

ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES INDUCIDAS POR VIRUS DENGUE EN CULTIVOS CELULARES

Mildre E. Disla¹ Francisco Hernández^{1, 2*} y Laya Hun²

RESUMEN

Los cuatro serotipos del virus dengue inducen un efecto citopático (ECP) leve en cultivos celulares provenientes de mamíferos o mosquitos, como son las células Vero y las C6/36, respectivamente. Este ha sido descrito al microscopio electrónico de transmisión (MET); pero las posibles alteraciones a nivel de la superficie de las células infectadas no han sido descritas. Por tal razón investigamos el ECP al MET y al ME de rastreo (MER). Ambas líneas celulares (Vero y C6/36) fueron infectadas con Den-1, se fijaron y procesaron para MET y MER. Las células Vero mostraron vacuolización y algunas veces fusión celular; pero su superficie fue similar en las células sin infectar. Las células C6/36 mostraron un citoplasma totalmente vacuolizado y en el cual sólo se identificó el núcleo y microtúbulos. Al MER esas células presentaban abundantes filipodia con cadenas de cuerpos esféricos, similares a un rosario, que podrían corresponder a las vacuolas. (Rev., Cost. Clenc. Méd. 1996; 17-22)

PALABRAS CLAVE: Dengue, cultivos celulares, efecto citopático, ultraestructura.

1. Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

2. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

* Correspondencia.

INTRODUCCION

Entre los flavivirus patógenos para humanos de mayor relevancia están los virus causantes de la fiebre amarilla y del dengue, ambos transmitidos por mosquitos del género *Aedes*. En el caso del virus dengue, se han descrito cuatro serotipos, denominados con los dígitos de 1 a 4 y los principales transmisores son *A. aegypti* y *A. albopictus*⁽¹⁾.

El virión presenta una nucleocápside icosaédrica de unos 30 nm de diámetro, que encierra un genoma ARN de hebra positiva, asociado con una proteína estructural denominada C (de "core"). La nucleocápside es envuelta por una membrana fosfolipídica, con otras dos proteínas estructurales, E de envoltura y M de membrana. Además, se han identificado unas 7 proteínas no estructurales (1).

En la naturaleza estos virus tienen un ámbito de hospederos muy restringido, pues a parte del insecto vector se logran replicar en humanos y en algunos primates; sin embargo, in vitro se pueden replicar en varias líneas celulares derivadas de mono, como LLC-MK-2, Vero, FRhL y cultivos primarios de riñón; también se replica en las líneas BSC-1, PDK y BHK-21, provenientes de humanos, perro y hamster, respectivamente. De hecho, su ciclo de replicación se concreta mejor en líneas celulares derivadas de mosquito, como el caso de AP-61, TRA-284 y C6/36; esta última proviene de *A.*

albopictus y es una de las más empleadas (1, 2).

El virión reconoce un receptor en la célula blanco, y funde su membrana fosfolipídica con la membrana de la célula, permitiendo la entrada de la nucleocápside, o bien penetra mediante viropéxis; es posible que ocurran ambos mecanismos, dependiendo del serotipo involucrado. Una vez pasados los procesos de replicación y síntesis, las nucleocápsides se ensamblan y geman a través de membranas ricas en la proteína E y en un precursor de la proteína M (proM), estas membranas pueden ser del aparato de Golgi o de cisternas del retículo endoplásmico, y ello le permite adquirir la membrana fosfolipídica (2,3). Luego los viriones son liberados en vesículas exocíticas y la proteína proM es escindida en un proceso de maduración, para adquirir así su carácter infeccioso (2).

En cultivos celulares la infección puede ser desde inaparente hasta manifestar un efecto citopático, el cual se manifiesta por un aumento de la refractibilidad de las células, arredondamiento de éstas o formación de conglomerados, similares a sincicios (2, 4-6). Este tipo de alteración ha sido descrito ultraestructuralmente mediante microscopía electrónica de transmisión (MET); sin embargo, no hay descripciones de las posibles alteraciones que la infección viral podría inducir en la superficie de las células. Por este motivo se hace esta investigación, para tratar de describir esas alteraciones mediante microscopía electrónica de rastreo (MER).

MATERIAL Y METODOS

Se inocularon líneas celulares Vero y C6/36 con virus Dengue tipo 1 (Instituto Pedro Kouri, Puerto Rico). Las células se cultivaron en botellas o en placas de titulación con fondo plano. Los

cultivos de las botellas fueron tripsinizados para cosechar las células a la semana post inoculación. En las placas, las células se cultivaron sobre cubreobjetos redondos colocados en el fondo de cada pocillo, de manera que al cabo del período de incubación se extrajo el cubreobjetos con la monocapa.

Las células, ya fuese una suspensión o la monocapa sobre el cubreobjetos, se fijaron con solución de Karnowski (glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos), se postfijaron con OsO₄ al 1% y se deshidrataron. Las suspensiones de células se embebieron en resma para realizar cortes ultrafinos y analizarlos al MET, mientras las monocapas se procesaron para MER (7). Igualmente se procesaron cultivos celulares sin infectar, para analizarlos como controles normales.

Paralelamente se evaluó el grado de infección mediante inmunofluorescencia, empleando un anticuerpo monoclonal anti Dengue 1 y se reveló con un anticuerpo anti inmunoglobulinas murina marcado con fluoresceína (8).

RESULTADOS

Las células Vero son de tipo epitelioide, con una superficie cubierta por microvellosidades (Fig. 1). Al MET los cambios más patentes observados en las células Vero infectadas fueron el incremento en las vacuolas intracelulares y la aparición de acúmulos de células, tipo sincicio. Estos fueron más frecuentemente de tipo filamentosos, y aparecieron como largos filamentos con varios núcleos (Fig. 2); pero a alta magnificación se identifican las divisiones de las células. Sin embargo, a nivel de MER no se observaron diferencias en la superficie de las células Vero infectadas y no infectadas.

En tanto las células C6/36 sin infectar aparecen en los cortes ultrafinos con un aspecto esferoide, con proyecciones tipo filipodia. El núcleo se dispone centralmente y entre las organelas, sobresalen las mitocondrias por presentar un aspecto característico, ya que aparecen alargadas, delgadas y curvas (Fig. 3). Además, en el citoplasma aparecen algunas vacuolas con un material parcialmente electrolúcido y en algunos casos, con restos de membranas. En las células infectadas las vacuolas constituyen el elemento más abundante, lo que les confiere un aspecto característico, incluso se observaron las vacuolas en las proyecciones citoplasmáticas (Fig. 4). Algunas de esas vacuolas presentan restos de membranas en arreglos concéntricos y la única estructura identificable en esas células son acúmulos gigantes de microtúbulos que aparecen cortados en diversos planos (Fig. 4). En estas células fueron más frecuentes los agrupamientos de células, con apariencia de masas sinciciales. Además el núcleo frecuentemente aparece desplazado hacia la periferia de la célula.

Las células C6/36 al MER aparecen esferoides con una base expansiva delgada con múltiples proyecciones que le confieren un aspecto dendriforme (Fig. 5). Esas proyecciones tienen una superficie lisa y parecen adherirse al cubreobjetos donde se cultivaron. En las células infectadas, observadas a aumentos menores de 1000X no se aprecian diferencias respecto a los controles sin infectar. Sin embargo, a mayores aumentos, esos filipodios presentan una serie de abultamientos que le confieren un aspecto de rosario (Figs. 6 a 9). Característica que también se observó en las proyecciones de la superficie esferoidea o cuerpo de la célula (Fig.9).

La reacción de IF mostró un patrón diferente en ambas líneas celulares infectadas, en Vero apareció la fluorescencia más circunscrita a la

periferia de la célula, en tanto en C6/36 abarcó todo el citoplasma, respetando el núcleo. No hubo reacción de fluorescencia en los controles sin inocular.

DISCUSION

El efecto citopático inducido por los virus dengue es menos aparente e inconspicuo que el causado por otros agentes virales (2, 4). Incluso, éste puede variar dependiendo del serotipo involucrado y su adaptación al cultivo *in vitro*, así como al tipo de células empleadas y al número de pasajes de la cepa (2). Obviamente, éstos virus se replican mejor en células originarias de mosquito, que en aquellas provenientes de mamíferos (4); pero aún en esas células de mosquito, la producción de viriones por célula infectada es pobre, si se compara con otros agentes virales, pues los picos más altos de producción viral apenas llegan a las 10^{8-9} unidades formadoras de placas (UFP)/ml a la semana de incubación; en tanto en células de mamíferos los títulos son de 10^{5-6} UFP/ml (2).

Los acúmulos de células observados no corresponden propiamente a un arreglo sincicial, pues no se perdió la individualidad de las células, ya que se logra identificar las membranas de cada célula, tanto en los cultivos de Vero como de C6/36. No obstante, en estas últimas fueron más evidentes los cambios encontrados, sobre todo la abundante vacuolización del citoplasma, contrastando con la pérdida de organelas, pues a parte de las vacuolas sólo fue posible identificar arreglos de microtúbulos y el núcleo usualmente apareció desplazado periféricamente. En MER el hallazgo más importante fue la serie de abultamientos en los filipodia, que posiblemente corresponden a vacuolas, como podría deducirse de los cortes ultrafinos que muestran esas vacuolas en las proyecciones citoplasmáticas.

ABSTRACT

Dengue viruses, serotypes 1 to 4, induce a light cytopathic effect in cell monolayers from mammalian sources and from mosquito, such as Vero and C6/36, respectively. They have been described by transmission electron microscopy (TEM). However, the possible alterations at the surface level of the infected cells has not been reported. For that reason we investigated the CPE under TEM and scanning EM (SEM). Both kinds of cells were infected with Den-1, fixed, and processed for TEM and SEM. Vero cells showed vacuolization and sometime cell fusion; but their surface was similar to uninfected cells. C6/36 showed their cytoplasms totally vacuolized and only

the nucleus and microtubules were identified. Under SEM the cells have abundant filipodia with chains of round bodies, like a rosary, that could be correspond to vacuoles.

AGRADECIMIENTOS:

Mildre Disla fue estudiante del XIII Curso Regional de Microscopia Electrónica, auspiciado por la Agencia de Cooperación Internacional de Japón ("JICA"). Se agradece la colaboración del personal del Departamento de Virología de la Facultad de Microbiología y de la Unidad de Microscopia Electrónica; así como el apoyo de la Vicerrectoría de Investigación, de la Universidad de Costa Rica.

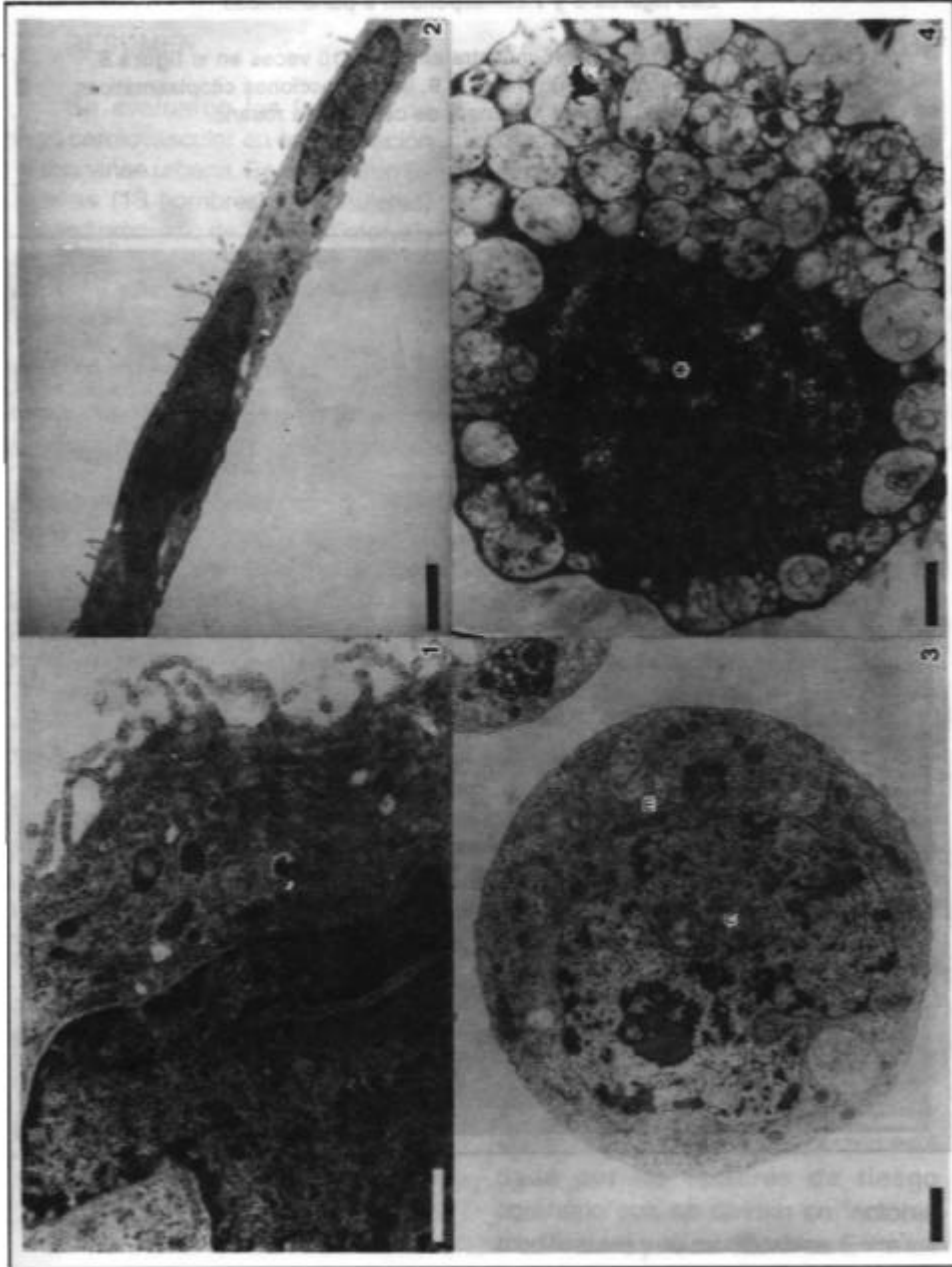
REFERENCIAS

1. Monath TP. Flavivirus. En: Field BN, Knipe DM, Chanock RM, Hirsch MS, Melnick JL, Monath TP, Roizman B. (Eds). *Virology* 2 ed. Raven Press Ltd. NY. 1990. p. 73- 814.
2. Henchal EA, Putnak R. The dengue viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990; 3: 37-396.
3. Halsted SB. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr. Opinion Infec. Dis.* 1990; 3: 434-438.
4. Barth OM. Replication of dengue viruses in mosquito cell cultures. A model from ultrastructural observations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 1992; 87: 565-557.
5. Barth OM, Schatzmayr HG. Brazilian dengue type 1 replication in mosquito cell cultures. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 1992; 87: 1-7.
6. Barth OM, Cortes LM de C, Lampe E, de Costa-Farias J. Ultrastructural aspects of virus replication in one fatal case and several other isolates from a Dengue type 2 outbreak in Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 1994; 89: 21- 24.
7. Dawes JC. Biological technique for transmission and scanning electron microscopy. Burlington, Vermont. Ladd Research Industries, Inc. Publ. 1980.
8. Henchal EA, Gentry JM, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibody by direct immunofluorescence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1982; 3: 830-836.

Figuras 1 a 4: Micrografías electrónicas de transmisión.

Figs. 1 y 2 corresponden a células Vero, sin infectar e infectadas, respectivamente (para más detalles ver el texto).

Las figuras 3 y 4 corresponden a células C6/36 sin infectar e infectadas, respectivamente. En estas últimas, se aprecia una masa de microtúbulos (asterisco) y el citoplasma vacuolizado. n=núcleo, m=mitocondria.



Figuras 5 a 9: Micrografías electrónicas de rastreo de células C6/36 infectadas.

Las **figuras 5 y 7** corresponden a panorámicas

El recuadro de la **figura 7** se muestra ampliado 10 veces en la **figura 6**,
mostrando, al igual que las **figuras 8 y 9**, las proyecciones citoplasmáticas
con abultamiento a manera de cuentas de rosario.

