



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

T E S I S

BO 1322/97
e. 1

MECANISMOS DE PENETRACION
DEL VIRUS DEL DENGUE A LAS CELULAS C6/36
(*Aedes albopictus*)

PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

MARIA YAZI MENDOZA MIRANDA

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial a la **Dra. Rosa Ma. Del Angel Nuñez de Cáceres**, por mencionar aquellas palabras precisas en el momento exacto fomentando en mi nuevamente la confianza, y por brindarme su valioso tiempo en la realización de este trabajo.

Con un gran cariño y respeto al **M. en C. Juan Santiago Salas Benito**, por permitirme compartir en todo momento su experiencia y demostrarme ser siempre un amigo dispuesto a apoyarme incondicionalmente.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Virología del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y Estudios Avanzados de I.P.N. Salvador Chavarría, José de Jesús Martínez, Beatriz Urrutia, Mónica A. Denova, Fernando Medina, Jorge García, Ligia Canto, A. Lorena Gutiérrez.

A Manuel que de manera directa o indirecta, contribuyó con sus observaciones, comentarios o simplemente con su interés, para la realización de este trabajo.

Con todo respeto a un amigo muy especial al **Dr. Guillermo del Rey**, por sus consejos, pero sobre todo por su amor a la vida y a su carrera.

A Fernando Medina por el cultivo de la Línea celular C6/36 (*Aedes albopictus*).

INDICE

INTRODUCCION	PAGINA
Fisiopatología del Virus del Dengue.....	2
Características del Genoma Viral	7
Cultivo de Célula	11
Sitos de replicación	11
ANTECEDENTES	12
OBJETIVOS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS PARTICULARES	16
MATERIAL	
Cultivo de la Línea Celular C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>)	17
Purificación del Virus del Dengue-4	17
Gel para electroforesis de poliacrilamida-SDS para proteínas	18
Trasferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa	19
Reactivo de Bradford para cuantificar proteínas	20
Columna de proteína G recombinante	20
Solución de RSB-40 1%	21
Solución de MEM sin metionina	21
Material radioactivo Metionina L- (³⁵ S)	21
Líquido de Centelleo	21
Coctel Inhibidor	21
Soluciones para inmunofluorescencia indirecta	22
METODOLOGIA	
Propagación del Virus del Dengue-4 en cerebro de ratón lactante	23
Cultivo de la Línea celular C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>)	23
Propagación del Virus del Dengue-4 en la Línea celular C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>)	23
Electroforesis en gel de poliacrilamida -SDS para proteínas	24
Transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa	25
Western Blot (peroxidasa)	25
Purificación de Gamma-globulinas humanas con una solución saturada de sulfato de Amonio	25
Producción de Anticuerpos policlonales IgG anti-VD4 de ratón	26
Purificación de Anticuerpos policlonales IgG anti-VD4 de de ratón	26
Extracto de proteínas celulares C6/36	27
Marcaje del Virus del Dengue-4 con metionina ³⁵ S	27
Marcaje de proteínas celulares de C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>) con metionina ³⁵ S	27

Ensayo de formación del complejo VD4-Anticuerpo IgG	28
Ensayos de Binding (Ensayos de unión)	28
Ensayo de inmunofluorescencia indirecta para detectar la proteína E del VD4	30

RESULTADOS

Reconocimiento del serotipo del VD4 por Anticuepos monoclonales anti-proteína E del VD4	31
Efecto citopático sobre la monocapa de células C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>)	33

Ensayos de Binding o unión:

Tratamiento de las Células C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>) con tripsina al 0.06% e incubación con el Virus del Dengue-4 ³⁵ S	39
Incubación con las C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>) con el complejo Virus D4 ³⁵ S-Anticuerpo IgG de ratón a 37°C	39
Tratamiento de las Células C6/36 (<i>Aedes abopictus</i>) con tripsina al 0.06% e incubación con el complejo Virus D4 ³⁵ S-Anticuerpo IgG	41
Tratamiento de las Células C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>) con Gamma-globulina humanas e incubación con el complejo Virus D4 ³⁵ S-Anticuerpo IgG	45

DISCUSION	48
------------------------	----

CONCLUSIONES	52
---------------------------	----

BIBLIOGRAFIA	53
---------------------------	----

INDICE DE FIGURAS

PAGINA

FIGURA No.1.- Distribución del Virus del Dengue en México.....	3
FIGURA No.2.- Hembra de <i>Aedes aegypti</i>	5
FIGURA No.3.- Hembra de <i>Aedes albopictus</i>	5
FIGURA No.4.- Modelo de Organización del Virus del Dengue	8
FIGURA No.5.- Organización Genómica del Virus del Dengue	10
FIGURA No.6.- Pasos requeridos para la replicación de flavivirus y la transmisión por el vector	13
FIGURA No.7.- Ensayo de inmunofluorescencia indirecta de las Células C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>) infectadas con el VD4.....	32
FIGURA No.8.- Efecto citopático sobre la monocapa de Células C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>)	34
FIGURA No.9.- Virus del Dengue-4 en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con Coomasie	35
FIGURA No.10.- Anticuerpos policlonales IgG anti-VD4 de ratón purificados mediante una columna de proteína G recombinante.....	36
FIGURA No.11.-Ensayo de Western Blot que muestra el reconocimiento del VD4 por los anticuerpos policlonales IgG anti-VD4 de ratón	37
FIGURA No.12.- Ensayo de Western Blot con Anticuerpos policlonales anti-VD4 de ratón	37
FIGURA No.13.- Efecto de la tripsina en la infección por el VD4 ³⁵ S a 1hr. y 3 hrs. Post-infección	40
FIGURA No.14.-Células C6/36 incubadas con los complejos a diferentes con - centraciones a 37°C	42
FIGURA No.15.-Células C6736 incubadas con los complejos a diferentes con - centraciones a 4°C	43
FIGURA No.16.-Efecto de la tripsina en la infección por la presencia de los com- plejos a diferentes concentraciones a 37°C	44
FIGURA No.17.-Gamma-globulinas aisladas de suero humano mediante la pre- cipitación por una solución de Sulfato de Amonio saturado	46
FIGURA No.18.- Efecto de las Gamma-globulinas humanas en la infección por los complejos a diferentes concentraciones.....	47

ABREVIATURAS

ADE	Aumento dependiente de anticuerpo
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CO₂	Bióxido de Carbono
c.p.m	Cuenta por minuto
DAB	3,3' diaminobenzidina tetrahidroclorada
DNA	Acido desoxiribonucleico
Fab	Fragmento de unión al antígeno
Fc	Fragmento cristalino del anticuepo
FHD	Fiebre Hemorrágica por Virus del Dengue
G.G	Gama globulinas
GppAmp⁷	Residuo de guanina metilado en la posición 7
IgG	Anticuerpo tipo G
kDa	Kilodaltones
MEM	Medio mínimo esencial
ml	Mililitros
mM	Milimolar
M	Moles
Prot. Cel.	Proteínas Celulares
Prot. Cel-Ac	Complejo Proteínas Celulares-Anticuerpo (IgG)
nm	Nanómetros
p.f.u.	Unidad formadora de placas
p.i.	Post-infección
RNA_m	Acido ribonucleico mensajero
RNA	Acido ribonucleico
r.p.m	Revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
SSD	Síndrome de shock por Virus del Dengue
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
Tx/Trip	Tratamiento con tripsina
TEMED	N,N,N' tetrametil etilen diamino
ug	Microgramos
ul	Microlitros
uCi	Microcurie
v/v	Volumen/Volumen
VAP	Proteína de unión viral
VD4	Virus Dengue serotipo 4
VD4-Ac	Complejo Virus del Dengue 4-Anticuerpo (IgG)
VD2	Virus Dengue serotipo 2

RESUMEN

El Virus del Dengue es el agente causal de la enfermedad llamada "Fiebre del Dengue", la cual se encuentra distribuida en regiones de tropicales y subtropicales de Asia, Africa, Australia y Oceanía principalmente, sin embargo, en los últimos 25 años se ha presentado en regiones de América. En México se ha reportado la circulación de los cuatro serotipos del virus (Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3 y Dengue 4) en los estados de Guerrero, Puebla, Sonora Oaxaca y Chiapas. El virus es transmitido al hombre por la picadura de la hembra hematófaga de mosquitos *Aedes aegypti* Linnaeus la cual se caracteriza por ser estrictamente antropofila, pero existen otras especies susceptibles a la infección entre las que se encuentra el mosquito *Aedes albopictus* Skuse, ambas especies se encuentran en México. En el hombre la infección por el Virus del Dengue presenta un cuadro clínico que va desde un cuadro febril (Dengue clásico) y las formas graves de la enfermedad que pueden manifestarse como Fiebre Hemorrágica por Dengue y Síndrome de Choque (FHD/SCD). El Virus del Dengue tiene como célula blanco a los macrófagos, tales como los monocitos. En éstas el virus entra a través de un receptor viral natural sensible a la acción de tripsina o por medio de receptores Fc γ R cuando el virus forma el complejo virus-anticuerpo. Para conocer los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la infección en el vector, se utilizó la línea celular C6/36 derivada de mosquito (*Aedes albopictus*). Esta línea celular presenta una alta susceptibilidad a la infección por el Virus del Dengue. Cuando las células C6/36 fueron tratadas con tripsina, la infección por el virus disminuyó significativamente con respecto a las células sin tratamiento, por otro lado la presencia de anticuerpo (IgG) facilita la entrada del Virus del Dengue como se presenta en las células monocíticas, sin embargo esta susceptibilidad se reduce por la acción de la proteasa. Los resultados encontrados en este trabajo indican que el Virus del Dengue penetra a las células C6/36 a través de un receptor viral natural, así como por la presencia del complejos virus-anticuerpo (IgG). Ambos mecanismos requieren de componentes celulares sensibles a tripsina. Es de suponerse entonces que la molécula involucrada en la internalización de los complejos virus-anticuerpo no es un receptor tipo Fc ya que es sensible a tripsina y no es bloqueado por la incubación con Gamma-globulinas.

INTRODUCCION

Los virus son una clase única de agentes infecciosos que se caracterizan por ser parásitos intracelulares obligados que dependen en gran medida de la maquinaria sintética de la célula para poderse replicar. Estos son los responsables de muchas enfermedades infecciosas importantes que afectan a la humanidad, algunas de ellas pueden ser fatales como la Rabia, la Viruela, el SIDA, la Hepatitis, el Dengue hemorrágico, etc.. Ellos se encuentran constituidos por pequeños segmentos de material genético ya sea DNA o RNA, rodeado por una envoltura de proteínas llamada cápside y, en algunos casos, presentan una bicapa lipídica de origen celular denominada envoltura.

Actualmente la virología no solamente se ha enfocado al aislamiento, propagación y caracterización de determinados virus, sino también a entender la interacción virus-célula a través de los mecanismos que intervienen en la patogénia de los mismos (Fenner-White, 1984). Cada virus afecta solamente a un grupo bien definido de especies biológicas (hombre, animales, vegetales o bacterias) y dentro de ellas solamente a algunas células tales como los macrófagos (virus de la familia Flaviviridae), células nerviosas (Poliovirus), células musculares (Virus de la Viruela) u otras. En el proceso de infección viral, el primer paso que ocurre es la unión del virus a la superficie de la célula hospedera en la cual participan, por un lado, moléculas presentes en la superficie de la cápside o de la envoltura denominadas VAP (Viral Attachment Protein), y por otro lado, alguna molécula presente de una manera natural en la superficie celular que actúa como receptor viral (Lentz, L.T., 1990). Los virus pueden entrar a la célula hospedera mediante receptores específicos o por la participación de dos o más receptores (Haywood, A.M., 1994). Algunos otros interactúan indirectamente empleando una molécula intermediaria, la cual puede hacer más eficiente la entrada del virus a la célula blanco. Un ejemplo de esto último es el incremento de la eficiencia de la infección con el empleo de anticuerpos intermediarios, proceso demostrado en varios virus, tales como el Dengue y West Nile (Littau, R. 1990) en donde los anticuerpos antivirales se unen por su porción Fab al virus y por su porción Fc al receptor presente en la superficie celular, con lo que se facilita el ingreso del virus a la célula. (Lentz L. Tomas 1990.

Carballal, 1991).

FISIOPATOLOGIA DEL VIRUS DEL DENGUE

El Virus del Dengue pertenece a la familia Flaviviridae del cual existen cuatro serotipos diferentes Dengue-1, Dengue-2, Dengue-3, y Dengue- 4, y es el agente causal de la enfermedad llamada "Fiebre del Dengue" la cual tiene una distribución mundial y se estima que ocurren mas de 100 millones de casos por año en todo el mundo. y en zonas endémicas se presenta en un 10% en promedio anual (Halstead, S. B. 1984). El Dengue se considera una enfermedad limitada a algunas regiones de Asia, África, Australia y Oceanía, sin embargo, en los últimos 25 años se han comenzado a presentar casos de dengue hemorrágico en algunas regiones de América entre las que destaca Cuba (1981), no sólo por el número de caso sino por ser el primer país de Las Américas que sufrió una epidemia por esta enfermedad, Venezuela(1989-1990) y Brasil (1990-1991)(Dantés, G.H.1991). En México, a finales de 1978, sólo se tenían reportes de Dengue clásico en el sureste pero a partir de 1980-1993 se han reportado 25 casos de Dengue hemorrágico (Epidemiología, 1995). En los 80's estudios seroepidemiológicos reportan la circulación de tres serotipos del Dengue en nuestro país. El serotipo 4 (Dengue-4) fue aislado del estado de Oaxaca, el serotipo 2 (Dengue-2) del estado de Guerrero y el serotipo 1 (Dengue 1) de los estados de Puebla y Sonora (Kaplan, 1983). En 1996 se reportó el serotipo 3 (Dengue 3) aislado de casos de Dengue Hemorrágico en los estados de Colima, Chiapas, Oaxaca, San Luis Potosi, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz (Epidemiología, 1996). En la actualidad en la mayor parte del territorio nacional se encuentra regiones afectadas por el Dengue y sólo en 5 entidades la incidencia, es baja como en Chihuahua, Distrito Federal, México, Guanajuato y Tlaxcala. Los estados más afectados de 1980 a 1993 son, de acuerdo al número de casos, Veracruz(12.6%), Guerrero(10%), Oaxaca(7.7%), Sinaloa (7.6%) , Yucatán(6.3%) y Tamaulipas(6.13%) en donde se concentran casi el 50% del total de casos reportados(Dantés, G.H., 1994)(FIGURA No. 1).

✓ El Virus del Dengue es transmitido a los vertebrados por la picadura de la hembra hematófaga del mosquito de el género *Aedes* de la especie *Aedes aegypti* Linnaeus



- Estados que presentan una incidencia baja por "Fiebre del Dengue".
- Estados donde se concentran aproximadamente el 50% del total de los casos

FIGURA No.1.- Distribución de la enfermedad de la "Fiebre del Dengue" en México. Tomado de Dantés-Gómez-Héctor, 1994.

que se caracteriza por ser estrictamente antropofílica. Ésta se encuentra ampliamente distribuida en Asia y África entre los 30° longitud Norte y 20° longitud Sur e infecta al hombre llevando a cabo el ciclo hombre-mosco-hombre. Además existen otras especies que son susceptibles a la infección como: *Aedes albopictus* Skuse, *Aedes scutellaris* Walk y *Aedes polynesiensis* en Tahití (Ramos, C. 1989. Halstead, S.B. 1988. Dantés, G. H. , Bernal, Y. 1994), que afectan tanto al hombre como al mono.

Actualmente tanto en México como en el Continente Americano se encuentran las especies *Aedes aegypti* (FIGURA No. 2) y *Aedes albopictus* (FIGURA No.3). En México se ha visto que *Aedes albopictus* ocupa los mismos microambientes de crianza que *Aedes aegypti* (Dantés, G.H. 1994) y se ha planteado la hipótesis de que *Aedes albopictus* sirve como puente entre los ciclos urbano y silvestre, al picar indistintamente al hombre y a monos infectados transmitiendo el virus. El mosquito es estrictamente doméstico y en condiciones favorables su ciclo de vida se puede complementar en 10 días. El habitat de las larvas son los depósitos de agua estancada, caucho, vegetales, vidrio, metal, madera, en las rocas, etc. (OPS, 1995). El mosquito pica durante el día dentro de un período silencioso preferentemente en la zona de los tobillos, codos, parte posterior de las rodillas y del cuello y adquiere el virus de personas infectadas entre 16 y 18 horas antes del periodo febril o bien durante el mismo. Después de haber ingerido la sangre infectada con el Virus del Dengue se necesita un periodo mínimo de incubación de 8 a 14 días, tiempo durante el cual se multiplica en las glándulas salivales del mosquito permitiéndole actuar como transmisor por el resto de su vida (Ramos, C. 1989. Halstead, S.B. 1989. Zarate, A. 1992).

En el hombre la Fiebre de Dengue presenta un cuadro clínico que varía desde un cuadro febril (Dengue clásico o infección primaria) hasta las formas graves que pueden manifestarse como Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) o como Síndrome de choque por Dengue (SCD).

1.-Dengue Clásico:

Se caracteriza por tener un periodo de incubación de 2-8 días, se presenta con

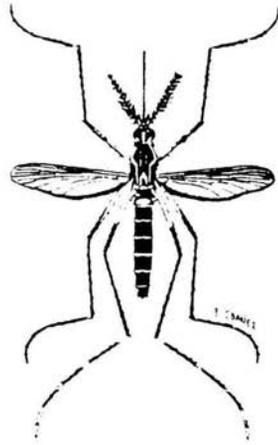


FIGURA No.2.- Hembra *Aedes aegypti*. Vista dorsal.

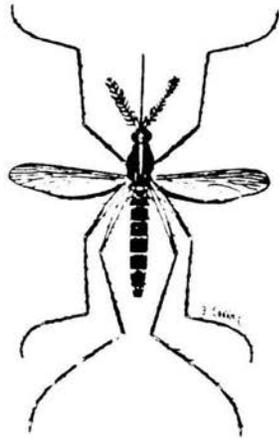


FIGURA No.3.- Hembra de *Aedes albopictus*. Vista dorsal. Tomado de Dantés Gómez Héctor, 1994.

fiebre elevada y escalofrío acompañado de cefalea, dolor generalizado en todo el cuerpo, hepatomegalia, vómito y molestias gastrointestinales leves, sin embargo existe la posibilidad de que pase desapercibida por semejar a un cuadro gripal. Esta forma de la enfermedad generalmente se presenta en la primoinfección y es de carácter benigno. Los mecanismos de defensa inmunológicos, tales como los anticuerpos y macrófagos, son suficientes para controlarla por lo que se resuelve aproximadamente en 3-6 semanas dejando memoria inmunológica serotipo específica (Kumate, 1988).

2.-Dengue hemorrágico y Síndrome de choque:

Se manifiesta por temperaturas elevadas, hipotensión, presencia de petequias en la piel y hemorragia en tubo digestivo. La caída de temperatura indica el inicio de un síndrome de choque por dengue en la cual la condición del paciente se deteriora rápidamente, la piel se enfría, el pulso se acelera y ocurre liberación de aminas vasoactivas responsables de la hipotensión por lo que el paciente entra en un estado letárgico (Dantés, G. 1995. Reyes, R.H. 1990).

Para tratar de explicar la presencia de estas formas graves de la enfermedad se ha sugerido dos hipótesis: La primera propuesta explica que los virus pueden presentar diferentes grados de virulencia (variación antigénica) que están relacionados directamente con las manifestaciones graves de la enfermedad (Scott,R.M. 1976. Trent, D.W. 1981). La segunda, y la más probable, supone que la infección secundaria (SFH/SSD) se ve aumentada por la existencia de anticuerpos (IgG) desarrollados por un contacto previo con un serotipo diferente durante la primoinfección (Hastead, S.B. 1988). A este fenómeno se le llama “ estimulación” dependiente de anticuero (ADE) y estas proteínas actúan como moléculas que facilitan la entrada del virus a la célula huésped, debido a su capacidad de interactuar con los macrófagos (célula blanco de la infección viral) por su porción Fc. Estas condiciones no sólo se han visto relacionadas con infecciones secundarias, si no que también han ocurrido en niños menores de un año cuyas madres transmitieron los Anticuerpos anti-Dengue en forma pasiva, y donde

estos anticuerpos tienen dos implicaciones: la primera de protección y la segunda de riesgo ya que la disminución de los títulos con el paso del tiempo incrementa las posibilidades de desarrollar las formas graves de la infección (Kliks, C.S. 1988).

CARACTERISTICAS DEL GENOMA VIRAL

El Virus del Dengue es miembro de la Familia Flaviviridae. Esta Familia está constituida por 66 virus de los cuales el 44% están asociados a infecciones en el hombre, incluyendo el virus de la Fiebre amarilla, el virus de la Encefalitis Japonesa y el Virus del Dengue (Monath, P. 1990).

El Virus del Dengue es envuelto, de forma icosaédrica y de 40-50 nm de diámetro. Su genoma está constituido por una molécula de RNA que tiene una longitud de 10,500 nucleótidos con un coeficiente de sedimentación de 42s y un peso molecular de 3.3×10^6 daltones. Es de cadena sencilla y de polaridad positiva lo que le permite funcionar tanto RNA genómico y como RNA mensajero (RNAm) (**FIGURA No.4**) (Chambers, T.J. 1990. Dimmock, 1994.). En el extremo 5' del genoma viral se encuentra una estructura llamada "cap" o capuchon formada por un residuo de guanina metilado en la posición 7 (GppAmp⁷). El cap es responsable del proceso de iniciación de la traducción y de la unión de los ribosomas para la posterior síntesis de proteínas estructurales y no estructurales. En el extremo 3' carece de poli A, y en su lugar se encuentra una estructura en forma de horquilla que le confiere estabilidad al RNA (Westaway, E.G. 1985, 1987. Schlesinger, S. 1990). El genoma del virus está organizado de la siguiente manera: en el extremo 5' se encuentran las secuencias que codifican para las proteínas estructurales: la C es la proteína de la cápside, M o de membrana y E o de envoltura. La C es una proteína básica y no glicosilada cuyo peso molecular es de 13 a 16 kDa, se asocia al RNA viral y da lugar a la nucleocápside. La proteína M es una glicoproteína de 7 a 9 kDa, que es procesada en las etapas tardías de la maduración de virión para dar lugar al fragmento Pr, el cual es liberado al medio mientras que la proteína M propiamente dicha se mantiene anclada a la membrana por su extremo C-terminal hidrofóbico, exponiéndose parcialmente a la superficie.

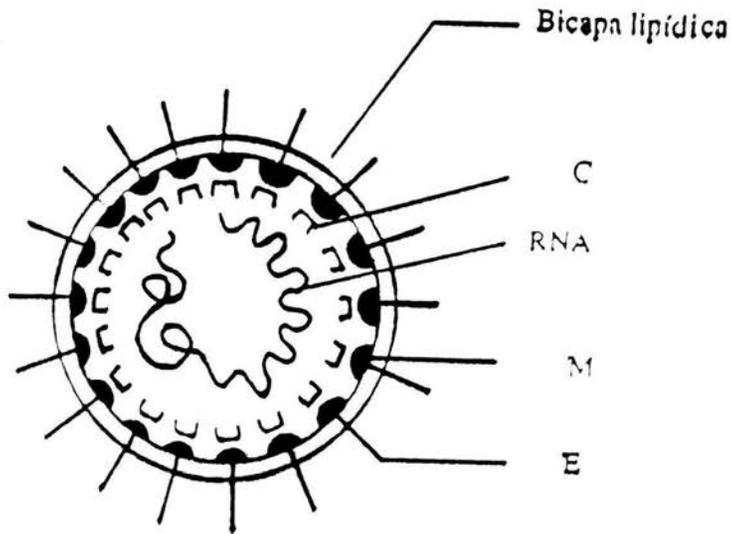


FIGURA No. 4.- MODELO DE ORGANIZACION DEL VIRUS DEL DENGUE.

El Virus del Dengue es de forma icosaédrica de 40-50 nm de diámetro, está envuelto por una bicapa lipídica presenta en su interior un RNA de polaridad positiva. En el virus dengue maduro se encuentran las proteínas estructurales: La proteína C de la cápside, la M de membrana, la E de envoltura que se encuentra expuesta en la superficie. Tomado de Ramos Celso, 1989.

Aparentemente el precursor, conocido como PrM, protege a la proteína E de los cambios conformacionales que podría sufrir en las condiciones de bajo pH presentes en algunos compartimentos de la vía exocítica. La proteína E tiene un peso molecular de 53 a 59 kDa, dependiendo del serotipo del virus, es glicosilada (sólo en el caso de Dengue, pero no para el resto de los Flavivirus) y es el componente principal de la envoltura (Chamber, T.J. y col. 1990). Desempeña un papel muy importante en la unión del virus al receptor celular, es la responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes específicos del serotipo, tiene la actividad de hemaglutinación, es responsable de la fusión de membrana a nivel intra-endosomal a pH ácido y parece estar involucrada en el ensamble y liberación de las partículas virales. (Westaway, E.G. 1987. Rice, M.C.H. 1985. Chamber, T.J. y col. 1990. Kimura, T. 1988).

Hacia el extremo 3' del RNA, se encuentran las secuencias que darán origen a las proteínas no estructurales: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5. La NS1 es una glicoproteína, la cual puede encontrarse asociada a la membrana plasmática de las células infectadas. Se ha visto que en la infección por Flavivirus los anticuerpos dirigidos contra NS1 son capaces de fijar el complemento y las moléculas que son excretadas de la célula son conocidas como antígeno soluble que también fijan al complemento. La inmunización activa con NS1 o inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales anti-NS1 protege a los animales de retos con Flavivirus homólogos (Bray, M y col. 1989). Otra de las posibles funciones que puede tener la proteína NS1 es la de estar involucrada en el proceso de replicación viral (Rice, M.C.H. y col. 1985). Las proteínas NS2a, NS4a, NS4b, son pobremente conservadas en los Flavivirus, sus funciones no son bien conocidas, pero se cree que participan en la replicación, ensamble y/o liberación de las partículas virales, dado que al estar asociadas a la membrana del retículo endoplásmico, podrían formar complejos replicativos con las proteínas NS3 y NS5 por medio de interacciones proteína-proteína (Chambers, y col. 1990. Kurane, Y. 1991a). La proteína NS3 y la NS2b parece formar un complejo proteico con actividad proteolítica, además la NS3 tiene dominios que sugieren que esta involucrada en la replicación viral. La NS5 es la más altamente conservada en los Flavivirus y su posible función es la de RNA polimerasa (**FIGURA No.5**) (Chambers, T.J y col. 1990).

CULTIVO DE CELULAS

Los Virus del Dengue son capaces de multiplicarse en una amplia gama de cultivos celulares, incluyendo de mamíferos e insectos. Las células que más se han utilizado con el fin de mantener y propagar este virus son LLC-MK2 y VERO (riñón de mono verde), BHK-21 (riñón de hámster lactante), líneas humanas, FRhL (pulmón fetal de mono rehusus) y recientemente las PDK (de riñón de perro)(Halstead, S.B. 1984), embriones de ratón y de pollo. Las líneas celulares de mosquito altamente susceptibles a la infección por este virus son: las células C6/36 (*Aedes albopictus*) LSTM-AP61(*Aedes Pseudoscutellaris*) y las TRA-284 (*Toxorhynchites amboinensis*) (Kumate, 1988. Monath, P.T. 1990).

En los artrópodos la infección sí tiene cierto efecto patológico pero en los vertebrados los cambios son más serios. Esta diferencia se observa también en los cultivos celulares, en donde la replicación viral en las células de vertebrados se caracteriza por la destrucción (efecto citopático) de la célula infectada, en contraste con la escasa apariencia de daño en las líneas celulares de artrópodos (Sinarachatanant & Olson, 1973).

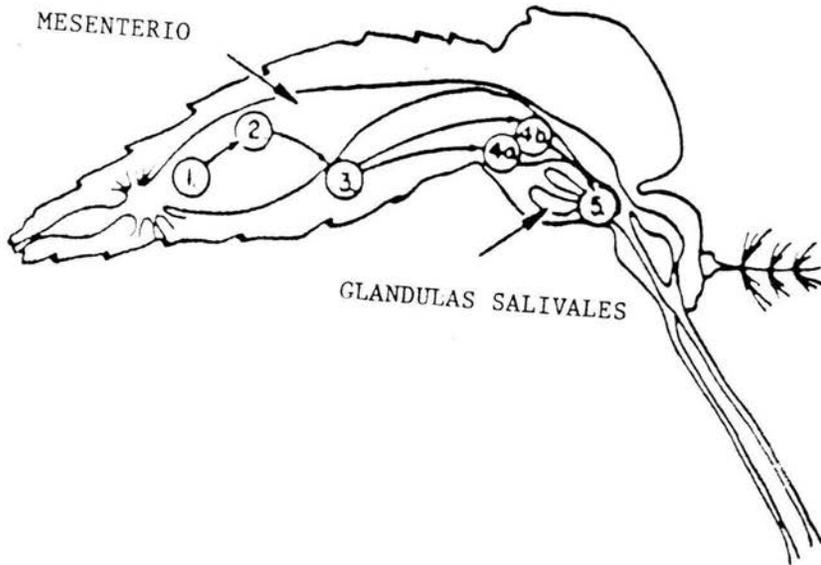
SITIOS DE REPLICACION

En el hombre el Virus del Dengue se replica principalmente en células del sistema fagocítico mononuclear, tales como macrófagos, células mononucleares de la piel, bazo, ganglios linfáticos, corteza tímica, células de kuppfer, macrófagos alveolares y del glomérulo renal. (Bhamarapravati, N. 1981. Monath, P.T. 1990). En el mosquito se replica en el sistema nervioso, cerebro, glándulas salivales, tejido graso, células epidérmicas, epitelio de intestino medio y tracto genital, pero no es capaz de replicarse en músculo estriado, ovario e intestino posterior (Sriurairatna, S. & Bhamarapravati, N. 1977). En el ratón infectado el virus puede encontrarse en médula espinal, musculo esquelético y bazo (Boonpucknavig,1981).

ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, el Virus del Dengue se transmite al hombre por la picadura del mosquito *Aedes aegypti*. El vector se infecta con el virus al ingerir sangre contaminada de algún individuo que presenta la enfermedad. Una vez que el virus penetra al mosquito, tiene la capacidad de replicarse en células epiteliales del intestino medio y trasladarse después, por el homocel, hasta las células neuronales y las glándulas salivales, lugar donde se replica (Monath, P.T. 1990. Sriurairatna, S. and Bhamarapravati, 1977). Por último el virus es expulsado a través de secreciones exocrinas salivales mediante la probosis cuando se esta alimentando de tal manera que el ciclo de transmisión continúa (FIGURA No.6).

Para poder conocer los procesos de infección que ocurren tanto en el hombre como en el vector, fue necesario utilizar diversas líneas celulares derivadas tanto de vertebrados como de mosquitos, sin embargo, éstas últimas parecen tener ventajas para el aislamiento e identificación de los diferentes serotipos por su alta susceptibilidad a la infección (Sinarachatanant, P. 1973). Una de las líneas celulares de mosquito más utilizadas para estos propósitos son las células C6/36 (*Aedes albopictus*) que han sido adaptadas a crecer en el laboratorio a temperatura de 28°C o 34°C (Igarashi, A. 1979). La penetración del Virus del Dengue en estas células ha sido estudiada por Hase y colaboradores mediante microscopía electrónica, en donde observan que la entrada del Virus del Dengue (serotipo 2) se lleva a cabo mediante la fusión directa de la membrana del virión con la membrana plasmática a través de 3 etapas: En la primera el virión se une a la superficie de la célula mediante sus espigas de envoltura, las cuales atraviesan la membrana. En la segunda la envoltura del virus y la membrana plasmática se sobrelapan, proceso en el cual el virión pierde la estructura de bicapa de su envoltura. Finalmente, en la última etapa, las partículas virales parecen entrar al citoplasma a través de la disrupción de la membrana provocada en la etapa anterior. En este trabajo no se observó que en estas células la penetración del virus fuera por endocitosis mediada por receptor. El mecanismo de entrada del virus a los monocitos de sangre periférica incubadas bajo las mismas condiciones mostraron que varios estadios de entrada son



- 1).- Ingestión de sangre contaminada
- 2).- Células epiteliales del mesenterio infectadas por el virus
- 3).- Virus liberado de células epiteliales del mesenterio
- 4).- a. Virus infectivo en glándulas salivales después de la ampliación secundaria en otras células/tejidos
 b. Virus infectivo en glándulas salivales sin la ampliación secundaria en otras células/tejidos
- 5).- Virus liberado de células epiteliales de las glándulas salivales para ser transmitido al momento de alimentarse

FIGURA No.6.- Pasos requeridos para la replicación de Flavivirus y la transmisión por el vector. Tomado del Fields, 1990.

✓ similares a los observados en las células de mosquito por lo que los autores concluyeron que el Virus del Dengue (serotipo 2) utiliza el mismo mecanismo para entrar a las células monociticas que a las células de mosquito, y en ambos casos las espigas de envoltura del virión se anclan en la membrana plasmática causando una disrupción, de tal manera que el daño producido permite que el virus se introduzca en el interior de las mismas (Hase y col. 1989). Sin embargo durante el desarrollo del trabajo realizado por Barth y col., no se observó en ningún momento la fusión directa de membrana entre el virión y la membrana plasmática, por lo que el autor sugiere que las partículas virales (de Dengue -1 y Dengue- 2) penetran a las células C6/36 por endocitosis y cuando son incubadas con el complejo virus (Dengue-2) - anticuerpo (Dengue-1), son aparentemente fagocitados. A los 30 minutos postinfección (pi) el virus fue encontrado en vesículas y endosomas tempranos y tardíos y a las 24 horas, cuando se incubaron con el complejo ya se encontraba en lisosomas y en los fagosomas. Después de 2-3 días pi los precursores virales se observaron en el retículo endoplásmico rugoso (RER), aunado a un proceso activo de síntesis proteica. Posteriormente algunas partículas virales se encontraron en el aparato de Golgi y en vesículas desnudas o cubiertas de clatrina mediante las cuales el virus era liberado de la célula por exocitosis al fusionarse a la membrana de la vesícula con la plasmática. (Barth, O.M. 1992).

Los mecanismos de replicación del Virus del Dengue en la célula blanco no son aún comprendidos completamente pero se ha visto que existe tropismo por determinadas células lo que hace sospechar que existe un sitio de unión selectivo en su superficie que se une a receptores de la célula blanco. Se sabe que el primer contacto que tiene el virus con la célula huésped esta mediado por la proteína E de la envoltura de membrana. Anderson y colaboradores en 1992, demostraron la correlación que existe entre la unión de la proteína E viral en células susceptibles a la infección. Para ello, se infectaron con Virus del Dengue (serotipo 4) marcado con ³⁵S metionina monocapas de células C6/36 (*Aedes albopictus*), células Vero (riñón de mono verde), y células Hep G2 (Hepatoma humano) y se determinó la susceptibilidad a la infección mediante un ensayo de binding o unión .

Encontraron que las células Vero fueron hasta un 93% más susceptibles a la infección con respecto a las otras células, lo que correlacionó con la presencia de proteína E viral asociada a la pastilla (viral) a las 2 horas de infección. Por otro lado también se examinó la presencia del antígeno viral en varias líneas celulares por medio de un ensayo de inmunofluorescencia y se encontró que en las células Vero y las LLC-MK2 tienen una mayor susceptibilidad a la infección (85%) por el Virus del Dengue (serotipo 4), mientras que las células Hep G2 presentaron una menor susceptibilidad (10%), así como las células L929(Fibroblasto de ratón) y MDBK (riñón bovino)(teniendo menos del 5%). Estas observaciones sugieren que la capacidad del virus para infectar a cualquier tipo celular depende de la presencia de los receptores celulares a los cuales se une la proteína E viral.

El mecanismo de entrada del Virus del Dengue a las células monocíticas ha sido mostrado por Daughaday, el cual presenta evidencias de 2 mecanismos de infección del Virus del Dengue a estas células. Cuando el cultivo de células monocíticas fue tratado con tripsina al 0.075%, (con una actividad de 1g de tripsina digiere 250 de caseína) se observó una reducción de la capacidad de ser infectadas por el virus. Al adicionar anticuerpos (IgG) en concentraciones subneutralizantes a este sistema, se forman complejos virus-anticuerpos los cuales actúan como facilitadores de la infección permitiendo la entrada del virus vía receptor Fc con la porción Fc de la IgG. Lo anterior sugiere entonces la existencia de una vía de entrada del virus mediante la existencia de un receptor viral sensible a tripsina (el cual se modifica, sin dañar a la célula blanco) y otra vía receptor Fc, que es resistente a esta enzima (Daughaday, L. 1981). Aunque la molécula que sirve como receptor para el Virus del Dengue no ha sido aún identificada, la presencia de una vía alterna ha sido ampliamente estudiada. Esta vía de entrada permite la infección mediada por anticuerpos y se le conoce como el aumento dependiente de anticuerpo (ADE). Porterfiel y Peiris trabajando con las células P 388 Di infectadas con el virus West Nile (VWN) en presencia de anticuerpos anti-virus West Nile en concentraciones subneutralizantes observaron un incremento en la replicación viral debido a la presencia de receptores Fc en la superficie de la célula, los

cuales promueven la entrada de los complejos (Porterfield & Peiris, 1979). Estos resultados fueron comprobados por trabajos en donde las células monocíticas incubadas con anticuerpos monoclonales anti-Fc bloquearon la unión del complejo antígeno-anticuerpo, por lo tanto mostraban una reducción en la infección. Por los datos presentados parece que los receptores Fc participan de manera importante en la patogénesis de infecciones por el Virus del Dengue (Mady, J.B. 1991, 1993. Littua R, 1990) al menos en el caso de monocitos. De acuerdo a los antecedentes planteados anteriormente la vía alterna de entrada del Virus del Dengue por anticuerpos no ha sido estudiada en las células C6/36 pero es posible considerar que las líneas celulares derivadas de mosquito puede presentar una vía de entrada diferente a la del receptor natural. Para poder conocer la existencia de una vía de entrada alterna del Virus del Dengue a las células C6/36 (*Aedes albopictus*) se plantearon los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- * CONOCER LOS MECANISMOS DE ENTRADA DEL VIRUS DEL DENGUE A LAS CELULAS C6/36 (*Aedes albopictus*).

OBJETIVOS PARTICULARES

- * DETERMINAR SI EL RECEPTOR PARA EL VIRUS DEL DENGUE EN CELULAS C6/36 (*Aedes albopictus*) ES SENSIBLE A TRIPSINA COMO OCURRE EN LAS CELULAS MONOCITICAS.
- * DETERMINAR SI LAS CELULAS C6/36 (*Aedes albopictus*) SON SUCEPTIBLES A LA INFECCION POR EL COMPLEJO VIRUS-ANTICUERPO VIA RECEPTOR TIPO Fc DE LAS INMUNOGLOBULINAS.

MATERIALES

MATERIAL BIOLÓGICO:

CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR C6/36 (*Aedes albopictus*).

Las células C6/36 (*Aedes albopictus*) fueron crecidas en monocapa a una temperatura de 34°C en medio de cultivo MEM (medio mínimo esencial) con Suero Fetal Bovino al 4% con la siguiente composición:

MEDIO DE CULTIVO MEM

	Cantidad/litro
* Medio Esencial de Eagle (MEM)	1000 ml
Suero Fetal Bovino (Inactivado a 56°C por 30 min.)	100 ml
** Aminoácidos no esenciales 100x	10 ml
*** Vitaminas 100x	10 ml
Glutamina 200 mM	20 ml
Bicarbonato de sodio	2.2 ml
Agua bidestilada	755 ml
* Gibco No. cat. 4101500 L	
** Gibco BRL No. cat. 1140-019	
*** Vitaminas No. cat. 320-1120 AG	

El pH se ajustó a 6.8 y el suero puede diluirse hasta el 4% para mantenimiento de las células. Las células se despegan con gendarme o por agitación física.

PURIFICACION DEL VIRUS DEL DENGUE-4.

El Virus del Dengue-4 empastillado se resuspendió en la solución GTNE estéril.

SOLUCION DE GTNE:

	Cantidad
G: Glicina	1.50 gr
T: Tris	0.60 gr
N: Cloruro de Sodio	58 gr
E: EDTA	0.03 gr

El pH se ajustó a 7.5 con HCl y fue esterilizado por filtración.

GELES PARA ELECTROFORESIS DE POLIACRILAMIDA-SDS PARA PROTEINAS.

Para preparar los geles de poliacrilamida-SDS se utilizaron las siguientes soluciones:

* SOLUCION A	Cantidad
Acrilamida	30 gr
Bis-acrilamida	0.8 gr

Se aforó a 100 ml con agua destilada y después se filtró. Se guardó a 4°C.

* SOLUCION B

Trizma Base	12.11 gr
-------------	----------

Se ajustó el pH a 8.8 con HCl y se afora después a 100 ml de agua destilada. Se guardó a 4°C.

* SOLUCION C

SDS (Dodecil Sulfato de Sodio)	10 gr
--------------------------------	-------

* SOLUCION D

Trizma Base	12.11gr
-------------	---------

* PERSULFATO DE AMONIO

Persulfato de amonio	1gr
----------------------	-----

Se aforó a 10 ml con agua destilada. Se guardó a 4°C.

* AMORTIGUADOR DE CORRIDA 10x

Glicina	144 gr
Trizma base	30 gr
SDS al 10%	100 gr

Se aforó a 1000 ml con agua destilada.

*** BUFFER DE MUESTRA 2x**

Solución D	1 ml
Solución C	2 ml
Beta-mercaptoetanol	0.1 ml
Glicerol	60 ml
Agua destilada	0.8 ml
Azul de bromofenol	1 %

*** SOLUCION DE COOMASIE PARA TEÑIR**

Reactivo de azul de Coomasie R-250	0.2 %
Metanol	30 %
Acido acético	7 %

*** SOLUCION PARA DESTEÑIR**

Metanol	30 %
Acido acético	7 %

TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A PAPEL DE NITROCELULOSA.

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA

		Concentración Final
Tris	5.82 gr	48mM
Glicina	2.93 gr	39mM
SDS al 10%	3.75 gr	-
Agua destilada	500 ml	-
Metanol	200 ml	20%

Se aforó con agua destilada a 1000 ml.

ENSAYO DE WESTERN BLOT.

***SOLUCION DE PBS:**

Na ₂ HPO ₄	0.24 gr
NaH ₂ PO ₄	1.44gr
NaCl	8.00 gr

Se aforó a 900 ml con agua destilada, luego se ajustó a pH 7.2-7.4 con NaOH 1 M y después se aforó a 1000 ml.

*SOLUCION DE PBS 20mM y 50mM.

	20mM pH 7.4	50mM pH 7.4
Na ₂ HPO ₄ 0.5M	10ml	25ml
NaH ₂ PO ₄ 0.5M	10ml	25ml
NaCl 5M	15.4ml	
H ₂ O	500ml	500ml

REACTIVO DE BRADFORD PARA CUANTIFICAR PROTEINAS.

Azul de Coomasie (G-250)	100 mg
Etanol al 95%	50 ml
Acido fosfórico	100 ml
Agua destilada	850 ml

La solución se dejó agitando de 3-4 hrs y después se filtró en papel Wathamann 3MM. Se guardó en un frasco ambar a temperatura ambiente.

COLUMNA DE PROTEINA G recombinante.

SOLUCIONES:

*AMORTIGUADOR BINDING

Na ₂ HPO ₄ 0.05M	.68 gr
NaH ₂ PO ₄ 0.05M	.71 gr
NaCl 0.15M	8.76 gr

Se aforó a 900 ml con agua desionizada se ajustó a pH7 y se aforó a 1000 ml.

*AMORTIGUADOR DE ELUCION

Hidroclorato de glicina 0.1M	7.51 gr
------------------------------	---------

Se ajustó a pH 2.5 con HCl 5N y se aforó a 1000 ml con agua desionizada.

*AMORTIGUADOR DE ALMACENAMIENTO

Para un litro de amortiguador de "Binding" se agregarón 0.5 gr de Thimerosal (0.05%)

SOLUCION DE RSB-40 1%.

Cloruro de magnesio	1.5 mM
Tris-HCl pH 7.5	10 mM
Cloruro de Sodio	10 mM

Una vez preparado el RSB, se agrega el NP-40 a una concentración final de 1% v/v.

SOLUCION DE MEM SIN METIONINA.

Medio MEM (medio minimo esencial) sin sales, y sin L-glutamina, L-Leucina, L-lisina, L-metionina.

MATERIAL RADIOACTIVO METIONINA L- (³⁵S).

Actividad 1175.0 Ci / mmol NEN DuPont.

LIQUIDO DE CENTELLEO

Omnifluor	4 gr
Triton X-100	300 ml

Se aforó con Tolueno a 1000 ml y se guardó en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

COCTEL INHIBIDOR.

Contenido de la pastilla:

Antipapaina-HCl	3.0 mg
Bestatin	0.5 mg
Quimiostatin	1.0 mg
E-64	3.0 mg
Leupeptin	0.5 mg

Pepstantin	0.5 mg
Fosforamidon	3.0 mg
Pefabloc	20.0 mg
EDTA	10.0 mg
Aprotinin	0.5 mg

SOLUCIONES PARA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

***FORMALDEHIDO AL 4% para 10 ml**

Formaldehido 37%	1 ml
Agua destilada	9 ml
Tween-20	-

***PBS-Tween-20**

Na ₂ HPO ₄	1.15 gr
NaH ₂ PO ₄	0.23 gr
NaCl	9.0 gr
Tween-20	0.2 ml

Se afora a 900 ml con agua destilada y se ajusta el pH a 7.2-7.4 con NaOH o HCl y se aforó a 1000 ml.

***SOLUCION BLOQUEADORA**

Suero Fetal Bovino	50%
Leche descremada (Comercial)	6%
BSA	3%
Tween-20	0.2%
Azida de Sodio	0.02%

METODOLOGIA

PROPAGACION DEL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 4 EN CEREBRO DE RATON LACTANTE.

Se utilizaron camadas de ratones lactantes de la cepa BALB/c de 2-3 días de nacidos. Los animales fueron inoculados por la fontanela lambdaoidea con aproximadamente 20 μ l del Virus del Dengue serotipo 4 cepa SH-241 con un título de 1×10^6 pfu/ml. Los ratones se revisaron hasta que se observó la presencia de síntomas tales como: fiebre, desequilibrio al caminar, movimiento torpe y lento, parálisis parcial de las extremidades posteriores, etc.; todos indicadores de un proceso de neurovirulencia. Una vez que se manifestaron los síntomas, se sacrificaron por congelación a -70°C durante 10 minutos y después se realizó asepsia de la región cefálica con alcohol al 70% e inmediatamente se extrajo el cerebro con ayuda de una jeringa comercial (25x16 mm. Plastipak). Se resuspendió con la misma jeringa en 1 ó 2 ml de medio MEM-SFB 4%. El extracto se guardó a -70°C (Kimura R,1944).

CULTIVO DE LA LINEA CELULAR C6/36 (*Aedes albopictus*).

La línea celular de mosquito C6/36 (*Aedes albopictus*) se mantuvo con MEM-SFB 4%, aminoácidos no esenciales, vitaminas, glutamina y bicarbonato de sodio a 34°C en ausencia de CO_2 (Igarashi,A.1979).

PROPAGACION DEL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 4 EN LA LINEA CELULAR C6/36(*Aedes albopictus*).

Cuando la monocapa de células C6/36 presentó una confluencia entre el 70% y el 80%, se infectó con 400 μ l del homogenizado del extracto de cerebro de ratón lactante-VD4 y se mantuvo durante 5-7 días a 34°C en ausencia de CO_2 . Se dieron pases consecutivos del virus propagado sobre la línea celular y el sobrenadante o lisado que se

recuperó de los pases fue centrifugado a 7,000 r.p.m. por 10 minutos (en un rotor JA-20 Beckman) para eliminar los restos celulares. Las partículas virales se empastillaron por ultracentrifugación (en un rotor (50 Ti Núm. de serie 4530) Beckman). La pastilla fue resuspendida en 1/100 del volumen inicial en la solución de GTNE y se almacenó con el 50% de SFB (v/v) a -20°C.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA - SDS PARA PROTEINAS.

El material biológico que se obtuvo durante el desarrollo del trabajo fue analizado en geles de poliacrilamida al 10%, los cuales se prepararon de la siguiente manera. Se limpiaron dos placas de vidrio con agua y jabón, y los restos de grasa se retiraron con etanol al 70%. La mezcla para 30 ml del gel separador se preparó con 10 ml de solución A, 11.25 ml de solución B, 0.3 ml de solución C, 8.25 ml de agua destilada, 120 µl de Persulfato de amonio al 10% y 50 µl de TEMED. Esta mezcla se vació en la cámara formada en ambas placas de vidrio (evitando la formación de burbujas), dejando un espacio de 5-8 cms entre la parte superior de la cámara y la superior del gel. El gel separador fue aplanado con 0.5ml de 2-propanol. Después de la polimerización el 2-propanol se retiró con papel absorbente y sobre éste se agregó el gel concentrador, formulado con 1.33 ml de solución A, 1.25 ml de solución D, 0.1 ml de solución C, 7.2 ml de agua destilada, 200 µl de persulfato de amonio y 10 µl de TEMED. Antes de que solidificara se colocó el peine. El gel preparado se colocó en una cámara de electroforesis a la cual se le añadió, tanto en la parte superior como inferior, el amortiguador de corrida. Las muestras biológicas se mezclaron (v/v) con el amortiguador de muestra 2x, y se calentaron a 95°C durante 2-5 minutos antes de colocarse en los pozos. El gel de poliacrilamida con la muestras se corrió a un voltaje constante a 100 volts, hasta que las muestras penetraron en el gel concentrador, y a 130 volts hasta el terminó de la electroforesis. Finalmente el gel fue retirado de las placas de vidrio y se colocó en el colorante azul de Coomassie R250 para teñirlo. Se destiñó en una solución de metanol 30%, ácido acético 7%. Se secó a 80°C al vacío por 1:30 hrs.

TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A PAPEL DE NITROCELULOSA.

El gel de poliacrilamida - SDS previamente corrido con las muestras se equilibró durante 1 hr a 4°C en el amortiguador de transferencia y se transfirió a membranas de nitrocelulosa (Núm. cat. 11465-077 GIBCO BRL) colocando 3 piezas de papel filtro Wathmann 3MM, el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa y otras 3 piezas de papel filtró Wathmann 3MM, todos prehumedecidos en el amortiguador de transferencia. El sandwich se colocó en una unidad de transferencia semi-seca modelo HEP-1 conectada a una fuente de poder y la transferencia se llevó a cabo a 12 volts por 45 minutos (Towbin, H.T. 1979).

WESTERN BLOT (PEROXIDASA).

El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se bloqueó con leche descremada (comercial) al 5% en PBS 1x durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Se lavó 3 veces con PBS Tween al 0.5%, a temperatura ambiente por 10 minutos lavando en agitación; después se incubó con el 1er. anticuerpo (IgG policlonal de ratón anti-VD4) durante toda la noche a 4°C en agitación. Se hicieron lavados como se describió anteriormente y después se incubó 2 hrs. a temperatura ambiente con el 2do. anticuerpo anti-ratón IgG acoplado a peroxidasa (Núm. de cat. 19704-014 GIBCO BRL) diluido 1:2000 en PBS 1x. El papel de nitrocelulosa fue lavado 3 veces con PBS Tween al 0.5% por 10 minutos y 2 veces con PBS 20 mM y una vez con PBS 50 mM por 10 minutos a temperatura ambiente. Se reveló con la siguiente solución: 0.3mg/ml de DAB (3,3' diaminobenzidina tetrahidroclorada) (Núm. de cat. 59725A GIBCO BRL), 5 ml de PBS 50 mM, y 9µl de agua oxigenada.

PURIFICACION DE GAMA-GLOBULINAS HUMANAS POR PRECIPITACION CON UNA SOLUCION SATURADA DE SULFATO DE AMONIO .

Para la obtención de Gama-globulinas se recolectó el suero separado del paquete globular de sangre humana obtenido de humanos normales y se inactivó a 63°C por 10 minutos.

El suero fue precipitado 3 veces con una solución saturada de sulfato de amonio a pH 7.8, en agitación por 2 horas a 4°C, centrifugándose cada vez a 3,500 rpm durante 30 minutos (en un rotor JA-20 Beckman). Después de la tercera precipitación la pastilla se resuspendió en la mitad del volumen inicial con PBS 1x frío y finalmente se dializó contra 1 litro de PBS 1x, durante 4 días a 4°C con 2 cambios por día. Las gammaglobulinas dializadas se concentraron mediante liofilización, se resuspendieron en 1/10 de su volumen inicial con PBS 1x y se guardaron a -20°C. La cantidad de proteína fue cuantificada mediante el reactivo de Bradford (Garvey, S.J y col. 1977).

PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES IgG ANTI-VD4 DE RATON.

Se inmunizaron de 8-10 ratones de la cepa BALB/c de 8 semanas de nacidos vía cojinete plantar con una mezcla de 80µg de virus D4 empastillado y 5µl de Adyuvante completo de Freud's (No. Cat. 660-5721 PIERCE) por ratón para la primera inmunización. Las siguientes inmunizaciones se llevaron a cabo con 80µg de VD4 empastillado y 5µl de hidróxido de aluminio (Plus de Farmacia), dejando entre cada una un periodo de 15 días hasta completar 5 inmunizaciones por ratón. El reconocimiento de los anticuerpos producidos contra VD4 se confirmó mediante ensayos de Western Blot (Harlow, D. 1988).

PURIFICACION DE ANTICUERPOS IgG ANTI-VD4 DE RATON MEDIANTE LA COLUMNA G.

El suero de los ratones inmunizados con el VD4 se pasó a través de una Columna de proteína G recombinante acoplada a agarosa (Núm. cat. 15920-010 GIBCO BRL). Los Anticuerpos IgG aislados por la cama fueron eluidos con una solución de Glicina-HCl pH 2.6 0.1M y el pH se ajustó con Tris-HCl 1M a pH 7. Después se concentraron por liofilización, se resuspendieron con 400µl de PBS 1x frío y se almacenaron a -20°C.

EXTRACTO DE PROTEINAS CELULARES C6/36 (*Aedes albopictus*).

Monocapa de la línea celular C6/36, fueron desprendidas con un gendarme. Las células se empastillaron por centrifugación a 1,000 r.p.m por 10 minutos y se lavarón 3 veces con PBS 1x estéril y frío. El sobrenadante fue eliminado, la pastilla celular se resuspendió en una solución de RSB-NP40 1% y después se centrifugó a 10,000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó, se le añadió 1x de coctel inhibidor de proteasas (No. Cat. 1697498 Boehringer) y se almacenó a -20°C.

MARCAJE DEL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 4 CON METIONINA ³⁵S.

Primeramente se le retiró el medio de cultivo a la monocapa de células C6/36 y se agregó medio fresco (MEM con SFB 4%, aminoácidos no esenciales, vitaminas, glutamina y bicarbonato de sodio) junto con un inóculo viral, el cual se dejó incubando por 6 hrs a 34°C en ausencia de CO₂. Se retiró el medio nuevamente y se agregó MEM fresco sin metionina con 10 µCi/ml de metionina ³⁵S y se incubó a 34°C por 7 días. El sobrenadante se recuperó y se procedió a empastillar el virus. El virus empastillado se cuantificó en un contador de centelleo (Beckman LS5801).

MARCAJE DE PROTEINAS CELULARES DE C6/36 (*Aedes albopictus*) CON METIONINA ³⁵S.

Sobre la monocapa de células C6/36, previamente propagadas, se agregó medio MEM-sin metionina con SFB 4%, 1x de vitaminas, 1x de amoniácido no esenciales, bicarbonato de sodio y 25 µCi/ml de metionina ³⁵S y se incubó por 12 horas. Pasado este tiempo el medio de mantenimiento con metionina se retiró y las células se desprendieron con ayuda de un gendarme, las cuales se empastillaron por centrifugación a 1,000 r.p.m. por 10 minutos. El sobrenadante fue decantado y la pastilla se lavó 3 veces con PBS1x frío, centrifugando cada vez a 1,000 r.p.m por 10 minutos. La pastilla celular se lisó con RSB-NP40 1% y se centrifugó a 10,000 r.p.m. a 4°C por 10 minutos.

El sobrenadante se recuperó y se guardado con 1x del coctel inhibidor de proteasas a -20°C.

ENSAYO DE FORMACION DE EL COMPLEJO VD4 - ANTICUERPO IgG.

Se utilizarón 3,000 c.p.m. del VD4 y Proteínas celulares marcadas con metionina ³⁵S para llevar a cabo la formación de cada complejo antígeno-anticuerpo. Para ello el Virus del Dengue y las proteínas celulares se pusieron a interactuar con las diluciones 1:250, 1:500, 1:750, 1:1000, 1:1,500 de los anticuerpos IgG anti-VD4 durante 2 horas a 37°C en un baño giratorio Modelo G76.

ENSAYOS DE BINDING:

CULTIVO DE LA LINEA CELULAR C6/36 (*Aedes albopictus*) TRATADAS CON TRIPSINA AL 0.06%.

Se sembraron 1×10^6 células C6/36 en una multiplaca de 24 pozos un día antes del ensayo. Al día siguiente el medio de mantenimiento (MEM-SFB 4%) fue retirado del cultivo celular por aspiración y la monocapa se lavó 1 vez con medio MEM-sin SFB, inmediatamente después la monocapa fue tratada con tripsina al 0.06% (1g de tripsina digiere 250g de caseína) (Núm. de cat.27250-0 GIBCO BRL) durante 30 minutos a 37°C, la cual se inactivó adicionando medio MEM-SFB 4% e incubando 1 hora a 37°C (la viabilidad de las células C6/36 analizada con el reactivo de Azul tripano fue mayor del 90%) al término del tiempo, se retiró, el medio de mantenimiento y la monocapa se incubó con 3,000 c.p.m. del VD4 marcado con ³⁵S metionina y proteínas celulares de C6/36 marcadas con metionina ³⁵S por 1hr. en un cuarto de temperatura de 37°C en agitación lenta. Las células C6/36 y el sobrenadante fueron cosechados por separado en viales, los cuales se cuantificaron en un contador de centelleo.

Los cálculos para conocer el porcentaje de unión a las células C6/36 se basaron en la fórmula:

Total del número c.p.m.=Número de c.p.m. unidas a las células (pastilla)+ Número de c.p.m no unidas a las células(sobrenadante)

Porcentaje de unión= Número de c.p.m. unidas a las células x 100

Total del número de c.p.m.

CULTIVO DE LA LINEA CELULAR C6/36 (*Aedes albopictus*) TRATADAS Y NO TRATADAS CON TRIPSINA A 0.06% E INFECTADAS CON EL COMPLEJO VD4-ANTICUERPO IgG.

En una multiplaca de 24 pozos se sembraron 1×10^6 células C6/36 por pozo un día antes del ensayo. La monocapa de células se lavó una vez con medio MEM-sin SFB 4% y se trató con tripsina al 0.06% como se describió anteriormente. La monocapa de células que no fue tratada con tripsina se incubó con medio MEM-sin SFB. Al término del tratamiento el sobrenadante de cada ensayo fue retirado y se prosiguió a incubar las células tratadas y no tratadas con la tripsina al 0.06% con las diferentes diluciones de los complejos VD4-anticuerpo IgG y Proteínas celulares-anticuerpo IgG preformados durante 1 hora en un cuarto de temperatura de 37°C en agitación lenta. El sobrenadante y las células de cada ensayo se cosecharon y se colectaron en los viales de centelleo, los cuales fueron cuantificados en la forma anteriormente descrita.

CULTIVO DE LA LINEA CELULAR C6/36 (*Aedes albopictus*) TRATADAS Y NO TRATADAS CON GAMA-GLOBULINAS HUMANAS E INFECTADAS CON EL COMPLEJO VD4 -ANTICUERPO IgG.

En una multiplaca de 24 pozos se sembraron 1×10^6 células C6/36 en cada pozo un día antes del ensayo. La monocapa se lavó una vez con MEM-sin SFB y se incubó con 500µg/ml de gama-globulinas humanas, mientras que la monocapa que no se trató con las gama-globulinas humanas se incubó con MEM-sinSFB ambos ensayos por 30

minutos a 37°C y posteriormente el sobrenadante de cada uno fue retirado, la monocapa se incubó con las diferentes concentraciones de los complejos VD4-anticuerpo IgG y Proteínas celulares-anticuerpos IgG preformados durante 1 hora en un cuarto de temperatura a 37°C en agitación lenta y las células y el sobrenadante de cada ensayo se procesaron de la manera antes mencionada.

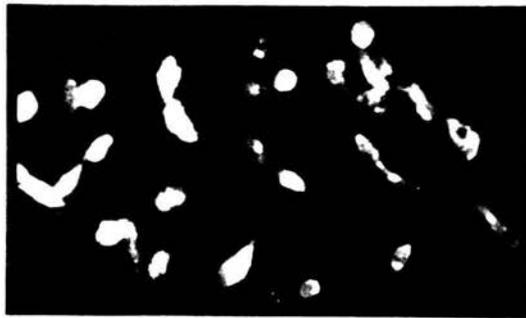
ENSAYO DE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA PARA DETECTAR LA PROTEINA E DEL VD4.

La monocapa de las células C6/36 infectadas con el VD4 fue lavada con MEM-SFB. Posteriormente se fijaron con la solución de formaldehído al 4% por 1 hr. a temperatura ambiente, siendo tratadas inmediatamente con la solución de formaldehído al 4% - Tween .2% por 1 hr. e hidratadas después con PBS-Tween 0.2% por 1hr. , después fueron bloqueadas por 30 minutos con la solución bloqueadora, la monocapa se lavó 5 veces con PBS para luego agregar el 1er. Anticuerpo (Anticuerpo monoclonal anti-proteína de envoltura E del VD4) a una dilución de 1:50 e incubar durante la noche a 4°C sobre una cámara húmeda. La monocapa fue lavada con PBS y se agregó un 2o. Anticuepo de Cabra Anti-Mouse IgG de ratón acoplado a flouresceína (No. Cat. 13846-019 Gibco BRL) a una dilución 1:80 incubando por 1 hr. a 37°C en oscuridad. La monocapa fue lavada 5 veces con PBS y se observó al microscopio de fluorescencia.

RESULTADOS

El Virus del Dengue tiene un amplio rango de hospederos entre los que se encuentran el hombre, siendo el más afectado, algunas especies de monos (tales como el mono aullador *Aloatta sp*, el mono araña *Ateles sp*, mono lechuza *Aotus sp* etc.) así como también especies de Artrópodos (Ludwig,G.1993). Sin embargo en el laboratorio el animal de mayor uso es el ratón. Se ha visto que el Virus del Dengue presenta un marcado neurotropismo en ratones lactantes cuando han sido inoculados intracerebralmente, causándoles una encefalitis a los pocos días (Boonpucknavig S. 1981). Esta manera de replicar el virus en el laboratorio ha permitido la aplicación de técnicas para detectar, propagar y aislar el virus, principalmente en sistemas de cultivo celulares (Rosen L.1974).

Primeramente el Virus del Dengue serotipo 4 (VD4) usado en este trabajo fue sometido a Ensayos de inmunofluorescencia (como se describe en la sección de metodos) con Anticuerpos monoclonales anti-proteína E del VD4 (1H10-6-7) (FIGURA No.7). Como puede observarse, en la línea celular C6/36 la fluorescencia se presenta en una zona perinuclear del citoplasma confirmando la infección por el serotipo 4 del Virus del Dengue. Una vez corroborado el serotipo, se prosiguió a inocular ratones lactantes, los cuales fueron observados diariamente hasta que presentaron las manifestaciones de una encefalitis. El Virus del Dengue obtenido se propagó en la línea celular de mosquito C6/36 (*Aedes albopictus*) empleando monocapas con un 80% de confluencia para la infección. Se ha reportado que entre los cultivos celulares de mamífero (LLC-MK2, VERO, HepG2) e insectos (LSTM-AP61, C6/36 ,TRA-171 y TRA-284 SFG) la susceptibilidad a la infección por el Virus del Dengue varía (Sinarachatanant. P. 1973., Marianneau, P. 1996), sin embargo en las líneas celulares de mamífero se ha observado un mayor daño celular e incluso hasta la destrucción de la célula, mientras que en las líneas celulares de mosquito no es frecuente observar un cambio en su morfología. El trabajo realizado por Igarashi, A. en 1978 mostró que las células C6/36 son altamente susceptibles a la infección por el virus dengue, y en este estudio el autor observó claramente el efecto citopático sobre las células infectadas con los diferentes serotipos



A)



B)



C)

FIGURA No. 7.- ENSAYO DE LA INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA DE LAS CELULAS C6/36 (*Aedes albopictus*) INFECTADAS CON CON EL VD4 POR 7 DIAS RECONOCIDO POR ANTICUERPOS MONOCLONALES anti-proteína E DE ENVOLTURA DEL VD4.

A) Fotografía de la fluorescencia de células infectadas y

B) Fotografía de contraste de fase de células infectadas

C) Fotografía de células no infectadas incubadas con el 2o. Anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a fluoresceína, usado como control negativo.

del Virus del Dengue. Nuestros resultados fueron similares a los reportados por Igarashi ya que cuando las células C6/36 fueron infectadas con el VD4 el efecto citopático se manifestó por el aumento de tamaño de las células, su agrupación formando sincitios y por la gran cantidad de vacuolas presentes en el citoplasma de la célula (FIGURA No.8). La presencia del efecto citopático sobre la monocapa indicaba que el Virus del Dengue-4 se encontraba en un estado altamente infeccioso por lo que se decidió a purificarlo por ultracentrifugación a 23,000 r.p.m. por 2 hrs., siendo después analizado en un gel de poliacrilamida al 10% (FIGURA No.9). El virus así obtenido es visualizado por la presencia de una proteína de 55 kDa correspondiente a la proteína E. A pesar de que las proteínas C y M también forman parte de la partícula viral, su peso molecular es muy bajo y no se observan en la tinción mostrada.

Con el VD4 purificado, se inmunizaron los ratones de la cepa BALB/c como se describe en la metodología, con el fin de generar una respuesta inmunológica de tipo humoral. Los anticuerpos policlonales IgG anti-VD4 de ratón fueron purificados a través de una columna de proteína G recombinante y analizados después por un gel de poliacrilamida al 10% (FIGURA No.10). Las IgG purificadas tuvieron como se esperaba una migración de una banda de 150 kDa bajo condiciones no desnaturizantes (carril 1) y dos bandas una de 50 y 25 kDa bajo condiciones reductoras (carril 2). Los Anticuerpos IgG anti-VD4 fueron titulados mediante un ensayo de Western Blot, en el cual se observa el reconocimiento del VD4 hasta en una dilución de 1:4000 y la ausencia de respuesta hacia las proteínas provenientes de células C6/36 no infectadas, lo que confirma su especificidad (FIGURA No.11).

Debido a que en los ensayos de binding o unión se emplearía el VD4 marcado con metionina ³⁵S se corroboró su purificación mediante un ensayo de Western Blot con los anticuerpos policlonales IgG anti-VD4 de ratón purificados (FIGURA No.12). Como puede observarse, el VD4 marcado (carril 1) y el no marcado (carril 2) fueron reconocidos de manera similar y no así, las Proteínas celulares (Carril 3).

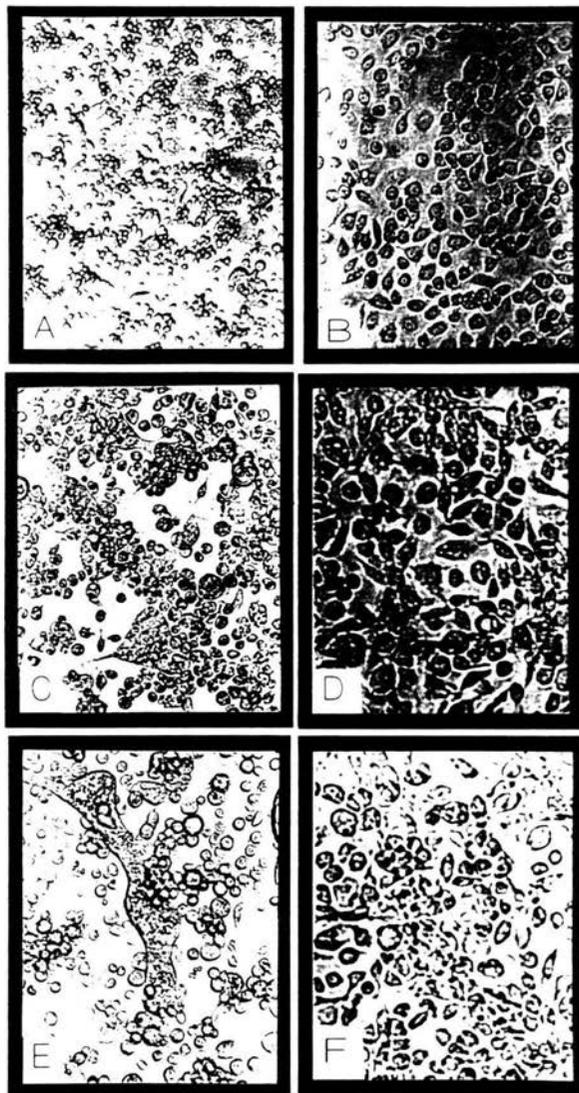


FIGURA. No. 8.- EFECTO CITOPATICO SOBRE LA MONOCAPA DE CELULAS C6/36 (*Aedes albopictus*).

A los 3(A), 5(C) y 7(E) dias post-infección con el VD4 y células C6/36 no infectadas a los 3(B), 5(D) y 7(F) dias usadas como control.

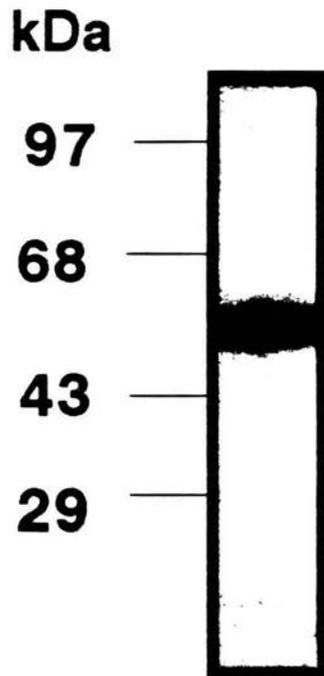


FIGURA No.9.- Virus del Dengue-4 purificado por ultracentrifugación observado en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con Coomassie como se describe en la sección de metodos.

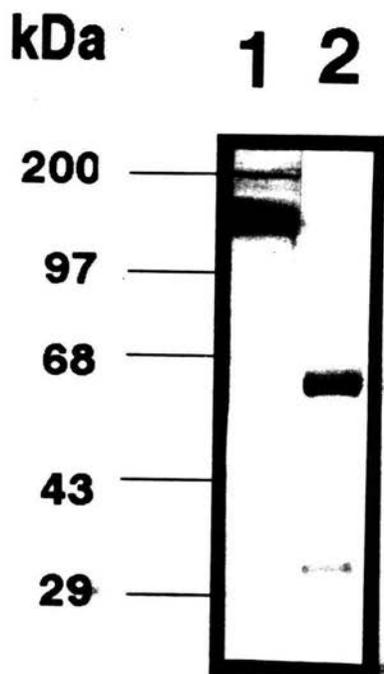


FIGURA No. 10.- ANTICUERPOS IgG anti-VD4 PURIFICADOS POR UNA COLUMNA DE PROTEINA G recombinante.

En el **carril No. 1** se observa el Anticuerpo tipo IgG en condiciones no reductoras como una banda de 150 kDa y en el **carril No. 2** en condiciones reductoras presentando una banda de 50 kDa, que corresponde a las cadenas pesadas, y una banda de 25 kDa, que corresponde a las cadenas ligeras.

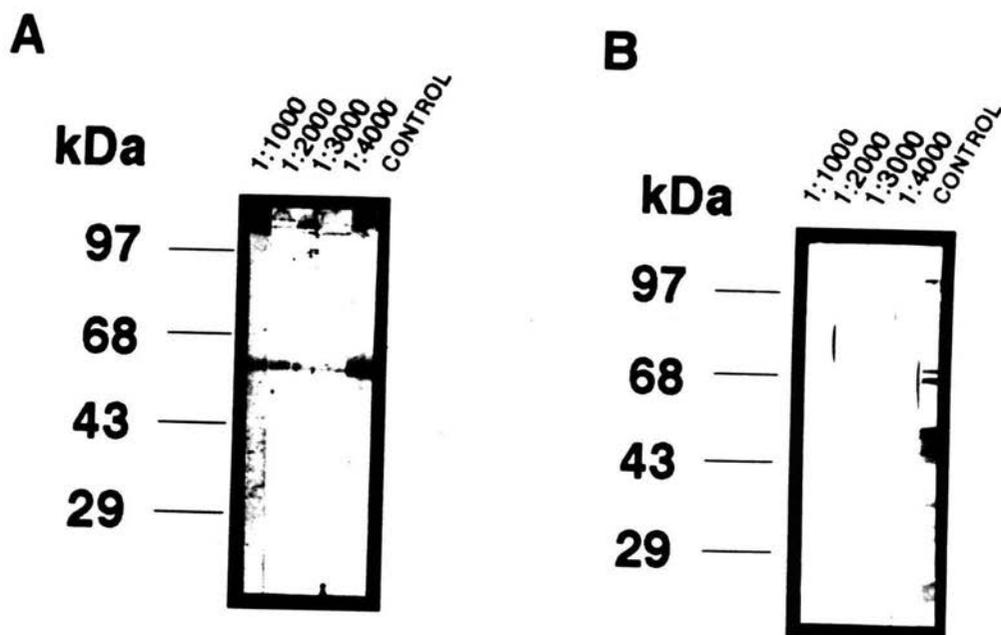


FIGURA No.11.- ENSAYO DE WESTERN BLOT QUE MUESTRA EL RECONOCIMIENTO DEL VD4 POR LOS ANTICUERPOS POLICLONALES IgG anti-VD4 de ratón.

En el **panel A** se muestra el reconocimiento del VD4 por los Anticuerpos policlonaes IgG hasta la dilución 1:4000, así como su control positivo usando un anticuerpo IgG dirigido contra el VD4 (en una dilución de 1:500) y en el **panel B** el reconocimiento de las proteínas celulares provenientes de las células C6/36 y su control positivo usando un anticuerpo IgG dirigido contra las células C6/36 (en una dilución de 1:500).

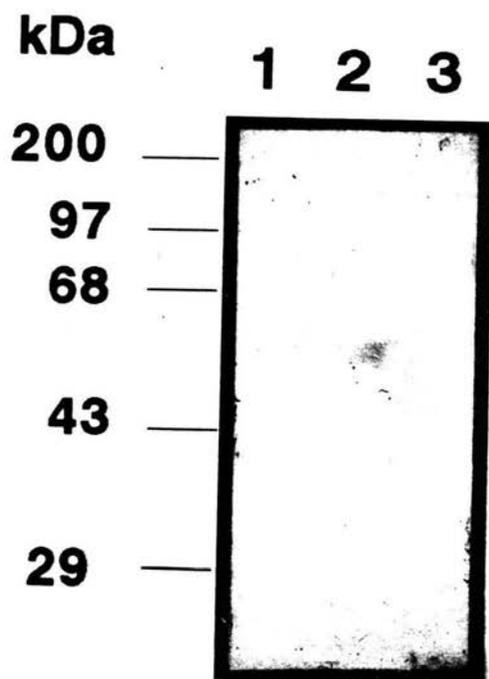


FIGURA. No. 12.- ENSAYO DE WESTERN BLOT CON ANTICUERPOS POLICLONALES IgG anti-VD4 de ratón.

En el carril No.1 se observa el reconocimiento del VD4 ³⁵S en el carril No.2 se observa el VD4 no marcado y en el carril No.3 se encuentran las proteínas celulares provenientes de las células C6/36 reconocidas por los Anticuerpos policlonaes anti-VD4 de ratón.

ENSAYOS DE BINDING:

TRATAMIENTO DE LAS CELULAS C6/36 (*Aedes albopictus*) CON TRIPSINA AL 0.06% E INCUBACION CON EL VIRUS DENGUE-4 ³⁵S .

Con el fin de conocer el tipo de molécula que intervenía en la interacción entre el VD4 y las células C6/36, se llevaron a cabo ensayos de "binding" o de unión como se describe en la sección de metodos. Las células C6/36 fueron tratadas con tripsina al 0.06% por 30 minutos e inmediatamente después incubadas con el Virus del Dengue por 1 hr a 37°C. Después del tratamiento, las células muestran una reducción en la unión del virus de casi un 43% comparada con la unión observada en las células C6/36 no tratadas. Este resultado sugiere que la unión del Virus del Dengue a las células C6/36 se ve afectada por el tratamiento con esta proteasa causando una reducción en la unión. Para determinar si las células C6/36 se recuperaban del tratamiento con la tripsina, éstas se incubaron con el Virus del Dengue hasta por 3 hrs. después del tratamiento. A este tiempo, se siguió observando una reducción en la unión del 40% con respecto a las células no tratadas lo que sugiere que es necesario un tiempo mayor para la recuperación de las molécula(s) a la que el VD4 se une (FIGURA No.13). Las células C6/36 con y sin tratamiento fueron capaces de unir la misma cantidad de c.p.m. de las proteínas celulares a los diferentes tiempos. Esta unión se considera como unión inespecífica.

INCUBACION DE LAS CELULAS C6/36 (*Aedes albopictus*) CON EL COMPLEJO Virus D4 ³⁵S-Anticuerpo IgG de ratón a 37°C.

El aumento en la replicación viral por la presencia de anticuerpos anti-virus en concentraciones subneutralizantes ha sido ampliamente estudiada en los Flavivirus. Este fenómeno (ADE) se ha visto en ensayos *in vitro* y es característico de células susceptibles a la infección por el Virus del Dengue tales como las células monocíticas, en las cuales el complejo virus-anticuerpo entra por la vía receptor Fc expresado en la superficie de la célula. Este mecanismo de entrada tiene un papel muy importante en la patogenésis de la infección debido a que se ha encontrado asociado a las formas graves de la enfermedad

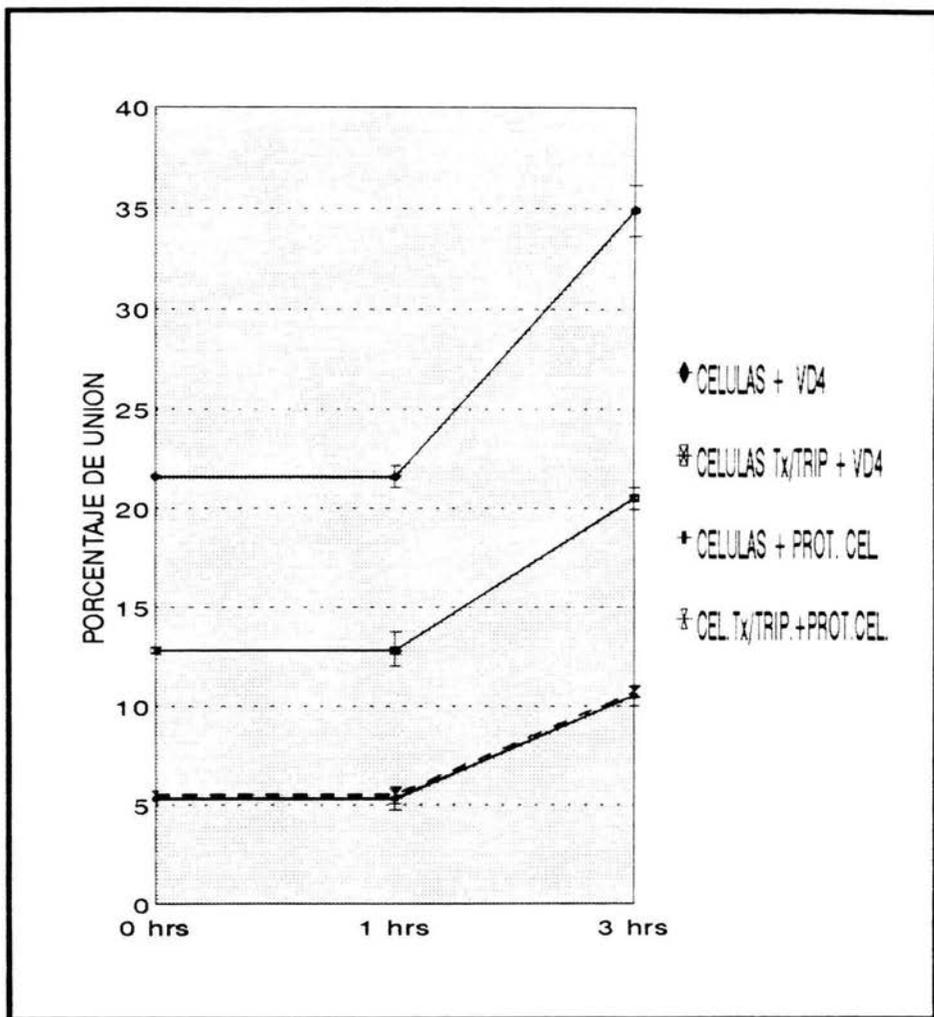


FIGURA No.13.- Efecto de la tripsina en la infección por el VD4^{35S} a 1 hr. y 3 hrs. post-infección.

FHD/SSC (Morens, M. 1994., Kliks, S. 1990). Para conocer si existía una vía de entrada alterna diferente a la del receptor viral como ocurre en monocitos, las células C6/36 fueron incubadas con los complejos virus D4³⁵S-Anticuerpo IgG (pre-formados) (como se describe en la sección de metodos) por 1 hr. a 37 °C (FIGURA No.14). Los resultados obtenidos muestran que la penetración del virus se incrementa ligeramente en presencia de anticuerpos comparada con lo que ocurre en su ausencia. Estas observaciones son similares a las reportadas para las células monocíticas, por lo tanto se consideró la posibilidad de que existiera un sitio de unión específico para el anticuerpo. Para saber si ésta unión era dependiente o independiente de temperatura el ensayo de unión se llevó a cabo a 4°C bajo las mismas condiciones (FIGURA No.15). Los resultados obtenidos a esta temperatura fueron similares a los observados anteriormente, lo cual indica que la unión del complejo virus-anticuerpo a las célula C6/36 es independiente de temperatura. Las células C6/36 incubadas con las proteínas celulares en presencia y ausencia del anticuerpo nos permiten determinar la unión inespecífica que pudiera presentarse en las células C6/36.

TRATAMIENTO DE LAS CELULAS C6/36 (*Aedes albopictus*) CON TRIPSINA AL 0.06% E INCUBACION CON EL COMPLEJO Virus D4 ³⁵S-Anticuerpo IgG.

Las células C6/36 fueron tratadas con tripsina al 0.06% e incubadas con el complejo VD4 ³⁵S-Anticuepo IgG a diferentes concentraciones por 1 hr. A 37°C (FIGURA No.16) se observó que la unión del complejo a las células C6/36 disminuye por el tratamiento con tripsina, tal y como ocurre en las células C6/36 que han sido incubadas con el VD4 ³⁵S (FIGURA No.13). En ambas condiciones se presentó una diferencia con respecto a las células C6/36 sin tratamiento e incubadas con el VD4 ³⁵S. Estos datos indican que la posible molécula que internaliza al complejo VD4-Anticuerpo IgG es sensible a tripsina como lo es receptor viral.

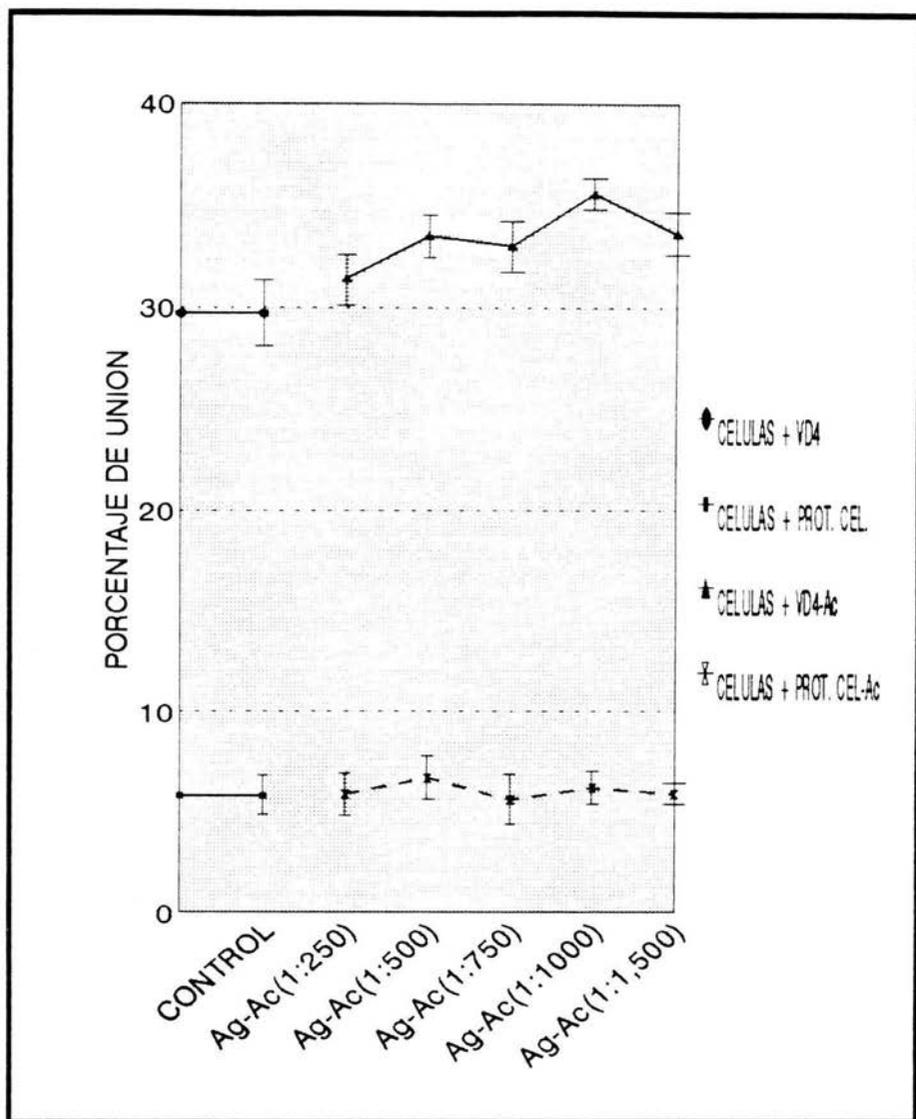


FIGURA No.14.- Células C6/36 incubadas con los complejos a diferentes concentraciones a 37°C.

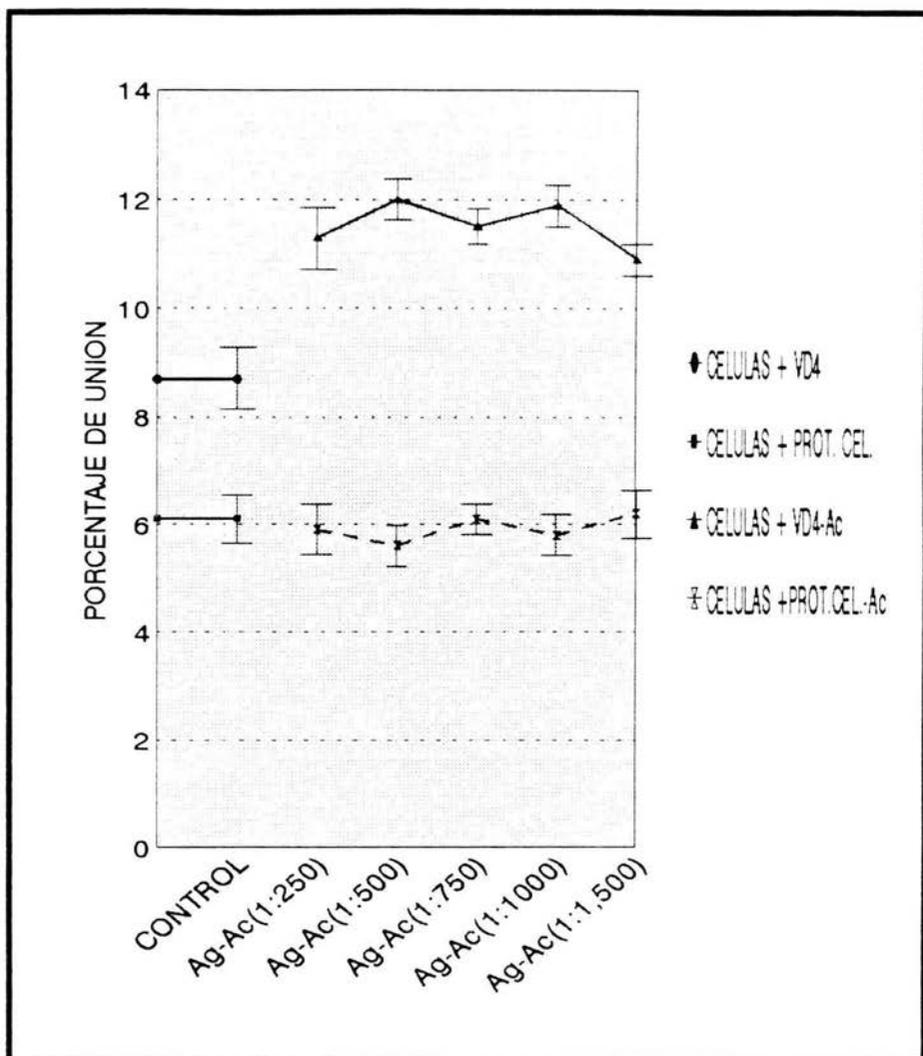


FIGURA No.15.- Células C6/36 incubadas con los complejos a diferentes concentraciones a 4°C.

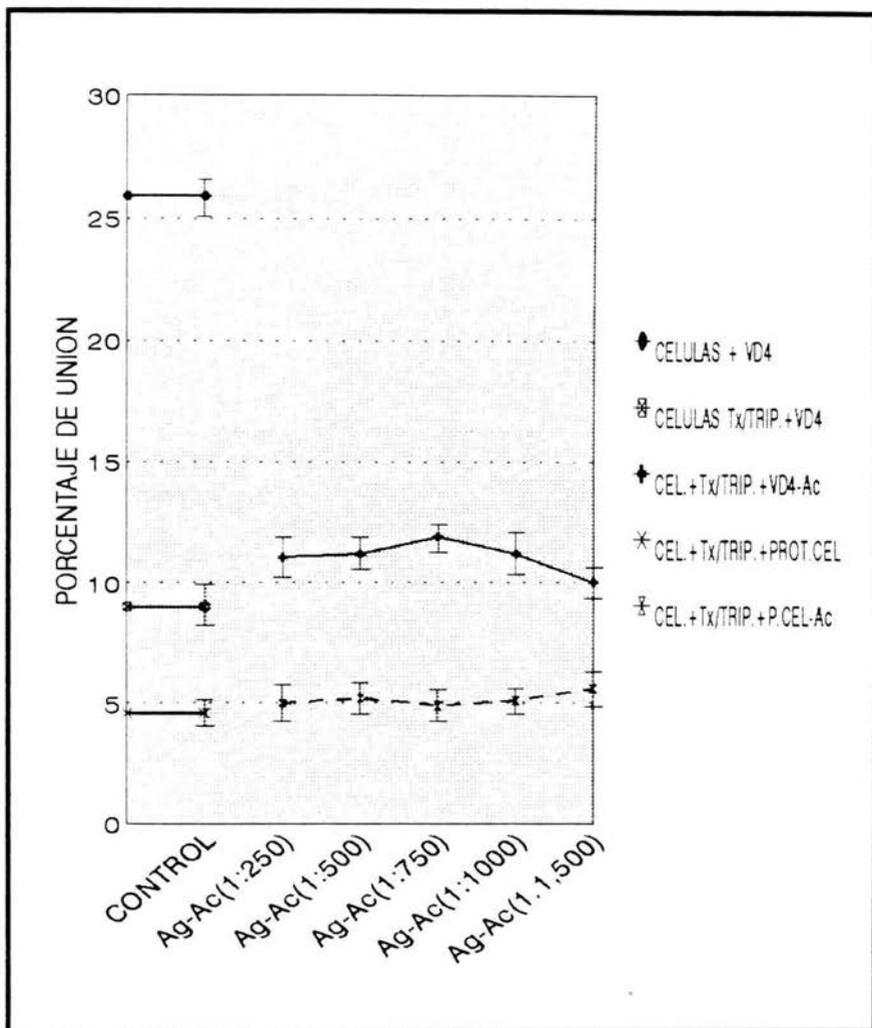


FIGURA No.16.- Efecto de la tripsina en la infección con los complejo a diferentes concentraciones a 37°C.

TRATAMIENTO DE LAS CELULAS C6/36 (*Aedes albopictus*) CON GAMA-GLOBULINA HUMANAS E INCUBACION CON EL COMPLEJO Virus D4 ³⁵S-Anticuerpo IgG.

En muchos trabajos la presencia del receptor Fc ha sido confirmada ya que la infección mediada por el complejo virus-Anticuerpo puede ser bloqueada por Anticuerpos anti-Fc. Un estudio diferente a estos es el realizado por Daughaday, C. en 1981 el cual utilizó una concentración de 1,000µg/ml de gama-globulinas para saturar a los receptores Fc presentes en las células monocíticas. Si el mecanismo por el cual los complejos VD4-Anticuerpo IgG requiere de un receptor Fc presente en las células C6/36, entonces, las γ -globulinas bloquearían a este receptor e inhibiría la unión del VD4 marcado. Primeramente, purificamos γ -globulinas humanas como se describió en la sección de Metodos y se analizaron en un gel de poliacrilamida al 10% (**FIGURA No.17**). Al igual que los Anticuerpos IgG purificados, se observa la banda de 150 kDa en las condiciones nativas y dos bandas una de 50 y 25 kDa en las condiciones reductoras.

Con estas γ -globulinas purificadas (500µg) se bloquearon las células C6/36 durante 30 minutos antes de la incubación con el complejo VD4 ³⁵S-Anticuerpo IgG (pre-formado) por 1 hr a 37°C (**FIGURA No.18**). Los resultados muestran que la unión del complejo a la célula C6/36 disminuye ligeramente con respecto a las células con el virus, sin embargo, la unión es similar a la observada con las células tratadas con γ -globulina e incubadas con el virus. La ligera reducción en la unión del virus sólo o del complejos virus-anticuerpo en presencia de las γ -globulina posiblemente se debe a que éstas últimas ejercen un efecto estérico en el sistema, impidiendo la unión del virus-anticuerpo incluso del virus. Estos datos nos indican varios eventos: Primero, el virus es capaz de penetrar en forma de complejo virus-anticuerpo a las células C6/36 a pesar de estar bloqueadas por γ -globulinas sugiriendo que la molécula involucrada en éste proceso no es un receptor Fc. Segundo, que el receptor viral une un poco menos a las partículas virales cuando las células C6/36 son incubadas con γ -globulinas, tal vez por un efecto estérico. Finalmente, que los Anticuerpos anti- VD4 no neutralizan o inhiben la infección viral en las células C6/36.

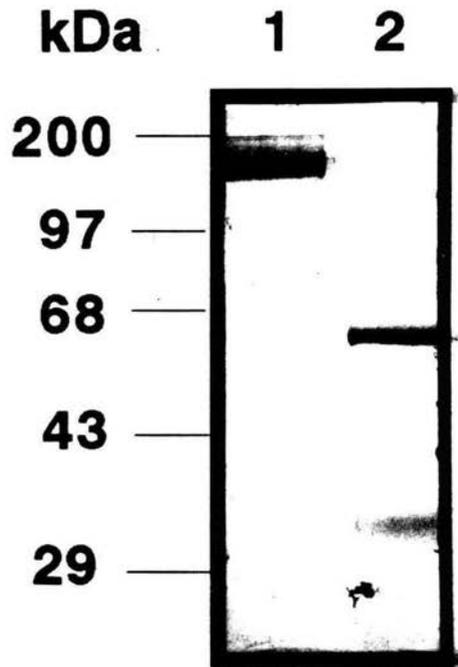


FIGURA. No.17.- GAMMA-GLOBULINAS AISLADAS DE SUERO HUMANO MEDIANTE LA PRECIPITACION POR UNA SOLUCION DE SULFATO DE AMONIO SATURADO.

El **carril No. 1**, muestra una banda de aproximadamente 150 kDa que corresponde a las Gamma-globulinas en condiciones no reductoras y en el **carril No. 2** en condiciones reductoras, en donde se observan 2 bandas: una entre 55-60 kDa, que corresponden a las cadenas pesadas, y una de entre 25-29 kDa, que corresponden a las cadenas pesadas.

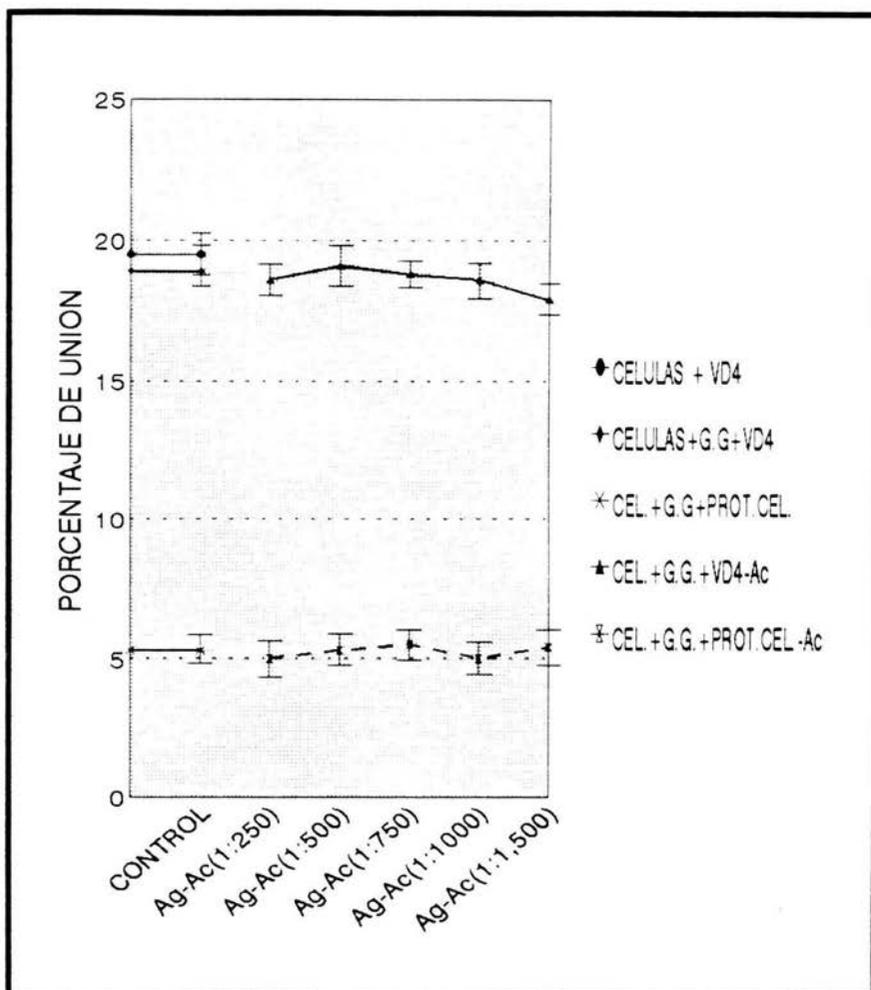


FIGURA No.18.- Efecto de las Gama-globulinas humanas en la infección con los complejos a diferentes concentraciones a 37°C.

DISCUSION

El primer contacto del virus con su célula huésped está mediado por las proteínas virales de unión (VAP, viral attachment protein) y por receptores virales que pueden estar constituidos por más de una molécula. La interacción de estas moléculas conduce a la entrada del virión a través de dos mecanismos: por fusión directa o bien por endocitosis mediada por receptor (Lentz, L.T. 1990). En ambos el virión libera su ácido nucléico genómico al citoplasma para iniciar los procesos de replicación y traducción viral. En el transcurso de estos procesos pueden ocurrir cambios en la morfología como los observados en las células C6/36 (*Aedes albopictus*) infectadas con el VD4, los cuales se caracterizan por la aparición de una gran cantidad de vesículas con virus distribuidas en el citoplasma y por la hipertrofia de las membranas del retículo endoplásmico rugoso, en donde la morfogenesis del virión se lleva a cabo, y es ahí también donde el Virus del Dengue adquiere su envoltura al pasar o trasladarse al lumen del retículo endoplásmico rugoso como virión inmaduro (Igarashi, A. 1979).

La proteína E de envoltura del Virus del Dengue se ha identificado como la proteína de unión viral, la cual ha sido ampliamente estudiada. Los trabajos realizados sobre esta proteína indican que en un pH fisiológico se encuentra en forma dimérica pero cuando se expone a un pH ácido (6.5) se induce un cambio conformacional irreversible que promueve la formación de trimeros y la exposición de dominios hidrofóbicos críticos para la fusión de la membrana del virión con la del endosoma después de llevarse a cabo la endocitosis mediada por receptor (Helenius, A. 1995). La proteína E de envoltura consta de 3 dominios. El dominio A, el cual contiene secuencias muy conservadas entre los distintos Flavivirus y se ha propuesto como la parte que tiene la actividad fusogénica. La importancia biológica del dominio B radica en la modulación de la patogenicidad *in vivo*, en donde también se encuentran localizados los sitios antígenicos reconocidos por anticuerpos neutralizantes. El dominio C es considerado como la región más variable entre la Familia de los Flavivirus (Rey, A. F. 1995., Chambers, J.T. 1990). Se ha descrito que entre los aminoácidos 281 a 423 de la proteína E de envoltura se localizan los determinantes de unión a la célula blanco (Chen, Y. 1996).

A pesar de lo mucho que se sabe de esta proteína de unión viral, no se ha logrado identificar su receptor celular, aunque se ha podido determinar que es sensible a tripsina, lo cual sugiere que su naturaleza es proteica. En este trabajo pudimos determinar que el posible receptor para el Virus del Dengue en las células C6/36 también es sensible a tripsina ya que la infección en las células tratadas se redujo hasta un 43%, probablemente debido a que el receptor viral fue modificado por el tratamiento con ésta proteasa. Cuando la incubación del virus se prolongo hasta las 3hr. después del tratamiento, la unión del virus no se restableció completamente, sin embargo, a tiempos más largos (5hrs.) la recuperación es evidente (Salas, B. comunicación personal). La inhibición de la unión viral debida a proteasas, también ha sido descrita para otras células como las células Vero, HepG2 y monocitos (Daughaday, C. 1981. Marianneau, P. 1996), correlacionando con nuestros resultados.

Cuando nosotros incubamos el VD4 en presencia de Anticuerpos IgG anti-VD4 y los pusimos en contacto con las células C6/36 lejos de ver una inhibición en la unión, observamos un incremento, sugiriendo que en las células C6/36 existe un sitio de unión y entrada para los complejos VD4-Anticuerpo IgG. Los complejos virus-anticuerpo se unieron eficientemente a las células C6/36 a 37°C, sin embargo no sabíamos si el proceso era dependiente o independiente de temperatura. Para determinar la relevancia de la temperatura en la unión, los complejos fueron puestos a interactuar con las células a 4°C. Debido a que la unión de los complejos a las células no se redujo a 4°C, es posible afirmar que la unión es un proceso independiente de temperatura. La entrada del Virus del Dengue mediada por anticuerpos ha sido determinada anteriormente por Barth y cols. en sus observaciones de Microscopía electrónica en las células C6/36 donde encontró que los complejos VD2-Anticuerpo internalizados en las células se localizaban en los fagosomas y que dichos complejos eran posteriormente degradados en los lisosomas sugiriendo que la infección realizada por esta vía no era exitosa.

Por otro lado en estudios de Microscopía electrónica realizado por Collins, S. y col. en 1985, se observó que la entrada del Virus West Nile marcado con ³⁵S (VWN) a la línea celular de macrófagos P388DI se llevaba a cabo en presencia y ausencia de

anticuerpos monoclonales anti-VWN a las temperaturas de 37°C y 0°C. A una hora post-infección a 37°C la mayoría de las partículas virales desaparecen de la superficie de la célula tanto en presencia como en ausencia del anticuerpo anti-VWN. Por ensayos de binding se demostró que la unión en presencia del anticuerpo fue del 95%, mientras que en su ausencia fue sólo del 25%. El aumento en la unión del virus debido al anticuerpo posiblemente se relacione con las interacciones del anticuerpo con los receptores Fc. A 0°C, los virus sólo se observaron a nivel de la superficie celular, y en la presencia del anticuerpo, se observaron agregados de partículas virales incapaces de entrar a las células (Collins, S. 1985).

Como ha sido ampliamente descrito, el Virus del Dengue puede entrar a la célula blanco mediante los complejos virus-anticuerpo a través de los receptores Fc presentes en la superficie de los macrófagos (Mady, J. 1991., Littaua, R. 1990.). Sabiendo que los receptores tipo Fc juegan un papel importante en la unión y en la entrada de los complejos de algunas células, decidimos analizar su participación en las células C6/36 bloqueandolos con Gamma-globulina humanas. El que las Gamma-globulinas no redujeran la unión de los complejos nos sugiere que ésta no se lleva a cabo por un receptor tipo Fc. Esta afirmación se refuerza aún más, cuando costatamos que la molécula implicada en la unión de los complejos a las células C6/36 es sensible a tripsina.

En resumen, nuestros resultados indican que el Virus del Dengue es capaz de unirse a las células C6/36 por 2 mecanismos. El primero, mediado por el contacto entre el virus y el receptor sensible a tripsina. El segundo mecanismo, involucra la participación de los complejos virus-anticuerpo los cuales se unen por una molécula diferente al receptor Fc, y que también es sensible a tripsina. Para el caso de las células C6/36, al parecer la molécula o moléculas responsables de la unión de los complejos virus-anticuerpo no es un receptor Fc " Típico" como el que se encuentra en la superficie de las células monocíticas ya que nuestros resultados muestran que éste es sensible a tripsina, mientras que el receptor Fc presente en los monocitos es resistente a la acción de ésta proteasa. Por otro lado, los resultados aquí presentados correlacionan con

los reportados por Smith, H. en 1993, donde se demuestra, por ensayos de inmunofluorescencia, que las células C6/36 carecen de receptor Fc. El mecanismo que permite la entrada de los complejos virus-anticuerpo podría ser un proceso de fagocitosis como ha sido sugerido por Bart y cols. (Barth, M. 1992), pero con la salvedad de que Barth sugiere que esta vía no sería productiva por la lisis producida en los fagolisosomas. En nuestro caso, sabemos que los complejos son capaces de inducir una infección productiva. La propuesta de Barth y cols. es que las partículas virales acomplejadas con los anticuerpos serían degradadas por las enzimas presentes en el fagolisosoma. La forma de explicar que estas partículas pudieran liberarse de la degradación es que si los anticuerpos están en una proporción tal que permitan que cierta cantidad de partículas virales interactúen con la membrana del fagosoma a través de la proteína E, la cual sufre un cambio conformacional inducido por el pH bajo propiciando la fusión de membranas. Esto traería como consecuencia que el ácido nucleico se libera en el citoplasma y por tanto se iniciaría el ciclo replicativo viral. Si la proporción de anticuerpos es muy alta, no dejaría disponible a la proteína E para inducir la fusión por tanto los virus serían degradados junto con los anticuerpos dentro de los fagolisosomas.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados presentados anteriormente se consideran las siguientes conclusiones:

- 1).- El receptor viral natural para el Virus del Dengue serotipo 4 presente en las células C6/36 (*Aedes albopictus*), es sensible a la acción de la tripsina como el encontrado en las células monocíticas.
- 2).- La infección del Virus del Dengue serotipo 4 en las células C6/36 (*Aedes albopictus*) también se lleva a cabo en la presencia de anticuerpos (IgG) anti-virus, como ocurre en las células monocíticas.
- 3).- La unión del complejo VD4-Anticuerpo (IgG) es independiente de temperatura y es a través de una molécula sensible a tripsina.
- 4).- La molécula implicada en la entrada de los complejos virus-anticuerpo no es un receptor tipo Fc.
- 5).- Por la susceptibilidad a la acción de la tripsina del receptor viral y de la molécula que internaliza a los complejos virus-anticuerpo, es posible indicar que ambas son de naturaleza proteica.

BIBLIOGRAFIA

Anderson, R., King, D. and Innis, L. Correlation of E protein binding with cell susceptibility to dengue 4 virus infection. *J. Gen. Virol.* 1992; 73:2155-2159.

Barth, M.O. Replication of Dengue viruses in mosquito cell culture-a model from ultrastructural observation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 1992; 87:565-574.

Bhamarapravati, N. Pathology and Pathogenesis of DHF in "Dengue Hemorrhagic Fever" .1981(S.Hotta,ed) ICMR, Kobe. 207-214.

Boonpucknaving, S., Vuttiviroj, O., Boonpuchapavig, V. Infection of young adult mice with dengue virus type 2. *Transact. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1981, 175:647-653.

Bray, M., Zhao, Markoff, B., Eckels, K., Chanok, R., Lai,L. Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue 4 virus structural proteins with or without nonstructural protein NS1 are protected against fatal dengue virus encephalitis. *J. Virol.* 1989; 63: 2853-56.

Carballal, G.; Oubiña, J.R. *Virologia Médica. El ateneo. Buenos Aires Argentina.* 1991;395.

Collins, S. And Porterfield, J. Flavivirus infection enhancement in macrophages: An electron microscopic study of viral cellular entry. *J. Gen. Virol.* 1985; 66:1969-82.

Chambers, T.J., Hahn, S CH, Galler, R. And Rice, M. Flavivirus Genome Organization, Expression and Replication. *Ann. Rev. Microb.* 1990; 44:649-88.

Chen, Y.T., Maguire, and R.M. Marks. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J. Virol.* 70:8765-8772.

Dantés-Gómez Héctor. El dengue en las Américas. Un problema de Salud Regional. *Salud Publica de México.* 1991; 4:347-335.

Dantés-Goméz Héctor, Bernal-Ibañez Sergio. *Dengue.INDRE. SSA. 1994, México.* 85-96.

Dantés -Goméz Héctor. Castellanos-Montesano Raúl, Conyer-Tapia Roberto. *Dengue y Dengue Hemorragico: Cuadro clinico, Diagnóstico y Vigilancia epidemiologica. Enfermedades Infecciosas y Microbiologicas.* 1995;15:3.

Daughaday, C.C., Brandt, W. E., McCown, J.M. and Rusell, P.K. Evidence for two mechanism of dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin resistant immune complex receptor. *Infect. Immun.* 1981;32:469-473.

Dimmock, J.N. y Primrose, B. S. *Introduccion to Modern Virology*. 4 th. Ed. Bloccwell. Science. 1994.

Epidemiología. Boletin Semanal. Conyer-Tapia Roberto. De Secretaria de Salud. Direccion General de Epidemiologia, SSA. 1995; No 25, Semana 50,8.

Epidemiología. Panorama Epidemiológico del Dengue Hemorragico Boletin Semanal. Direccion General de Epidemiologia, SSA. 1996, Semana 38.

Fenner-White. *Virologia Médica*. Ediciones científicas la Prensa Médica Mexicana. 2 ed. Mexico. 1984; 447.

Garvey, S.J. Remmer, E.N., Sussdurf, H.D. *Methodos in Inmunology*. Ed. W.A. Benjamin, N.C. 3 edición. 1979; 545.

Halstead, S.B. The pathogenesis of dengue. *Molecular epidemiology in infectious disease*. *Am. J. Epidemiol.* 1984; 114:632-648.

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

Halstead, S.B. Dengue. In *Tropical and Geographical Medicine*. 2 de. Kennet S. Warren/ A del AF Mahmoud. Mc. Graw Hill. Chapter 72. 1989; 1159.

Harlow, E.; Lane David. *Antibodies a Laboratory Manual*. Cold spring Harbor Laboratories. E.U. 1988; 613.

Hase, T., Summers, P.L., Eckels, K.H. Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. *Arch. Virol.* 1989; 104: 129-143.

Haywood, M.A. Virus Receptors: Binding, Adhesion Strengthening, and Changes in Viral Structure. *J. Virol.* 1994; 68:1-5.

Helenius, A. Alphavirus and Flavivirus Glycoproteins: Structures and Fuctions. *Cell.* 1995; 81:651-653.

Igarashi, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chinkunguaya viruses. *J. Gen. Virol.* 1978; 40:531-544.

Igarashi, A. Characteristic of *Aedes albopictus* cell persistently infected with dengue viruses. *Nature (London)*. 1979; 280:290-91.

Kaplan, J.E., Eliason, D.A., Moore, M. Y col. Epidemiologic investigations of dengue infection in Mexico. *Am. J. Epidemiol.* 1983, 117:335-343.

Kimura, T., Ohyama, A. Asociation between the pH dependent conformational change of West Nile Flavivirus E protein and virus-mediated membrane fusion. *J. Gen. Virol.* 1988, 69: 1247-54.

Kimura, R., Hotta S. On the inoculation of dengue virus into mice. *Nippon Igakku.* 1944, 3379: 629-633.

Kliks, C.S., Nimmanitya, S., Nisalak, A. And Burke, S.D. 1988. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988; 38: 411-419.

Kliks, S. Antibody Enhanced Infection of Monocytes as the pathogenetic Mechanism for Severe Dengue Illness. *Aids Research and Human Retroviruse.* 1990, 6: 993-998.

Kontny, U., Kurane, Y. And Ennis, A.F. Gamma Interferon Augments Fcγ receptor-mediated Dengue virus infection of human monocytic cells. *J. Virol.* 1988, 62:3928-3933.

Kumate, J., Gutiérrez Gonzalo. Dengue. En: *Manual de Infectología.* Méndez, C.F. (ed). 11ª edición. México, D.F. 1988; 454-62.

Kurane, I., Brinton M.A., Samson, A.L, Ennis, F.A. Dengue virus-specific, human CD4⁺, CD8⁺ cytotoxic T cell clones: multiple patterns of virus crossreactivity recognized by NS3 specific T cell clones. *J. Virol.* 1991; 65:1823-1828.

Lentz, T.L. The recognition event between virus and host cell receptor: a target for antiviral agents. *J. Gen. Virol.* 1990; 71:751-66.

Littua, R., Kurane, Y. And Ennis, A. F. Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J. Virol.* 1990; 144:3183-3186.

Ludwing, V. G. And Connors- Iacono, C.L. Insect- transmitted vertebrate viruses: Flaviviridae. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 1993; 29: 296-309.

Mady, J.B., Erbe, D.V., Fanger, W.M. and Ennis, A.F. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection mediated by bispecific antibodies other than Fcγ receptors. *J. Immun.* 1991; 147: 3139-3144.

Marianneau, P., Mégret, F., Oliver, R., Morens, D. And Deubel, V. Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. *J. Gen. Virol.* 1996; 77:2547-2554.

✓ **Monath, P.T.** Flavivirus. Virology. Secon Edition, edited by B.N. Fields, D.M. Knipe et al. Raven Press, Ltd. New York. 1990; 763-814.

Morens, M. David. Antibody-Dependet Enhacement of Infection and the Pathogenesis of viral Disease. *Clin. Infec. Dis* 1994; 19:500-512.

✓ **Organización Panamericana de la Salud.** Dengue y Dengue hemorrágico en las Américas. guías para su prevención y control. Publicación científica. 1995; 248: 109.

Porterfield, J.S. and Peiris, J.S.M. 1979. Antibody-mediated enhacement of Flavivirus replication in macrophages-like cell line. *Nature (London)*. 1979; 282: 509-511.

Ramos Celso. Biología de la infección causada por el virus del dengue. *Salud Pública de México*. 1989; 3: 54-72.

Rey, A.F. Heinz, F.X., Mand, I. CH, and Harrinson, C.S. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus al 2°A resolution. *Nature (London)*. 1995; 375: 291-298.

Reyes, R.H. Navarro, R.P. Enfermedades infecciosas virales. *De. Disimlimed.* 1990; 283-295.

Rice, M.CH y cols. Nucleotide Sequence of Yellow Fever virus. Implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*. 1985; 22: 726-33.

Rose, L. And Gubler, D. The use of mosquitoes detect and propage dengue viruses. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1974; 23: 1153-1160.

Sinarachatanant, P. And Olson, C. Lloyd. Replication of dengue type 2 in *Aedes albopictus* cell culture. *J. Virol.* 1973; 12: 275-283.

Siurairatna, S. and Bhamarapavati, N. Replication of Dengue-2-virus in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1977; 26: 1199-1205.

Schelensinger, S. and Schlensinger, M. J. Replication of Togaviridae and Flaviviridae. In: B.N. Fields & D.M. Knipe et al. Raven Press, Ltd; New York. E.U. Chapter 25. 1990; 697-707.

Scott, R.M. Nimmannityas, Branco ft, W.H. Mansuwan, P. Schock Sindrome in primary dengue infección. *Am. J. Trop. Hyg.* 1976; 25: 886-874.

Smith, I.H., Vincendeau, P. Absence of Fc receptores on *Aedes albopictus* C6/36 cell permissive for dengue virus 2. *Acta Virol.* 1993; 37:202.

Tesh, B. Robert. A method for the asilation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1979; 28:1053-1059.

Trent, D.W., Grant, J.A., Vomdam, A.V., Monath, T.P. Genetic heterogenety among St.Louis encephalitis virus isolates of diferent geographic origin. *Virology.* 1981; 114:319-32.

Towbin,H.T. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1979; 76: 4350-4354.

Westaway, E.G. y et al. Flaviviridae. *Intervirolgy.* 1985; 24:183-192.

Westaway, E.G. y et al. Flavivirus Replication Strategy. *Adv. Res.* 1987; 33: 45-90.

Zarate, A.M. Vacunas. *Ciencia y Salud.* Secretaria de Salud, México, D.F. Capitulo 31. 1992; 395-408.