

---

---

## Selección de variantes de virus dengue sensibles a la heparina en células BHK-21.

Argelia Celis<sup>1,2</sup>, Zoila Moros<sup>1</sup>, Marlene Gerder<sup>1</sup>, Francesca Pagano<sup>1</sup>, Esmeralda Vizzi<sup>1</sup> y Ferdinando Liprandi<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio Biología de Virus, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias de la Salud, Departamento Clínico Integral, Escuela de Bioanálisis, Universidad de Carabobo. Sede Aragua, La Morita, Venezuela.

**Palabras clave:** virus dengue, adaptación viral, heparina, pases seriados, células BHK-21.

**Resumen.** Estudios previos han demostrado que la adaptación de diversos virus a crecer en líneas celulares de vertebrados, conduce a la selección de variantes virales que unen al heparán sulfato (HS) con alta afinidad. En el presente trabajo se determinó la susceptibilidad de cepas del virus dengue (DENV) a la heparina hipersulfatada un análogo al HS, después de pases seriados en células BHK-21. A aislados de campo de los cuatro serotipos de DENV, se les realizaron ocho pases seriados en células BHK-21. La adaptación de los DENV al cultivo celular seleccionó variantes virales con una aumentada capacidad replicativa en células BHK-21 y una incrementada susceptibilidad a la heparina, en relación a las respectivas cepas no adaptadas, obteniéndose una inhibición de la infectividad más significativa en DENV-2 y DENV-4. Las cepas de DENV adaptadas presentaron cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína de envoltura (E), en particular una sustitución K204R para DENV-1, N67K para DENV-2, K308R y V452A para DENV-3 y E327G para DENV-4. Estas sustituciones implicaron ganancia de residuos básicos que incrementaron la carga neta positiva de la proteína. Los resultados sugieren, que la adaptación de cepas de DENV a células BHK-21 selecciona variantes virales sensibles a la heparina y que la efectividad de este compuesto varía dependiendo de la cepa viral. Además sugieren que el HS puede jugar un papel importante en la infectividad de las cepas de DENV adaptadas al cultivo celular, a diferencia de los aislados de DENV no adaptados.

## **Selection of heparin-sensitive dengue virus variants in BHK-21 cells.**

*Invest Clin 2014; 55(2): 155 - 167*

**Keywords:** dengue virus, viral adaptation, heparin, serial passages, BHK-21 cells.

**Abstract.** Several studies have shown that adaptation of various viruses to grow in certain cell lines of vertebrates, leads to the selection of virus variants that bind heparan sulfate (HS) with high affinity. In this study we investigated the susceptibility of strains of dengue virus (DENV) to oversulfated heparin an analogue of HS after passages in BHK-21 cells. Field isolates of the four serotypes of DENV with a limited number of passes in mosquito cells C6/36HT were serially passaged eight times in BHK-21 cells. The adaptation of the DENV to the cell culture selected viral variants with an increased replicative capacity in BHK-21 cells and an increased susceptibility to heparin compared with the original not adapted strains, with a more significant inhibition of the infectivity in DENV-2 and DENV-4. The E protein of the adapted strains showed changes in the amino acid sequence, particularly at the position K204R to DENV-1, N67K to DENV-2, K308R and V452A for DENV-3 and E327G to DENV-4. These substitutions implicated a gain of basic residues that increased the net positive charge of the protein. These results suggest that adaptation of DENV strains to BHK-21 cells implies changes in the envelope protein, changes associated to the protein reactivity with heparin, the inhibitory effectiveness of this compound varying depending on the viral strain. In addition, these results suggest that the HS can play an important role in the infectivity of the DENV strains adapted to vertebrate cell culture, but not in the infectivity of non-adapted DENV isolates.

*Recibido: 27-06-2013. Aceptado: 30-04-2014*

### **INTRODUCCIÓN**

El dengue es una enfermedad febril aguda, de etiología viral, transmitida al hombre por mosquitos del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti*. Clínicamente, la enfermedad puede manifestarse como dengue no grave sin y con signos de alarma y de una forma más severa, la cual puede cursar con extravasación de plasma, hemorragia severa y compromiso grave de órganos (1). Se estima que a nivel mundial, ocurren anualmente entre 50 y 100 millones de casos de infecciones por dengue y hasta 50.000 muertes cada año (2, 3).

El agente causal de la enfermedad es el virus dengue (DENV); éste pertenece a la familia *Flaviviridae* del género *Flavivirus* y posee un genoma de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 11 Kb. El virión completo tiene un diámetro aproximado de 50 nm. Presenta una nucleocápside de naturaleza proteica, con simetría icosaédrica de 30 nm de diámetro, que empaqueta al genoma viral. La nucleocápside esta revestida por una envoltura lipídica de 10 nm de grosor, que contiene dos proteínas asociadas, una de membrana (M) y otra de envoltura (E) que reposan paralelamente sobre la superficie del vi-

rión (4). El grupo de DENV está representado por los serotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 que están relacionados serológicamente pero con características antigénicas distintas (5, 6) y DENV-5 que recientemente fue descubierto (7).

La proteína E, constituye la proteína más grande del virión (51-59 kD), es el componente principal de las proyecciones de la superficie del mismo. Esta proteína presenta tres dominios; el dominio I, es el dominio central que organiza la estructura; el dominio II es elongado, contiene el péptido de fusión (98 a 111 residuos) y el dominio III presenta una estructura parecida a inmunoglobulinas y contiene un sitio de unión al receptor (382-385 residuos) (8). Al igual que otros virus envueltos, esta proteína presentan dos sitios de glicosilación (9) y cumple un papel importante en un número de actividades biológicas incluyendo: ensamblaje viral, unión al receptor, fusión de membrana y es el principal blanco para anticuerpos neutralizantes (10).

Diferentes proteínas celulares han sido identificadas como receptores potenciales para los DENV; sin embargo, hasta el momento no existe una evidencia directa del papel que juegan éstos durante la entrada en células hospedadoras y algunos de los resultados son controversiales (11). Se ha demostrado que el heparán sulfato (HS) un glicosaminoglicano (GAG) altamente sulfatado está involucrado en la unión y entrada de DENV en células susceptibles (12-16). Basándose en el papel del HS, como receptor putativo para DENV, diferentes investigadores han demostrado, que algunos compuestos polianiónicos naturales y sintéticos que mimetizan al HS, pueden actuar como inhibidores de la infectividad de DENV en ciertas células de mamífero (13, 14, 16-20).

Recientemente en nuestro laboratorio se evaluó la actividad anti-DENV de dos

compuestos polianiónicos sulfatados: suramina y heparina hipersulfatada a diferentes concentraciones (10, 30 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La suramina demostró ser un inhibidor eficaz de aislados de campo de los cuatro serotipos de DENV, mientras que la heparina hipersulfatada no inhibió la infección de los DENV en células BHK-21 (21). Estos resultados sugieren, que DENV podría utilizar moléculas receptoras distintas al HS para mediar la entrada a células BHK-21 o que la susceptibilidad al compuesto sulfatado es dependiente de la cepa viral utilizada. Se ha demostrado que la adaptación de virus a crecer en cultivos celulares genera cepas mutantes, que pueden ser usadas para evaluar diferencias específicas en el uso del receptor entre aislados originales y cepas de laboratorio (22). También se ha demostrado, que la adaptación de diversos virus incluyendo *Flavivirus*, al multiplicarse en ciertas líneas celulares de vertebrados, conduce a la selección de variantes virales que unen al HS con alta afinidad (22-24). Un estudio realizado con el virus de la encefalitis transmitido por garrapatas (TBEV, por sus siglas en inglés) (25), demostró que los aislamientos originales, son menos HS dependientes que el virus obtenido luego de pases seriados en células BHK-21. Estos virus presentaron varias mutaciones en la superficie de la proteína E que crearon áreas nuevas de carga positiva, que probablemente reaccionan con el HS. En la presente investigación se planteó como objetivo, determinar la susceptibilidad de varias cepas de DENV, representativas de cuatro serotipos (DENV-1 a DENV-4), al efecto inhibitorio de un GAG soluble altamente sulfatado, antes y después de varios pases en células BHK-21 e identificar las eventuales mutaciones en la proteína de envoltura asociadas al cambio de este fenotipo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Células

Células BHK-21 (riñón de hámster lactante, clon 21, ATCC), células Vero (riñón de mono verde africano ATCC) y las células C6/36HT provenientes de *Aedes albopictus* (adaptadas a 32°C) se cultivaron en medio 199 (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA) suplementadas con 10% suero fetal bovino (SFB, Gibco New York, USA), 2,92% de L-glutamina (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA), 0,24% de bicarbonato de sodio (Merck, Darmstadt-Alemania), 100.000 UI/L de penicilina sódica (Pfizer Venezuela, S.A), 2,5 mg/L anfotericina B (Bristol-Meyers, Squibb, Venezuela) y 80 mg/L gentamicina (Laboratorios Leti, S.A. Venezuela).

### Virus

Se utilizaron aislados de campo de los cuatro serotipos de DENV que han circulado en Venezuela en diferentes años. La cepa DENV-1 23668 fue cedida gentilmente por el LARDIDEV, Maracay-Venezuela; las cepas DENV-2 288085, DENV-3 220034 y DENV-4 220244 fueron cedidas por el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas-Venezuela. Todos los virus fueron recibi-

dos como un pase temprano (segundo o tercero a partir del plasma del paciente en células C6/36HT). Posteriormente, virus de cada serotipo fueron amplificados en células C6/36HT (entre 4 y 10 pases) (26), hasta la obtención de títulos virales adecuados para ensayos de infectividad e iniciar pases seriados en células BHK-21 (Tabla I).

### Titulación viral

Los títulos de los DENV fueron determinados por ensayo de placa en células Vero (27). Las células crecidas en platos de 24 pozos, fueron infectadas con 0,2 mL de diluciones seriadas de virus, utilizando como diluyente medio 199 más 2% SFB. Cada dilución se inoculó por duplicado. Después de dos horas de incubación a 37°C, a cada pozo se añadió 1 mL de de carboximetilcelulosa (Sigma-Aldrich Co., St Louis, Missouri, EUA) al 1,5% en medio de cultivo MEM suplementado con 2,5% de SFB (CMC-MEM). Seguidamente los platos se incubaron a 37°C, entre siete y nueve días dependiendo de la cepa. Transcurrido ese tiempo se procedió a la fijación de las placas con p-formaldehído al 1% (1 g/L diluido en alcohol técnico y p-formaldehído al 1% diluido en PBS) durante 15 min y tinción con una solución de cristal violeta (Merck,

**TABLA I**  
VIRUS DENGUE USADOS EN EL ESTUDIO

Virus	Año aislamiento	Tipo de célula	No. de Pases	Designación	Título (UFC/mL)
DENV-1 cepa 23668	2004	C6/36HT	5*	VD1p5	1 × 10 <sup>6</sup>
		BHK-21	8	VD1p5BHK8	8 × 10 <sup>7</sup>
DENV-2 cepa 288085	2008	C6/36HT	4*	VD2p4	6 × 10 <sup>5</sup>
		BHK-21	8	VD2p4BHK8	5 × 10 <sup>8</sup>
DENV-3 cepa 220034	2003	C6/36HT	10*	VD3p10	2 × 10 <sup>6</sup>
		BHK-21	8	VD3p10BHK8	4 × 10 <sup>7</sup>
DENV-4 cepa 220244	2003	C6/36HT	6*	VD4p6	5 × 10 <sup>5</sup>
		BHK-21	8	VD4p6BHK8	2 × 10 <sup>8</sup>

\*Nivel de pases en C6/36 HT del cual se iniciaron los pases en células BHK-21.

Darmstadt-Alemania) durante 1 h. Los títulos virales fueron calculados y expresados en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL).

### **Adaptación de virus dengue en células BHK-21**

Para la adaptación de los DENV se realizaron pases seriados de cada serotipo en células BHK-21. Cepas virales de cada serotipo, que tenían un número limitado de pases (entre 4 y 10) en células C6/36HT, se multiplicaron en monocapas de células BHK-21, inoculadas a una multiplicidad de infección (m.o.i) de 0,1 UFP/célula, seguido por incubación a 37°C por 2 h. Transcurrido el tiempo de adsorción, se agregó medio de mantenimiento 199 al 5 % SFB y fueron incubadas a 37°C hasta la aparición de efecto citopático. Posteriormente, las suspensiones virales se centrifugaron a 1000 rpm durante 15 min. El sobrenadante obtenido fue usado para una nueva infección en monocapas de BHK-21 y así sucesivamente hasta alcanzar ocho pases (Tabla I). Como control se utilizaron monocapas de células BHK-21 sin infectar. Una vez realizado el último pase se procedió a la cuantificación de los títulos virales correspondientes a cada uno de éstos, resultando una m.o.i. utilizada entre 0,1 y 8 UFP/célula.

### **Rendimiento de virus dengue antes y después de pases en células BHK-21**

Monocapas de células BHK-21, fueron cultivadas en placas de seis pozos e infectadas con los cuatro serotipos de DENV con y sin pases en células BHK-21 a un m.o.i. de 1. Después de 2 h de incubación a 37°C, las células fueron lavadas y cultivadas en 3 mL de medio 199 al 5% SFB a 37°C por 48 h. Después de este tiempo el sobrenadante fue colectado y el título viral fue determinado por ensayo de placa en células Vero. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

### **Ensayo de reducción de placas**

La inhibición de la infectividad de DENV por la heparina hipersulfatada (Neoparin Inc. USA) fue estudiada incubando durante 1 h a 37°C, 100 UFP de los DENV con y sin pases en células BHK-21, en ausencia y presencia del compuesto (100 µg/mL). Posteriormente, 300 µL de estas mezclas virales fueron añadidas a monocapas de células BHK-21 cultivadas en platos de 12 pozos y procesadas para la obtención de placas. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición en el número de placas respecto a una muestra control de virus no incubada con el compuesto y calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:  $100 - (100 \times [\text{número de placas formadas en presencia de la concentración del compuesto} / \text{número de placas del control}])$ . Los ensayos fueron realizados por triplicados para al menos dos experimentos independientes.

### **Análisis de secuencias**

**Extracción del ARN:** El ARN viral se extrajo a partir de alícuotas de 140 µL de sobrenadante de cultivo de cada uno de los serotipos de DENV adaptado o no a células BHK-21, empleando el QIAamp® Viral RNA mini kit (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Transcripción reversa:** Con el ARN viral extraído se preparó una mezcla de reacción con la enzima Transcriptasa Reversa Super Script II (Invitrogen) para generar un ADNc. La mezcla de reacción incluyó: 20 µL de ARN, 0,5 mM de cada uno de los deoxinucleótidostrifosfato (dNTPs), 1 µg/µL de random primer (Invitrogen) y agua hasta completar 30 µL de reacción. Esta mezcla se incubó a 65°C por 5 min, para luego enfriar sobre hielo. Finalmente se le agregó 0,01 M DTT, RNaseOUTtm (Invitrogen), 100U de 5X first strand buffer (250 mM, Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl, Invitrogen) obteniéndose un volumen final de 50 µL de

mezcla de reacción. Seguidamente la mezcla fue incubada a 42°C durante 90 min y luego inactivada por calentamiento a 72°C durante 15 min.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Para la amplificación del gen completo de envoltura (E), se diseñaron cebadores específicos para cada serotipo usando el programa DNAMAN versión 5.2.2 (Lynnon Boiosoft, Quebec, Canada) (Tabla II). Así 6  $\mu$ L de ADNc se añadieron a una mezcla de reacción de 50  $\mu$ L que contenía 0,3 mM de cada dNTPs, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,3 mM cada uno de los cebadores sentido y antisentido, buffer de amplificación provisto por la casa comercial Invitrogen y 2,5 U/ $\mu$ L Platinum® Pfx (Invitrogen). La mezcla fue colocada en un termociclador modelo PTC-200 (MJ Research, Inc., Waltham, Mass USA) y sometida a 35 ciclos de desnaturalización (94°C  $\times$  30 s), hibridización o anillamiento (60°C  $\times$  90 s) y extensión (68°C  $\times$  2 min). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (1  $\mu$ g/ $\mu$ L, Sigma Sigma-Aldrich Co.,

St Louis, Missouri, EUA) y visualizados en un transluminador de luz UV (Bio-rad Laboratories, Richmond, California EUA).

**Secuenciación:** Los fragmentos de ADN purificados fueron sometidos a una secuenciación automatizada, utilizando el servicio comercial de secuenciación (Macrogen, Seúl, Corea). Las secuencias nucleotídicas fueron analizadas y editadas utilizando el programa DNAMAN versión 5.2.2 (Lynnon Boiosoft, Quebec, Canada). Para la obtención de los alineamientos de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas se utilizó el programa de alineamiento de múltiples secuencias CLUSTAL W (28), integrado en el programa MEGA versión 4.0 (29).

#### Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como medias aritméticas  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre grupos fueron determinadas por la prueba *t* de Student usando el programa Excel (Microsoft). Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

**TABLA II**  
LISTA DE CEBADORES DISEÑADOS Y UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA DE ENVOLTURA (E) DE LOS VIRUS DENGUE

*Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	**Posición cebador en el genoma (nt)	Tamaño del producto (pb)
D1-603-S	CGTTGACTGCTGGTGTAAATGCC	603-625	1997
D1-2600-AS	TGGCTGATCGAATTCCACAC	2581-2600	
D2-614-S	GTCCACATGGGTAACCTTATG	614-633	1988
D2-2602-AS	TTACTGAGCGGATTCCACAGATGCC	2578-2602	
D3-603-S	GCAACCTCACATCAACATGG	603-622	1973
D3-2576-AS	CACTCCATTCTCCAAGCG	2558-2576	
D4-399-S	TCAACGATAACATTGCTGTGCTTGATTCCC	399-428	2120
D4-2519-AS	TTTGTACTGTTCTGTCCAAGTGTGC	2495-2519	

\* Los nombres de los oligonucleótidos con una S indican orientación en el sentido del genoma y con AS indican antisentido u orientación complementaria y reversa. \*\* Las posiciones de las regiones amplificadas están basadas de acuerdo a las secuencias en GenBank de las cepas de DENV-1: EU482611.1, DENV-2: EU482608.1, DENV-3: EU529683.1, DENV-4: FJ882592.1

## RESULTADOS

### Rendimiento viral antes y después de pases en células BHK-21

En ensayos de crecimiento viral en células BHK21, se compararon las cantidades de virus producido por las cepas de los serotipos de DENV adaptadas y no adaptadas a células BHK-21. En las cepas adaptadas se observó un incremento del rendimiento viral, entre 10 y 1000 veces en relación a la cepa no adaptada (Fig. 1).

### Inhibición de la infección por heparina hipersulfatada en cepas de virus dengue adaptadas o no a células BHK-21

Para determinar si pases seriados de los DENV en células BHK-21, seleccionan variantes virales cuya infectividad es dependiente de la interacción con GAG altamente sulfatado, se utilizó la heparina hipersulfatada, un GAG soluble, análogo estructural del HS, como un inhibidor potencial de la infectividad de los DENV. Para ello, células

BHK-21, fueron infectadas con DENV en ausencia y presencia de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de heparina hipersulfatada. Los resultados mostraron que los cuatro serotipos de DENV adaptados a células BHK-21 tienden a ser más susceptibles al compuesto que las cepas no adaptadas (Fig. 2). Un efecto inhibitorio altamente significativo se observó con los serotipos DENV-2 ( $p=0,00002$ ) y DENV-4 ( $p=0,001$ ) que fueron inhibidos 12,3 veces (98,6%) y 4,9 veces (77,6%) más que las cepas no adaptadas (8 y 15,8%) respectivamente. Mientras los serotipos DENV-1 y DENV-3 fueron menos sensibles al efecto inhibitorio de la heparina alcanzando una reducción de la infectividad de 68,6% y 45,5% respectivamente.

### Mutaciones en la proteína de envoltura de virus dengue resultantes de la adaptación en células BHK-21

Se determinaron los cambios nucleotídicos en el gen de la proteína E de las cepas de DENV adaptadas a cultivo celular. El

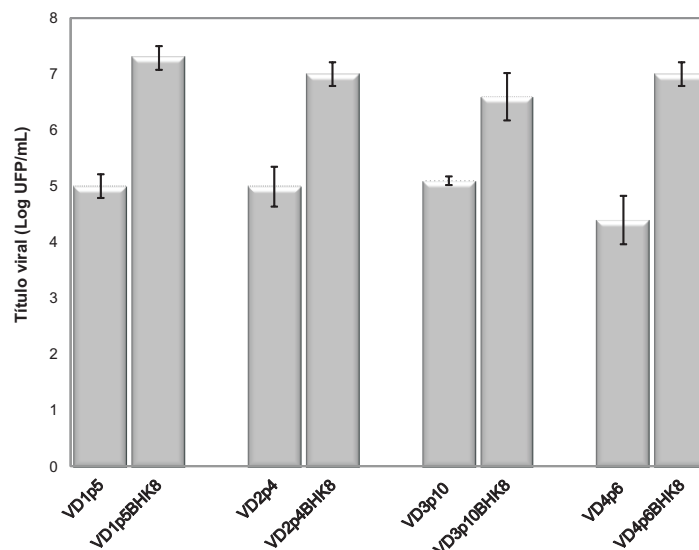


Fig. 1. Cambios en el rendimiento del virus dengue antes y después de pases en células BHK-21. Monocapas de células BHK-21 fueron infectadas con los cuatro serotipos de DENV con y sin pases en células BHK-21 a un m.o.i de 1. Después de incubarlos a 37°C por 48 h, el título viral fue determinado por ensayo de placa en células Vero. Los resultados se expresan como el logaritmo del título viral. Cada valor representa el promedio de ensayos triplicados  $\pm$  desviación estándar.

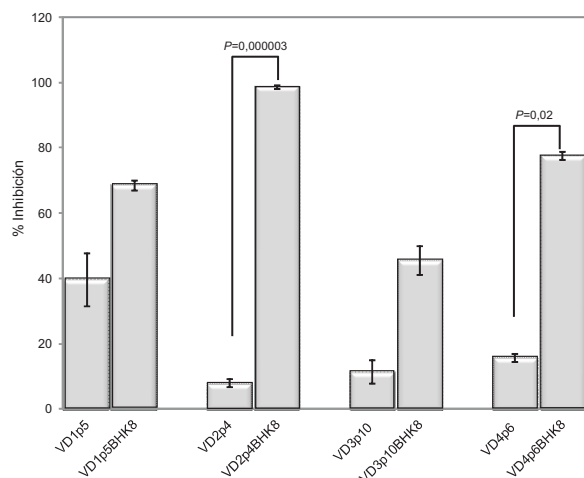


Fig. 2. Efecto inhibitorio de la heparina hipersulfatada sobre la infectividad de cepas de virus dengue adaptadas o no a células BHK-21. Aproximadamente 100 UFP de cada uno de los cuatro serotipos de DENV con y sin pases en células BHK-21, fueron incubados durante 1 h a 37°C, con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de heparina hipersulfatada previo a la determinación del título infeccioso por ensayo de placas en células BHK21. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del número de placas observadas en cada caso. Cada valor representa el promedio de dos experimentos independientes por triplicado ( $n=6$ )  $\pm$  desviación estándar. La prueba *t* de Student fue usada para comparar valores entre grupos y un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

análisis de secuencia de la región genómica correspondiente al gen E de todos los DENV obtenidos después de ocho pases en células BHK-21, reveló la aparición de sustituciones nucleotídicas, resultantes en uno o dos cambios no conservativos de aminoácidos en los dominios II y III de la proteína E (Tabla III y Fig. 3). El serotipo 1 de DENV presentó un cambio de lisina (K) por arginina (R) en la posición 204. La cepa DENV-2 seleccionó una mutación asparagina (N) por K en la posición 67, mutación que implicó la pérdida de un sitio de glicosilación en el dominio II. DENV-3 seleccionó mutaciones K por R en la posición 308 y valina (V) por alanina (A) en posición 452. En los aislados de DENV-4 sólo se seleccionó una mutación que implicó reemplazo de un residuo ácido por uno básico [ácido glutámico (E) por glicina (G)] en la posición 327.

## DISCUSIÓN

Se ha demostrado que los aislamientos originales de DENV son menos HS-dependientes que el virus obtenido luego de pases seriados en células BHK-21 (25). En ensayos preliminares evaluamos la actividad anti-DENV de la heparina hipersulfatada, empleando diferentes concentraciones (10, 30 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) del compuesto, el cual resultó no ser un inhibidor eficaz de la infectividad de aislados de campo de los cuatro

**TABLA III**  
CAMBIOS EN LA PROTEÍNA DE ENVOLTURA (E) DE LOS VIRUS DENGUE RESULTANTES DE LA ADAPTACIÓN A CÉLULAS BHK-21

Virus	Designación *	Cambio nucleótido (posición)	Cambio aminoácido (posición)
DENV-1	VD1p5 $\rightarrow$ VD1p5BHK8	A $\rightarrow$ G (611)	K $\rightarrow$ R (204)
DENV-2	VD2p4 $\rightarrow$ VD2p4BHK8	C $\rightarrow$ A (201)	N $\rightarrow$ K (67)
DENV-3	VD3p10 $\rightarrow$ VD3p10BHK8	A $\rightarrow$ G (923) T $\rightarrow$ C (1355)	K $\rightarrow$ R (308) V $\rightarrow$ A (452)
DENV-4	VD4p6 $\rightarrow$ VD4p6BHK8	A $\rightarrow$ G (980)	E $\rightarrow$ G (327)

\*P, BHK: número de pases en células C6/36HT (p) y BHK-21 (BHK).



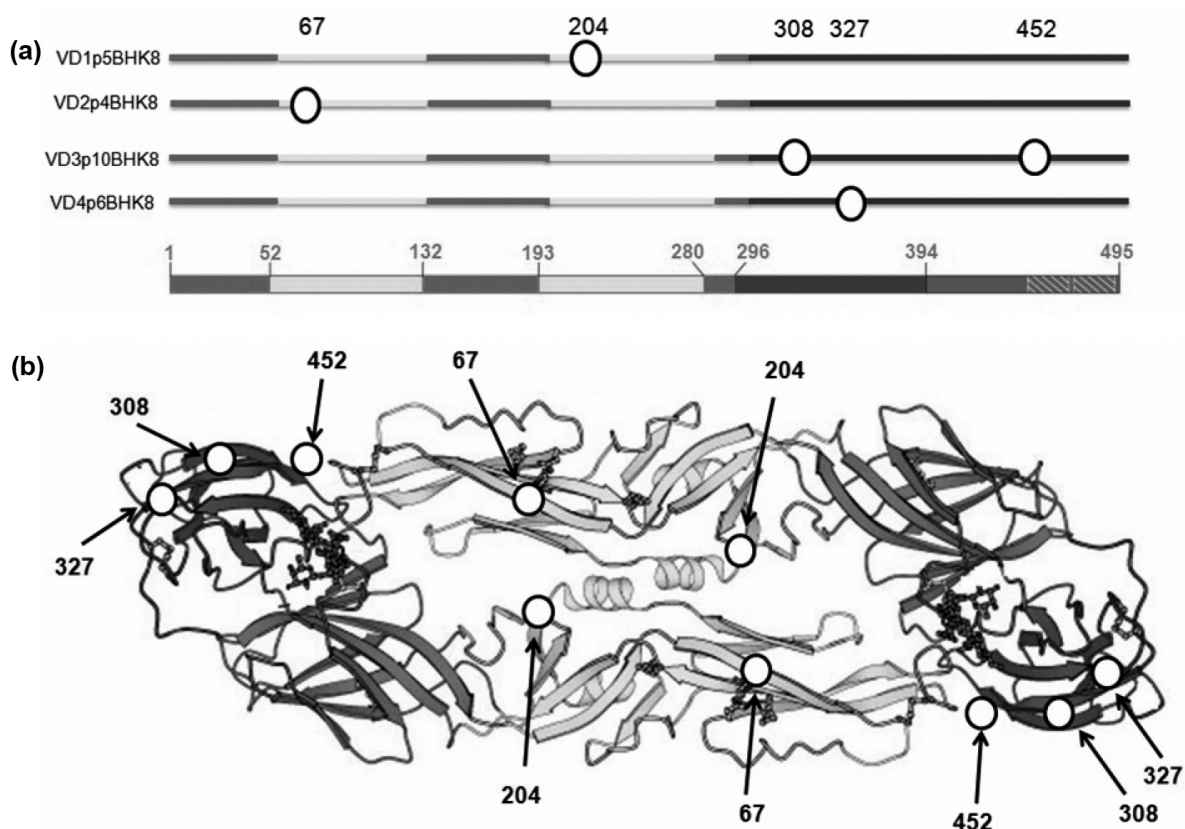


Fig. 3. Localización de los cambios de aminoácidos en la proteína de envoltura de las variantes de DENV resultantes de la adaptación a células BHK-21. Las posiciones de las mutaciones de aminoácidos de los DENV adaptados se muestran en círculos de color blanco en: (a) Dominios de la proteína E representados en: gris claro, dominio I; blanco, dominio II; gris oscuro, dominio III. (b) Vista superior de la estructura dimérica DENV-2, un modelo propuesto por Modis y col. (39).

serotipos de DENV en células BHK-21 (21). En este estudio se demostró que la adaptación de los cuatro serotipos de DENV a la línea celular BHK-21, tiende a seleccionar variantes virales susceptibles a la heparina hipersulfatada a diferencia de sus respectivas cepas no adaptadas y dicha susceptibilidad es dependiente del serotipo viral, siendo DENV-2 y DENV-4 significativamente más susceptibles al compuesto que los serotipos DENV-1 y DENV-3. Este resultado se corresponde con datos publicados previamente sobre la inhibición diferencial de la infección de los DENV por diversos polisacáridos sulfatados, incluyendo heparina y diferentes carragenanos (30, 31).

El incremento observado en la susceptibilidad a la heparina hipersulfatada de los DENV podría estar asociado a la presencia de mutaciones en la proteína E, que incrementen la carga neta positiva por ganancia de aminoácidos básicos (R, K y H), lo cual podría favorecer la interacción con la heparina hipersulfatada. Al realizar el análisis de la proteína E (495 residuos aminoácidos) de las cepas de DENV adaptados a células BHK-21, se observó que cada una presentó cambios en la secuencia de aminoácidos, observándose mutaciones tanto en el dominio II y III. Resultados previos por otros autores, han demostrado que las mutaciones en la proteína E obtenidas luego de la adap-

tación pueden variar entre los tres dominios. Por ejemplo, Lee y col. (32) demostraron que variantes de DENV-2 seleccionadas después de pases en células de adenocarcinoma humanas (SW-13) y en BHK-21 contenían un número de sustituciones en el dominio II, pero ninguno en el dominio I o III de la proteína E. En variantes de virus TBE seleccionadas luego de pases en células BHK-21, Mandl y col. (25) demostraron que las mutaciones adquiridas estuvieron presentes en cada uno de los tres dominios de la proteína E.

La cepa DENV-1 exhibió una mutación de un aminoácido en la proteína E, donde hubo un reemplazo de un residuo básico por otro básico (K204R). Esta misma mutación ha sido también descrita en una quimera de virus de fiebre amarilla que llevaba el gen E de DENV-1 y ésta fue asociada con una reducida virulencia en ratones y primates (33). Por otra parte, la cepa DENV-3 presentó dos sustituciones aminoacídicas (K308R, V452A), que no implicaron ganancia de carga positiva lo cual podría explicar la ausencia de un aumento significativo en la susceptibilidad a la heparina.

En las cepas de DENV-2 y DENV-4, se originaron sustituciones de aminoácidos en la proteína E (N67K para DENV-2 y E327G para DENV-4) que implicaron ganancia de residuos básicos, lo cual explicaría en parte el aumento significativo en la susceptibilidad a la heparina.

Es importante señalar, que la sustitución de N67K en DENV-2 implicó además una pérdida de un sitio de glicosilación. La proteína E de los flavivirus, posee dos sitios de glicosilación en el dominio II, asparagina 67 y asparagina 153 (N67 y N153). Se ha sugerido, que la glicosilación de las proteínas estructurales de los *Flavivirus* podría jugar un papel importante durante la morfogénesis viral, la infectividad y el tropismo (34, 35). Recientemente se demostró que el sitio de glicosilación N67 no tiene una

importancia crítica para el crecimiento de DENV-2, ya que dependiendo de la sustitución aminoacídica que se introduzca para abolir ese sitio de glicosilación en la proteína E, el crecimiento viral se puede ver afectado (36). Basándonos en el presente estudio, se pudiera pensar, que la sustitución de N por K en la posición 67 en DENV-2 tuvo un efecto compensatorio en ese sitio de glicosilación, favoreciendo el crecimiento viral luego de los ocho pases en células BHK-21, ya que el mismo se incrementó 100 veces cuando se comparó con la cepa no adaptada. Además, el encontrar una mayor inhibición en la infectividad de esta cepa por la heparina hipersulfatada con respecto a la cepa no adaptada, sugiere que la ganancia de residuos básicos en la posición 67 de la proteína E, pudo favorecer un incremento de la carga neta positiva y/o alterar la conformación general de la proteína E, que permitiera la exposición de sitios de unión al HS. A través de análisis estructurales de proteínas que se unen a GAG, Cardin y Weintraub (37) determinaron secuencias consenso de unión al HS, las cuales fueron definidas como XBBBXXBX o XBBXBX (donde B es un residuo básico y X cualquier aminoácido). Una posibilidad alternativa es que estas sustituciones modifiquen los sitios de unión al HS en la proteína E, quedando éstos expuestos de manera que fuese más accesible a la heparina.

La pérdida de un residuo ácido (E327G) en la proteína E de DENV-4, luego de la adaptación en células BHK-21, podría explicar el aumento de la susceptibilidad a la heparina hipersulfatada, debido a un incremento de la carga neta positiva en la superficie de la proteína E, que mejoraría la unión a este GAG soluble, cargado negativamente. Esta misma mutación también fue descrita por Añez y col. (38) en DENV-4, luego de haber sido propagado en células de pulmón fetal de mono Rhesus para la producción de vacunas, quien demostró que

la mutación E327G en DENV-4 aportó un sitio de unión para una interacción de alta afinidad del virus a la heparina por incremento de la carga neta positiva en un área localizada en el borde lateral superior del dominio III de la glicoproteína E, la cual es accesible a la superficie del virión.

Adicionalmente, en el presente estudio se demostró que los cuatro serotipos de DENV incrementaron su rendimiento viral luego de la adaptación a células BHK-21. Este hallazgo podría ser consecuencia de las mutaciones ocurridas en la proteína E, las cuales mejorarían la eficiencia de la replicación viral en las células de cultivo. Sin embargo, no se puede descartar la ocurrencia de mutaciones en otros genes virales, no analizados en el presente estudio, que afecten la eficiencia de la replicación.

Es importante resaltar, que el número de pases realizados a los cuatro serotipos de DENV en células BHK-21, fue el resultado de la aparición de un efecto citopático marcado y reproducible, por lo que se consideró que ocho pases asegurarían una selección de variantes virales mejor adaptadas en cada caso. Hecho que se confirmó con los resultados presentados aquí, los cuales sugieren que la adaptación de cepas de DENV a células BHK-21, se acompañan de mutaciones en la proteína E, que incrementan la carga neta positiva por ganancia de aminoácidos básicos, lo cual podría favorecer la interacción del virus con la heparina hipersulfatada, resultando en una inhibición de la infectividad en células BHK-21. Considerando que la heparina es un análogo estructural del HS, estos datos apuntan que el HS podría jugar un papel significativo en la infectividad de las cepas de DENV adaptadas a esta línea celular, a diferencia de los aislados de DENV no adaptados, los cuales podrían utilizar moléculas receptoras distintas al HS para mediar la entrada a células BHK-21, teniendo en cuenta que diferentes proteínas han sido identificadas como re-

ceptores potenciales para los DENV en diferentes tipos de células.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Oficina de Planificación del Sector Universitario del Consejo Nacional de Universidades (OPSU-CNU), Programa de Formación de Doctores "Alma Mater", y al programa LOCTI "Caracterización molecular de los virus del dengue circulantes en Venezuela" por el financiamiento otorgado para el desarrollo del presente trabajo.

## REFERENCIAS

1. **TDR/WHO.** Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO) & Special Programme for the Research and Training in Tropical Diseases (TDR); 2009.
2. **Ranjit S, Kissoon N.** Dengue hemorrhagic fever and shock syndromes. *Pediatr Crit Care Med* 2011; 12(1): 90-100.
3. **World Health Organization.** Dengue and dengue hemorrhagic fever. Factsheet No. 117. 2012. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>. Accesado 13 de julio de 2012.
4. **Kuhn RJ, Zhang W, Rossman MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG.** Structure of Dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation and fusion. *Cell* 2002; 108: 717-725.
5. **Normile D.** Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science* 2013; 342(6157): 415.
6. **Monath T, Heinz F.** Flavivirus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. P 961-1034.
7. **Rico-Hesse R.** Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990; 174(2): 479-493.
8. **Crill WD, Roehrig JT.** Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue

- virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cell. *J Virol* 2001; 75: 7769-7773.
9. **Smith GW, Wright PJ.** Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus infected Vero and *Aedes albopictus* cell. *J Gen Virol* 1985; 66: 559-571.
  10. **Heinz FX.** Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv Vir Res* 1986; 31:103-168.
  11. **Lindenbach BD, Rice CM.** Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, col., Eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Williams y Wilkins; 2001. P 991-1041.
  12. **Martinez-Barragan J, Del Angel RM.** Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection. *J Virol* 2001; 75: 7818-7827.
  13. **Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM.** Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 1997; 3: 866-871.
  14. **Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruijgrok RW, Zarski JP, Drouet E.** Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* 2002; 292:162-168.
  15. **Hilgard P, Stockert R.** Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 2000; 32: 1069-1077.
  16. **Hung SL, Lee PL, Chen HW, Chen LK, Kao CL, King CC.** Analysis of the steps involved in dengue entry into host cells. *Virology* 1999; 257:156-167.
  17. **De SF-Tischer PC, Talarico LB, Nosedá MD, Guimaraes SMPB, Damonte EB, Duarte MER.** Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. *Carbohydr Polym* 2006; 63: 459-465.
  18. **Pujol CA, Ray S, Damonte EB.** Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. *Int J Biol Macromol* 2012; 51(4): 412-416.
  19. **Talarico LB, Duarte MER, Zibetti RGM, Nosedá MD, Damonte EB.** An algal derived DL-galactan hybrid is an efficient preventing agent for in vitro dengue virus infection. *Plant Medical* 2007; 73: 1464-1468.
  20. **Thaisomboonsuk BK, Clayson ET, Pantuwatana S, Vaughn DW, Endy TP.** Characterization of dengue-2 virus binding to surfaces of mammalian and insect cells. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72: 375-383.
  21. **Celis A.** Papel de los glicosaminoglicanos en las interacciones tempranas de virus dengue en células susceptibles. [Tesis Doctoral]. Caracas: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC); 2011.
  22. **Klimstra WB, Ryman KD, Johnston R.** Adaptation of Sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor. *J Virol* 1998; 72:7357-7366.
  23. **Lee E, Hall R, Lobigs M.** Common E protein determinants for attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis and West Nile viruses. *J Virol* 2004; 78: 8271-8280.
  24. **Lee E, Lobigs M.** Mechanism of virulence attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis virus and Murray Valley encephalitis virus. *J Virol* 2002; 76: 4901-4911.
  25. **Mandl CW, Kroschewski H, Allison SL, Kofler R, Holzmann H, Meixner T, Heinz FX.** Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation in vivo. *J Virol* 2001; 75: 5627-5637.
  26. **Roche RR, Alvarez M, Guzman MG, Luis M, Kouri G.** Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C6/36-HT cells. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3508-3510.
  27. **Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N.** Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semi micro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 1985; 22:250-254.
  28. **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of

- progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673-4680.
29. **Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24:1596-1599.
  30. **Talarico LB, Damonte EB.** Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. *Virology* 2007; 363: 473-485.
  31. **Talarico LB, Pujol C, Zibetti R, Faría P, Nosedá M, Duarte M, Damonte E.** The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Res* 2005; 66: 103-110.
  32. **Lee E, Wright P, Davidson A, Lobigs M.** Virulence attenuation of Dengue virus due to augmented glycosaminoglycan-binding affinity and restriction in extraneural dissemination. *J Gen Virol* 2006; 87: 2791-2801.
  33. **Guirakhoo FZ, Zhang G, Myers BW, Johnson K, Pugachev R, Nichols N, Brown N, Lavenbook I, Draper K, Cyrek S, Lang J, Fournier C, Barrere B, Delagrave S, Monath TP.** A single amino acid substitution in the envelope protein of chimeric yellow fever-dengue 1 vaccine virus reduces neurovirulence for suckling mice and viremia/viscerotropism for monkeys. *J Virol* 2004; 78: 9998-10008.
  34. **Parodi AJ.** Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 69-93.
  35. **Trombetta ES, Helenius A.** Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8: 587-592.
  36. **Lee E, Leang S, Davidson A, Lobigs M.** Both E protein glycans adversely affect dengue virus infectivity but are beneficial for virion release. *J Virol* 2010; 84: 5171-5180.
  37. **Cardin A, Weintraub H.** Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 21-32.
  38. **Añez G, Men R, Eckels K, Lai CJ.** Passage of dengue virus type 4 vaccine candidates in fetal rhesus lung cells selects heparin-sensitive variants that result in loss of infectivity and immunogenicity in rhesus macaques. *J Virol* 2009; 83: 10384-10394.
  39. **Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC.** Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 2004; 427: 313-319.