

## USO DE CÉLULAS DE *Aedes albopictus* C6/36 NA PROPAGAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE ARBOVÍRUS DAS FAMÍLIAS TOGAVIRIDAE, FLAVIVIRIDAE, BUNYAVIRIDAE E RHABDOVIRIDAE

**Luiz Tadeu Moraes Figueiredo**

*Colônias de células de mosquito Aedes albopictus C6/36 foram infectadas com 23 arbovirus, sendo 19 destes existentes no Brasil, pertencentes às famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Rhabdoviridae. A Replicação viral foi detectada por imunofluorescência indireta com todos os vírus estudados enquanto que o efeito citopático foi observado durante a infecção por alguns destes. No teste de imunofluorescência indireta utilizou-se fluidos ascíticos imunes de camundongos, específicos para os vírus estudados. A replicação viral caracterizada por grande produção de antígeno recomenda a utilização de células C6/36 na propagação e em tentativas de isolamento desses arbovirus. A técnica de imunofluorescência ofereceu importantes subsídios na classificação e identificação de vírus que replicam nestas células.*

Palavras-chaves: Arbovirus. Culturas de células de mosquito. Imunofluorescência Indireta. Isolamento de vírus.

A maioria dos vírus das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* e alguns da família *Rhabdoviridae* são classificados epidemiologicamente como arbovirus<sup>9</sup>. O nome arbovirus corresponde a denominação dada à vírus de diferentes características taxonômicas, que se mantêm na natureza através de ciclos complexos envolvendo um hospedeiro vertebrado e um artrópodo vetor, que os transmite pela picada<sup>15</sup>. O Brasil é, particularmente, a região Amazônica é recordista mundial em isolamento de arbovirus, contando até 1985 com 134 vírus diferentes, sendo 84 destes novos para o mundo<sup>4 11</sup>.

O isolamento e a propagação de arbovirus no Brasil vêm sendo feito desde a década de 50 principalmente em camundongos recém-nascidos, através da inoculação pela via intra-cerebral<sup>3 15</sup>. Linhagens celulares contínuas de mamíferos tais como a Vero (originária de rim de macaco verde africano) e a BHK-21 (originária de rim de hamster) também são usadas no isolamento e propagação de arbovirus<sup>9</sup>. A iden-

tificação e classificação destes vírus baseia-se em critérios de relacionamento antigênico que são detectados através das técnicas clássicas de fixação do complemento e neutralização em camundongos<sup>18</sup>.

A importância dos insetos vetores no ciclo arboviral vem sendo cada vez mais valorizada, a ponto de a descoberta da transmissão transovariana de vírus das famílias *Togaviridae*<sup>2</sup>, *Flaviviridae*<sup>12</sup> e *Bunyaviridae*<sup>10</sup> em mosquitos, sugerir que para a manutenção destes na natureza não é essencial a passagem pelo vertebrado. A infecção por estes vírus desde o mesenteron, sua disseminação pela hemolinfa e a multiplicação nas glândulas salivares e ovários são prova da notável adaptação que possuem aos tecidos do mosquito<sup>2</sup>. Linhagens celulares de mosquitos adequadas à replicação de arbovirus "in vitro" foram desenvolvidas por Singh<sup>16</sup>. Essas linhagens celulares têm como vantagem sobre as de vertebrados a fácil manutenção e crescimento à temperatura ambiente de 28°C<sup>17</sup>. Dentre várias linhagens celulares oriundas de mosquitos uma das mais utilizadas para a propagação de arbovirus é a C6/36, que foi desenvolvida por Igarashi<sup>8</sup> através da clonagem de células de larvas de *Aedes albopictus* obtidas originalmente por Singh. Descrevemos neste trabalho as observações qualitativas relacionadas à propagação de 23 arbovirus em células C6/36 e ao uso da técnica de imunofluorescência indireta na identificação e classificação destes vírus. Estes dados foram obtidos durante a formação de um banco de arbovirus no Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz.

---

Trabalho efetuado no Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Financiado em parte pelo CNPq (302509/87-9/BM/FV) e pela SUCAM.

Endereço para correspondência: Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo. Departamento de Clínica Médica. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. 14049 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Recebido para publicação em 03/08/89.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Vírus

Vinte e três vírus foram usados em nosso estudo (Tabela 1). Todos, com exceção dos vírus Capim e Anopheles B são causadores de infecções humanas. As estirpes dos vírus Mucambo, Mayaro, do dengue tipo 2, 3, Oropouche, Guama e Anopheles B foram obtidas de fontes norte-americanas (CDC, ATCC, Universidade de Yale) embora estes agentes, com exceção dos dengue 2, 3 e Anopheles B, já tenham sido isolados no Brasil<sup>9</sup>. O vírus do dengue tipo 1 Rio H 36589, foi por nós isolado, de um paciente que se infectou em Angola. A escolha destes 23 vírus para serem utilizados como referência, na identificação e

classificação de novos isolamentos, obedeceu critérios de importância epidemiológica e de seleção em cada família dos vírus, correspondendo a diferentes grupos antigênicos.

Todos os vírus com exceção das amostras de dengue sorotipos 2, 3 e 4, foram propagados inicialmente com uma passagem em cérebro de camundongos brancos (*Mus musculus* – variedade albino suíço) com aproximadamente 2 dias de idade e posteriormente inoculados em células C6/36 (Tabela 1).

### Fluidos Ascíticos Imunes (FAI)

Os FAI foram obtidos em camundongos adultos jovens (*Mus musculus* – variedade albino suíço). Os

Tabela 1 – Classificação, estirpes, tempo de infecção em células C6/36 e efeito citopático (ECP) observado com os vírus estudados.

Família (gênero) Vírus	Estirpe	Tempo de infecção*	ECP
<i>Togaviridae (Alphavirus)</i>			
Encefalite Equina Leste (EEE)	SPAN1472	3 dias	NO**
Mucambo	ATCC VR580	3 dias	dest. celular
Encefalite Equina Oeste (WEE)	Rio1257	2 dias	NO
Mayaro	TRVL4675	3 dias	NO
<i>Flaviviridae (Flavivirus)</i>			
Febre Amarela (YF)	17DD vacinal	5 dias	sincícios
Rocio	SPH34675	6 dias	sincícios
Ilhéus	HBe7445	5 dias	dest. celular
Encefalite de St. Louis (SLE)	SPAN1916	5 dias	dest. celular
Dengue sorotipo 1	RioH28973	7 dias	sincícios
Dengue sorotipo 1	RioH36589	7 dias	NO
Dengue sorotipo 2	New Guinea c	7 dias	NO
Dengue sorotipo 3	H87	7 dias	NO
Dengue sorotipo 4	H241	7 dias	NO
<i>Bunyaviridae (Bunyamwera)</i>			
Caraparu	BeAn3994	5 dias	NO
Marituba	BeAn 15	3 dias	sincícios
Oropouche	TRVL9760	4 dias	NO
Maguari	BeAr 7272	5 dias	NO
Guama	TRVL33579	4 dias	NO
Guaroa	BeH22	5 dias	NO
Capim	BeAn 8582	4 dias	NO
Tacaiuma	BeAn73	8 dias	NO
Anopheles B	ATCCVR86	5 dias	NO
<i>Rhabdoviridae (Vesiculovirus)</i>			
Piry	BeAn24232	8 dias	NO

\* Tempo de infecção – Tempo de infecção até a colheita do material.

\*\* NO – Efeito citopático não foi observado durante o tempo de infecção.

animais receberam 04 inoculações semanais de 0,2ml de suspensões de macerado de cérebro de camundongos recém nascidos infectados com vírus, diluídos a 1/30 em PBS, pela via intraperitoneal. Cinco dias após a última imunização os animais eram inoculados pela via intraperitoneal com células do Sarcoma 180/TG<sup>1</sup> e desenvolviam ascite volumosa após uma semana. O líquido ascítico obtido era rico em anticorpos específicos. FAI não foram elaborados para os vírus do dengue 2, 3 e 4 por razões de segurança.

Um "pool" de FAI para alphavírus foi preparado misturando volumes iguais dos FAI dos vírus da Encefalite Equina do Leste (EEE), Mucambo, Encefalite Equina do Oeste (WEE) e Mayaro. O "pool" de flavivírus foi preparado misturando volumes iguais dos FAI de dengue 1, Febre Amarela (YF), Rocio, Ilhéus e do vírus da Encefalite de St. Louis (SLE). A mistura de volumes iguais dos FAI de Caraparu, Oropouche, Maguari, Guama, Guaroa, Capim, Tacaiuma e anopheles B formou o "pool" de bunyavírus.

#### *Infecção e colheita do material infectado*

Frascos contendo uma monocamada de células C6/36 foram infectados com extrato de cérebro de camundongo ou com sobrenadante de cultura de células contendo vírus das 4 famílias referidas, diluídos 1/10 em PBS, que apresentavam títulos que variaram na dependência do vírus infectante. O tempo de infecção observado até a colheita do material foi variável de acordo com o agente em questão. Observamos com alguns vírus, o aparecimento de efeito citopático (ECP; vide Tabela 1).

#### *Cultivo de células C6/36*

As células de mosquito *Aedes albopictus* C6/36 foram cultivadas em meio de Leibowitz L15 (GIBCO – New York, USA) contendo 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 10% de caldo de triptose fosfato, 100 U/ml de penicilina de 0,1 mg/ml de estreptomina. As colônias de células C6/36 contidas em frascos com tampa selada, foram mantidas a 28°C em estufa comum.

#### *Teste de imunofluorescência*

O teste de imunofluorescência indireto (IFI) foi efetuado em aproximadamente 2 horas<sup>6</sup>. As células infectadas eram removidas da parede do frasco por

raspagem para formar uma suspensão com o meio de cultivo celular e 1 gota deste material era aplicado em "spots" de lâminas de microscopia. O material era seco e fixado por 20 minutos em acetona. O teste propriamente dito consistiu em acrescentar a cada "spot" 1 gota de FAI diluído em PBS e após incubação por 30 minutos a 37°C e lavagem das lâminas em PBS, acrescentávamos 1 gota em cada "spot", de conjugado de imunoglobulinas de carneiro anti-IgC de camundongo com o isotiocianato de fluoresceína (Institut Pasteur – Marnes, France), diluído em PBS. As lâminas eram novamente incubadas por 30 minutos, lavadas em PBS por 10 minutos e em água 1 minuto, secas, e os "spots" eram observados em microscópio de fluorescência Zeiss equipado com lâmpada de mercúrio de alta pressão. Utilizamos nestes testes 2 tipos de controles negativos: células C6/36 não infectadas às quais acrescentamos FAI; e células infectadas às quais se acresceu fluido ascítico de animal não imunizado ou FAI de vírus de outra família. Testes positivos foram determinados em "spots" apresentando intensa fluorescência celular, acompanhados de controles negativos (ausência de fluorescência), na mesma lâmina. Após a observação de IFI com reação positiva, os fluidos de cultivo contendo as células infectadas eram armazenadas a -70°C como sementes de vírus. Estes fluidos mostraram-se infecciosos em inoculações de culturas celulares posteriores, das quais resultou replicação viral.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de antígenos virais nas células C6/36 detectados por IFI com reação fortemente positiva, foi observada entre 2 e 3 dias pós infecção para os alphavírus, entre 5 e 7 dias para os flavivírus, entre 3 e 8 dias para os bunyavírus e 8 dias pós infecção para o vesiculovírus Piry (vide Tabela 1). Os tempos de infecção para os alphavírus e bunyavírus observados em nosso estudo, foram similares àqueles onde Singh<sup>16</sup>, estudando em células de *Aedes albopictus* o crescimento dos alphavírus Chikungunya e Sindbis, entre o segundo e o quarto dia pós-infecção e os bunyavírus Batai e Sathuperi, entre o quarto e o oitavo dia pós infecção, observou a produção celular dos mais elevados títulos virais. Os tempos de infecção que relatamos para os flavivírus são similares aos descritos por Tesh<sup>17</sup> e Figueiredo e Shope<sup>5</sup>, os quais referem, respectivamente, maior número de células C6/36 antígeno positivas para dengue 2 e um título mais

elevado do vírus dengue 1 entre o sexto e oitavo dia pós infecção. O crescimento do vírus Rocio foi estudado em células C6/36 por Sakurai e cols<sup>13</sup>. Os autores observaram a produção de títulos virais mais elevados que em células de vertebrados a partir do segundo dia pós-infecção e citam as células C6/36 como um excelente sistema celular para o crescimento deste e outros arbovírus.

O ECP produzido em células de *Aedes albopictus* infectadas por diferentes arbovírus inicia-se com citólise de pequenas células individuais e evolui com o aparecimento de largas massas celulares sinciciais que vão aumentando gradualmente, e podem chegar até a fusão completa da monocamada celular. Na fase mais adiantada do processo ocorre extensa destruição celular com a permanência de apenas algumas células residuais intactas<sup>7 14 16</sup>. A infecção persistente por alphavírus e flavivírus em culturas celulares de *Aedes albopictus* é uma particularidade destas células de insetos e tem sido estudada por vários autores<sup>2 19</sup>. Na infecção persistente as células infectadas restringem a replicação viral a áreas limitadas no citoplasma, prevenindo assim a citopatologia e até permitindo cura celular espontânea. Ocorre nestes casos um equilíbrio entre o vírus infectante e o tecido, levando a reduzido número de células infectadas. Os fenômenos e mecanismos que transformam uma infecção aguda em persistente são ainda pouco conhecidos<sup>2</sup>. ECP caracterizado por extensa destruição celular de células C6/36 foi observado em nosso estudo com o alphavírus Mucambo, no terceiro dia pós infecção (Tabela 1). ECP em células de *Aedes albopictus* após infecção com alphavírus tem sido observado de forma variável dependendo do clone celular estudado e das condições do cultivo celular<sup>2</sup>. ECP do tipo sincicial foi observado em nosso estudo, para os seguintes flavivírus: febre amarela vacinal, Rocio e dengue 1 Rio H 28973, entre 5 e 7 dias pós infecção (Tabela 1). Tal efeito não foi observado com a estirpe angolana de dengue 1 RioH 36589 (Tabela 1). Schatzmayr e cols<sup>14</sup> observaram ECP caracterizado por formação de grandes sincícios em células C6/36, após uma semana de infecção com vírus do dengue 1 isolados durante a epidemia de 1986/87, no Rio de Janeiro. A citopatia parece ser variável entre infecções por diferentes estirpes de vírus do dengue nesta linhagem celular, já que outros autores não observaram tais efeitos<sup>5 18</sup>. ECP com extensa destruição celular 5 dias após a infecção de células C6/36 com o vírus Ilhéus e o vírus da encefalite de St. Louis isolado no Estado de São Paulo, foi por nós observado (Tabela 1). ECP caracterizado por formação de células sinciciais foi observado para o vírus Marituba 3 dias após infecção (Tabela 1). Não existe referência à estudos sobre a

replicação do flavivírus Ilhéus, do vesiculovírus Piry e do bunyavírus Marituba, em células C6/36 no Catálogo Internacional de Arbovírus<sup>9</sup>.

IFI utilizando FAI de camundongos, com reação claramente positiva, foi observada para os 23 vírus. Reações positivas para os 4 alphavírus foram obtidas com o FAI "pool" do gênero. Reações positivas para os 9 flavivírus foram obtidas com o FAI "pool" do gênero, incluindo dengue 2, 3 e 4 que não participaram com FAI na elaboração do "pool" e apresentaram reação cruzada para o gênero flavivírus. Os 9 bunyavírus apresentaram reação IFI positiva com o FAI "pool" do gênero, incluindo o vírus Marituba que não participou com FAI na elaboração do "pool" e provavelmente reagiu cruzado com o FAI de Caraparu. Os resultados mostram a boa qualidade dos FAI obtidos segundo o protocolo descrito e que em alguns casos foram utilizados no teste em diluições altas como 1/80. A presença de antígenos virais em mais de 50% das células foi observada com todos os vírus. Fotografias da fluorescência celular para alguns alphavírus, flavivírus e bunyavírus bem como controle negativo podem ser vistas na Figura 1. A presença de antígeno viral detectada pela fluorescência pode ser observada no citoplasma das células, local de replicação destes RNA vírus, em intensidade variável para os diferentes agentes. Em alguns casos a fluorescência desenha os contornos nucleares vistos como fundo escuro. A ausência de ECP em células C6/36 infectadas com a maioria dos vírus estudados faz com que a IFI seja uma importante arma na detecção da multiplicação viral (Figura 1).

A facilidade de cultivo das colônias de C6/36, o seu crescimento rápido e a replicação viral, que embora não quantificada mostrou-se evidente pela produção de antígeno, recomendam a utilização destas células, paralelamente aos camundongos recém-nascidos, no isolamento a partir de materiais obtidos de pacientes, animais e insetos, e também na propagação e identificação de arbovírus destas 4 famílias. A experiência obtida com os vírus do dengue usando a técnica de IFI pode ser estendida a outros arbovírus<sup>7 16</sup>. IFI utilizando bactérias de FAI de vírus das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* e *Rhabdoviridae*, bem como "pools" de FAI de uma mesma família pode oferecer importantes subsídios na classificação e identificação de novos vírus, baseado no relacionamento antigênico destes com outros já conhecidos. A IFI também é de importância fundamental na detecção da replicação viral em células C6/36, especialmente porque em muitos casos não se observa ECP.

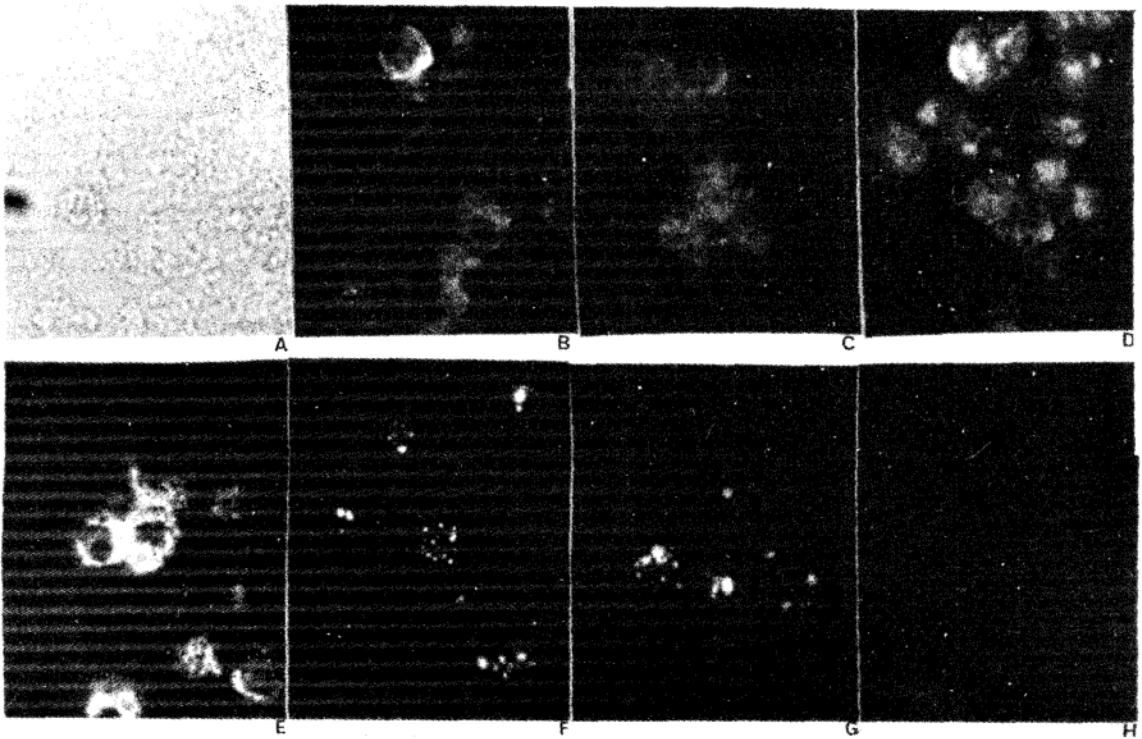


Figura 1 - Células de *Aedes albopictus* C6/36 mostrando evidência de infecção com alphavirus, flavivirus ou bunyavirus, através do teste de imunofluorescência indireta (aumento aproximado de 320 x). A. células não coradas; B. infecção por Mayaro; C. infecção por Mucambo; D. infecção por dengue 1; E. infecção por Rocio; F. infecção por Guaroa; G. infecção por anopheles B; H. controle negativo células C6/36 infectadas por Mucambo e testadas contra FAI de Piry.

## SUMMARY

*C6/36 Aedes albopictus cells were infected with Brazilian arbovirus from the families Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae. Replication was obtained with all the studied viruses and cytopathic effect was observed with some. Viral antigen was assayed in C6/36 cell cultures for antigen was assayed in C6/36 cells by an indirect immunofluorescence test using specific mouse immune ascitic fluid. Antigen production was detected in C6/36 cells infected with all the studied viruses. The author recommends the inoculation of C6/36 cell cultures for isolation of virus from the four studied families. The immunofluorescence technique is an important tool for classification and identification of virus growing in C6/36 cells.*

*Key-words: Arbovirus. Mosquito tissue culture cells. Indirect immunofluorescence. Virus isolation.*

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos o auxílio técnico de Marcos Costa Simões, Silvia Maria Baêta Cavalcanti, José de Carvalho Filho, José Farias e Paulo Post. Agradecemos ao Dr. R. Shope da Universidade de Yale, USA, ao Dr. G. Kuno do CDC, USA, à Dra. A. Travassos da Rosa do Instituto Evandro Chagas de Belém, Para e à Dra. L. T. de Souza do Instituto Adolpho Lutz, São Paulo pelo fornecimento de muitos dos agentes virais utilizados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brandt WE, Buescher EL, Hetrick FM. Production and characterization of arbovirus antibody in mouse ascitic fluid. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 16:339-347, 1967.
2. Brown DT, Condreay LD. Replication of alphaviruses in

- mosquito cells. In: Schlesinger S, Schlesinger MJ. The Togaviridae and Flaviviridae, 1 st edition, Plenum, New York, p. 171-203, 1986.
3. Causey CE, Causey OR. Development of arbovirus studies in the Amazon Region. In: International Symposium on Tropical Arboviruses and Haemorrhagic Fevers, Belem, 1980. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p. 13-20, 1982.
  4. Dégallier N, Hervé JP, Rosa APAT, Vasconcelos PFC, Rosa JFST, Sá Filho GC. A ecologia dos arbovírus na Amazônia: pesquisas atuais e perspectivas. *Hiléia Médica* 8:1-98, 1987.
  5. Figueiredo LT Shope RE. An enzyme immunoassay for dengue antibody using infected cultured mosquito cells as antigen. *Journal of Virological Methods* 17:191-198, 1987.
  6. Gardener PS. Immunofluorescence. In: Specter S, Lancz GJ. *Manual of Clinical Virology*, 1 st edition, Elsevier, New York, p. 95-109, 1986.
  7. Henchal EA, Mc Cown JM, Seguin MC, Gentry MK, Brandt WE. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32:164-169, 1983.
  8. Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and Chikungunya viruses. *Journal of General Virology* 40:531-544, 1978.
  9. Karabatsos N (ed). *International Catalogue of Arbovirus including certain other viruses of vertebrates*. San Antonio, Texas, American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1985.
  10. Miller BR, De Foliart GR, Yuill TM. Vertical transmission of La Crosse virus (California encephalitis Group): transovarial and filial infection rates in *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 14:437-440, 1977.
  11. Pinheiro FP. Situação das arboviroses na Região Amazônica. In: *International Symposium on Tropical Arboviruses and Haemorrhagic Fevers*, Belém, 1980. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, p. 27-48, 1982.
  12. Rosen L. Further observations on the mechanism of vertical transmission of flaviviruses by *Aedes* mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 39:123-126, 1988.
  13. Sakurai T, Bundo K, Igarashi A. Detection of Rocio virus-specific polypeptides in virus-infected cells and culture by western blotting method. *Tropical Medicine* 27:129-140, 1985.
  14. Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Rosa APAT. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 81:245-246, 1986.
  15. Shope RE, Sather GE. Arboviruses. In: Lennette FH, Schmidt NJ (ed). *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, 2nd edition, American Public Health Association, Washington, p. 767-814, 1979.
  16. Singh KR. Propagation of arboviruses in Singh's cell lines. I. Growth of arboviruses in *Aedes albopictus* and *A. aegypti* cell lines. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 55:127-133, 1971.
  17. Tesh RB. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 28:1053-1059, 1979.
  18. Theiler M, Downs WG. Virus classification. In: *The arthropodborne viruses of vertebrates. An account of The Rockefeller Foundation Virus Program 1951-1970*. Yale University, New Haven, p. 95-316, 1973.
  19. Westaway EG. Flavivirus replication strategy. *Advances in Virus Research* 33:45-90, 1987.