

MAY 05, 2023

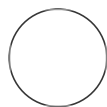
## 🌐 DENV 2 Infection

Delia Piedad Recalde-

Edwin Stiven Quiguanás<sup>1</sup>, Reyes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad del Quindío;

<sup>2</sup>Corporación Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt



Edwin Stiven Quiguanás

Universidad del Quindío

OPEN  ACCESS

DOI:

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.j8nlkwpbdl5r/v1](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.j8nlkwpbdl5r/v1)

**Protocol Citation:** Edwin Stiven Quiguanás, Delia Piedad Recalde-Reyes 2023. DENV 2 Infection .

**protocols.io**

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.j8nlkwpbdl5r/v1>

**License:** This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

**Protocol status:** Working  
We use this protocol and it's working

**Created:** Mar 27, 2023

**Last Modified:** May 05, 2023

**PROTOCOL integer ID:**  
79497

**Keywords:** DENV. Infección. Plaqueo

### ABSTRACT

En este protocolo se describen las condiciones para el mantenimiento de las líneas celulares C6/36 HT y BHK-21, además del procedimiento de infección y plaqueo del DENV 2

### MATERIALS

#### Materiales

Tubos de 1,5 mL

Tubos de 2,0 mL

Tubos de 15 mL

Tubos de 50 mL

Crioviales

Cajas T25

Cajas T75

Microplacas de 24 pozos

Puntas de 10, 200 y 1000 uL con filtro

#### Reactivos

Medio de cultivo L-15

Medio de cultivo RPMI-1640

Antibiótico antimicótico

L-glutamina

Bicarbonato de sodio

Suero fetal bovino

Solución salina

Buffer PBS 1X

# Amplificación del virus

- 1 La infección y amplificación del DENV 2 se realiza en células C6/36 (*Aedes albopictus* clone C6/36 CRL-1660™ ATCC) (línea celular originaria del mosquito *Aedes albopictus* y utilizadas para la replicación de Flavivirus). Esta línea celular es un clon obtenido de las líneas del mosquito *Aedes albopictus* de Singh (1967) que presenta una alta sensibilidad a los virus Dengue y Chikunguya. Se ha demostrado que estas células son más sensibles en comparación a otras líneas de mosquito como las AP61 y TRA-284.

Para el mantenimiento de esta línea celular se utiliza el medio de cultivo L-15 (Leibovitz's L-15 Medium con L-glutamina Marca Gibco Cat No. 41300-039 x10-1L).

## 1.1 Preparación de medio L-15

Nota: este medio no contiene bicarbonato de sodio

Cada sobre contiene 13,7 gramos para preparar un Litro de medio

- En un recipiente de vidrio agregar 500 mL de agua estéril (agua de droguería) y agregar todo el contenido de un sobre de medio L-15. Disolver con ayuda de un agitador magnético.
- Una vez completamente disuelto el medio, adicional 500 mL de agua estéril y continuar agitando
- Ajustar el pH del medio a 7,6 con HCL si es necesario
- Esterilizar el medio por filtración

### Preparación del medio de cultivo L-15 para crecimiento inicial de C6/36

Se preparan alícuotas de 50 mL suplementado con SFB 10 %

Tabla 1.

A	B	C	D
Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Volumen
L-15	1X	1X	43 mL
SFB	100 %	10 %	5 mL
L-glutamina Cat No: SH30034.02	200 mM	2 mM	500 uL
Antibiótico Sigma A5955- 100 mL	100X	1X	500 uL
Triptosa fosfato	4X	10 %	1,25 mL

## Preparación del medio de cultivo L-15 para mantenimiento de C6/36

Se preparan alícuotas de 50 mL suplementado con SFB 2 %

Tabla 2.

A	B	C	D
Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Volumen
L-15	1X	1X	47 mL
SFB	100 %	2 %	1 mL
L-glutamina	200 mM	2 mM	500 uL
Antibiótico	100X	1X	500 uL
Triptosa fosfato	4X	10 %	1,25 mL

## Procedimiento para descongelación y apertura de línea celular C6/36

Previo a todo el procedimiento, limpiar la cabina de flujo laminar y dejar todo el material necesario en UV por 15 o 20 minutos.

- En un tubo falcon de 15 mL agregar 3 mL de medio L-15 suplementado con SFB al 10 % (Tabla 1).
- Sacar del freezer o del nitrógeno líquido el criovial de células C6/36, llevarlo a la cabina de flujo y descongelarlo suavemente con las manos.
- Una vez descongeladas las células, se adiciona al criovial 1 mL de medio L-15 suplementado con SFB al 10 %, mezclar por pipeteo muy suave y luego agregar todo el contenido al tubo de 15 mL. (Volumen final de 5 mL).
- Se centrifugan las células a 150 gravedades x 10 minutos y temperatura de 18 a 20 °C en centrífuga con rotor 143.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet de células con 5 mL de medio L-15 suplementado con SFB al 10 %.
- Transferir todo el contenido a una caja T25, rotularla con el nombre de la línea celular, número del pase, porcentaje de SFB y responsable.
- Incubar las células a 28 °C sin CO<sub>2</sub>.

## Procedimiento pase de células C6/36

- Previo a todo el procedimiento, atemperar los reactivos que se van a utilizar, en este caso, solución salina y el medio L-15 suplementado con SFB al 2 % o 5 % según sea el caso.
- Se observan las células al microscopio, se revisa la morfología y la confluencia y se procede a realizar el pase.

- Se toma la caja T25 y se descarta el medio de cultivo, sin hacer movimientos muy bruscos. Luego realizar uno o dos lavados muy suaves con solución salina.
- Después de los lavados se le adiciona 5 mL de medio L-15 suplementado con SFB al 2 %. Luego, se le da unos golpes muy suaves en seco por los costados de la caja con el fin de desprender las células (esta línea celular no requiere del uso de tripsina).
- Todo el contenido se transfiere a una caja T75 y luego se le adicionan 10 mL de medio L-15 suplementado con SFB al 2 % (Volumen final 15 mL).
- Si se desea, a la caja T25 se le adiciona nuevo medio L-15 y se sigue manteniendo.
- Las cajas se incuban a 28 °C

### **Procedimiento congelación de células C6/36**

- Al tener una caja T25 o T75 con una confluencia del 90 al 100 % se procede a congelar las células para preservar la línea celular.
- Previo al procedimiento, se sacan los crioviales estériles, se rotulan con el nombre de la línea celular, número de pase, fecha y responsable.
- A cada criovial se le adicionan 100 uL de DMSO grado cultivo celular Ref D2650 Sigma-Aldrich
- Luego, se toma la caja y se dan golpes suaves por los costados con el fin de desprender las células. El contenido es transferido a un falcon de 15 mL.
- Se centrifugan las células a 800 rpm x 10 minutos
- Se descarta el sobrenadante y se resuspender el pellet en 1 mL de suero fetal bovino si el pellet es de una caja T25 o en 5 mL si el pellet es de una caja T75.
- A cada criovial con DMSO (concentración final 10 %) se le adicionan 900 uL de células, se mezcla suavemente y se guardan en freezer por una semana. Posteriormente, se pasan los crioviales a nitrógeno líquido.

### **Procedimiento infección de células C6/36 con DENV 2**

El procedimiento de infección se hace en células C6/36 mantenidas en una caja de T75 y con una confluencia del 90 al 100 %.

- Se realiza un lavado muy suave con solución salina previamente atemperada.
- En un tubo falcon de 15 mL adicionar 8 mL de medio L-15 sin suplementos (este volumen es para infectar dos cajas T75).
- A esos 8 mL de medio se le adicionan 500 uL de DENV 2 (el virus previamente descongelado).
- Una vez se tiene la solución de medio + virus, se elimina la solución salina de la caja T75 y se adicionan 4,25 mL de la solución de virus.
- Se incuba la caja T75 a 28 °C por dos horas (verificar que la caja quede en posición recta en la incubadora y el medio cubra toda la superficie de la caja para evitar que las células se sequen y mueran).
- Cada 20 minutos revisar la caja y mezclar suavemente moviendo la caja.
- Mientras pasan las dos horas de infección realizar lo siguiente:

- En un tubo falcon de 15 mL, adicionar, 7120 uL de medio L-15 sin suplementos, 400 uL de triptosa fosfato al 4X, 320 uL de SFB puro y 160 uL de antibiótico (volumen final de 8 mL para dos cajas T75).
- Una vez suplementada esa alícuota de medio y pasadas las dos horas de infección, sin retirar el inóculo viral de la caja T75, adicionar 4 mL. Por lo tanto, la caja T75 queda con un volumen final de 8,25 mL.
- Se incuba la caja a 28 °C por 7 días.

Nota: a los 3 o 4 días de infección se pueden revisar las células y observar el efecto citopático

### **Finalización de la infección**

- Después de los 7 días de infección, se saca la caja T75 de la incubadora y se observan las células al microscopio.
- Luego, el contenido de la caja es transferido a un tubo de 15 mL, dejando 1 mL en la caja.
- El contenido del falcon se centrifuga a 600 gravedades (2900 rpm) x 5 minutos a 4 °C.
- Se sacan alícuotas de 600 uL del sobrenadante en tubos de 1,5 mL, se rotulan y se guardan a -80 °C.
- La caja T75 con volumen final de 1 mL se congela a -80 °C por 24 horas.
- Pasadas las 24 horas, sacar todo el contenido y hacer alícuotas en tubos de 1,5 mL, rotularlos como "lisado célula.

## **Plaqueo de DENV 2 en células BHK-21**

- 2 Esta línea celular BHK.21 se trabaja con medio RPMI-1640 referencia R6504 – 1L, este medio contiene L-glutamina y no contiene bicarbonato de sodio.

### **2.1 Preparación de medio RPMI-1640**

Nota: este medio no contiene bicarbonato de sodio. Trabajarlo así

Cada frasco contiene los gramos necesarios para preparar un Litro de medio

- En un recipiente de vidrio agregar 500 mL de agua estéril (agua de droguería) y agregar todo el contenido del frasco. Disolver con ayuda de un agitador magnético.
- Una vez completamente disuelto el medio, adicional 500 mL de agua estéril y continuar agitando.
- Esterilizar el medio por filtración

**El Procedimiento para descongelación y apertura de línea celular se realiza de la misma forma que se realizó para las células C6/36**

Nota: Tener en cuenta que las células BHK-21 se incuban a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

### **Procedimiento pase de células BHK-21**

- Al tener una caja T25 con una confluencia del 90 al 100 % se procede a hacer un pase de células.
- Previo a todo el procedimiento, atemperar los reactivos que se van a utilizar, en este caso, solución salina, tripsina y medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 2 % o 5 % según sea el caso.
- Luego, se toma la caja y se realizan dos lavados con 2 o 3 mL de solución salina.
- Después de los lavados, retirar muy bien la solución salina y adiciona 500 uL de tripsina previamente atemperada. Incubar por 1.30 o 2 minutos a 37 °C con el fin de desprender las células.
- Pasado ese tiempo, dar unos golpes muy suaves para terminar de desprender todas las células y adicionar 1 mL de SFB o 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB (con la concentración que se vaya a trabajar).
- El contenido (volumen de 1,5 mL) es transferido a un falcon de 15 mL.
- Se centrifugan las células a 800 rpm x 10 minutos
- Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 2 % o 5 % según sea el caso.
- De una caja T25 se abren 3 cajas T25, para ello, adicionar 300 uL de las células resuspendidas a cada una de las nuevas T25 y adicionar 5 mL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 2 % o 5 % según sea el caso.
- Incubar las cajas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

### **Procedimiento congelación de células BHK-21**

- Al tener una caja T25 con una confluencia del 90 al 100 % se procede a congelar las células para preservar la línea celular.
- Previo al procedimiento, se sacan los crioviales estériles, se rotulan con el nombre de la línea celular, número de pase, fecha y responsable.
- A cada criovial se le adicionan 100 uL de DMSO grado cultivo celular Ref D2650 Sigma-Aldrich
- Luego, se toma la caja y se realizan dos lavados con 2 o 3 mL de solución salina previamente atemperada.
- Después de los lavados, retirar muy bien la solución salina y adiciona 500 uL de tripsina previamente atemperada. Incubar por 1.30 o 2 minutos a 37 °C con el fin de desprender las células.
- Pasado ese tiempo, dar unos golpes muy suaves para terminar de desprender todas las células y adicionar 1 mL de SFB o 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB (con la concentración que se vaya a trabajar).
- El contenido (volumen de 1,5 mL) es transferido a un falcon de 15 mL.
- Se centrifugan las células a 800 rpm x 10 minutos.
- Se descarta el sobrenadante y se resuspender el pellet en 1 mL de suero fetal bovino.

- A cada criovial con DMSO (concentración final 10 %) se le adicionan 900 uL de células, se mezcla suavemente y se guardan en freezer por una semana. Posteriormente, se pasan los crioviales a nitrógeno líquido.

### **Procedimiento conteo de células BHK-21 para plaqueo**

- De una caja T25 salen aproximadamente 2,5 a 3 millones de células. Por lo tanto, se tripsinizan las células BHK.21 bajo las mismas condiciones del procedimiento de pase de células.
- El pellet de células se resuspende en 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 5 %.
- Se toman 10 uL de las células y mezclan con 10 uL de azul tripán
- Se hace el conteo de las células en cámara de Neubauer. Realizar el conteo de las células de los 4 cuadrantes de la cámara

**# células totales:** sumatoria de las células de los 4 cuadrantes

**10.000:** Dimensión de la cámara de Neubauer

**2:** Factor de dilución

**4:** # cuadrantes totales

$$\text{células/mL} = ((\# \text{ células totales} * 10.000) * 2) / 4$$

Se adicionan 400 uL de la solución de células a cada pozo de la placa de 24. A la placa, suavemente se le realizan movimientos en círculo o de arriba hacia abajo con el fin de extender las células en toda la superficie de cada pozo.

- Se observan las células al microscopio y luego se incuba la placa por 24 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

### **Condiciones del plaqueo**

**Número de células/pozo:** 90.000. Para una caja de 24 pozos se requieren 2.5 millones de células (un total para 28 pozos)

**Medio RPMI-1640** suplementado con SFB al 5 %

**Volumen/pozo:** 400 uL

**Volumen final de solución de células:** 11.200 uL (11 mL + 200 uL)

### Preparación de carboximetilcelulosa al 3 % (CMC)

Se utiliza la carboximetilcelulosa Ref C4888 viscosidad media de SIGMA-ALDRICH

Se prepara un volumen final de 500 mL de carboximetilcelulosa a concentración del 3 %, para ello:

- Pesar 15 gramos de CMC y aforar a 500 mL (se usan 3 gramos por cada 100 mL).
- Dejar la mezcla disolviéndose por 24 horas
- Posterior a las 24 horas, se esteriliza por autoclave
- Sacar alícuotas en tubos de Falcon de 50 mL

### Preparación del medio overlay

**Nota:** Este medio se prepara en el espacio de dos horas que hay durante infección.

RPMT-1640 Ref R6504 (con L-glutamina) (No bicarbonato de sodio).

Para una sola placa de 24 pozos, se prepara una alícuota de 25 mL

Tabla 3.

A	B	C
Reactivo	Volumen	Concentración final
RPMT-1640 al 2X	13,5 mL	1X
CMC al 3 %	10 mL	1,2 %
Antibiótico	250 uL	1X
Bicarbonato de sodio	500 uL	
Suero fetal bovino puro	500 uL	2 %

### Procedimiento de plaqueo DENV 2

Nota: previo al procedimiento, limpiar la cabina de flujo laminar con alcohol al 70 % y dejar en UV por 15 minutos.

Pasadas las 24 horas de incubación de las células en la placa de 24 pozos, se observan al microscopio y se analiza la confluencia.

- Se descarta todo el contenido de medio de los pozos de la caja de 24.



- Se realizan dos lavados con 200 uL de solución salina por pozo (solución salina previamente atemperada).
- En el último lavado, se retira la solución salina de los pozos:

A2 hasta A6

B2 hasta B6

C2 hasta C6

- Una vez retirada la solución salina de los pozos mencionados, se adiciona en cada pozo 200 uL de **medio RPMI-1640 sin suplementos** (agregar suavemente por la pared de cada pozo).
- Finalizada esta parte, se retira la solución salina de todos los pozos de la fila D y se les adiciona 200 uL de medio RPMI-1640 sin suplementos (A estos pozos ya no se les hace nada durante el resto del procedimiento). Estos serán los controles de células.
- Una vez realizados estos pasos, continuar con:
- Retirar la solución salina de los pozos de la columna 1 (1A – 1B – 1C) y adicionar 200 uL en cada pozo del virus DENV 2 puro. Mezclar suavemente haciendo giros a la placa.

### Diluciones del virus

En este paso, las diluciones del virus se realizan directamente en cada uno de los pozos.

- Los pozos de la columna 1, cada uno tiene 200 uL de virus puro.
- Luego, se inclina un poco la placa y se toman 20 uL de cada uno de los pozos de la columna 1 (1A – 1B – 1C) y se adicionan a cada pozo de la columna 2 (2A – 2B – 2C) y así sucesivamente hasta llegar la columna 6.

Nota: En cada dilución, mezclar la misma cantidad de veces antes de continuar con la siguiente dilución (se mezclaron 5 veces).

- Una vez se termina de realizar las diluciones, se mezcla suavemente haciendo giros de arriba abajo y de izquierda a derecha.
- La caja de 24 se incuba a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> por 2 horas.
- Paso opcional: Cada 20 minutos, mezclar haciendo giros suaves a la placa

### Diseño de la placa - Montaje del ensayo

	A	B	C	D	E	F	G
		<b>1</b>	<b>2</b>	3	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
	DENV 2	Puro	-1	-2	-3	-4	-5
	<b>A</b>	200					

A	B	C	D	E	F	G
<b>B</b>	200					
<b>C</b>	200					
<b>D</b>	CC	CC	CC	CC	CC	CC

Fila D: Controles de células

Volumen final de infección: 200 uL

Tiempo de incubación: 2 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>

### Después de finalizar la infección. Proceso final del plaqueo

- Pasadas las 2 horas de la infección, se saca la placa de la incubadora y se retira todo el medio de cada uno de los pozos.
- De manera ágil y rápida, sin dejar que se sequen las células de los pozos, se adiciona 1 mL de medio overlay previamente preparado y atemperado a 37 °C. (Adicionar suavemente por la pared de cada pozo).
- Una vez finalizado este proceso, se tapa la caja y se deja en cámara húmeda e incubar a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> por 8 días.
- Después de los 8 días de incubación, sacar la placa de 24 y observar las células al microscopio.
- Se descarta todo el medio overlay y se realizan 2 lavados con 400 uL de PBS 1X, agregando suavemente por las paredes de cada pozo.
- Luego, se fijan las células con 300 uL de formaldehído al 4 % (diluido en PBS 1X) por 30 minutos.
- Pasado este tiempo, se descarta el formaldehído.
- Se tiñen las células con 300 uL de cristal violeta previamente filtrado Ref 12214 (Químicos ALBOR LTDA) por 30 minutos y luego se lava la placa con agua de grifo retirando muy bien el exceso de colorante. No dejar caer el chorro del agua directamente en los pozos.

## Resultados e interpretación

### 3

#### Interpretación

- Se observa la destrucción de la monocapa celular a causa del virus puro (columna 1).
- Se observan unidades formadoras de placa (UFP) en todas las diluciones (-1 a - 5).
- En la última dilución donde sean contables las UFP, se calcula el título del virus.

