

9

0308/24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

“ANALISIS DE LA HETEROGENEIDAD GENOMICA
DEL VIRUS DEL DENGUE Y SU RELACION CON LA
EXPRESION DE NEUROVIRULENCIA.”

T E S I S

que para obtener el título de

DOCTOR EN INVESTIGACION

BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A

M. en I.B.B. Irma J. Sánchez Vargas



México, D.F.

1996

TESIS CON

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Proyecta lo difícil,
partiendo de donde aún es fácil,
Realiza lo grande,
partiendo de donde aún es pequeño.
Todo lo difícil comienza siempre fácil.
Todo lo grande comienza siempre pequeño.
Por eso el sabio nunca hace nada grande,
y realiza lo grande sin embargo.
El árbol de ancho tronco,
está ya en el pequeño brote.
Un gran edificio
se basa en una capa de tierra.
El viaje hacia lo eterno
comienza ante tus pies.

Proverbio Chino

JURADO ASIGNADO

Presidente: DR. JULIO SOTELO MORALES
Secretario: DR. ALEJANDRO GARCIA CARRANCA
Vocal: DRA. BLANCA HAYDE RUIZ ORDAZ
Vocal: DRA. SUSANA LOPEZ CHARRETON
Vocal: DRA. BEATRIZ GOMEZ GARCIA
Suplente: DR. ARTURO ORTEGA SOTO
Suplente: DRA. VALERIA SOUZA SALDIVAR

Este trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. en el laboratorio de la Dra. Blanca H. Ruíz Ordaz del Departamento de Biología Molecular.

Fué parcialmente financiado por el Programa de Apoyo de Estudiantes de Doctorado (PADEP).

Fué aceptado para su publicación en Julio de 1996 en el Journal of General Virology y publicado en octubre en el Vol.77, No. 10 pp 2541-2545 del mismo año. (se anexa la copia del artículo)

A mis padres, por su gran
apoyo, paciencia y dedicación
sin lo cual no hubiera logrado
llegar a esta meta.

A mis hermanos y cuñados,
por sus consejos y motivación

A la memoria de mi hermano Edgar Javier

A mis amigos , por su ayuda y apoyo

Con respecto y agradecimiento a la Dra.
Blanca H. Ruiz, asesor de este trabajo

INDICE

	No. de página
INTRODUCCION	1
PROTEINAS VIRALES	6
REPLICACION	9
Penetración y desnudamiento	9
Replicación del RNA viral	10
Síntesis y procesamiento proteolítico de las proteínas virales	15
Ensamblaje y liberación del virus	21
INMUNIDAD Y PROTECCION	22
VARIABILIDAD GENETICA	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
OBJETIVOS	38
DISEÑO EXPERIMENTAL	39
MATERIALES Y METODOS	
CELULAS Y VIRUS	40
ASILAMIENTO, CLONACION Y TITULACION DE LAS POBLACIONES VIRALES	40
PURIFICACION DEL RNA VIRAL	41
SINTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA) DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEINA E VIRAL	41
SINTESIS DE LA RIBOSONDA ESPECIFICA DEL GEN E	44

HIBRIDIZACION Y DIGESTION CON RNasa A (MISMATCH)	44
SECUENCIACION DEL GEN E DE LAS DIFERENTES CLONAS	44
ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO EN ENCEFALITIS MURINO	45

RESULTADOS

IDENTIFICACION Y CLONACION DE LAS POBLACIONES VIRALES	46
ELABORACION DE LA RIBOSONDA DEL GEN DE LA PROTEINA E VIRAL	46
SELECCION DE LAS CONDICIONES DE DIGESTION CON RNasa A DE LOS HETEROHIBRIDOS RNA:RNA	48
ANALISIS DE LA VARIACION GENOMICA DE DIFERENTES POBLACIONES DENTRO DE UN MISMO AISLADO VIRAL	51
SECUENCIACION DEL GEN E DE LAS CLONAS	54
DETERMINACION DE LA VIRULENCIA DE LAS CLONAS Y DEL AISLADO D2-M EN RATON	56

DISCUSION	61
------------------	----

REFERENCIAS	68
--------------------	----

ARTICULO PUBLICADO EN LA REVISTA JOURNAL GENERAL VIROLOGY

ABSTRACT

Dengue viruses with 4 different serotypes (DEN1, DEN2, DEN3, DEN4), are transmitted by mosquito bites, of *Aedes aegypti*. Dengue virus-infected cases show acute febrile illness (DF); however, some patients manifest severe hemorrhage (DHF) and shock (DSS). The heterogeneity of epidemic dengue virus strains has been shown serologically and at the molecular level. However, it is not clear which genomic change may be related with the virulence of a particular strain. We identified 11 clones from a D-2 Mexican isolate which produce lytic plaques of different sizes, and we analyzed genomic heterogeneity among them, which revealed a direct correlation between the percentage of genomic variability and the degree of virulence. Clones which presented 100% homogeneity in electrophoretic patterns obtained by digestion of heterohybrids, showed attenuated virulence in mice. However, clones with 80% homogeneity produced a severe infection (70% or more mortality). These differences in electrophoretic patterns correlated with the number of substitutions of nucleotides in the gene which codes for E protein of each clone. Those mutations were silent with the exception of change at position 2102 (aminoacid 390) in clones with attenuated or with severe virulence. The clones of attenuated virulence showed a substitution of Asp for Asn, at the same position that those presented in vaccine strains. Flavivirus which cause encephalitis such as JEV, MVE, KUN, SLE, carry a His in residue 390. The mutation of Asp for His shown in clones D2ML1, D2ML2 and D2ML3 cause severe neurovirulence. Based on these data, we conclude that the amino acid substitution at position 390 affects a functionally important structural element that is a major determinant of neurovirulence.

RESUMEN

El dengue es un virus de RNA de cadena sencilla de ≈11Kb que codifica para un precursor poliproteínico (3386 a.a.) que por cambios postraduccionales genera 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales (5' C-prM-M-E-NS1-NS2α-NS2b-NS3-NS4α-NS4b-NS5 3'). La proteína E tiene 495 a.a. y es responsable de las principales funciones biológicas del virus como son : enlace al receptor, fusión a membrana, presenta los determinantes antigénicos de neutralización, hemaglutinación y fijación de complemento, y tiene un papel importante en la patogenicidad del virus, definiendo el tropismo celular y/o afectando la penetración viral.

Recientemente se han reportado varios trabajos sobre el análisis de secuencias entre cepas parentales y vacunales de fiebre amarilla, encefalitis japonesa y encefalitis del Valle de Murray, donde se asocia la variabilidad genómica con una reducción en la patogenicidad, sin embargo, no se han podido determinar cambios específicos sobre la proteína E asociados con la virulencia de la cepa.

En aislados de virus (HIV, Polio, sarampión) se han detectado una mezcla de variantes que producen placas líticas pequeñas y grandes, donde el tamaño parece estar relacionado con la virulencia en ratón.

Nosotros hemos aislado 11 clones de la cepa de dengue-2 mexicano, de acuerdo a su capacidad de generar placas líticas grandes (D2ML1, D2ML2, D2ML3), medianas (D2MM1, D2MM2, D2MM3 y D2MM4) y pequeñas (D2MS1, D2MS2, D2MS3 y D2MS4). Posteriormente se purificó el RNA de cada una de ellas y se formaron heterohíbridos RNA:RNA con una ribosonda específica (obtenida por transcripción *in vitro*) que comprende del nucleótido 16 al 2103 del gen que codifica para la proteína E. Los heterohíbridos formados se dirigieron con RNasaA y los fragmentos generados, se analizaron por electroforesis en UREA-PAGE al 6%, observando que existe una variación a nivel genómico entre las clones.

Al mismo tiempo se determinó la capacidad virulenta de cada una de las clones en un modelo de encefalitis murino. Se observó que existe una

relación directa entre la variación genómica y la capacidad de virulencia de las clonas. Así mismo se observó que el fenotipo de la clona correlaciona con la virulencia, con excepción de la clona D2MS3, que presenta un fenotipo de placa lítica pequeña tiene una variación genómica y una virulencia parecida a una clona que produce un placa lítica grande.

Posteriormente se llevo a cabo la secuenciación de las clonas, con el fin de conocer cual es el cambio responsable del incremento o disminución en la virulencia. Al hacer el análisis de similitud de secuencia entre ellas, observamos un cambio importante en el dominio III de la proteína E, en el aminoácido 390 de Asp a His en las clonas que son altamente virulentas (D2ML1, D2ML2, D2ML3). Este cambio cae dentro de una de las regiones más conservadas entre los flavivirus y se piensa que es la región responsable de la fusión a membrana dependiente de pH ácido. Al llevarse a cabo el análisis de secuencia entre los flavivirus que producen encefalítis se observó que todos presentan una His en ésta posición. Sin embargo, las clonas que producen una placa lítica pequeña, son poco virulentas, presentan en éste sitio el cambio de Asp por Asn, que es un aminoácido presente en la cepa vacunal M3 de Malasia (DEN2). Por lo cual podemos concluir que el cambio en la posición 390 es importante en la capacidad de producir encefalítis en dengue.

INTRODUCCION.

El dengue es un problema de salud pública en la mayoría de los países tropicales, siendo las principales áreas endémicas el Sureste de Asia, África y en América.

La primera epidemia de la enfermedad fué descrita en Filadelfia en 1780 por Benjamín Rush, notificándose durante los años siguientes otras epidemias en Norteamérica, el Caribe, Asia y Australia (Cohen y col., 1964). En 1906, Bancot reporta la transmisión de la enfermedad por el vector Aedes aegypti. En 1944, Sabin y Schlesinger aislaron el virus de ratones infectados, estableciéndose la existencia de más de un serotipo mediante ensayos de reacción cruzada utilizando antisueros humanos (Sabin y col., 1945).

Actualmente se reconocen cuatro serotipos del virus del dengue (DEN1, DEN2, DEN3, y DEN4), los cuales crecen en una variedad de cultivos celulares primarios y continuos (humanos, BSC-1; mono, LLC-MK2, Vero; mosquito, TRA-284; hamster, BHK-21), replicándose *in vivo* en mosquitos, hamsters y en cerebro de ratones lactantes (Briton, 1988). Los diferentes serotipos han sido aislados a partir de pacientes ya sea de casos de dengue clásico y/o dengue hemorrágico/síndrome de choque (DHF/DSS).

El dengue es una virosis aguda y sistémica que causa una gran morbilidad y mortalidad en niños y adultos jóvenes que habitan en regiones tropicales (Asia, Oceanía, Australia y América), en donde prevalece el vector y en las cuales reside la mitad de la población mundial (Halstead, 1980) (Figura 1).

A nivel mundial se reportan anualmente aproximadamente 100 millones de casos de dengue, predominando la forma clásica de la enfermedad (90 % de los casos)(Halstead, 1990), la cual inicia abruptamente después de un periodo de incubación de 2-7 días con fiebre elevada, dolor de cabeza, dolor retroocular y lumbosacral. Los síntomas iniciales son seguidos de mialgias, artralgias y dolor óseo generalizado que incrementa en severidad, así como anorexia, náusea, vómito y debilidad.

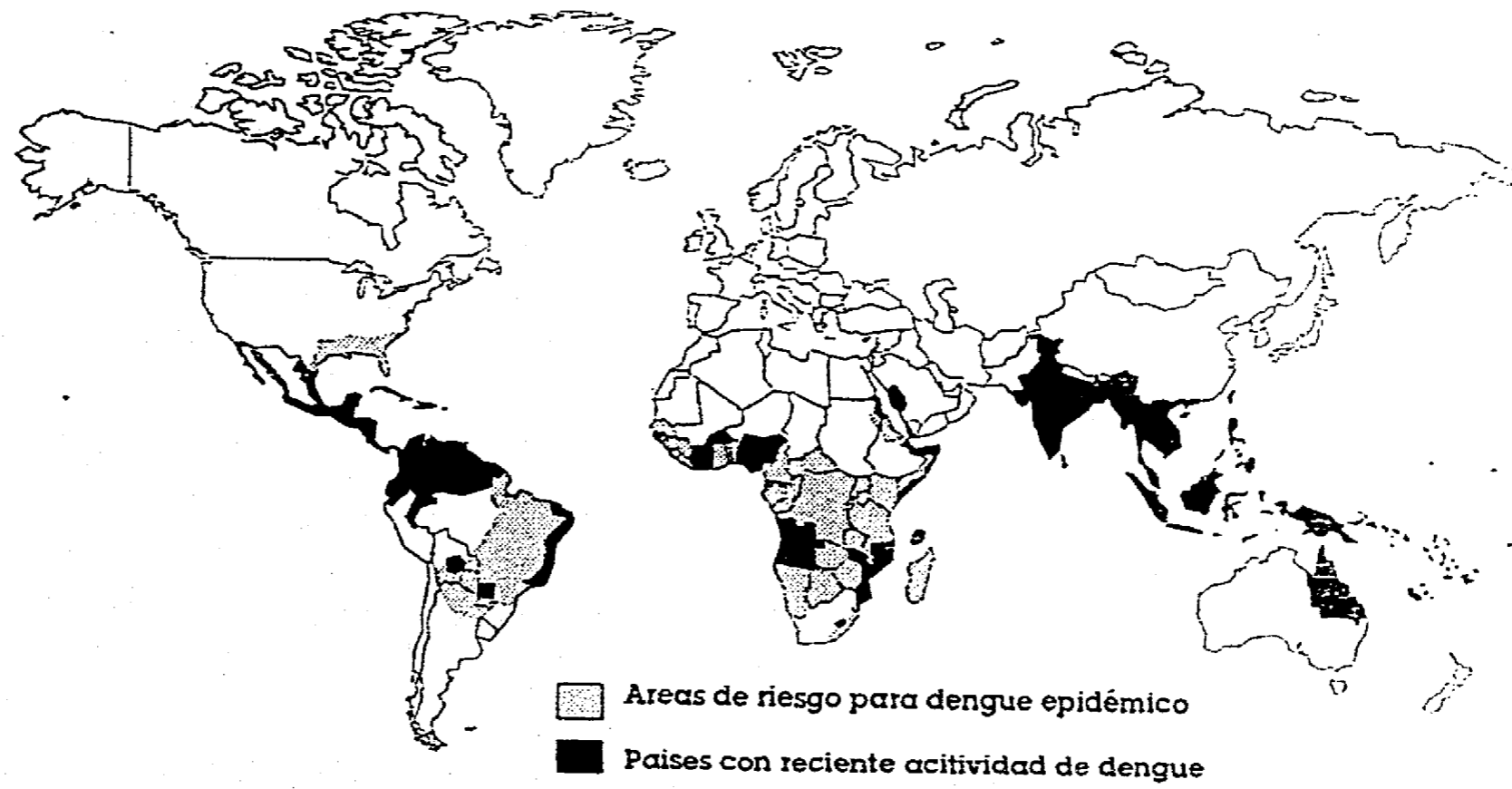


Figura 1. DISTRIBUCION MUNDIAL DE DENGUE EN 1995.

En 1954, se describió una enfermedad febril con signos hemorrágicos en una epidemia en Manila, cuyos agentes causantes fueron los virus del DEN3 y DEN4; a esta enfermedad se le denominó fiebre hemorrágica de dengue (DHF) y más tarde se presentó en el Sureste de Asia, donde actualmente existe en forma tanto endémica como epidémica, con altos índices de morbilidad (Cohen, y col., 1964). La manifestación hemorrágica inicialmente se presenta como en la forma clásica, que después de 2-5 días progresa rápidamente causando irritabilidad, choque con hipotermia en las extremidades, diaforesis, cianosis periférica, hipotensión, aparición de hemorragias espontáneas como petequias, equimosis y epistaxis. El progreso del choque es rápido si no hay tratamiento fisiológico oportuno, con una letalidad del 40 %. De las personas que presentan dengue del 5 al 10 % desarrollan DHF/DSS. (Monath y col., 1986).

Desde 1981 se han notificado casos de dengue hemorrágico en Latino América: Suriname, México, República Dominicana, Haití, Aruba, Nicaragua, Colombia, Puerto Rico, Santa Lucía, Estados Unidos, Islas Vírgenes, Brasil, El Salvador y Honduras (PAHO, 1992).

Halstead propone que la forma severa de la enfermedad tiene bases inmunopatológicas y que ocurre en individuos previamente infectados con un serotipo heterólogo del dengue (Halstead y col., 1979). En Thailanda se hospitalizan 20 000 pacientes anualmente con DHF y en Bangkok se ha demostrado que muchos de los casos de DHF/DSS son el resultado de una infección secuencial con diferentes serotipos del virus, especialmente cuando la segunda infección es con serotipo 2.

Las causas por las cuales se presenta DHF/DSS no están todavía bien entendidas, pero se ha planteado la hipótesis que la facilitación inmunológica mediada por anticuerpos no neutralizantes heterotípicos en el transcurso de una infección secundaria (Halstead y col., 1981; Portefield y col., 1982; Halstead y col., 1984), ocasionando una activación de los macrófagos, es un factor predisponente. Los macrófagos a su vez activan los sistemas de coagulación y/o fibrinólisis, ocasionando una coagulopatía de consumo. Así mismo, otros estudios han demostrado que la existencia de anticuerpos maternos contra el virus, en niños lactantes, incrementan la probabilidad de presentar DHF/DSS (Milns y col., 1989; Naside y col., 1993).

Sin embargo, se han reportado casos de DHF/DSS en el curso de una infección primaria, lo cual sugiere que probablemente exista variabilidad genómica y/o antigénica viral que puede influir en la expresión de la virulencia (Barnes y Rosen, 1974).

Rosen en 1977 propuso que DHF/DSS es causado por variantes del virus del dengue con un potencial patogénico incrementado (Rosen, 1977). La importancia del potencial patogénico dentro de la variación natural ha sido estudiado recientemente por varios autores (Igaroshi y col., 1984; Monath y col., 1986) sugiriendo que ésta influye directamente tanto en la virulencia hacia el huésped (humano), como en su capacidad de infectar al vector. Los estudios llevados a cabo por Schlesinger en 1980 sugieren la existencia de una mezcla de poblaciones virales con diferentes propiedades virulentas dentro de aislados independientes del virus del dengue (Schlesinger, 1980), observando en la mezcla de variantes (formando placas líticas grandes y pequeñas) que el tamaño de placa lítica correlacionaba con el grado de virulencia en ratón, sensibilidad a temperatura y atenuación en primates no humanos (Eckels y col., 1976; Harison, y col., 1977).

En un esfuerzo para entender los mecanismos de atenuación en flavivirus se ha llevado a cabo la secuenciación a nivel tanto de nucleótidos como de aminoácidos del genoma completo de cepas atenuadas del virus de la fiebre amarilla (YF), del virus de la encefalitis Japonesa (JEV) y el virus del dengue. Estas secuencias fueron comparadas con las secuencia de las cepas parentales (Aihara y col., 1991; Block y col., 1992; Hahn y col., 1987; Nitayaphan y col., 1990) y en todos los casos se identificaron numerosos cambios de aminoácidos a lo largo del genoma viral.

La hibridización de oligonucleótidos con el RNA, los ensayos de RNA mediante huella digital (fingerprinting), la hibridización RNA-DNA y el análisis antigénico, han sido herramientas útiles en los análisis de epidemiología molecular, determinando el origen y expansión de las cepas virales, clasificándose dentro de variantes geográficas o topotipos (Tabla I), encontrándose además, cambios genéticos en las poblaciones virales, dentro de una área geográfica determinada con la aparición de nuevos genotipos por mutación y selección natural (Heinz y col., 1986; Kerschner y col., 1986; Monath y col., 1986).

Tabla I . TOPOTIPOS DEL VIRUS DEL DENGUE

DEN 1	DEN2	DEN3	DEN4
1. Filipinas ^a	1. América/India/ Pacífico Sur	1. Tailandia	1. América
2. Malasia	2. Caribe	2. Indonesia	2. Filipinas
3. Tailandia	3. Filipinas/Taiwan	3. Caribe	3. Tailandia
4. Africa/ Sri Lanka	4. Seychelles	4. Sri Lanka	4. Sri Lanka
5. América	5. Africa (endémica)	5. Filipinas	5. Africa
6. India	6. Africa (enzootica)		
7. Indonesia	7. Malasia		
8. Islas del Pacífico	8. Sri Lanka		
	9. Indonesia		
	10. Tailandia		

^aLos topotipos son designados con números arábigos para cada serotipo

PROTEINAS VIRALES.

El virus del dengue mide 50 nm de diámetro, pertenece a la familia Flaviviridae, su material genómico es un RNA de cadena sencilla de polaridad positiva el cual codifica para un precursor poliproteínico (3386 a.a.). El procesamiento del precursor poliproteínico en flavivirus, genera al menos 10 proteínas virales. En la Tabla II, se resume la información que se tiene sobre estructura, maduración y posible función de estos polipéptidos.

La proteína E (P.M. 53-60 Kd) es la principal proteína estructural del virión la cual presenta la mayor parte de las actividades biológicas del mismo que incluyen el ensamblaje del virión, enlace al receptor, fusión a membrana, hemaglutinación, fijación del complemento, neurotropismo y es el principal blanco para anticuerpos neutralizantes (Heinz y col., 1986). La digestión de E con proteasas indica que es una proteína de membrana típica con un ectodominio en el extremo N-terminal que presenta 2 segmentos transmembranales que sirven para anclar a la proteína en la bicapa lipídica vía un dominio hidrofóbico que se localiza en el extremo C-terminal. El monómero de la proteína contiene 500 aminoácidos.

La proteína E se encuentra formando dímeros sobre la superficie de los viriones maduros a pH fisiológicos, la exposición a pH ácidos (más bajos de 6.5) induce un cambio conformacional irreversible en la proteína que tiene como consecuencia la formación de trimeros. Se postula que este cambio conformacional es crítico para la fusión de la membrana del virus con la membrana del endosoma, una vez que el virus ha entrado a la célula. Los viriones inmaduros no presentan este cambio conformacional en la proteína E cuando son expuestos a pH ácido, debido a la presencia de pM, proponiéndose que una de sus funciones sea la de prevenir esta inactivación irreversible durante el transporte del virus a través de los compartimientos acídicos de la red trans-Golgi. Rey y colaboradores llevaron a cabo la cristalización de un fragmento dimérico soluble (sE) de la proteína E a una resolución de 2 Å (Rey y col., 1995) (Figura 2). El fragmento fue obtenido a partir del tratamiento de los viriones con tripsina. Este comprende del residuo 1 - 395, faltándole 105 aminoácidos que corresponden al fragmento de anclaje a la membrana.

7

TABLA II. PROPIEDADES DE LAS PROTEINAS DE FLAVIVIRUS

Proteínas flavivirus	Peso molecular	Corte en N-terminal	Corte en C-terminal	Hidrofobicidad (YF) %	Carga neta (YF)	Dominio asociado membrana	Sitios de glicosilación αN	Propiedades adicionales	Función
C (anclaje)	12.3 - 13.7	M	S	40	+25	SI	NO	N-terminal heterogeneo; básico; anclaje hidrofóbico	Enlace a RNA; precursor de la nucleocápside; secuencia prM señal
C (virion)	10.5 - 11.7	M	DC	37	+26	NO	NO	N-terminal heterogeneo; básico; nucleocápside del virus	Desnudamiento?; Eventos tempranos?
prM	18.1 - 19.0	S	S	39	+5	SI	SI	Anclaje transmembranal; dominio luminal; prM/E heterodímero; precursor M; asociada a membrana	Morfogenesis viral y/o transporte
pr	9.8 - 10.7	S	DL	31	+1	NO	SI	Dominio luminal; 6 C-C residuos conservados	Precursor glicosilado de M
M	8.2 - 8.5	DL	S	46	+4	SI	NO	Anclaje transmembranal; ectodominio; proteína de membrana del virus	Componente espicular del virion; enlace y entrada
E	53.3 - 54.3	S	S	41	-5	SI	SI/NO	Anclaje transmembranal; 12 C-C residuos conservados; proteína de envoltura	Ensamblaje del virion; enlace al receptor; fusión a membrana; principal antígeno viral
NS1	39.2 - 40.0	S	L?	34	-7	NO?	SI	Forma asociada-membrana y secretada; dímero; antígeno CF	Maduración del virus?; Anticuerpos protectivos
NS2A	23.7 - 25.4	L?	DC	56	+9	?	NO	Hidrofóbica; poco conservada	Maduración de NS1
NS2B	13.8 - 14.5	DC	DC	54	-7	?	NO	Hidrofóbica; poco conservada	Asociada a membrana; componente replicasa/proteasa
NS3	68.5 - 69.5	DC	DC	39	0	NO	NO	Dominio serin-proteas; Motivo de enlace NTP; muy conservada	Proteasa, helicasa
NS4A	16.0 - 16.4	DC	S	56	2	?	NO	Hidrofóbica; poco conservada	Componente de replicasa asociada a membrana;
NS4B	26.5 - 27.9	S	DC	49	+3	?	NO	Hidrofóbica; poco conservada	Componente de replicasa asociada a membrana;
NS5	103 - 104	DC	N/A	39	+14	NO	NO	Motivo GDD; muy conservada	RNA polimerasa

DC = Corte después de 2 residuos básicos en citoplasma, DL = Corte después de 2 residuos básicos en el lumen, L = lumen, S = Señalasa del huésped; M=Metionina amino-peptidasa celular. El porcentaje de hidrofobicidad esta dado por el contenido de Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Val, Trp, Tyr.

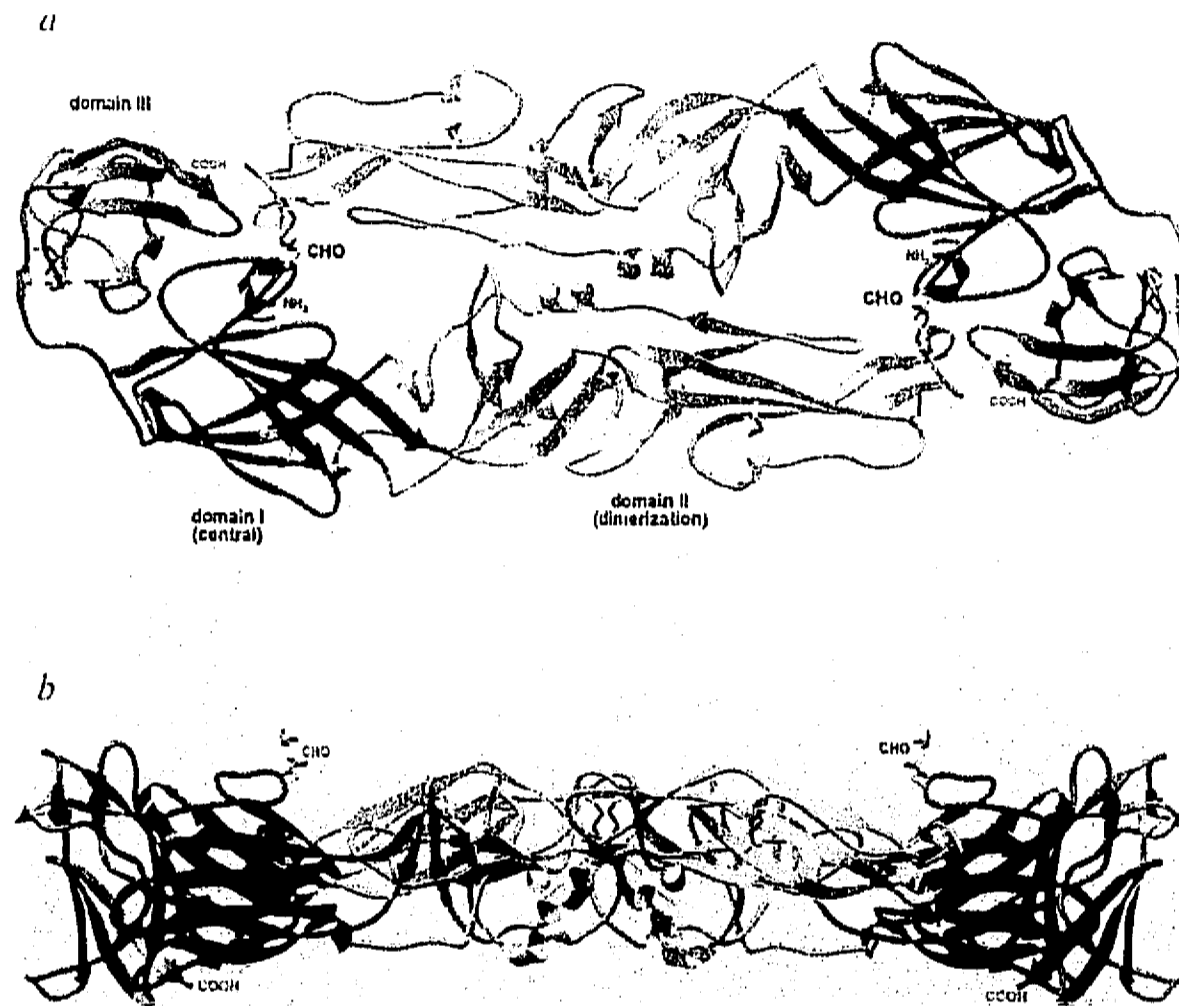


Figura 2. Estructura tridimensional del fragmento soluble de la proteína E de TBE (dímero). **a).** Representa al dímero de la proteína visto de la parte de afuera de la partícula viral. **b).** Vista de la cara lateral el dímero de la proteína E. La proteína E ocupa un área de $1\ 600\ \text{Å}^2$. La interface intrasubunidad entre los dominios I y II ocupa una superficie de $650\ \text{Å}^2$ sobre cada dominio. Las hojas β están representadas por listones con flechas; las alfa hélices por listones en espiral; las asas con listones delgados. Los puentes disulfuro y el motivo de carbohidrato se muestran en estructura química.

La estructura de la proteína tiene las siguientes dimensiones; de ~150 Å x 55 Å x 30 Å. Como se observa en la figura 2b el dímero es alargado y paralelo a la membrana y tiene una extensión radial de cerca de 30 Å. En la cara externa (forma convexa) de la proteína se encuentran localizadas las asas que varían de tamaño y secuencia entre los flavivirus, así como los principales sitios antigénicos y el carbohidrato. La cara interna (parte cóncava) contiene el C-terminal proyectado hacia la membrana.

El monómero está formado por tres dominios distintos:

Dominio I o dominio central, contiene cerca de 120 residuos en tres segmentos (1-51, 137-189, y 285-302), que se encuentran plegados en 8 hojas β formando un barril β . Hay dos puentes disulfuro en este dominio.

Dominio II o dominio de dimerización comprende los residuos 52-136 y 190-284 que forman una estructura tipo digitiforme extendida. Dentro de este dominio se encuentra el asa cd formada por los residuos 98-113, que son los más conservados entre los flavivirus, es una región rica en glicina y ligeramente hidrofóbica.

Dominio III, está compuesto por los residuos 303-395 que forman un dominio tipo inmunoglobulina (IgC). Se encuentra unido al dominio central de la proteína por un segmento de aproximadamente 15 residuos y un puente disulfuro. La superficie lateral del dominio III, contiene residuos que se ha visto están implicados en el grado de virulencia y tropismo en diferentes flavivirus. Rey y colaboradores proponen que esta superficie puede estar involucrada en el reconocimiento al receptor (Rey y col., 1995).

REPLICACION VIRAL

Penetración y desnudamiento.

El ciclo de transmisión natural en flavivirus, implica su replicación tanto en un vector artrópodo (usualmente mosquito o garrapata), así como en su huésped vertebrado. En el artrópodo, la infección no es patogénica; sin embargo, en los vertebrados infectados, ya sea en forma natural o experimental frecuentemente se presentan cambios patológicos severos.

Estas diferencias también se han observado en cultivos celulares; por ejemplo, la replicación viral en líneas celulares de mosquitos, no ocasiona muerte celular, mientras que diferentes líneas celulares de vertebrados generalmente presentan un efecto citopático agudo (Halstead y col., 1977).

Los flavivirus entran a la célula mediante 2 mecanismos a). el virión (Figura 3) interacciona con los receptores celulares y entra al citoplasma por endocitosis mediada por receptor y b). por fusión directa con la membrana celular (Figura 4). Cuando las células son infectadas en presencia de concentraciones subneutralizantes de anticuerpos, el virus generalmente penetra a la célula vía receptor Fc (Daughaday y col., 1981).

Hase y colaboradores observaron por microscopia electrónica que los viriones de dengue y encefalitis Japonesa penetran la membrana plasmática de células de mosquito a través de la ruptura de esta en los sitios de adsorción y en células mononucleares humanas de sangre periférica el virus entra a través de membranas vacuolares macropinocíticas (Hase y col., 1989).

Los flaviviriones que entran a la célula por las vesículas acídicas endocíticas son liberados de su envoltura por la acción de enzimas proteolíticas presentes en los endosomas (Guirakhoo y col., 1991). Los endosomas acídicos contienen las tres proteínas estructurales del virus: las proteínas de la cápside (C), de la membrana (M), y de envoltura (E), la cual sufre cambios conformacionales a pH ácido. El procesamiento proteolítico de las proteínas virales se lleva a cabo a pH 5.0 - 6.0, en el momento en que la vesícula es transportada al interior de la célula. La enzima catépsina D es la responsable del rompimiento proteolítico (Blum y col., 1989). Los eventos moleculares que resultan en la disociación de la nucleocápside y la liberación del RNA infeccioso, no están bien definidos (Figura 5).

Replicación del RNA viral.

El RNA desnudo inicialmente es transportado al citoplasma donde empieza la traducción del RNA. La replicación del RNA viral comienza con la síntesis de un RNA (-) complementario con ayuda de RNA polimerasa-dependiente de RNA codificada por el virus, (Westaway, 1987).

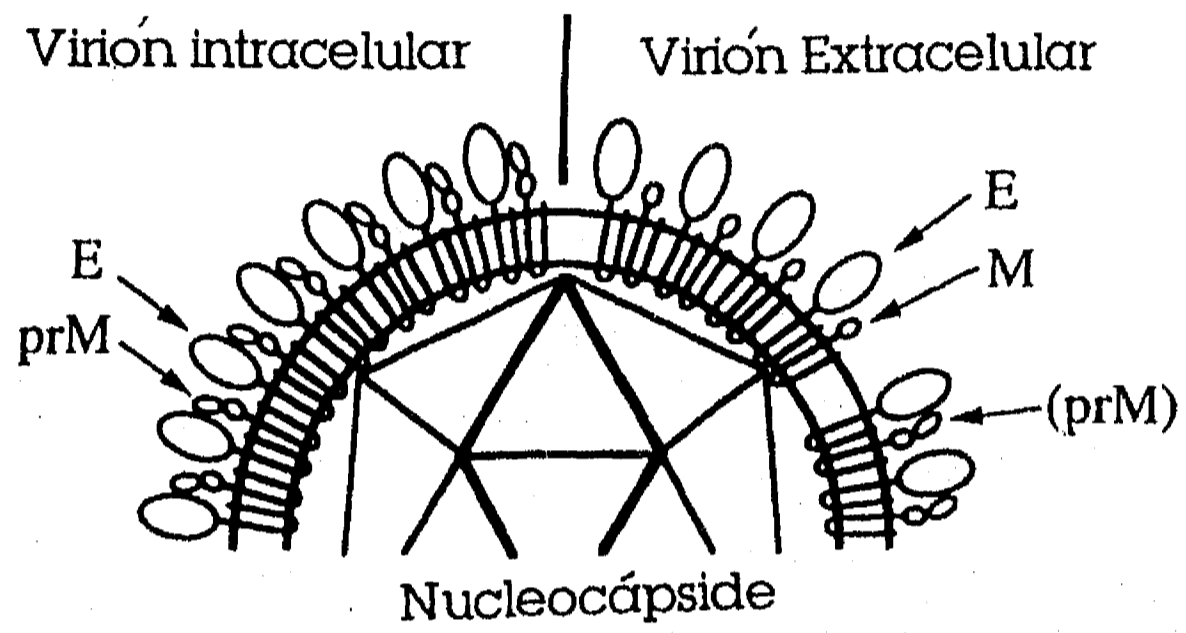


Figura 3. Representación esquemática del virus del dengue.

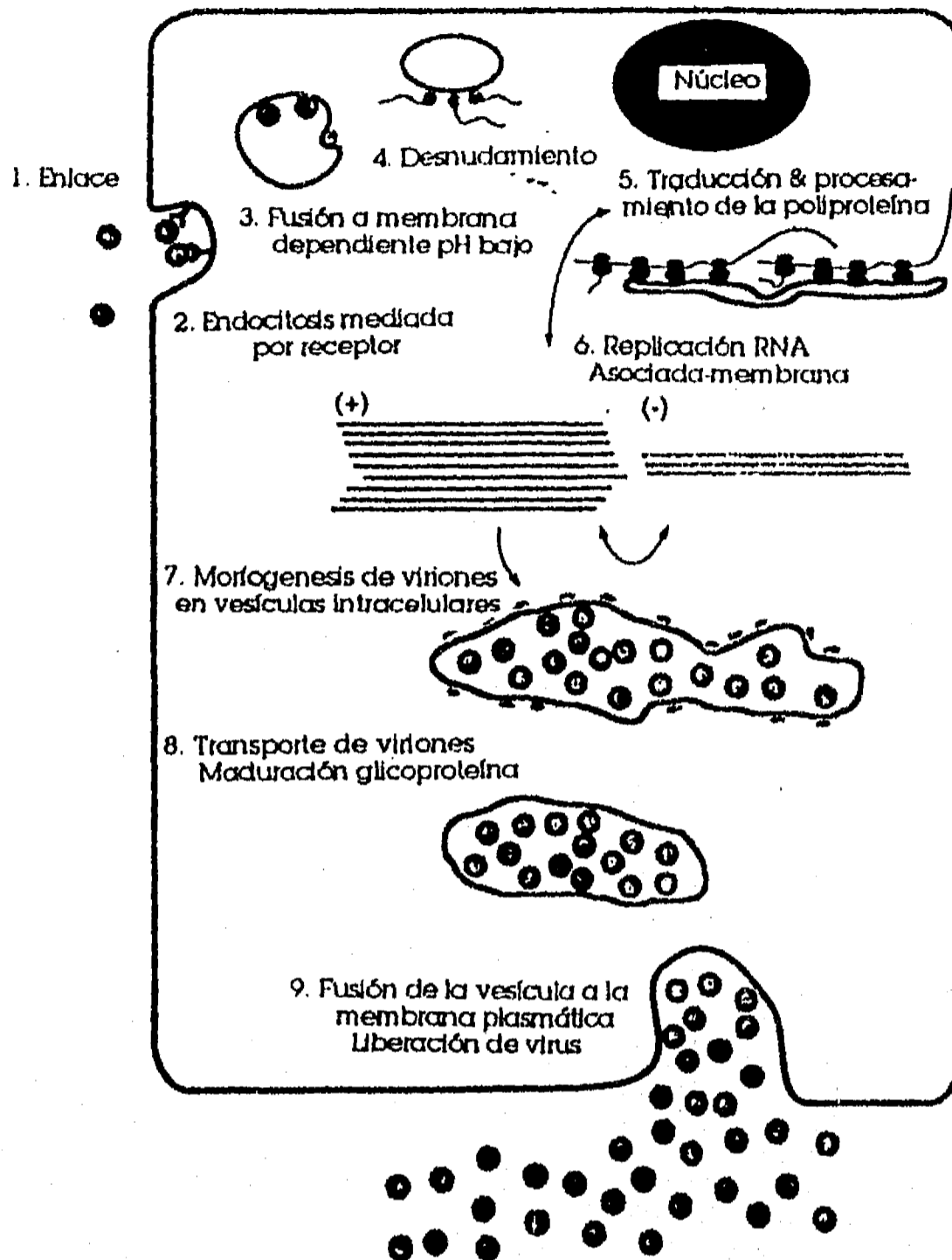


Figura 4. Ciclo de vida de flavivirus: penetración, desnudamiento y replicación viral.

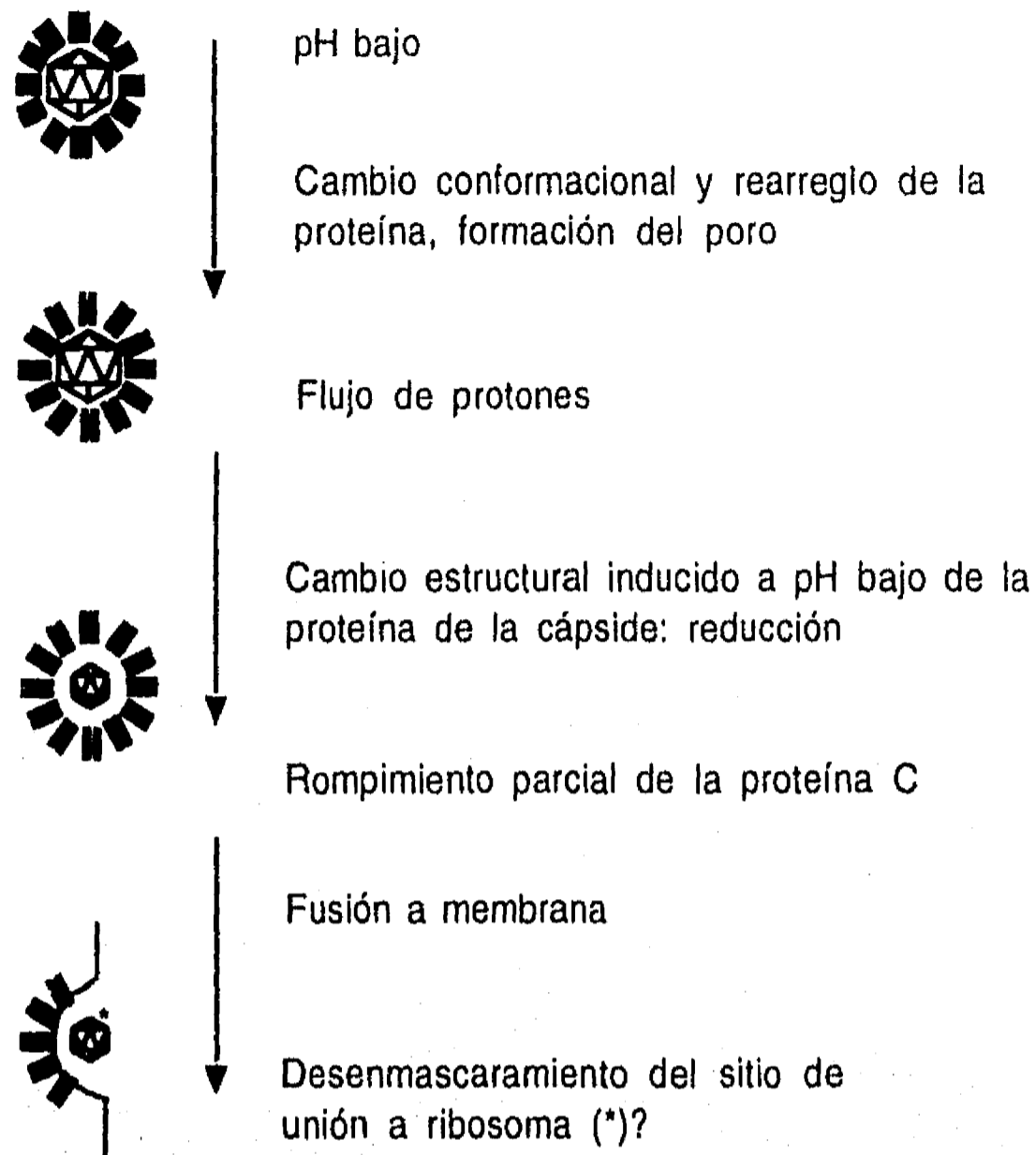


Figura 5. Modelo del desensamblaje de la cápside por medio del flujo de protones (pasos 4 y 5 de la figura 3). El desnudamiento ocurre en el endosoma, donde el pH bajo (5-6) induce la proteína E a formar poros en la membrana viral, así como, catalizar la fusión a membrana endosomal. La formación de los poros ocasiona un cambio de pH dentro del virón, lo que induce cambios estructurales, siendo uno de estos cambios el rompimiento autoproteolítico, teniendo como consecuencia el desensamblaje de la cápside o exposición del sitio de unión al ribosoma.

El RNA (-) es utilizado como molde para generar RNA (+) que es utilizado para la síntesis de otras moléculas de RNA (-), para la traducción de las proteínas virales, y para su encapsidación. La replicación del RNA ocurre en la región perinuclear de la célula infectada a las 3 horas postinfección. Tres tipos de RNA son recuperados y aislados por sedimentación usando gradientes de sacarosa de células infectadas: RNA de 20S a 22S resistente a RNasa, denominado forma replicativa; RNA de 20S a 28S parcialmente resistente a RNasa considerado como una forma replicativa intermedio; y un RNA de 42S sensible a RNasa (Stollar y col., 1967; Wengler y col., 1978).

El RNA de forma replicativa puede ser convertido en RNA de 42S con agentes desnaturizantes o por calor; esto sugiere que la forma replicativa es un RNA de doble cadena compuesto por una cadena de RNA (+) y una de RNA(-). El RNA de forma replicativa y el RNA parcialmente resistente a RNasa (replicativa intermedio) sirven como precursores de RNA viral 42S de cadena positiva (Chu y col., 1985). Se desconoce como se regula la replicación del RNA, pero se ha observado que en los eventos tardíos de la replicación se favorece la síntesis de RNA (+) infeccioso, hay un aumento de la proteína C, la cual se une al extremo 3' del RNA (+) evitando de esta manera que sea reconocido por la RNA polimerasa, sin embargo este RNA si es reconocido por los ribosomas que se unen al extremo 5' ocasionando que se inicie el ensamblaje de la nucleocápside (Westaway y col., 1980).

La progenie viral llega a ser visible por microscopía electrónica en las cisternas de las vesículas del retículo endoplasmático (RE), en la región perinuclear de células infectadas después de 8-12 horas de la infección (Westaway, 1987). También se observa una excesiva proliferación de la membrana del RE rugoso y liso. El ensamblaje y el desarrollo de la nucleocápside ocurre intracelularmente a través de gemación de membranas intracelulares. Los viriones son transportados por vesículas citoplasmáticas a la superficie de la célula (Dubois y col., 1984). Estas vesículas siguen la vía secretoria de la células, donde la liberan al virus por fusión de la membrana de las vesículas conteniendo el virus con la membrana plasmática o, en casos citopatológicos el virus puede liberarse por ruptura de la membrana celular (Figura 4).

Síntesis y procesamiento proteolítico de las proteínas virales.

El virus del dengue presenta un RNA de cadena sencilla que funciona como material genómico de 11 kilobases, infeccioso, de polaridad positiva que presenta un Cap tipo I en su extremo 5' y carece de poli(A)+ en su extremo 3'. La característica más importante del genoma es la presencia de un marco abierto de lectura de cerca de 11 000 bases que codifica para un precursor poliproteínico (NH₂-C-prM-M-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-COOH) que se procesa postraduccionalmente dando lugar a 3 proteínas estructurales (C, prM-M y E) y 7 proteínas no estructurales, dentro de las cuales NS2B, NS3, NS4A y NS5 son altamente conservadas en todos los flavivirus (Briton y col., 1988; Chambers y col., 1990; Rice y col., 1986).

Se ha observado que el precursor poliproteínico está parcialmente insertado en la membrana del RE, sugiriendo que cuando el extremo N-terminal de la poliproteína esta en el citosol, la proteínas prM, M y E estan incorporadas en el lumen del RE. El resto de la poliproteína, incluyendo NS2A, NS2B, NS3, NS4 α , NS4b y NS5 están presentes en el citosol (Coia y col., 1988). El procesamiento en los sitios de C-prM, prM-E, E-NS1, y probablemente NS4A-NS4B, es llevado a cabo por la enzima peptidasa señal (señalasa) de la célula huésped (Figura 6) (Chambers y col., 1990b; Markoff, 1989; Nowak y col., 1989; Ruiz-Linares y col., 1989).

Markoff y colaboradores en 1994 propusieron un modelo para el procesamiento de las proteínas estructurales en flavivirus, a partir de las propiedades hidrofóbicas del carboxilo terminal de prM y E, (el cual estructuralmente es conservado), para que prM sea incorporada a la membrana del RE en una orientación tipo I (Nexo-Cyto) y deje disponible el sitio de corte prM- E (Von Heijns, 1988; Nowak y Wengler, 1987; Chambers y col., 1990 α). La poliproteína naciente de flavivirus inicia su procesamiento con el reconocimiento cotraduccional del péptido señal en C-prM (Markoff, 1989). Alternativamente, el corte en el péptido señal de prM, catalizado por una proteasa (NS3) codificada por el virus, (Chambers y col., 1990c; Falgout y col., 1991; Preugschat y col., 1990; Wengler y col., 1991) libera la proteína de la cápside (C) al citoplasma, facilitando el reconocimiento de la señal de prM (Yawshchikov y Compans, 1993) lo cual es probablemente mediado por la

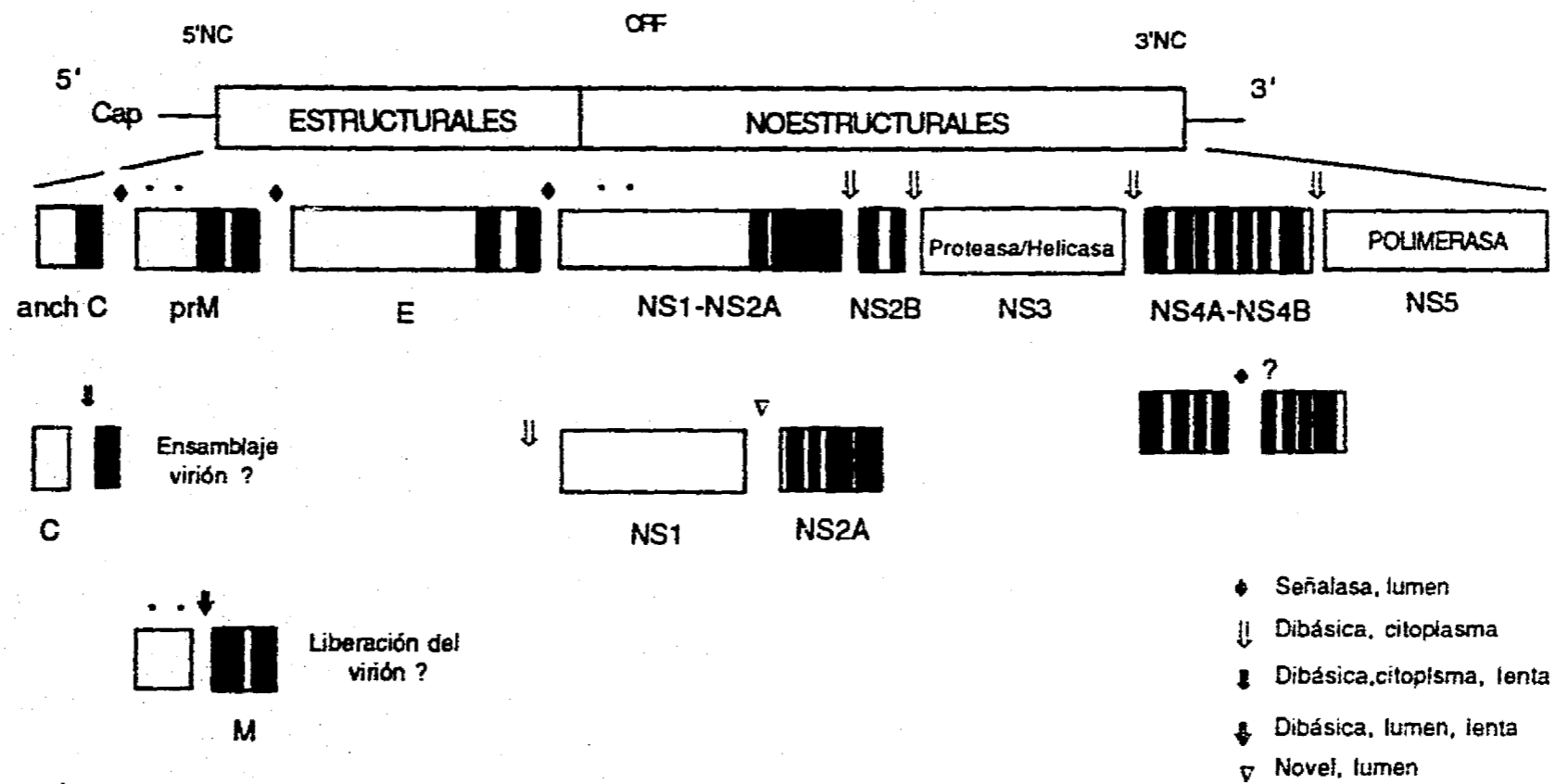


Figura 6. Organización del genoma de los flavivirus, procesamiento del polipéptido, y propiedades de las proteínas codificadas. El genoma viral se representa en la parte de arriba de la figura, con las regiones que codifican para las proteínas estructurales y no-estructurales, el cap en el extremo 5' y las regiones no traducibles 3' y 5', las cajas de abajo representan los precursores del genoma y las proteínas maduras obtenidas mediante un proceso proteolítico en cascada. Las zonas oscuras señalan las regiones formadas con aminoácidos no cargados. Los asteriscos indican los sitios probables de N-glicosilación.

interacción con una ribonucleoproteína citoplasmática llamada partícula de reconocimiento señal [SRP (Walter y Lingappa, 1986)], teniendo como resultado la internalización de prM en el lumen del RE a través de un canal acuoso formando una estructura tallo-asa (hairpin loop) en el sitio de interacción de la SRP con su receptor proteico, sobre el lado citoplasmático de la membrana del RE (Figura 7a)(Walter y col., 1981; Shaw y col., 1988).

Para que la translocación se lleve a cabo es necesario la presencia de un segundo componente de la membrana, Sec61p, que es un complejo heterotrimérico, que se propone sea el principal constituyente del canal acuoso (Siegel, 1995). El péptido señal en prM se fija a la membrana con el amino terminal sobre el lado citoplasmático, y es cortado por una señal-peptidasa, liberando el amino terminal de prM en el lumen del RE durante la translocación (Figura 7b).

Esta translocación es transitoriamente interrumpida por la presencia de los residuos hidrofóbicos del segmento tm (Figura 7c), éste es necesario pero no suficiente para estabilizar el anclaje de prM a la membrana. En DEN4 el segmento tm tiene 37 aminoácidos de longitud localizado entre los residuos 243 al 279 del precursor poliproteínico el cual presenta una Arg (264) siendo un aminoácido anfipático (Despres y col., 1990; Ruiz-Linares y col., 1989), que interrumpe la hidrofobicidad formando una asa sobre el lado citoplasmático de la membrana del RE que sirve como péptido señal de E, el cual es reconocido para que la translocación de la poliproteína sea reiniciada (Figura 7d) (Markoff y col., 1994).

prM, E y NS1 son translocadas, cortadas y glicosiladas después del eficiente reconocimiento del amino terminal del péptido señal prM. La hidrofobicidad del segmento tm es determinante para la translocación a través del canal acuoso y efectuar el bloqueo del mismo, resultando en la integración de la proteína en la membrana (Walter y Lingappa, 1986; Von Heijns, 1988; Simon y Blobel, 1991).

El procesamiento de las proteínas no estructurales no se conoce bien pero se conoce que se lleva a cabo en el citoplasma siguiendo una organización topológica del rompimiento del precursor del lado citoplasmático de la membrana del RE (Figura 8).

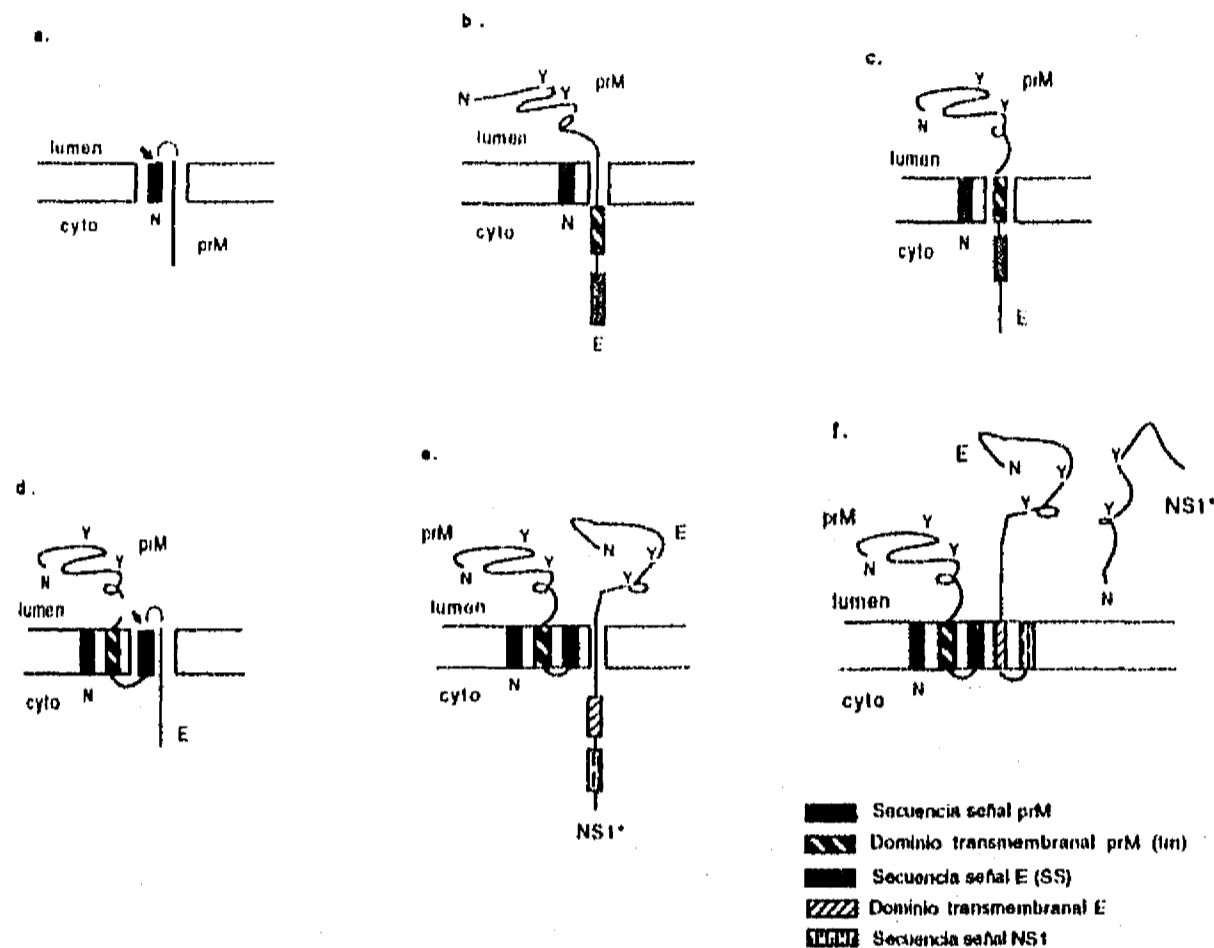
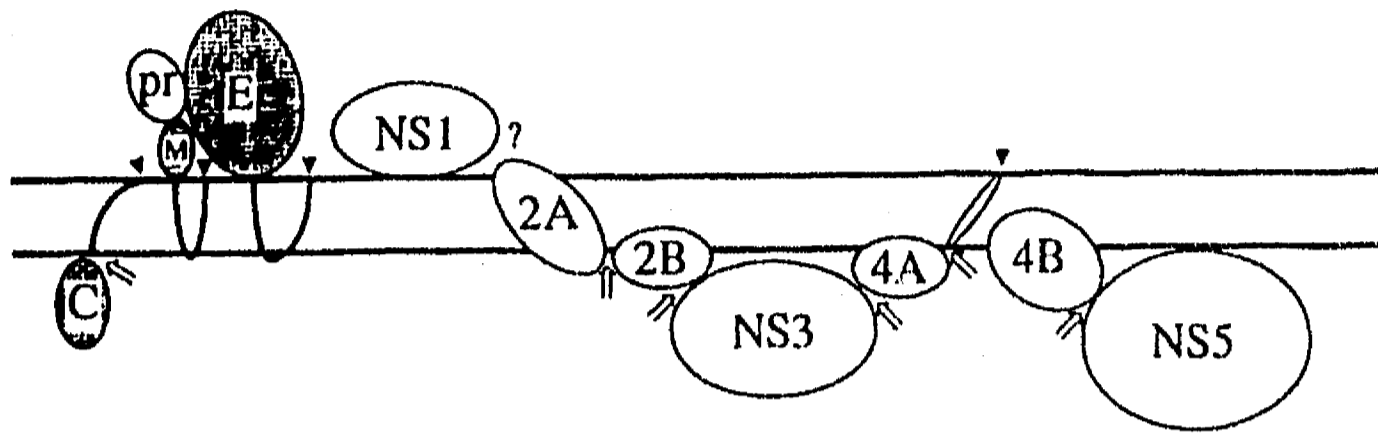


Figura 7. Procesamiento del polipéptido que codifica para prM-E-NS1*. La membrana del RE es mostrada, separando la región luminal de la citoplasmática. (a.) Una vez que es reconocida la secuencia señal de prM (comprende del aa 100-113 de la poliproteína de Den 4), se lleva a cabo la apertura de un canal acuoso y el N-terminal (N) de la señal permanece del lado citoplasmático de la membrana. Posteriormente se inicia la translocación de prM, a través del canal acuoso, formando una estructura tallo-asa (horquilla). La enzima señal-peptidasa corta en la secuencia señal de prM (■), separando en la membrana intraluminal el N-terminal de la proteína procesada. (b.) A continuación el ectodominio principal de prM es translocado y diglicosilado (Y), y el péptido señal prM se incorpora a la membrana lipídica. (c.) El dominio transmembranal (tm) de prM (aa 243-263), interrumpe transitoriamente la translocación de prM, al ponerse en contacto con el canal acuoso (esta interacción no es suficiente para estabilizar la integración a la membrana de prM). (d.) La secuencia señal de E (SS; aa 265-279) en este momento es reconocida, llevándose a cabo la integración estable de prM a la membrana. Markoff y col. (1994) proponen, que se requiere la apertura de un segundo canal acuoso para que la proteína E nascente sea translocada a través del canal en forma de horquilla. El C-terminal de prM (aa 259-264) que es un dominio anfipático conservado es incorporado a la membrana, orientado hacia el lado citoplasmático. La flecha diagonal indica el sitio de corte de la enzima señal-peptidasa en la secuencia señal de E. (e.) Se termina la translocación del ectodominio principal de E. El C-terminal de prM es girado dentro del ambiente lipídico de la membrana. E es diglicosilada (Y) y el corte de E SS se lleva a cabo, liberando el N-terminal de E (N). (f.) El dominio transmembranal en E interrumpe transitoriamente la translocación de E. El reconocimiento subsecuente de la señal NS1* tiene como resultado la integración estable de E en la membrana; la translocación de NS1* vía un tercer canal acuoso; el corte en la secuencia señal NS1* y la glicosilación de la proteína. NS1* como carece del dominio de anclaje a membrana se encuentra libre en el lumen del RE. NS1* (proteína truncada del aa 3166 en adelante).

LUMEN RE



CITOPLASMA

Figura 8. Diagrama del procesamiento del precursor poliproteínico de flavivirus en la membrana del RE. Las proteínas se encuentran a escala (el área es proporcional al número de aminoácidos) y son colocadas de izquierda a derecha de acuerdo a su colocación en el precursor. Se indica los segmentos hidrofóbicos que son procesados por señalasa del huésped (▼), por la serina-proteasa viral (⇓), o por proteasas que no han sido identificadas, responsables del corte de NS1-2A(?).

La proteína NS3 tiene un papel muy importante en la replicación viral, ya que presenta tanto actividad de ATPasa como de RNA helicasa, aunque se desconoce su mecanismo de acción, es posible que NS3 linearice la estructura secundaria del extremo 3' del genoma de los flavivirus y/o que participe en la iniciación de la síntesis de RNA viral (Rice y col., 1985; Takegami y col., 1994).

Basados en estudios de homología de secuencia con proteasas serínicas y modelaje molecular se ha propuesto que el dominio de la proteasa viral se encuentra en el extremo N-terminal de NS3 (Bazan y Fletterick, 1989; Gorbalenya y col., 1989), su actividad es dependiente de NS2B, que sirve como cofactor que promueve o modula la actividad de la proteasa NS3 (Falgout y col., 1991; Preugschat y col., 1990; Chambers y col., 1990c). NS2B forman un complejo estable con la proteasa viral, siendo necesarios los primeros 40 aminoácidos de NS2B, para que en el momento en que se está generando de NS3, esta tenga un plegamiento adecuado (Falgout y col., 1993).

La proteasa viral NS2B-NS3, rompe el precursor poliproteínico en las uniones intergénicas que contienen la secuencia específica de dos aminoácidos básicos Arg-Arg, Lys-Arg. También puede romper después de Gln-Arg y en el sitio que precede a la secuencia señal de NS4B (Lin y col., 1993). Probablemente, también lleve a cabo el rompimiento en uno o posiblemente en dos sitios alternos en NS2A. Uno de estos sitios es Lys-Lys-Gly que se encuentra a 33 aminoácidos hacia arriba del sitio de unión en NS2A-NS2B. En JEV y en otros miembros del grupo de West Nile (WNV) se ha observado que contienen otro sitio potencial de rompimiento (Lys-Lys-Thr or Lys-Arg-Ser) localizado 6 aminoácidos hacia arriba del sitio de unión (Jan y col., 1995). Estudios con virus JEV, virus Kunjin (KV), YF sugieren que NS2A es procesada normalmente en un sitio interno en flavivirus y se piensa que es funcionalmente importante para la replicación viral (Speight y col., 1988; Mason, 1989). La proteasa NS2B-NS3 también es responsable del rompimiento de NS3-NS4A. El rompimiento de NS4A-NS4B, NS4B-NS5 y NS1-NS2A se lleva a cabo por una proteasa tipo peptidasa-señal en el citoplasma, que depende de una secuencia de 8 aminoácidos en el carboxi-terminal de NS1-NS2A

(Krausslich y col., 1988; Markoff, 1989; Nowak y col., 1989; Ruiz-Linares y col., 1989), pero se desconoce si esta proteasa es NS2B-NS3. NS3 y NS5 son los componentes virales del complejo replicasa (Grun y col., 1988), ambas proteínas son hidrofóbicas y son las más conservadas en secuencia de aminoácidos entre los flavivirus. NS5 presenta el motivo de RNA polimerasa GDD y NS3 un motivo helicasa (Rice y col., 1986; Chambers y col., 1990). NS4A y NS4B contienen regiones hidrofóbicas que están estrictamente conservadas en los flavivirus, lo que sugiere que pueden tener un papel importante para que se lleve a cabo el anclaje de NS3 y NS5 a la membrana, como parte del complejo replicasa.

Ensamblaje y liberación del virus.

El ensamblaje del virus del dengue consta de las siguientes fases: (i) ensamblaje de la nucleocápside, a partir del RNA y la proteína C; (ii) "gemación" de la nucleocápside a través de la membrana del RE que contiene las proteínas E y prM, produciendo el virus envuelto. (iii) Salida del virus de la célula, a través de vesículas citoplasmáticas y (iv) rompimiento de la proteína prM, lo que tiene como resultado una reorganización de la superficie del virión y su maduración (ver Figura 4).

La formación de la nucleocápside se lleva a cabo con la proteína C, la cual presenta en su extremo carboxilo terminal regiones hidrofóbicas, las cuales sirven para anclarse a la membrana del RE rugoso. El extremo carboxilo es posteriormente removido durante la maduración del virión (Leary y col., 1980).

Los virus liberados no contienen o presentan poca proteína prM, lo cual implica que el procesamiento de la proteína ocurre antes o durante la salida del virus de la célula. Este rompimiento ocasiona una reorganización de la envoltura del virión, en lugar de presentar el heterodímero prM-E, ahora presenta la proteína E en forma de trímero. Los viriones inmaduros, los cuales contienen la proteína prM, son 60 veces menos infecciosos que los virus maduros (Randolph y col., 1990).

INMUNIDAD Y PROTECCIÓN

El primer foco de infección en vertebrados por flavivirus es la piel. De aquí se expande a los nódulos linfáticos regionales donde se desarrolla la viremia primaria. La progenie viral es vertida al torrente sanguíneo donde es transportado a diferentes órganos, de acuerdo al tropismo que presenta el virus por el tejido. Los sitios extraneurales primarios para la replicación de flavivirus son el tejido conectivo, esqueleto, músculo liso, tejido linfo-reticular, el miocardio y glándulas endócrinas y exócrinas (Figura 9).

El virus del dengue infecta principalmente a las células del sistema fagocítico-mononuclear (monocitos, macrófagos, histiocitos, células de Kuffer, etc.), el cual representa una población celular responsable de varios procesos biológicos, tales como: homeostasis, reacciones inmunes e inflamatorias, presentación de antígenos, secreción de citocinas y funciones efectoras mediadas por células. El tipo y grado de respuesta del macrófago infectado con el virus del dengue, varía de manera dependiente al estado de diferenciación del mismo, especie del tejido de origen y de la concentración local del agente activante o desactivante (Keller y col., 1995).

El macrófago infectado por el virus, es un blanco para la eliminación por el sistema inmune, probablemente mediado por linfocitos T citotóxicos (CTL)-dengue específicos, teniendo como resultado la liberación de varios mediadores que producen algunos de los síntomas de choque y hemorragia (Halstead, 1980a; Pang, 1983; Portefield, 1982). Se han reportado otros tipos de inmunidad celular en respuesta al dengue, tales como hipersensibilidad retardada mediada por células T (DTH), medida sobre el cojinete plantar de ratones infectados con DEN4 (Pang y col., 1982;1984) e inhibición de la migración de linfocitos (Nagarkatti y col., 1978); así mismo se ha observado que la actividad de células NK (asesinas naturales) está incrementada 2 a 3 días postinfección (Gately y col., 1988). En KUN, TBE, WNV y en el virus Langat se ha reportado que la lisis de células infectadas por células NK es inversamente proporcional a la concentración sobre la superficie celular de moléculas MHC clase I (Müllbacher y col., 1989; Trinchieri y col., 1978).

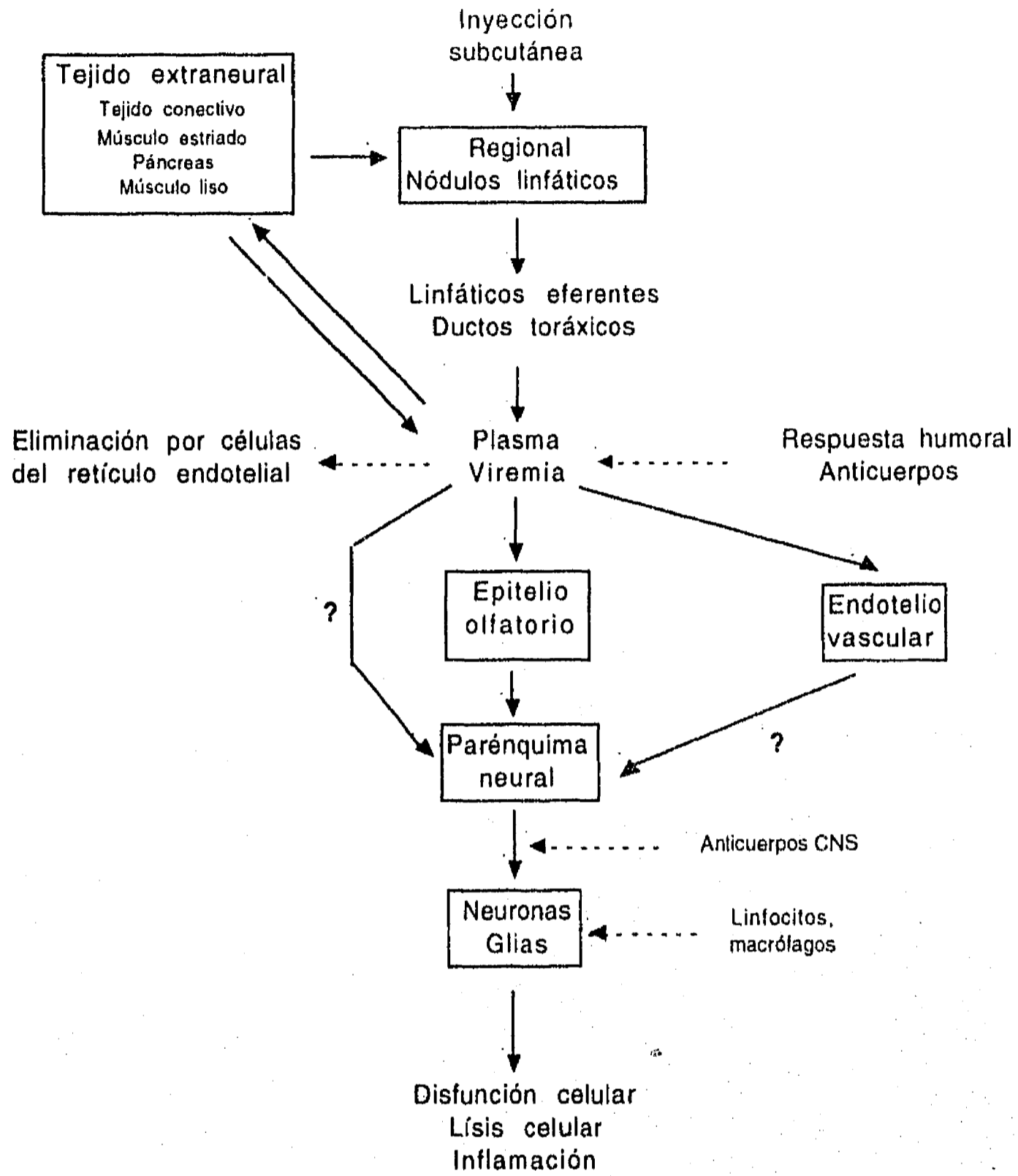


Figura 7. Esquema general del desarrollo secuencial de una infección con flavivirus . Los cuadros indican los sitios de replicación del virus, y las líneas punteadas los mecanismos de defensa inmune.

Macrófagos infectados con DEN2 presentan al antígeno (Ag) en el contexto de moléculas Ia+ o Ia- del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), a la célula B, ocasionando una expansión policlonal *in vitro* e *in vivo* (Rizvi y col., 1987). Así mismo, estas células inducen la generación de células T ayudadoras (TH) que producen una citocina ayudadora soluble (HF), sensible a pH alcalino y ácido, que actúa de una manera Ag específica y MHC restringida, el cual tiene un peso molecular de 65- 68 Kda, y está compuesta por 2 cadenas unidas con 2 enlaces disulfuro (cadena α - presenta al Ag, y cadena β - tiene los determinantes de MHC), que es diferente de las citocinas producidas por las células TH1 y TH2, y actúa aumentando la expansión clonal de células formadoras de anticuerpo (Ac) IgM específicas a dengue (Chaturverdi y col., 1987, 1992; Pahwa y col., 1988).

Las células T tienen un papel importante en el establecimiento del DHF tanto para la eliminación inmune de los monocitos infectados (Halstead, 1980), como en la elaboración de γ -interferón (células T CD4+), que favorece la infección mediada por Ac del virus, al aumentar el número de células que presentan el receptor Fc (Figura 10) (Konthy y col., 1988; Kuarane y col., 1989). Estudios con WNV, han demostrado que este induce un incremento tanto en la expresión de moléculas MHC I y II como de moléculas de adhesión ICAM-1, por un mecanismo independiente de γ -interferón y dependiente del ciclo celular (Argall y col., 1991; Bao y col., 1992; King y Kesson 1988; Liu y col., 1989), esto sugiere que la habilidad de regular directamente la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1, representa un evento importante en la patogenia viral al incrementar la adhesión célula-célula, y probablemente la transmisión célula-célula (Shen y col., 1995).

En individuos infectados con el virus del dengue se han detectado células T de memoria CD4+, CD8-, que reconocen principalmente epitopes en NS3 (Kurane y col., 1989) y células CD4-, CD8+, que reconocen epitopes localizados en las proteínas E y NS3 (Bukowski y col., 1989; Green y col., 1993; Grunewald y col., 1992). Esto implica que nonapéptidos, productos del rompimiento proteolítico del precursor poliproteínico, entran al RE en las células infectadas e interaccionan con moléculas HLA-I. Recientemente se ha reportado que un nonapéptido (TPEGIPTL) localizado en la posición 500-508

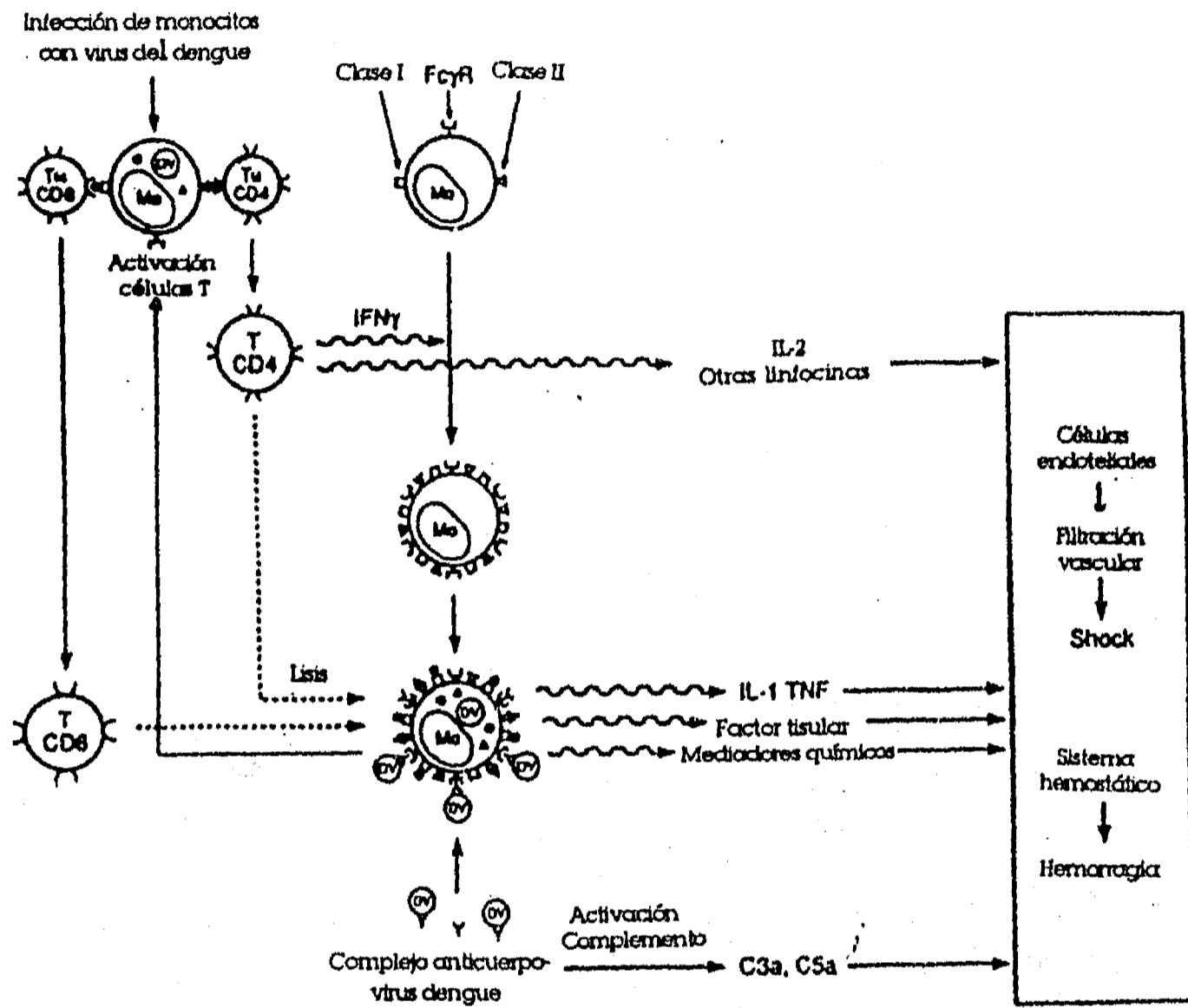


Figura 10. Mecanismo inmunopatológico que se observa en la patogenesis de una infección con DHF/DSS. Mo= macrófago, T_M= Célula T de memoria, DV= virus del dengue

de la proteína no estructural NS3 de DEN4 genera CTL's (CD8+) dengue específicas en el contexto HLA-B35 (Jaroslav y col., 1995). Un simple cambio de aminoácido en el nonapéptido induce proliferación de una serie de CTL's heterogénea que reconocen a todos los serotipos.

En pacientes con DHF se ha encontrado un aumento de proteínas de superficie solubles CD4, CD8, Il6 y receptor de Il2, así como concentraciones elevadas del factor de necrosis tumoral (TNF) que se correlacionan con las diferencias en la severidad de la enfermedad con respecto a pacientes con dengue clásico (Kurane y col., 1991; Halstead, 1994). En base a estos antecedentes Okamoto y col. en 1994, postularon que el aumento de la respuesta de células T inducida por una infección de virus del dengue causa una excesiva producción de citocinas, que resultan en el establecimiento ó aparición de DHF.

A la fecha se sabe que la permeabilidad vascular que genera el DHF/DSS es resultado del incremento de dos citocinas producidas durante la infección. Estas citocinas son el producto de los linfocitos T (Ly 1+,2,3-) y macrófagos, denominadas factor citotóxico (CF) y (CF2). CF tiene un peso molecular de 43 000 d, es una proteína que destruye selectivamente a células T ayudadoras (Th), macrófagos I-A y células que son capaces de liberar sustancias tipo histamina. Los análisis de secuencia de aminoácidos de CF con otras moléculas citotóxicas, revelaron que CF no presenta ninguna homología con otras citocinas tales como la linfoxina de ratón, el factor de necrosis tumoral o de serin-proteasas de células T. CF y CF2 destruyen al macrófago y a las células T ayudadoras mediante un mecanismo dependiente de Ca^{2+} , que tiene como consecuencia la liberación de histamina y la activación de los sistemas de coagulación y/o fibronólisis (Chaturverdi y col., 1980;1991; Khana y col., 1991).

Sin embargo, se ha reportado que, los macrófagos infectados con el virus del dengue liberan un inhibidor de Il-1 (Roberts y col., 1986; Schur y col., 1989; Chang y col., 1994). Observando que la secreción de Il-1 se aumenta en presencia de complejos inmunes y se inhibe con concentraciones altas de IgG libre agregada, posiblemente por un mecanismo vía competencia tipo 1 por el receptor Fc (Kaufmann y col., 1989), lo que afecta la capacidad del virus del dengue a infectar monocitos. Por otra parte, Il-1 estimula tanto la

producción de prostaglandina E_2 e I_2 como un factor activador de plaquetas, que son potentes vasodilatadores, importantes en la regulación de eventos celulares y bioquímicos que ocasionan la formación del coágulo, y la infiltración celular (Dinarello, 1988). Por lo tanto, se ha postulado que la presencia del inhibidor puede tener un papel importante en la patogénesis del DHF/DSS (Chang y col., 1994).

Por otro lado, se ha demostrado que en el estado agudo del DHF/DSS, disminuye significativamente la cantidad de proactivador C3 y de los componentes del complemento C1q, C3, C4, C5-8 (WHO, 1985a, 1985b). Esto indica que hay una activación de la vía clásica del complemento y probablemente la vía alterna. Esta activación tiene como resultado la formación de C3a y C5a, que son potentes anafilotoxinas que incrementan la permeabilidad vascular. Suvatte y colaboradores en 1988 demostró que en pacientes con DHF/DSS hay un incremento de estos compuestos en el momento del choque en pacientes con dengue (Suvatte y col., 1988).

La infección con flavivirus estimula preferencialmente la formación de anticuerpos del tipo IgG2a dirigidos contra la proteína de envoltura del virión y cambia dramáticamente la relación de IgG1/IgG2a (Coutelier y col., 1987). IgG2a fija complemento eficientemente y activa la respuesta inmune celular. La proteína NS1 se encuentra intracelularmente, asociada a membrana o extracelularmente (Fan y col., 1990; Winkler y col., 1989). En una infección con flavivirus se encuentran anticuerpos dirigidos contra la proteína NS1, que presentan actividad de fijación de complemento. Cuando NS1 es secretada actúa como un antígeno soluble de fijación de complemento. La inmunización pasiva con anticuerpos dirigidos contra NS1 o la inmunización directa con la proteína NS1 purificada, proporciona protección a ratones cuando se infectan con dosis letales del virus (Gould y col., 1986; Schlesinger y col., 1987).

VARIABILIDAD GENÉTICA.

La variabilidad genética entre virus de RNA ha sido determinada mediante diferentes métodos, entre los que se incluyen: determinación de la

movilidad electroforética de las moléculas genómicas (Palese y Schulman, 1976), desnaturalización parcial de heteroduplex RNA-RNA o RNA-DNA (Smith y col., 1986), análisis de huella RNasa T₁ oligonucleotido (Trent y col., 1983), digestión de cDNA con enzimas de restricción (Walker y col., 1988), digestión de desparamientos en heteroduplex RNA-RNA con RNasa A (Lopez-Galindez y col., 1988) y secuenciación nucleotídica de RNA o cDNA.

Trent y colaboradores en 1983, llevaron a cabo análisis de huella de los oligonucleótidos generados con RNasa T₁ y de los patrones de restricción enzimática entre virus del dengue antigénicamente diferentes, obteniendo que estos presentan patrones específicos y únicos aún en aquellos virus que son serológicamente iguales, presentando una identidad del 50 al 80%. Esto ha servido para clasificar aislados del virus del dengue de diferentes partes del mundo en topotipos. La comparación de los virus del mismo topotipo permite conocer el grado de similitud entre su RNA genómico.

Entender el grado de heterogeneidad genómica y fenotípica entre los virus es de gran importancia para entender la epidemiología de la enfermedad, el origen de las cepas virales, las características antigénicas de las poblaciones virales específicas y diferenciar entre cepas vacunales y parentales.

Las mutaciones a nivel genético en virus RNA ocurren con una frecuencia muy elevada (Holland y col., 1982; Steinhaurer y Holland, 1986), debido a que el grado de error de las RNA polimerasas virales (incluyendo la transcriptasa reversa de retrovirus) son del orden de 10⁻⁴ bases por ciclo de replicación (Dougherty y col., 1988). Para estas RNA polimerasas no existe un mecanismo de corrección, como el que presentan las DNA polimerasas de procariotes y eucariotes. Por tal motivo, se propone que un genoma de 10 Kb de un virus RNA debiera ser único y por lo tanto, debiera existir como una mezcla de poblaciones con genomas cercanamente relacionados, denominados quasiespecies. Una quasiespecie está sujeta a presiones selectivas, el sistema inmune del huésped, terapias antivirales, etc. Así mismo, podrían producir un modelo de enfermedad caracterizado por ser de períodos muy largos o producir infecciones crónicas, sin ser eliminadas por el huésped. Por estas razones se ha incrementado el interés de los investigadores

sobre el estudio de las quasiespecies como un punto crítico para entender la patogénesis causada por virus de RNA.

El genoma de poliovirus tiene un grado de variación de cerca de 2 bases sustituidas por semana durante una epidemia, por esta razón los análisis de huella solo sirven para relacionar aislados separados de la infección ancestral por no más de 3-5 años (Nottay y col., 1981).

La relación existente entre la heterogenidad genómica y su influencia en la virulencia ha sido muy documentada en diferentes tipos de virus. En el caso de rotavirus (cepa de rotavirus porcino, familia *Reoviridae*), existen dos variantes, que fueron aisladas en placa por dilución limitante sobre una monocapa de células de riñón de mono MA104. Estas han sido adaptadas a cultivo, y difieren en sus propiedades de crecimiento. La variante 4S crece más rápido y produce placas líticas grandes, después de 4 o 5 días postinfección, mientras la variante 4F produce solamente placas líticas pequeñas en 10 - 12 días. Por otro lado, ambas presentan diferencias significativas en patogenicidad cuando son inoculadas en cochinillos silvestres, estas presentan el mismo título viral, pero la variante 4F llega a ser más patogénica después de 4 a 5 pases mientras que la variante 4S no es patogénica (Burke y col., 1994). Estas también difieren en sus regiones de corte con tripsina, 4F tiene el sitio de corte similar a la cepa parental y presenta las 19 prolinas altamente conservadas en el gen VP4 de rotavirus, mientras que la variante 4S tiene una región de corte poco común y solo contiene 17 prolinas. Estos aislados mostraron un 67.2 % de identidad a nivel de nucleótidos y un 70.6% de identidad a nivel de aminoácidos.

En el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), un rhabdovirus, se ha observado una correlación entre los cambios en el tropismo a tejido con cambios específicos en el genoma del virus de cuatro variantes resistentes a neutralización seleccionadas con anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína G (RB-2, RB-3, RB-4 y RB1). Las tres primeras mostraron ligera atenuación infectando hígado y tejido hematopoyético en peces. La secuencia del gen G de estas variantes no mostraron cambios significativos con respecto al gen parental; sin embargo con la variante RB-1, G que presenta dos cambios en los aminoácidos 78 y 218, se alteró dramáticamente su estructura secundaria, perdiendo

completamente su capacidad patogénica. Por lo que se propone que estos cambios sean responsables del tropismo alterado en estos virus (Kim y col., 1994).

En el caso del virus Semliki Forest, existen dos variantes: una cepa virulenta (SFV 4) y una no virulenta (SFV A7) al remplazar el gen que codifica para la glicoproteína E2 de la variante SFV4 con el gen E2 de la cepa no virulenta, SFV4 modificada presenta un comportamiento similar a la cepa SFV A7 cuando es inoculada i.p. en ratón. En cambio la cepa SFV4 original produce una letalidad en ratón del 80%. Al llevar a cabo la secuencia de este gen se observó una diferencia de 34 nucleótidos, presentándose un cambio a nivel de secuencia de aminoácidos en la posición 162 de una Lys por un Glu; esta sustitución convierte a SFV4 en una cepa atenuada (Santagati y col., 1995).

Otros ejemplos en donde se manifiesta la importancia del cambio de un aminoácido en la virulencia son: El virus de la coriomeningitis linfocítica donde el cambio de Gly por Gln en la posición 1079 en la polimerasa afecta el tropismo a macrófago y su persistencia viral (Matloubian y col., 1993). El virus del mosaico del tabaco, virus de la anemia infecciosa equina, virus del sarampión, virus de Theiler, y variantes de la vacuna de poliovirus, donde la sustitución de un aminoácido en las proteínas de envoltura confiere diferentes fenotipos con neurovirulencia atenuada o incrementada, resistencia a drogas, y/o cambios en el tropismo celular.

El virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV) ha sido de los más estudiados en la variabilidad genética y su relación con la virulencia. Shioda y colaboradores analizaron la tercera región hipervariable (V3) de la glicoproteína de envoltura gp120 de quasiespecies del virus HIV aisladas de un individuo infectado (Shioda y col., 1994), encontrando que aquellas especies que presentaban una sustitución de un aminoácido básico (Lys por Asp) en la posición 323 de gp120, (una de las 4 posiciones claves que determina el tropismo celular), ocasionaba que la población fuera distinta en un corto periodo de tiempo, ya que le confería la capacidad de replicarse en todas las líneas de células T humanas. El cambio de un aminoácido ácido en la misma posición, permitía que el virus creciera más rápido, pero este no crecía en todas las líneas de células T. Por otro lado, una sustitución polar en

el aminoácido 2 de la glicoproteína gp41 de HIV, que es una proteína que media la fusión a membrana, interfería con la formación de sincicio y con la capacidad de infección del virus de una manera dominante (Freed y col., 1992; Grimailla y col., 1992).

Como se mencionó anteriormente en flavivirus se han utilizado tanto ensayos de huella de RNA como del polimorfismo de restricción enzimática, como herramienta para estudiar la divergencia genética de: aislados independientes de un área geográfica específica; de aislados obtenidos a tiempos distintos y en algunos casos aislados con diferente grado de virulencia. Estudios llevados a cabo con aislados del virus de la encefalitis de San Luis (SLE), obtenidos durante 30 años de las orillas del río Mississippi, indicaron que los flavivirus no sufren cambios genéticos rápidos (Trent y col., 1981). Más adelante los análisis de huella del virus JEV (Hori y col., 1986b) y del virus de la encefalitis del Valle de Murray (Coelen y McKenzie, 1988) permitieron concluir que el genoma de los flavivirus cambia muy poco cuando es transmitido tanto en mosquitos como en su huésped natural o en cultivos celulares (Hori y col., 1986a,b).

En el caso del virus del dengue, se ha visto que DEN4 presenta un solo genotipo alrededor del mundo. La variación de secuencia en la proteína E de virus DEN4 es de 4.9% , este porcentaje es más bajo que con los otros serotipos del virus del dengue. Con respecto a esta proteína (E) la máxima divergencia se encontró en DEN3 (12.3%) (Chungue y col., 1993), en DEN2 fue del 20 % (Deubel y col., 1993) y del 6.9 % para DEN1. Sin embargo, las cepas del Pacífico del Sur y de América que presentan un 99 a 100 % de identidad, mostraron una relación más cercana entre el mismo genotipo que entre las cepas de Asia y Africa (4.9% de divergencia). Esta divergencia probablemente refleja diferentes propiedades biológicas entre los virus; por ejemplo: DEN2 Y DEN3 presentan diferentes niveles de replicación con respecto a DEN4 (el cual es muy bajo) y a esto se ha asociado a que se aislen con más frecuencia en infecciones (Chunge y col., 1995). Estas observaciones sugieren que la frecuencia de mutación en el virus del dengue esté relacionado con el nivel de replicación viral en mosquito y en el humano (Scott y col. 1994). El promedio de mutaciones al azar del gen E es de 0.1 al 0.2 % por año. Sin embargo estudios del gen E de cepas de DEN1 y DEN4

distantes mostraron una estabilidad marcada. Cepas del virus del dengue del mismo serotipo varían en su secuencia de aminoácidos del 1.4% (DEN4) al 10% (DEN2) (Deubel y col., 1993).

En flavivirus se ha observado la existencia de cepas específicas que presentan diferencias marcadas en su capacidad neurovirulenta y/o neuroinvasiva. Se han obtenido cepas atenuadas a través de pases sucesivos en cultivo celulares y de esta manera se aislaron la cepa vacunal 17D de fiebre amarilla (Theiler y col., 1937); la SA-14 para encefalitis japonesa (Yu y col., 1988; Nitayaphan y col., 1990) y diferentes cepas atenuadas para los distintos serotipos del dengue (Yoksan y col., 1986). Estudios de las cepas parentales con las vacunales han revelado algunas de las bases moleculares de la virulencia en flavivirus, pero la mayoría de las mutaciones encontradas, están localizadas a lo largo de todo el genoma viral.

En el virus de la encefalitis japonesa, la cepa P3 es altamente virulenta y neuroinvasiva, mientras que las cepas SA14/U.S.A. y S892 son solamente neurovirulentas. La cepa P3 a diferencia de la cepa S892, se multiplica rápidamente y alcanzando una infectividad mayor cuando son inoculadas intraperitonealmente en ratones. Cuando la cepa SA14/USA es inoculada en ratones por la misma vía, estos no mueren. Sin embargo la similitud genómica entre las cepas P3, S892 y SA14/USA es del 97.8% a nivel de nucleótidos y del 99% a nivel de aminoácidos. Las cepas P3 presenta 33 aminoácidos diferentes con respecto a S892 y 21 aminoácidos cuando es comparada con la cepa SA14/USA, 9 de estos aminoácidos están en la proteína E de varias cepas de JE, y aunque no se han identificado como determinantes moleculares de la virulencia, se sugiere que estos cambios estén directamente relacionados con la misma (Ni y Barret, 1996).

Con el virus DEN1, la cepa desarrollada en Thailandia por Bhamarapavati y col. difiere de la parental (#16007) en 39 nucleótidos y 18 aminoácidos (Barret y col. 1990; Dunster y col., 1990). En DEN-2 la diferencia entre una cepa atenuada y la parental es de 53 nucleotidos (Block y col. 1992). En fiebre amarilla la diferencia entre las cepas vacunales 17D-204, 17DD y la 17D-213 comparada con la cepa Asibi (parental) es de 50 nucleótidos y 13 aminoácidos. Estos cambios se encuentran distribuidos a lo largo del genoma viral y 5 de ellos caen en el gen que codifica para la

proteína E (aminoácido 52, 173, 200, 305 y 380) los cuales se sabe que están implicados en atenuación. Dos de las mutaciones (aminoácido 52 y 200) están presentes en la secuencia de fusión del dominio II, dos cambios (posición 305 y 380) caen en el dominio III, y el otro cambio (aminoácido 173) en el dominio I esta proteína. Las mutaciones en la posición 173 y 380 se presentan cerca de un epitope de neutralización y de virulencia mapeado en mutantes de escape del virus de TBE.

Rey y colaboradores, localizaron todas las mutaciones que afectan el enlace de anticuerpos monoclonales neutralizantes a epítopes específicos sobre la glicoproteína de envoltura del virus TBE (Figura 11a), algunos de estos son epítopes individuales que solo son reconocidos cuando la proteína sufre un cambio conformacional a pH ácido, o cuando está presente la proteína prM en los viriones inmaduros. Al mismo tiempo, identificaron sobre el dímero de la proteína de envoltura del virus de TBE todas aquellas mutaciones que afectan la virulencia en flavivirus que han sido reportadas en la literatura (Figura 11b).

Ellos observaron que las mutaciones se presentan en tres regiones sobre la estructura tridimensional de la proteína: 1) la cara distal del dominio III; 2) la base del dominio II; y 3) en la región de contacto que se encuentra entre la interfase del dominio I/dominio III y el asa cd de la subunidad opuesta. Los cambios que ocurren en las dos últimas regiones están relacionadas con la virulencia porque afectan la transición del cambio conformacional que se lleva a cabo a pH bajo. En contraste, las sustituciones sobre la cara distal del dominio III, cerca del asa FG, afectan principalmente la capacidad de unión a la célula. El asa FG contiene la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es un motivo que es reconocido por integrinas tales como el receptor de fibronectina tipo III. Las mutaciones que afectan la virulencia y/o el tropismo celular caen dentro de esta región (Rey y col., 1995).

Datos obtenidos con mutantes de escape a anticuerpos monoclonales (Cecilia y col., 1991; Holzmann y col., 1990; Jiang y col., 1993; Lobigs y col., 1987), con mutantes que son capaces de infectar diferentes huéspedes (Lobigs y col., 1990) revertantes en virulencia (Jennings y col., 1993) y con clonas de cDNA infeccioso de DEN4 y JE generadas por ingeniería genética (Sumiyoshi y col., 1992), demostraron que la proteína E tiene un papel muy

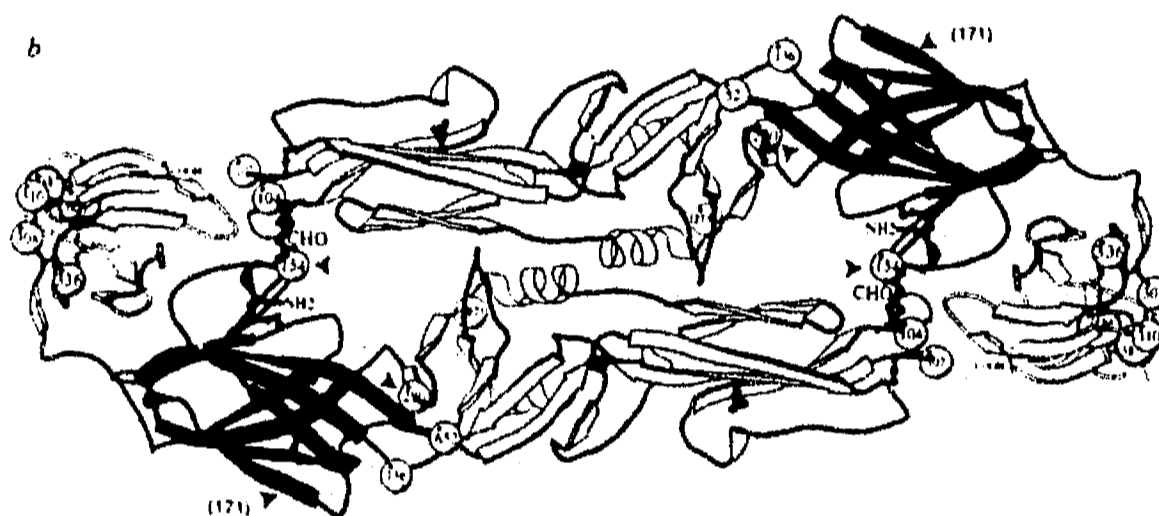
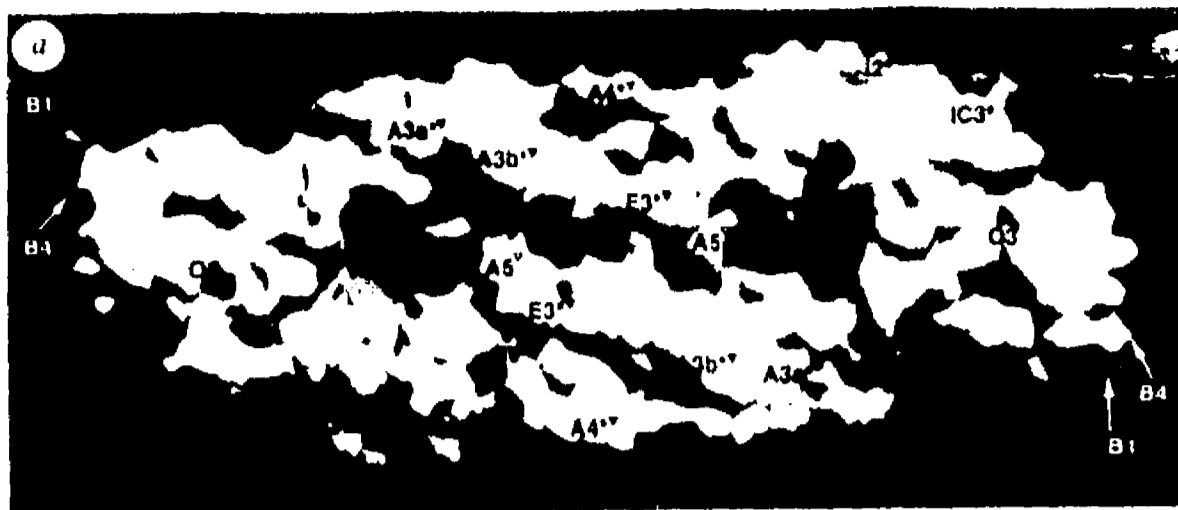


Figura 11. a). Localización de las mutaciones que afectan el enlace de anticuerpos monoclonales neutralizantes a epitopes de la proteína E de TBE. (▼) representan los sitios enmascarados ó (▽) expuestos por pM. (★) Marca los sitios donde el enlace del anticuerpo monoclonal disminuye cuando la proteína es expuesta a pH bajos.

b). Localización de las mutaciones que afectan la virulencia de varios flavivirus. Estas mutaciones se localizan en 3 regiones sobre la estructura tridimensional de la proteína. Las mutaciones de las posiciones 52 (Hasegawa y col., 1992), 136, 271 y 336 (Cecilia y col., 1991) son el virus de encefalitis Japonesa; en el virus de la encefalitis del Valle de Murray, el cambio en las posiciones 280 y 387 (Lobings y col., 1990); sustituciones en la posiciones 104 y 107 de un virus quimérico de TBE/ dengue 4 (Pletnev y col., 1993); en el aminoácido 171 (Mandl y col., 1988) y 384 (Holzmann y col., 1990) del virus de TBE y en el sitio de glicosilación (154) del virus quimérico de TBE/ dengue 4 (Pletnev y col., 1993).

importante en la determinación de la virulencia en flavivirus. La sustitución de un aminoácido en la proteína E puede ocasionar un cambio dramático en la virulencia de la cepa; tal es el caso del virus quimérico de DEN4, al cual se sustituyó el gen E por el de TBE, resultando un virus con el fenotipo de neurovirulencia de TBE (Pletnev y col., 1993).

En el caso del virus causante de encefalitis Japonesa, mutaciones en las posiciones 52 (Hasegawa y col., 1992), 136, 271 y 336 (Cecilia y col., 1991); en el virus de la encefalitis del Valle de Murray, el cambio en las posiciones 280 y 387 (Lobings y col., 1990); sustituciones en las posiciones 104 y 107 de un virus quimérico de TBE/ dengue 4 (Pletnev y col., 1993); en el aminoácido 171 (Mandl y col., 1988) y 384 (Holzmann y col., 1990) del virus de TBE y en el sitio de glicosilación (154) del virus quimérico de TBE/ dengue 4 (Pletnev y col., 1993) en la proteína E del virus afectan la virulencia de las cepas. Además se ha demostrado que mutaciones en la proteína NS1 que afectan la neurovirulencia. Sin embargo, los mecanismos responsables de un fenotipo atenuado o virulento se desconocen.

Recientemente Schlesinger y col. compararon la capacidad de replicación en el sistema nervioso central de la cepa Potterfield PYF neuroadaptada con una cepa no-neuroadaptada YF5.2iv de fiebre amarilla. La diferencia entre estas dos cepas fue la distribución del virus a través de la neuraxis, encontrando que la cepa YF5.2iv necesita más tiempo para replicarse en SCF y glándulas adrenales, mientras que la cepa PYF se replica más rápidamente, obteniéndose de 1000 a 10000 títulos más altos que con YF5.2iv, sugiriendo que existen factores virus-específicos importantes en la patogénesis de una encefalitis fatal en el ratón (Schlesinger y col., 1996). Después de llevar a cabo la secuenciación de clonas cDNA de la región que codifica para E/NS1 de la cepa PYF, encontraron que había cambios de aminoácidos en la proteína E con respecto a la secuencia de la cepa YF5.2iv (R52 → G, I173 → T, F305 → V, R380 → T y I462 → M). Posteriormente, estos investigadores generaron virus recombinantes intertípicos PYF/YF5.2iv (YF5.2iv con las mutaciones observadas en el gen E de PYF) con el fin de conocer la importancia de estos cambios en la neurovirulencia. Encontraron que los cambios en la posición 380 y 462 eran los únicos que estaban involucrados en la neurovirulencia. Además estos cambios los presentaron las cepas

parentales Asibi, vicerotrópica French y neurotrópica de fiebre amarilla cuando compararon las secuencias. El hecho de que estas sustituciones sean comunes en las cepas virulentas de fiebre amarilla sugiere que estos residuos pueden ser los responsables de conferir a la proteína E propiedades funcionalmente importantes en la patogénesis (Schlesinger y col., 1996).

Con el fin de desarrollar una vacuna tetravalente para el virus del dengue (el cual presenta 4 serotipos), Chen y colaboradores, han construido virus quiméricos intertípicos DEN1/DEN4, DEN2/DEN4 y DEN3/DEN4 los cuales contienen los genes C-preM-E o solamente PreM-E de DEN1 o DEN2 o DEN3 y los demás genes de DEN4, observando que estos virus quiméricos presentan una disminución en su eficiencia de replicación comparada con los aislados parentales de DEN1, DEN2 o DEN3. Estos mismos autores producen dos sustituciones en DEN3, Thr⁴³⁵ → Leu y Glu⁴⁰⁶ → Lys, los cuales confieren capacidad neurovirulenta en ratón a DEN4 y DEN2. La sustitución de Thr⁴³⁵ → Leu, abate el sitio potencial de glicosilación, generando una proteína E idéntica en tamaño a la proteína E del virus parental de DEN3, indicando que este sitio, normalmente no se utiliza. La mutante quimérica con la sustitución de Glu⁴⁰⁶ → Lys, fue inoculada intracerebralmente en ratones, resultando neurovirulenta, a diferencia de la parental y de los virus quiméricos que no presentan este cambio, los cuales no fueron neurovirulentos (Chen y col. 1995).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Uno de los principios básicos en el estudio de la patogénesis de las infecciones virales, es el análisis de las características tanto del virus como del hospedero, los cuales son factores importantes que contribuyen al establecimiento y severidad de la infección. Rosen (1977) propuso que el DHF/DSS es causado por variantes del virus del dengue con un potencial patogénico aumentado y esta variación influye en el grado de virulencia de las cepas virales en su hospedero. Por otro lado, también se ha demostrado (Schlesinger, R.W., 1980) que los aislados del virus del dengue que provienen de casos humanos contienen una mezcla de poblaciones que tienen diferentes propiedades en virulencia. Estas poblaciones son una mezcla de variantes que producen en un ensayo de placa lítica, placas de diferente tamaño. Las variantes que producen placa lítica pequeña están relacionadas con una virulencia atenuada, y son sensibles a temperatura (Eckels y col., 1976; Harrison y col., 1977).

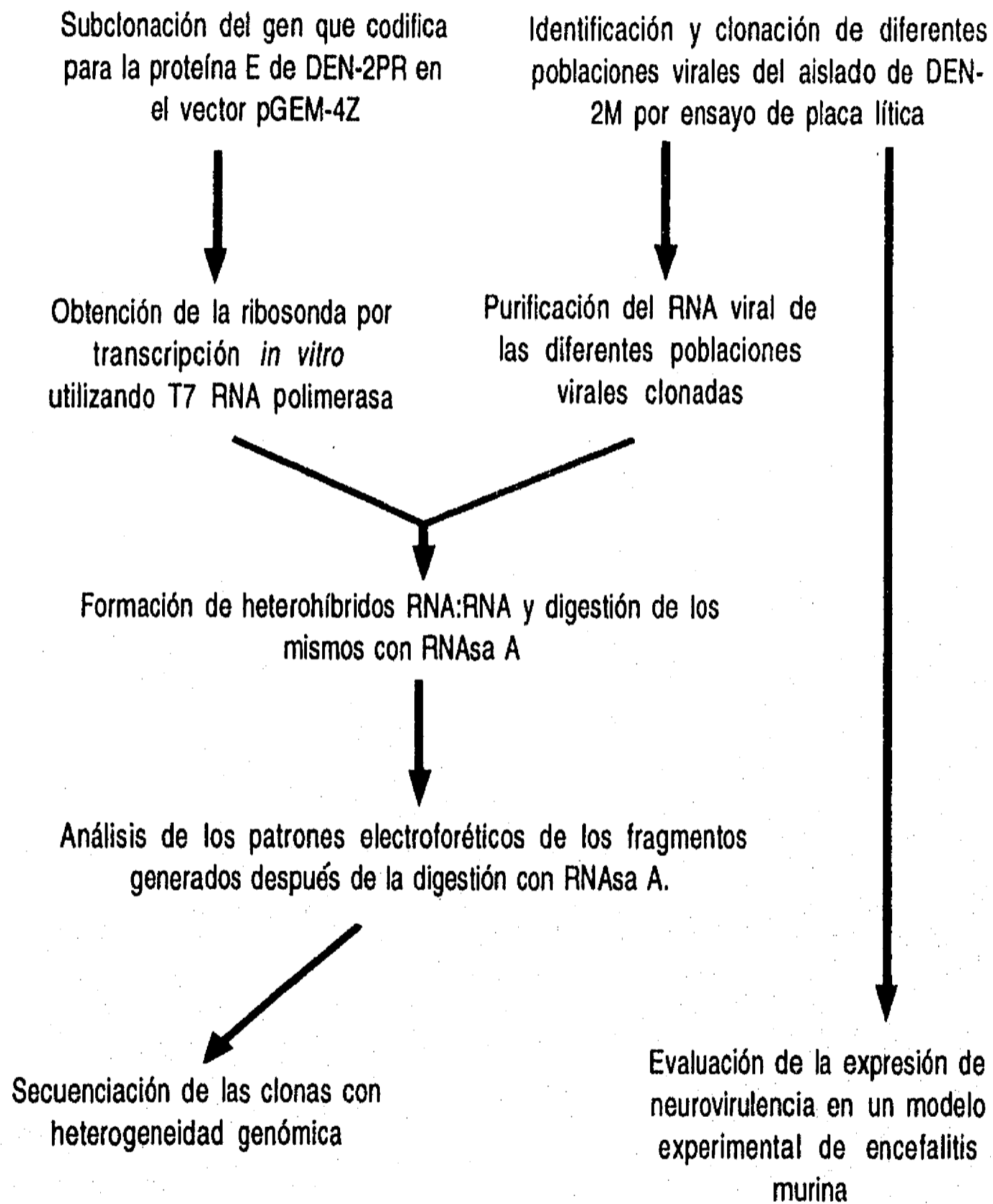
En el laboratorio, hemos observado que dentro de un mismo aislado viral existe una heterogeneidad grande en la población en un ensayo de placa lítica. Se ha reportado que el tamaño de la placa lítica está directamente relacionada con la virulencia, asociando la formación de una placa chica a un fenotipo atenuado. Sin embargo, no se sabe si el polimorfismo fenotípico existente en una población heterogénea está relacionado con cambios a nivel genómico y si la heterogeneidad genómica tenga influencia directa en la expresión de la virulencia en las cepas.

OBJETIVOS

Analizar las bases genómicas del polimorfismo existente en diferentes poblaciones de un mismo aislado viral (dengue 2) y su relación con la expresión de neurovirulencia en un modelo de encefalitis murina.

- Identificación y clonación de diferentes poblaciones virales en un aislado de dengue 2 mexicano por ensayo de placa lítica.
- Purificación de RNA viral de cada una de las poblaciones identificadas.
- Clonación del cDNA que codifica para la glicoproteína gp60 del virus del dengue, en el vector pGEM4 que contiene los promotores para SP6 y T7 RNA polimerasa para la obtención de una ribosonda específica marcada uniformemente por transcripción in vitro.
- Formación de heterohíbridos RNA:RNA utilizando una ribosonda específica para gp60 y el RNA de cada población viral.
- Análisis de los patrones electroforéticos (UREA-PAGE) de los fragmentos obtenidos por digestión con RNasa A de los heterohíbridos RNA:RNA.
- Identificación de las regiones variables en cada una de las clonas aisladas y amplificación de estas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos que flanquean estas regiones.
- Secuenciación directa de las regiones variables a partir de los productos de amplificación de cada clona.
- Evaluación de la neurovirulencia en cada una de las clonas, utilizando un modelo de encefalitis murina.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIALES Y METODOS

Células y virus.

El aislado de dengue mexicano (200787/1983) serotipo 2 (D-2M) y el aislado de Puerto Rico DEN-2PR159 S1 (cepa vacunal) se obtuvieron a partir de mosquitos infectados (donados generosamente por el Dr. Gubler de los Laboratorios San Juan, CDC de San Juan de Puerto Rico). La cepa viral 200787 inicialmente se aisló de un caso de dengue clásico durante una epidemia en el estado de Guerrero, México, en 1983. Posteriormente se propagó en la línea celular TRA-284, la cual proviene de la larva del mosquito *Toxorhynchitesamboinensis*. Los virus se identificaron por medio de inmunofluorescencia directa (Henchal, 1983), y posteriormente se ratificó el serotipo mediante inmunofluorescencia indirecta con ayuda de anticuerpos monoclonales (Mabs) específicos para cada serotipo. El aislado de Indonesia corresponde a una mezcla de sueros humanos obtenidos de un brote de dengue hemorrágico en 1986 en Indonesia, fue obtenido de los laboratorios CDC de San Juan de Puerto Rico al igual que la cepa de dengue 2 Nueva Guinea C. Los virus se amplificaron en células LLC-MK2, las cuales se mantuvieron en medio DME-M complementado con 2.5 % de suero fetal bovino (SFB) a 37° C y 5% CO₂.

Aislamiento, clonación y titulación de las poblaciones virales.

La titulación y clonación de las diferentes poblaciones virales, se llevó a cabo mediante el ensayo de placa lítica de acuerdo a la técnica descrita por Dulbecco en 1952. Para llevar a cabo este ensayo se utilizaron 5×10^5 células LLC-MK2 formando una monocapa, las cuales se infectaron con una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0.1 a partir del stock de D-2M (4×10^8 p.f.u./ml). A los 8 días postinfección las monocapas se tiñeron con 1.5 ml de una solución al 0.1% de rojo neutro en solución balanceada de Hank's (Choppin, 1986). De las placas líticas formadas se escogieron al azar placas

de diferentes tamaños (4 pequeñas, 4 medianas y 3 grandes). Cada una de las clonas fueron subclonadas y consecutivamente seleccionadas hasta que se obtuvieron poblaciones homogéneas (5 veces). Una vez purificadas, estas se amplificaron mediante pases sucesivos en células LLC-MK2 obteniendo de esta manera los stock para cada clona.

Purificación del RNA viral.

A partir de células MK2 previamente infectadas con 0.1 m.o.i del virus D-2M o con cada una de las clonas se llevó a cabo la purificación del RNA. Las células se cosecharon al octavo día postinfección, y se lavaron 2 veces con PBS (NaPO₃ 10 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.4). A continuación, se les agregó una solución de tiocianato de guanidina (tiocianato de guanidina 47 %, sarcosyl 0.5 %, β-mercaptoetanol 0.1M). Al lisado celular obtenido se le añadió 1 gr de CsCl/2 ml y se colocó sobre 1.5 ml de una solución de CsCl 5.7 M, 0.1M EDTA. Las muestras anteriores se centrifugaron durante 3:30 horas a 85 000 r.p.m.; posteriormente, el precipitado obtenido se resuspendió en 200 µl de agua grado milicu estéril. Finalmente el RNA viral se extrajo con cloroformo: butanol 4:1 (2X) y se precipitó con 1/10 de acetato de sodio 3M, pH 5 y 2 volúmenes de etanol, guardándose a -70° hasta su uso (Schlesinger, 1977). Para determinar la especificidad del mismo se llevó a cabo un análisis de Northern blotting utilizando una sonda que reconoce al gen que codifica para la proteína E del virus del dengue (Maniatis y col., 1989).

Síntesis de DNA complementario (cDNA) del gen que codifica para la proteína E viral.

La síntesis de la primera cadena del cDNA del gen que codifica para la proteína E de cada una de las clonas, se llevó a cabo a partir del RNA viral, con la ayuda del iniciador TM3 (Tabla III) siguiendo el método RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) (Saiki y col., 1988). Brevemente: 5 µg del RNA viral con 10 µM del primer fueron desnaturalizados a 94° C

Primer	Nucleótido	Secuencia (5' → 3')	Enzima de restricción (subrayado)
TM3	2421-2402	atccgc <u>GGTACCTAGG</u> CCAGCACCATAACTCCCA <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100px; margin: 0 auto;"> A T G </div> <div style="display: flex; justify-content: center; margin-top: -10px;"> T </div>	Kpn I
TM4	920-939	actcta <u>AGATCTCGCTCCTTCAATGACAATG</u>	Bgl II
P14	2051-2076	TCGGAGACAGCTACATCATATAGG	
P15	2230-2250	ACCTGGTGGAGAGAGCCTTCC	

durante 5 min. e inmediatamente después se colocaron a 4° C/ 10 min. Posteriormente, se agregó 1 µl de 10 mM dNTP's, 4 µl de buffer de reacción 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl y 15 mM MgCl₂), 2 µl de 0.1M DTT y 1 µl de la enzima transcriptasa reversa de moloney murine leukemia virus (200 U/µl) y se dejó la mezcla de reacción incubar a 37° C por 1.5 hrs. Al término de este tiempo, se añadió el iniciador TM4 (Tabla III) para llevar a cabo la síntesis de la segunda cadena del cDNA por medio de PCR (Saiki y col., 1988). El programa de PCR comprendió un paso inicial denominado "Hot Start" a 65° C durante 10 minutos, seguido por un calentamiento a 94° C durante 2 minutos. A continuación, las muestras se sometieron a 45° C por 30 s, 72° C durante 90 s y 94 ° C por 30 s, 35 veces, y por último, estas se sometieron a 72° C por 7 min. Cada 100 µl de reacción contenía: 0.2 mM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 µl de buffer de reacción 10X (15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.7), 20 µl de la reacción de síntesis de la primera cadena de cDNA, 200 µM del par del iniciadores (TM3 y TM4) y 1 unidad de *Taq* polimerasa (Perkin Elmer).

Síntesis de la ribosonda específica del gen E

La síntesis de la ribosonda específica del gen que codifica para la proteína E, se llevó a cabo utilizando el cDNA de la cepa de Den-2 PR-159, el cual fue sintetizado siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Este cDNA se clonó en el plásmido pGEM/4 en el sitio *Sma* I y con ayuda de T7 RNA polimerasa y α -³²P-ATP, finalmente se obtuvo una ribosonda uniformemente marcada. La síntesis se llevó a cabo en 20 µl de reacción a 37° C durante 60 minutos, con 0.1- 0.5 µg del plásmido recombinante linearizado (digerido con la enzima de restricción *Pvu* II), 4 µl de buffer de transcripción 5X, 2µl de 100 mM DTT, 1µl de RNasin (25 U/ µl), 2 µl de una solución de NTP's (250 µM de CTP, GTP y UTP y 50 µM ATP), 80 µCi de [α -³²P] ATP (400- 800 Ci/mmol) y 10 - 15 U de T7 RNA polimerasa. Posteriormente, el DNA templado se digirió con 10 unidades de DNasa libre de RNasa durante 15 minutos a 37° C y finalmente, el RNA marcado fue extraído con fenol y

purificado a través de una columna de Sephadex G-50 previamente saturada con 10 µg de tRNA (Cristina y col., 1990).

Hibridización y digestión con RNasa A (mismatch).

La ribosonda obtenida en el ensayo anterior (20 000 a 200 000 c.p.m.), se hibridó durante 2 hrs a 45°C con 10 - 30 µg de RNA viral, extraído a partir de células infectadas. Inicialmente, RNA viral y la ribosonda fueron coprecipitados con una décima de volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 3 volúmenes de etanol durante 30 minutos a 80° C. Una vez coprecipitados se resuspendieron en 3 µl de agua, se le añadieron 30 µl de buffer BHR (40 mM PIPES pH 6.4, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA y 80 % formamida desionizada) y se incubó a 90° C / 5 minutos, seguido de un período de incubación de 2 horas a 45° C. Una vez llevada a cabo la hibridización se añadió a la mezcla de reacción RNasa A a una concentración final de 60 µg/ml y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Los productos de digestión fueron desproteinizados con fenol, precipitados con etanol, y separados a través de un gel UREA-PAGE al 4 y 6.8 % (40 cm de longitud) visualizándose mediante autoradiografía.

Secuenciación del gene E de las diferentes clonas.

La secuenciación del gene que codifica para la proteína E de cada clona se llevó a cabo por 3 diferentes métodos: 1) siguiendo el método de la cadena terminal con dideoxinucleótidos utilizando [³⁵S]dATP (ICN) (Sanger y col., 1982), así como con el kit de Sequenase (USB). A partir del RNA viral, se amplificó el gene E utilizando el ensayo de RT-PCR descrito anteriormente. El producto amplificado (1487 pb) se clonó en el vector M13mp18 y M13mp19, y una vez clonado, se purificó el DNA de cadena sencilla para posteriormente, llevar a cabo la secuenciación. 2) Por secuenciación directa del gene E amplificado por PCR de acuerdo al método de Nichols y Raben (1994) con ayuda del kit AmpliTaq^R Cycle Sequencing (Perkin Elmer) y 3) Finalmente, se llevó a cabo la secuenciación directa del producto de amplificación de la región que comprende del nucleótido 2051 al 2250. Es en esta región donde

se encontraron diferencias a nivel de secuencia. En la secuenciación se utilizó 1 µl del producto de amplificación de todo el gene E, desnaturalizado a 94° C durante 5 minutos, en presencia de los iniciadores P14 y P15 (Tabla III). Las reacciones de secuenciación fueron analizadas mediante electroforesis en geles de Tris-Boratos-Urea (Maxam y Gilbert, 1980). El análisis de la secuencia se llevó a cabo con la ayuda del programa PCGene (Intelligenetics).

Establecimiento de un modelo encefalítico murino.

Con el objeto de evaluar la virulencia de cada una de las clonas, se estableció un modelo encefalítico murino utilizando ratones lactantes BALB/c de 8 días de nacidos, los cuales fueron inoculados intracerebralmente con 20 µl del virus del dengue a diferentes concentraciones, para determinar la LD 50, de acuerdo al método de Reed y Muench. Una vez infectados los ratones, se observaron durante un mes, llevándose un registro de la aparición de síntomas característicos de una infección encefalítica (erizamiento del pelaje, parálisis, muerte), con respecto a la cantidad de virus inoculado.

Una vez que se determinó la LD50 se llevó a cabo la determinación de la virulencia de cada una de las clonas inoculando a los ratones 100 LD 50, observándolos durante 1 mes.

RESULTADOS.

Identificación y clonación de las poblaciones virales

A partir del aislado viral de dengue 2 mexicano, se identificaron y clonaron 11 poblaciones homogéneas. Para la obtención de las mismas, fue necesario llevar a cabo 5 subclonaciones consecutivas, seleccionando siempre placas líticas pequeñas, medianas y grandes, que estuvieran perfectamente aisladas y presentaran un fenotipo diferenciado. De esta manera se obtuvieron: 4 clonas denominadas D2MS1, D2MS2, D2MS3 y D2MS4 que producían un tamaño de placa lítica con un diámetro menor de 0.1 mm; 4 clonas que formaban placas líticas de 1.5 a 2 mm de diámetro designadas D2MM1, D2MM2, D2MM3 y D2MM4; y 3 de placa lítica grande de 3 a 4 mm de diámetro denominadas D2ML2, D2ML3 y D2ML4 (Figura 12). Fue necesario llevar a cabo 10 pases consecutivos adicionales para aumentar el título viral de cada una de las clonas, en el último pase, las muestras se titularon, y al mismo tiempo se comprobó que las poblaciones clonadas eran homogéneas. Posteriormente, se purificó el RNA viral correspondiente a cada fenotipo y con ayuda de una sonda específica para el gen E del virus del dengue, se llevó a cabo un ensayo de Southern Blot. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 11b, en la cual podemos observar que el RNA purificado tiene aproximadamente 11 Kb, y es reconocido por la sonda específica para el gen E del virus.

Elaboración de la ribosonda del gen de la proteína E viral.

Para la elaboración de la ribosonda se utilizó el gen E del aislado DEN-2PR159 S1 (cepa vacunal), debido a que en un análisis de alineamiento múltiple de secuencias correspondientes al gen E de 39 diferentes aislados geográficos de DEN 2, observamos que este aislado fue el que presentó mayor similitud (92%) con el aislado de D-2M.

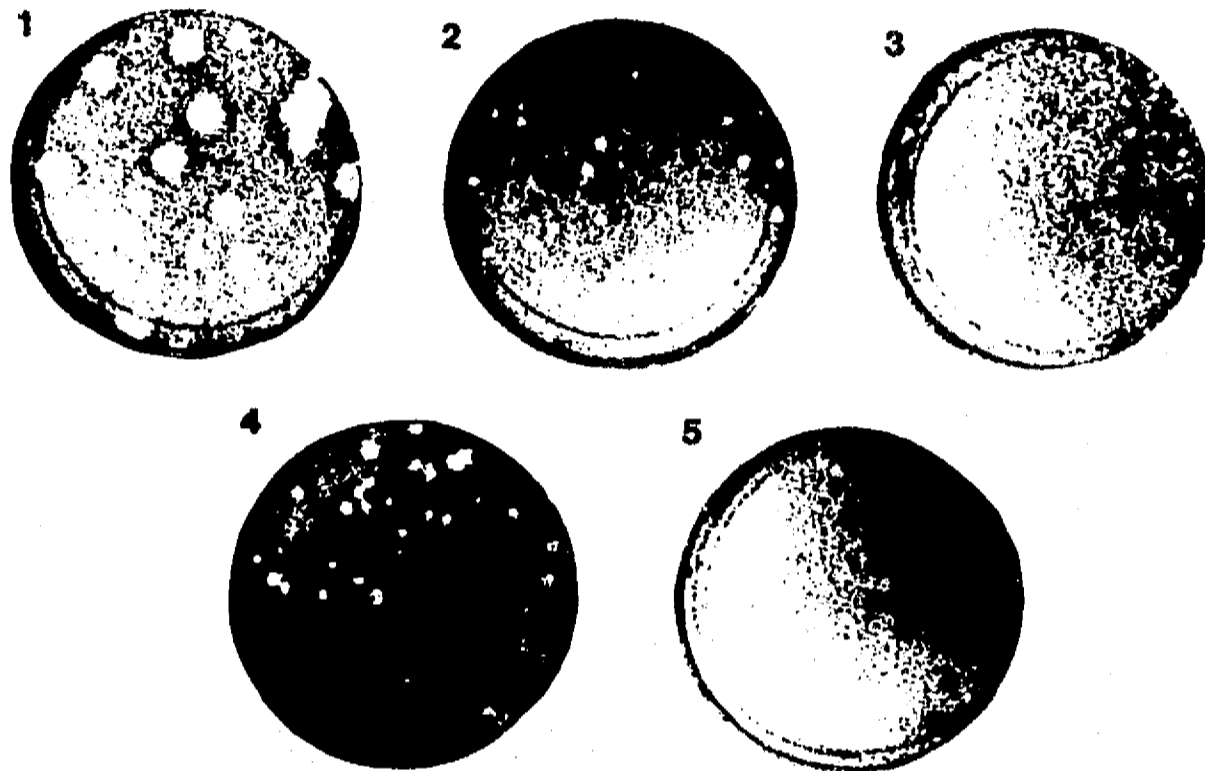


Figura 12. Placas líticas de clonas del aislado de D-2M obtenidas en una monocapa de células MK2 a partir de un ensayo de placa.

1. Clonas que producen placas líticas grandes (3 a 4 mm de diámetro).
2. Clonas que producen placas de 1.5 a 2 mm (D2MM).
3. Clonas que producen placas de <1mm
4. Placas líticas producidas por el aislado de D-2M
5. Monocapa de células MK2 sin infectar (Control negativo)

Inicialmente se llevó a cabo la clonación del gen E de D-2PR en el sitio de restricción Sma I del vector pGEM4. Una vez obtenido el plasmido recombinante, se sintetizó la ribosonda mediante transcripción *in vitro*, con ayuda de T7 RNA polimerasas y un ribonucleótido marcado (Figura 13A). Durante la purificación de la ribosonda observamos que la cantidad de ribosonda generada fue grande, ya que se incorporan arriba de 10 millones de c.p.m. por reacción.

Selección de las condiciones de digestión con RNasa A de los heterohíbridos RNA:RNA.

Una vez obtenida la ribosonda se llevó a cabo la hibridización con los RNA virales de diferentes aislados de dengue 2: DEN-2PR159 S1 (control 100% homología), D-2M, D-2 Nueva Guinea (D-2NGC) y D-2 Indonesia (D-2I). Una vez formados los heterohíbridos, estos fueron expuestos a diferentes concentraciones de RNasa A (30, 60 y 120 µg/ml), temperatura (15°, 30° y 37° C) y tiempo (15, 20 y 30 minutos), con el fin de establecer las condiciones óptimas de digestión de los heterohíbridos que nos permitieran observar diferencias entre las cepas. Conforme se incrementó la concentración de RNasa A y la temperatura de digestión, se obtuvieron patrones electroforéticos muy complejos y difíciles de interpretar. Cuando los heterohíbridos fueron digeridos con 60 µg/ml de RNasa A a 37° C por 15 minutos, se observó un patrón electroforético complejo pero característico para cada aislado (Figura 14), el cual fue siempre único y reproducible bajo las mismas condiciones.

Al mismo tiempo fue necesario establecer la concentración de acrilamida de los geles, que nos permitieran separar y diferenciar perfectamente todos los fragmentos obtenidos en digestión. Después de correr los fragmentos en geles de acrilamida al 4, 6.8, 8.5 %, observamos que se presentó una mejor separación y resolución en la concentración al 4%, al correr 80 cms las muestras.

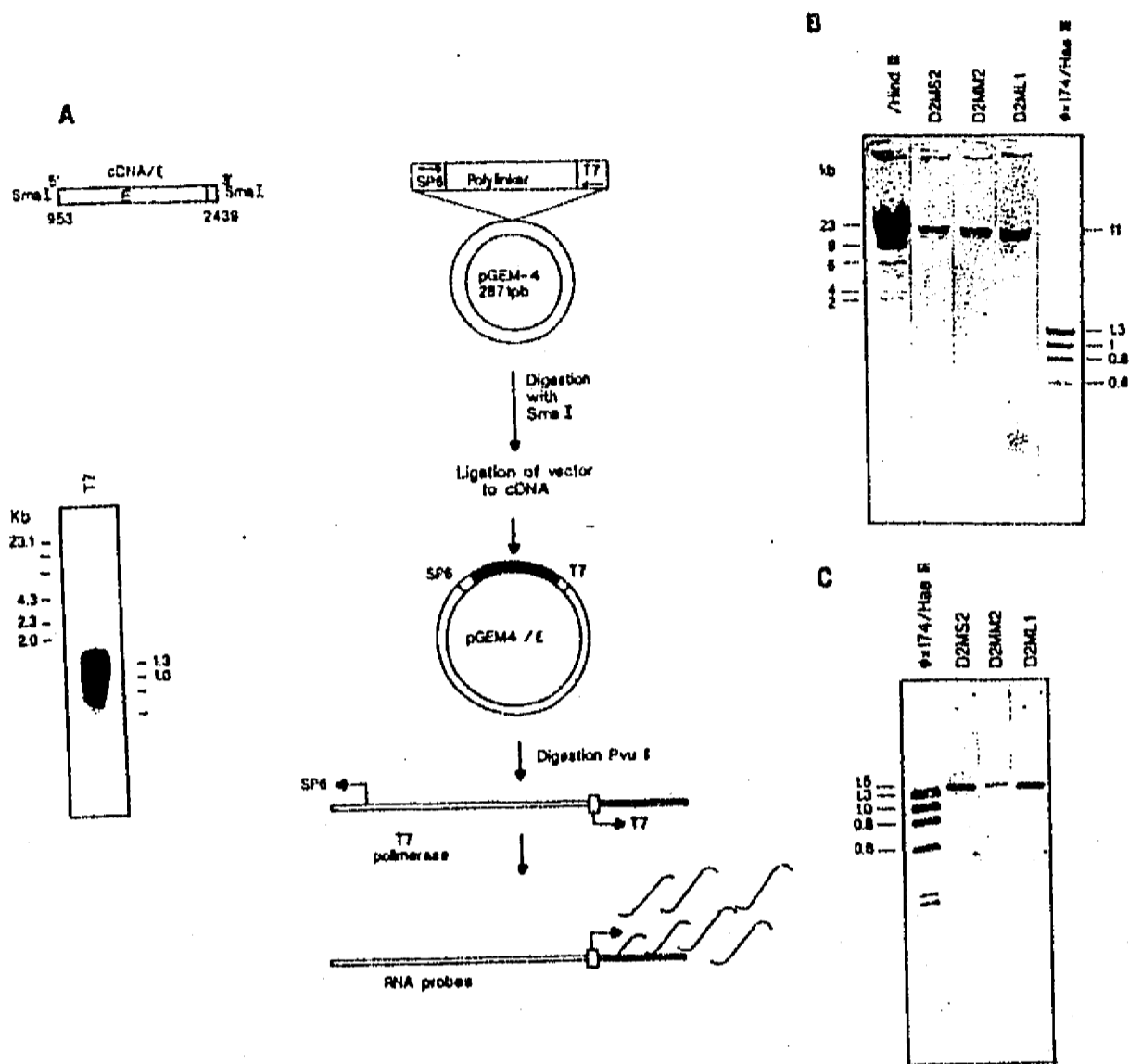


Figura 13. A). Obtención de la ribosonda uniformemente marcada con $[^{32}P]$ -ATP. El cDNA que codifica para el gen de la proteína E fue clonado en el sitio de restricción Sma I del plásmido pGEM4. El plásmido recombinante pGEM4/E fue utilizado para la transcripción *in vitro* con ayuda de T7 RNA polimerasa después de que se digirió con Pvu II.

B). Northern blot utilizando una sonda específica para E, del RNA viral purificado a partir de células MK2 infectadas con las clonas D2MS2, D2MM2 y D2ML1.

C). Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación de 1500 p.b. obtenido por RT-PCR, a partir del RNA viral de las clonas D2MS2, D2MM2 y D2ML1.

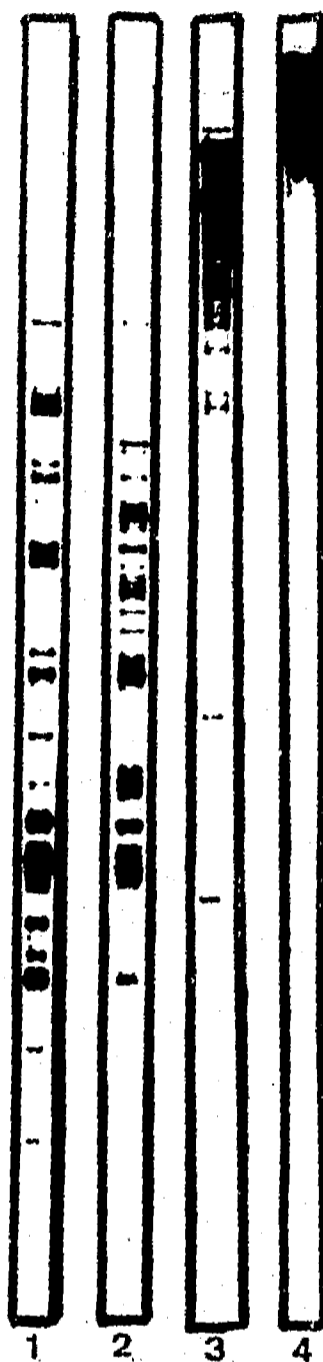


Figura 14. Patrones electroforéticos de los fragmentos obtenidos de la digestión con RNasa A de los heterohíbridos formados con el RNA viral de la cepa de D-2NGC (carril 1), D-2 I (carril 2), D-2M (carril 3) y D-2PR (control 100% homología) (carril 4), con la ribosonda (D2PR/E) en un gel al 4%.

Análisis de la variación genómica de las diferentes poblaciones.

Una vez establecidas las condiciones de digestión de los heterohíbridos, se llevó a cabo el ensayo de "mismatch" utilizando el RNA viral de las clonas, y la ribosonda marcada. En la figura 15 se muestra el patrón de bandas que presentaron los heterohíbridos formados con cada variante, observándose pocas diferencias en los perfiles electroforéticos formados entre las diferentes clonas y el obtenido con el D-2M parental. Con D2ML2, D2ML3, D2ML4, D2MS3 y D2MM2 se observó la aparición de una serie de subbandas en su patrón electroforético, con respecto a los perfiles de las otras clonas, indicativas de la presencia de cambios a nivel de secuencia nucleotídica entre ellas y de la heterogeneidad genómica presente en un mismo aislado.

Para tener una estimación cuantitativa de la variación genómica entre las variantes, fue necesario hacer un análisis densitométrico (programa Scan GS370) a cada uno de los patrones electroforéticos obtenidos, por medio del cual se determinó el número total de bandas generadas por cada clona. Posteriormente se determinó el porcentaje de similitud entre ellas siguiendo el método descrito por Cristina y colaboradores, en 1990. Este cálculo se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de similitud} = \frac{\text{No. de bandas comunes de un par de virus}}{\text{No. total de bandas en el par de virus}} \times 2 \times 100.$$

Los resultados obtenidos de este análisis están compilados en la Tabla IV, y fueron indicativos de la variación genómica existente entre las diferentes poblaciones. De esta manera, se observó que las clonas D2MS1, D2MS2, D2MS4 y D2MM4, presentaron el mismo número de fragmentos que el obtenido con D-2M parental (100 % de identidad). Sin embargo el patrón de bandeo de las variantes D2MS3, D2MM1 y D2MM3 tuvieron un 83.7, 90 y 94.7 % de similitud respectivamente. Finalmente, D2MM2, D2ML2, D2ML3 y D2ML4 presentaron un 78.2 % o menos de similitud. Estos resultados, sin embargo, solo representan un índice de las diferencias a nivel genómico entre las clonas.

Análisis de la variación genómica de diferentes poblaciones dentro un mismo aislado viral.

Una vez establecidas las condiciones de digestión de los heterohíbridos, se llevó a cabo el ensayo de "mismatch" utilizando el RNA viral de las clonas, y la ribosonda marcada. En la figura 15 se muestra el patrón de bandas que presentaron los heterohíbridos formados con cada variante, observándose pocas diferencias en los perfiles electroforéticos formados entre las diferentes clonas y el obtenido con el D-2M parental. Con D2ML2, D2ML3, D2ML4, D2MS3 y D2MM2 se observó la aparición de una serie de subbandas en su patrón electroforético, con respecto a los perfiles de las otras clonas, indicativas de la presencia de cambios a nivel de secuencia nucleotídica entre ellas y de la heterogeneidad genómica presente en un mismo aislado.

Para tener una estimación cuantitativa de la variación genómica entre las variantes, fue necesario hacer un análisis densitométrico (programa Scan GS370) a cada uno de los patrones electroforéticos obtenidos, por medio del cual se determinó el número total de bandas generadas por cada clona. Posteriormente se determinó el porcentaje de similitud entre ellas siguiendo el método descrito por Cristina y colaboradores, en 1990. Este cálculo se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de similitud} = \frac{\text{No. de bandas comunes de un par de virus}}{\text{No. total de bandas en el par de virus}} \times 2 \times 100.$$

Los resultados obtenidos de este análisis están compilados en la Tabla IV, y fueron indicativos de la variación genómica existente entre las diferentes poblaciones. De esta manera, se observó que las clonas D2MS1, D2MS2, D2MS4 y D2MM4, presentaron el mismo número de fragmentos que el obtenido con D-2M parental (100 % de identidad). Sin embargo el patrón de bandeo de las variantes D2MS3, D2MM1 y D2MM3 tuvieron un 83.7, 90 y 94.7 % de similitud respectivamente. Finalmente, D2MM2, D2ML2, D2ML3 y D2ML4 presentaron un 78.2 % o menos de similitud. Estos resultados, sin embargo, solo representan un índice de las diferencias a nivel genómico entre las clonas.

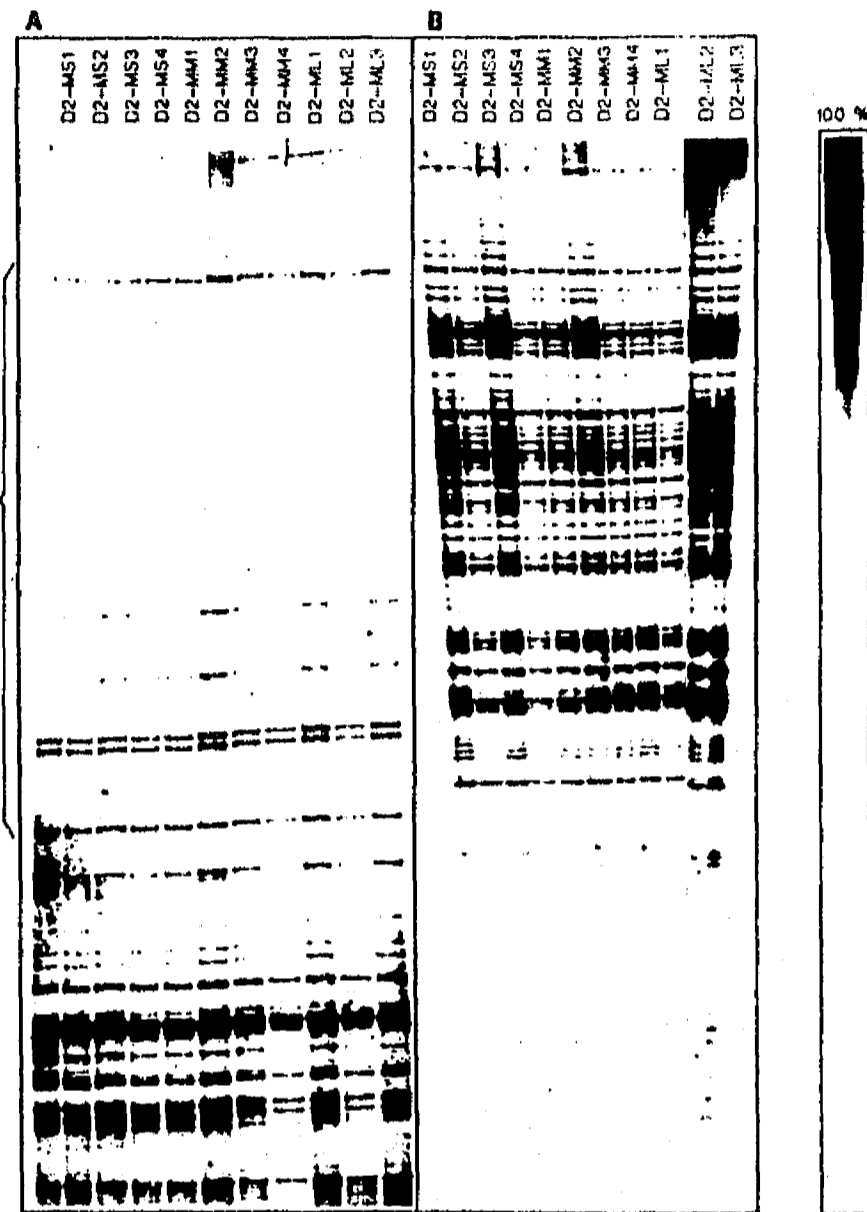


Figura 15. Patrones electroforéticos de los fragmentos obtenidos de la digestión con 60 μ g de RNasa A , durante 15 min. a 37° C, de los heterohíbridos formados con las 11 clonas de D-2M y la ribosonda antisentido del gen E, separados en un gel de secuencia (40 cm de longitud) y visualizado por autoradiografía.

A. UREA-PAGE al 4 % . El paréntesis señala la zona donde aparecen las subbandas, revelando la diferencia entre los patrones. B. UREA-PAGE al 6.8 %. EL último carril muestra el control del 100% de homología.

TABLA IV. CARACTERISTICAS DE LAS CLONAS

VIRUS	Tamaño de la placa (mm)	Neurovirulencia en ratón (100 LD 50)	*Bandas comunes en el patrón de fragmentos de RNA %
DEN-2 M parental	0.5 a 4 (variable)	Moderada	N.D.
Subclonas D-2M.S1 D-2M.S2 D-2M.S3 D-2M.S4	<1	Atenuada Atenuada Moderada Atenuada	100 (18/36) 100 (18/36) 83.7 (18/43) 100 (18/36)
Subclonas D-2M.M1 D-2M.M2 D-2M.M3 D-2M.M4	1.5 - 2	Moderada Moderada Moderada Moderada	94.7 (18/38) 76.5 (18/47) 90 (18/40) 100 (18/36)
Subclonas D-2M.L2 D-2M.L3 D-2M.L4	3 - 4	Severa Severa Severa	76.5 (18/47) 78.2 (18/46) 76.5 (18/47)

* Nota: El porcentaje de bandas comunes calculada como % = (Bandas comunes por cada par de virus / Total de bandas por cada par de virus) x 2 x 100. El número entre paréntesis indica el número de bandas comunes en el patrón electroforético de fragmentos RNA señalado en la figura 13, divididos por el número total de bandas por cada par de virus.

Secuenciación del gene E de las clonas.

Con el fin de determinar a nivel de secuencia las diferencias observadas entre las clonas por los ensayos anteriores, se secuenció el gen E de cada una de las variantes utilizando diferentes métodos para corroborar el (los) cambio(s) observado(s). Las secuencias obtenidas se compararon entre ellas y con la secuencia del aislado mexicano parental reportada. De esta manera obtuvimos que las clonas D2MS1, D2MS2 y D2MS4, que producen placas líticas pequeñas presentaron la misma secuencia entre ellas, pero cuando se comparó la secuencia de estas con la parental, observamos 6 cambios a nivel de secuencia de nucleótidos (Tabla V). Pero solamente la sustitución de G por A en el nucleótido 1168 ocasiona la mutación de aspártico (Asp) a asparagina (Asn) en la posición 390 de la proteína E. La clona D2MS3 además del cambio de aminoácido observado en las clonas D2MS, presentó una mutación en el aminoácido 388 de lisina por asparagina, como consecuencia de la sustitución de G por C en el nucleótido 1164 (Tabla V).

Al llevarse a cabo el análisis de secuencia de las clonas que producen placa lítica mediana (D2MM1, D2MM2, D2MM3 y D2MM4), se observaron 6 cambios a nivel de secuencia nucleotídica, 5 de los cuales fueron diferentes de los observados en las clonas que producen placas líticas pequeñas (Tabla V); sin embargo, las clonas D2MM, presentaron además la sustitución en el nucleótido 1168 de G por A que ocasiona el cambio en el aminoácido 390 de Asp a Asn. Cuando las secuencias de las clonas D2ML2, D2ML3 y D2ML4 fueron comparadas con el aislado de D-2M, se observaron 11 diferencias, de los cuales 10 resultaron ser cambios silenciosos, y solamente la mutación de G a C en la posición 1168 que ocasiona la sustitución de Asp por histidina (His) en el aminoácido 390 (Tabla V).

Posteriormente, se llevó a cabo un alineamiento múltiple con diferentes aislados de DEN2, dentro del cual se incluyeron secuencias de cepas vacunales y de cepas aisladas de casos de dengue hemorrágico (cepas asiáticas). Como se observa en la figura 15, las cepas vacunales de DEN2, presentan en el aminoácido 390 una asparagina como en las variantes D2MS

Tabla V. Resumen de las mutaciones detectadas en el gen que codifica para la proteína E de las clonas.

‡Clona	Nucleótidos	Cambio de codon	Aminoácido	
D2MS3	57	T → C	AGT → AGC	19 *
	351	T → G	GCT → GCG	117 *
	531	C → G	GGC → GGG	177 *
	1017	A → C	ATA → ATC	339 *
	1164	G → C	AAG → AAC	388 Lys → Asn
	1168	G → A	GAC → AAC	390 Asp → Asn
D2MM1	72	T → C	GGT → GGC	24 *
	246	G → A	CTG → CTA	82 *
	252	A → G	GAA → GAG	84 *
	1168	G → A	GAC → AAC	390 Asp → Asn
	1278	A → C	GGA → GGC	426 *
	1323	A → G	GGA → GGG	441 *
D2ML2	57	T → C	AGT → AGC	19 *
	87	T → C	AGT → AGC	29 *
	213	C → T	GAC → GAT	71 *
	351	T → G	GCT → GCG	117 *
	480	A → G	AAA → AAG	160 *
	531	C → G	GGC → GGG	177 *
	771	G → A	GAG → GAA	257 *
	1167	G → C	CTG → CTC	389 *
	1168	G → C	GAC → CAC	390 Asp → His
	1278	A → C	GGA → GGC	426 *
1323	A → G	GGA → GGG	441 *	

* aminoácidos que no cambian

‡ Secuencia que es representativa de cada fenotipo de las clonas

y en el caso de las cepas de aislados asiáticos, estas presentan una Histidina en esta misma posición al igual que las clonas D2ML.

Es interesante señalar que, cuando se realizaron los alineamientos múltiples con secuencias de flavivirus que causan encefalitis: virus de la encefalitis Japonesa (JEV), virus Kunjin (KUN), virus de la encefalitis de San Luis (SLE), virus del Western Nile (WN), se observó que estos aislados presentan una His en el aminoácido 390 (Figura 16).

Determinación de la virulencia de las clonas y del aislado D2M en ratón.

Simultáneamente a la secuenciación de las clonas, se llevó a cabo la determinación de la LD 50 siguiendo el método descrito por Reed y Muench del aislado de D-2M utilizando el aislado de D-2NGC como control positivo. Se inocularon 5 ratones BALB/c de 8 días de nacidos intracerebralmente con diferentes concentraciones (diluciones seriadas) del stock viral de D-2M y D-2NGC, los cuales fueron observados durante un mes, llevando un control de ratones muertos por dosis (Figura 17). La LD 50 para el aislado de D-2M fue de 3×10^6 p.f.u./20µl.

Posteriormente, se inocularon 5 ratones BALB/c de 8 días de nacidos i.c. con 100 LD 50 (3×10^8 p.f.u./ml) con cada una de las clonas y fueron observados durante 30 días, llevando un control de aparición de signos o síntomas de encefalitis. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VI, donde se observó diferencias significativas en la capacidad de generar encefalitis entre las clonas. Se identificaron tres grados característicos de virulencia de acuerdo al criterio descrito por Monath y colaboradores en 1980 para el virus de la encefalitis Japonesa, quienes consideran como variantes de alta virulencia aquellas que producen 70 - 100 % de mortalidad en ratones después de que el virus es inoculado i.c. ; variantes de virulencia moderada o intermedia, aquellas que son capaces de producir una mortalidad variable (menor de 50 %), y que tiene la característica de no ser letales para los animales y finalmente, variantes de virulencia atenuada, las cuales producen solamente síntomas moderados de encefalitis, es decir, los animales presentan el pelo erizado, temblores, ataques y ocasionalmente parálisis.

ALINEAMIENTO ENTRE EL VIRUS PARENTAL Y LAS CLONAS.							
D-2M	351	LTTVNPVTE	KDSPLNIEAE	PPFGDSYIII	GVEPGQLKLD	WFKKASSIGQ	MFETIMRGAK
D2MS2		-----	-----	-----	-----N	-----	-----
D2MS3		-----	-----	-----	-----N	-----	-----
D2MM1		-----	-----	-----	-----N	-----	-----
D2ML2		-----	-----	-----	-----H	-----	-----

ALINEAMIENTO ENTRE LAS CLONAS Y OTROS AISLADOS GEOGRAFICOS DE DENGUE.							
D-2M	351	LTTVNPVTE	KDSPLNIEAE	PPFGDSYIII	GVEPGQLKLD	WFKKASSIGQ	MFETIMRGAK
D2MS2		-----	-----	-----	-----N	-----	-----
D2MS3		-----	-----	-----	-----N	-----	-----
D2MM1		-----	-----	-----	-----N	-----	-----
D2ML2		-----	-----	-----	-----H	-----	-----
16681-PDK53 (vaccinal)		-----	---V---	-----	-----N	---G---	-----
Thailandia (D2-D80-141)		-----	---V---	-----	-----H	---G---	-----
Indonesia		-----	---V---	-----	-----N	---G---	-----
JAMAICA		-----	---V---	-----	-----N	---G---	-----
NGC(JS219)		-----	---V---	-----	-----N	---G---	-----
Puerto Rico (vaccinal S1)		-----	---V---	-----	-----D	---G---	-----
China (D2-04)		-----	---V---	-----	-----H	---G---	-----
Malasia (M3)		-----	---V---	-----	-I-----H	-L-----	-----
DENGUE 1		-I-A---	-EK-V---	---E---VV	-SGEKA---S	---G---K	---A-A---R
DENGUE 3		-I-A---	-EE-V---	---E-N--I	-IGDKA---H	-YR-G---K	---A-A---R
DENGUE 4		-ISST-LAEN	TNSVT---LE	RPL-DSY-V-	-VGNSA-T-H	---R-G---K	---S-Y---

ALINEAMIENTO ENTRE LAS CLONAS Y FLAVIVIRUS QUE PRODUCEN ENCEFALITIS.							
D-2M	351	LTTVNPVTE	KDSPLNIEAE	PPFGDSYIII	GVEPGQLKLD	WFKKASSIGQ	MFETIMRGAK
D2MS2		-----	-----	-----	-----N	-----	-----
D2MS3		-----	-----	-----	-----N	-----	-----
D2MM1		-----	-----	-----	-----N	-----	-----
D2ML2		-----	-----	-----	-----H	-----	-----
JEV		-V---F-ATSSAN-KVLV-M-	---E---VV	-RGDK-TNHH	-H-AG-TL-K	A-S--LK--Q	
MVE		MV-A--Y-ASSTANAKVLV-I-	---E---VV	-RGDK-TNHH	-H-EG---K	A-S--LK--Q	
KUN		-V---F-SVSTAN-KVLV-L-	---E---VI	-RGEQ-TNHH	-H-SG---K	A--A-LK--Q	
WN		-V---F-SVATAN-KVLV-L-	---E---VV	-RGEQ-TNHH	-H-SG---K	A---L---Q	
SLE		-V---FIISTOGANNKVM-V-	---E---VV	-RGTT-IM-H	-H-EG---K	ALA--WK--Q	
YF		-V---AST N-DEVLV-VN	---E---V	-RGDSR-T-S	-H-EG---K	L--Q--K-VE	

Figura 16. Alineamiento múltiple de secuencia de aminoácidos de la posición 351 a la 410 de la proteína E de las clonas D2MS2, D2MS3, D2MM1, y D2ML2 con la secuencias correspondientes de otros flavivirus. La identidad de cada posición con la secuencia parental de D-2M se señala con (-). Las diferencias se indican con una letra. (*) representa el residuo 390. D2MS1 y D2MS4 tienen la misma secuencia que D2MS2. D2MM2, D2MM3, y D2MM4, presentan la misma secuencia que D2MM1. D2ML3 y D2ML4 presenta la misma secuencia que D2ML2.

NOTA: Aislado (número de acceso): D1, Singapore S275/90 (M87512); D2 (200787) México (L04561); D2(V) Puerto Rico (P12823); D2 16681-PDK53 (29991); D2(IIIb) Tailandia D80141 (M24444); D2(IV) Indonesia 1051 (L10044); D2(IIIb) Jamaica (M15075); D2 China D2-04 (P30026); D2(IIIa) Malasia M3 (S06747); D2(I) Nueva Guinea C (JS0219); D3 Dengue 3 (M93130); D4 Dengue 4 (M14931); Kunjin KUNCG (D00246); West Nile WNFCG (M12294); Murray Valley FLMVEV5 (X03467); encefalitis de San Luis SLOCME (M16614); encefalitis japonesa JEVCG (M18370); Fiebre amarilla 17D-204 (X15062)

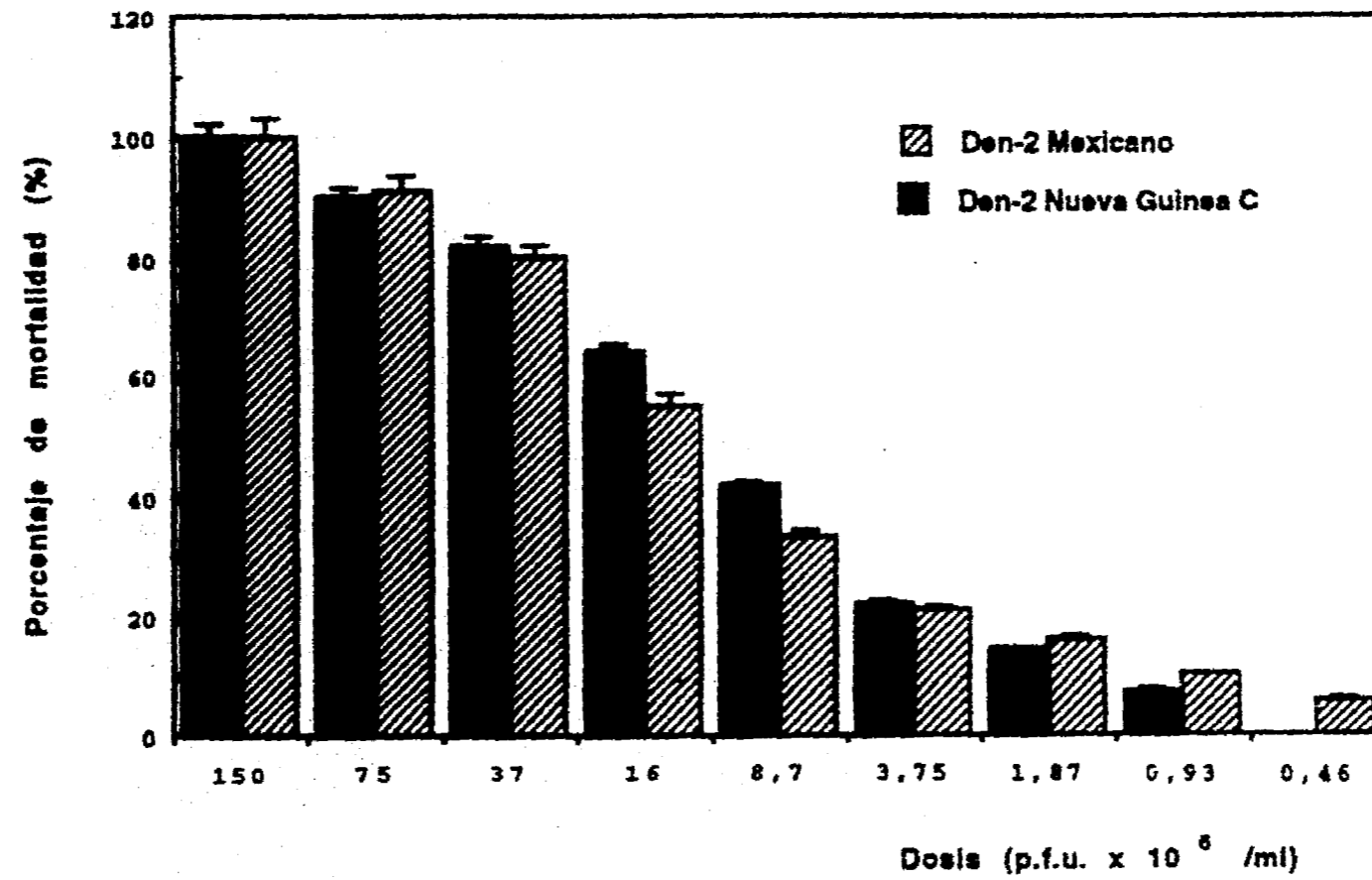


Figura 17. Determinación de la LD 50, del virus del dengue. Se inocularon ratones BALB/c de 8 días de nacidos con diferentes concentraciones del virus DEN 2 del aislado de Nueva Guinea C y del aislado Mexicano.

TABLA VI. VIRULENCIA DE LAS CLONAS Y DEL VIRUS DEL DENGUE PARENTAL EN RATONES BALB/c INOCULADOS I.C. CON 100 LD 50 (6 X 10⁶ P.F.U).

VIRUS	No. ratones muertos/ No. de ratones totales. (%)	No. de ratones enfermos (infección severa)/ No. de ratones totales. (%)	No. de ratones enfermos (infección moderada)/ No. de ratones totales. (%)	Neurovirulencia en ratón.
D-2M parental	3/10 (30)	7/10 (70)	0/10	Moderada
Clonas				
D2M.S1	0/10 (0)	1/10 (10)	9/10 (90)	Atenuada
D2M.S2	0/10 (0)	2/10 (20)	8/10 (80)	Atenuada
D2M.S3	1/10 (10)	8/10 (80)	1/10 (10)	Moderada
D2M.S4	0/10 (0)	2/10 (20)	8/10 (80)	Atenuada
D2M.M1	2/10 (20)	8/10 (80)	0/10 (0)	Moderada
D2M.M2	0/10 (0)	10/10 (100)	0/10 (0)	Moderada
D2M.M3	0/10 (0)	8/10 (80)	1/10 (10)	Moderada
D2M.M4	0/10 (0)	9/10 (90)	1/10 (10)	Moderada
D2M.L2	9/10 (90)	1/10 (10)	0/10 (0)	Severa
D2M.L3	8/10 (80)	2/10 (20)	0/10 (0)	Severa
D2M.L4	7/10 (70)	3/10 (30)	0/10 (0)	Severa

Siguiendo este criterio, las clonas D2ML2, D2ML3 y D2ML4 produjeron 70 - 90 % de mortalidad en ratones, por lo tanto fueron catalogadas como variantes muy virulentas. Las clonas D2MS3, D2MM1, D2MM2, D2MM3, y D2MM4 presentaron una mortalidad del 20 % cuando se inocularon i.c. en ratones, fueron clasificadas como variantes de virulencia moderada; y clonas de virulencia atenuada D2MS1, D2MS2 y D2MS4. Estos experimentos se llevaron a cabo dos veces para tener una estimación más precisa de la capacidad virulenta de las clonas. Como se observa en los resultados hay una correlación directa entre el tamaño de placa lítica que producen las clonas en un ensayo *in vitro* y su capacidad virulenta *in vivo*.

DISCUSION

Entender el grado de heterogeneidad genómica y fenotípica entre los virus y su relación con la expresión de neurovirulencia es de gran importancia para entender la etiopatogenia de la enfermedad, el origen de las cepas virales, las características antigénicas de poblaciones virales específicas y diferenciar entre cepas vacunales y parentales.

En el laboratorio observamos en un ensayo de placa lítica que el aislado de D-2 mexicano, presentaba poblaciones heterogeneas de virus, que se diferenciaban en su capacidad de generar placas líticas de diferente tamaño. Esto mismo ya había sido observado por Schlesinger en 1980 (Schlesinger, 1980) con otros aislados, quien sugirió la existencia de una mezcla de poblaciones virales con diferentes propiedades biológicas dentro de aislados independientes del virus del dengue. Así mismo se ha reportado que el tamaño de la placa lítica formada por las variantes correlacionaba con el grado de virulencia en ratón, sensibilidad a temperatura y atenuación en primates no humanos (Eckels y col., 1976, Harrison y col., 1977). Aunado a esto, la existencia de reportes de casos de DHF/DSS en el curso de una infección primaria, sugieren la existencia de variabilidad genómica y/o antigénica viral que probablemente influya directamente tanto en la virulencia hacia el huésped (humano), como en la capacidad de infectar al vector (Barnes y Rosen, 1974).

Con el fin de analizar las bases genómicas del polimorfismo existente en el aislado de D2-M, identificamos 11 clonas estables, que producen diferente tamaño de placa lítica. Para la obtención de las mismas, fue necesario llevar a cabo 5 subclonaciones consecutivas, seleccionando siempre placas que estuvieran completamente aisladas con un fenotipo bien diferenciado y evitando demasiados pases de las clonas *in vitro*, para evitar de esta manera que cambiaran su capacidad virulenta, debido a que se han obtenido cepas atenuadas a través de pases sucesivos en cultivo celulares en flavivirus, de esta forma se obtuvo la cepa vacunal 17D de fiebre amarilla (Theiler y col., 1937); la SA-14 para encefalitis japonesa (Yu y col., 1988; Nitayaphan y col.,

1990) y diferentes cepas atenuadas para los distintos serotipos del dengue (Yoksan y col., 1986).

Posteriormente, analizamos la heterogeneidad genómica de cada clona, siguiendo el método descrito por Cristina y colaboradores, en 1990 (análisis de mismatch) y el grado de virulencia de las mismas utilizando un modelo de encefalitis murina, (ya que la mayor parte de la información que hay con respecto a la patogénesis de flavivirus, se ha obtenido a partir de experimentos con ratones). Tanto dengue como fiebre amarilla, causan infección encefalítica en roedores. Así cuando las clonas se inocularon intracerebralmente en ratón, se observaron diferencias significativas en su capacidad de generar encefalitis, identificándose tres grados característicos de virulencia de acuerdo al criterio descrito por Monath y colaboradores en 1980 para el virus de la encefalitis Japonesa, y que posteriormente se adoptó para otras encefalitis causada por flavivirus. Se consideraron como variantes de alta virulencia a las clonas D2ML2, D2ML3 y D2ML4 ya que produjeron 70 - 100 % de mortalidad en ratones después de que el virus se inoculó i.c.; variantes de virulencia moderada o intermedia D2MS3, D2MM1, D2MM2, D2MM3 y D2MM4, que fueron capaces de producir una mortalidad variable (menor de 50 %), y que tiene la característica de no ser letales para los animales. Finalmente, variantes de virulencia atenuada a D2MS1, D2MS2 y D2MS4, las cuales produjeron solamente síntomas moderados de encefalitis, es decir los animales presentan el pelo erizado, temblores, ataques y ocasionalmente parálisis. Además observamos que el tiempo de infección de las clonas más virulentas fue corto, es decir, los ratones presentaron los síntomas al segundo día postinfección, siguiéndose 3 a 4 días más y posteriormente fallecieron. En cambio con las cepas atenuadas las manifestaciones aparecieron después de 6 días postinfección y el período de duración fue largo (15 días) y generalmente los ratones se recuperaban.

Esto nos indicó que la capacidad de replicación fue diferente entre las clonas virulentas y las atenuadas, lo cual podría ser un factor importante en la expresión de virulencia. Estos resultados concuerdan con los reportados recientemente por Schlesinger y colaboradores los cuales compararon la capacidad de replicación en el sistema nervioso central de la cepa Poterfield PYF neuroadaptada con una cepa no-neuroadaptada YF5.2iv de fiebre

amarilla. La diferencia entre estas dos cepas fue la distribución del virus a través de la neuraxis, encontrando que la cepa YF5.2iv necesita más tiempo para replicarse en SCF y glándulas adrenales, mientras que la cepa PYP se replica más rápidamente, obteniéndose de 1000 a 10000 títulos más altos que con YF5.2iv, sugiriendo que existen factores virus-específicos importantes en la patogénesis de una encefalitis fatal en el ratón. (Schlesinger y col., 1996).

Correlacionando el grado de virulencia con la variabilidad genómica, observamos que las clonas D2MS1, D2MS2, D2MS4 y D2MM4 presentaron patrones electroforéticos idénticos (100%) en los ensayos de digestión de heterohíbridos RNA-RNA (mismatch) además de que mostraron neurovirulencia atenuada en ratón, es decir, produjeron solamente síntomas moderados de encefalitis. Sin embargo, aquellas clonas que mostraron un 80 % de similitud en los análisis de mismatch, presentaron la capacidad de generar una infección severa (70 - 100 % de mortalidad en ratones después de que el virus fué inoculado i.c.). Los resultados obtenidos en este análisis fueron indicativos de la variación genómica existente entre las diferentes poblaciones. De esta manera, se observó que las clonas D2MS1, D2MS2, D2MS4 y D2MM4, presentaron el mismo número de fragmentos que el obtenido con D-2M parental (100% de identidad). Sin embargo el patrón de bandeo de las variantes D2MS3, D2MM1 y D2MM3 tuvieron un 83.7, 90 y 94.7 % de similitud respectivamente. Finalmente, D2MM2, presentaron un 78.2 % o menos de similitud. Estos resultados, sin embargo, solo representaron un índice de las diferencias a nivel genómico entre las clonas. Por tal motivo, decidimos llevar a cabo la secuenciación de cada una de las clonas, con el fin de determinar a nivel de secuencia las diferencias observadas en los análisis anteriores.

Al llevar a cabo los alineamientos de las secuencia de las clonas con las diferentes cepas de dengue 2 tanto vacunales como parentales, observamos que las cepas vacunales presentaron una asparagina (Asn) en el aminoácido 390 al igual que las clonas de virulencia atenuada (que nosotros obtuvimos de un mismo aislado) mostrando una sustitución de un aspártico (Asp) por una asparagina (Asn) en la posición 390 de la proteína E. Estos resultados sugieren que hay factores virus-específicos importantes en la

capacidad de causar una encefalitis en ratón. El hecho de que la mutación D390 → H sea común en las clonas altamente virulentas, sugiere que este residuo podría conferir a la proteína E propiedades funcionales importantes en la patogénesis viral. En estudios realizados con cepas virulentas y atenuadas con flavivirus, se ha demostrado que la proteína E juega un papel importante en la virulencia; tal es el caso de los análisis llevados a cabo con la cepa Poterfield PYF neuroadaptada con una cepa no-neuroadaptada YF5.2iv de fiebre amarilla (Schlesinger y col., 1996). Después de llevar a cabo la secuenciación de clonas de cDNA de la región que codifica para E/NS1 de la cepa PYF, encontraron que había cambios de aminoácidos en la proteína E con respecto a la secuencia de la cepa YF5.2iv (R52 → G, I173 → T, F305 → V, R380 → T y I462 → M). Al generar virus recombinantes intertípicos PYF/YF5.2iv (YF5.2iv con las mutaciones observadas en el gen E de PYF) con el fin de conocer la importancia de estos cambios en la neurovirulencia, estos investigadores observaron que los cambios en la posición 380 y 462 eran los únicos que estaban involucrados en la neurovirulencia de la cepa. Además estos cambios los presentaron las cepas parentales Asibi, vicerotrópica French y neurotrópica de fiebre amarilla. El hecho de que estas sustituciones sean comunes en las cepas virulentas de fiebre amarilla sugiere que estos residuos podrían ser los responsables de conferir a la proteína E propiedades funcionalmente importantes en la patogénesis (Schlesinger y col., 1996).

En el virus del dengue los estudios llevados a cabo por Chen y colaboradores con el fin de desarrollar una vacuna tetravalente hacia los 4 serotipos, construyeron virus quiméricos intertípicos DEN1/DEN4, DEN2/DEN4 y DEN3/DEN4, observaron que cuando sustituyen Thr⁴³⁵ → Leu y Glu⁴⁰⁶ → Lys en el virus quimérico DEN3/DEN4, le confieren capacidad neurovirulenta en ratón a diferencia de la parental y de los virus quiméricos que no presentan este cambio, no fueron neurovirulentos (Chen y col. 1995).

Es interesante el hecho de que los análisis de comparación de secuencia de las clonas con aislados de dengue 2 obtenidos del continente asiático: China (D2-04) y Malasia (M3), donde la incidencia de casos graves de la enfermedad es mayor, así como con aislados de flavivirus que producen encefalitis tales como JEV, MVE, KUN, SLE considerados como cepas virulentas, se observó que estos flavivirus, presentaron una His en el residuo

390, al igual que las clonas que mostraron neurovirulencia muy severa en ratón (D2ML1, D2ML2 y D2ML3), las cuales presentaron la sustitución de Asp por His en esta misma posición.

Se ha descrito que mutaciones específicas en la proteína E entre el elemento de unión del dominio central I con el asa de dimerización del dominio II, afectan la virulencia en TBE, JE, y MVE. Nuestros resultados difieren con los obtenidos por el grupo Pletnev y colaboradores, con el virus quimérico de DEN4/TBE, (Pletnev y col., 1993) donde observan mutaciones específicas que incrementan la neurovirulencia de la cepa, en la región más conservada del dominio II, la cual interacciona con el dominio III del otro monómero del dímero. El cambio que nosotros observamos en la posición 390 en las clonas virulentas y atenuadas se presenta en la fase distal del dominio III. Esta superficie contiene residuos relacionados con el tropismo del virus, por tal motivo se ha propuesto que esta región esté involucrada con el reconocimiento del receptor. La importancia del dominio III en la virulencia se ha demostrado por el análisis de mutantes: en TBE, un cambio de tirosina a histidina en el aminoácido 384 (dominio III) ocasiona una atenuación de la cepa; en el virus MVE mutaciones en la secuencia RGD (región que se propone influye en el enlace al receptor), principalmente en el residuo 387 ocasionan igualmente un cambio en la virulencia de la cepa.

De acuerdo con los datos mencionados con anterioridad, y los resultados que nosotros obtuvimos, la morfología de la placa lítica formada está asociada con la sustitución de un aminoácido en el residuo 390 de la proteína E: por ejemplo, el cambio de Asp→His está asociado con una morfología de placa lítica y neurovirulencia severa; sin embargo, el cambio de Asp→Asn está asociado con la formación de placa lítica pequeña y virulencia atenuada. Esto implicaría que las clonas que producen placas pequeñas tengan una capacidad de penetración menor, y/o no sean liberadas al medio, disminuyendo su capacidad de infectar a las células vecinas.

De esta manera podemos proponer, que una sustitución en el asa de dimerización del dominio II y/o en la cara distal del dominio III de la proteína de envoltura del virus del dengue, estén determinando el grado de expresión de neurovirulencia en ratón, probablemente porque afecten directamente la

unión del virus al receptor, la fusión a membrana del mismo, capacidad de replicación y/o su tropismo celular.

Recientemente Cheng y col. obtuvieron una mutante RP-9 del aislado de JE que presentaba una virulencia severa y formaba placa lítica grande. Esta mutante difiere en el aminoácido 138, de la variante RP-2ms la cual, no fue virulenta y formaba placa pequeña; RP-9 presentó un Glu en esta posición mientras que RP-2ms una Lys. Esta mutación fue localizada en la región externa del dominio I (unión entre dominio I y II) la cual, es importante para la formación del dímero y la interacción de la proteína E, con las moléculas de la superficie celular (Chen y col., 1996). Estos resultados confirman nuestra observación de que mutaciones específicas en la región de dimerización de E, están directamente afectando la capacidad virulenta de la cepa.

Varios investigadores han notado que hay un incremento en la severidad de la expresión de la enfermedad en epidemias del dengue. Por ejemplo, durante la epidemia de Cuba en 1981, la incidencia de casos graves del DHF y el grado de letalidad se incrementó con el tiempo y fue más alto al final de la epidemia (Kouri y col., 1987). Recientemente la epidemia de dengue en Queensland, la incidencia de dengue hemorrágico aumentó conforme avanzaba la epidemia (Streatfield y col., 1993). Estas observaciones sugieren que la virulencia en dengue aumenta conforme el virus infecta a la población humana varias veces. Un análisis preliminar ha demostrado que las cepas que causan DHF tienden a replicarse más rápidamente en células mononucleares de torrente sanguíneo que las que producen dengue clásico (Kliks, 1990, Morens y col., 1991), por lo tanto, la densidad de la población viral que presenta virulencia severa, se incrementa. Sin embargo, desafortunadamente no se han hecho comparaciones a nivel de secuencia entre aislados obtenidos en la fase temprana y tardía de la epidemia, para conocer si hay cambios a nivel de secuencia que correlacionen con la virulencia de la cepa.

Entre los factores que influyen en la virulencia de la cepa se encuentran los factores genéticos. Con el virus del dengue se han reportado una asociación entre el tipo de haplotipo que se expresa y el grado de manifestación de la enfermedad. En Cuba se ha visto que pacientes que expresan el haplotipo, HLA-B "blank", HLA-A1 y HLA-Cw1, presentan DHF

(Paradoxa y col., 1987). En Tailandia, se ha asociado el DHF en personas que presentan el haplotipo HLA-B "blank" y HLA-A2 (Chiewlisp y col., 1981). Otro factor que influyen en la expresión de severidad de la enfermedad es el nutricional. Curiosamente se ha reportado que en niños con buena alimentación, más incidencia de DHF que en niños malnutridos (Thisyakorn, y col., 1993), lo cual implica que el status del sistema inmunológico es también importante en el tipo de manifestación de la enfermedad.

Sin embargo, hay que tomar en cuenta que aunque las modificaciones en la proteína estructural E son importantes para la virulencia, otras modificaciones en las proteínas no estructurales o en las regiones 3' y 5' no codificable, también podrían influir en la expresión de la misma. Un ejemplo de esto son los estudios llevados a cabo con el virus quimérico DEN4/TBE, en el cual se ha observado que la eliminación del sitio conservado de glicosilación de la proteína no estructural NS1 tiene como consecuencia que el virus presente neurovirulencia atenuada en ratones adultos (Plentnev y col., 1993). Estudiar si otras proteínas no estructurales tales como NS3 Y NS5 que son componentes necesarios para la replicación del virus presentan determinantes que afecten la virulencia, proporcionará más información sobre los mecanismos de virulencia.

La clonación de poblaciones virales para reducir la variabilidad, para preservar y manipular una serie completa de variantes abre una nueva dimensión en los análisis de función y/o estructura de virus RNA, ya que permite mapear e identificar nuevos locis en donde la prevalencia de mutaciones se relaciona con mutantes de escape y/o con diferentes grados de virulencia, lo cual es importante en el diseño para la generación de vacunas.

Finalmente, cabe mencionar que aunque los resultados obtenidos en el presente trabajo, apoyen de manera importante la participación de regiones específicas en la glicoproteína de superficie viral en la expresión de neurovirulencia, es necesario llevar a cabo el desarrollo de clonas revertantes, las cuales confirmarían nuestra hipótesis de trabajo.

REFERENCIAS

- Aihara, I., Ghunming, R., Yong-Xin, Y., Lee, T., Watanabe, K., Komiya, T., Sumiyoshi, H., Hashimoto, H., and Nomoto, A. 1991. Identification of mutations that occurred on the genome of Japanese encephalitis virus during attenuation process. *Virus Genes* 5, 95-109.
- Argall, K.G., Armati, P.J., King, N.J.C. and Douglas, M.W. 1991. The effects of West Nile virus on MHC class I and II antigen expression by rat Schwann cells in vitro. *J. Neuroimmunol.* 35, 273-284.
- Bao, S., King, N.J.C., and Los Remedios, C.G. 1992. Flavivirus induces MHC antigen on human myoblasts: a model of autoimmune myositis?. *Muscle Nerve* 15, 1271-1277.
- Barnes, W. J. S., Rosen, L., 1974. Fatal haemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23, 495-506.
- Barrett, A.D., Monath, T.P., Cropp, C.B., 1990. Comparison of wild type yellow fever virus by passage in HeLa cells. *J. Gen. Virol.* 71, 2301-2306.
- Bazan, J. K. and Fletterick, R. J. 1989. Detection of a trypsin like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* 171, 637-639.
- Block, J., McWilliam, S. M., Butter, H. C., Gibbs, A. J., Weiller, G., Herring, B. L. Hemsley, A. C., Aaskov, J. G., Yokson, S., and Bhamaraprovati, N., 1992. Comparison of a dengue 2 virus and its candidate vaccine derivative sequence relationships with the flaviviruses and other viruses. *Virology* 187, 573-590.
- Blum, J. S., Diaz, R., Diment, D.S., Fiani, M., Mayorga, L., Rodman, J.S., and Stahl, P.D. 1989. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 54, 287-292.
- Brinton, M. A. 1988. Replication of flavivirus. *Virology*, 200, 327-365.
- Bukowski, J.F., Kurane, I., Lai, C.-J., Bray, M., Falgout, B. and Ennis, F.A. 1989. dengue virus-specific cross-reactive CD8+ human cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 63, 5086-5091.
- Burke, B., McCrae, M.A., Desselberger U. 1994. Sequence analysis of two porcine rotaviruses differing in growth in vitro and in pathogenicity: distinct VP4 sequences and conservation of NS53, VP6 and VP7 genes. *J. General. Virol.* 75, 2205-2212.
- Cecilia, D., and Gould, E. A. 1991. Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization-resistant mutants. *Virology*. 181, 70-77.
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., Rice, C. M. 1990a. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 649-688.
- Chambers, T. J., McCourt, D. W., and Rice, C. M. 1990b. Production of yellow fever virus proteins in infected cells: identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. *Virology* 177, 159-174.
- Chambers, T. J., Weir, R. C., Grakoui, A., McCourt, D. W., Bazan, J. F., Fletterick, R. J. and Rice, C. M. 1990c. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from

yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 8898-8902.

Chang, D-M. and Shaio, M-F. 1994. Production of interleukine-1 (IL-1) and IL-1 inhibitor by human monocytes exposed to dengue virus. *J. Infect. Diss.* **170**, 811-817.

Chaturverdi, U. C., Dhawan, R., Khanna, M., Mathur, A. 1980. Production of cytotoxic factor in the spleen of dengue virus- infected mice. *Immunology* **40**, 665-671.

Chaturverdi, U.C., Pahwan M. and Mathur, A. 1987. Dengue virus-inducer helper t Cells. *Indian. J., Med. Res.* **86**, 1-8.

Chaturverdi, U.C., Dhawan, R., Khanna, M., and Mathur, A. 1991. Breakdown of the blood-barrier during dengue virus infection of mice. *J. General. Virol.* **72**, 859-866.

Chaturverdi, P., Chaturverdi, U.C. and Mukherjee, R. 1992. Transmission of dengue virus-induced helper signal to B cell via macrophages. *Int. J. Exp. Path.* **73**, 773-782.

Chen, W., Kawano, H., Men, R., Clark, D. and Lai C-J. 1995. Construction of intertypic chimeric dengue viruses exhibiting type 3 antigenicity and neurovirulence for mice. *J. Virol.* **69**, 5186-5190.

Chen, L-K., Lin, Y-L., Liao, C-L., Lin, C-G., Huang, Y-L., Yeh, C-T., Lai, S-C., Jan, J-T., and Chim, C. 1996. Generation and characterization of organ-tropism mutants of Japanese Encephalitis virus in vivo and in vitro. *Virology*, **223**, 79-88.

Chiewslip, P., Scott, R.M., Bhamarapravavti, N. 1981. Histocompatibility antigens and dengue haemorrhagic fever. *Am. Trop. Med. Hyg.* **30**, 1100-1105.

Choppin, P.W. 1986. Basic Virology. In "Virology in Medicine" (Rothschild H and Cohen C.J. , Ed.), Oxford University Press, Oxford. pp 3-45.

Chu, P.W.G. and Westaway, E.G. 1985. Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. *Virology* **104**, 68-79.

Chunge, E., Deubel, V., Cassar, O., Laille, M., and Martin, P.M. 1993. 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. *J. General Virol.* **74**, 2765-2770.

Chunge, E., Cassar, O., Drouet, M.T., Guzman, M.G., Laille, M., Rosen, I. and Deubel, V. 1995. Molecular epidemiology of dengue 1 and dengue 4 viruses. *J. General. Virol.* **76**, 1877-1884

Coelen, R.J., and McKenzie J.S. 1988. *J.General.Virol.* **69**, 1903-1912.

Cohen, S. N. and Halstead, S. B. 1964. Shock associated with dengue infection I. the clinical and physiological manifestations of dengue haemorrhagic fever in Thailand 1964. *J. Pediatric* . **68**, 448-456.

Coia, G., Parker, M.D., Speight, G., Byrne, M.F., y Westaway, E.G. 1988. *J.General Virol.* **69**, 333-365.

Couteller, J-P., Van Der Logt, J.T. M., Heeson, F.W.A., Warner, G y Van Snick, Lj. 1987. IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infection. *J. Exp. Med.* **165**, 64-69.

- Cristina, J., Lopez, J. A., Albó, C., Barreno-García B., García J., Melero, J. A., and Portela, A. 1990. Analysis of genetic variability in human respiratory syncytial virus by the RNase A mismatch cleavage method: Subtype divergence and heterogeneity. *Virology* **174**, 126-134.
- Daughaday, C.C., Brandt, W.E., McCown, J.M. and Russell P.K. 1981. Evidence for two mechanisms of dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. *Infect. Immun.* **32**, 469-473.
- Deubel, V., Noguera, R.M., Drouot, M.T., Zeller, H., Reynes, J.M. and Ha, D.Q. 1993. Direct sequencing of genomic cDNA fragments amplified by the polymerase chain reaction for molecular epidemiology of dengue-2 viruses, *Arch. Virol.* **129**, 197-210.
- Desprès, P., Ruiz-Linares, A., Cahour, A., Girard, M., Wychowski, C., and Bouloy, M. 1990. The 15 amino acid residues preceding the amino terminus of the envelope protein in the yellow fever virus polyprotein precursor act as a signal peptide. *Virus. Res.* **16**, 59-76.
- Dinarello, C.A. 1988. Biology of Interlukine-1. *FASEB J.* **2**, 108-115.
- Dougherty, J.P., and Temin, H.M. 1988. Determination of the rate of base-pair substitution and insertion mutation in retrovirus replication. *J. Virol.* **62**, 2817-2822.
- Dubois-Dalcq M., Holmes, K.V., Rentier, B. 1984. Assembly of envelope RNA viruses, Vienna, New York: Springer Verlag, pp. 120-148.
- Dunster, L.M., Gibson, C.A., Stephenson, J.R. 1990. Attenuation of virulence of flavivirus following passage in HeLa cells. *J. Gen. Virol.* **71**, 601-607.
- Eckels, K. H., Brandt, W. E., Harrison, V. R., McConn, J. M., Russell, P. K. 1976. Isolation of a temperature-sensitive dengue 2 virus under conditions suitable for vaccine development. *Infect. Immun.* **14**, 1221-1227.
- Falgout, B., Pethel, M., Zhang, Y-M., and Lai, C-J. 1991. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J. Virol.* **65**, 2467-2475.
- Falgout, B., Miller, R.H., and Lai, C. J. 1993. Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. *J. Virol.* **67**, 2034-2042.
- Fan, W., Mason, P.W. 1990. membrane association and secretion of the Japanese encephalitis virus NS1 protein from cells expressing NS1.cDNA. *Virology* **177**, 470-476.
- Freed, E.O., Delwart, E.L., Buchsacher, G.L. Jr., and Panganiban, A.T. 1992. A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 70-74.
- Gately, M.K., Anderson, T.D., Hayes, T.J. 1988. Role of asialo-GM₁ positive lymphoid cells in mediating the toxic effects of recombinant IL-2 in mice. *J. Immunol.* **141**, 189-196.
- Gorbalenya, A. E., Donchenko, A. P., Koonin, E. V. and Blinov, V. M. 1989. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pest- viruses may be serine proteases. *Nucl. Acid. Resch.* **17**, 3889-3897.
- Gould, E.A., Buckely, A., Barrett, A.D.T., Cammack, N. 1986. Neutralizing (54K) and non-neutralizing (54K and 48K) monoclonal antibodies against structural and non-structural yellow fever virus proteins confer immunity in mice. *J. General. Virol.* **67**, 591-595.

Green, S., Kurane, I., Edelman, R., Tacket, C.O., Eckels, K.H., Vaughn, D.W., Hoke Jr, C.H. and Ennis, F.A. 1993. Dengue virus-specific human CD4⁺ T-lymphocyte responses in a recipient of an experimental live-attenuated dengue virus type 1 vaccine: bulk culture proliferation, clonal analysis and precursor frequency determination. *J. Virol.* **67**, 5662-5967.

Grimaila, R. J., Fuller, B. A., Rennert, P. D., Nelson, M. B., Hammarskjöld, M. L., Potts, B., Murray, M., Putney, S. D. and Gray, G. 1992. Mutations in the principal neutralization determinant of human immunodeficiency virus type 1 affect syncytium formation, virus infectivity, growth kinetics, and neutralization. *J. Virol.* **66**, 1875-1883.

Grunewald, J., Jeddi-Tehrani, M., Pisa, E., Janson, C.H., Andersson, R., and Wigzell. 1992. Analysis of JB gene segment usage by CD4⁺ and CD8⁺ human peripheral blood T lymphocytes. *Int. Immunol.* **4**, 643-650.

Grun, J.B., Brinton, M.A. 1988. Separation of functional West Nile virus replication complexes from intracellular membrane fragments. *J. General. Virol.* **69**, 3121-3127.

Guirakhoo, F., Heinz, F.X., Mandl, C.W., Holzmann, H., and Kunz, C.J., 1991. *J. General. Virol.* **72**, 1323-1329.

Halstead, S.B. and O'Rourke, E.J. 1977. Dengue virus and mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* **146**, 201-217.

Halstead, S. B. 1979. Immune enhancement of dengue virus infection in Rhesus monkey by passively transferred antibody. *J. Infect. Dis.* **140**, 527-533.

Halstead, S. B. 1980. Immunological parameters of togavirus disease syndromes. In "The Togaviruses" (R.W. Shlesinger, Ed.), Academic Press, New York, pp. 107-173.

Halstead, S. B. 1980a. Dengue haemorrhagic fever- a public health problem and a field for research. *Bull. W.H.O.* **58**, 1-21.

Halstead, S. B. 1981. The pathogenesis of dengue: Molecular epidemiology in infectious disease. *Am.J. Epidemiol.* **114**, 632-648.

Halstead, S. B., Venkatesan, C. N., Gentry, M. K., Arsen, L. K. 1984. Heterogeneity of infection enhancement of dengue 2 strains by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **132**, 1529-1532.

Halstead, S. B. 1988. Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. *Science* **239**, 476-481.

Halstead, S. B. 1990. Global epidemiology of dengue hemorrhagic fever. *South Asian J. Trop. Med. Publ. Health* **21**, 636-645.

Halstead, S.B. 1994. Dengue, yellow fever and rabies. *Current Opinion Infect. Dis.* **7**, 559-563.

Hahn, C. S., Darlymple, J. M., Strauss, J. H., and Rice, C. M. 1987. Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 2119-2123.

Harrison, V. R., Eckels, K. H., Sagartz, J. W., Russell, P. K. 1977. Virulence and immunogenicity of a temperature-sensitive dengue 2 virus in lower primates. *Infect. Immun.* **18**, 151-156.

- Hase, T., Summers, P. L. and Eckels, K.H. 1989. Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. *Arch. Virol.* **104**, 129-143.
- Hasegawa, H., Yoshida, M., Shiosaaka, T., Fujita, S., and Kobayashi, Y. (1992). Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology*, **191**, 158-165.
- Heinz, F. X., Kunz, C. 1986. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv. Vir. Res.* **31**, 103-168.
- Holland, J., Spindler, K., Harodyski, F., Grabau, E., Nochol, S., and Vanderpal, S. 1982. *Science* **215**, 1577-1585.
- Holzmann, H., Heinz, F. X., Mandl, C. W., Guirakhoo, F., and Funz, C. 1990. A single amino acid substitution in envelope protein E of tick-borne encephalitis virus leads to attenuation in the mouse model. *J. Virol.* **64**, 5156 - 5159.
- Hori, H., Igarashi, A., Yoshida, I., and Tagaki, M. 1986a., *Acta Virol.* **30**, 428-431.
- Hori, H., Morita, K., and Igarashi, A. 1986b. *Acta Virol.* **30**, 353-359.
- Igaroshi, A., 1984. A hypothesis on the geographical distribution of arboviruses. *Trop. Med.* **26**, 173-180.
- Jan, L-R., Yang, C-S., Trenr, D. W., Falgout, B., and Lai, C-J. 1995. Processing of Japanese encephalitis virus non-structural proteins: NS2B-NS3 complex and heterologous proteases. *J. Gen. Virol.* **76**, 573-580.
- Jaroslav, Z., Kurane, I., Leporati, A.M., Ibe, M., Takiguchi, M., Zeng, L.L., Briton, M.A. and Ennis, F.A. 1995. A single nine-amino acid peptide induces virus-specific, CD8+ human cytotoxic T lymphocyte clones of heterogeneous serotype specificities. *J. Exp. Med.* **182**, 853-863.
- Jaton, J., Brandt, D. Ch., Vasalli, M. The isolation and characterization of immunoglobins, antibodies and their constituent polypeptide chain. In *Immunological methods*. Lefkovits, I. and Pernis, B. Ed. Academic Press. New York. 1970. p 44.
- Jennings, A.D., Whitby, J.E., Minor, P.D. 1993. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope protein of the wild-type French viscerotropic strain of yellow fever virus, and the French neurotropic vaccine strain derived from it. *Virology*, **192**, 692-695.
- Jiang, W.R., Lowe, A., Higgs, S. 1993. Single amino acid codon changes detected in Louping ill virus antibody resistant mutants induce reduced neurovirulence. *J. Gen. Virol.* **74**, 931-935.
- Kaufmann, S.H.E. and Reddehase, M.J. 1989. Infection of phagocyte cells. *Curr. Opin. Immunol.* **2**, 43 -49.
- Keller, R., Keist, R., and Joller, P. 1995. Macrophage response to microbial pathogens: modulations of the expression of adhesion, CD14, and MHC class II molecules, by viruses, bacteria, protozoa and fungi. *Scand. J. Immunol.* **42**, 337-344.
- Khanna, M., Chaturverdi, U. C., Dhawan, R., Tekwani, B.L. and Pandey, V. C. 1991. Presence of Ca²⁺ is obligatory for the cytotoxic activity of dengue virus-induced cytotoxic factor. *Immunology*, **72**, 73-78.

- Kim, C.H., Winton, J.R., and Leong, J.C. 1994. Neutralization-Resistant variants of infectious hematopoietic necrosis virus have altered virulence and tissue tropism. *J. Virol.* **68**, 8447-8453.
- King, N.J., and Kesson, A.M. 1988. Interferon-independent increases in class I major histocompatibility complex antigen expressing follow flavivirus infection. *J. General Virol.* **69**, 2535-2543.
- Kliks, S. 1990. Antibody-enhanced infection of monocytes as the pathogenetic mechanism for severe dengue illness. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **6**, 993-998.
- Konthy, U., Kurane, I., and Ennis, F.A. 1988. Gamma interferon augments Fc receptor-mediated dengue virus infection of human monocytic cells. *J. Virol.* **62**, 3928-3933.
- Kouri, G.P., Guzman, M.G., Bravo, J.R. 1987. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**, 821-823.
- Krausslich, H. G., and Wimmer, E. 1988. Viral proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 701-754.
- Kurane, I., Innis, B.L., Nisalak, A., Hoke, C., Nimmanitya, S., Meager, A., and Ennis, F.A. 1989. Human T cell cell responses to dengue virus antigens: proliferative responses and interferon gamma production. *J. Clin. Invest.* **83**, 506-513.
- Leary, K., y Balir, C.D. 1980. Sequential events in the morphogenesis of Japanese encephalitis virus. *J. Ultrastruct. Res.* **72**, 123-129.
- Lin, C., Chambers, T. J., and Rice, C. M. 1993. Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-NS3 proteinase is a prerequisite for processing at downstream 4A/4B signalase site. *J. Virol.* **67**, 2327-2335.
- Liu, Y., King, N.J.C., Kesson, A.M., Blanden, R.V. and Mullbacher, A. 1989. Flavivirus infection up regulates the expression of class I and II major histocompatibility antigens of an enhances T cell recognition of astrocytes in vitro. *J. Neuroimmunol.* **21**, 157-168.
- Lobigs, M., Dalgarno, L., Schlesinger J.J. 1987. Location of a neutralization determinant in the E protein of yellow fever (17D vaccine strain). *Virology* **165**, 245-255.
- Lobigs, R., Usha, R., Nestorowicz, A., Marshall, I. D., Weir, R. C., and Dalgarno, L. 1990. Host cell selection of Murray Valley encephalitis virus variants altered at an RGD sequence in the envelope protein and in mouse virulence. *Virology* **176**, 587-595 .
- Lopez-Galindez, C., Lopez, J.A., Melero, J.A., de la Fuente, L., Martinez, C., Ortin, J. and Perucho, M. 1988. Analysis of genetic variability and mapping of point mutations in influenza virus by RNase A mismatch method. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **85**, 3522-3526.
- Mandl, C. W., Heinz, F. X. and Kunz, C. (1988). Sequence of structural proteins of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis with other flavivirus. *Virology.* **166**, 197-205.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harborg Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Markoff, L. 1989. In vitro processing of dengue virus structural proteins, cleavage of the premembrane protein. *J. Virol.* **63**, 3345-3352.

- Markoff, L., Chang, A. and Falgout, B. 1994. Processing of flavivirus structural glycoproteins: Stable membrane insertion of premembrane requires the envelope signal peptide. *Virology* 204, 526-540.
- Mason, P. W. 1989. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology* 169, 354-364.
- Matloubian, M., Kolhekar, S.R., Somasundaram, T., Ahmed, R. 1993. Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: Importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 67, 7340-7349.
- Maxam, A.M., and Gilbert, W., 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65, 499.
- Milns, N. R. and Gardner, I. D. 1989. Maternal T cells and human pregnancy outcome. *J. Reproductive Immunology.* 15, 175-178.
- Monath, T. P., Wands, J. R., Hill, L. J. 1986 Geographic classification of dengue 2 virus strain by antigen signature analysis. *Virology.* 154, 313-324.
- Morens, D.M., NMarchette, N.J., Chu, M.C., Halstead, S.B. 1991. Growth of dengue type virus isolates in human peripheral blood leukocytes correlates with severe and mild dengue disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45, 644-651
- Müllbacher, A., King, N.J.C., 1989. Natural killer cell lysis of target cells is influenced by B₂- microglobulina expression. *Scan. J. Immunol.* 30, 21-29.
- Nagararkatti, P., D'Souza, M., and Rao, K.M. 1978. Use of sensitized spleen cells in capillary tube migration inhibition test to demonstrate cellular sensitization to dengue virus in mouse. *J. Immunol. Methods* 23, 341-348.
- Naside, A., Monath, T. P. Vandenberg, J., Tomori, O., Calisher, C. H., Hurtegen, X., Munube, G. R. R., Sorungbe A. O. O., Okafor, G. C. and Wali, D. S. 1993. Yellow fever vaccination and pregnancy: a four year prospective study. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 337-339.
- Ni, H. and Barret, D.T., 1996. Molecular differences between wild-type Japanese encephalitis virus strains of high and low mouse neuroinvasiveness, *J. General Virol.* 77, 1449-1455.
- Nichols, R. C. and Raben, N. (1994). Hints for direct sequencing of PCR-generated single stranded DNA. *Biotechniques* 117, 412-414.
- Nitayaphan, S., Grant, J. A., Chang, J. A., Chang, G. J., and Trent, D. W. 1990. Nucleotide sequence of the virulent SA-14 strain of Japanese encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, SA-14-14-2. *Virology* 177, 541-552.
- Nottay, B.K., Kew, O.M., Hatch, M.H., Heyward, J.T., and Obijeski, J.F. 1981. *Virology* 108, 405-423.
- Nowak, T. and Wengler, G. 1987. Analysis of disulfides present in membrane protein of West Nile flavivirus. *Virology.* 156, 127-137.
- Nowak, T., Färber, P. M., Wengler, G. 1989. Analysis of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology* 169, 365-376.

- Okamoto, Y., Gagnon, S.J., Kurane, I., Loporati, M., and Ennis, F.A. 1994. Preferential Usage of T-cell receptor VB17 by dengue virus-specific human T lymphocytes in a donor with immunity to dengue virus type 4. *J. Virol.* **68**, 7614-7619.
- PAHO. 1992. Dengue and Dengue hemorrhagic fever in the Americas: an overview of the problem. *Epidemiol Bull* **13**, 9-10.
- Pahwa, M., Chaturverdi, U.C., Mathur, A. 1988. Dengue virus-induced production of helper factor by T-lymphocytes of spleen. *Indian. J. Med. Microbiol.* **6**, 1-10.
- Palese P., and Schulman, J.L. 1976. Differences in RNA patterns of influenza viruses. *J. Virol.* **17**, 876-884.
- Pang, T., Wong, P.Y., and Pathmanathan, R. 1982. Induction and characterization of delayed-type hypersensitivity to dengue virus in mice. *J. Infect. Dis.* **146**, 235-242.
- Pang, T. 1983. Delayed-type hypersensitivity: probable role in pathogenesis of dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome. *Rev. Infect. Dis.* **5**, 346-352.
- Pang, T., Devi, S., Wong, P. Y., McKenzie, I.F.C., and Yap, K.L. 1984. Lyt phenotype and H-2 compatibility requirements of effector cells in the delayed-type hypersensitivity response to dengue virus infection. *Infect. Immun.* **43**, 429-431.
- Paradoa Perez, M.L., Trujillo, Y., Basanta, P. 1987. Association of dengue hemorrhagic fever with the HLA system. *Hematologia*, **20**, 83-87.
- Pletnev, A .G., Bray, M., and Lai, C-J. 1993. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue 4 viruses: Effects of mutations on neurovirulence in mice. *J. Virol.* **67**, 4956-4963.
- Preugschat, F., Yao, C-W., and Strauss, J. H. 1990. In vitro processing of dengue virus type 2 nonstructural protein NS2A, NS2b, and NS3. *J. Virol.* **64**, 4364-4374.
- Portefield, J.S. 1982. Immunological enhancement and the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. *J. Hyg.* **89**, 355-364.
- Randolph, V.B., Winkler, G., and Stollar, V. 1990. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. *Virology* **174**, 450-458.
- Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C., Harrison, S.C. 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 °A resolution. *Nature* **375**, 291-298.
- Rice C. M., Lenches, E. M., Eddy, S. R., Shin, S. J., Sheets, R. L., and Strauss, J. H. 1985. *Science* **229**, 726-735.
- Rice, C. M., Strauss, J. H. 1986. Structure of the flavivirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 2062-2066.
- Rizvi, N., Chaturverdi, U.C., Nagar, R. and Mathur, A. 1987. Macrophage functions during dengue virus infection: antigenic stimulation of B cells. *Immunology*, **62**, 493.
- Roberts, N.J., Prill, A.H., Mann, T.N. 1986. Interlukine 1 and interlukine 1 inhibitor production by humans macrophages exposed to influenza virus or respiratorial syncytial virus. *J. Exp. Med.* **163**, 511-519.
- Rosen, L., 1977. The emperor's new clothes revisited or reflections on the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**, 337-343.

Rota, J. S., Hummel, K. B., Rota, P. A. and Bellini, W. J. 1992. Genetic variability of the glycoprotein genes of current wild-type measles isolates. *Virology*. **188**, 135-142.

Ruiz-Linares, A., Cahour, A., Depres, A., Girard, P., and Bouloy, M. 1989. Processing of yellow fever virus polyprotein, role of cellular proteases in maturation of the structural proteins. *J. Virol.* **63**, 4199-4209.

Sabin, A. B. and Schlesinger, R. W. 1945. Production and immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science*. **101**, 640-642.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., Hill, D.F., and Petersen, G.B. 1992. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ 24 DNA. *J. Mol. Biol.* **162**:729.

Santagati, M.G., Määttä, J.A., Itäranta, P.V., Salmi, A.A., and Hinkanen, A.E. 1995. The Semliki Forest virus E2 gene as a virulence determinant. *J. General. Virol.* **76**, 47-52.

Scott, T.M., Weaver, S.C., and Mallanpalli, V.L. 1994. Evolution of mosquito-borne virus. *In the Evolutionary Biology of viruses*. pp 293-324. Edited by S.S. Morse. New York:Raven Press.

Schlesinger, R.W. 1977. Dengue viruses. In "Virology monographs" continuation of Handbook of virus research (S. Gard, C.Hallauer, Ed.). Springer-Verlag, New York. pp. 26-39.

Schlesinger, R. W., 1980. Virus-host interactions in natural and experimental infections with alphavirus and flaviviruses, in "The Togaviruses" (R.W. Schlesinger, ed.), Academic Press, New York, pp 83-106.

Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W., Walsh, E.E., 1987. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J. General. Virol.* **68**, 853-857.

Schlesinger, J.J., Chapman, S., Nestorowicz, A., Rice, R.M., Ginocchio, T.E. and Chambers, T.J. 1996. Replication of yellow fever virus in the mouse central nervous system: comparison of neuroadapted and non-neuroadapted virus and partial sequence analysis of the neuroadapted strain. *J. General Virol.* **77**, 1277-1285.

Schur, P.H., Chang, D.M., Baptiste, P., Uhteg, L., Handson, D.C. 1989. Human monocytes produce Il-1 and a inhibitor of Il-1 in response to different signals. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **57**, 45-63.

Shaw, A., Rottier, P. J. M., and Rose, J. K. 1988. Evidence for the loop model of signal-sequence insertion into the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* **85**, 7592-7596.

Shen, J., Devery, J.M. and King, N.J.C. 1995. Early induction of interferon-independent virus-specific ICAM-1 (CD54) expression by flavivirus in quiescent but not proliferating fibroblasts-implications for virus-host interactions. *Virology*, **208**, 437-449.

Shioda, T., Oka, S., Ida, S., Nokiara, K., Toriyoshi, H., Mori, S., Takebe, Y., Kimura, S., Shimada, and Nagai, Y. 1994. A naturally occurring single basic amino acid substitution in the V3 region of the human immunodeficiency virus type 1 env protein alters the cellular host range and antigenic structure of the virus. *J. Virol.* **68**, 7689-7696.

- Siegel, V., 1995. A Second signal recognition event required for translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell* **82**, 167-170.
- Simon, S.M., and Blobel, G. 1991. A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* **65**, 371-380.
- Smith, F.I., Parvin, J.D., and Palese, P. 1986. Detection of single base substitutions in influenza virus RNA molecules by denaturing gradient gel electrophoresis of RNA-RNA or DNA-RNA heteroduplex. *Virology* **150**, 55-64
- Speight, G., Coia, G., Parker, M. D. and Westaway, E. G. 1988. Gene mapping and positive identification of non-structural proteins NS2A-NS2B, NS3, NS4B and NS5 of the flavivirus Kunjin and their cleavages sites. *J. Gen. Virol.* **69**, 23-24.
- Steinhauer, D.A. and Holland, L.J.J. 1986. *J. Virol.* **57**, 219-228.
- Stollar, V., Schlesinger, R.W. and Stevens, M. 1967. Studies on the nature of dengue virus. III. RNA synthesis in cells infected with type 2 dengue virus. *Virology* **33**, 650-658.
- Streatfield, R., Biebley, G., Sinclair, D. 1993. A primary dengue 2 epidemic with spontaneous hemorrhagic manifestations. *Lancet*, **342**, 560-561
- Sumiyoshi, H., Hoke, C.H., Trent, D.W. 1992. Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. *J. Virol.* **66**, 5425-5431.
- Suvatte, V., Malasist, P., Sarasombath, S., Wasi, C. 1988. Immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome. In Proceeding of First International Congress of Tropical Paediatrics.
- Takegami, T., Sakamuro, D., and Furukawa, T. 1994. Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS3 has RNA binding and ATPase activities. *Virus Genes* **9**, 105-112.
- Theiler, M., Smith, H.H., 1937. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *J. Exp. Med.* **65**, 787-800
- Thisyakorn, U., Nimmannitya, S., 1993. Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. *Clin. Infect. Dis.* **16**, 295-297.
- Trent D.W., Grant, J.A., Orridam, A.V and Monath, TP. 1981. *Virology* **114**, 319-332.
- Trent, D.W., Grant, J.A., Rosen, L., and Monath, T.P. 1983. Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology* **128**, 271-284.
- Trinchieri, G., Santoli, D. 1978. Antiviral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. *J. Exp. Med.* **147**, 1314-1333.
- Von Heijns G. 1988. Transcending the impenetrable: How proteins come to terms with membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **947**, 307-333.
- Walker, P.J., Henschal, E.A., Block, J., Repik, P.M., Henschal L.S., Burke, D.S., Robbins, S.J., and Gorman B.M. 1988. Variation in dengue type 2 viruses isolated in Bangkok during 1980. *J. General Virol.* **69**, 591-602.
- Walter, P., Ibrahimi, I., and Blobel, G. 1981. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum I. signal recognition protein (SRP) binds to in vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell. Biol.* **91**, 545-550.

- Walter, P., and Lingappa, V.R. 1986. Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **2**, 499-516.
- Wengler, G., Wengler, G. and Gross, H.J. 1978. Studies on virus specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flavivirus. *Virology* **89**, 423-437.
- Wengler, G., Czaya, G., Färber, P. M. and Hegeman, J. H. 1991. *In vitro* synthesis of West Nile virus proteins indicates that the amino-terminal segment of the NS3 protein contains the active centre of the protease which cleaves the viral polyprotein after multiple basic amino acids. *J. Gen. Virol.* **72**, 851-858.
- Westaway, E.G. 1980. Replication of flavivirus In: Schlesinger, R. W. Ed. The Togaviruses, biology, structure, replication: New York: Academic Press pp. 531-584.
- Westaway, E. G. 1987. Flavivirus replication strategy. *Adv. Vir. Resch.* **33**, 45-90.
- Winkler, G., Mazwel, S.E., Riemmler, C., Stollar, V. 1989. Newly synthesized dengue 2- virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology* **171**, 302-305.
- World Health Organization (WHO). 1985a. Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases. Teach. Rep. Ser. no. 719, WHO, Geneva.
- World Health Organization (WHO). 1985b. Viral haemorrhagic fevers. Tech. Rep. Ser. no. 721111. WHO, Geneva.
- Yamshchikov, V. F. and Compans, R. W. 1993. Regulation of the late events in flavivirus protein processing and maturation. *Virology* **192**, 38-51.
- Yoksan, S., Bhamarapravati, N., Halstead, S.B., 1986. Dengue virus vaccine development: Study on biological markers of uncloned dengue 1-4 viruses serially passaged in primary kidney cells. In: St Georg TD, Kay, B.H., Block, J.; eds. Arbovirus research in Australia. Brisbane: Proceedings of the Fourth Symposium CSIRO/QIMR, 35-38.
- Yu, Y.X., Zhang, G.M., Guo, Y.P., 1988. Safety of a live-attenuated Japanese encephalitis virus vaccine (SA-14-14-2) for children. *Amr. J. Trop. Med. Hyg.* **39**, 214-217.

A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice

Irma J. Sánchez and Blanca H. Ruiz

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (Ciudad Universitaria Apartado Postal 70228, 04510 México, D.F., México)

Eleven clones of dengue virus 2 Mexican strain were selected by the size of their lytic plaques. Nucleotide sequences of the clones producing large plaques (D2ML2, D2ML3 and D2ML4) revealed 11 mutations, 10 of which were silent. The substitution at nucleotide 1168 (G → C) generates one amino acid difference at residue 390 (Asp → His) of the envelope protein (E). These clones showed high virulence in suckling mice when inoculated intracerebrally (≥ 70% mortality). However, the clones which showed small lytic plaques (D2MS1, D2MS2 and D2MS4) displayed a substitution from Asp → Asn at the same position and had attenuated virulence. Based on these data, we suggest that substitution of Asp → His at residue 390 perhaps affects a functionally important structural element that could be a determinant of dengue neurovirulence. This substitution falls in domain III of the E protein, which plays an important role in viral binding; therefore, we propose that the substitution affects virulence and cellular tropism.

Dengue is caused by four different serotypes of the dengue virus. Dengue fever (DF) is acute, mosquito-transmitted viral disease characterized by fever, headache, arthralgia, myalgia and rash; however, some patients manifest severe clinical symptoms of haemorrhage (dengue haemorrhagic fever; DHF) and shock (dengue septic shock; DSS) (Monath, 1986). It has been proposed that immunopathological mechanisms play important roles in the development of DHF/DSS (Halstead, 1988).

Rosen (1977) has proposed that DHF/DSS is caused by dengue virus variants of increased pathogenic potential. The potential importance of natural variation among dengue virus

strains has recently been restated by several authors (Igarashi, 1984; Monath, 1986) and this variation may be the origin of virulence in human hosts and of infective capacity of mosquito vectors. The heterogeneity of epidemic dengue virus strains has been shown both serologically and at the molecular level. However, it is not clear which genomic changes may be related with the virulence of a particular strain.

Dengue virus has an approximately 11 kb single-stranded RNA genome (Rice *et al.*, 1986) and three structural proteins: the capsid (C), the membrane (M) protein and the envelope (E) protein. The E protein (≈ 500 aa) acts as the viral haemagglutinin, induces a protective immune response and mediates receptor-specific virus attachment to the cell surface; it is also the major antigenic component on the surface of the dengue virion (Ng & Lau, 1988). The E protein is thought to play a role in the pathogenicity of several viruses, either by defining cellular tropism or by affecting virus penetration (Russell *et al.*, 1989).

Specific sequence changes in the E protein have yet to be directly associated with alterations in the biological activity of flaviviruses. However, sequence differences in the E-gene-attenuated strains of Yellow fever virus (YFV), Japanese encephalitis virus (JEV), Tick-borne encephalitis virus (TBE) and Murray Valley encephalitis virus (MVE) have been associated with reduced pathogenicity (Hahn *et al.*, 1987; Nitayaphan *et al.*, 1990; Holzmann *et al.*, 1990; Lobigs *et al.*, 1990). Earlier studies suggested that new dengue isolates contain mixtures of virion populations with different virulence properties. A mixture of large- and small-plaque variants were also detected in a DEN-2 strain isolated from a human case (Eckels *et al.*, 1976). Furthermore, the small-plaque variant appeared to correlate with mouse virulence, temperature sensitivity and attenuation in non-human primates (Harrison *et al.*, 1977).

During plaque purification of a Mexican strain isolate of dengue virus (200787/1983) serotype 2 (D-2M), we detected D-2M clones with plaque sizes remarkably different from one another. To investigate whether significant differences were present between the E protein clones with different lytic plaque size and the possibility that they could influence the expression of virulence, we isolated, cloned and purified 11 stable clones with different plaque sizes on LLC-MK2 cell monolayers and

Author for correspondence: Irma J. Sánchez.
Fax +52 5500048. e-mail 777

The sequence of the dengue virus 2 Mexican strain has been deposited in the GenBank database under the DENPPSP library with the accession number LD 4561.

L. J. Sánchez and B. H. Ruiz

Table 1. Characteristics of D-2M virus clones

Virus	Plaque size (mm)	Common bands in the RNA fragment patterns (%) [*]	No. of dead mice/no. of treated mice (%) [†]	No. of mice with severe infection/no. of treated mice (%) [†]	No. of mice with mild infection/no. of treated mice (%) [†]	Neurovirulence in mice (100 LD ₅₀)
D-2M parent Clones	0.5 to 4.0 (variable)	ND	3/10 (30)	7/10 (70)	0/10	Medium
D2MS1	> 1	100.0	0/10 (0)	1/10 (10)	9/10 (90)	Low
D2MS2		100.0	0/10 (0)	2/10 (20)	8/10 (80)	Low
D2MS3		83.7	1/10 (10)	8/10 (80)	1/10 (10)	Medium
D2MS4		100.0	0/10 (0)	2/10 (20)	8/10 (80)	Low
D2MM1	1.5-2.0	94.7	2/10 (20)	8/10 (80)	0/10 (0)	Medium
D2MM2		76.5	0/10 (0)	10/10 (100)	0/10 (0)	Medium
D2MM3		90.0	0/10 (0)	8/10 (80)	1/10 (10)	Medium
D2MM4		100.0	0/10 (0)	3/10 (30)	7/10 (70)	Low
D2ML2	3.0-4.0	76.5	9/10 (90)	1/10 (10)	0/10 (0)	High
D2ML3		78.2	8/10 (80)	2/10 (20)	0/10 (0)	High
D2ML4		76.5	7/10 (70)	3/10 (30)	0/10 (0)	High

of common bands

* The percentage bands calculated as (Common bands in a pair of virus/Total bands in the pair of viruses) x 2 x 100.

† The assays of neurovirulence estimate were performed twice in suckling mice in groups of ten, inoculated i.c. 6×10^6 p.f.u. of each clone per animal and observing them for 31 days.

evaluated them in a murine encephalitis model (BALB/c suckling mice). Several large, medium and small plaques were selected and subjected to repeated plaque purifications, until homogeneous plaque size populations were obtained. Three clones were obtained (D2ML2, D2ML3 and D2ML4), producing plaques of 3-4 mm diameter; 4 clones (D2MM1, D2MM2, D2MM3 and D2MM4) producing plaques of 1.5-2 mm diameter, and 4 clones (D2MS1, D2MS2, D2MS3 and D2MS4) producing plaques of < 1 mm diameter (Table 1). The viral stocks were separated and used to purify viral RNA and to inoculate it intracerebrally (i.c.) into BALB/c suckling mice.

We applied the RNaseA mismatch detection method to analyse the genetic variability of RNA before sequence analysis of clone RNA to obtain a general pattern of the genomic heterogeneity. Viral RNA prepared from each D-2M clone was used for the assay and a radioactive antisense RNA probe corresponding to the E gene of the D-2PR strain was synthesized with T7 RNA polymerase using PvuII-pGEM4/E. RNA:RNA hybrids were digested with 60 µg of RNaseA (15 min at 37 °C) and the RNA fragments resistant to digestion were analysed by denaturing 6.8% and 4% gel electrophoresis.

A complex band pattern was observed with the full-length RNA probe, as expected. The digestion pattern was similar in several hybrids, with some differences. For instance D2MS2, D2MS4 and D2MM4 clones generated band patterns 100% identical to D2MS1. However, the band patterns of D2MS3, D2MM1 and D2MM3 were 83.7, 90.0 and 94.7% homologous, respectively. Finally, the D2MM2, D2ML2, D2ML3

and D2ML4 clones matched the bands of D2MS1 at a level of 78.2% or less (Table 1).

Mismatch cleavage results are indicative of genetic heterogeneity in the same viral isolate. However this assay did not reveal the absolute genetic differences between viral clones. To determine differences at the genome level, each clone was sequenced. The E gene, which codes for the viral envelope protein, was amplified and cloned in a sequencing vector or used in direct sequencing of the PCR product.

The nucleotide sequence of the E region of each clone was determined and they were compared with one another and with the sequences of the D-2M strain. Most mutations were silent (Table 2). When the amino acid sequences from clones with small plaque size (D2MS1, D2MS2 and D2MS4) were compared, they displayed the same sequence, which differed from the sequence of parental D-2M strain at only one position, namely residue 390 of the E protein where the Asp residue of D-2M was replaced by Asn in clones with small plaque size (Fig. 1). The sequence of the D2MS3 clone contained two substitutions. One of them resulted in the same mutation as in the small plaque clone (Asp → Asn at residue 390) and the second in the substitution of Lys → Asn at position 388 (Table 2).

Comparison between the amino acid sequence of the E-coding region of D2ML2, D2ML3, D2ML4 and the D-2M strain sequence revealed no differences except at one location. The mutation consisted of the change of G in D-2M to C at nucleotide position 1168 in clones with large plaque size, resulting in the substitution of Asp in D-2M for His in D2ML

L. J. Sánchez and B. H. Ruiz

Table 1. Characteristics of D-2M virus clones

Virus	Plaque size (mm)	Common bands in the RNA fragment patterns (%) [*]	No. of dead mice/no. of treated mice (%) [†]	No. of mice with severe infection/no. of treated mice (%) [†]	No. of mice with mild infection/no. of treated mice (%) [†]	Neurovirulence in mice (100 LD ₅₀)
D-2M parent Clones	0.5 to 4.0 (variable)	ND	3/10 (30)	7/10 (70)	0/10	Medium
D2MS1	> 1	100.0	0/10 (0)	1/10 (10)	9/10 (90)	Low
D2MS2		100.0	0/10 (0)	2/10 (20)	8/10 (80)	Low
D2MS3		83.7	1/10 (10)	8/10 (80)	1/10 (10)	Medium
D2MS4		100.0	0/10 (0)	2/10 (20)	8/10 (80)	Low
D2MM1	1.5-2.0	94.7	2/10 (20)	8/10 (80)	0/10 (0)	Medium
D2MM2		76.5	0/10 (0)	10/10 (100)	0/10 (0)	Medium
D2MM3		90.0	0/10 (0)	8/10 (80)	1/10 (10)	Medium
D2MM4		100.0	0/10 (0)	3/10 (30)	7/10 (70)	Low
D2ML2	3.0-4.0	76.5	9/10 (90)	1/10 (10)	0/10 (0)	High
D2ML3		78.2	8/10 (80)	2/10 (20)	0/10 (0)	High
D2ML4		76.5	7/10 (70)	3/10 (30)	0/10 (0)	High

of common bands

^{*} The percentage bands calculated as (Common bands in a pair of virus/Total bands in the pair of viruses) x 2 x 100.
[†] The assays of neurovirulence estimate were performed twice in suckling mice in groups of ten, inoculated i.c. 6×10^8 p.f.u. of each clone per animal and observing them for 31 days.

evaluated them in a murine encephalitis model (BALB/c suckling mice). Several large, medium and small plaques were selected and subjected to repeated plaque purifications, until homogeneous plaque size populations were obtained. Three clones were obtained (D2ML2, D2ML3 and D2ML4), producing plaques of 3-4 mm diameter; 4 clones (D2MM1, D2MM2, D2MM3 and D2MM4) producing plaques of 1.5-2 mm diameter, and 4 clones (D2MS1, D2MS2, D2MS3 and D2MS4) producing plaques of < 1 mm diameter (Table 1). The viral stocks were separated and used to purify viral RNA and to inoculate it intracerebrally (i.c.) into BALB/c suckling mice.

We applied the RNaseA mismatch detection method to analyse the genetic variability of RNA before sequence analysis of clone RNA to obtain a general pattern of the genomic heterogeneity. Viral RNA prepared from each D-2M clone was used for the assay and a radioactive antisense RNA probe corresponding to the E gene of the D-2PR strain was synthesized with T7 RNA polymerase using PvuII-pGEM4/E. RNA:RNA hybrids were digested with 60 µg of RNaseA (15 min at 37 °C) and the RNA fragments resistant to digestion were analysed by denaturing 6.8% and 4% gel electrophoresis.

A complex band pattern was observed with the full-length RNA probe, as expected. The digestion pattern was similar in several hybrids, with some differences. For instance D2MS2, D2MS4 and D2MM4 clones generated band patterns 100% identical to D2MS1. However, the band patterns of D2MS3, D2MM1 and D2MM3 were 83.7, 90.0 and 94.7% homologous, respectively. Finally, the D2MM2, D2ML2, D2ML3

and D2ML4 clones matched the bands of D2MS1 at a level of 78.2% or less (Table 1).

Mismatch cleavage results are indicative of genetic heterogeneity in the same viral isolate. However this assay did not reveal the absolute genetic differences between viral clones. To determine differences at the genome level, each clone was sequenced. The E gene, which codes for the viral envelope protein, was amplified and cloned in a sequencing vector or used in direct sequencing of the PCR product.

The nucleotide sequence of the E region of each clone was determined and they were compared with one another and with the sequences of the D-2M strain. Most mutations were silent (Table 2). When the amino acid sequences from clones with small plaque size (D2MS1, D2MS2 and D2MS4) were compared, they displayed the same sequence, which differed from the sequence of parental D-2M strain at only one position, namely residue 390 of the E protein where the Asp residue of D-2M was replaced by Asn in clones with small plaque size (Fig. 1). The sequence of the D2MS3 clone contained two substitutions. One of them resulted in the same mutation as in the small plaque clone (Asp → Asn at residue 390) and the second in the substitution of Lys → Asn at position 388 (Table 2).

Comparison between the amino acid sequence of the E-coding region of D2ML2, D2ML3, D2ML4 and the D-2M strain sequence revealed no differences except at one location. The mutation consisted of the change of G in D-2M to C at nucleotide position 1168 in clones with large plaque size, resulting in the substitution of Asp in D-2M for His in D2ML

Table 2. Summary of mutations detected on the E protein gene of the clones

Clone*	Nucleotide	Codon change	Amino acid change
D2MS3	57 T→C	AGT→AGC	19 NA
	351 T→G	GCT→GCG	117 NA
	531 C→G	GGX→GGC	177 NA
	1017 A→C	ATA→ATC	339 NA
	1164 G→C	AAG→AAC	388 Lys→Asn
	1168 G→A	GAC→AAC	390 Asp→Asn
D2MM1	72 T→C	GGT→GGC	24 NA
	246 G→A	CTG→CTA	82 NA
	252 A→G	GAA→GAG	84 NA
	1168 G→A	GAC→AAC	390 Asp→Asn
	1278 A→G	GGA→GGC	426 NA
	1323 A→G	GGA→GGG	441 NA
D2ML2	57 T→C	AGT→AGC	19 NA
	87 T→C	AGT→AGC	29 NA
	213 C→T	GAC→GAT	71 NA
	351 T→G	GCT→GCG	117 NA
	480 A→G	AAA→AAG	160 NA
	531 C→G	GGC→GGG	177 NA
	771 G→A	GAG→GAA	257 NA
	1167 G→C	CTG→CTC	389 NA
	1168 G→C	GAC→CAC	390 Asp→His
	1278 A→C	GGA→GGC	426 NA
	1323 A→G	GGA→GGG	441 NA

* The sequences are representative of clone phenotypes. NA, Not applicable.

clones at residue 390 (Fig. 1). All sequencing data were confirmed by direct-sequencing of DNA segments obtained by PCR from the nucleotide regions 1118 to 1320 where most mutations were located.

The 11 clones or D-2M strains were subsequently tested to evaluate the effect of the mutation on neurovirulence in suckling mice, inoculating a dose of 6×10^6 p.f.u. (100 LD₅₀), i.e., of each clone per animal and observing them for 31 days for signs of encephalitis or death. As shown in Table 1, three virulence patterns were identified: (1) highly virulent clones (D2ML2, D2ML3 and D2ML4), which produced 70–90% mortality; (2) intermediate virulence clones (D2MS3, D2MM1, D2MM2, D2MM3 and D2MM4), which showed variable mortality rates (< 20%), but characteristically not lethal for animals, although they did cause symptoms of tremor, seizure and paralysis; and (3) low virulence clones (D2MS1, D2MS2 and D2MS4), which induced only mild symptoms (inactivity, slow movement, shaking, tremor and inability to stand). There was a significant difference between clones of different plaque size when the mice were inoculated i.c. This experiment was performed twice for a more accurate estimate of mouse neurovirulence.

These experiments revealed a direct correlation between

the percentage of genomic variability and the degree of virulence. Clones D2MS1, D2MS2, D2MS4 and D2MM4, which presented 100% homogeneity in electrophoretic patterns obtained by digestion of heterohybrids, showed attenuated virulence in mice (Table 1). However, the clones showing 80% homogeneity produced a severe infection (70% or more mortality). The difference in electrophoretic patterns correlated with the number of substitutions of nucleotides in the E gene of each clone. Previous mutations were silent with the exception of the change at position 1168 (amino acid 390) in clones with attenuated or with severe virulence (Table 2).

Multiple alignments with other isolates of dengue virus 2 were performed (Fig. 1). The clones showing attenuated virulence presented a substitution of Asp for Asn at residue 390 when compared with the parenteral strain (D-2M), and the Asn was also found in the vaccine strains. The clones showing high virulence have a substitution of Asp for His, and this His was also present at the same position (390) in dengue virus 2 isolates from Asia, where severe cases of dengue are more common. Interestingly, this substitution was also found in other flaviviruses that cause encephalitis such as JEV, MVE, Kunjin virus (KUN), and St Louis encephalitis virus (SLE). The mutation of Asp for His shown by clones D2ML2, D2ML3 and D2ML4 causes severe neurovirulence.

Several mutation sites that affect virulence in different flaviviruses have been described. These mutations occur in the E gene. Mutations at positions 52 (Hasegawa *et al.*, 1992), 271 and 336 (Cecilia *et al.*, 1991) have been observed in JEV; at position 390 in MVE virus (Lobig *et al.*, 1990), at 104 and 107 in the tick-borne encephalitis virus/dengue virus 4 chimera (Pletnev *et al.*, 1993), at 171 and 384 from TBE virus (Mandl *et al.*, 1988) and they are responsible for specific properties of each strain. The position of mutations which influence flavivirus virulence occur in three different regions of the envelope protein: (1) the distal face of domain III (residues 303–395) has an IgC-like fold. Mutations in this region modify the capacity for virus binding to the cell, affecting viral internalization or cellular tropism; (2) the base of domain II (residues 52–136 and 190–284); (3) the contact between the domain I/domain III interface. This region is the site of dimerization or trimerization with monomers of the E protein upon contact of the virus with the cellular membrane (Rey *et al.*, 1995).

The mutation observed in residue 390 of D-2 Mexican clones was localized in domain III. This is the first example of an immunoglobulin module on a viral surface protein (Rey *et al.*, 1995). Since these structures are directly related to cell adhesion, we believe that this domain plays a very important role in receptor-cell binding, in fact, any mutations in domain III could be related to the change in virulence in the presently examined clones. These results support the notion that the basic amino acid substitutions in the envelope protein of dengue virus, including aa 390, may be functionally important and are probably involved in receptor binding, which has been postulated from studies with several other flaviviruses.

I. J. Sánchez and B. H. Ruiz

Alignment between parental virus and clones							
D-2M	351	LTTVNPVITE	KDSPLNIEAE	PPFGDSYIII	GVEPQQLKLD	WFKKASSIGQ	MFETTRGAK
D2MS2		-----	-----	-----	-----	-----	-----
D2MS3		-----	-----	-----	-----	-----	-----
D2MM1		-----	-----	-----	-----	-----	-----
D2ML2		-----	-----	-----	-----	-----	-----

Alignment between clones and other geographic isolates of dengue virus							
D-2M	351	LTTVNPVITE	KDSPLNIEAE	PPFGDSYIII	GVEPQQLKLD	WFKKASSIGQ	MFETTRGAK
D2MS2		-----	-----	-----	-----	-----	-----
D2MS3		-----	-----	-----	-----	-----	-----
D2MM1		-----	-----	-----	-----	-----	-----
D2ML2		-----	-----	-----	-----	-----	-----
16681-PDK53 (vaccinal)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
Thailandia (D2-D80-141)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
Indonesia		-----	-----	-----	-----	-----	-----
JAMAICA		-----	-----	-----	-----	-----	-----
NGC(JS0219)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
Puerto Rico (vaccinal 51)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
China (D2-04)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
Malasia (M3)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
DENGUE 1		-I-A---ID	-EK-V---	---E---VV	-SGEKA--S	---G---K	---A-A---R
DENGUE 3		-I-A---IK	-EE-V---	---E-N--I	-IGDKA--IM	-YR-G---K	---A-A---R
DENGUE 4		-ISST-LAEN	TNSVT---LE	RPL-DSY-V-	-VGNSA-T-H	--R-G---K	---S-Y---

Alignment between clones and encephalitis causing flaviviruses							
D-2M	351	LTTVNPVITE	KDSPLNIEAE	PPFGDSYIII	GVEPQQLKLD	WFKKASSIGQ	MFETTRGAK
D2MS2		-----	-----	-----	-----	-----	-----
D2MS3		-----	-----	-----	-----	-----	-----
D2MM1		-----	-----	-----	-----	-----	-----
D2ML2		-----	-----	-----	-----	-----	-----
JEV		-V---F-ATSSAN-KVLV-H-	---E---VV	-RGDK--IMH	-H-AG-TL-K	A-S--LK--Q	
MVE		MV-A--Y-ASSTANAKVLV-I-	---E---VV	-RGDK--IMH	-H-EG---K	A-S--LK--Q	
KUN		-V---F-SVSTAN-KVLV-L-	---E---VI	-RGEQ--IMH	-H-SG---K	A--A-LK--Q	
WN		-V---F-SVATAN-KVLV-L-	---E---VV	-RGEQ--IMH	-H-SG---K	A--A-LK--Q	
SLE		-V---FIISTGGANRKH-V-	---E---VV	-RGTI--IMH	-H-EG---K	ALA--WK--Q	
YF		-V---AST N-DEVLV-VN	---E---V	-RGDSR--T-S	-H-EG---K	L--Q--K-VE	

Fig. 1. Amino acid sequence alignment of positions 351 to 410 of the E protein of clones D2MS2, D2MS3, D2MM1 and D2ML2 with the corresponding sequences of other flaviviruses. Identity at each position with the D-2M parental sequence is indicated by a dash. D2MS1 and D2MS4 show the same sequence as D2S2. D2MM2, D2MM3 and D2MM4, present the same sequence as D2MM1. D2ML3 and D2ML4 have the same sequence as D2ML2. The origin of the sequences used are as follows (accession number in parentheses): D1, Singapore S275/90 (M87512); D2 (200787) México (L04561); D2(V) Puerto Rico (P12823); D2 16681-PDK53 (29991); D2(IIb) Thailand D80141 (M24444); D2(IV) Indonesia 1051 (L10044); D2(IIb) Jamaica (M15075); D2 China D2-04 (P30026); D2(IIIa) Malasia M3 (S06747); D2(I) New Guinea C (U0219); D3 Dengue 3 (M93130); D4 Dengue 4 (M14931); Kunjin KUNCG (D00246); West Nile WNFCG (M12294); Murray Valley FLMVEV5 (X03467); St Louis encephalitis SLOCME (M16614); Japanese encephalitis JEVCG (M18370); Yellow Fever 17D-204 (X15062).

Nevertheless, our results are similar to those found in other RNA viruses such as human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and hepatitis C virus (HCV), which circulate *in vivo* as a mixture of heterogeneous populations (quasispecies). These quasispecies frequently present one point mutation on the viral

envelope protein which affects the replication capabilities on different cell types as in the case of HIV (Shiodo *et al.*, 1994), or changing the structure of the neutralizing epitope, as with HCV (MacKawa *et al.*, 1995). A quasispecies lends itself to selection pressures which include host immune surveillance.

antiviral therapies and many other *in vivo* conditions that produce different patterns of disease. All the quasispecies in a single person appear to have the same origin; the status quo is likely to be the result of an accumulation of mutants from the original viral inoculum. In our case, the density of the population of dengue virulent clones ('quasispecies-like') could be relevant to the progress of the disease.

Definite answers to the genetics and structural basis of virulence differences will be obtained by specific engineering of infectious clones to demonstrate that these substitutions are responsible for virulence. Virulence could be reverted by site-directed mutagenesis of RNA from non-virulent to virulent clones. Our results provide valuable information for such experiments in the future.

References

- Cecilia, D. & Gould, E. A. (1991). Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization-resistant mutants. *Virology* 181, 70-77.
- (f.d.) Eckels, K. H., Brandt, W. E., Harrison, V. R., McConn, J. M. & Russell, P. K. (1976). Isolation of a temperature-sensitive dengue 2 virus under conditions suitable for vaccine development. *Infection and Immunity* 14, 1221-1227.
- Hahn, C. S., Dalrymple, J. M., Strauss, J. H. & Rice, C. M. (1987). Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 84, 2019-2023.
- Halstead, S. B. (1988). Pathogenesis of dengue; challenge to molecular biology. *Science* 239, 476-481.
- Harrison, V. R., Eckels, K. H., Sagartz, J. W. & Russell, P. K. (1977). Virulence and immunogenicity of a temperature-sensitive dengue 2 virus in lower primates. *Infection and Immunity* 18, 151-156.
- Hasegawa, H., Yoshida, M., Shiozaka, T., Fujita, S. & Kobayashi, Y. (1992). Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology* 191, 158-165.
- Holzmann, H., Heinz, F. X., Mandl, C. W., Guirakhoo, F. & Funz, C. (1990). A single amino acid substitution in envelope protein E of tick-borne encephalitis virus leads to attenuation in the mouse model. *Journal of Virology* 64, 5156-5159.

- Igarashi, A. (1984). A hypothesis on the geographical distribution of arbovirus. *Tropical Medicine* 26, 173-180.
- Lobigs, R., Usha, R., Nestorowicz, A., Marshall, I. D., Weir, R. C. & Dalgarno, L. (1990). Host cell selection of Murray Valley encephalitis virus variants altered at an RGD sequence in the envelope protein and in mouse virulence. *Virology* 176, 587-595.
- MaeKawa, S., Enomoto, N., Kurosaki, M., Maroma, F. & Sato, C. (1995). Host dependent variation of hepatitis C virus: phylogenetic analyses. *Archives of Virology* 140, 2123-2133.
- Mandl, C. W., Heinz, F. X. & Kunz, C. (1988). Sequence of structural proteins of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis with other flaviviruses. *Virology* 166, 197-205.
- Monath, T. P. (1986). Pathobiology of the flaviviruses. In *The Togaviridae and Flaviviridae*, pp. 375-440. Edited by S. Schlesinger & M. J. Schlesinger. New York: Plenum Press.
- Ng, M. L. & Lau, C. L. (1988). Possible involvement of receptors in the entry of Kunjin virus into Vero cells. *Archives of Virology* 100, 199-211.
- Nitayaphan, S., Grant, J. A., Chang, J. A., Chang, G. J. & Trent, D. W. (1990). Nucleotide sequence of the virulent SA-14 strain of Japanese encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, SA-14-14-2. *Virology* 177, 541-552.
- Platnev, A. G., Bray, M. & Lal, C. J. (1993). Chimeric tick-borne encephalitis and dengue 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. *Journal of Virology* 67, 4956-4963.
- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C. & Harrison, S. C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375, 291-298.
- Rice, C. M., Strauss, E. G. & Strauss, J. H. (1986). Structure of the flavivirus genome. In *Togaviridae and Flaviviridae*, pp. 279-326. Edited by S. Schlesinger & M. J. Schlesinger. New York: Plenum Press.
- Rosen, L. (1977). The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 26, 337-343.
- Russell, D. L., Dalrymple, J. M. & Johnston, R. E. (1989). Sindbis virus mutations which coordinately affect glycoprotein processing, penetration, and virulence in mice. *Journal of Virology* 63, 1619-1629.
- Shiodo, T., Oka, S., Ida, S., Nohhara, K., Toriyoshi, H., Mori, S., Takebe, Y., Kimura, S., Shimada, K. & Nagai, Y. (1994). A naturally occurring single basic amino acid substitution in the V3 region of human immunodeficiency virus type 1. Env protein alters the cellular host range and antigenic structure of the virus. *Journal of Virology* 68, 7689-7696.

Received 9 May 1996; Accepted 27 June 1996