



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS Y
ESTEQUIOMÉTRICOS DE CÉLULAS C6/36 DE *Ae. albopictus*,
EN CULTIVOS INFECTADOS Y NO INFECTADOS CON VIRUS
DENGUE.

TESIS

Que para obtener el título de:
Química Farmacéutica Biológica

PRESENTA

López Sánchez Elizabeth

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Ana Carolina Alcalá Aristiguieta

ASESOR DE TESIS

Q.F.B. Ramón Rodríguez Hernández

Ciudad de México

2018.





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.

Investigación realizada gracias al programa UNAM PAPIIT IT-200416 y IT200418, en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dr. Ana Carolina Alcalá Aristiguieta, en el grupo de investigación Palomares - Ramírez. Un agradecimiento especial a la técnico académico M. en C. Martha Alicia Contreras Ordoñez, por todo el apoyo y los conocimientos brindados en la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS.

Agradecimiento especial a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM, por darme la oportunidad de cursar una carrera profesional, gracias por todo lo aprendido. Siempre te recordaré con mucho cariño.

A la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera y al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich por aceptarme en su exitoso grupo de investigación, es un honor haber pertenecido a él.

A la Dra. Ana Carolina Alcalá Aristiguieta, gracias por ser mi directora de tesis, guiarme y tenerme mucha paciencia con todas las células que contamine y otras tantas que mate, ser su primer tesista es un honor.

A la M. en C. Martha Alicia Contreras Ordoñez, gracias por todo lo que me enseñó, por apoyarme con experimentos y dedicar tiempo para este proyecto.

Gracias a Karin Levy Pop, por su apoyo administrativo y a todas las personas que hacen que GPR funcione.

Al Q.F.B. Ramón Rodríguez Hernández gracias por el tiempo invertido en este proyecto y por aceptar ser mi asesor.

DEDICATORIA.

Primero dedico este trabajo a Dios, que me ha dado vida, salud, fuerza y recursos para realizarlo.

A Tita mi mamá, que siempre me apoyó para realizar mis metas y me impulsa día a día a alcanzar sueños más grandes que los que ella realizó.

Gracias a mis buenos amigos que conocí en la Fes Zaragoza, me hicieron la universidad mucho más divertida, fue un placer compartir vida con ustedes.

Contenido

1. ABREVIATURAS.	9
2. RESUMEN.	14
3. INTRODUCCIÓN.	15
4. MARCO TEÓRICO.	16
4.1. Virus del dengue.	16
4.2. Vectores del virus dengue.	18
4.3. Técnicas de aislamiento y producción del virus dengue.	18
4.3.1. Inoculación en embriones de pollo.	18
4.3.2. Inoculación en ratones lactantes.	18
4.3.3. Inoculación de mosquitos.	19
4.4. Cultivos celulares.	19
4.4.1. Cultivo en adherencia.	20
4.5. Línea celular C6/36.	22
4.6. Metabolitos de la línea celular C6/36 DE <i>Ae. albopictus</i>	23
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	27
6. HIPÓTESIS.	28
7. OBJETIVOS.	29
7.1. Objetivo general.	29
7.2. Objetivos particulares.	29
8. DISEÑO EXPERIMENTAL.	29
8.1. Tipo de estudio.	29

8.2. Población de estudio.....	29
8.3. Criterios.....	29
8.3.1. Criterios de inclusión.....	29
8.3.2. Criterios de exclusión.	30
8.3.3. Criterios de eliminación.	30
8.4. Variables.....	30
8.4.1. Variable independiente.....	30
8.4.2. Variable dependiente.....	30
9. MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
9.1. Medios de cultivo.....	30
9.2. Cultivos celulares.....	32
9.3. Descongelación de células.....	32
9.4. Congelación de células.....	33
9.5. Determinación de la viabilidad celular y concentración.....	33
9.6. Preparación de soluciones.....	35
9.7. Cinéticas de crecimiento de células C6/36 en adherencia.....	41
9.8. Determinación de metabolitos.....	43
9.9. Propagación y mantenimiento del virus en ratones lactantes.....	47
9.10. Titulación del virus.....	49
9.11. Tipificación molecular del DENV.....	51
9.11.1. Purificación de RNA viral.....	51
9.11.2. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) del virus dengue.....	52

9.12. Cinéticas de infección de células C6/36 en adherencia con DENV a MOI 0.05 UFP/ML	57
9.13. Efecto citopático.	58
10. DIAGRAMA DE FLUJO.	59
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	60
12. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.	60
13. RESULTADOS.	61
13.1. Caracterización de cultivos de células C6/36 crecidas en adherencia, mediante parámetros cinéticos y estequiométricos.	61
13.1.1. Determinación de parámetros cinéticos y estequiométricos.	61
13.1.2. Determinación de metabolitos en el medio de cultivo.	64
13.2. Caracterización de cultivos de células C6/36 crecidas en adherencia a lo largo de una infección con DENV.	65
13.2.1. Tipificación del virus dengue.	65
13.2.2. Cinéticas de infección de células C6/36 en adherencia con DENV a MOI 0.05 UFP/mL.	67
13.2.3. Efecto citopático producido por DENV en células C6/36.	67
13.2.4. Consumo y/o producción de metabolitos en cultivos infectados con DENV a MOI 0.05 UFP/mL.	71
13.2.5. Títulos obtenidos de cinéticas de infección de células c6/36 en adherencia con DENV a MOI 0.05 UFP/mL.	74
14. DISCUSIÓN.	75
14.1. Caracterización de cultivos de células C6/36 crecidas en adherencia mediante parámetros cinéticos y estequiométricos.	75
14.1.1. Determinación de parámetros cinéticos y estequiométricos.	75
14.1.2. Determinación de metabolitos en el cultivo celular.	78

14.2. Caracterización de cultivos de células C6/36 crecidas en adherencia a lo largo de una infección con DENV.	85
14.2.1. Tipificación del virus dengue.	85
14.2.2. Cinéticas de infección de células C6/36 en adherencia con DENV a MOI 0.05 UFP/mL.	87
15. CONCLUSIONES.	101
16. PERSPECTIVAS.	103
17. REFERENCIAS.	104

1. ABREVIATURAS.

Agua MQ Agua Milli Q

AlaAT Alanina aminotransferasa

AP-61 Células de *Ae. pseudoscutellaris*

AspAT Aspartato aminotransferasa

ATCC “Siglas del inglés Colección Americana de Células y Tejidos”

ATP Adenosin Trifosfato

AZS Azaserina

BHK-21 Células de riñón de hámster bebé de 21 días de nacido

BV Baculovirus

C6/36 Células de *Ae. albopictus*

C6/36 HT Células de *Ae. albopictus* adaptadas para crecer a 31°C.

Cbp Cuanto baste para

CCI Concentración celular en la infección

CLA-1 Células clonadas de *Ae. pseudoscutellaris*

CHIKV De la abreviación del inglés Chikungunya Virus (Virus del chikungunya)

CHO Células de ovario de hámster chino

CMC Carboximetilcelulosa

CPE Efecto citopático

DENV De la abreviación del inglés Dengue Virus (Virus del dengue)

DENV-1 Virus del dengue serotipo 1

DENV-2 Virus del dengue serotipo 2

DENV-3 Virus del dengue serotipo 3

DENV-4 Virus del dengue serotipo 4

DFAT Técnica de anticuerpos fluorescentes directos

DMEM “Siglas del inglés Medio de Eagle Modificado de Dulbecco”

DMSO Dimetilsulfóxido

EMEM “Siglas del inglés Medio Mínimo Esencial de Eagle.

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

f.f.u Unidades formadoras de focos

FHD Fiebre hemorrágica del dengue

FRhL Células fetales de pulmón de macaco Rhesus

GDH Glutamato deshidrogenasa

GltS Glutamato sintasa

GOGAT Enzima glutamato sintasa

GS Glutamina sintetasa

HCl Ácido clorhídrico

High 5 Células de ovario de *Trichoplusia ni*.

Hpi Horas post infección

IFA Inmunofluorescencia de anticuerpos

JE Encefalitis japonesa

JEV De la abreviación del inglés Japonesa Encefalitis Virus (Virus de la encefalitis japonesa)

kb kilobases

KCl Cloruro de potasio

KH_2PO_4 Dihidrógeno fosfato de potasio

LLC-MK₂ Línea continúa de células de riñón de macaco Rhesus

prM Proteína precursora de membrana

μ Velocidad de crecimiento

μmol Micromol

mL Mililitro

mM Milimol

MOI Multiplicidad de infección

NaCl Cloruro de sodio

NADH Nicotinamin Adenin Dinucleótido reducido

Na₂HPO₄ Hidrógeno fosfato de disodio

NS1 Proteína no estructural 1

NS2a Proteína no estructural 2a

NS2b Proteína no estructural 2b

NS3 Proteína no estructural 3

NS4a Proteína no estructural 4a

NS4b Proteína no estructural 4b

NS5 Proteína no estructural 5

pb Pares de bases

PBS “Siglas del inglés amortiguador fosfato salino”

PDK Células primarias de riñón de perro

PPP Vía pentosa fosfato

psi “Siglas del inglés libra de fuerza por pulgada cuadrada”

q Velocidades de consumo y producción (μ/Y ; μxY)

RMN Resonancia Magnética Nuclear

RNA Ácido ribonucleico

RT-PCR Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa

SAAR Células originales no clonadas de *Ae. albopictus*

Sf-9 Células de *Spodoptera frugiperda*

SFB Suero fetal bovino

TBE Buffer de Tris-Borato-EDTA

TCA Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

td Tiempo de duplicación

TRA-284 Células de *Toxorhynchites amboinensis*

UFP Unidades formadoras de placas

VERO Células epiteliales de riñón de mono verde africano

Y Rendimiento de consumo (células/metabolito) y producción (metabolito/células)

ZIKV De la abreviación del inglés Zika Virus (Virus del zika)

2. RESUMEN.

Las células C6/36 son una de las líneas de mosquito más utilizadas en ensayos con virus dengue, debido a las múltiples ventajas que presenta, entre ellas se encuentran la fácil detección del efecto citopático producido por el virus, alto rendimiento de producción viral, temperatura de crecimiento menor a otras líneas celulares, bajos costos y fácil manipulación. A pesar de las ventajas que representa realizar ensayos con DENV no está caracterizada con parámetros cinéticos y estequiométricos, hasta donde se sabe.

En este trabajo se logró determinar por medio de cinéticas de crecimiento de la línea celular C6/36 cultivadas en adherencia, la fase de crecimiento exponencial, la velocidad específica de crecimiento, el tiempo de duplicación y los rendimientos y velocidades de consumo y producción de glucosa, glutamina, lactato, glutamato y amonio. Estos parámetros son importantes ya que permiten manipular el cultivo, para optimizar tiempo, obtención de biomasa y determinar los requerimientos nutricionales adecuados para el crecimiento celular. También se determinaron metabolitos consumidos y producidos en células infectadas, que muestran los cambios en el metabolismo celular que induce el virus. Además, se determinó que en cultivos de células C6/36 infectados y no infectados, las concentraciones de lactato y amonio producidos son menores a 1 mmol/L, esto es importante ya que se demuestra que la limitación de oxígeno no repercute en la formación de lactato y plantea la hipótesis de que las células C6/36 metabolizan glutamina sin formación de amonio. Esto añade una ventaja al uso de esta línea en ensayos con DENV, ya que no produce concentraciones tóxicas de estos metabolitos.

3. INTRODUCCIÓN.

El dengue es una enfermedad febril infecciosa, de etiología viral sistémica, de presentación clínica variable: dengue, dengue hemorrágico¹ y estado de shock por dengue², se encuentra presente principalmente en zonas tropicales y subtropicales. Esta enfermedad es una de las más importantes en el mundo, el virus del dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae* y es un arbovirus (virus transmitido por artrópodos), el mecanismo de transmisión es a través de la picadura del mosquito hembra *Ae. aegypti* (principal vector) y en menor proporción por el mosquito *Ae. albopictus*^{1, 3}. Se conocen cuatro serotipos distintos del virus: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4⁴. Cuando una persona se recupera de la infección adquiere inmunidad de por vida contra el serotipo con el que se infectó, sin embargo, la inmunidad cruzada contra los serotipos restantes es parcial y temporal. Las infecciones posteriores causadas por otros serotipos aumentan el riesgo de padecer fiebre hemorrágica del dengue (FHD), lo cual puede ser mortal⁵. En las últimas décadas la incidencia del virus dengue se incrementó en el mundo. El número real de personas infectadas con dengue está subestimado porque en muchos casos es mal diagnosticado⁵.

En el año 2017 se reportaron en México 89 893 casos probables de dengue y 16 932 casos confirmados de infección con este virus, de los cuales 11 344 pertenecen a dengue no grave, 2 419 a dengue con signos alarmantes, 375 a dengue grave y 2 794 a dengue con signos alarmantes más dengue grave⁶.

Hasta la semana epidemiológica 10 del 2018, se registraron 225 casos de virus dengue en toda la República Mexicana. El 27.56 % de los casos son de dengue no

grave, el 65.33 % pertenece a dengue con signos alarmantes y el 7.11 % son casos con dengue grave. El estado con mayor incidencia del virus es Chiapas con el 72.89% de los 225 casos registrados⁷.

En este trabajo se abordó la infección del DENV desde la línea celular C6/36 la cual es una de las líneas de insecto más utilizadas para el aislamiento y producción del virus debido a que es un sistema que representa las condiciones de crecimiento similares al insecto vector *in vivo*. Se determinaron los parámetros cinéticos y estequiométricos de la línea celular C6/36 de *Ae. albopictus*, que fueron determinados en cultivos infectados y no infectados, para comprender la actividad metabólica en el contexto de la infección con virus dengue.

4. MARCO TEÓRICO.

4.1. Virus del dengue.

El DENV pertenece a la familia *Flaviviridae*, las partículas del virus son icosaédricas, miden 50 nm aproximadamente, contienen un núcleo denso de 30 nm, rodeado por una envoltura lipídica, cuya composición depende del hospedero, sobre la cual se insertan las proteínas de membrana y de envoltura^{8,9}. El interior del virus contiene el complejo riboproteico conformado por la proteína de la cápside y el genoma viral que consiste en una hebra única de RNA de sentido positivo de 10.7 kb⁸, el cual codifica tanto para las proteínas estructurales que formarán parte de la partícula viral, como para las proteínas no estructurales que intervienen durante los procesos de ensamblaje y replicación del RNA genómico, entre otras funciones.

El genoma del flavivirus codifica una poliproteína que se procesa mediante proteasas celulares y virales que generan diez proteínas diferentes ^{4,10}. El núcleo del virión contiene el genoma viral encapsulado en la proteína de la cápside (C). La proteína de la envoltura más grande (E) es esencial para la unión del virus y la entrada a la célula a infectar. La proteína de membrana se sintetiza como una proteína precursora (prM) que se procesa durante la exportación y evita que se produzcan cambios conformacionales en E, durante el ensamblaje viral. Además de estas tres proteínas estructurales (C-prM/M-E), el genoma viral codifica para siete proteínas no estructurales importantes en la replicación viral, la traducción y el procesamiento proteolítico de la poliproteína viral, las cuales son: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5 ^{4,10}. Como se observa en la figura 1.

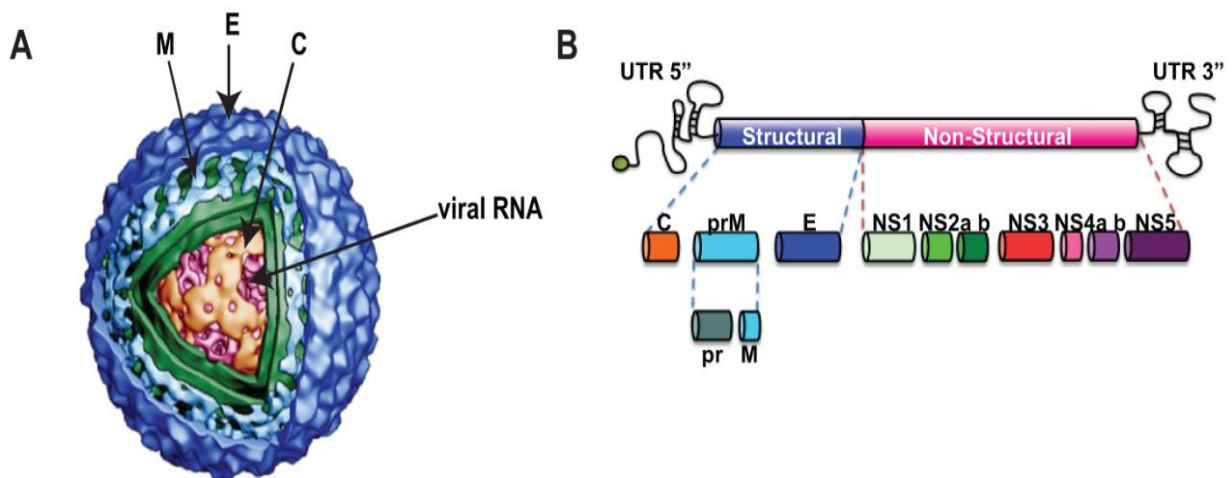


Figura 1. A. Viriones envueltos del dengue. Contienen tres proteínas estructurales; las proteínas de envoltura (E) y de membrana (M) (azul y azul claro, respectivamente) que están ancladas a la membrana viral (color verde) y la proteína de la cápside (C) (naranja) que cubre el genoma viral (rosa). **B.** El genoma del Dengue es una hebra monocatenaria, ARN de polaridad positiva con un único marco de lectura abierto flanqueado por regiones no traducidas 5"y 3" (UTR). Codifica para tres proteínas estructurales y siete no estructurales, representadas por cuadros de color, con el nombre indicado¹⁰.

4.2. Vectores del virus dengue.

El mosquito *Ae. aegypti*, es el principal vector del virus que causa el dengue⁵. El virus infecta el intestino medio del mosquito y luego se extiende hasta las glándulas salivales en un periodo entre 8 a 12 días (periodo de incubación)⁵. La infección se inicia cuando un mosquito hembra *Ae. aegypti* infectado pica y deposita partículas virales en humanos. También se atribuyen brotes de dengue por *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis* y varias especies del complejo *Ae. scutellaris*⁵, en menor frecuencia.

4.3. Técnicas de aislamiento y producción del virus dengue.

Desde el descubrimiento del dengue se establecieron diversos procedimientos para el aislamiento, mantenimiento y producción del virus, a continuación se describen las técnicas más utilizadas.

4.3.1. Inoculación en embriones de pollo.

Esta técnica fue utilizada a partir de la década de los 30's. Es llevada a cabo por medio de la inoculación del virus en la membrana corioalantoidea del pollo (huevo), en esa época se hicieron numerosos intentos para propagar una variedad de cepas del DENV. Sin embargo, todos estos intentos produjeron resultados negativos comprobados mediante pruebas en voluntarios humanos que no desarrollaron ni enfermedad ni inmunidad¹¹. Después de que el virus del dengue se adaptó con éxito a la propagación en ratones, resultó obsoleto cultivarlo en embriones¹¹.

4.3.2. Inoculación en ratones lactantes.

Esta técnica es ampliamente utilizada porque presenta múltiples ventajas, debido a sus bajos costos y la fácil manipulación que requiere. Consiste en hacer inoculaciones intracraneales de suspensiones del DENV en ratones lactantes de 1-3 días de edad. Los ratones se inoculan con suspensiones de especímenes clínicos,

macerados de artrópodos o tejido animal, para así aislar el virus^{12, 13, 14}. Aunque este es el método tradicional, presenta la desventaja de ser el menos sensible para el aislamiento de virus, debido a esto muchos virus no pueden aislarse en ratones lactantes y los que están aislados requieren numerosos pases para adaptar el crecimiento en los ratones, además el aislamiento por succión del cerebro es lento y costoso. Este método ya no se recomienda para el aislamiento de los virus del dengue^{12, 15}.

4.3.3. Inoculación de mosquitos.

Técnica reportada para detección y amplificación viral, es el método más sensible para el aislamiento y ensayo del DENV¹². Consiste en la inoculación de mosquitos por vía intratorácica con muestras clínicas positivas al virus, después de 15 días los mosquitos sobrevivientes se prueban con ensayo de inmunofluorescencia de anticuerpos (IFA) para el antígeno del Flavivirus¹⁶. El mosquito *Ae. albopictus* y el *Toxorinchites splendens* son las especies utilizadas, la inoculación del mosquito requiere personal entrenado, equipos especiales y cultivar colonias de mosquitos en insectarios, que son instalaciones costosas, lo que representa una desventaja para esta técnica¹⁷.

4.4. Cultivos celulares.

Los cultivos celulares pueden derivarse de explantes primarios o suspensiones de células dispersadas, estos cultivos se encuentran en constante proliferación celular, lo que hace factible la propagación de las líneas celulares, esta puede realizarse en suspensión o monocapa de células, con una fracción de crecimiento significativa, que puede disgregarse mediante tratamiento enzimático o dilución simple y volver a sembrarse o subcultivarse en recipientes nuevos, esto constituye un pase. Los

cultivos celulares presentan ventajas en la cuantificación, caracterización y muestreo de replicación, pero carecen de interacción célula-célula e interacción célula-matriz proporcionada por cultivos de órganos¹⁸.

4.4.1. Cultivo en adherencia.

El cultivo en adherencia es una técnica utilizada para líneas celulares primarias y para líneas establecidas que muestran crecimiento dependiente de la superficie¹⁹. Las células se unen al sustrato para proliferar y propagarse de este modo¹⁸, el rendimiento celular es proporcional al área superficial disponible del matraz, ya que forman en la superficie una monocapa¹⁹.

Las ventajas del cultivo en adherencia radican en que es aplicable para más tipos de células, incluyendo las líneas primarias, se utiliza para citología, mitotic shake-off, extracciones *in situ* y cosecha continua de productos. Por otra parte, las células que pueden tener una eficacia de clonación moderadamente alta en monocapa, tienen una eficacia de clonación muy baja en suspensión debido a su necesidad de fijarse y extenderse para entrar en el ciclo de proliferación celular¹⁸.

En este tipo de cultivo no es necesario un sistema complejo de reciclado de células y el cambio de medio se realiza fácilmente, aunque no presenta homogeneidad con respecto a los gradientes de todas las variables esenciales de cultivo, la determinación y control de los parámetros para todas las células es imposible, tiene diferentes presiones de selección no definidas lo que da como resultado derivaciones genéticas y subpoblaciones. No se puede establecer una tasa de crecimiento constante, ni una alta productividad volumétrica debido a la tasa de dilución y al

desacoplamiento del crecimiento, además los costos de inversión y mantenimiento son mucho más altos para este tipo de cultivo¹⁹.

En el desarrollo de experimentos, propagación o mantenimiento de cepas de DENV se utilizan diferentes líneas celulares de mamífero con distintos grados de sensibilidad, las más comunes son BHK-21 (células de riñón de hámster bebé de 21 días), utilizada para ensayos de neutralización de placas²⁰, LLC-MK₂ (línea continua de células de riñón de macaco Rhesus), detección y recuperación del virus²¹, FRhL (células de pulmón de macaco Rhesus fetales), usada en la propagación de la vacuna del DENV-2 libre de SFB²², PDK (células primarias de riñón de perro) utilizada en la producción de DENV-2 atenuado, usado como inmunógeno candidato a vacuna²³, VERO (células epiteliales de riñón de mono verde africano) aislamiento y propagación del virus²⁴ y ensayos en placas²⁵.

Las células de mosquito son utilizadas en forma creciente ya que resultan mejores para el aislamiento del DENV en comparación con las células de mamífero, ya que las células de mosquito son más sensibles, fáciles de multiplicar y mantener a temperatura ambiente, pueden permanecer hasta 14 días sin cambio de medio de cultivo y pueden inocularse directamente²⁶. Las líneas celulares de mosquito que tienen mayor sensibilidad para el aislamiento son AP-61 (células de *Ae. pseudoscutellaris*), C6/36 (células de *Ae. albopictus*), TRA-284 (células de *Toxorhynchites amboinensis*)²⁷, CLA-1 (células clonadas de *Ae. pseudoscutellaris*)²⁸)²⁶. De todas las líneas celulares de mosquito utilizadas en ensayos con DENV la línea celular C6/36 es un buen método de aislamiento del virus, analizando la

sensibilidad del sistema, la factibilidad de su realización y que logra en un porcentaje relativamente alto en la producción del virus¹⁷.

4.5. Línea celular C6/36.

La línea celular C6/36 es la línea más utilizada para la propagación del DENV, se obtuvo a partir de larvas recién eclosionadas de *Ae. albopictus*. En 1967, Singh logró establecer tres líneas celulares, una a partir de *Ae. albopictus* y dos de *Ae. aegypti* con un medio de cultivo sin hemolinfa de insecto. Estos cultivos celulares establecidos se adaptaron al medio 199 y el medio mínimo esencial de Eagle suplementados con SFB al 10%²⁹. Posteriormente, se aislaron 20 clones de células cultivadas de *Ae. albopictus* en presencia de suero anti-virus de Chikungunya³⁰.

Cada clon se ensayó para determinar la infectividad de DENV tipos 1, 2, 3 y 4 y CHIKV. Uno de los clones: C6/36, mostró de leve a extensos efectos citopáticos varios días después de la infección por el virus, en contraste con las células originales no clonadas (SAAR)³⁰. Las curvas de crecimiento de los virus indicaron que el clon C6/36 dio un rendimiento significativamente mayor para cada virus a diferencia de las células SAAR hasta 7 días después de la infección³⁰.

El clon C6/36 de *Ae. Albopictus* fue elegido para el aislamiento del virus dengue porque demostró una alta sensibilidad a la infección y facilidad de manejo^{12, 30}. Esta línea celular es altamente estable, tiene un crecimiento óptimo a temperaturas más bajas que las células de mamífero, se utiliza frecuentemente y proporciona un método simple y económico para el aislamiento y ensayo del DENV¹². También utiliza en la producción de placas por Arbovirus³¹, aislamiento de diversos virus¹², pruebas de anticuerpos fluorescentes directos (DFAT)²⁷, producción del virus

dengue^{32, 33} y ensayos de interferencia entre Fiebre Amarilla y dengue³⁴, entre otros usos.

Las limitantes de esta línea celular radican en que no detecta la encefalitis japonesa (JE) y los serotipos del DENV a un título muy bajo, comparado con la línea celular del mosquito *Ae. Krombeini* que es más sensible a varios arbovirus¹². Tiene una baja velocidad de aislamiento del virus Dengue de suero humano comparada con AP-61 de *Ae. pseudoscutellaris* y TRA-284 de *Toxorhynchites amboinensis* y una menor resistencia a los efectos tóxicos del suero humano de las tres líneas²⁷.

4.6. Metabolitos de la línea celular C6/36 DE *Ae. albopictus*.

La línea celular C6/36 no está caracterizada metabólicamente con parámetros cinéticos y estequiométricos, a pesar de ser una de las líneas más utilizadas en el aislamiento y replicación del virus Dengue. Los parámetros cinéticos son aquellos parámetros que son dependientes del tiempo y que cambian con respecto a éste, como son la velocidad de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (td) de una línea celular, además de la fase de crecimiento exponencial, todos estos parámetros son específicos para cada línea.

Los parámetros estequiométricos son aquellos que se modifican o dependen de las concentraciones de sustrato o producto y del número de células que existan en el cultivo, estos parámetros son rendimientos de consumo (Y células/metabolito) y producción (Y metabolito/células), ambos rendimientos son una relación estequiométrica entre células y metabolitos, ya que expresan cuantas células consumen una cantidad determinada de un nutriente específico y cuantas células producen una cantidad determinada de cierto producto del metabolismo celular. Las

velocidades de consumo y producción ($q \mu/Y$; $q \mu xY$), también son una relación que indica el número de células que consumen cierto metabolito en un tiempo definido³⁵.

En otras líneas celulares se ha observado que la mejora del metabolismo celular produce un aumento de crecimiento, viabilidad, productividad, espectro de sustrato y energía, que resulta en numerosas aplicaciones de las células de insectos³⁶. En el caso de la línea celular C6/36 el estudio de estos parámetros puede contribuir en la comprensión de la infección viral y el incremento de la producción del virus para realizar una infección más eficiente. Se sabe de forma general que cuando un virus infecta una célula, secuestra la maquinaria celular y la enfoca en la producción y ensamblaje de las partículas virales, dejando de lado la replicación celular³⁷. Esto da pie a pensar que los parámetros cinéticos y estequiometricos son modificados cuando el virus infecta a la célula, ya que existe un cambio en el metabolismo celular.

Se sabe que las células de insecto pueden utilizar diversas fuentes de carbono³⁷. La glucosa es la fuente principal, la maltosa y la fructuosa se consumen cuando existen concentraciones limitantes de glucosa³⁷. En particular el mosquito *Ae. aegypti* necesita ingerir azúcar para satisfacer las demandas energéticas del metabolismo basal y de la fuga³⁸. Como se ilustra la Figura 2.

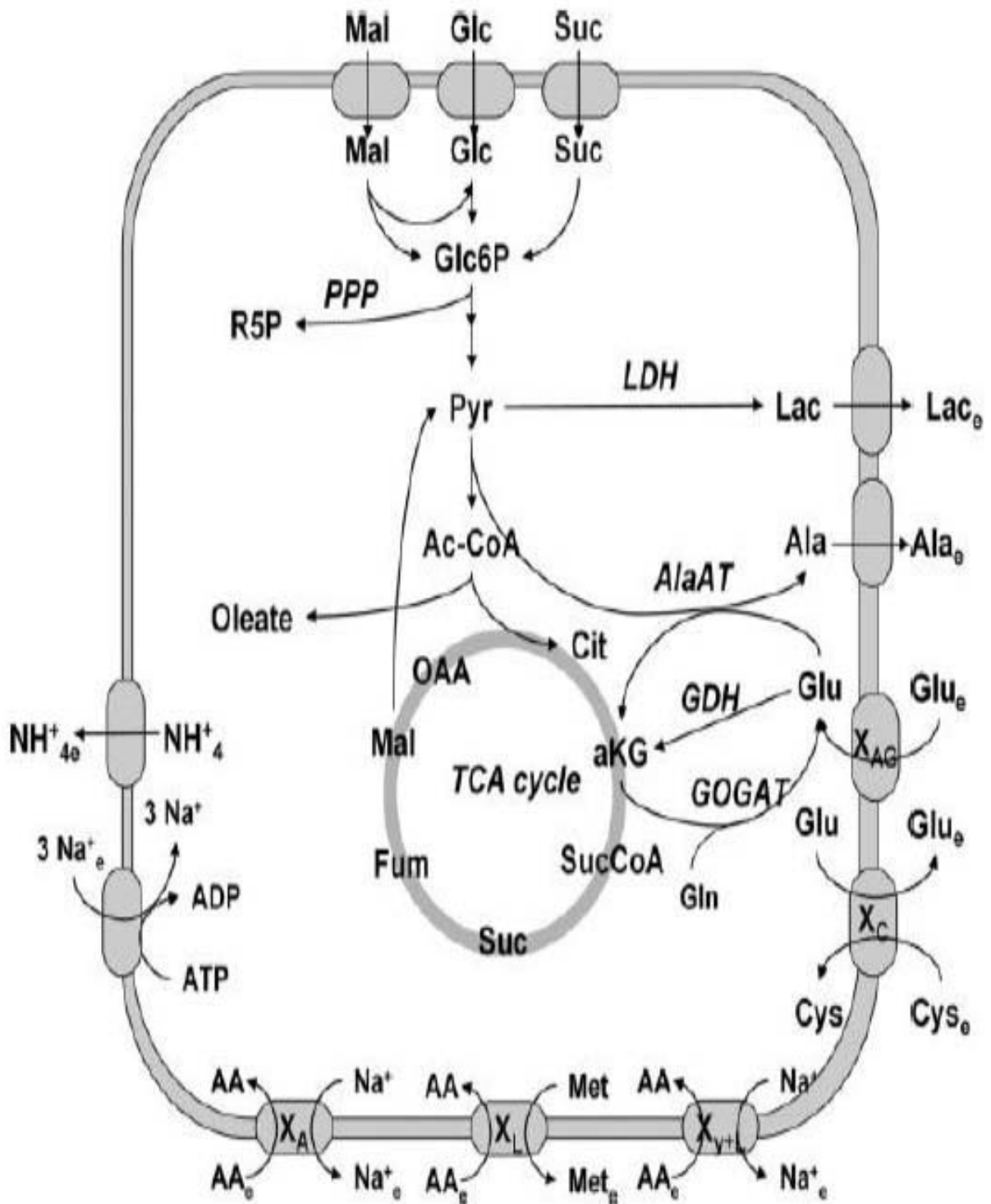


Figura 2. Principales rutas metabólicas consideradas para el metabolismo central de las células Sf9³⁶.

Se reporta que existe consumo de lactato después del agotamiento de glucosa y glutamina, aunque el lactato es un metabolito tóxico importante para cultivos de células de mamífero³⁷. El lactato es el principal subproducto de la glucosa en el metabolismo anaerobio, aunque también se produce a partir de glutamina. La producción del lactato depende de la concentración de glucosa, la actividad celular y las condiciones ambientales³⁷. El lactato es tóxico en cultivos donde no se controla el pH³⁷.

La glutamina es el aminoácido de mayor importancia en el cultivo de células de mamífero. Es importante para la síntesis de purinas, pirimidinas, glucosamina y asparagina³⁷. El consumo de glutamina para obtener energía, origina dos moles de amonio, mientras que su uso para biosíntesis origina solo una. La ruta del metabolismo de la glutamina se llama glutaminólisis, el amonio y el lactato son productos importantes de esta ruta. Durante la deaminación de la glutamina por la glutaminasa se produce una cantidad considerable de amonio³⁷.

El amonio es el principal metabolito tóxico para las células eucariotas, se produce en la célula al metabolizar la glutamina. Se monitoreó el efecto del amonio sobre el crecimiento celular y proliferación en cultivos en lote de células de insecto y se observó que el amonio prácticamente no se produjo y no fue tóxico en concentraciones hasta de 10 mM³⁷. En el mosquito *Ae. aegypti* el metabolismo del amoniaco hace frente a las concentraciones de amoniaco tóxico que resultan del metabolismo rápido de proteínas por lo que incorpora amoniaco en forma de aminoácidos por distintas vías metabólicas específicas³⁹. Como se esquematiza en la Figura 3.

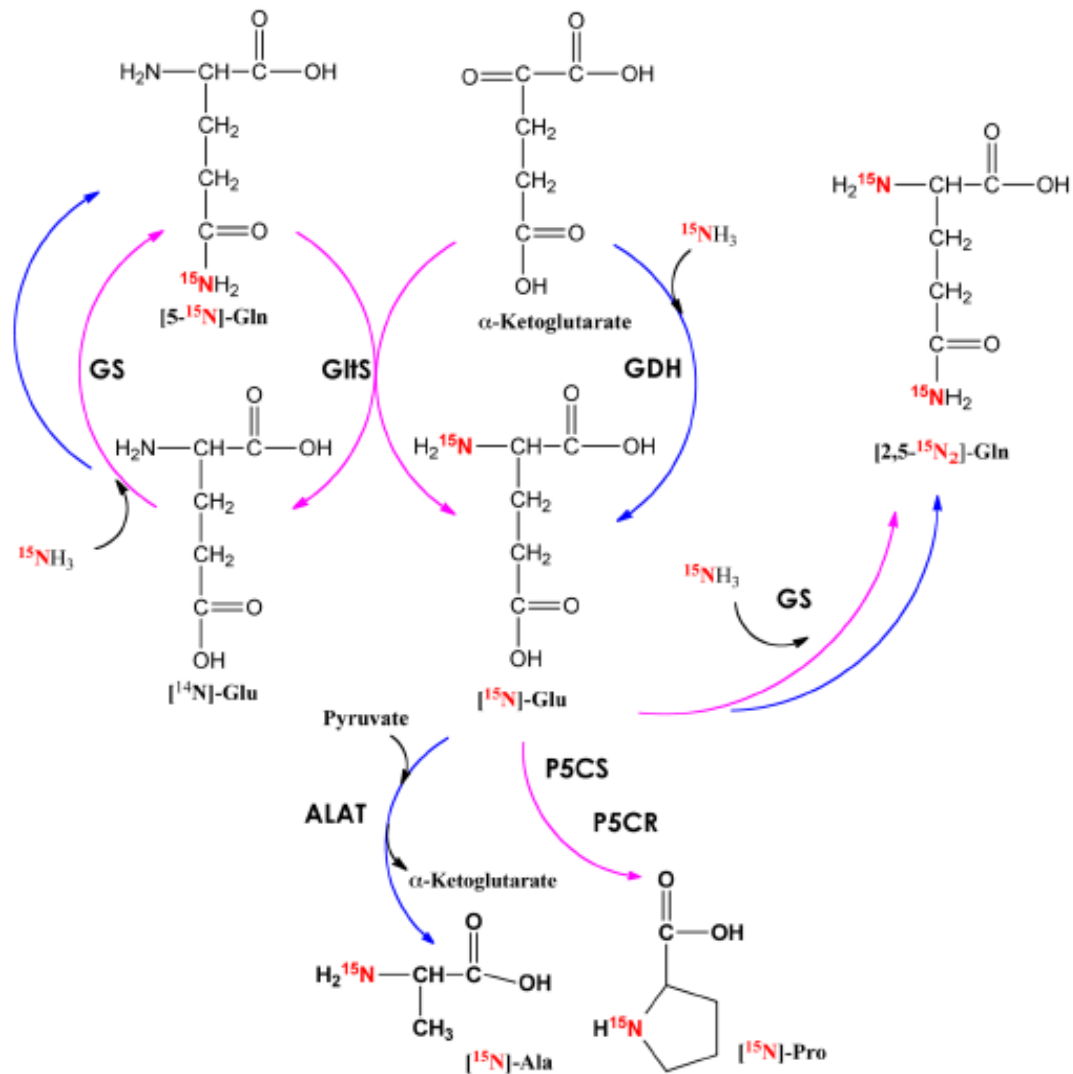


Figura 3. Esquema representativo de las rutas metabólicas para el metabolismo de amonio en hembras de *Ae. aegypti*. Son usados diferentes colores para resaltar las principales reacciones enzimáticas que operan durante la detoxificación en los tejidos en cuerpo gordo (rosa) y en el intestino medio (azul) ³⁹.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La infección de células C6/36 con virus dengue, está reportada desde que este clon fue aislado por Igarashi en 1978³¹, quien describió el efecto citopático producido por este virus en la línea celular y los títulos virales alcanzados. Otros autores también han reportado esto⁴⁰, sin embargo no existe información sobre cinéticas de

crecimiento de la línea sin infectar y por lo tanto no existen datos para la fase de crecimiento exponencial, velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (t_d), ni sobre el consumo y/o producción de metabolitos que favorecen o limitan el crecimiento celular. De igual forma no existe información sobre cómo se afecta el metabolismo celular en el contexto de una infección con DENV.

En otras líneas celulares de importancia industrial estos parámetros se han descrito ampliamente en diferentes condiciones de cultivo, lo que facilita la manipulación de la línea, y esto reditúa en una mayor producción del objetivo deseado (anticuerpos monoclonales, partículas pseudovirales, virus, etc.). En la línea celular C6/36 el conocimiento de estos parámetros cinéticos y estequiométricos, podría facilitar múltiples aspectos del cultivo y la infección viral, como son calcular el tiempo de crecimiento celular y la cantidad de metabolitos que se consumirán con base a la densidad celular que puede alcanzar el cultivo y así optimizar los tiempos de infección considerando el agotamiento de nutrientes, el título máximo alcanzado en un tiempo determinado y disminuir los costos del cultivo.

6. HIPÓTESIS.

La caracterización de los parámetros cinéticos (μ y t_d) y estequiométricos de células C6/36 de *Ae. albopictus*, en cultivos infectados y no infectados con virus dengue, permite conocer los cambios producidos por la infección sobre el consumo y/o producción de metabolitos presentes en el medio de cultivo.

7. OBJETIVOS.

7.1. Objetivo general.

Determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos de células C6/36, en cultivos infectados y no infectados con el virus Dengue.

7.2. Objetivos particulares.

1.- Caracterizar cultivos de células C6/36 crecidas en adherencia mediante la determinación de parámetros cinéticos y estequiométricos.

2.- Caracterizar cultivos de células C6/36 crecidas en adherencia a lo largo de una infección con DENV.

8. DISEÑO EXPERIMENTAL.

8.1. Tipo de estudio.

Experimental, longitudinal, cuantitativo.

8.2. Población de estudio.

Línea celular C6/36 de *Ae. albopictus*, cultivada en adherencia. Estas células se incubaron en medio EMEM (ATCC®) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), en una atmosfera de CO₂ al 5% a 28°C, manipuladas en condiciones asépticas en campana de flujo laminar clase II tipo A/B3, en cuarto de cultivo celular, ubicado en el Instituto de Biotecnología, UNAM.

8.3. Criterios.

8.3.1. Criterios de inclusión.

Células C6/36 con 95-100% de viabilidad.

8.3.2. Criterios de exclusión.

Células con viabilidad menor al 95%, concentración celular mayor o menor a la establecida para cada experimento.

8.3.3. Criterios de eliminación.

Contaminación de la línea celular.

8.4. Variables.

8.4.1. Variable independiente.

Tiempo.

8.4.2. Variable dependiente.

La única variable que se realiza en los cultivos fue la infección o no con virus dengue, pero este hecho repercutirá en la concentración de metabolitos (glucosa, lactato, glutamina, glutamato y amonio) a lo largo del cultivo (156 horas de cultivo para células no infectadas y 108 hpi para células infectadas) y el título viral.

9. MATERIAL Y MÉTODOS.

Para realizar los cultivos celulares se utilizó la línea celular C6/36 de *Ae. albopictus* (ATCC® CRL-1660™) amablemente donada por el Dr. Juan Ernesto Ludert (CINESTAV), a menos que se especifique lo contrario. Se trabajó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

9.1. Medios de cultivo.

Medio de cultivo Mínimo Esencial de Eagle (EMEM, ATCC®): suplementado con la cantidad requerida de SFB.

Medio de cultivo de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM Sigma-Aldrich):

Material:

1 frasco de Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich, cat: D5030-1L).

3.7 g de bicarbonato de sodio (J. T. Baker, cat: 3506-01).

1 g de glucosa (Sigma-Aldrich, cat: G7021-1K).

Rojo de fenol (Sigma de México S.A. de C.V.).

Agua MQ cbp 1L.

HCl al 37% (J.T. Baker, cat: 9535-05).

Filtros de membrana DURAPORE®, tipo 0.22 µm GV (Merck Millipore Ltd, cat: GVWP04700).

Soporte de filtros reutilizable con receptor de 1L (NALGENE®).

Equipo:

Balanza analítica (OHAUS, ANALYTICAL Plus).

Placa de agitación (Thermo Scientific, CIMAREC).

Campana de flujo laminar clase II tipo A/B3 (NUAIRE® Modelo: NU-1425-400).

Bomba de vacío.

Procedimiento para preparar el medio:

Se suplementó el medio con 3.7 g de bicarbonato de sodio y 1.0 g de glucosa, se disolvió en agua MilliQ y se ajustó el pH a 7.4 con HCl al 37%. El medio se filtró a través de la unidad de filtración y se almacenó entre 2 a 8°C. La cantidad requerida de SFB y glutamina se adicionaron al momento de utilizarse para evitar la degradación de ambos.

Medio de cultivo de Eagle Modificado de Dulbecco 2X (DMEM Sigma-Aldrich): Se preparó y suplementó de igual manera que el medio anterior, utilizando la mitad del volumen de agua.

9.2. Cultivos celulares.

La cantidad de células sembradas, dependió del formato para cada experimento.

Para este trabajo se utilizaron dos líneas celulares:

La línea C6/36 (células de *Ae. albopictus*), se utilizó para la caracterización de parámetros cinéticos y estequiométricos en cultivo infectados y no infectados con DENV. Las células se cultivaron en medio EMEM (ATCC®) suplementado con 5% de SFB, en una atmósfera de CO₂ al 5% a 28°C.

Las células VERO (células epiteliales de riñón de mono verde africano) se utilizaron para realizar ensayos de plaqueo, para titular las partículas de DENV viables. Las células VERO se cultivaron en medio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado con 5% de SFB, 4mM Glutamina en atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C.

9.3. Descongelación de células.

Para iniciar los cultivos se descongelaron células de bancos preexistentes en el laboratorio, los cuales se mantuvieron en nitrógeno líquido. Los crioviales se descongelaron y se trasvasaron a frascos T de 25cm², en medio de crecimiento

adecuado para la línea celular. Posteriormente, se monitorearon para constatar el desarrollo del cultivo.

9.4. Congelación de células.

Para asegurar la disponibilidad de las líneas celulares durante todo el trabajo se almacenaron viales de células de cada condición de crecimiento que se logró estandarizar, a manera de resguardo. El procedimiento para la congelación, dependió del formato (adherencia o suspensión) en el cual se encontraban las células. Las células se congelaron en una mezcla que contenía 90% de SFB y 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido).

9.5. Determinación de la viabilidad celular y concentración.

Para determinar la viabilidad celular se utilizó el método de exclusión de azul de tripano, el cual se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen ciertos colorantes como el azul de tripano, mientras que las células muertas no. Una célula viable tendrá un citoplasma claro, mientras que una célula no viable tendrá un citoplasma azul⁴¹.

Material:

Azul de tripano.

Cámara de Neubauer (Hausser Scientific).

Equipo:

Microscopio óptico invertido Eclipse TE300, NIKON.

Procedimiento:

Se tomó muestra de las células a contar y se realizó una dilución con azul de tripano, procurando que el número de células contabilizadas en ambos campos de la cámara fuera entre 250 y 500, para realizar una medición confiable. Una vez mezcladas las células con azul de tripano, se colocaron en una cámara de Neubauer para su visualización en un microscopio óptico invertido (Eclipse TE300, NIKON), de esta manera se determinó la concentración celular y la viabilidad.

Fórmulas utilizadas:

$$\text{células viables por mL} = \frac{\text{No. células contadas vivas}}{\text{No. de cuadros contados}} \times \text{factor de dilución} \times 10000$$

$$\text{células no viables por mL} = \frac{\text{No. de células contadas muertas}}{\text{No. de cuadros contados}} \times \text{factor de dilución} \times 10000$$

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{No. de células viables}}{\text{No. total de células}} \times 100$$

La determinación de la concentración celular se verificó adicionalmente de forma automatizada utilizando el equipo Counter Coulter (Multisizer™ 3, Beckman Coulter). Se realizó la dilución necesaria para la lectura de la muestra y se determinó la concentración celular de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{número total de células} = \frac{\text{No. de células contadas}}{100 \mu\text{L}} \times \frac{10000 \mu\text{L}}{\mu\text{L muestra tomados}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}}$$

9.6. Preparación de soluciones.

Para los diversos métodos que fueron utilizados en este trabajo se prepararon las soluciones que se describe a continuación, para más adelante solo referir a las soluciones ya preparadas en cada método en particular.

Glutamina 200 mM.

Material:

2.922 g de L-Glutamina (Sigma-Aldrich, cat: G-3126).

Agua MQ cbp 100 mL.

Filtro Millex[®]-GS de 0.22 μ m (MERCK Millipore Ltd, cat: SLG033SB).

Microtubos de 1.5 mL (AXYGEN, cat: MCT-150-C).

Equipo:

Balanza analítica (OHAUS, ANALYTICAL Plus).

Campana de flujo laminar clase II tipo A/B3 (NUAIRE[®] Modelo: NU-1425-400).

Procedimiento:

Para preparar 100 mL, se disolvieron 2.922 g de glutamina en agua MQ, una vez que se solubilizo la glutamina, se filtró y se almacenó en microtubos de 1.5 mL a -20°C.

Azul de tripano 20% (v/v).

Material:

Azul de tripano (Sigma-Aldrich, cat: T8154-100ML).

40 mL de PBS estéril.

Filtro Millex[®]-GS de 0.22 µm (MERCK Millipore Ltd, cat: SLG033SB).

Procedimiento:

Para preparar 50 mL, se tomaron 40 mL de PBS estéril y se mezclaron con 10 mL de solución de azul tripano al 0,4%. Una vez homogénea la solución, se filtró y se almacenó a temperatura ambiente.

Carboximetilcelulosa 2% (CMC).

Material:

5 g de Carboximetilcelulosa de sodio (Sigma-Aldrich, C4888-500G).

Agua MQ cbp 250 mL.

Equipo:

Balanza analítica (OHAUS, ANALYTICAL Plus).

Autoclave Yamato Sterilizer SM510.

Procedimiento:

Para preparar 250 mL, se hidrataron 5 g de Carboximetilcelulosa con agua MQ cbp 250 mL, durante 24 horas. Posteriormente se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 15 psi de presión.

PBS 1X.

Material:

8 g de NaCl cristal (J.T. Baker, cat: 3624-01).

0.2 g de KCl cristal (J.T. Baker, cat: 3624-01).

1.44 g de Na₂HPO₄ (J.T. Baker, cat: 3828-01).

0.24 g de KH₂PO₄ (J.T. Baker, cat: 3246-01).

HCl al 37% (J.T. Baker, cat: 9535-05).

Agua MQ cbp 1L.

Equipo:

Balanza analítica (OHAUS, ANALYTICAL Plus).

Autoclave Yamato Sterilizer SM510.

Procedimiento:

Se disolvieron todas las sales en agua MQ, se ajustó el pH a 7.4 con HCl. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 15 psi de presión.

Formaldehído al 1%.

Material:

Solución de Formaldehído al 37% en H₂O (Sigma-Aldrich, SHBH2425V).

PBS 1X cbp 500 mL.

Procedimiento:

Para preparar 500 mL, se tomaron 13.5 mL de solución de formaldehído al 37% y se aforaron a 500 mL con PBS 1X. Se almacenó a temperatura ambiente, protegido de la luz.

Cristal violeta.

Material:

0.5 g de Cristal violeta (Sigma-Aldrich, cat: C0775-25G).

5 mL de etanol puro (Sigma-Aldrich, cat: E7023-500ML).

Formaldehído al 1%.

Equipo:

Balanza analítica (OHAUS, ANALYTICAL Plus).

Procedimiento:

Para preparar 250 mL, se disolvieron 0.5 g de cristal violeta en 5 mL de etanol y se aforaron a 250 mL de volumen total con formaldehído al 1%. Se almacenó a temperatura ambiente, protegido de la luz.

Agarosa 1%.

Material:

1 g Agarosa Ultrapura (Invitrogen, Cat: 16500-500).

Agua MQ cbp 100 mL.

Equipo:

Balanza analítica (OHAUS, ANALYTICAL Plus).

Procedimiento:

Para preparar 100 mL, se disolvió 1 g de agarosa en 100 mL de agua MQ. Al momento de utilizarse se calentó la solución en microondas en intervalos de 30 segundos, hasta que se observó una solución cristalina.

Solución de EDTA 0.5 M (pH 8).

Material:

1.861 g de EDTA (J.T. Baker, cat. 8993-01).

Agua destilada cbp 10 mL.

NaOH 1N cbp ajustar pH

Equipo:

Balanza analítica (OHAUS, ANALYTICAL Plus).

Autoclave Yamato Sterilizer SM510.

Procedimiento:

Se ajustó a pH 8 con NaOH 1N, 8 mL de agua y se colocaron 1.861 g de EDTA, se aforó a 10 mL de volumen final con agua. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 15 psi de presión.

Amortiguador TBE 1X.

Materiales:

10.8 g de Trisbase (Sigma-Aldrich, cat: T6066-5K).

6.875 g de Ácido bórico (J. T. Baker, cat. 8401).

4 mL de solución de EDTA 0.5 M (pH 8).

Agua MQ cbp

Procedimiento:

Para preparar 1 L, se disolvieron 10.8 g de tris base, 6.875 g de ácido bórico, 4 mL de EDTA 0.5 M (pH 8.0) en cbp 1 L de agua grado MilliQ.

Bromuro de etidio 10 mg/mL.

Materiales:

Bromuro de etidio (E-8751, Sigma-Aldrich).

Agua destilada cbp 5 mL.

Procedimiento:

Para preparar 10 mL, se disolvieron 100 mg de bromuro de etidio en 10 mL de agua destilada y se almacenó protegido de la luz a temperatura ambiente.

9.7. Cinéticas de crecimiento de células C6/36 en adherencia.

Para caracterizar la línea celular C6/36 se realizaron tres cinéticas de crecimiento.

Material biológico:

Células clon C6/36 *Ae. albopictus* CRL-1660, ATCC®.

Suero fetal bovino (BY productos, cat: 90020).

Material:

Medio EMEM (ATCC®, cat: 30-2003).

PBS estéril.

42 Corning® 25 cm² Cell Culture Flaks con 0.2 µm Vent Cap, REF 431463.

Microtubos de 1.5 mL (AXYGEN, cat: MCT-150-C).

42 Cell Scraper estéril (Corning®, cat 3010).

Cámara de Neubauer (Hausser Scientific).

Azul de tripano.

Equipo:

Campana de flujo laminar clase II tipo A/B3 (NUAIRE® Modelo: NU-1425-400).

Microscopio óptico invertido Eclipse TE300, NIKON.

Multisizer™ 3 Coulter Counter. Beckman Coulter.

Procedimiento:

Se sembraron 0.5×10^6 células/mL en 14 frascos T25 con un volumen total de 6 mL de medio de cultivo EMEM suplementado con 5% de SFB. Se sembraron 14 frascos de los cuales se utilizó 1 cada 12 horas para la recolección del sobrenadante el cual se almacenó en microtubos. La monocapa celular se lavó con 6 mL de PBS estéril y se desprendió suavemente con Cell Scraper. Las células se resuspendieron mediante pipeteo para luego tomar una muestra y realizar el conteo celular por cámara de Neubauer y Coulter Counter. Con los datos obtenidos se determinó en que intervalo de tiempo el cultivo se presentó crecimiento exponencial, con base en esto se calculó la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación. Se realizó una gráfica, en donde el eje X representó el tiempo de crecimiento en horas y el eje Y representó el logaritmo natural de la concentración celular (\ln) determinada en cada tiempo de muestreo de la cinética de crecimiento. A partir de la gráfica obtenida se calculó el coeficiente de correlación (R^2), para identificar la fase de crecimiento exponencial (línea con el mayor R^2), una vez identificada la fase exponencial se calculó la ecuación de la recta. En base a esta ecuación se determinó que la pendiente es equivalente a μ (velocidad específica de crecimiento) de la línea celular.

El tiempo de duplicación (t_d) se determinó a partir de la ecuación:

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d}$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento, $\ln 2$ equivale al logaritmo natural de 2 y t_d es igual al tiempo de duplicación.

A partir de esta ecuación se despeja el tiempo de duplicación, por lo que se obtiene:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

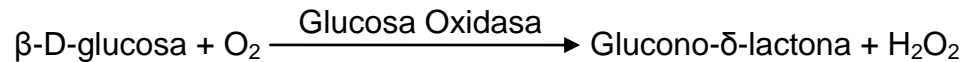
9.8. Determinación de metabolitos.

Los sustratos consumidos y metabolitos producidos por las células en cada tiempo de muestreo de las cinéticas de crecimiento y de infección, se determinaron por medio del analizador bioquímico Yellow Springs Instrument (YSI) 2900.

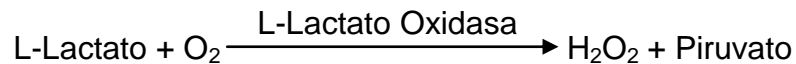
Este analizador bioquímico funciona mediante una sonda enzimática que contiene una enzima inmovilizada (particular para cada metabolito), esta sonda está constituida por 3 capas donde se fija la enzima en la capa media. La cara de la sonda, cubierta por la membrana, se sitúa en un módulo de muestra lleno de solución amortiguadora en el que se inyecta la muestra a analizar. Parte del sustrato se difunde por la membrana y cuando se pone en contacto con la enzima oxidasa inmovilizada, se oxida rápidamente, produciendo peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno, a su vez, se oxida en el ánodo de platino, lo que genera electrones. Se alcanza un equilibrio dinámico cuando la velocidad de producción de H_2O_2 y la velocidad a la que el H_2O_2 sale de la capa enzimática inmovilizada son constantes y se indica mediante una respuesta estable. El flujo de electrones es linealmente proporcional a la concentración de H_2O_2 en el estado estacionario y, por lo tanto, a la concentración del sustrato.

Las reacciones que se llevan a cabo para cada metabolito se muestran a continuación, así como la enzima involucrada:

GLUCOSA.

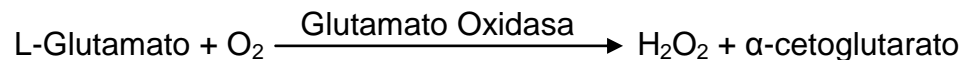
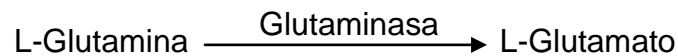


LACTATO.

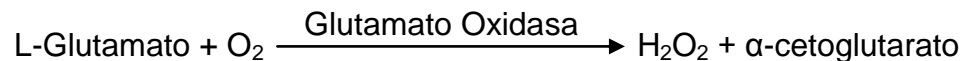


GLUTAMINA. Para cuantificar glutamina se requiere la acción de dos enzimas: glutaminasa y glutamato oxidasa. Se lleva a cabo una cadena de reacciones y la cantidad de peróxido de hidrógeno que se libera en la última reacción es directamente proporcional a la cantidad de glutamina, las reacciones indicadas se describen a continuación.

REACCIONES:

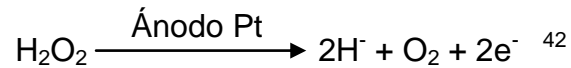


GLUTAMATO.



AMONIO. La lectura de la cantidad de amonio contenida en la muestra se realiza directamente en una solución con un Electrodo Selectivo de Iones.

Una vez que se llevan a cabo las reacciones necesarias para cada metabolito, se libera peróxido de hidrógeno como producto general, que al entrar en contacto con el ánodo de platino ocurre la siguiente reacción:



Material biológico:

Sobrenadante de células C6/36 sin infectar e infectadas con DENV.

Equipo:

Centrífuga (Eppendorf 5418).

Campana de flujo laminar clase II tipo A/B3 (NUAIRE® Modelo: NU-1425-400).

Analizador bioquímico (Yellow Springs Instrument, YSI 2900).

Procedimiento:

Para realizar la cuantificación de los metabolitos, las muestras colectadas se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 rpm, para eliminar los restos celulares. Posteriormente, se tomaron 200 µL de sobrenadante el cual se leyó automáticamente en el analizador bioquímico⁴².

Una vez que se realizó la cuantificación de los metabolitos del medio de cultivo, se determinó el rendimiento y velocidad de consumo de glucosa y glutamina. Y el rendimiento y velocidad de producción de lactato, amonio y glutamato. Los valores de la fase exponencial de crecimiento se utilizaron para realizar los cálculos, la concentración inicial fue la concentración del primer tiempo de la fase exponencial y

la concentración final fue la concentración del último tiempo de la fase exponencial. A continuación de muestran las fórmulas que se utilizaron para cada metabolito:

Rendimientos de consumo:

$$Y \frac{\text{células}}{\text{glucosa}} = \frac{[\text{células finales}] - [\text{células iniciales}]}{[\text{glucosa inicial}] - [\text{glucosa final}]} = \frac{\text{células} \times 10^6}{\mu\text{mol}}$$

$$Y \frac{\text{células}}{\text{glutamina}} = \frac{[\text{células finales}] - [\text{células iniciales}]}{[\text{glutamina inicial}] - [\text{glutamina final}]} = \frac{\text{células} \times 10^6}{\mu\text{mol}}$$

Rendimientos de producción:

$$Y \frac{\text{lactato}}{\text{células}} = \frac{[\text{lactato inicial}] - [\text{lactato final}]}{[\text{células finales}] - [\text{células iniciales}]} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{células} \times 10^6}$$

$$Y \frac{\text{glutamato}}{\text{células}} = \frac{[\text{glutamato inicial}] - [\text{glutamato final}]}{[\text{células finales}] - [\text{células iniciales}]} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{células} \times 10^6}$$

$$Y \frac{\text{amonio}}{\text{células}} = \frac{[\text{amonio inicial}] - [\text{amonio final}]}{[\text{células finales}] - [\text{células iniciales}]} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{células} \times 10^6}$$

9.9. Propagación y mantenimiento del virus en ratones lactantes.

La propagación y mantenimiento de cepas de DENV se realizó mediante la inoculación del DENV en el cerebro de ratones lactantes cepa CD1 entre el segundo y tercer día de nacidos.

Material biológico:

60 – 70 ratones lactantes.

Material:

Solución CS Pisa, Cloruro de Sodio 0.9%.

Jeringa de insulina

Jeringa de 10 mL

Filtro Millex[®]-GS de 0.22 µm (MERCK Millipore Ltd, cat: SLG033SB).

Microtubos de 1.5 mL (AXYGEN, MCT-150-C).

Equipo:

Campana de flujo laminar The Baker Company. Clase II, tipo A/B3. Modelo: SG-250
Serial 60703.

Homogeneizador eléctrico (Motorized Pestle Mixer, ARGOS TECHNOLOGIES).

Sonicador Q700 Sonicator, QSONICA.

Centrífuga Eppendorf[®], modelo 5810R con rotor para microtubos de 1.5 mL.

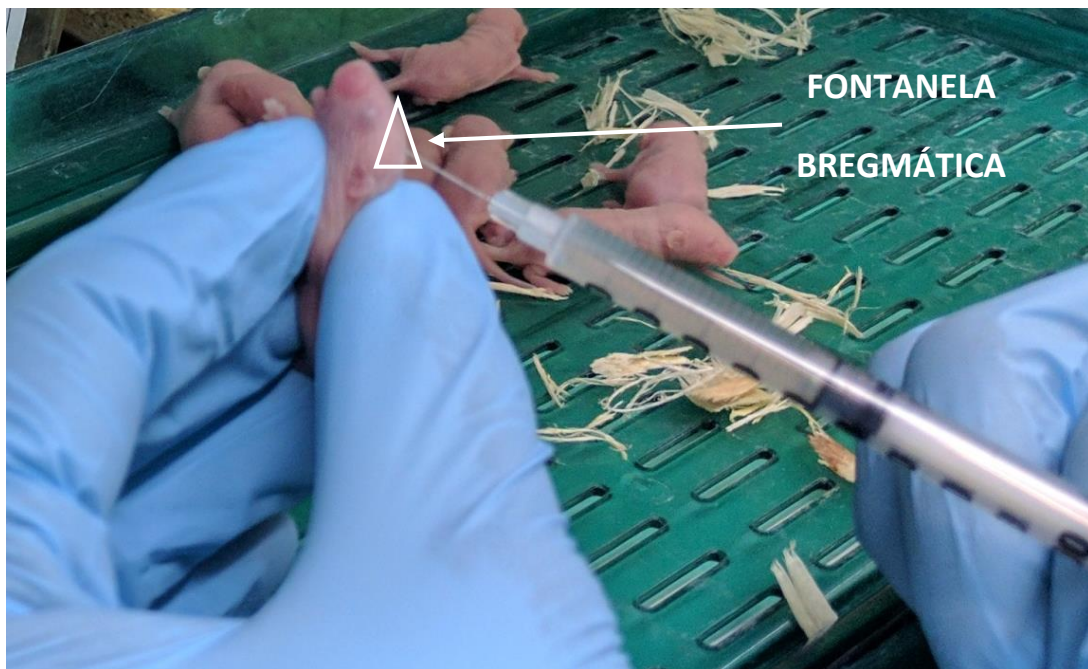
Procedimiento:

Cada ratón se inoculó por vía intracraneal con jeringa para insulina a nivel de la fontanela bregmática con 10 μ L de DENV (Imagen 1). Diariamente, los ratones se revisaron hasta que se detectó la aparición de signos característicos de afectación neurológica como ataxia, movimiento torpe y lento, parálisis parcial o total de las extremidades posteriores^{14, 27, 43}. Una vez que se manifestaron estos síntomas se sacrificó a los animales en ultracongelación a -70°C, donde se conservaron hasta el momento de homogeneizar los cerebros.

Posteriormente, se descongelaron los ratones para extraer el cerebro, mediante succión con una jeringa de 10 mL, como se muestra en la imagen 1. Todos los extractos de cerebros se reunieron y maceraron, utilizando un homogeneizador eléctrico en un microtubo de 1.5 mL, se colocó 1 mL de muestra y se licuó por 3 min. Posteriormente el extracto se sonicó con una intensidad de 30 % de amplitud, durante 3 ciclos de 20 s y se centrifugó en 2 ciclos de 13 000 rpm durante 30 min a 4°C, para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes se colectaron y se filtraron con filtros con tamaño de poro de 0,22 μ m. Las alícuotas del extracto filtrado se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Imagen 1. Inoculación de ratón lactante (cepa CD1) con DENV en el área de la fontanela bregmática.

Imagen tomada exclusivamente para este proyecto.



9.10. Titulación del virus.

Para cuantificar la cantidad de partículas virales viables del Dengue que se producen en modelo murino y en cultivo celular, se utilizó la técnica de plaqueo en células VERO.

Material biológico:

Células VERO.

Muestras de virus dengue.

Suero fetal bovino (BY productos, 90020).

Material:

Medio DMEM 1X ATCC® 30-2003.

Medio DMEM 2X.

Glutamina 200 mM.

Carboximetilcelulosa al 2%.

Formaldehído 1%.

Cristal violeta.

30 Placas de 24 pozos Costar (Corning Incorporated, cat: 3524).

Microtubos de 1.5 mL (AXYGEN, MCT-150-C).

Equipo:

Campana de flujo laminar The Baker Company. Clase II, tipo A/B3. Modelo: SG-250
Serial 60703.

Incubadora INNOVA 4230. Refrigerater Incubator Shaker.

Procedimiento:

Se realizaron 8 diluciones seriadas en base 10 del virus a titular, en medio DMEM suplementado con Glutamina 4mM sin SFB. Se infectaron monocapas confluentes de células VERO crecidas en cajas de cultivo de 24 pozos con 200 μ L de cada dilución del virus por duplicado. Las monocapas se incubaron durante 2 horas en las condiciones de crecimiento de la línea celular. Posteriormente se agregaron 0.5 mL de medio DMEM 1X (10% SFB y 4mM Glutamina) y 1 mL de medio DMEM 2X y Carboximetilcelulosa 2%, proporción 1:1. El sistema se incubo durante 7 días en las condiciones de crecimiento de la línea celular. La combinación de medio DMEM y

Carboximetilcelulosa genera un medio denso que reduce la migración de los virus que logran infectar a las células en monocapa, lo cual ocasiona que los virus infectantes se confinen en un área restringida y al cabo de 7 días de infección se observen espacios en blanco o placas en la monocapa, los cuales luego de fijar y teñir se pueden contar. Después de 7 días, se descartó el medio gastado de las placas de cultivo y se fijaron las células con 1 mL de formaldehído al 1 % por 30 minutos, se retiró la solución y se agregaron 0.5 mL de Cristal violeta permitiendo una incubación durante 30 minutos. Posteriormente se retiró el exceso de colorante y se estimó el título viral, el cual corresponde al número de placas contables en la mayor dilución.

9.11. Tipificación molecular del DENV.

Para realizar la tipificación del virus se realizó el procedimiento descrito por Lanciotti⁴⁴, para el cual fue necesario realizar previamente la purificación del RNA obtenido a partir de cualquier modelo murino.

9.11.1. Purificación de RNA viral.

Este método se basa en la afinidad del RNA de los cuatro serotipos del DENV por las propiedades de unión selectiva a una membrana de sílice con partículas fraccionadas por tamaño⁴⁵ combinado con la velocidad de la microcentrifuga⁴⁶. La muestra se sometió primero a lisis en condiciones altamente desnaturalizantes en presencia de inhibidores de RNasas para asegurar el aislamiento del ARN viral intacto^{45, 46}.

Material biológico:

Muestras de virus dengue.

Material:

QIAamp® Viral RNA Mini Kit (250) (cat: 52906).

Etanol al 70%.

Microtubos de 1.5 mL (AXYGEN, MCT-150-C).

Agua libre de RNasas 1L (Sigma-Aldrich, cat: W4502).

Equipo:

Campana de flujo laminar The Baker Company. Clase II, tipo A/B3. Modelo: SG-250
Serial 60703.

Centrífuga Eppendorf (modelo: 5418).

Fisher Vortex Genie 2™ (cat: 12-812).

Procedimiento:

Para llevar a cabo las extracciones de RNA viral se utilizó el estuche comercial QIAamp® Viral RNA Mini Kit (50) y se siguió el procedimiento Mini Spin Procedure de acuerdo a las recomendaciones del fabricante⁴⁷. El producto obtenido se almacenó a -80°C.

9.11.2. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) del virus dengue.

9.11.2.1. Tipificación del virus dengue (Lanciotti).

Es un ensayo rápido y específico para la detección y tipificación de los virus del dengue. El método se basa en dos etapas: generación de una copia de ADNc del genoma de RNA viral por RT y posterior amplificación de este ADNc mediada por la

Taq polimerasa. En la RT se utilizan cebadores que reconocen una secuencia RNA de la proteína E común a los 4 serotipos, lo que asegura que todas las cepas del virus se amplifiquen en la reacción de amplificación de la primera ronda. La especificidad del ensayo se basa en la capacidad de los cebadores específicos de tipo utilizados en la RT, para reconocer las secuencias de RNA únicas para cada tipo de virus dengue⁴⁴.

Materiales biológicos:

Muestras de virus dengue.

Materiales:

5XQ5 Reaction Buffer

dNTP's (10mM)

Primer Forward D1

Template DNA

Enzima Q5 High Fidelity DNA Polymerase, New England Bio Labs Inc.

5XQ5 High GC Enhancer

Agua libre RNAsas

Microtubos de 1.5 mL, MCT-150-C, AXYGEN.

Equipos:

Termociclador Corbett Research CG1-96.

RT de Lanciotti. Se mezclaron en un microtubo de 0.6 mL los reactivos en la proporción que indica la tabla 1 y se procedió en un termociclador programado con los ciclos indicados en la tabla 2.

Tabla 1. Proporción de reactivos para el procedimiento de retrotranscripción de Lanciotti.

REACTIVO	VOLUMEN (μ L)
5XQ5 Reaction Buffer	10.0
dNTP's (10 mM)	1.0
Primer Foward D1	2.5
Template DNA (10 mM)	2.0
Q5 High Fidelity DNA Polymerase	0.5
5XQ5 High GC Enhancer	10.0
H ₂ O	24.0
Volume total:	50.0

Tabla 2. Condiciones para el procedimiento de retrotranscripción de Lanciotti.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
98	4	1
98	30	
65	1	35
72	1	
72	10	1
10 (HOLD)	60	1

PCR de Lanciotti. Se mezclaron en un microtubo de 0.2 mL los reactivos en la proporción que indica la tabla 3, una vez obtenido el producto de la RT-Lanciotti se añadió a cada tubo obtenido 50 μ L de la mezcla realizada y se procedió en un termociclador programado con los ciclos indicados en la tabla 4.

Tabla 3. Proporción de reactivos para el procedimiento de PCR de Lanciotti.

REACTIVO	VOLUMEN (μ L)
5XQ5 Reaction Buffer	10.0
dNTP's (10 mM)	1.0
Primer D1	2.5
Primer TS1	2.5
Primer TS2	2.5
Primer TS3	2.5
Primer TS4	2.5
DNA	2.0
Q5 High Fidelity DNA Polymerase	0.5
5XQ5 High GC Enhancer	10.0

H ₂ O	14.0
Volumen total:	50.0

Tabla 4. Condiciones para el procedimiento de PCR de Lanciotti.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	CICLOS
98	4	1
98	30	
55	1	35
72	1	
72	10	1
10 (Hold)	60	1

Se visualizó el producto obtenido por medio de un gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio.

9.11.2.2. Preparación de geles de agarosa.

Material biológico:

Muestras amplificadas producto de la tipificación de Lanciotti.

Material:

Agarosa al 1%.

Solución Amortiguadora TBE 1X.

Bromuro de etidio.

Buffer de carga, 6X DNA Loading Dye, Thermo Scientific.

Marcador de peso molecular, Gene Ruler 1Kb DNA Ladder, Thermo Scientific.

1 Tubo Falcón de 50 mL

Bandeja de gel UVT con peine de 8 pozos

Equipo:

Cámara de corrida Owl Easy Cast B2 Mini Gel Electrophoresis Systems, Thermo Fisher Scientific.

Fotodocumentador, Chemi Doc™ XRS+ Imager.

Se preparó una solución de Agarosa al 1%, diluida 1:1 con solución amortiguadora TBE, Agua destilada, la cual se disuelve con calor y se le adicionaron 5 μ L de Bromuro de Etidio, por cada 20 mL de agarosa 1%. La mezcla se homogeneizó y se vació uniformemente sobre una bandeja de gel UVT con peine de 8 pozos. Una vez solidificado, se introdujo el gel en la cámara de corrida, se cubrió el gel completamente con TBE 1X. La muestra se preparó mezclando 5 μ L de muestra y 1 μ L de amortiguador de carga. Se destinó un carril para cargar el volumen total de cada muestra, en un pozo del extremo se cargaron 2 μ L de marcador de peso molecular de 10 000 pb. Los geles se corrieron a corriente constante de 100 V durante 30 min y se visualizaron en un fotodocumentador.

9.12. Cinéticas de infección de células C6/36 en adherencia con DENV a MOI 0.05 UFP/ML.

Para caracterizar la línea celular C6/36 en el contexto de una infección con Dengue, se realizaron tres cinéticas de infección, como se describe a continuación.

Material biológico:

Células clon C6/36 *Ae. albopictus* CRL-1660, ATCC®.

Virus dengue.

Suero fetal bovino 90020 BY productos.

Material:

3 Corning® 75 cm² Cell Culture Flaks con 0.2 µm Vent Cap (cat: 431464U).

Medio EMEM (ATCC®, cat: 30-2003).

Microtubos de 1.5 mL (AXYGEN, MCT-150-C).

Equipos:

Campana de flujo laminar The Baker Company. Clase II, tipo A/B3. Modelo: SG-250 Serial 60703.

Incubadora INNOVA 4230. Refrigerater Incubator Shaker.

Procedimiento:

Se sembraron 35.5×10^6 células totales en un frasco T75. Una vez adheridas las células, se descartó el medio gastado y se realizó la infección con DENV proveniente del extracto de cerebro de ratón a un MOI de 0.05 en 3 mL de medio EMEM sin SFB. La infección se llevó a cabo durante 2h en las condiciones de crecimiento de la línea celular. Una vez pasado el tiempo de infección se adicionaron 15 mL de medio de cultivo EMEM (suplementado con 5% de SFB), para un volumen final de 18 mL. A partir de este punto se tomó muestra del sobrenadante (0.7 mL) cada 12 horas durante 7 días, el cual se almacenó en microtubos en alícuotas a -70°C , hasta el momento de su procesamiento.

9.13. Efecto citopático.

Material biológico:

Células clon C6/36 *Ae. albopictus* CRL-1660, ATCC® infectadas con DENV4.

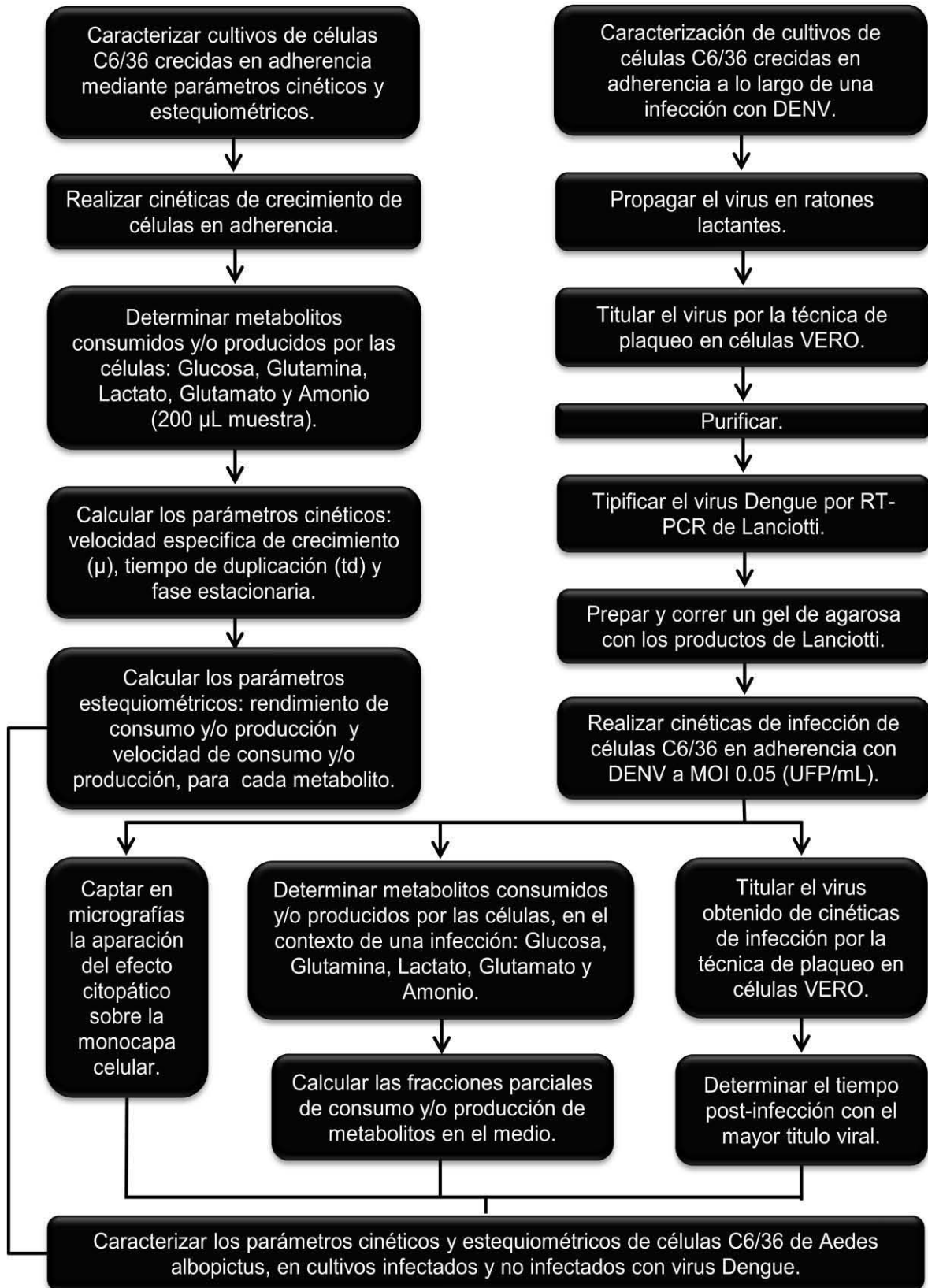
Equipos:

Microscopio óptico invertido Eclipse TE300, NIKON.

Procedimiento:

En cada punto de muestreo se tomaron fotos de la monocapa infectada en microscopio óptico invertido, para monitorear la aparición del efecto citopático a lo largo de la infección.

10. DIAGRAMA DE FLUJO.



11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para las cinéticas de crecimiento e infección, determinación de metabolitos y titulación por plaqueo se realizaron tres replicas independientes, para las cuales se determinaron los parámetros estadísticos: promedio (\bar{x}), desviación estándar (σ) y coeficiente de variación (CV). Para determinar si existe diferencia significativa o no entre los títulos virales producidos en las cinéticas de infección, se realizó la prueba con F calculada para los valores más cercanos.

12. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

ACTIVIDAD	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5	MES 6	MES 7	MES 8	MES 9	MES 10	MES 11	MES 12
Revisión bibliográfica.	X	X										
Planteamiento del problema.	X	X										
Diseño de investigación.	X	X										
Elaboración del protocolo de tesis.	X	X										
Medios de cultivo.			X		X		X		X		X	
Cultivos celulares.			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Descongelación de células.			X					X				
Congelación de células.							X				X	
Determinación de la viabilidad celular y concentración.			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Preparación de soluciones.			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cinéticas de crecimiento de células C6/36 en adherencia.					X	X	X					
Determinación de metabolitos.								X			X	
Propagación y mantenimiento del virus en ratones lactantes.					X	X	X	X	X	X		
Titulación del virus.									X	X	X	X
Purificación del RNA viral.						X			X			
Transcripción reversa y reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) del virus dengue.						X			X			
Preparación de geles de agarosa.						X			X			
Cinéticas de infección de células C6/36 en adherencia con DENV a MOI 0.05.									X	X		
Efecto citopático.									X	X		
Elaboración del informe final.											X	X

13. RESULTADOS.

13.1. Caracterización de cultivos de células C6/36 crecidas en adherencia, mediante parámetros cinéticos y estequiométricos.

13.1.1. Determinación de parámetros cinéticos y estequiométricos.

Las cinéticas de crecimiento de la línea celular C6/36 de *Ae. albopictus* en adherencia fueron realizadas para determinar la velocidad específica de crecimiento (μ), el tiempo de duplicación (td) y la fase de crecimiento exponencial. Los valores correspondientes para cada parámetro son los mostrados en la tabla 5.

Tabla 5. Parámetros cinéticos calculados a partir de cinéticas de crecimiento de células C6/36.

Fase exponencial	24-72 h
Velocidad específica de crecimiento (μ)	0.022 h ⁻¹
Tiempo de duplicación (td)	31.5 h

En la figura 4A se muestran los valores promedio de concentración de células viables, la concentración celular a las 0 h de cultivo fue de $0.14 \pm 0.01 \times 10^6$ células/mL, la fase de crecimiento exponencial determinada se encuentra entre las 24 a 72 h de cultivo, en la cual las células aumentan de una concentración de $0.53 \pm 0.12 \times 10^6$ células/mL a $1.41 \pm 0.14 \times 10^6$ células/mL. Posterior a la fase de crecimiento exponencial se observa un crecimiento celular que no se adapta a un modelo de crecimiento puesto que las barras de error se empalman en los siguientes tiempos determinados y existen aumentos y decrementos en la concentración celular.

Una vez que fueron determinadas las concentraciones de metabolitos consumidos y/o producidos en el medio de cultivo de las cinéticas de crecimiento, se calcularon los valores para el rendimiento y velocidad de consumo de glucosa y lactato, al igual que el rendimiento y velocidad de consumo y/o producción de lactato, glutamato y amonio.

Tabla 6. Parámetros cinéticos y estequiométricos determinados para células C6/36 crecidas en adherencia en fase exponencial, obtenidos a partir de metabolitos cuantificados con YSI 2900, en cinéticas de crecimiento.

METABOLITO	Y (χ / metabolito) (células $\times 10^6$ / μmol)	q (χ / metabolito) (μmol / células $\times 10^6$ x h)
Glucosa	1.2304 \pm 0.4766	0.0202 \pm 0.0091
Glutamina	2.1414 \pm 0.7254	0.0111 \pm 0.0036
METABOLITO	Y (metabolito / χ) (μmol / células $\times 10^6$)	q (χ / metabolito) (células $\times 10^6$ / μmol x h)
Lactato	0.0884 \pm 0.0279	0.0019 \pm 0.0006
Glutamato	0.0024 \pm 0.0042	0.0001 \pm 0.0001
Amonio	0.7831 \pm 1.0465	0.0172 \pm 0.0230

Y= Rendimiento de consumo y/o producción, q= Velocidad de consumo y/o producción, X= biomasa.

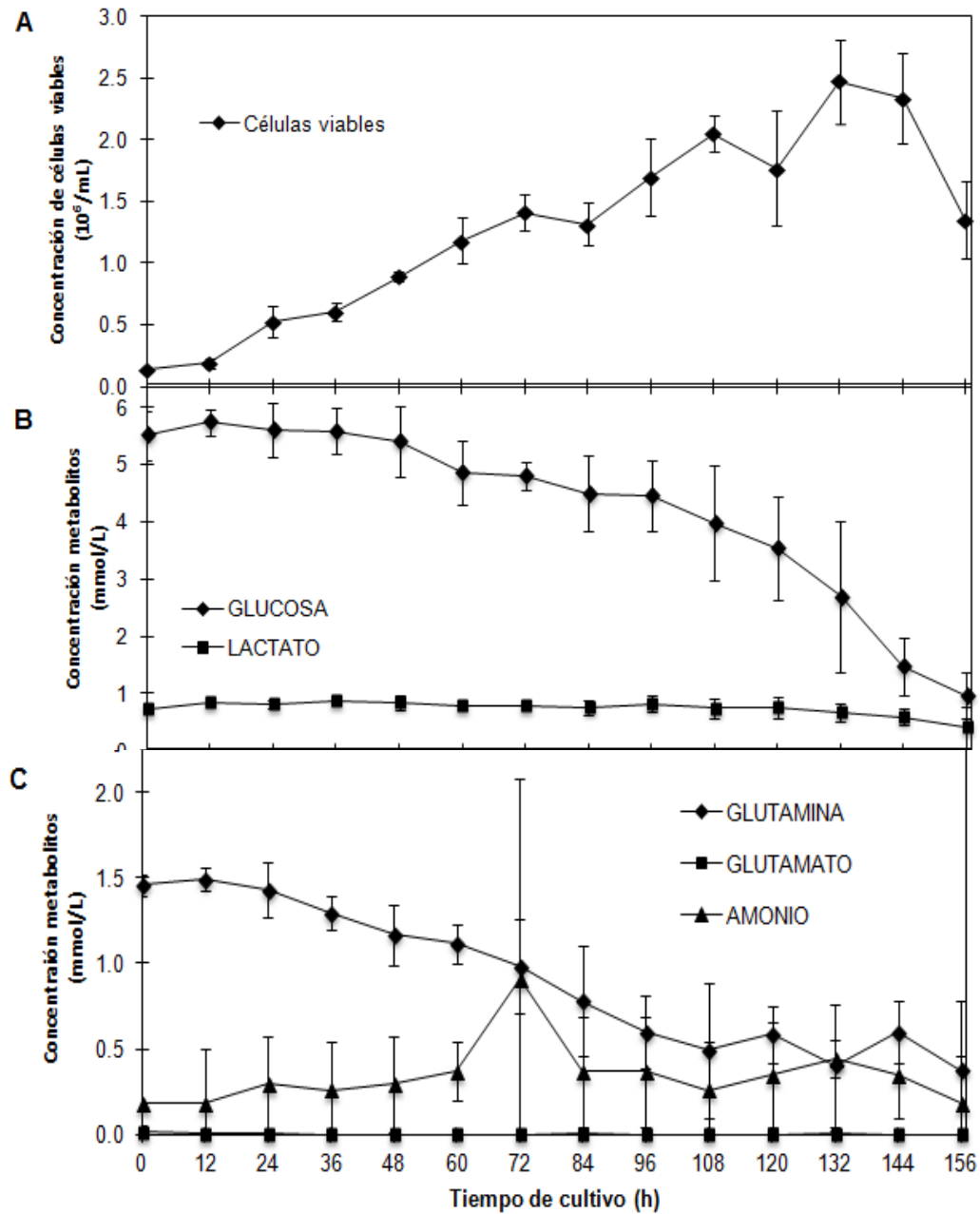


Figura 4. A. Cinética de crecimiento de células C6/36 viables en función del tiempo. B. Consumo de glucosa y producción de lactato a lo largo del tiempo de cultivo. C. Consumo de glutamina y producción de glutamato y amonio a lo largo del tiempo de cultivo. Barras de error equivalentes a la desviación estándar de 3 muestras independientes.

13.1.2. Determinación de metabolitos en el medio de cultivo.

Se cuantificaron los metabolitos glucosa, glutamina, lactato, glutamato y amonio.

Estas determinaciones son importantes ya que algunos de los metabolitos son esenciales para el crecimiento y mantenimiento de la célula (glucosa y glutamina) y otros pueden ser tóxicos a una alta concentración (lactato y amonio).

En la figura 4B se observa el consumo de glucosa y la producción de lactato, a lo largo de 156 horas de cultivo. La glucosa es un metabolito fundamental para el crecimiento de la célula, formación de estructuras y producción de energía, por otra parte el lactato es un metabolito desfavorable para el crecimiento celular, ya que algunas células son afectadas a ciertas concentraciones⁴⁸. La glucosa inicial fue de 5.51 ± 0.43 mmol/L y se consumió a lo largo del tiempo, la concentración final de glucosa fue 0.49 ± 0.42 mmol/L. Con respecto al lactato, para esta línea celular se observa que la concentración nunca sobrepasó 1 mmol/L en las de 156 horas de cultivo, esto concuerda con lo ya reportado para otras líneas celulares de insecto, ya que se sabe que éstas no producen lactato en altas concentraciones, en comparación con células de mamífero⁴⁸.

En la figura 4C se muestra el consumo de glutamina y la producción de glutamato y amonio. La glutamina es un aminoácido importante, porque sirve para la síntesis de proteínas y bases púricas y pirimídicas³⁹, ya que es la principal fuente de nitrógeno. El glutamato y amonio son productos de la degradación que sufre la glutamina al descomponerse, aunque también se pueden formar por otras vías. Se observa que la glutamina tiene un valor inicial de 1.46 ± 0.06 mmol/L y finaliza en 0.29 ± 0.03 mmol/L a las 156 horas de cultivo. El glutamato se mantuvo con

tendencia a cero a lo largo de toda la cinética. Con respecto al amonio se detectó que en el tiempo 0 h la concentración de amonio fue igual a 0.19 ± 0.32 mmol/L, conforme el tiempo de cultivo avanzó las concentraciones de amonio se incrementaron y alcanzaron una concentración máxima de 0.90 ± 1.16 mmol/L a las 72 h de cultivo, posteriormente la concentración de amonio disminuyó, al finalizar la cinética la concentración de amonio en medio de cultivo fue 0.29 ± 0.25 mmol/L. Cabe destacar que la concentración máxima de amonio coincide con el periodo de mayor consumo de glutamina (0-72 h).

13.2. Caracterización de cultivos de células C6/36 crecidas en adherencia a lo largo de una infección con DENV.

13.2.1. Tipificación del virus dengue.

Se realizó la tipificación del virus Dengue mediante la prueba de Lanciotti⁴⁴ como una prueba de control de calidad para identificar el serotipo del virus utilizado. En la figura 5 se muestra el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, en el cual se corrieron las muestras resultado de la primera y segunda ronda de amplificación. Se detectó en los carriles 2, 3, 4, 5 y 8, el producto amplificado en la primera ronda que tiene un tamaño de 511 pb, en los carriles 6 y 7 se observa que la banda esperada no aparece. En los carriles 11-16 se detectaron los productos amplificados en la segunda ronda, se observa en el carril 11 tres productos amplificados, uno de ellos es el esperado para el serotipo 4 con un tamaño de 392 pb. En los carriles 12 y 13 se observan la banda específica del serotipo 2 a 119 pb, pero también se observan otras bandas desconocidas de aproximadamente 500 pb, en el carril 15 se colocó el serotipo 1, se observan 6 bandas amplificadas, el

producto esperado específico es de 482 pb, este tamaño pertenece a una de las bandas.

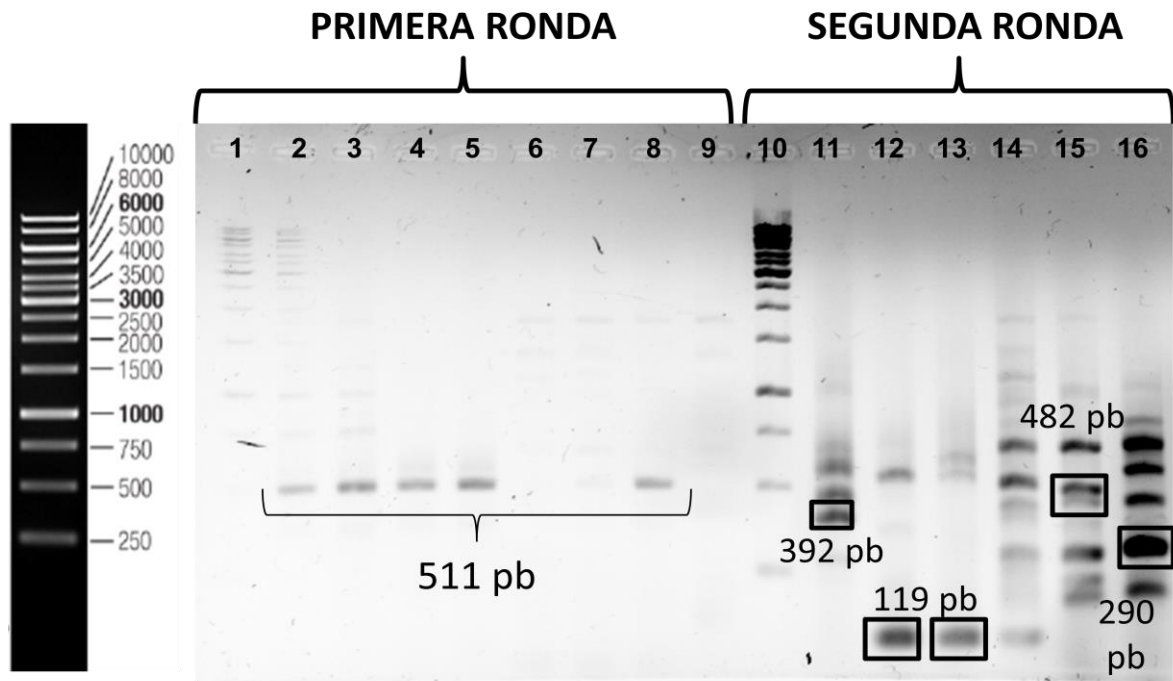


Figura 5. Prueba de Lanciotti. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio, las muestras cargadas son producto de una primera y segunda ronda de PCR de Lanciotti. Carril 1 y 10: Marcador de peso molecular. **PRIMERA RONDA.** Carril 2 y 3: DENV4, carril 4 y 5: DENV2, carril 6: ZIKV, carril 7: DENV1, carril 8: DENV3, carril 9: Blanco. **SEGUNDA RONDA.** Carril 11: DENV4, carril 12 y 13: DENV 2, carril 14: ZIKV, carril 15: DENV1, carril 16: DENV 3. El producto esperado para la primera ronda es de 511 pb, los productos esperados para la segunda ronda son: DENV1 482 pb, DENV2 119 pb, DENV3 290 pb, DENV4 392 pb.

Finalmente se observa en el carril 16 el serotipo 3, en este carril también se observan 6 bandas amplificadas, el tamaño esperado para el producto amplificado fue de 290 pb, se observa en un tamaño aproximado una banda muy concentrada que podría ser el producto esperado, pero no se resolvió de forma óptima en el

gel. En esta prueba también se amplificó una muestra del virus Zika, se observa en el carril 6 que el producto esperado no fue amplificado para este virus, en contraste en el carril 14 se observan varias bandas, producto de amplificaciones con los cebadores específicos para los serotipos del virus Dengue, probablemente regiones comunes en ambos virus o productos espurios.

13.2.2. Cinéticas de infección de células C6/36 en adherencia con DENV a MOI 0.05 UFP/mL.

Las cinéticas de infección de células C6/36 en adherencia, se realizaron en frasco T75. Se sembraron 35.5×10^6 células totales, en un volumen total de 18 mL por frasco. A diferencia de las cinéticas de crecimiento en las cinéticas de infección las células no se desprendieron de la monocapa en cada toma de muestra, esto con el fin de observar el progreso del efecto citopático en la monocapa celular. Debido a esto no se determinó el número de células viables y por ende no se calcularon los rendimientos y velocidades de consumo y producción de metabolitos, sin embargo se muestran las fracciones parciales de consumo y producción de metabolitos con respecto al tiempo.

13.2.3. Efecto citopático producido por DENV en células C6/36.

Se muestra en la figura 6A y 6B la monocapa celular sin infectar, ambas micrografías se adquirieron con diferentes objetivos (10x y 40x, respectivamente). Las células sin infectar presentan una morfología redondeada y pequeña, estas células tienen un tamaño que va de los 9 μm a los 11 μm (determinado experimentalmente). En la figura 6C y 6D se muestran los tiempos 0 y 12 hpi respectivamente, en estos tiempos no se observó un cambio físico en la monocapa celular causado por la infección. El primer cambio causado por el

efecto citopático fue visible a las 24 horas post infección (hpi), en la fig. 6E se observaron 3 células redondeadas de mayor tamaño con respecto al resto de las células. A las 36 hpi (figura 6F) se observaron células redondeadas y células aglomeradas, este efecto se incrementó conforme la cinética avanzó a partir de este punto y hasta el final. A las 72 hpi, se detectó la aparición de células gigantes redondeadas, que pareciera tienen diferentes compartimentos, este tipo de células se observaron también en los tiempos posteriores. A las 84 hpi (figura 6J) se puede ver además que algunas células comienzan a desprenderse de la monocapa adherente, en tiempos anteriores se observaron algunas células desprendidas de la monocapa, pero cabe resaltar que este efecto se agravó en este tiempo, en la figura 6J se observan puntos redondos luminosos, estas son las células que se encontraban flotando en el sobrenadante, este efecto aumentó conforme avanza el tiempo de infección. A las 96 hpi se observó un mayor desprendimiento de células de la monocapa y las células que permanecen adheridas se encuentran aglomeradas en su mayoría. A las 108 hpi (figura 6L) se observa una célula gigante multinucleada, células aglomeradas y como ya se mencionó varias células desprendidas de la monocapa, aunque se debe resaltar que solo un porcentaje de células se desprendió de la monocapa, las células que permanecieron adheridas al sustrato estaban completamente aglomeradas.

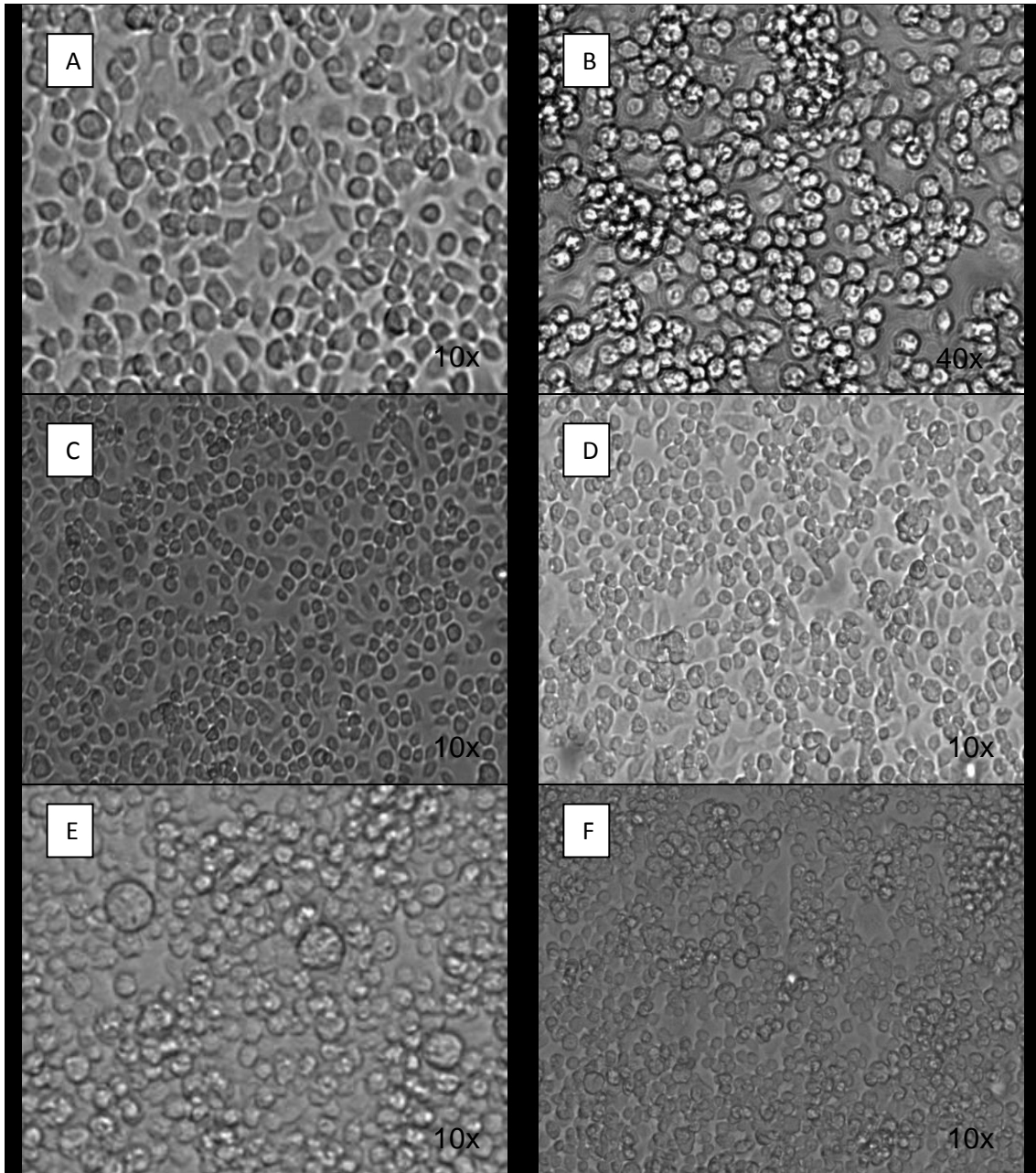


Figura 6. Efecto citopático producido por DENV-4 en células C6/36. Micrografías representativas de células infectadas con DENV MOI 0.05, tomadas en microscopio óptico invertido, que muestran la aparición progresiva del efecto citopático. **A y B)** Células sin infectar. **C)** Células a 0 hpi. **D)** Células a 12 hpi. **E)** Células a 24 hpi. **F)** Células a 36 hpi. Se muestran los cambios morfológicos producidos por el virus sobre la monocapa confluyente.

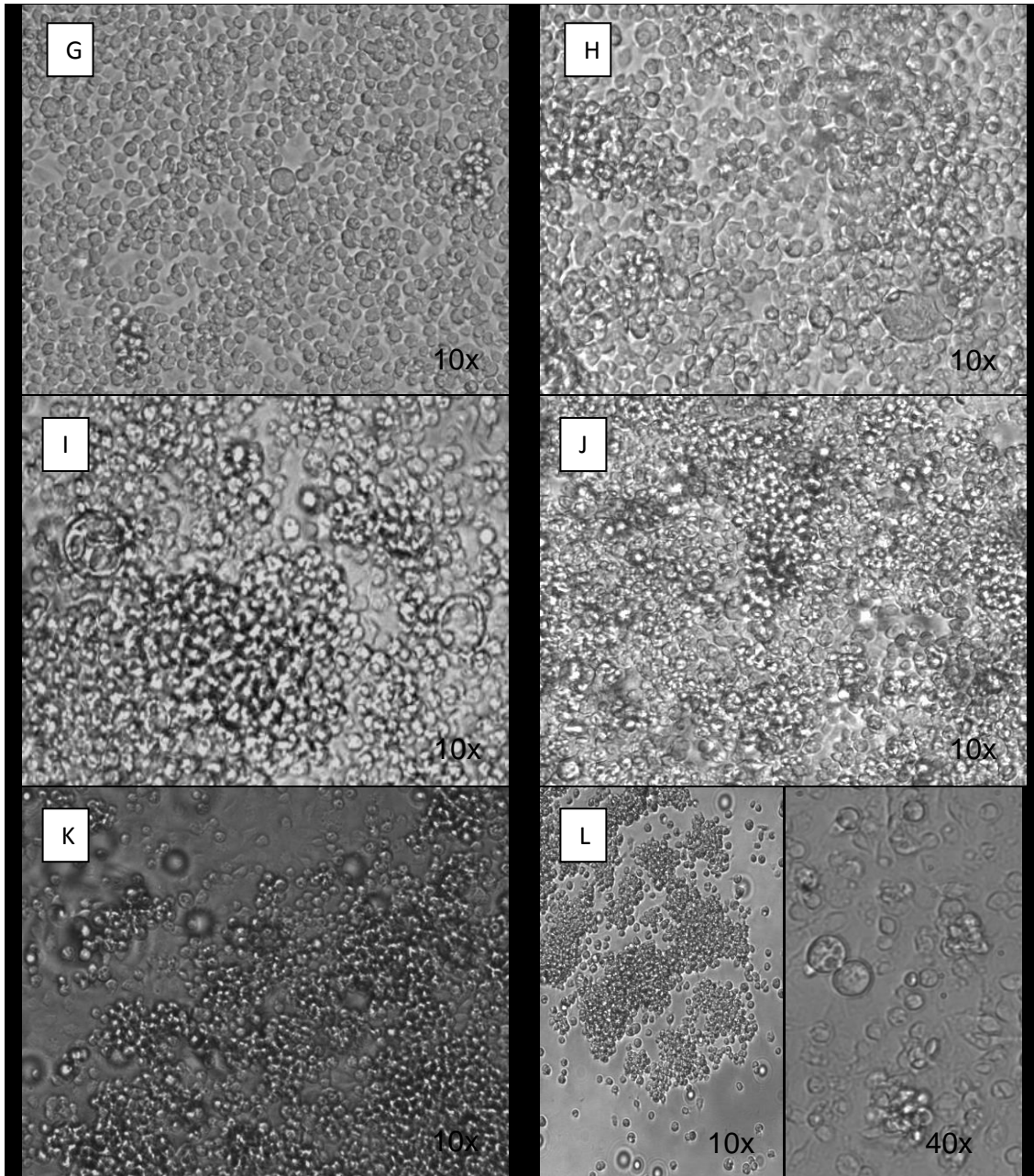


Figura 6 (continuación). Efecto citopático producido por DENV-4 en células C6/36. Micrografías representativas de células infectadas con DENV MOI 0.05, tomadas en microscopio óptico invertido, que muestran la aparición progresiva del efecto citopático. **G)** Células a 48 hpi. **H)** Células a 60 hpi. **I)** Células a 72 hpi, ampliación de imagen. **J)** Células a 84 hpi. **K)** Células a 96 hpi. **L)** Células a 108 hpi. Se muestran los cambios morfológicos producidos por el virus sobre la monocapa confluyente.

13.2.4. Consumo y/o producción de metabolitos en cultivos infectados con DENV a MOI 0.05 UFP/mL.

En la figura 7A se muestra el consumo de glucosa a lo largo del tiempo de infección, la concentración de glucosa inicial fue 5.33 ± 0.16 mmol/L la cual se consumió totalmente durante la infección. La concentración de lactato se mantuvo a lo largo de la infección en niveles menores a 0.1 mmol/L, la máxima concentración se detectó a las 0 hpi y fue de 0.099 ± 0.013 mmol/L. La cantidad de lactato disminuyó conforme progresó la infección.

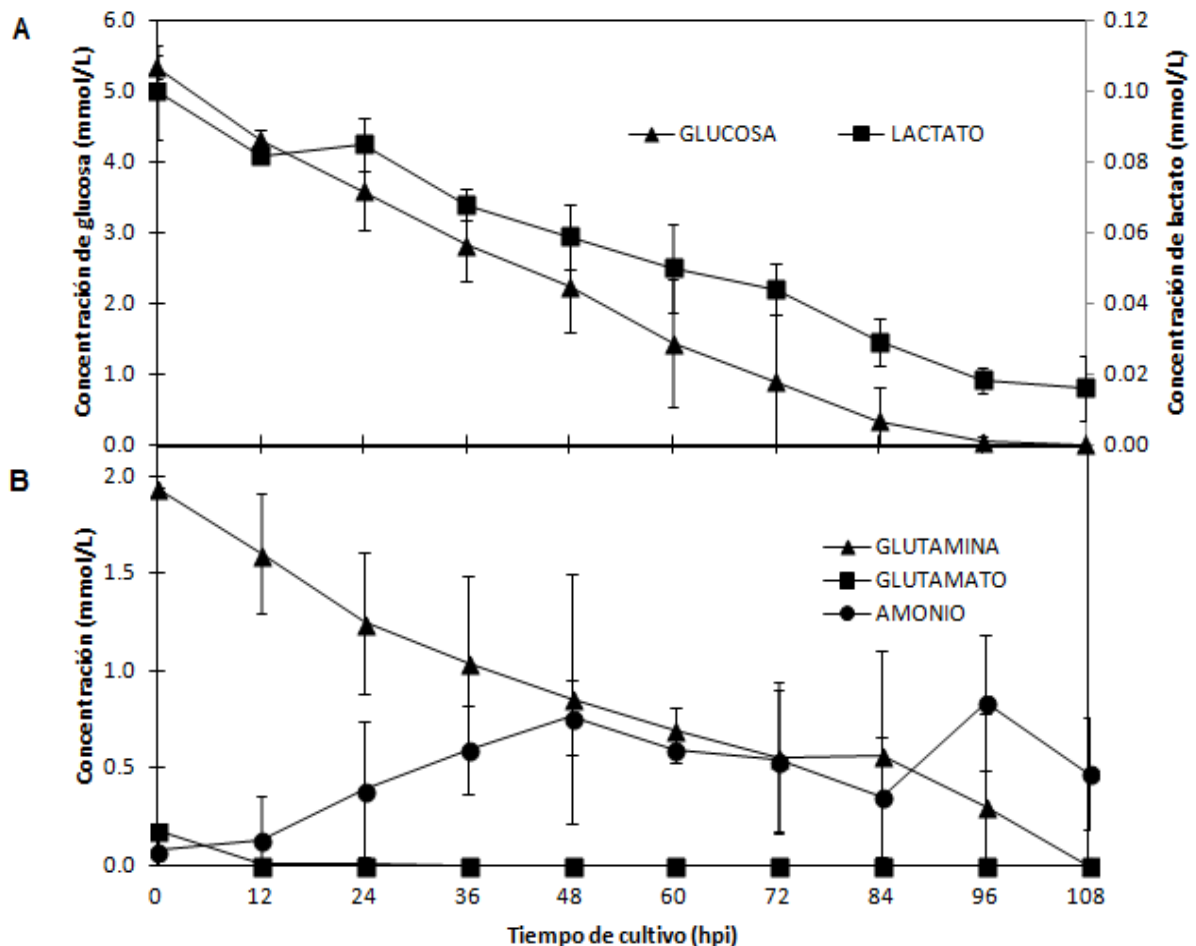


Figura 7. Consumo y producción de metabolitos en cultivos de células C6/36 en adherencia infectadas con DENV-4. A. Consumo de glucosa y consumo y/o producción de lactato a lo largo del tiempo de infección. B. Consumo de glutamina y consumo y/o producción de glutamato y amonio a lo largo de la cinética de infección. Barras de error equivalentes a la desviación estándar de las muestras.

En la figura 7B se observa el consumo de glutamina y el consumo y/o producción de glutamato y amonio. La concentración inicial de glutamina fue de 1.931 ± 0.006 mmol/L, la cual al igual que la de glucosa se consumió en su totalidad. El glutamato se mantuvo con tendencia a cero durante todo el cultivo. El amonio fluctuó entre 0.074 ± 0.08 mmol/L (concentración inicial) y 0.834 ± 0.34 mmol/L (concentración máxima a las 96hpi).

En la tabla 6 se muestran las fracciones parciales de consumo y/o producción de metabolitos en cultivos de células C6/36 infectados con virus dengue a MOI 0.05 UFP/mL. Los valores positivos corresponden al consumo del metabolito en cuestión y los valores negativos corresponden a la formación del metabolito. Estas fracciones parciales tanto de consumo, como de producción se refieren a la concentración determinada en un intervalo de 12 horas. Los metabolitos consumidos son glucosa y glutamato, se puede observar que el consumo de glucosa en los intervalos comprendidos entre 12 y 48 hpi decrece con respecto a la cantidad consumida inicialmente (1 a 12 hpi), posterior a este tiempo el consumo de glucosa por la células se incrementa en el intervalo de 48 a 60 hpi, y decrece posteriormente. El glutamato es un metabolito que se consume de las 0 a las 36 hpi, posteriormente la concentración de glutamato es cero.

Tabla 7. Fracciones parciales de consumo y/o producción de metabolitos en el medio de cultivo con respecto al tiempo (intervalos de 12 horas) en cinéticas de infección de células C6/36 con DENV MOI 0.05. Fracciones obtenidas a partir de metabolitos cuantificados en cinéticas de infección de la línea celular.

TIEMPO (hpi)	METABOLITO (mmol/L)				
	GLUCOSA	LACTATO	GLUTAMINA	GLUTAMATO	AMONIO
0-12	1.0242 ± 0.2136	0.2037 ± 0.1450	0.3333 ± 0.3136	0.1735 ± 0.0105	-0.0556 ± 0.2942*
12-24	0.7256 ± 0.4567	-0.0370 ± 0.0714*	0.3539 ± 0.0829	0.0023 ± 0.0079	-0.2595 ± 0.2507*
24-36	0.7634 ± 0.0790	0.1889 ± 0.0509	0.2100 ± 0.0950	0.0023 ± 0.0040	-0.2039 ± 0.1699*
36-48	0.5747 ± 0.1474	0.1000 ± 0.0619	0.1826 ± 0.2477	0.0000 ± 0.0000	-0.1668 ± 0.2005*
48-60	0.8104 ± 0.2656	0.1000 ± 0.0401	0.1553 ± 0.5284	0.0000 ± 0.0000	0.1668 ± 0.1471
60-72	0.5471 ± 0.2160	0.0667 ± 0.0588	0.1461 ± 0.4041	0.0000 ± 0.0000	0.0556 ± 0.3096
72-84	0.5534 ± 0.5351	0.1630 ± 0.0357	-0.0114 ± 0.2535*	0.0000 ± 0.0000	0.1853 ± 0.1399
84-96	0.2947 ± 0.5104	0.1222 ± 0.0588	0.2603 ± 0.1385	0.0000 ± 0.0000	-0.4819 ± 0.3702*
96-108	0.0383 ± 0.0664	0.0222 ± 0.0676	0.3014 ± 0.4753	0.0000 ± 0.0000	0.3633 ± 0.2693

* NOTA: Los signos negativos corresponden a la formación del metabolito en cuestión, en cierto intervalo de tiempo.

Los metabolitos que se consumieron y se produjeron son glutamina, lactato y amonio. La glutamina se consumió en la mayoría de las fracciones presentadas en la tabla 6 y únicamente se produjo entre las 72-84 hpi. El lactato se consume principalmente y solo se generó en el intervalo de 12 a 24 hpi. En contraste el amonio es el único que se genera y consume intermitentemente a lo largo de la cinética de infección.

13.2.5. Títulos obtenidos de cinéticas de infección de células c6/36 en adherencia con DENV a MOI 0.05 UFP/mL.

En la figura 8 se muestra la titulación de sobrenadantes obtenidos de cultivos de células C6/36 infectados con DENV-4, se muestran las placas representativas para cada tiempo post-infección.

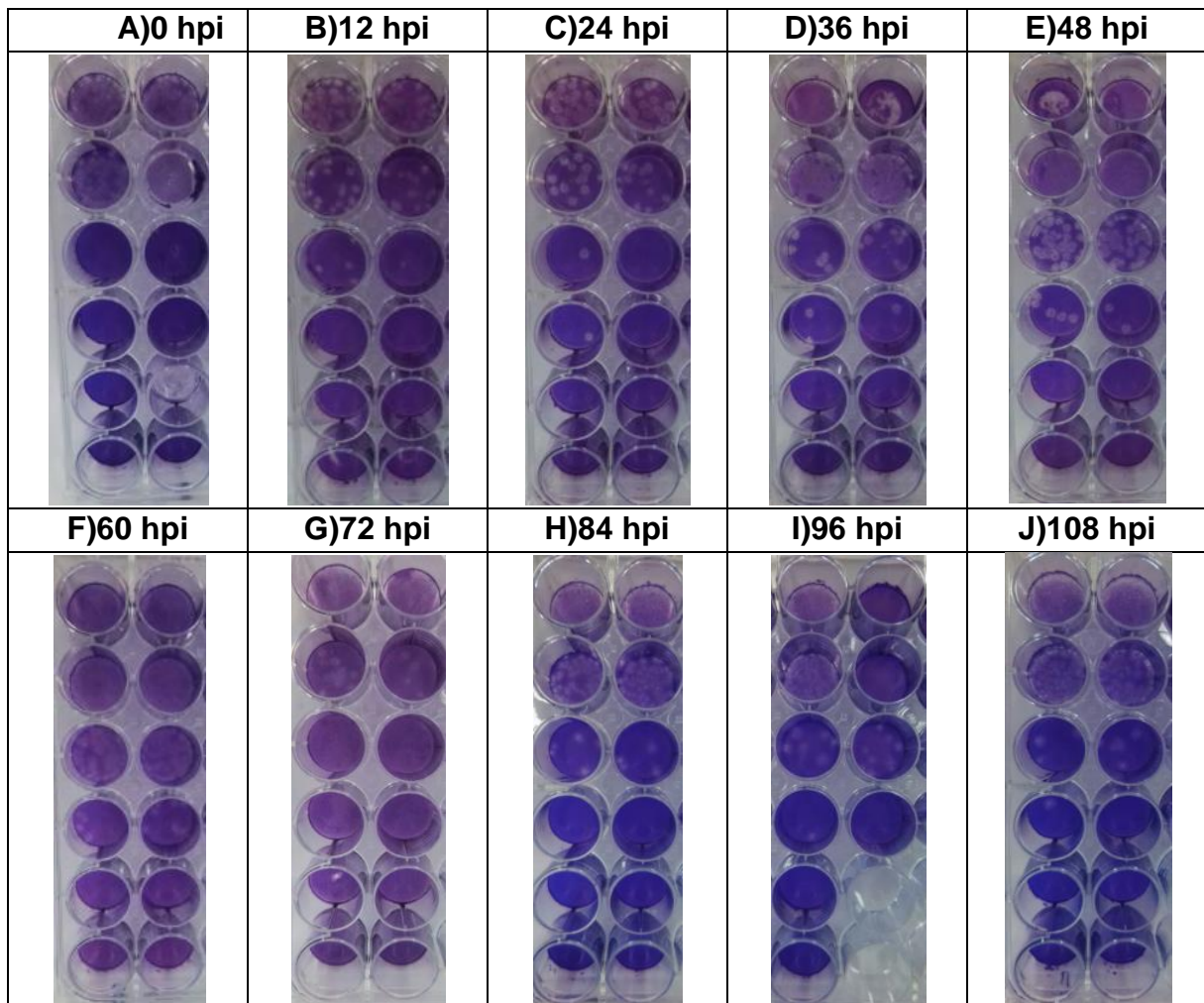


Figura 8. Titulación del DENV4. Placas de células VERO teñidas con cristal violeta y fijadas con formaldehído al 1%. Placas representativas obtenidas a partir de la titulación de sobrenadantes de células C6/36 infectadas, muestreados a diferentes tiempos de infección. A) Sobrenadante 0 hpi B) Sobrenadante 12 hpi C) Sobrenadante 24 hpi D) Sobrenadante 36 hpi E) Sobrenadante 48 hpi F) Sobrenadante 60 hpi G) Sobrenadante 72 hpi H) Sobrenadante 84 hpi I) Sobrenadante 96 hpi J) Sobrenadante 108 hpi. Se observan en todas las placas pequeños círculos sin color que representa las partículas virales viables infecciosas en cada tiempo post-infección.

En la figura 9 se muestra la gráfica de los títulos virales obtenidos de sobrenadantes de células C6/36 en adherencia infectadas con DENV-4 MOI 0.05. El título viral a las 0 hpi fue de 3.3×10^3 UFP/mL y aumentó conforme la infección viral progresó, a las 60 hpi se alcanzó la máxima concentración viral de $4.5 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5$ UFP/mL. Posteriormente, se observó que el título viral disminuye, a las 108 hpi, el título viral determinado fue $2.3 \times 10^4 \pm 1.0 \times 10^4$ UFP/mL.

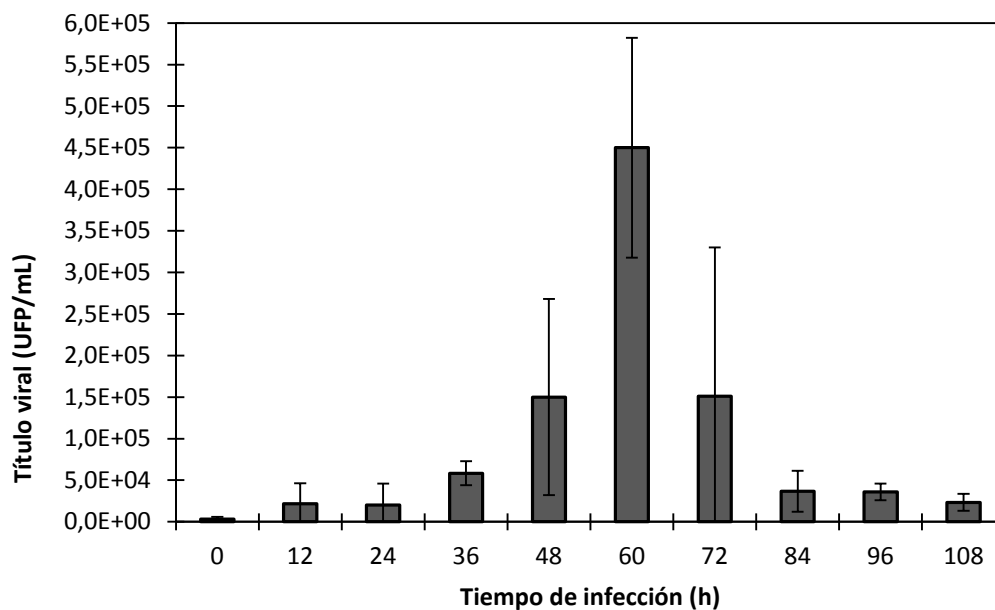


Figura 9. Títulos virales de células C6/36 en adherencia infectadas con DENV-4 MOI 0.05. Grafico obtenido a partir de sobrenadantes infectados titulados en placas de células VERO.

14. DISCUSIÓN.

14.1. Caracterización de cultivos de células C6/36 crecidas en adherencia mediante parámetros cinéticos y estequiométricos.

14.1.1. Determinación de parámetros cinéticos y estequiométricos.

Las células C6/36 son un clon derivado de las células de *Ae. albopictus* (mosquito en fase larvaria), a pesar de ser una de las líneas más utilizadas en infecciones con virus Dengue la información que existe sobre esta línea sin infección es poca

o casi nula. El tiempo de duplicación (td) para la línea celular C6/36 no se ha reportado, como tampoco se reportan otros parámetros cinéticos (μ , Y, q). La Colección Americana de Células y Tejidos (ATCC) especifica que para la línea celular de *Ae. albopictus* (mosquito larva, ATCC® CCL-126™) línea originaria, el tiempo de duplicación de la población es de 26 (no especifica unidades), en este trabajo se determinó que el tiempo de duplicación (td) de la línea celular C6/36 en adherencia con una concentración celular inicial de $0.14 \pm 0.01 \times 10^6$ células/mL es de 31.5 h, en cultivos en adherencia con medio de cultivo EMEM suplementado con 5% de SFB, incubados a 28°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. En estas mismas condiciones la velocidad específica de crecimiento (μ) es 0.022 h^{-1} y se determinó que la fase exponencial ocurre entre las 24 y 72 h de cultivo. Todos estos datos se reportaron en la tabla 5.

En la figura 4A se muestra la cinética de crecimiento de la línea celular, en donde la fase de adaptación se encuentra entre 0 y 24 h, la concentración celular inicial fue de $0.13 \pm 0.001 \times 10^6$ células/mL, a partir de las 24 y hasta las 72 h se presentó crecimiento exponencial. En esta fase de crecimiento se determinó que la concentración celular fue $0.53 \pm 0.12 \times 10^6$ células/mL al inicio de la fase y al finalizar la concentración fue $1.41 \pm 0.14 \times 10^6$ células/mL, obteniéndose un aumento de $0.88 \pm 0.14 \times 10^6$ células/mL, posterior a las 72 h se observó crecimiento celular, sin embargo las barras de error se traslapan entre los siguientes tiempos. La variación entre los triplicados de cada punto de muestreo podrían explicarse por el hecho de que se trata de una línea celular que se cultivó en adherencia, cuya desventaja es que para contabilizar el número de células se

deben despegar mecánicamente, lo que pudiera provocar daño a cierto porcentaje de células y que algunas de estas se queden adheridas al frasco, lo cual puede generar la variabilidad en los puntos determinados.

Con respecto a los rendimientos y velocidades de consumo y/o producción de metabolitos de la línea celular C6/36 (Tabla 6) se determinó que el rendimiento de consumo de glucosa es de $1.23 \pm 0.48 \times 10^6$ células/ μmol de glucosa. Esto significa que en la fase exponencial de crecimiento se requiere 1 μmol de glucosa para formar 1.2 millones de células. La fase de crecimiento exponencial de esta línea celular fue entre las 24 y las 72 h. En la figura 4A se observa que la concentración de células viables a las 24 h de cultivo es de $0.52 \pm 0.12 \times 10^6$ células/mL y a las 72 h el cultivo alcanza una concentración celular de $1.41 \pm 0.14 \times 10^6$. El rendimiento de consumo de glutamina es $2.14 \pm 0.73 \times 10^6$ células/ μmol , esto implica que en crecimiento celular se necesita 1 μmol de glutamina para la formación de $2.14 \pm 0.73 \times 10^6$ células. El rendimiento de glucosa y glutamina son valores relacionados con las funciones vitales que requiere la célula, se debe recordar que el 100% de glucosa y glutamina no se convirtió en biomasa puesto que la célula también debe producir energía para mantener el funcionamiento del metabolismo celular. El rendimiento de producción y consumo de lactato fue de $0.09 \pm 0.03 \mu\text{mol/células} \times 10^6$, esto implica que 1 millón de células producen o consumen 0.09 μmol de lactato, el rendimiento de glutamato fue $0.0024 \pm 0.0042 \mu\text{mol/células} \times 10^6$ y el de amonio fue $0.78 \pm 1.05 \mu\text{mol/células} \times 10^6$.

La velocidad de consumo de glucosa determinada fue $0.0202 \pm 0.0091 \mu\text{mol/células} \times 10^6 \times \text{h}$, este valor implica que 1 millón de células consumen 0.0202

μmol en el intervalo de 1 hora. De igual forma la velocidad de glutamina fue $0.0111 \pm 0.0036 \mu\text{mol}/\text{células} \times 10^6 \times \text{h}$, la velocidad de consumo y/o producción de lactato determinada es igual a $0.0019 \pm 0.0006 \text{ células} \times 10^6 / \mu\text{mol} \times \text{h}$, este valor indica que 1 millón de células producen $0.0019 \mu\text{mol}$ en 1 h, la velocidad del glutamato fue $0.0001 \pm 0.0001 \text{ células} \times 10^6 / \mu\text{mol} \times \text{h}$ y de amonio fue $0.0172 \pm 0.0230 \text{ células} \times 10^6 / \mu\text{mol} \times \text{h}$. Los rendimientos de producción de lactato y glutamato tienen valores bajos, debido a la alta eficiencia del ciclo de los TCA y la incorporación de glutamato en alanina. Cabe resaltar que las velocidades de producción y/o consumo de lactato y glutamato son bajas para ambos metabolitos comparadas con las de glucosa y glutamina.

14.1.2. Determinación de metabolitos en el cultivo celular.

14.1.2.1. Glucosa y lactato.

La glucosa es un metabolito importante ya que sirve para la formación de biomasa celular y obtención de energía. El lactato es un metabolito que se puede formar durante la glucólisis, cuando la cantidad de oxígeno disponible en el cultivo no es suficiente para reoxidar el NADH generado a partir de la glucólisis, el piruvato se reduce para generar lactato y NADH, esta reacción es catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa.

En la figura 4B se muestra el consumo de glucosa, la producción y consumo de lactato. En el intervalo de 0-60 h hay un consumo progresivo de la glucosa, posteriormente entre las 60-96 h se observa una meseta y al final del cultivo se presenta una disminución de la velocidad de consumo. La concentración de glucosa inicial fue de $5.50 \pm 0.42 \text{ mmol/L}$, y a las 156 h de cultivo la concentración

final fue de 0.96 ± 0.40 mmol/L, esto significa que se consumió el 82.5% de la glucosa disponible en el cultivo. En la fase de crecimiento exponencial las células consumieron el 14.6% de la glucosa total. Briegel (1990), menciona que las proteínas y carbohidratos totales están altamente correlacionados con el tamaño del mosquito *Ae. aegypti* y que las hembras de esta especie llevan a cabo lipogénesis a partir de carbohidratos⁴⁹. Se puede deducir que la glucosa consumida por las células C6/36 se aprovechó para el crecimiento celular y la producción de energía.

En un estudio realizado con células de insecto Sf9, realizado por Drews et al, demostró por medio de RMN que en cultivos en suspensión existe la formación de alanina y lactato a partir de glucosa⁵⁰. A través de piruvato glucolítico, el 67% de la alanina total se deriva de la glucosa a través de la glucólisis, se sabe que la glucosa que se utiliza en la glucólisis abastece al ciclo de TCA, por lo cual se puede pensar que la glucosa presente en el medio de cultivo se podría utilizar también para sintetizar alanina⁵⁰.

En contraste con la curva de consumo de glucosa, se observa que los niveles de lactato en el cultivo de células C6/36 se mantienen por debajo de 1 mmol/L a lo largo de toda la cinética de crecimiento, la concentración máxima de lactato se alcanzó a las 36 horas de cultivo y fue 0.87 ± 0.08 mmol/L. En cultivos estáticos (adherencia) de células de insecto Sf9 la curva de consumo y producción de lactato fue similar a una campana, conforme avanza el cultivo la concentración de lactato aumentó, una vez que se agotó la fuente de glucosa se alcanzó la concentración máxima de lactato, posterior a esto, el lactato disminuyó ya que las

células pueden consumir este metabolito y usarlo como fuente de carbono y energía³⁷. Esta curva de consumo y producción de lactato no se observó en los cultivos con las células C6/36.

Las concentraciones de lactato producidos por cultivos de células C6/36 fueron menores a los reportados para otras líneas celulares. En células de mamífero, específicamente para células CHO en cultivo en matraz agitado se reportó una concentración de lactato de 16 mM a los 6 días de cultivo⁴⁸. En cultivos en células de insecto se reportaron valores de lactato de 1.8 mM aproximadamente, para cultivos de células de *Anticarsia gemmatilis* (lepidóptero), manteniéndose la concentración constante a lo largo de 120 horas de cultivo⁵¹. En las células Sf9 se han detectado valores máximos de lactato entre 4.4 - 5.5 mmol/L en cultivos en adherencia y suspensión³⁷.

La concentración de lactato puede incrementar en el cultivo cuando la tensión de oxígeno disuelto disminuye, en el cultivo celular en frasco T (sistema utilizado en este experimento), la concentración de oxígeno disuelto promedio fue del 1.5%⁵², este valor denota una limitación de oxígeno en el sistema, que repercutiría directamente en la concentración de lactato en el medio de cultivo conforme la concentración de glucosa inicial disminuyó⁵². En este trabajo, la concentración de lactato permaneció por debajo de 0.87 ± 0.08 mmol/L a lo largo de todo el cultivo, aun cuando la glucosa se consumió, por lo que es probable que la limitación de oxígeno disuelto no repercutió en la formación de lactato para esta línea celular (figura 3).

También se ha documentado que el lactato puede causar daño en membranas celulares, ácidos nucleicos y proteínas⁵³, en las células de insecto particularmente en células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) cultivadas en adherencia a una concentración de 15 mM de lactato agregado en el medio de cultivo, se detectó una disminución en la concentración celular máxima, atribuido a un cambio en la osmolaridad y a un consumo específico mayor de glucosa³⁷. Los datos obtenidos en este trabajo, sugieren que la concentración de lactato fue muy baja sin sobrepasar los niveles reportados que pueden tener un efecto negativo en el crecimiento en otras líneas de insecto.

14.1.2.2. Concentración de glutamina, glutamato y amonio.

En la figura 4C se muestra el consumo de glutamina y producción de dos metabolitos resultado de la descomposición de la glutamina, en glutamato y amonio. La concentración inicial de glutamina en el cultivo fue de 1.45 ± 0.06 mmol/L, al término de la cinética la cantidad de glutamina fue de 0.37 ± 0.40 mmol/L. El consumo total de glutamina presente en el medio fue el 74.5%, en la fase de crecimiento exponencial que va de las 24 a las 72 h, las células consumieron el 30.8% de la glutamina total. La concentración de glutamato se mantuvo con tendencia a cero a lo largo del cultivo, sin cambio. En la figura 4C se observa que la línea celular C6/36 tiene una producción de amonio de 0.3 ± 0.27 mmol/L durante la mayor parte del cultivo. Aunque se puede observar que a las 72 h de se presentó un valor máximo en la concentración de amonio (0.90 ± 1.17 mmol/L), este punto coincide con el intervalo de mayor consumo de glutamina, lo que refleja la degradación de la misma y la formación de amonio como subproducto. Posterior a la concentración máxima de amonio alcanzada en el

cultivo a las 72 h, la concentración de amonio disminuye y tiende a estabilizarse nuevamente en 0.3 mmol/L. Esta disminución se pudo deber a que el amonio se utilizó en alguna vía metabólica por un mecanismo de regulación (metabolismo del nitrógeno) y así evitar que se alcancen concentraciones tóxicas para la célula.

Drews ⁵⁰ (2000), demostró que en las células de insecto Sf9 el metabolismo de nitrógeno en condiciones de exceso de glucosa, produce alanina como principal subproducto metabólico, sin liberación de amonio. Se sugiere que esto ocurre por medio de la enzima glutamato sintasa (GOGAT) que transfiere el nitrógeno de la amida de la glutamina a la posición amina en glutamato, donde se transamina a alanina⁵⁰. Este grupo llegó a esa conclusión debido a que no detectaron producción de amonio durante el crecimiento con glutamina y glucosa, además se detectó un nivel bajo de incorporación de amonio libre en alanina en medios que contienen glutamina e inhibición del metabolismo de glutamina por azaserina (AZS)⁵⁰. En ese estudio también mencionaron que aunque la reacción de GOGAT teóricamente, da como resultado cantidades iguales de ¹⁵N-labil de amina y glutamina marcada con amida que aparece en el glutamato y posteriormente en alanina, no observaron este resultado⁵⁰. Por tal razón, se sugiere que la glutamina se puede metabolizar por otras vías alternas, tales como amidotransferasas en las vías biosintéticas que secuestran la amida del nitrógeno para producir biomasa⁵⁰. En este mismo estudio, se informó que las células que tuvieron limitación de glucosa, producían amonio proveniente de glutamina y en cantidades menores de glutamato, lo que sugirió que en este paso estaban involucradas las enzimas glutaminasa y glutamato deshidrogenasa (GDH), como sucede en las células de

mamífero⁵⁰. Estas enzimas se encuentran reguladas negativamente cuando existe suficiente glucosa y positivamente en condiciones de glucosa limitada. Por lo tanto, en condiciones de escasez de energía, las células Sf9 catabolizan la glutamina y el glutamato a través de una ruta que genera iones de amonio libres y 2-oxoglutarato que se oxida en el ciclo de TCA para generar energía⁵⁰.

Estos resultados concuerdan con lo obtenido en este trabajo, ya que a lo largo de la cinética de crecimiento de las células C6/36 no se detectaron concentraciones altas de amonio, a pesar de que el cultivo se mantuvo por 156 h, además cuando se alcanzó la concentración máxima de este metabolito, que coincide con el mayor consumo de glutamina, la concentración de amonio disminuyó. Aunque a las 144 h de cultivo se detectó nuevamente un incremento en la concentración de amonio, esto se puede deber a la limitación de glucosa, ya que en este tiempo más del 70% de la glucosa ya se consumió y se podrían estar activando las enzimas glutaminasa y GDH para la obtención de energía, produciendo amonio.

La concentración baja de glutamato que se produjo en los cultivos de células C6/36, concuerdan con lo reportado para el mosquito *Ae. aegypti*, este hecho se explica mediante la formación de alanina a partir de glutamina sin la formación de glutamato y amonio. Para confirmar esta teoría se requiere cuantificar la concentración de alanina en el medio de cultivo para determinar si este metabolito se está formando o no.

El amonio es tóxico para algunas líneas celulares^{37, 48}. Palomares³⁷ evaluó el efecto del amonio sobre el crecimiento de la línea Sf9 en cultivos estáticos. Para

esto, realizó cultivos que contenían con diferentes concentraciones de cloruro de amonio (0, 5, 10 y 15 mM). Como resultado, observó que no existe un efecto en la viabilidad del cultivo celular hasta llegar a una concentración de 10 mM de amonio³⁷. Lo que significa que los niveles bajos de amonio producidos en los cultivos de células C6/36 no alcanzan niveles tóxicos de amonio para la línea celular, esto es una ventaja puesto que el sistema no está limitado por la producción de amonio, lo cual representa un gasto económico menos en el mantenimiento de cultivo y un sistema con mayor robustez ya que las pruebas no se afectan por los niveles de amonio en el medio.

Lo anterior indica que el metabolismo de las células C6/36 difiere incluso de otras líneas celulares de insecto, por lo que al constituir un modelo tan importante de estudio para DENV y otros flavivirus, sería importante estudiar a que se deben las diferencias metabólicas, lo que pudiera generar conocimiento de lo que pasa en el insecto *in vivo*.

Scaraffia³⁹ et al, reporta que el mosquito *Ae. aegypti* enfrenta las concentraciones tóxicas de amonio que resultan del rápido metabolismo de las proteínas de sangre, al incorporar amoniaco en los aminoácidos. Esto se detectó en tejidos grasos del cuerpo y del intestino medio de mosquitos hembra³⁹. La incorporación de amonio se realizó por diferentes vías, en el caso del tejido de cuerpo graso se llevó a cabo por medio de la vía de la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GltS)³⁹. En el intestino medio, la desintoxicación de amonio se realiza por medio de la glutamato deshidrogenasa, alanina aminotransferasa y GS³⁹. Este trabajo coincide con lo planteado por Drews⁵⁰ para células Sf9 y corrobora los

bajos niveles de amonio acumulados en el cultivo, ya que las células C6/36 provienen de mosquitos del mismo género *Aedes*, el cual podría poseer un metabolismo similar para el control de amonio. Como se comentó anteriormente las enzimas glutamina sintetasa, glutamato sintasa, glutamato deshidrogenasa y alanina aminotransferasa están activas en las células Sf9, otra línea celular que deriva de insecto y puede metabolizar la glutamina sin formación de amonio al igual que el mosquito *Ae. aegypti*.

14.2. Caracterización de cultivos de células C6/36 crecidas en adherencia a lo largo de una infección con DENV.

14.2.1. Tipificación del virus dengue.

En la figura 5, se muestra el gel realizado con los productos de la primera y segunda ronda de RT-PCR, siguiendo la metodología de Lanciotti⁴⁴ para tipificación de muestras de dengue. Se puede observar en los carriles 2, 3, 4, 5 y 8 que el producto obtenido en la primera ronda de amplificación es de un tamaño de 511 pb, este es el tamaño esperado según Lanciotti y es el tamaño esperado para los cuatro serotipos del dengue ya que se utilizaron cebadores consenso, para amplificar una región común de los cuatro serotipos.

Posteriormente, se detectaron en la segunda ronda de amplificación, los productos obtenidos para cada serotipo del virus dengue. Para el serotipo 1 (carril 15) se detectó la banda esperada a 482 pb, pero también se presentaron otras bandas en el mismo carril que no coinciden con los productos esperados, esto se puede deber a inespecificidad de los cebadores, los cuales amplifican varias regiones o debido a la contaminación de la muestra. En el serotipo 2 (carriles 12 y 13) se detectaron la banda esperada a 119 pb y una banda por arriba de 500 pb que

podría ser la banda de la primera ronda, esta banda puede aparecer nuevamente en la segunda ronda. Para el serotipo 3 (carril 16) se detectó una banda gruesa con un tamaño de 250 pb y otras cuatro bandas con diversos tamaños, cabe resaltar que ninguna de estas bandas coincide con el producto esperado ya que este debe tener un tamaño de 290 pb. Para el serotipo 4 (carril 11) se observan tres bandas, la primera de ellas corresponde con el tamaño esperado para el producto amplificado, la segunda coincide con el producto de 511 pb y la tercera es una banda tenue de aproximadamente 600 pb no identificada. En carril 6 y 14 se observan los productos amplificados para el virus del Zika, se observa que en la primera ronda el producto esperado de 511 pb no amplificó, en contraste se observa que para la segunda ronda de amplificación aparecen diversas bandas en tamaños similares para los serotipos del virus Dengue, esto puede ser debido a que el Dengue y el Zika pertenecen a la misma familia de Flavivirus, por lo cual pueden tener fragmentos de RNA conservados en ambos virus, aunque también se puede deber a inespecificidades de los cebadores consensó ya que estos se diseñaron para amplificar a los serotipos específicos del Dengue.

En general la técnica reportada por Lanciotti es útil para la identificación de los serotipos del virus dengue, ya que es posible distinguir los cuatro serotipos del dengue con base a los productos esperados que se reportan en la literatura, pero carece de especificidad ya que además de amplificar los productos esperados para cada serotipo, también se amplificaron otros productos que se detectaron en el gel como bandas inespecíficas y se amplificaron otros flavivirus. Para resolver

estos problemas de inespecificidad al emplear este protocolo, es necesario, estandarizar la metodología de tipificación utilizando cebadores más específicos.

14.2.2. Cinéticas de infección de células C6/36 en adherencia con DENV a MOI 0.05 UFP/mL.

14.2.2.1. Efecto citopático producido por DENV en células C6/36.

El efecto citopático producido por el virus dengue en células C6/36 ya se ha descrito. La primera vez que se reportó en células de *Ae. albopictus* fue en el trabajo de Singh³⁰. En este trabajo, se infectaron cultivos celulares con diversos arbovirus entre ellos DENV. En estos cultivos se observó un incremento en la granularidad, células despegadas (desprendimiento de la monocapa) y en etapas posteriores, las células agrupadas en grandes masas celulares³⁰. En un estudio posterior realizado por el mismo grupo de investigación, se describe el efecto citopático causado específicamente por cada serotipo del virus dengue. En este último, se reporta que los serotipos 1 y 2 producen un efecto citopático progresivo que involucra toda la monocapa celular y que este efecto conduce a la lisis completa⁵⁴. Para los serotipos 3 y 4 se ha descrito un efecto citopático no progresivo con focos pequeños de formación sincital y efecto citolítico, pero sin provocar la lisis completa de la monocapa celular, aun cuando la infección durara 14-15 días, en estas células se detectaron formaciones sincitiales extensas en masas de células que se desprendieron de la pared de vidrio y flotaban libremente en el medio sobrenadante⁵⁴.

Al realizar el clon C6/36 a partir de células de *Ae. albopictus* e infectar cultivos celulares de estos clones con los cuatro serotipos del virus dengue, Igarashi³¹ observó que las células presentaban diferentes patrones de efecto citopático

dependiente del serotipo del virus, para los serotipos 1 y 4 se detectaron células redondeadas predominantemente, las células infectadas con el serotipo 2 mostraron una notable formación de células gigantes y sincitios a partir del 2 al 3 día de infección y finalmente el serotipo 3, mostraba células redondeadas y células gigantes³¹.

En la figura 6 se presenta el efecto citopático producido en la monocapa de células C6/36 adheridas e infectadas con DENV4 a una MOI = 0.05 UFP/mL. En los tiempos 0 y 12 hpi se detectó que la monocapa se mantiene sin cambios morfológicos en comparación con la monocapa sin infectar. A partir de las 24 hpi se observan células agrupadas en algunas zonas de la monocapa celular, lo cual corresponde con lo reportado por Igarashi para estas células, quien describió que el efecto aparecía entre el 2 y 3 día post-infección. A las 36-60 hpi se observó que la monocapa se afectó por la infección viral ya que se detectaron un mayor número de células agrupadas, además de que empiezan a aparecer células aglomeradas. A las 72 hpi se observaron células nuevamente agrupadas y además comenzaron a aparecer células gigantes y redondeadas con varios núcleos (figura 6I). A las 84 hpi se observan células desprendidas de la monocapa que flotan en el sobrenadante además de que se empiezan a ver fracciones del frasco T vacías. Se puede apreciar que a las 96 hpi una fracción de células se agrupa y otra fracción continuó desprendiéndose de la monocapa. Finalmente a las 108 hpi se detectaron nuevamente células gigantes y redondeadas (fig. 6M), desprendimiento de células y otras aglomeradas. Es importante resaltar que al final de la cinética existían células aun adheridas al frasco, es decir, la monocapa

no se destruyó en su totalidad. Se observaron todos los signos descritos por Singh e Igarashi producidos por el efecto citopático en células C6/36 debido a una infección con DENV4 que coinciden con los observados en este trabajo.

14.2.2.2. Consumo y producción de metabolitos en cultivos infectados con DENV.

14.2.2.2.1. Glucosa y lactato.

En la figura 7 se observó el consumo y producción de metabolitos (glucosa, glutamina, lactato, glutamato y amonio) en células C6/36 infectadas con virus dengue. En la figura 7A se muestra la curva de consumo de glucosa, la cantidad de glucosa inicial fue 5.33 ± 0.16 mmol/L, consumiéndose totalmente al finalizar la cinética de infección. Se observa que la fracción de consumo parcial de glucosa más elevada se obtuvo en el intervalo de 0 a 12 hpi (tabla 7) se consumieron 1.02 ± 0.21 mmol/L de glucosa, en los intervalos comprendidos entre 12 y 48 hpi, las fracciones parciales de consumo de glucosa determinadas fueron menores a la fracción inicial. En el intervalo comprendido entre las 48 y 60 hpi se observa un incremento en el consumo de glucosa con respecto al intervalo anterior, este aumento coincide con el incremento en el título viral a las 60 hpi, el cual es el máximo título alcanzado a lo largo de la cinética de infección (figura 9), por lo cual se puede pensar que las células necesitan una mayor concentración de glucosa para suplir las demandas de energía que le permiten funcionar como hospedero en la infección y la producción de las partículas virales aunado a todas las funciones que esto implica. A partir de las 60 hpi (tabla 7) el consumo de glucosa disminuyó conforme transcurrió el tiempo hasta agotarse. La concentración de partículas virales viables disminuyó paralelamente a la disminución del consumo de glucosa, posterior a las 60 hpi es posible que las células ya no están

consumiendo glucosa solo para sintetizar partículas virales viables, sino también para mantener las funciones vitales y debido al tiempo de infección el virus provocó un daño en la maquinaria celular, lo cual disminuyó la calidad de la partículas virales sintetizadas y los requerimientos de glucosa.

En la cinética de la infección se detectaron valores de lactato con tendencia a cero, la casi nula producción de lactato en el cultivo es importante ya que se ha reportado que el lactato inhibe la infección viral, no obstante, en este sistema esta limitante no existe. En las líneas celulares de insecto Sf9 y High 5, esta reportado que el amonio y el lactato inhiben la expresión de proteínas, aun cuando la concentración de estos metabolitos no inhibía el crecimiento celular³⁷. En la línea celular C6/36 esta limitante no existe ya que los niveles de lactato producidos por las células son muy bajos en comparación con otras líneas de insecto, esta condición puede favorecer la producción viral, ya que todas las proteínas virales se pueden expresar correctamente y ensamblarse, para liberar así las partículas virales maduras. En las células infectadas con virus de encefalitis japonesa (JEV)⁵⁵ se ha descrito que los salicilatos inhiben la infección viral, los datos sugieren que esta sal puede disminuir la cantidad de la glicoproteína NS1 sintetizada intracelularmente o bloquear la secreción de la glicoproteína de las células infectadas⁵⁵. Esto podría presentar un mecanismo celular con el lactato, pero como ya se mencionó esta limitante no está presente en el sistema de células C6/36.

14.2.2.2.2. Glutamina, glutamato y amonio.

En la figura 7B se representa el consumo de glutamina por las células C6/36 infectadas. Disminuyó la concentración de glutamina con el tiempo, la concentración inicial de este sustrato fue 1.93 ± 0.006 mmol/L, misma que se consumió, lo mismo ocurrió con la concentración de glucosa. En la tabla 7 se muestra la fracción parcial con mayor consumo de glutamina se observó en el intervalo comprendido entre las 12 y 24 hpi, en esta fracción las células consumieron 0.35 ± 0.08 mmol/L. En el intervalo comprendido entre las 48 – 60 hpi, se determinó la mayor producción de partículas virales y en contraste con lo observado en el consumo de glucosa, el consumo de glutamina no se incrementa en este periodo de tiempo, sino que es menor con respecto a la fracción parcial de mayor consumo, en el intervalo de mayor producción viral se consumieron 0.16 ± 0.53 mmol/L. En el intervalo comprendido entre 72 y 84 hpi se generaron 0.01 ± 0.25 mmol/L de glutamina, cabe resaltar que en este intervalo de tiempo es el único que se observa formación de glutamina, posterior a esto se observa un nuevo incremento en el consumo de glutamina presente en el medio, hasta agotar la existencia de este aminoácido en el medio de cultivo.

El glutamato estuvo presente en muy baja concentración en el cultivo. La cantidad de glutamato al inicio de la cinética de infección fue 0.1781 ± 0.0119 mmol/L, en intervalo de 0-12 hpi se observa un consumo de 0.1735 mmol/L, esto representa el 97.42% del glutamato total presente en el medio de cultivo. Posteriormente, el consumo de glutamato se mantuvo constante en los intervalos de 12-24 hpi y 24-36 hpi, se consumió en cada intervalo 0.0023 mmol/L de glutamato, que equivale al 2.58 % de glutamato restante. En las siguientes horas no se detectó formación

ni consumo de glutamato y se mantuvo su concentración en 0 mmol/L hasta el final de la cinética de infección.

De manera general la concentración de amonio a lo largo de la cinética de infección fue baja. La concentración más alta en la cinética fue de 0.83 ± 0.35 mmol/L a las 96 hpi. Esta concentración de amonio no es tóxica para el cultivo celular según los reportados para otras líneas de insecto y tampoco afecta la producción viral, ya que las concentraciones reportadas como inhibitoras en la entrada del virus dengue tipo 2 en células C6/36 HT, se encuentran entre 10 a 50 mM de cloruro de amonio⁵⁶. El valor inicial de amonio presente en el cultivo fue 0.07 ± 0.08 mmol/L, conforme la cinética avanzó la cantidad de amonio presente se incrementó. En el intervalo comprendido entre 0-12 hpi se produjeron 0.06 mmol/L, de 12-24 hpi 0.26 mmol/L, de 24-36 hpi 0.20 mmol/L y de 36-48 hpi 0.17 mmol/L, en estos 4 intervalos consecutivos se formó amonio en el cultivo (Tabla 7). Posterior a esto se observa que la concentración de producto en el medio disminuye y en vez de producirse amonio se consume en el medio de cultivo de las 48 a las 84 hpi. En el periodo de 84-96 hpi se detectó la mayor concentración de amonio 0.48 mmol/L. En el periodo posterior se determinó una disminución de la concentración de amonio en el medio. Estas fluctuaciones en la concentración de amonio se pueden deber a que las células en un intento por regular la concentración de amonio incorporen amonio para la síntesis de aminoácidos.

14.2.2.3. Comparación de los metabolitos consumidos y/o producidos por células infectadas y no infectadas con DENV.

En las cinéticas de infección de células C6/36 con DENV a una MOI 0.05 UFP/mL se sembraron 1.97×10^6 células/mL (0 hpi), esta densidad celular se alcanza en la cinéticas de crecimiento de las células sin infectar a las 96 horas de cultivo. Debido a que ambas cinéticas se realizaron en formatos diferentes (frascos T75 y T25, respectivamente) se tomaron en cuenta para fines comparativos los metabolitos consumidos y/o producidos en los tiempos de 96 a 156 horas de cultivo en las cinéticas de crecimiento y de 0 a 60 hpi en las cinéticas de infección, considerando 5 intervalos para igualar los tiempos comparados.

En las cinéticas de infección no se realizó el conteo de células existentes en cada tiempo de muestreo para observar la aparición del CPE, pero se cree que el crecimiento celular después de la infección es detenido, puesto que el mecanismo celular es arrestado en la infección. En células Sf9 el metabolismo celular se detiene inmediatamente después de la infección, cuando los baculovirus (BV) comienzan a controlar la maquinaria celular, el ciclo celular se detiene en la fase G2 / M y cesa la expresión de los genes del huésped³⁶. En células C6/36 no se ha determinado como se afecta puntualmente a nivel metabólico el funcionamiento celular, pero se sabe que en las células de insecto Sf9 la tasa de síntesis de macromoléculas (componentes de la biomasa) disminuyen de 5 a 20 veces una vez que las células están infectadas con un BV recombinante. La detención de la división celular por la infección, es un efecto que depende de la concentración celular al momento de la infección y de la MOI, fue más significativo a una MOI alta³⁶. La alteración en el metabolismo de azúcares, después de la infección a baja

concentración celular en la infección (CCI) condujo a flujos glicolíticos más altos en células infectadas³⁶. Esto dio como resultado un mayor flujo de piruvato hacia acetil-CoA, que junto con la detención del crecimiento celular (y consecuentemente la disminución en la síntesis de lípidos) contribuyó aún más a la mejora observada en el entrada de carbono a través del ciclo de TCA y en el estado energético de las células³⁶. De hecho, el estado de energía de las células Sf9 infectadas es altamente dependiente de la CCI, como se muestra por la tasa neta específica de producción de ATP en paralelo a la producción del baculovirus³⁶.

En los resultados obtenidos en este trabajo las células C6/36 sin infectar consumieron el 62.88% de la glucosa total disponible en el medio de cultivo en el intervalo determinado (96 a 156 horas de cultivo en las cinéticas de crecimiento y de 0 a 60 hpi en las cinéticas de infección), las células infectadas con virus dengue que consumieron el 70.90% de la glucosa total disponible en mismo periodo de tiempo. Se determinó que las células infectadas consumieron 8% de la cantidad de glucosa disponible en el medio en comparación con las células no infectadas. El que las células infectadas presenten un mayor consumo de glucosa puede deberse como se menciona para células Sf9, en el mejoramiento del flujo de carbono hacia el TCA debido a la disminución en la síntesis de lípidos, por la detención del crecimiento celular³⁶. Como ya se ha mencionado estos datos sobre los cambios en el consumo y producción de metabolitos en el contexto de una infección con virus dengue no han sido reportados para células C6/36, por lo tanto no se pueden comparar los datos obtenidos. Sin embargo, se ha observado que

en las células Sf-9³⁶ el consumo de glucosa es mayor a un MOI baja (MOI= 0.6) que a un MOI alta (MOI= 30). Como posible causa, se menciona que la mayoría de los azúcares consumidos se transformaron en piruvato, ya que los flujos metabólicos determinados para la ruta de PPP (vía pentosa fosfato) se encontraban en su totalidad condicionados por el arresto del crecimiento celular después de la infección, aun cuando se incrementaron los flujos glucolíticos³⁶. En este mismo trabajo también se observó que en células no infectadas, los flujos a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, son menores en comparación con las células infectadas³⁶. Para las células C6/36 no se realizó el análisis de los flujos metabólicos, debido a que el objetivo de este trabajo fue determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos de la línea celular, pero si se detectó un aumento en el consumo de glucosa (8%) cuando las células fueron infectadas con virus Dengue. En concordancia con lo ya reportado para las Sf9, se puede pensar que las células C6/36 consumieron glucosa que transformaron en piruvato condicionado por el arresto del metabolismo celular a causa de la infección viral, lo que incrementa los flujos metabólicos en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Aunque la cantidad de glucosa consumida fue más alta en los cultivos infectados la concentración de lactato producida por las células infectadas es menor a la producida por células no infectadas. En las cinéticas de crecimiento se detectó que el valor máximo de lactato alcanzado fue 0.87 ± 0.08 mmol/L a las 36 horas, manteniéndose los demás valores menores a lo largo del cultivo. En contraste con las células infectadas se observa que la concentración máxima de lactato es 0.09 ± 0.013 mmol/L, este valor es 8 veces menor al observado en las cinéticas de

crecimiento. Esto se puede deber a la gran cantidad de energía y nutrientes que la célula necesita para su funcionamiento y la producción de partículas virales. En este sentido, el lactato se podría aprovechar intracelularmente para utilizarse como fuente de energía o como fuente de carbono y esto puede inhibir que se secrete al medio de cultivo. La síntesis de lactato en cultivos de células Sf-9, tiene una tasa de producción baja, este hecho se atribuye a la alta actividad que tiene su ciclo de los TCA, lo que se puede utilizar como un indicativo de la eficacia de oxidación de la glucosa³⁶.

Comparando el consumo de glutamina en el intervalo definido, las células sin infectar consumen el 62.97% de la glutamina disponible en el medio, en contraste con las células infectadas que consumen solo el 36.05%. El metabolismo del nitrógeno y por lo tanto de los aminoácidos se afecta gravemente en el contexto de una infección con BV en células Sf9 y esta afectación depende de la estrategia de infección³⁶, entre las principales afectaciones se observó que la producción de alanina a un MOI bajo es superior, esto confirma que los aminoácidos consumidos no se utilizaron para la síntesis de proteínas, además de que la tasa de utilización y flujos del metabolismo intracelular de otros aminoácidos se valoraron inferiormente como consecuencia de síntesis de biomasa después del arresto celular, también se observó que la vía más activa a un MOI bajo y alto en el metabolismo del nitrógeno fue la vía GOGAT³⁶. El consumo de glucosa aumentó en células C6/36 infectadas, sin embargo, el metabolismo celular se arrestó y es poco probable que estos metabolitos se hayan utilizado para formación de biomasa. La vía GOGAT para producción de alanina se encuentra activa en el

mosquito *Ae. Aegypti*³⁹, por consiguiente, esta vía se pudiera relacionar con el consumo de glucosa en las cinéticas de infección en las células C6/36, y por lo tanto este consumo observado se esté dirigiendo a la formación de alanina y de energía.

La concentración de glutamato formado en cultivos infectados y no infectados es cero en ambas cinéticas. En las células Sf9³⁶ se ha descrito que los flujos metabólicos intracelulares se producen en dirección de glutamato, una vez formado éste se canaliza a la formación de alanina por transaminación con piruvato (AlaAT) y α -cetoglutarato³⁶. Nuevamente, la formación de alanina pudiera explicar los bajos niveles de glutamato medidos en las cinéticas de células C6/36 infectadas y no infectadas.

Comparando la concentración de amonio producido en ambas cinéticas, los niveles se mantuvieron por debajo de 1 mmo/L. Se ha descrito que en las células Sf9³⁶ parte del amonio producido se transfiere a piruvato, formando alanina (AlaAT), que es el principal compuesto de carbono formado por las células de insectos a bajas concentraciones de glucosa, e incluso se consume después del agotamiento de glucosa. También se sabe que la alta eficiencia del sistema de reciclaje de amonio depende principalmente del funcionamiento conjunto de las rutas de glutamato sintasa (GOGAT) y alanina aminotransferasa (AlaAT)³⁶, como ya se mencionó estas vías también se encuentran en mosquitos *Ae. aegypti*.

Por medio del análisis de la topología de red⁴⁶ y de los flujos intracelulares determinados en células Sf9 en suspensión, se dedujo que el grupo de glutamato

intracelular se produce sobre la base de la interacción de varias vías consideradas: glutamato sintasa (GOGAT), glutaminasa, glutamato deshidrogenasa (GDH) y el aspartato (AspAT) y actividades de alanina (AlaAT) aminotransferasa⁴⁶. Estas vías unen los cuatro grupos principales de aminoácidos (glutamina, glutamato, aspartato y alanina) con los dos principales nodos metabólicos que controlan el metabolismo celular: α -cetoglutarato y piruvato⁴⁶. Los flujos bajos positivos o incluso negativos para las rutas AspAT y GDH, junto con el consumo de α -cetoglutarato por la vía GOGAT, equilibraron la formación de α -cetoglutarato por la vía AlaAT, lo que explica la baja incorporación de cadenas principales de aminoácidos en el ciclo de TCA después de la infección y a altas densidades celulares⁴⁶. Los flujos bajos positivos o incluso negativos para las rutas AspAT y GDH, junto con el consumo de α -cetoglutarato por la vía GOGAT, equilibraron la formación de α -cetoglutarato por la vía AlaAT, lo que explica la baja incorporación de cadenas principales de aminoácidos en el ciclo de TCA después de la infección y a altas densidades celulares⁴⁶. Se observaron alteraciones importantes de la división metabólica en los nódulos de piruvato y α -cetoglutarato después de la infección por BV⁴⁶. Se sugiere realizar un análisis similar para las células C6/36 para complementar el trabajo realizado hasta ahora y poder confirmar las hipótesis generadas sobre el metabolismo de esta línea celular poco caracterizada.

14.2.2.4. Títulos obtenidos de cinéticas de infección de células C6/36 en adherencia con DENV a MOI 0.05.

En la figura 8 se muestran imágenes representativas de los ensayos de placa realizados con sobrenadantes colectados en cada tiempo de muestreo. En la figura 9, se observan gráficamente los títulos virales obtenidos a partir de las cinéticas de infección de células C6/36 con DENV. Inicialmente, los cultivos infectados tienen una concentración de 35.5×10^6 células totales por frasco, se detectó que la concentración de unidades formadoras de placa por mL (UFP/mL) aumenta progresivamente conforme pasa el tiempo post-infección. Este incremento observado es un comportamiento esperado en la cinética ya que las partículas virales viables que infectan a la monocapa celular, secuestran su maquinaria para comenzar la replicación viral. El máximo título viral se alcanzó a las 60 hpi, a una concentración de $4.50 \pm 1.30 \times 10^5$ UFP/mL. Este hecho corresponde con un incremento en el consumo de glucosa en el periodo que va de las 48 - 60 hpi. Esta relación de consumo de glucosa-producción de virus, se puede deber a la energía que la célula requiere para sintetizar las partículas virales y para mantenerse viva ella misma. En las células Sf9 el metabolismo celular se detiene inmediatamente después de la infección, cuando el virus toma control de la maquinaria celular y las células infectadas se dedican totalmente a la replicación del virus, en esta misma línea también se determinó que las células infectadas con un baculovirus recombinante presentaron un mayor consumo de glucosa.

Posterior a este periodo se observa que la concentración de partículas virales decae, este hecho corresponde con el agotamiento de glucosa y glutamina en el

medio, que son metabolitos necesarios para la célula. Es probable que el virus se replicara de forma constante hasta encontrar una limitante en los nutrientes encontrados en el medio de cultivo.

Los títulos de las infecciones por el virus dengue en las células C6/36 ya se han reportado previamente^{14, 30, 33}, se han realizado diversos trabajos, en donde las células se infectaron con diversos serotipos del virus dengue a diferentes MOI en los cuales se obtuvieron diversos títulos virales a diferentes tiempos de infección. Igarashi³⁰ determinó que al infectar cultivos de células C6/36 en adherencia con DENV con 0.1 mL de virus semilla a una MOI de 0.1 f.f.u/célula para los serotipos 1, 3 y 4 y una MOI de 1 f.f.u/célula para el serotipo 2, detectó que el serotipo 1 alcanzó la concentración máxima de 6.3 log(f.f.u/mL) aproximadamente a los 6 días post-infección, los serotipos 2 y 3 presentaron la máxima concentración a los cuatro días post-infección (8.4 log(f.f.u/mL) y 6.5 log (f.f.u/mL)) respectivamente, finalmente el serotipo 4 presentó su máxima concentración a los 5 días post-infección (6.4 log(f.f.u/mL)) aproximadamente³⁰. Henchal y Putnak¹⁴ refieren que los máximos títulos obtenidos en diversas líneas celulares de mosquito se encuentran entre 10^8 y 10^9 PFU/mL, sin mencionar la MOI. Sakoonwatanyoo y colaboradores, describieron que en las células C6/36 infectadas con los cuatro serotipos del virus dengue se obtuvieron títulos en el intervalo entre 6.5 y 8.5 log 10 (PFU/mL) a partir de los 5 días post-infección³³.

Se han reportado factores o moléculas inherentes a las células que pueden condicionar la entrada del virus. En este sentido, esta descrito que para que las partículas del virus dengue se internalicen en células C6/36 se requiere la

presencia de proteínas de unión a laminina, misma que utilizan los serotipos 3 y 4, pero no por los serotipos 1 y 2, se sugiere que el serotipo 2 del virus del dengue es capaz de unirse solo a una forma desnaturalizada de la proteína de unión a la laminina³³. Como se puede observar los títulos obtenidos en células C6/36 infectadas con virus Dengue varían de un experimento a otro, esto depende de la cantidad de células infectadas, la MOI y el tiempo de infección. Como este trabajo se desarrolló únicamente con DENV4, no se puede comparar con un efecto único del serotipo. El título máximo ($4.5 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5$ UFP/mL) obtenidos en este trabajo son más bajos que los reportados por otros autores pero se debe recordar que la MOI utilizada en este trabajo fue de 0.05 y se inocularon 35.5×10^6 células totales, estas variables podrían generar la diferencia entre los títulos obtenidos entre éste y otros trabajos^{14, 30, 33}. También se ha determinado que en células Sf9 la principal limitación para el ensamblaje de baculovirus en cultivos infectados, se debe a la limitación de la energía celular, este hecho establece un vínculo entre la densidad celular y el estado metabólico celular, ya que la célula una vez infectada solo se dedica a la replicación viral⁴⁶.

15. CONCLUSIONES.

- Se caracterizaron los parámetros: tiempo de duplicación (t_d) = 31.5 h, fase exponencial = 24-72 h, velocidad específica de crecimiento (μ) = 0.022 h^{-1} . Glucosa ($Y = 1.23 \pm 0.48 \text{ cél } \times 10^6 / \mu\text{mol}$ y $q = 0.02 \pm 0.01 \mu\text{mol} / \text{cél } \times 10^6 \times \text{h}$), glutamina ($Y = 2.14 \pm 0.73 \text{ cél } \times 10^6 / \mu\text{mol}$ y $q = 0.01 \pm 0.003 \mu\text{mol} / \text{cél } \times 10^6 \times \text{h}$), lactato ($Y = 0.09 \pm 0.03 \mu\text{mol} / \text{cél } \times 10^6$ y $q = 0.002 \pm 0.0006 \mu\text{mol} / \text{cél } \times 10^6 \times \text{h}$), glutamato ($Y = 0.0024 \pm 0.0042 \mu\text{mol} / \text{cél } \times 10^6$ y $q =$

$0.0001 \pm 0.0001 \mu\text{mol/ cél } \times 10^6 \times \text{h}$) y amonio ($Y = 0.78 \pm 1.05 \mu\text{mol/ cél } \times 10^6$ y $q = 0.0172 \pm 0.0230 \mu\text{mol/ cél } \times 10^6 \times \text{h}$) de la línea celular C6/36 crecida en adherencia.

- Los parámetros caracterizados son importantes, ya que en este son reportados por primera vez en la literatura, hasta donde se sabe. Estos parámetros permitirán la manipulación de la línea celular para optimizar el tiempo de cultivo, obtención de biomasa, así como la determinación de los requerimientos nutricionales adecuados para el crecimiento celular.
- Se caracterizaron los cultivos de células C6/36 crecidas en adherencia a lo largo de una infección con DENV, por medio de fracciones parciales de consumo y/o producción de metabolitos, que muestran los cambios en el metabolismo celular que induce el virus.
- Se documentó la aparición del efecto citopático de 0 a 108 hpi, demostrando el efecto continuó que el virus provoca sobre la monocapa celular.
- El máximo título viral obtenido de las células infectadas se determinó a las 60 hpi y fue $4.5 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5$ UFP/mL. Esto implica que las células no producen una mayor cantidad de partículas virales viables en tiempos posteriores, por lo cual el cultivo se debe detener a las 60 hpi, para optimizar de tiempo de infección.
- Se determinó que las células C6/36 producen concentraciones de lactato menores a 1 mmol/L, este comportamiento se observó tanto en células

infectadas y no infectadas con DENV-4, por lo que se piensa la limitación de oxígeno no repercute en la formación de lactato para esta línea celular.

- Se determinó que las concentraciones de amonio en cultivos infectados y no infectados se mantuvo en concentraciones menores a 1 mmol/L. Esto es importante ya que se puede suponer que las células C6/36 metabolizan la glutamina sin formación de amonio y glutamato, produciendo alanina.

16. PERSPECTIVAS.

Se sugiere realizar cultivos de células C6/36 modificando las concentraciones de los metabolitos glucosa y glutamina, para determinar si existen o no cambios en las concentraciones de lactato, amonio y glutamato.

Cuantificar la cantidad de alanina presente en el medio de cultivo en cinéticas de crecimiento e infección, para confirmar o descartar la hipótesis de la formación de alanina sin producción de amonio y con muy bajos niveles de glutamato en el medio de cultivo de células C6/36.

Se sugiere realizar la adaptación de la línea celular C6/36 de cultivo en adherencia a suspensión para eliminar la variación experimental que implica despegar las células de forma mecánica para realizar los experimentos y cuantificar metabolitos nuevamente.

Se sugiere realizar cinéticas de infección alimentando glucosa y glutamina, después de las 60 hpi para determinar si la producción de partículas virales viables está limitada por la falta de metabolitos en el medio de cultivo.

17. REFERENCIAS.

- 1) CENAPRECE. Manejo del Dengue no grave y el Dengue grave, Guía de referencia rápida: Guía de Práctica Clínica (pdf). México: Secretaria de Salud, CENAPRECE, 2016.
- 2) CENETEC. Clasificación, Diagnóstico y Tratamiento Integral del Dengue, Guía de referencia rápida: Guía de Práctica Clínica (pdf). México: Secretaria de Salud, CENETEC, 2016.
- 3) Urribarren T. Dengue, fiebre chikungunya, zika y otros arbovirus (sitio en internet). Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Acceso el 2 de Septiembre de 2016. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/dengue.html>.
Última revisión 26 de agosto del 2016.
- 4) Stevens AJ, Gahan ME, Mahalingam S, Keller PA. The Medicinal Chemistry of Dengue Fever. J. Med. Chem. Perspective 2009; 52: 7911-7926.
- 5) Organización Mundial de la Salud. Dengue y Dengue grave; Lucha contra el Dengue (sitio en internet). OMS Centro de prensa. [Accesado: 6/09/2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>. ; <http://www.who.int/denguecontrol/mosquito/es/>. Última revisión: Agosto/ Septiembre 2016.
- 6) Secretaría de Salud. Panorama Epidemiológico de Dengue, 2017 (pdf). México: Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología, SSA, 2018.

- 7) Secretaria de Salud. Boletín Epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema Único de Información (pdf). México: Secretaria de Salud, Dirección General de Epidemiología, 2018.
- 8) Ángel RMd. Entrada del virus del Dengue: Moléculas que pueden modular la patogenia viral. CINVESTAV 2006; 38-43.
- 9) Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Repliaction. En: Fields Virology. D. M. Knipe and P. M. Howley, Eds. 5 ed. Vol. 33. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 2007. P.1104.
- 10) Ángel RMd, Valle JR-d. Dengue Vaccines: Strongly Sought but Not a Reality Just Yet. PLoS Pathog. 2013; 9(10): 1-4, e1003551. doi:10.1371/journal.ppat.1003551.
- 11) Sabin BA. Research on dengue during World War II. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1952; 1: 30-50.
- 12) Samuel P.P., Tyagi B.K. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes (Revision). Indian J. Med. Res. 123 May 2006; 123: 615-628.
- 13) Meiklejohn, G., England B., Lennette E.H. Adaptation of dengue virus strains in unweaned mice. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1952; 1:51-58.
- 14) Henchal EA, Putnak JR. The Dengue Viruses. Clin. Microbiol. Rev. 1990; 3(4): 376-396.
- 15) Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Clin. Microbiol. Rev. 1998; 11(3): 480-496.
- 16) Jarman RG, Nisalak A, Anderson KB, Klungthong C, et al. Factors Influencing Dengue Virus Isolation by C6/36 Cell Culture and Mosquito

- Inoculation of Nested PCR-Positive Clinical Samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 84(2): 218-223.
- 17) Acosta-Bas C, Gómez-Cordero I. Biología y métodos de diagnósticos del dengue. *Rev Biomed.* 2005; 16: 113-137.
- 18) Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications.* 6 ed. USA: Wiley-Liss; 2010.
- 19) Leist CH, Meyer HP, Fiechter A. Potential and problems of animal cells in suspension culture. *J. Biotechnol.* 1990; 15: 1-46.
- 20) Morens, D. M., Halstead S.B., Repik P.M., Putvatana R., et al. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22:250-254.
- 21) Yuill, T. M., Sukhavachana P., Nisalak A., Russell P.K. Dengue-virus recovery by direct and delayed plaques in LLC-MK₂ cells. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 1968; 17:441-448.
- 22) Malewicz, B., Anderson L.E., Crilly K., Jenkin H.M. Fetal rhesus monkey lung cells can be grown in serumfree medium for the replication of dengue-2 vaccine virus. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1985; 21:470-476.
- 23) Bhamarapavati, N., Yoksan S., Chayanitayothin T., Angsubphakorn S., et al. Immunization with a live attenuated dengue-2-virus candidate vaccine (16681-PDK 53): clinical, immunological and biological responses in adult volunteers. *Bull. W.H.O.* 1987; 65:189-195.

- 24)Phanthanawiboon S, A-nuegoonpipat A, Panngarm N, Limkittikul K, et al. Isolation and propagation of Dengue virus in Vero and BHK-21 cells expressing human DC-SIGN stably. *J. Virol. Methods.* 2014; 209: 55-61.
- 25)Rodrigo WWS, Alcena CD, Rose CR, Jin X, et al. Short Report: An Automated Dengue Virus Microneutralization Plaque Assay Performed in Human Fcy Receptor-expressing CV-1 Cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 80(1): 61-65.
- 26)Guzmán GM, Kourí G. Advances in Dengue Diagnosis (minireview). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*1996; 3(6): 621-627.
- 27)Kuno G, Gubler DJ, Vélez M, Oliver A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bull. World Health Organ.* 1985; 63(2): 279-286.
- 28)Morier DL, López-Santa Cruz I, Álvarez M, Caballero LY, et al. Obtención de la sublínea celular CLA-HT. Estudio de su sensibilidad para el aislamiento y multiplicación de los virus del dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical.* 2014; 66(3): 424-432.
- 29)Singh KRP. Cell cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L). *Curr. Sci.* 1967; 36: 506-508.
- 30)Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* Cell Clone Sensitive to Dengue and Chikungunya Viruses. *J. Gen. Virol.* 1978; 40: 531-544.
- 31)Yunker CE, Cory J. Plaque Production by Arboviruses in Singh's *Aedes albopictus* Cells. *Appl. Microbiol.* 1975; 81-89.
- 32)Kuno G. Dengue Virus Replication in a Polyploid Mosquito Cell Culture Grown in Serum-Free Medium. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 851-855.

- 33) Sakoonwatanyoo P, Boonsany V, Smith DR. Growth and Production of the Dengue Virus in C6/36 Cells and Identification of a Laminin-Binding Protein as a Candidate Serotype 3 and 4 Receptor Protein. *Intervirology*. 2006; 49: 161-172.
- 34) Pereira EA, Lopes da FBA. Infection of Mosquito Cells (C6/36) by Dengue-2 Virus Interferes with Subsequent Infection by Yellow Fever Virus. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2016; 16(2): 124-130.
- 35) Crueger W. *Biotechnology, Manual de Microbiología Industrial*. España: Editorial Acribia; 1989.
- 36) Bernal V, Carinhas N, Yokomizo AY, Carrondo MJT, et al. Cell Density Effect in the Baculovirus-Insect Cells System: A Quantitative Analysis of Energetic Metabolism. *Biotechnol. Bioeng*. 2009; 104: 162-180.
- 37) Palomares Aguilera LA. *Caracterización cinética y metabólica de cultivos de Spodoptera frugiperda (Sf-9): Hacia el desarrollo de estrategias de control (tesis de maestría)*. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1996.
- 38) Marinotti O, James AA, Ribeiro JMC. Diet and salivation in female *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Insect Physiol*. 1990; 36 (8): 545-548.
- 39) Scaraffia PY, Zhang Q, Thorson K, Wysocki VH, et al. Differential ammonia metabolism in *Aedes aegypti* fat body and midgut tissues. *J. Insect Physiol*. 2010; 56: 1040-1049.
- 40) Parida MM, Upadhyay C, Pandya G, Jana AM. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. *J. Ethnopharmacol*. 2002; 79:273-278.

- 41) Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*. 2001; 21:3B:A.3B.1–A.3B.2.
- 42) Xylem Inc. YSI 2900 Series Biochemistry Analyzers. Operations and Maintenance Manual. 2016; Ohio, USA.
- 43) Gualano RC, Pryor MJ, Cauchi MR, Wright PJ, et al. Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA. *J. Gen. Virol.* 1998; 79: 437-446.
- 44) Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, et al. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30 (3): 545-551.
- 45) Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleotic Acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(3): 495-503.
- 46) Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 1986; 162: 156-159.
- 47) QIAGEN. QIAamp® Viral RNA Mini Handbook. For purification of viral RNA from plasma, serum, cell-free body fluids, and cell-culture supernatants. 4ed. Diciembre 2014.
- 48) Toussaint C, Henry O, Durocher Y. Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *J. Biotechnol.* 2016; 217: 122-131.

- 49) Briegel H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 1990; 36 (3): 165-172.
- 50) Drews M, Doverskog M, Öhman L, Chapman BE, et al. Pathways of glutamine metabolism in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells: evidence for the presence of the nitrogen assimilation system, and a metabolic switch by $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ NMR. *J. Biotechnol.* 2000; 78: 23-37.
- 51) Gioria VV, Beccaría AJ, Claus JD. Crecimiento, metabolismo y producción de baculovirus en cultivos en suspensión de una línea celular del insecto lepidóptero *Anticarsia gemmatilis*. *Revista Química Viva.* 2006; 1(5): 27-45.
- 52) Palomares LA. Aplicaciones de la bioingeniería en la producción de proteínas recombinantes por células de insecto. *Revista de la Sociedad Mexicana de BioTecnología y Bioingeniería A.C.* 2004; 9 (2): 22-31.
- 53) Lampe KL, Namba RM, Silverman TR, Bjugstad KB, et al. Impact of Lactic Acid on Cell Proliferation and Free Radical Induced Cell Death in Monolayer Cultures of Neural Precursor Cells. *Biotechnol. Bioeng.* 2009; 103(6): 1214-1223.
- 54) Singh KR, Paul SD. Isolation of Dengue viruses in *Aedes albopictus* cell cultures. *Bull World Health Organ.* 1969; 40 (6): 982-983.
- 55) Liao C-L, Lin Y-L, Wu B-C, Tsao C-H, et. al. Salicylates Inhibit Flavivirus Replication Independently of Blocking Nuclear Factor Kappa B Activation. *J. Virol.* 2001; 75 (17): 7828-7839.
- 56) Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 474-484.