

11
2 ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado del C. C. H.

Instituto de Investigaciones Biomédicas

ACTIVACION DE LA VIA ALTERNA DEL COMPLEMENTO
POR EL VIRUS DEL DENGUE

T E S I S

Que para obtener el Grado de
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
p r e s e n t a

DR. JUAN PABLO GUISCAFRE GALLARDO

México, D. F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Página
RESUMEN	
INTRODUCCION	2
HIPOTESIS	7
OBJETIVOS	7
MATERIAL Y METODOS	8
- Cultivos celulares	8
- Virus	8
- Concentración de partículas virales	9
- Suero	9
- Reactivos inmunológicos	9
- Reducción del titulo del complemento hemolítico	10
- Detección de los componentes C1 y C3	11
- Detección de los productos de desdoblamiento de C3 por inmunolectroforesis cruzada	11
- Detección del factor B mediante inmunolectro- foresis	12
- Inhibición de la glicosilación de las proteínas virales	12
- Extracción de glicoproteínas	13
- Electroforesis de las glicoproteínas	15
- Determinación de la activación del complemento por ELISA	15

	Página
- Inmunotransferencia de extractos de células infectadas.	16
RESULTADOS	18
DISCUSION Y CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFIA	28

**ACTIVACION DE LA VIA ALTERNA DEL COMPLEMENTO
POR EL VIRUS DEL DENGUE**

RESUMEN

El Dengue es una virósis sistémica y aguda causada por alguno de los 4 serotipos del virus perteneciente a la familia Flaviviridae. En las formas graves o hemorrágicas (DHF-DSS) de la enfermedad, se ha observado que los pacientes cursan con disminución de la mayoría de los componentes del complemento, por una activación masiva. De acuerdo a los hallazgos serológicos, la mayor parte de los casos (hemorrágicos) se explican por la presencia de complejos inmunes circulantes. Sin embargo, también se han reportado casos secundarios en sujetos con "primo infección", con ausencia de CI circulantes, lo que sugiere un mecanismo diferente en la depleción del complemento. Diversos cultivos celulares, infectados con virus como Sarampión, Epstein-Bar y algunos retrovirus, tienen la capacidad de activar el sistema del complemento en ausencia de anticuerpo específico. Churdboonchart y col., reportaron que una cepa del serotipo 2 del virus del dengue fue capaz de desdoblar el componente C3 del complemento. OBJETIVO: Estudiar las diferencias en la activación del complemento por tres diferentes cepas del serotipo 2 del virus del dengue (NG-C, Mexicana y 1169-Indonesia), así como analizar los componentes virales responsables de dicha activación. RESULTADOS: Los cultivos celulares de mosquito (TRA-284) y mamífero (Vero) infectados, consumen un 10% más de C, que sus controles no infectados. Tanto las células normales como las infectadas fijan el componente C3 del C en su membrana, aunque no el componente C1; lo que por un lado descarta la activación

del C por la vía clásica, pero no distingue entre cultivos infectados y normales.

Mediante la Inmunoelectroforesis - cruzada, se obtuvo un 30% mayor de conversión de C3 en cultivos infectados en relación a sus controles.

Al inhibir la glicosilación de las proteínas virales con Tunicamicina, las células infectadas se comportan como sus controles no infectados, lo que implica la participación de alguna glicoproteína en el fenómeno.

A partir de cultivos normales e infectados se extrajeron las glicoproteínas (Con A-sefarosa), las cuáles fueron separadas en un gel de poliacrilamida, transferidas a papel de nitrocelulosa, en donde se midió la capacidad de fijar los componentes C3b y C3bi mediante un ensayo inmuno-enzimático. Los resultados indicaron que la glicoproteína de 60 kDa (GP60) y no la de 46 kDa (GP46) fue el componente viral capaz de activar la cascada del complemento por vía alterna.

Mediante el mismo ensayo inmunoenzimático se observó que no existen diferencias importantes en la captación de C3b y C3bi, al comparar las 2 cepas virales obtenidas a partir de casos de dengue clásico o primario y la cepa aislada de un caso fatal o secundario.

**ACTIVACION DE LA VIA ALTERNA DEL COMPLEMENTO
POR EL VIRUS DEL DENGUE**

INTRODUCCION

El Dengue es una virosis sistémica y aguda causada por alguno de los cuatro serotipos del virus perteneciente a la familia FLAVIVIRIDAE (1,2,3). Se transmite al hombre por la picadura de la hembra hematófaga de los mosquitos Aedes aegypti y A. albopictus, los que se encuentran ampliamente distribuidos en zonas urbanas y rurales de Asia y el Pacífico (4,5). El virus es de forma esférica con una cubierta de lípidos y su diámetro es de 40 a 50 nm. El genoma viral dentro de la nucleocápside consiste de una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva, con un coeficiente de sedimentación de 45 S y un peso molecular aproximado de 3.3 a 4.2×10^6 Da. Su porción 5' terminal tiene un grupo "cap" y posiblemente no existe poliadenilación en la región 3'. El centro del virus es una estructura esférica de 27 nm de diámetro, y su replicación y transcripción se lleva a cabo en el citoplasma (asociado a membrana) de la célula infectada, el ensamblaje y la liberación de los viriones no ha sido aclarada pero podría ser por la vía del aparato secretor celular (6,7).

El virión contiene por lo menos tres proteínas estructurales: a) La proteína de nucleocápside, no glicosilada, V2 o C, de 14 kDa y que envuelve al RNA del virus. b) La proteína V1 o M, de 8 kDa, probablemente sea una proteína integral de membrana. c) La proteína V3 o E (envoltura) de 51 a 60 kDa es una glicoproteína que comprende los peplómeros o espículas y es en

la que residen los determinantes antigénicos de la hemaglutinación, neutralización y los de tipo específico.

El número y función de las proteínas no estructurales no está bien determinado (aproximadamente 15) y existen diferencias según el sistema de células en donde se lleve a cabo la infección.

En el año de 1977 se inició una gran epidemia de Dengue por el serotipo 1, la cual alcanzó algunos países del Caribe, Guatemala y Belice. A fines de 1978, se registraron los primeros casos en el sur de nuestro país (8). A partir de esta fecha se han informado diferentes brotes a lo largo de la República Mexicana. En el sexenio de 1979 a 1984 las unidades médicas del Instituto Mexicano del Seguro Social reportaron un total de 153,625 casos de Dengue clásico (9). Para 1985 se notificaron 17,706 casos de Dengue primario y para 1986 y 87 hubo un total de 44,226 y 16,209 casos respectivamente, informándose 2 casos en 86 y 6 casos en 87 con manifestaciones hemorrágicas (10).

La vigilancia epidemiológica en los Laboratorios San Juan del C.D.C. en San Juan, Puerto Rico, indicó que para 1983 ya circulaban en nuestro país al menos 3 serotipos del virus del Dengue (8).

La enfermedad ocurre principalmente en sujetos menores de 15 años. Los síntomas van desde un estado febril (Dengue clásico o primario) hasta formas graves que se manifiestan como

fiebre hemorrágica (FHD) o síndrome de choque (DSS), con una letalidad que varía entre 10 y 40%. El Dengue primario se caracteriza por fiebre, malestar general, dolor muscular generalizado, náusea, vómito, exantema y petequias. Algunos pacientes presentan anorexia, alteración del sentido del gusto, tos, ligera inflamación de la garganta y diarrea moderada o constipación. La exploración física puede revelar hepatomegalia moderada, bradicardia relativa y adenopatía cervical. Los datos de laboratorio son normales excepto leucopenia moderada (Fig. 1). El Dengue secundario se inicia como la primoinfección, con fiebre elevada de 2 a 7 días de duración, el estado general de los niños se agrava al remitir la fiebre, entrando en letargo; la perfusión tisular periférica se vuelve muy deficiente, se observa taquicardia e hipotensión, con las siguientes manifestaciones hemorrágicas: petequias, púrpura, equimosis, epistaxis, gingivorragias, hematemesis o melena. En la mayoría de los casos se observa hepatomegalia y prueba del torniquete positiva. Los exámenes de laboratorio informan de leucocitosis moderada, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hematuria, trombocitopenia, disminución del fibrinogeno y de la mayoría de los componentes del sistema del complemento (C). En los casos graves de FHD se presenta pulso rápido y débil, presión diferencial menor de 20 mmHg, conduciendo al paciente a un estado de choque e incluso la muerte (Fig. 2).

Se han sugerido varias hipótesis para intentar explicar la presentación de los casos graves de la enfermedad. En 1977

Rosen (11) sugirió la posible variación antigénica de las cepas virales, lo que implicaba un aumento en la virulencia de las mismas. Pavri en 1976 (12) postuló el sinergismo entre la infección por Dengue y la infestación por helmintos. Sin embargo, la hipótesis más aceptada actualmente, llamada "inmunopatológica" y descrita por Halsted y col. (13), se basa en la infección secuencial por dos diferentes serotipos del virus. La infección secundaria aumenta por la presencia de anticuerpos facilitadores o no neutralizantes (14,15) producidos contra el virus responsable del primer contacto. Los complejos inmunes (CI) circulantes activan el sistema del C, generando anafilatoxinas (C3a y C5a), las cuales producen desgranulación de las células cebadas con la consiguiente liberación de histamina y otras sustancias vasoactivas, produciendo aumento de la permeabilidad vascular y permitiendo la presentación del estado de choque.

El grado de disminución de la actividad del C se ha correlacionado con los grados III y IV de la clasificación de las manifestaciones clínicas emanadas de la Organización Mundial de la Salud (16). Tanto Bokisch y col. (17) como Churdboonchart y col. (18) demostraron que la activación del C ocurre en el suero de pacientes con FHD y con DSS.

La mayoría de brotes epidémicos de FHD y DSS se han reportado en casos de Dengue secundario (19). Sin embargo, en sujetos con primoinfección también se ha informado de casos hemorrá-

gicos, con disminución en los niveles del C y ausencia de CI circulantes (20), lo que sugiere un mecanismo diferente al de estos últimos en la participación del fenómeno de activación. Diferentes reportes (21,22,23,24), indican que cultivos celulares infectados con el virus del Sarampión, el virus Epstein-Barr y algunos retrovirus, tienen la capacidad de activar el sistema del C en ausencia de anticuerpo específico. Churdboonchart y col. (25) demostraron que una cepa del serotipo 2 del virus del Dengue era capaz de desdoblarse el componente C3 del C.

HIPOTESIS

- El grado de activación del C depende de la mayor virulencia de la cepa viral empleada.
- Por lo menos, una glicoproteína viral está implicada en el fenómeno de activación del C por la vía alterna.

OBJETIVOS

1. Estudiar las diferencias en la activación de la vía alterna del C, con algunas cepas del serotipo 2 del virus del Dengue.
2. Identificar el o los componentes virales responsables de la activación del C.

MATERIAL Y METODOS

CULTIVOS CELULARES

Para la replicación de virus se emplearon las siguientes líneas celulares.

- a) TRA-284 (*Toxorhynchites amboinensis*), obtenida del Dr. Goro Kuno de los Laboratorios San Juan, San Juan Puerto Rico.
- b) Vero (riñón de mono verde africano).
- c) LLC-MK₂ (riñón de mono rhesus), se empleó para la titulación viral mediante el ensayo de placa lítica (26,27).

La línea celular de mosquito fue crecida a 28°C en medio Leivobitz - 15 y triptosa fosfato (v/v), complementado con suero fetal de ternera (SFT) al 1%. Los cultivos de mamífero se crecieron a 37°C en medio mínimo esencial (MEM) conteniendo 10% de SFT.

VIRUS

Las tres cepas del serotipo 2 del virus del Dengue utilizadas fueron la Nueva Guinea (NG) C, la Mexicana y la 1169-Indonesia proporcionadas por el Dr. Duane J. Gubler de los Laboratorios San Juan del C.D.C. en San Juan Puerto Rico.

Las cepas NG-C y Mexicana fueron aisladas de pacientes con "Dengue clásico" y la cepa 1169-Indonesia de un caso fatal de FHD.

CONCENTRACION DE PARTICULAS VIRALES

Los lisados de células normales e infectadas se sometieron a 2 ciclos de sonicación de 15 seg (60 oms) y posteriormente se clarificaron a 800 x g durante 10 min. El sobrenadante se mezcló con polietilenglicol 6000 (PEG-6000) al 28% en 1.5 M de cloruro de sodio (1:5), manteniéndose en agitación durante 18 h a 4°C. En seguida se centrifugó a 6000 x g durante 45 min a 4°C y finalmente se resuspendió en 1/100 del volumen original con un amortiguador de Tris-NaCl (0.01 M Tris-HCl pH 7.6, 0.15 M de cloruro de sodio).

SUERO

Como fuente de C se empleó suero humano normal (SHN) a partir de un donador sano, previamente colectado en forma fresca en cada experimento.

REACTIVOS INMUNOLOGICOS

- Para confirmar la presencia de antígenos virales en los cultivos infectados, se utilizó una mezcla de sueros hiperinmunes humanos, con título de anticuerpos anti-Dengue inhibidores de la hemaglutinación > a 1:1280. El suero se conjugó con isotiocianato de fluoresceína (FITC).
- Un anticuerpo monoclonal contra el serotipo 2 del virus y un suero anti-IgG de ratón conjugado con FITC, fueron empleados para la identificación del virus tipo 2.

- Sueros de conejos anti C1 y C3 humanos conjugados con FITC fueron amablemente proporcionados por el Dr. Raúl Mancilla del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.
- Suero de cabra anti C3 humano, para detectar los productos de desdoblamiento de C3, se obtuvo de fuente comercial (Sigma, St. Louis, Mo.).
- El anticuerpo monoclonal Mab 129 biotinilado, específico para reaccionar con los componentes C3b y C3bi del complemento, fue proporcionado por el Dr. Neil Cooper de Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA.
- El suero anti-factor B humano se obtuvo de una fuente comercial (Sigma).
- El colorante DNA-33258 de Hoechst fue utilizado para detectar Mycoplasma en los cultivos celulares.

REDUCCION DEL TITULO DEL COMPLEMENTO HEMOLITICO

Con el objeto de medir la cantidad de complemento consumido por una concentración de 2×10^6 células Vero, TRA-284 y LLC-MK₂ tanto normales como infectadas con la cepa NG-C a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 a 1 durante 6 días, se incubaron con SHN diluido 1:10 durante 1 hora a 37°C; posteriormente se determinó la cantidad de SHN que lisaba al 50% de eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina (1:25000), por incubación de diferentes diluciones del SHN con los eritro-

citios sensibilizados durante 60 min a 37°C. Después de este período la suspensión se centrifugó a 400 x g por 10 min y el sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro a 541 nm.

DETECCION DE LOS COMPONENTES C1 y C3

Aproximadamente 2×10^6 células TRA-284 y Vero (normales e infectadas después de 6 días) se incubaron con SHN durante 30 min a 37°C, posteriormente se lavaron con amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 7.6 (PBS) y se gotearon sobre un portaobjetos de teflón con horadaciones, las células se secaron al aire y se fijaron en acetona fría durante 10 min.

Las células fijadas se incubaron 30 min a 37°C con una dilución 1:50 de suero de conejo anti C1 o anti C3 humano acoplado a FITC, en ambiente húmedo. Finalmente se lavaron con PBS durante 10 min y se observaron con un microscopio de epifluorescencia.

DETECCION DE LOS PRODUCTOS DE DESDOBLAMIENTO DE C3 POR INMUNOELECTROFORESIS CRUZADA

La medición de los productos de conversión del componente C3 del C se realizó mediante la inmunoelectroforésis cruzada, de la siguiente manera: Para la electrofóresis en la primera dimensión se utilizaron cristales de 20.5 x 11 cm con una capa de agarosa al 1% en amortiguador de barbital 0.05 M, pH 8.6. El corrimiento se realizó con 350 Volts/50-60 mA a 4°C durante 180

min. El segundo corrimiento fue perpendicular al primero en agarosa al 1% conteniendo una concentración de 4 ul/ml de suero de cabra anti C3 humano, con 200 V/10-15 mA a 4°C durante 16 horas. Los geles fueron lavados, secados y teñidos con azul de Coomassie.

DETECCION DEL FACTOR B MEDIANTE INMUNOELECTROFORESIS

Células TRA-284 obtenidas al sexto día de post-infección con la cepa NG-C, a una concentración de 2×10^6 , se lavaron una vez con PBS y se incubaron una hora a 37°C con SHN. Después de centrifugar a 800 x g se tomaron del sobrenadante 50 ul y se corrieron por inmunolectroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en amortiguador Tris-barbital pH 8.6 que se sometió a 3 mA durante 60 min. Después de este periodo, se agregaron en el canal intermedio 100 ul de suero anti factor B diluido 1:1 en PBS y se procedió a incubar por 12 a 18 h a temperatura ambiente en cámara húmeda.

INHIBICION DE LA GLICOSILACION DE LAS PROTEINAS VIRALES

Con el objeto de conocer las condiciones adecuadas para inhibir solamente la glicosilación sin afectar la síntesis de las proteínas virales, se realizaron los siguientes experimentos: a) Una concentración de 2×10^6 células Vero se infectaron con la cepa NG-C del virus a una MOI de 0.1 y a partir del tiempo inicial de infección se le adicionó al medio de cultivo una concentración de 2.5 ug/ml de tunicamicina (TM), antibiótico

que inhibe la formación de intermediarios de N-acetil-glucosamina-lípido, quienes actúan como donadores de azúcar en la cadena naciente de proteína (28,29). Los cultivos se incubaron a 37°C y a diferentes tiempos (24,48,72,96 y 120 horas), se retiró el inhibidor de la glicosilación y se añadió medio fresco. Al sexto día de infección, las células se cosecharon, se lavaron 2 veces con PBS y mediante la técnica de fluorescencia directa, utilizando un anticuerpo anti-Dengue acoplado a FITC, se determinó el número de células que expresaban antígenos virales.

b) En un segundo experimento se infectaron células Vero con la misma cepa viral, pero la TM se adicionó a diferentes tiempos (0,48,72 y 96 horas). Nuevamente se observó el porcentaje de células fluorescentes. c) Finalmente, en un tercer experimento, a los cultivos infectados se les adicionó el inhibidor alrededor de las 72 h de post-infección y a diferentes tiempos (24,38 y 44) se retiró la TM y se adicionó medio fresco.

EXTRACCION DE GLICOPROTEINAS

Se infectaron 2×10^7 células Vero con 1 MOI de la cepa NG-C, se permitió la adsorción del virus durante 1 h a 37°C y se le adicionó medio de mantenimiento (MEM con 2% de SFT). A las 72 h de infección el medio de cultivo se sustituyó por MEM que contenía 3 ug/ml de actinomicina D y 1/100 de la concentración normal de glucosa. A las 75 h de infección se dió un pulso de 125 uCi/ml de manosa tritiada ($[^3\text{H}]$ -manosa) durante 3 horas, cosechándose posteriormente las células. Se lavaron 2 veces

con PBS a 4°C y se resuspendieron en 5 ml de la solución I disruptora (Tris-acetato, 10 mM pH 7.6; acetato de magnesio, 0.5 mM; ditioneitol, 1.0 mM; triton X-100, 1% y desoxicolato de sodio, 0.5%). Las células se homogeneizaron y se adicionó un volumen igual de solución II (Tris-acetato, 10 mM pH 7.6; acetato de magnesio, 0.5 mM; ditioneitol, 1.0 mM, y cloruro de sodio, 1.0 M). Se centrifugó a 10,000 x g durante 2 min a 4°C en un rotor SS-34 (Sorvall). Al sobrenadante se le midió la concentración de proteínas y se almacenó en alicuotas de 1 ml. Cada alicuota se agregó a 100 ul de un paquete de concanavalina A - sefarosa 4B (Pharmacia), previamente lavado 3 veces con solución II, y se mezcló uniformemente durante 90 min a temperatura ambiente (T.A.) en agitación constante. Se agregaron 25 ul de Con A - sefarosa fresca por cada ml de homogenado y se incubó 30 min más. Posteriormente se centrifugó 1 min a 8000 x g y el sobrenadante se descartó. El paquete de Con A - sefarosa se resuspendió en 1 ml de solución II, se mezcló 15 min a T.A. y se centrifugó nuevamente. Ahora, el paquete fue resuspendido en 1 ml de SDS al 0.1%, se mezcló 15 min a T.A. y se centrifugó. Finalmente la elución de las glicoproteínas se realizó agregando al paquete 1 ml de amortiguador de electroforesis (5% SDS, 0.7 M de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.01% de azul de bromofenol) que contenía 8 M de urea y 5 mM de EDTA. Se mezcló vigorosamente, se hirvió 3 min y se centrifugó 5 min a 8000 x g. A las fracciones se les midió la radioactividad y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida, además de medir su capacidad de activar la vía alterna del c.

ELECTROFORESIS DE LAS GLICOPROTEINAS

Las glicoproteínas extraídas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% durante 207 min a 30 mA. Un gel fue teñido con azul de Coomassie y el otro gel fue transversalmente seccionado en fracciones de 2 mm; cada una de ellas fue solubilizada en N.C.S. (Amersham/Searle) 0.6 N a 35°C durante 18 horas y posteriormente se les adicionó 15 ul de ácido acético y 5 ml de líquido de centelleo (New England Nuclear).

DETERMINACION DE LA ACTIVACION DE LA VIA ALTERNA DEL COMPLEMENTO POR EL METODO DE ELISA

Las placas de microtitulación (Immunolon II) fueron sensibilizadas con 50 ul/pozo de una suspensión de células Vero normales o infectadas en amortiguador de carbonatos pH 9.6. Las placas se bloquearon durante 2 horas a T.A. con 200 ul/pozo de PBS-BSA al 1%. Después se adicionaron 100 ul/pozo de SHN quelado con 2.5 mM de $MgCl_2$ y 0.1 M de ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), durante 30 min a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS que contenía BSA al 0.05% y Tween 20 al 0.05%. Se adicionaron posteriormente 100 ul/pozo del anticuerpo monoclonal anti-C3b biotinilado (Mab 29, 1 ug/ml) y se incubaron 60 min a T.A.; posteriormente se lavaron 3 veces con PBS-BSA-Tween 20 y se agregaron 100 ul/pozo de la enzima estreptoavidina - peroxidasa (dil 1:1000), se incubaron a TA durante 30 min y se lavaron 5 veces con PBS-Tween 20. Finalmente, se añadieron 50 ul/pozo del sustrato ortofenilendiamina (Sigma, 1 ug/ml y 4 ul/ml de

H₂O₂ en amortiguador de citratos pH 4.5). La absorbancia se determinó después de 5 - 10 min a 492 nM.

INMUNOTRANSFERENCIA DE EXTRACTOS DE CELULAS INFECTADAS

Extractos de células infectadas durante 6 días con el virus del Dengue en presencia y ausencia de TM se analizaron en geles de poliacrilamida al 10%. Estos se pre-equilibraron en amortiguador de transferencia (25 mM de Tris, 192 mM de glicina y 20% de metanol, pH 8.3) durante 30 min. A continuación se colocó encima del gel un papel de nitrocelulosa previamente húmedo, se aplicaron las esponjas y los papeles filtros y se introdujeron en la cámara. La transferencia de proteínas se realizó a 150 V/0.47 A durante 60 min en frío y el papel transferido se dejó bloqueando con PBS-BSA al 1% 18 h a 4°C. Una parte del papel se incubó con una dilución 1:50 de anticuerpo anti-Dengue previamente purificado por cromatografía de intercambio iónico (30), durante 1 h a T.A. y posterior a un lavado exhaustivo se incubó con suero anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma) durante 60 min a T.A.

El resto de papel de nitrocelulosa, primeramente se incubó con SHN previamente quelado durante 1 hora y posteriormente se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-C3b durante 60 min. En seguida, el papel se incubó con la enzima estreptoavidina peroxidasa (1:1000) 30 min a T.A. Finalmente, las bandas de protei-

nas fueron reveladas con 4-Cloro 1-Naftol (50 mg, metanol 10 ml, PBS 50 ml y H₂O₂ 50 ul).

RESULTADOS

Los distintos estudios sobre el virus del Dengue y su efecto en la activación del C indican que existe un incremento del catabolismo del componente C3 en muestras de suero de los pacientes con FHD/DSS (17). Ambas vías, clásica y alterna, se han visto involucradas en la activación masiva del C (18). Para poder analizar diferencias en el grado de consumo del C por las diferentes cepas virales, era necesario contar con un método que reprodujera la mayor capacidad de consumo por cultivos infectados en relación con sus controles no infectados.

Después de demostrar la expresión de proteínas virales en la membrana citoplásmica de los cultivos infectados, se midió su capacidad para consumir C mediante varios métodos.

La Figura 3 muestra un menor porcentaje de eritrocitos de carnero lisados por el sobrenadante de células Vero y TRA-284 infectadas (17.3 y 14.5% de lisis) al compararlos con sus controles no infectados (26.1 y 24.2% respectivamente). Sin embargo, sólo la línea celular Vero mostró una diferencia significativa entre las células infectadas y sus controles normales ($p < 0.01$), lo que indica un mayor consumo del C por parte de las células infectadas. A pesar de haber modificado las condiciones experimentales, no fue posible incrementar la diferencia de casi 10.0%. Esta diferencia, no se observó en la línea celular LLC-MK₂ (25.0 vs 26.1% de lisis).

En la Tabla 1 se muestra la capacidad tanto de cultivos celulares de mamífero como de mosquito para fijar componentes del C en su superficie. Es evidente que en las condiciones experimentales descritas, tanto los cultivos normales como los infectados, son incapaces de fijar el componente C1. Sin embargo, se observa que el componente C3 es fijado en un porcentaje ligeramente mayor por las células infectadas.

Con el propósito de establecer una diferencia más clara entre los cultivos infectados y los normales, se midieron mediante inmunoelectroforesis los productos de desdoblamiento del factor B (C3 proactivador), uno de los componentes de la vía alterna del C. Como control positivo se utilizó el SHN tratado con una concentración de 1-2 mg/ml de zymosan (Zy) (31). Como se observa en la Figura 4a, el SHN incubado con Zy produce 2 bandas de precipitación (Ba, Bb) al revelarse con el suero anti-factor B. Sin embargo, el mismo patrón de bandeo se presenta cuando el SHN se incuba con células normales (Fig. 4f) y con células infectadas al segundo y sexto días de post-infección (Fig. 4b,d). Este patrón es diferente del que presenta el SHN control, donde solamente se observa un arco (Figs. 4c y 4e).

De la misma forma, se pudo observar por inmunoelectroforesis cruzada una mayor conversión del C3 cuando SHN fue incubado con extractos de células normales o infectadas que se concentraron previamente con polietilenglicol (Fig. 5).

Para estudiar la participación de las glicoproteínas virales en la activación de la vía alterna del C, se inhibió la glicosilación viral utilizando TM y se evaluó su efecto en las células infectadas por medio de un anticuerpo anti-Dengue marcado con FITC. Como se observa en la Tabla 2A, es necesario que la TM permanezca en el cultivo alrededor de las 72 h de post-infección para inhibir la expresión de glicoproteínas virales en la membrana citoplásmica de la célula infectada. También se observa que existe expresión de las glicoproteínas virales si se adiciona el inhibidor después de 96 h de la infección (Tabla 2B), indicando que para éste tiempo ya se había iniciado la glicosilación de las proteínas virales. Para conocer el tiempo necesario para evitar la adición de carbohidratos a la proteína, se adicionó la TM a las 72 h de infección y se cambió a medio fresco a los tiempos indicados en la Tabla 2C, mostrando que la TM adicionada a las 72 h ejerce su efecto inhibitor de la glicosilación en un intervalo de 24 h y por tanto es el momento adecuado para evitar la glicosilación de las proteínas. Como resultado de estos estudios, en los siguientes experimentos la inhibición de la expresión de glicoproteínas en células infectadas, se realizó por la adición de TM a los cultivos durante todo el ciclo de infección, de esta forma las células infectadas no reaccionaron al incubarse con un suero anti-Dengue conjugado con FITC (Fig. 6).

Cuando se realizaron estudios de electroforesis para determinar el desdoblamiento de C3 con células infectadas en presen-

cia y ausencia de TM se observó que las células a las que se les adicionó el inhibidor se comportaron igual que los cultivos no infectados (Fig. 7). Por otro lado, empleando el método de ELISA descrito por Mold y col. (32), que determina la activación de la vía alterna del C, se evidencian diferencias importantes en el grado de fijación de C3b en los cultivos infectados con la cepa NG-C ($p < 0.01$ y con la cepa Mexicana ($p < 0.001$) en presencia ó ausencia de TM (Figura B). Sin embargo, no se observa una diferencia significativa con la cepa 1169-Indonesia, aunque tiende a comportarse en forma similar; es decir, se observa un aumento de captación de C3b por los cultivos infectados al compararlo con su control normal y dicho aumento se pierde o por lo menos disminuye al adicionar el inhibidor (Fig. 8).

Los experimentos anteriores sugieren la participación de alguna o algunas glicoproteínas virales en la activación de la vía alterna del C, por lo que investigamos cuál de ellas era la responsable del fenómeno. Para ello, 2×10^7 células Vero infectadas con la cepa viral NG-C, se marcaron con [^3H]-manosa y mediante el procedimiento descrito por Poliquin y col. (33) se extrajeron las glicoproteínas, para posteriormente determinar su capacidad de fijar C3b. El extracto proveniente de cultivos Vero infectados mostró una mayor degradación de C3, como lo muestra la fijación de C3b y C3bi, que las provenientes de extractos no infectados ($p < 0.01$) (Fig. 9). Ambos extractos de glicoproteínas fueron separados en geles de poliacrilamida. Al ser teñidos con azul de Coomassie no se encontraron diferencias

en sus patrones electroforéticos; sin embargo, la incorporación de la marca radioactiva se observó únicamente en el extracto de células infectadas (Fig. 10). Asimismo, la marca radioactiva se distribuyó fundamentalmente en la región de 46 y 59 kDa. Los estudios de inmunotransferencia mostraron que una de las glicoproteínas transferidas a papel de nitrocelulosa y ensayadas inmunoenzimáticamente fijaba el componente C3b. Como se observa en la Figura 11, existe captación de C3b y/o C3bi en la región de la glicoproteína de 60 kDa, pero no en la región de 46 kDa.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados que aquí se reportan indican que el virus del Dengue, serotipo 2, activa la vía alterna del C a través de una glicoproteína de 60 kDa. Las cepas utilizadas obtenidas de pacientes con Dengue primario (NG-C y Mexicana) activan significativamente la vía alterna del C mientras que la obtenida de un caso fatal de Dengue secundario (1169-Indonesia), aunque mostró un patrón similar, lo hizo a niveles no significativos.

Se utilizaron diferentes técnicas con el propósito de diferenciar el grado de consumo del complemento entre cultivos celulares normales e infectados con el serotipo 2 del virus del Dengue, así como para determinar si existen variaciones importantes entre las cepas virales de diferente origen (casos de Dengue primario o secundario), ya que de acuerdo a la hipótesis de Rosen y col. (34) y Sumarmo y col. (35), la virulencia aumenta dependiendo de los pases sucesivos en un huésped susceptible. La cascada del C puede ser activada *in vitro* por la IgA humana e IgG agregada, así como por ciertas glicoproteínas y lipopolisacáridos (36). Igualmente, se han reportado diversos cultivos celulares infectados con virus (21,11), y bacterias (37) y parásitos (38,39) capaces de activar la vía alterna del C en ausencia de anticuerpo específico. Churdboonchart y col. (25) encontraron por inmunoelectroforesis cruzada que la cepa NG-C del serotipo 2 del virus del Dengue ocasionaba un desdoblamiento de C3, 20% mayor que el de sus controles normales. En

nuestro estudio, no pudimos obtener diferencias en el grado de consumo del C entre cultivos normales e infectados mediante las técnicas de electrofóresis para determinar productos de degradación del factor B (Fig. 4) y la presencia de los componentes del C (C1 y C3) en la membrana de las células Vero (Tabla 1). Sin embargo, con células Vero infectadas con la cepa NG-C y en menor proporción con la cepa Mexicana obtuvimos diferencias similares o aún mayores a las reportadas, mediante los métodos de consumo del complemento hemolítico CH-50 (Fig. 3), y de ELISA para determinación de C3b y/o C3bi (Fig. 9).

En los ensayos de CH-50 no se observó ninguna diferencia importante al emplear la línea celular LLC-MK². La presencia de Mycoplasma en ésta línea celular, verificado por la tinción con el colorante DNA-33258 (40), podría explicar este resultado, ya que se ha mencionado al ADN como activador no inmunológico de la vía clásica del C (41).

Los diferentes requerimientos de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺, se utilizaron como herramienta para determinar la activación de la vía alterna del C. Se sabe que mientras ambos cationes son necesarios para la activación de la vía clásica, sólo se necesita el Mg⁺⁺ para la activación de la vía alterna. Por lo tanto, el bloqueo con un agente quelante como el EGTA en presencia de MgCl₂, restaura la vía alterna pero no la clásica.

Entre los activadores virales de la vía alterna del C identificados hasta ahora se pueden mencionar a la proteína

P15E, proteína de envoltura de 15 kDa de los retrovirus (42) y la gp350, una glicoproteína también de envoltura del virus Epstein-Barr (32). De las 15 proteínas virales detectadas en cultivos infectados con la cepa NG-C del virus, aproximadamente 4 a 5 son glicoproteínas (43), por lo que alguna de ellas podría ser un buen candidato para activar la vía alterna del C. El aumento en la captación de C3b obtenido en los cultivos infectados se pierde al adicionar la TM. En estudios preliminares hemos observado que las cepas Mexicana y 1169-Indonesia, aisladas de un caso de Dengue primario y de un caso de Dengue secundario respectivamente, cultivadas en presencia de TM presentan una activación limitada de la vía alterna del C, en contraste con los mismos cultivos en ausencia de TM, los cuáles presentan hasta un 27% más de degradación de C3 (datos no incluidos). Los resultados obtenidos con la TM muestran claramente la participación de por lo menos alguna glicoproteína viral en el fenómeno de activación del C. Este aspecto también se confirma con el mayor consumo del C por los cultivos infectados después de haberse extraído las glicoproteínas (Fig. 9).

Por otro lado, la transferencia a papel de nitrocelulosa de glicoproteínas extraídas a partir de cultivos infectados en presencia o ausencia de TM, nos muestra la movilidad electroforética diferente de la gp60 en presencia (Fig. 11, carriles 3,4) o ausencia (carriles 1,2) del inhibidor de la glicosilación. Estos cambios en la movilidad pueden explicarse en función de la diferencia en el contenido de carbohidratos (43).

La falta de detección de C3b y C3bi en la región de 46 kDa nos indica que la gp 46, también conocida como NV3 o SCF (6), no tiene la capacidad de activar la vía alterna del C; sin embargo, estos resultados no descartan la participación de proteínas adicionales no detectadas por nosotros en el fenómeno de activación.

La notable disminución en la intensidad de la banda en la región de 66 kDa en las muestras con TM nos indica la necesaria participación del carbohidrato en la activación. El fondo de consumo o activación del C tan elevado en los cultivos normales observado en la mayoría de los métodos utilizados, creemos se debe a glicoproteínas con pesos moleculares mayores de 60 kDa propias de las células normales, como se puede observar en todos los carriles en la región por arriba de la gp60 (Fig. 11, carriles 1,2,3 y 4).

Las pequeñas diferencias observadas en el grado de activación del C, entre las cepas virales aisladas de casos de Dengue primario y secundario, creemos que se deben a las condiciones experimentales utilizadas, tales como línea celular, concentración celular, cinéticas de crecimiento viral, tiempo de incubación con el SHN, y concentración del inhibidor de la glicosilación.

Al no demostrar una mayor capacidad de activación del C por la cepa 1169-Indonesia, en relación a las cepas aisladas de casos de Dengue primario (NG-C, Mexicana), nos sugiere que la

hipótesis de la infección secuencial (13) será la más adecuada para explicar los casos de DHF/DSS. Sin embargo, recientemente Kouri GP y col. (44) reportaron, en base a la experiencia cubana de 1981 (45), que ninguna de las 2 hipótesis aceptadas actualmente, pueden explicar todos los casos graves de la enfermedad; y proponen la coincidencia de factores epidemiológicos, virales e individuales para que un brote de DHF/DSS ocurra.

Los resultados que aquí se reportan indican: (a) la capacidad del virus del Dengue para activar la vía alterna del C; (b) la participación de la glicoproteína GP-60 como responsable del fenómeno de activación, y (c) la capacidad de activación del C de todas las cepas virales, independientemente de su origen.

BIBLIOGRAFIA

1. Halstead SB. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XI. Dengue. *Rev Infect Dis*, 1984; 6:251-264.
2. Monath TP. Pathobiology of the Flaviviruses. En: *The Togaviridae and Flaviviridae*. Schlesinger S, Schlesinger M (Eds) NY. Plenum Press, 1986: 375-440.
3. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SY. *Flaviviridae*. *Intervirolgy*, 1985; 24: 183-192.
4. Khin MN, Than KA. Transovarial transmission of Dengue 2 virus by *Aedes Aegypti* in Nature. *Am J Trop Med Hyg*, 1983; 32: 590-594.
5. Centers for Disease Control. Update: *Aedes Albopictus* infestation: United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 1986; 35: 649-651.
6. Russell PK. Chemical and Antigenic Structure of Flaviviruses. In: *The Togaviruses; Biology, structure, replication*. Shlesinger RW (Ed). Academic Press, 1980: 503-529.
7. Rice ChM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for Flavivirus gene expression and evolution. *Science*, 1985; 229: 726-733.
8. Organización Panamericana de la Salud. *Boletín Epidemiológico*. El Dengue en las Américas 1983. 1984; 5: 5: 1-3.
9. Carrada BT, Plaza LJ. El Dengue en México. Nota Preliminar. *Rev Med IMSS (Méx)*, 1986; 24: 65-70.
10. *Epidemiología*. Sistema Nacional de Salud. México. 1988. 3(6): 58-66.
11. Rosen L. The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of Dengue haemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*, 1977; 26: 337-343.
12. Pavri KM. *Indian J Med Res*, 1976; 64: 713.
13. Halstead SB. The pathogenesis of Dengue. *Molecular Epidemiology in infection disease*. *Am J Epidemiol*, 1981; 5: 636-648.

14. Halstead SB. Immunological parameters of Togavirus disease syndromes. In: The Togavirus, Biology, Structure, Replication. Shlesinger RW (Ed) Academic Press, 1980: 107-173.
15. Halstead SB. In vivo enhancement of Dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. J Infect Dis, 1979; 140: 527-533.
16. World Health Organization. Guide for diagnosis, treatment and control for Dengue haemorrhagic fever. 2nd Ed. Manila: WHO, 1980.
17. Bokisch VA, Top FH, Russell PK, Dixon FJ, Muller-Eberhard HJ. The potential pathogenic role of complement in Dengue Hemorrhagic Schock Syndrome. N Engl J Med, 1973; 289: 996-1000.
18. Churdboonchart V, Bhamarapravati N, Futrakul P. Crossed immunoelectrophoresis for the detection of split products of the third complement in Dengue Hemorrhagic fever. I. Observations in patients plasma. Am J Trop Med Hyg, 1983; 32(3): 569-576.
19. Halstead SB. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. Science, 1988; 239: 476-481.
20. Scott RM, Nimmannitya S, Bancroft WH, Mansuwan P. Shock Syndrome in primary Dengue infection. Am J. Trop Med Hyg, 1976; 25: 874-886.
21. Sissons JG, Oldstone MB, Schreiber RD: Antibody-independent activation of the alternative complement pathway by measles virus-infected cells. Proc Natl Acad Sci. USA, 1980; 77(1): 559-562.
22. McConnell I, Klein G, Lin TF, Lachmann PJ. Activation of the alternative complement pathway by human B cell lymphoma lines is associated with Epstein-Barr virus transformation of the cells. Eur J Immunol, 1978; 8: 453-458.
23. Cooper NR, Jensen FC, Welsh RM, Oldstone MB. Lysis of RNA tumor viruses by human serum: Direct antibody-independent triggering of the classical complement pathway. J Exp Med 2976; 144: 970-981.
24. Norley SG, Wardley RC. Complement-mediated lysis of African Swine fever virus-infected cells. Immunology, 1982; 46: 75-82.

25. Churdboonchart V, Bhamarapavati N, Yoksan S. Crossed immunoelectrophoresis for the detection of split products of the third complement component in Dengue Hemorrhagic fever. II. In vitro activation by Dengue viral antigen. *Am J Trop Med Hyg*, 1984; 33(6): 1239-1247.
26. Russell PK. A plaque reduction test for Dengue virus neutralizing antibodies. *J Immunol*, 1967; 99: 285-291.
27. Klebe RJ, Harris JV. A technically simple "Non-lethal" viral staining procedure for viral plaque and cell transformation assays. *Arch Virol*, 1984; 81: 359-362.
28. Schwarz RT, Rohrschneider JM, Schmidt FG. Suppression of glycoprotein formation of Semliki Forest, Influenza and Avian Sarcoma virus by tunicamycin. *J. Virol*, 1976; 19: 782-791.
29. Musalem C, Espejo RT. Release of progeny virus from cells infected with Simian Rotavirus SA11. *J gen Virol*, 1985; 66: 2715-2724.
30. Himmelhoch RS. Chromatography of proteins on Ion-exchange adsorbents. *Methods in Enzymology*, 1971; 22: 273-286.
31. Schenkein HA, Ruddy S. The role of immunoglobulins in alternative pathway activation by zymosan. II. The effect of IgG on the kinetics of the alternative pathway. *J Immunol*, 1981; 126(1): 11-15.
32. Mold C, Bradt BM, Nemerow GR, Cooper NR. Activation of the alternative complement pathway by EBV and the viral envelope glycoprotein, gp350. *J Immunol*, 1988; 140(11): 3867-3874.
33. Poliquin L, Shore GC. A method for efficient and selective recovery of membrane glycoproteins from concanavaline A-Sepharose using media containing sodium dodecyl sulfate and urea. *Analytical Biochemistry*, 1980; 109: 460-465.
34. Rosen L. Dengue - an overview. In: *Viral diseases in South East Asia and the Western Pacific*. Australia. Academic Press, 1982: 484-493.
35. Sumarmo WH, Tahja E, Gubler DJ, Suharyono W, Sorensen K. Clinical observations on virologically confirmed fatal dengue infection in Jakarta, Indonesia. *Bulletin of the World Health Organization*, 1983; 61: 693-701.
36. Cooper NR. Activation and regulation of the first complement component. *Federation Proc*, 1983; 42: 134-138.

37. Hummell DS, Swift AJ, Tomasz A, Winkelstein JA. Activation of the alternative complement pathway by Pneumococcal Lipoteichoic acid. *Infection and Immunity*, 1985; 47(2): 384-387.
38. Ortiz-Ortiz L, Capin R, Capin NR, Sepulveda B, Zamacona G. Activation of the alternative pathway of complement by Entamoeba histolytica. *Clin exp Immunol*, 1978; 34: 10-18.
39. Pearson RD, Steigbigel RT. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *J Immunol*, 1980; 125: 2195.
40. Steiner T, McGarrity G. Mycoplasmal infection of insect cell cultures. *In vitro*, 1983; 19(2): 672-682.
41. Cooper NR. Activation of the complement system. *Contemp Top Mol Immunol*, 1973 2: 155.
42. Bartholomew RM, Esser AF, Muller-Eberhard HJ. Lysis of oncornaviruses by human serum. *J Exp Med*, 1978; 147: 844-853.
43. Smith GW, Wright PJ. Synthesis of proteins and glycoproteins in Dengue type 2 virus-infected Vero and *Aedes albopictus* cells. *J gen Virol*, 1985; 66: 559-571.
44. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1987; 81: 821-823.
45. Kouri GP, Más P, Guzman MG, Soler M, Goyenechea A, Morier. Dengue hemorrágico en Cuba, 1981. Diagnóstico rápido del agente etiológico. *Boletín Of San Panam*, 1982; 93: 414-420.

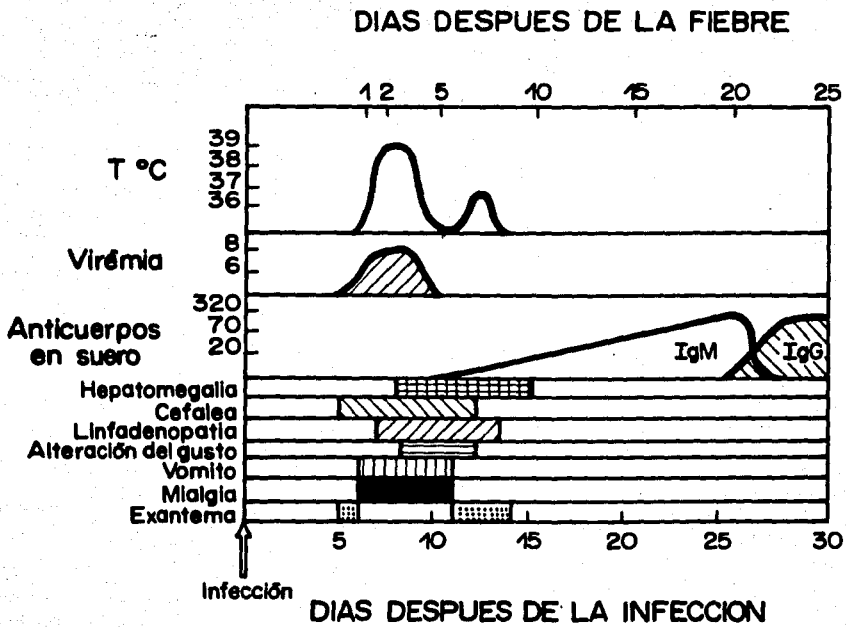


Figura 1. Evolución clínica del Dengue clásico o primario.

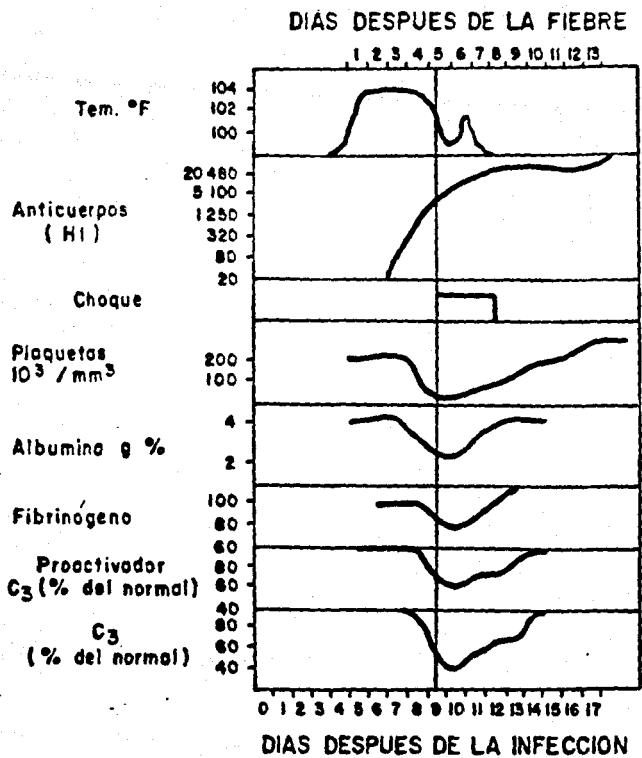


Figura 2. Esquema que indica los datos clinicos y de laboratorio tipicos de casos representativos de DSS.

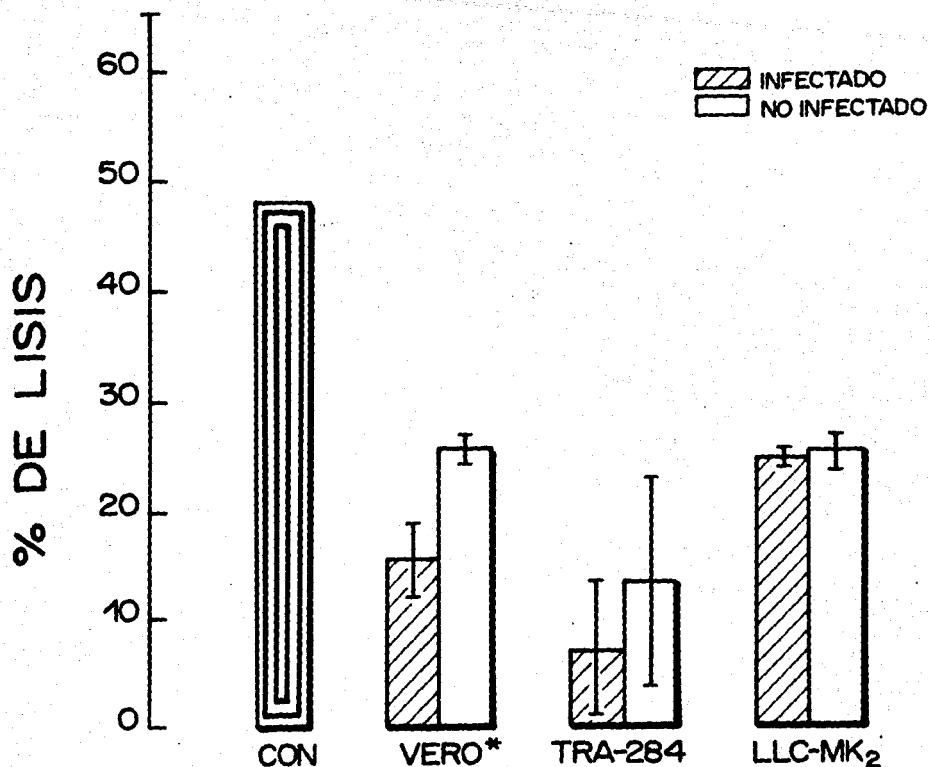


Figura 3. Reducción del título del Complemento hemolítico (CH_{50}). Una concentración de 2×10^6 células normales e infectadas 6 días con la cepa NG-C, se incubaron con SHN diluido 1:10, como fuente de complemento, durante 1 h a $37^{\circ}C$. Posteriormente, la misma cantidad de suero de cada muestra se incubó, con eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina, durante otros 60 min a $37^{\circ}C$. Se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 541 nm.

Con, control.

* $p < 0.01$.

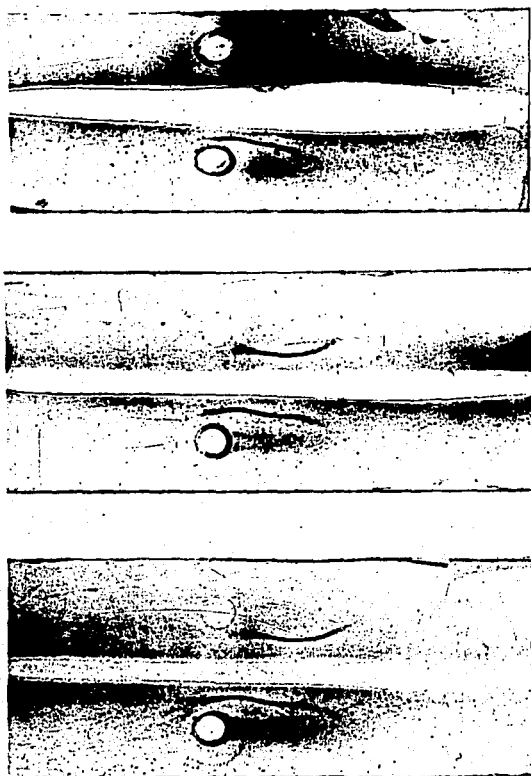


Figura 4. Conversión del Factor B en SHN por células TRA-284 normales e infectadas con la cepa NG-C del serotipo 2 del virus del Dengue. Se incubaron 2×10^6 células con SHN diluido 1:10 durante 60 min a 37°C . Del sobrenadante se tomaron 50 μl y se corrieron por inmunolectroforesis en agarosa al 0.8% durante 60 min a 3 mA/laminilla. Se reveló con suero anti-factor B diluido 1:1 en PBS y se tiñó con amido black al 2%. a) SHN + Zymosan; b) SHN + células al 60. día de infección; c) y e) SHN sólo; d) SHN + células al 20. día de infección y f) SHN + células normales.

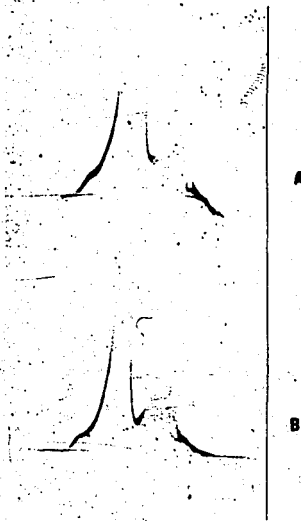


Figura 5. Determinación de la conversión de C3 por inmuno--electrofóresis cruzada en 200 ul del sobrenadante de SHN previamente incubado con 200 ug de extractos de células TRA-284 infectados con la cepa de Dengue NG-C (A) o de células normales (B).

% DE CELULAS FLUORESCENTES

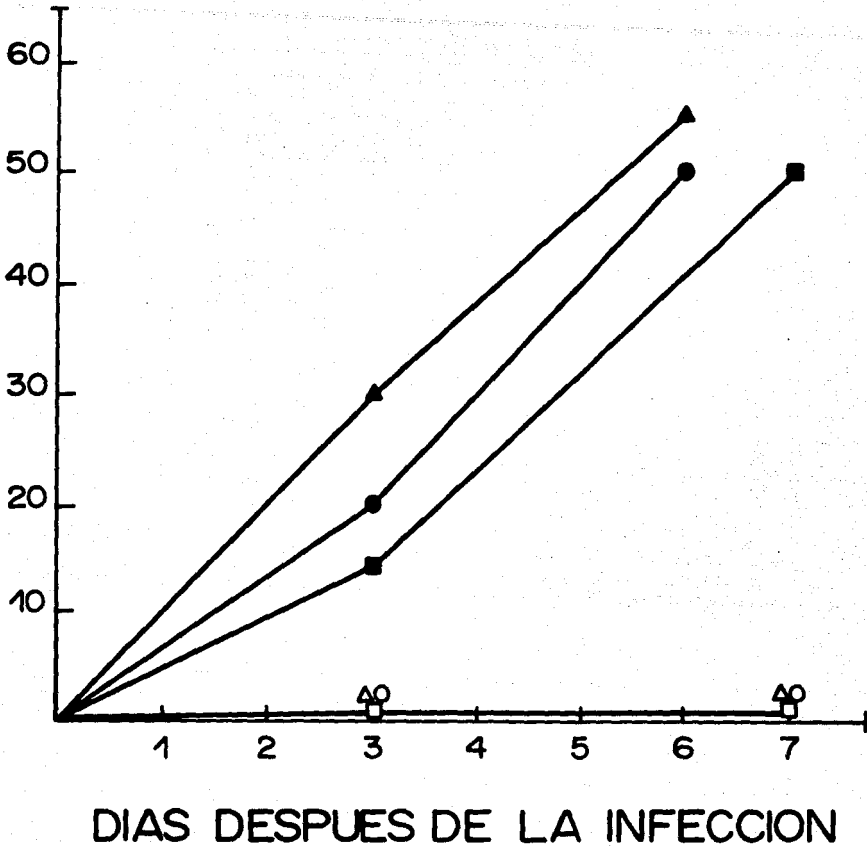


Figura 6. Efecto de la TM en la expresión viral de glicoproteínas en la membrana citoplásmica de células Vero infectadas con el serotipo 2 del virus del Dengue. Una concentración aproximada de 2×10^6 células fueron infectadas con una MOI de 0.1 de las cepas Mexicana ($\Delta \blacktriangle$), NG-C ($\circ \bullet$) ó 1169-Indonesia ($\square \blacksquare$) y durante el ciclo de infección se les adicionó TM (blancos) o PBS (oscuros). Un suero anti-Dengue conjugado con FITC se empleó para detectar la expresión de las glicoproteínas virales. Promedio de 3 campos con 100 células c/u.

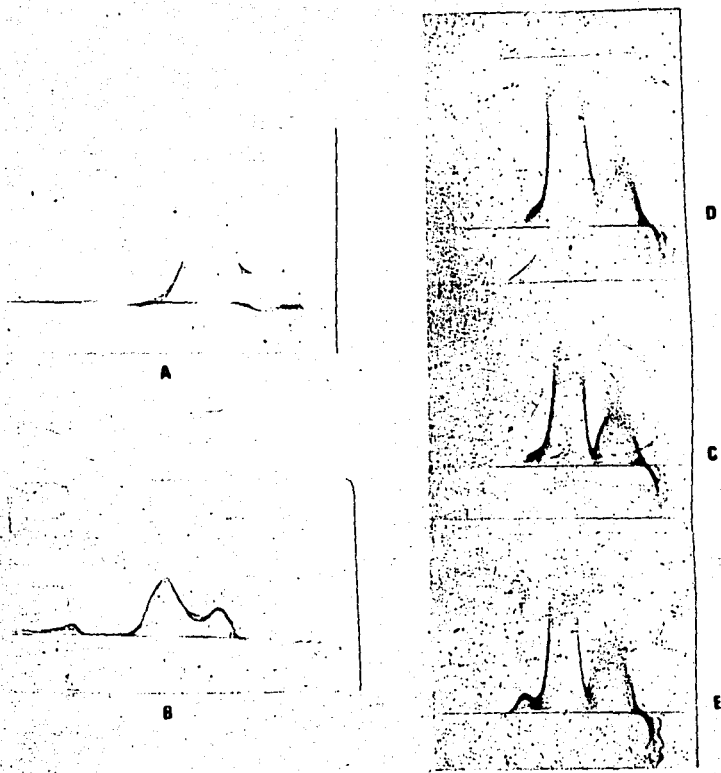


Figura 7. Electroferograma de C3 a partir de SHN incubado con antígeno viral. A) SHN incubado con PBS (control negativo); B) SHN incubado con ZYMOSAN (control positivo); C) SHN incubado con células TRA-284 normales durante 30 min; D) SHN incubado con cultivos infectados con la cepa 1169-Indonesia y E) SHN incubado con células infectadas con la misma cepa viral pero tratadas previamente con TM.

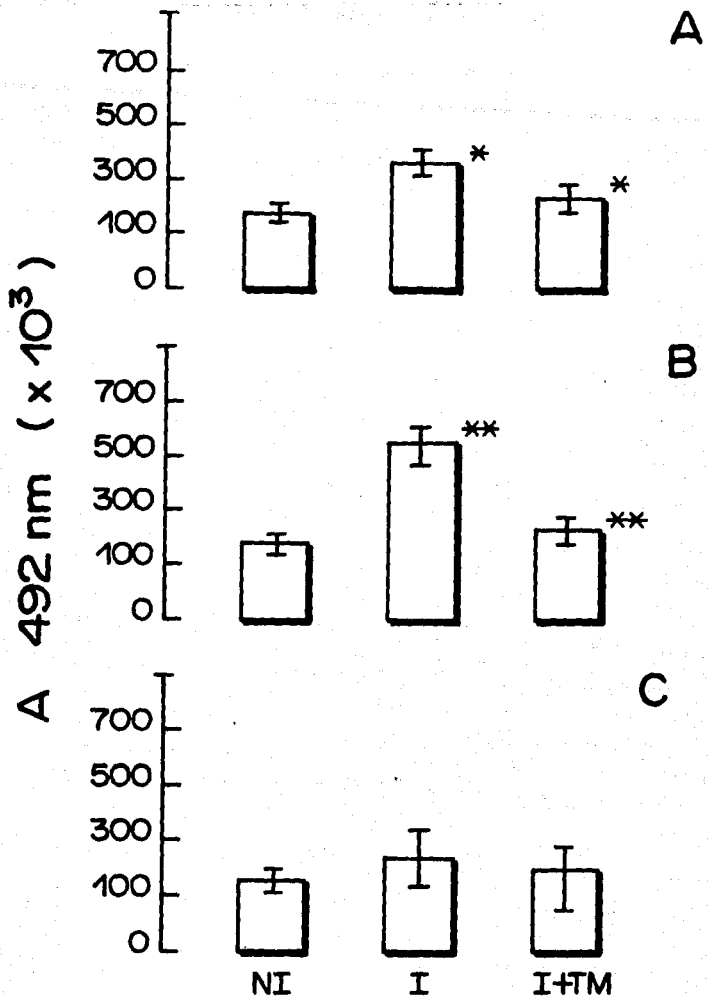


Figura 8. Activación de la vía alterna del C por tres cepas del virus Dengue-2. En experimentos por separado, 2×10^6 células Vero infectadas con las cepas NG-C (A), Mexicana (B) o 1169-Indonesia (C), en presencia o ausencia de 2.5 ug/ml de TM, se les midió la capacidad para degradar C3 y fijar C3b al 60. día de infección. NI, no infectado; I, infectado, y I+TM, infectado en presencia de TM.

* $p < 0.01$
 ** $p < 0.001$

ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

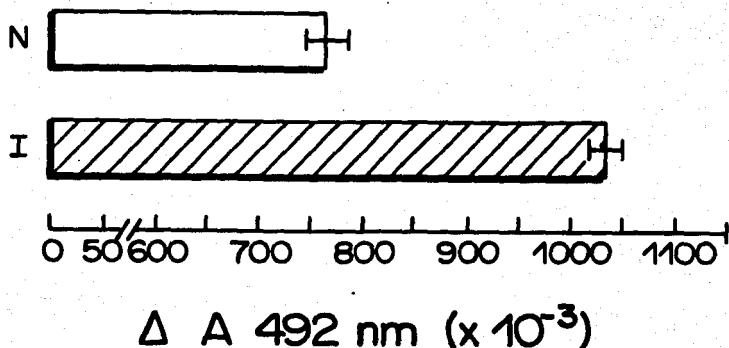


Figura 9. Detección de C3b y C3bi por glicoproteínas extraídas a partir de cultivos Vero normales e infectados con la cepa viral NG-C. A los cultivos se les dió un pulso de 3H-manosa durante 3 h y posteriormente se extrajeron las glicoproteínas como se indica en Material y Métodos. En cada pozo se añadieron 250 ng de proteína y se determinó por el método de ELISA la capacidad para fijar C3b. Como control negativo se utilizó PBS. La diferencia observada entre los grupos estudiados es significativa ($p < 0.01$). N, normal; I, infectado.

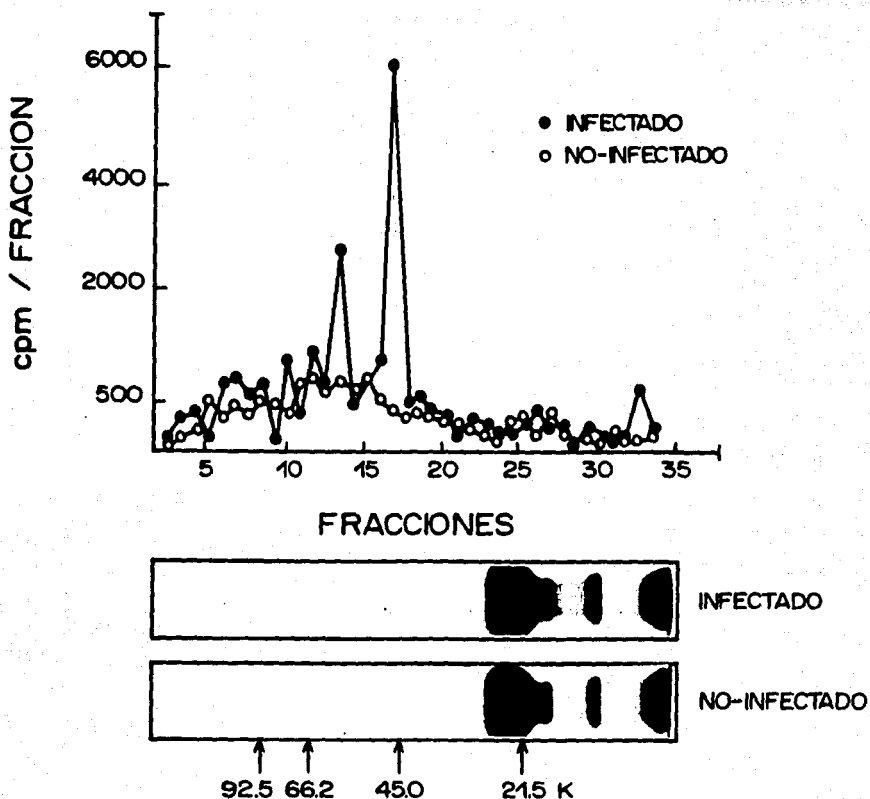


Figura 10. Patrón electroforético e incorporación de ^3H -manosa de las glicoproteínas extraídas a partir de células Vero normales e infectadas con la cepa viral NG-C. A 2×10^7 células normales e infectadas se les administró un pulso de ^3H -manosa durante 3 h; a continuación se lavaron con PBS y se extrajeron las glicoproteínas como se indica en Material y Métodos. Posteriormente fueron separadas en geles de poli-acrilamida al 12%, teñidas con azul de Coomassie, seccionadas en fracciones transversales de 2 mm cada una, solubilizadas en NCS 0.6 N y finalmente se midió la radioactividad contenida en cada fracción

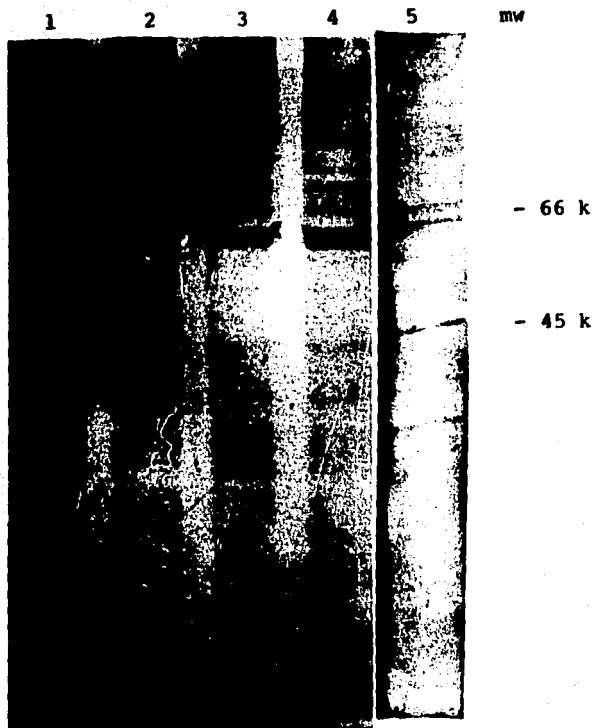


Figura 11. Electrotransferencia de glicoproteínas extraídas con Concanavalina A Sefarosa provenientes de células Vero infectadas con la cepa NG-C en presencia o ausencia de TM. Las glicoproteínas extraídas fueron transferidas a papel de nitrocelulosa y su capacidad para detectar C3b se midió por ELISA. Carril 1, cepa Mexicana; Carril 2, cepa NG-C; Carril 3, cepa Mexicana + TM; Carril 4, cepa NG-C + TM; Carril 5, células Vero infectadas con la cepa NG-C reveladas con suero anti-Dengue 2, purificado por cromatografía de intercambio iónico (DE-52) (30).

TABLA 1. UNION DE LOS COMPONENTES C1 y C3 DEL COMPLEMENTO A LA MEMBRANA CITOPLASMICA DE LAS CELULAS DE MOSQUITO Y DE MAMIFERO

Condiciones experimentales*	% de células fluorescentes	
	C1	C3
TRA-284 + SHN 1:10	0	40
TRA-284 + NG-C + SHN 1:10	0	50
TRA-284 + 1169-INDONESIA + SHN 1:10	0	50
VERO + SHN 1:10	0	35
VERO + NG-C + SHN 1:10	0	40
VERO + 1169-INDONESIA + SHN 1:10	0	40

* Una concentración aproximada de 2×10^6 células normales e infectadas (MOI: 0.1) se incubaron con SHN diluido 1:10 durante 30 min a 37°C. Después de un lavado con PBS se gotearon sobre un portaobjetos de teflón con horadaciones y se secaron y fijaron en acetona fría durante 10 min. Finalmente, se incubaron durante 30 min a 37°C con una dilución 1:50 de un suero de conejo anti C1 y anti-C3 humano conjugados con FITC. Promedio de 3 campos, con 100 células c/u.

TABLA 2. INHIBICION DE LA GLICOSILACION DE LAS PROTEINAS VIRALES EN CELULAS VERO INFECTADAS CON LA CEPA NG-C DEL SERO-TIPO 2 DEL VIRUS DEL DENGUE

EXPERIMENTO A			
Cepa viral NG-C	Tunicamicina t=0	Tiempo de eliminación de TM	Fluorescencia* (%)
+	+	24 h	30
+	+	48 h	15
+	+	72 h	0
+	+	96 h	0
+	+	120 h	0
-	-	0 h	0

EXPERIMENTO B		
Cepa viral NG-C	Tunicamicina (tiempo de adición, h)	Fluorescencia (%)
+	-	80
+	+ (0)	0
+	+ (48)	0
+	+ (72)	0
+	+ (96)	40

EXPERIMENTO C			
Cepa viral NG -C	Tunicamicina (adicionada a las 72 h)	Tiempo de eliminación de TM	Fluorescencia (%)
+	+	24 h	2
+	+	38 h	0
+	+	44 h	0
+	+	-	0
+	-	-	55

* Promedio de 3 campos, con 100 células c/u.