus isolates in human peripheral blood leukocytes correlates with severe and mild dengue disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1991; 45:644-651.

Morier L, Camacho D, Guzmán M, Álvarez M, Rodríguez R, Comach G. Comportamiento biológico de 3 cepas del virus dengue-2 en 2 líneas celulares de mosquito. *Revista cubana de Medicina Tropical* 2000; 52:215-219.

Neef J, Morris L, Gonzalez-Alcover R, Coleman PH, Lyss S and Negron H. Dengue fever in a Puerto Rican community. *American Journal of Epidemiology* 1967; 86:162-184.

Nisalak A, Endy T, Nimmannitya S, Kalayanaroj S, Thisayakorn U, Scott R et al. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2003; 68:191-202.

Nogueira R, Schatzmayr H, de Filippis A, dos Santos F, da Cunha R, Coelho J et al. Dengue Virus Type 3, Brazil, 2002. *Emerging Infectious Diseases* 2005; 11:1376-1381.

Ocazonez R, Gómez S, Villar L, Cortés F. Serotipo, Patrón de Infección y Dengue Hemorrágico en Área Endémica Colombiana 2007; 9:262-274

Ocazonez R, Cortés F, Villar L, Gómez S. Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection *Memories Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2006; 101:725-731.

Ospina M. Vigilancia epidemiológica del dengue en Antioquia. *Memorias del 1er. Simposio Nacional de Virología, Medellín. Latreia* 2004; 17:9.

Mamani E, García M, Gutiérrez V, Cabezas C, Harris E. Tipificación Molecular del virus dengue 3 durante el brote epidémico de dengue clásico en lima, Perú, 2005. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 2005; 22:161-164.

Messer W, Gubler D, Harris E, Sivananthan K, de Silva A. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerging Infectious Diseases* 2003; 9:800-809.

Ministerio de Salud y Protección Social. Instituto Nacional de Salud 2006. Guía de atención al dengue. URL/ http://www.ins.gov.co/pdf_dengue

Nisalak A, Endy T, Nimmannitya S, Thisyakorn U, Scott R, Burke D et al Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2003; 68:191-202.

Nogueira R, Schatzmayr H, Filippis AMB, Santos F, Cunha R, Coehlo J. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerging infectious diseases* 2005; 11:1376-1381.

Nogueira R, Miagostovich M, de Filippis A, Pereira M, Schatzmayr H. Dengue Virus Type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 2001; 96(7): 925-26.

PAHO (2000). Dengue in Central America: the epidemics of 2000. *Epidemiol Bull* 21, 4-8.

Pavón-Oro A 2004. Anticuerpos neutralizantes del suero humano frente a diferentes aislamientos del virus dengue 3. Tesis de Diploma: Instituto de Medicina Trópicos "Pedro Kouri"

Pinheiro and Corber. Global situation of dengue and dengue an dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Statistics Quarterly* 1997; 50: 161-169.

Rauscher S, Flamm C, Mandl W, Heinz F, Stadler P. Secondary structure of the 3' noncoding region of flavivirus genome: comparative analysis of base pairing probabilities. *RNA* 1997; 3:779-791.

Raymond and Rico-Hesse. American genotypes structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *Journal Virology* 2003 77:3929-3938.

Reed L and Munch H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* 1938; 27:493-497.

Rico Hesse. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990; 174: 479-493.

Rico-Hesse, Harrison L, Salas R, Tovar D, Nisalak A, Ramos C et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Américas. *Virology* 1997; 230: 244-251.

Rodríguez R and Guzman M. Caracterización molecular de cepas de dengue aisladas en epidemias cubanas. Instituto de Medicina Trópicos Pedro Kouri 2005; 1-122.

Rosen L. Dengue in Greece in 1927 and 1928 and the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever; new data and new conclusions. *American Journal of Tropical and Medicine Hygiene* 1986; 35:642-53.

Uzcategui N, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, Jimenez M et al. 2003. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *Journal of General Virology* 2003; 84: 1569-75.

Uzcategui N, Camacho D, Comach G, et al. Molecular epidemiology of dengue type 2 in Venezuela: evidencia for in situ virus evolution and recombination. *J Gen Virol* 2001; 82: 2945-2953

Vaughn D, Green S, Kalajanoorj S, Innis B, Nimmannitya S, Suntayakorns S, et al. Dengue viremia titer, antibody, response pattern and virus serotype correlate with disease severity. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 181:2-9.

Vitarana U, Jayasekera N, Withane N, Gubler D. Finding the cause of dengue hemorrhagic fever outbreaks in Sri Lanka. *Arbovirus Research in Australia* 1993; 6:125-129.

Wang W, Chao D, Kao C, Wu H, Liu Y, Li C et al. High levels of plasma dengue viral load during defervesce in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology* 2003; 305: 330-338.

WHO (World Health Organization): Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Fact sheet* 2002, 117.

Wittke V, Robb TE, Thu H, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanrooj S et al. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology* 2002; 301:148-56.