

PRESENÇA DE VÍRUS ENDÓGENO NA LINHAGEM CELULAR *Aedes ALBOPICTUS* CLONE C6/36 NÃO INFECTADAS

Maria Luisa BARBOSA*
Marli UEDA-ITO**
Iray Maria ROCCO***

RIALA 07/835

BARBOSA, M.L.; UEDA-ITO, M & ROCCO, I.M. — PRESENÇA DE VÍRUS ENDÓGENO NA LINHAGEM CELULAR *Aedes albopictus* CLONE C6/36 NÃO INFECTADAS. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 31-33, 1998.

RESUMO: As linhagens celulares obtidas a partir de larvas do mosquito *Aedes albopictus* apresentam-se naturalmente infectadas por vírus. O clone C6/36 dessas células, obtido por Igarashi em 1978, mostrou estar livre de vírus e tem sido usado para isolamento do vírus Dengue na maioria dos laboratórios especializados. Em nossos estudos com esse clone, após diferentes períodos de incubação, detectamos a presença de um vírus endógeno. Sobrenadante de cultura de células C6/36, após o 12o dia de repique, analisado por coloração negativa em microscopia eletrônica, revelou a presença de partículas virais sem envoltório, medindo cerca de 20 nm. Esse mesmo teste, quando realizado com células após o 2°, 6° e 10° dias de incubação, resultou negativo. As células também foram submetidas à imunofluorescência indireta utilizando anti soros para vários grupos de arbovírus. Os resultados foram negativos, descartando a possibilidade de contaminação laboratorial. A presença de vírus endógeno em células C6/36 pode ocorrer em diferentes laboratórios, sem ser detectada. Nossos resultados mostraram que esse vírus endógeno não influencia o isolamento do vírus Dengue e a replicação das células. Em razão da ausência de dados, o emprego dessas células para isolamento de outros vírus deve ser cuidadosamente avaliado.

DESCRITORES: linhagem celular clone C6/36; vírus endógeno; dengue.

INTRODUÇÃO

O estabelecimento de numerosas linhagens celulares possibilitou o avanço da pesquisa em diversas áreas, em particular a virologia. Linhagens celulares das mais diferentes origens, do homem aos insetos, são hoje obtidas com relativa facilidade. Em estudos com arbovírus, principalmente o vírus dengue, as linhagens celulares provenientes de mosquitos tiveram grande importância, pois apresentam maior sensibilidade a esse vírus que as de vertebrados sendo, ainda, de fácil crescimento e manutenção. SINGH & PAUL⁸ relataram pela primeira vez o isolamento do vírus dengue em cultura de células de *Aedes albopictus* estabelecidas por SINGH⁷. Desde então, várias linhagens celulares de diferentes mosquitos tem sido utilizadas para esse propósito. Estudos realizados com as células *Aedes albopictus* mostraram que podem apresentar-se

naturalmente infectadas por vírus (CUNNINGHAM et alii³; HIRUMI et alii⁶; BOUBLIK et alii¹). Clonagens realizadas por IGARASHI⁴, resultaram na obtenção do clone C6/36 livre de vírus, utilizado na maioria dos laboratórios que fazem isolamento do vírus Dengue.

Em estudos com o vírus Dengue, utilizando este clone, verificamos em controles negativos a presença de um vírus endógeno. Neste trabalho apresentamos alguns aspectos iniciais deste vírus e sua influência no isolamento do vírus Dengue.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de células

Os repiques para manutenção das células C6/36 foram feitos em tubos de ensaio e em garrafas de vidro

* Laboratório de Biologia Molecular

** Seção de Microscopia Eletrônica

*** Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos — Instituto Adolfo Lutz — São Paulo

de 250 ml, na concentração de 5×10^5 cél/ml. O crescimento foi em meio Leibovitz número 15 (L-15, SIGMA) modificado com 2,95% de "Tryptose Phosphate Broth"; Solução de aminoácidos não essenciais e 2% de L-Glutamina, reconstituído em água bidestilada, com pH ajustado com ácido clorídrico 0,1 M para 6.8 e suplementado com 10% de soro bovino fetal..

Períodos de incubação

As células foram incubadas por diferentes períodos: 2, 5, 9, 12, 14 e 16 dias à 28°C. Após cada período foram processadas para imunofluorescência e microscopia eletrônica.

Imunofluorescência indireta

As células foram removidas da parede dos tubos por agitação manual, centrifugadas a 1.500 rpm/10min., o sobrenadante desprezado, o sedimento ressuspendido em 0,1 ml de PBS e aplicado em lâminas próprias. Após secagem e fixação em acetona (-20°C/10 min.), as lâminas foram submetidas à imunofluorescência indireta, utilizando-se "pools" de fluido ascítico imuno anti alpha, flavi e bunyavírus e anti globulina total de camundongo conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (SIGMA).

Preparação das células para microscopia eletrônica

As células das garrafas foram rompidas por uma série de três congelamentos e descongelamentos rápidos e centrifugadas a 10.000 rpm/15min., em rotor 325 centrífuga SORVALL, para retirar os "debris" celulares. O sobrenadante foi ultracentrifugado a 25.000 rpm/90 min. em rotor SW-28 em ultracentrífuga BECKMAN L-8, o sedimento foi ressuspendido em 0,5 ml de PBS e analisado em microscopia eletrônica.

Microscopia eletrônica

O sobrenadante de células foi submetido à técnica de coloração negativa com fosfotungstato de potássio (PTK) a 2%, pH 6.8 e examinado em um microscópio eletrônico Philips EM-400T, operando a 80 kV (BRENNER et alli²).

RESULTADOS

Células da linhagem *Aedes albopictus* clone C6/36 inoculadas com vírus Dengue e células controle não infectadas incubadas em condições e períodos idênticos, foram enviadas para observação ao microscópio eletrônico. A microscopia eletrônica detectou a presença de partículas virais no sobrenadante dos controles a partir do 12º dia. Essas partículas eram numerosas, esféricas, sem envoltório e medindo cerca de 20 nm de diâmetro (Fig. 1), sendo perfeitamente distintas das partículas de

Dengue que possuem envoltório e medem cerca de 50 nm de diâmetro.

Em vista da importância do achado, o procedimento foi repetido mais três vezes, observando-se em todas as análises a presença dessas partículas nas células controles. Esses mesmos dados foram obtidos em estudos realizados com o clone C6/36 proveniente de outras instituições, confirmando os resultados.

Em todos os estudos realizados com C6/36 controle, não se observou qualquer alteração celular visível, após o repique, nos diferentes períodos de incubação.

A presença do vírus endógeno no clone C6/36 aparentemente não interferiu no aparecimento do efeito citopático e isolamento de vírus, obtido a partir de soros de pacientes, com suspeita clínica de dengue, inoculados nessas células.

Os resultados obtidos após imunofluorescência com fluido ascítico imuno anti alpha, flavi e bunyavírus, realizados nas células controle foram sempre negativos, afastando desta maneira a possibilidade de qualquer contaminação acidental pelos arbovírus manipulados no laboratório.

DISCUSSÃO

As linhagens celulares provenientes de mosquitos, são geralmente derivadas de um grupo de larvas, sendo

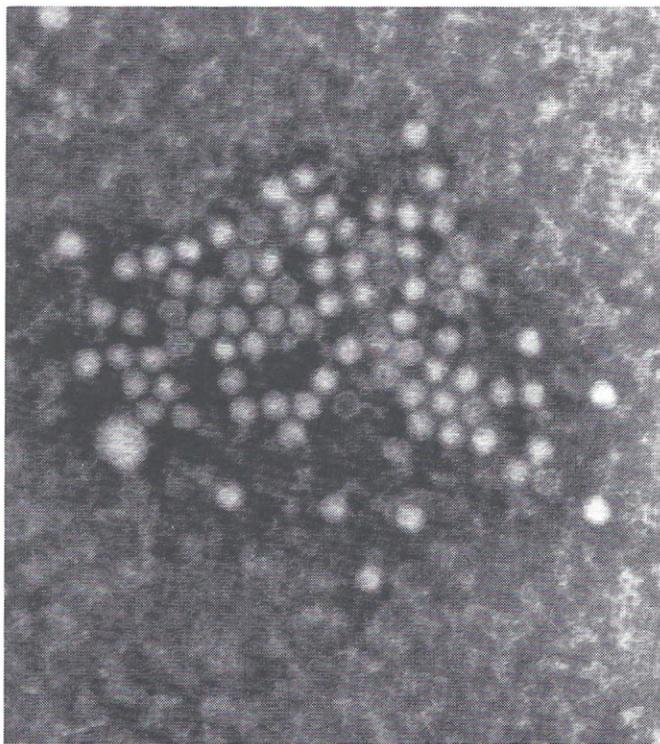


Figura 1. Micrografia eletrônica de partículas virais obtidas a partir do sobrenadante de cultura de células C6/36.

portanto uma mistura de populações de células. JOUSSET et alii⁵, relatam o isolamento de um vírus persistente, não envelopado, icosaédrico, de 22nm de diâmetro, isolado de clones C6/36, denominado parvovírus de *Aedes albopictus*. IGARASHI⁴ isolou vários clones de linhagem celular de *Aedes albopictus*, identificando o clone C6/36 livre de vírus. Durante nossos estudos, no entanto, verificamos neste clone a presença de partículas virais, sem que qualquer alteração na sensibilidade das células C6/36 fosse observada no isolamento do vírus Dengue.

A hipótese de contaminação dessas células por outros arbovírus foi eliminada, uma vez que todos os testes de imunofluorescência foram negativos para alphavirus, flavivirus e bunyavirus. Células C6/36 provenientes de outras

instituições e analisadas nas mesmas condições e período mostraram resultados idênticos aos nossos, confirmando desta maneira nossos achados e afastando a possibilidade de contaminação com os arbovírus trabalhados na Seção.

Esse provável vírus endógeno pode estar presente em células C6/36 de outros laboratórios sem ser detectado. Embora nossos dados não mostrem interferência deste vírus com o isolamento do vírus dengue, o emprego dessas células para o estudo de outros vírus deve ser cuidadosamente avaliado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Seção de Culturas Celulares, do Instituto Adolfo Lutz, pelo fornecimento dos meios utilizados.

RIALA 07/835

BARBOSA, M.L.; UEDA-ITO, M & ROCCO, I.M. — PRESENCE OF AN ENDOGENOUS VIRUS IN UNINFECTED *Aedes albopictus* CELL, CLONE C6/36. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57(2):29-31, 1998.

SUMMARY: Cell lines obtained from *Aedes albopictus* mosquitoes larvae has been shown to be naturally infected by viruses. The C6/36 clone of *Aedes albopictus* cells obtained by Igarashi in 1978 showed to be free of viruses and has been used to isolate Dengue viruses in the majority of specialized laboratories. In our studies with these cells, we detected the presence of an endogenous virus, after different periods of incubation. Electromicroscopic analysis of the culture fluid of C6/36 cell, by negative staining, revealed the presence of a non-enveloped viral particle, from the 12th day of splitting, measuring 20nm. Analysis on days 2, 6, and 10 after the day of splitting the cells were not able to show the same type of viral particle. These cells were submitted to indirect immunofluorescence test using a panel of antisera directed to several arbovirus groups. These tests were negative, ruling out the possibility of laboratory contamination. The presence of endogenous viruses in established cell lines may occur in any laboratory without being detected. Our work showed that this endogenous virus does not influence the isolation of Dengue viruses and the cell replication. Due to the lack of data, the use of these cells to isolation of other viruses should be carefully evaluated.

DESCRIPTORS: cell line clone C6/36; endogenous virus; dengue.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOUBLIK, Y.; JOUSSET, J.X. & BERGOIN, M. — Structure, restriction map and infectivity of the genomic and replicative forms of AaPV DNA. Arch. Virol. 137: 229-240, 1994.
2. BRENNER, S. & HORNE, R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim. Biophys. Acta, 34: 103-110, 1959.
3. CUNNINGHAM, A., WEBB, S.R., BUCKLEY, S.M. & CASALS, J. — Isolation of Chikungunya virus contaminating an *Aedes albopictus* cell line. J. Gen. Virol. 27: 97-100, 1975.
4. IGARASHI, A. — Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell line sensitive to dengue and chikungunya virus. J. Gen. Virol. 40: 531-544, 1978.
5. JOUSSET, F.-X.; BARREAU, C.; BOUBLIK, Y. & CORNET, M. — A parvo-like virus persistently infecting a C6/36 clone of *Aedes albopictus* mosquito cell line and pathogenic for *Aedes aegypti* larvae. Virus Res. 29: 99-114, 1993.
6. HIRUMI, H., HIRUMI, K., SPEYER, G., YUNKER, C.E., THOMAS, L.A., CORY, J. & SWEET, B.H. — Viral contamination of a mosquito cell line, *Aedes albopictus* associated with syncytium formation. In vitro 12: 83-97, 1976.
7. SINGH, K.R.P. — Cell cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L.), Current Science 36: 506-5-8, 1967.
8. SINGH, K.R.P. & PAUL, S.D. — Isolation of dengue viruses in *Aedes albopictus* cell cultures. Bull. W.H.O. 4: 982-983, 1960.

Recebido para publicação em 12/01/98

