

## ESTUDIO SOBRE UN INHIBIDOR DE LA HEMAGLUTINACION DE ARBOVIRUS PRESENTE EN EL LIQUIDO ALANTOIDEO DE HUEVOS EMBRIONADOS

Armando Soto Escalona\*, Hugo Hernández\* y Carlos Cárdenas\*\*

### RESUMEN

Se establece la presencia de un inhibidor de la hemaglutinación de arbovirus en el líquido alantoideo normal de huevos embrionados de gallina. El estudio de su composición química revela que se trata de una lipoproteína cuya parte activa inhibitoria existe en la fracción lipídica. El estudio de esta fracción demuestra que está compuesta de lecitina, colesterol, trioleína, y dos fracciones lipídicas aún no identificadas.

Se demuestra que el compuesto es activo contra la hemaglutinación pero no inhibe las propiedades infecciosas del virus. Su mecanismo de acción se discute bajo la hipótesis de que se trata de un compuesto con la misma composición química del receptor eritrocitario, y que actúa por competencia sobre los receptores hemaglutinantes de los arbovirus.

### INTRODUCCION

Desde un punto de vista práctico, las investigaciones sobre los inhibidores no específicos de la hemaglutinación son de gran interés por el

---

\* Instituto de Investigación Clínica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Apartado 1151. Maracaibo, Venezuela.

\*\* Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

amplio uso de la propiedad hemaglutinante de algunos virus en la identificación de anticuerpos, y como instrumento de estudio de los mecanismos de adsorción que se suceden entre los virus y las células susceptibles.

Se han descrito inhibidores no específicos de la hemaglutinación de arbovirus en sueros sanguíneos de diferentes especies de animales (2, 6, 10, 15) y humanos (5, 14), y se ha detallado la composición química de algunos de ellos (12, 13). Sin embargo, a pesar del amplio uso que reciben en las investigaciones con arbovirus (8, 11), y aunque se han reportado para otros virus (17), no se ha descrito la existencia de sustancias con esta actividad para arbovirus en los huevos embrionados.

Es el propósito del presente trabajo, describir la presencia de un inhibidor de la hemaglutinación de arbovirus en el líquido alantoideo de huevos embrionados de gallina, así como algunas de sus características y composición química.

## MATERIAL Y METODOS

**Preparación del inhibidor.**— Se obtuvo el líquido alantoideo de huevos embrionados de diferentes días de incubación, generalmente de 17 días. Una vez liberado de eritrocitos y lípidos en suspensión por centrifugación (10.000 g x 30 min), el líquido alantoideo fué fraccionado en una columna de Sephadex G-100 de 80 x 2,5 cms. Las diferentes fracciones fueron recogidas en cantidades de 5 ml. Eluidas con solución salina de Dulbecco (NaCl 0.15M y fosfato 0.1M), y leídas a 260 nm a través de un espectrofotómetro LKB U Uvicord II. Las fracciones con actividad inhibitora de la hemaglutinación de arbovirus fueron recogidas y constituyeron el inhibidor parcialmente purificado.

**Prueba de inhibición de la hemaglutinación.**— Se utilizó la microtitulación en platos plásticos desechables, siguiendo básicamente la técnica descrita por Clarke y Casals para anticuerpos (3), con algunas modificaciones. A diluciones crecientes del inhibidor se le añadieron 4-8 unidades hemaglutinantes del antígeno viral, y de inmediato se le agregaron los eritrocitos de ganso al 0,25%. Se incubaron a 37°C por una hora antes de su lectura. El título inhibitorio fué considerado como la más alta dilución de inhibidor capaz de impedir la hemaglutinación.

**Antígenos virales.**— La mayoría de las determinaciones hechas con el inhibidor, lo fueron con antígeno hemaglutinante del virus de la Encefalitis Equina Venezolana preparado en cerebro de ratón lactante y extraído con acetona-sacarosa (3). Se utilizaron además, antígenos de virus de Encefalitis Equina del Este, del Oeste, Bussuquara, Ilheus, Dengue I, Dengue II

y San Luis, obtenidos del Centro para el Control de Enfermedades, Atlanta, USA. Además, se utilizó virus de Encefalitis Venezolana purificado según Mussgay (11).

**Análisis de lípidos y proteínas.**— Se utilizó la técnica de Lowry (9) para la determinación del contenido proteico del inhibidor, y el método de elución de Szentirmay y cols (18) para la determinación de aminoácidos. Se hizo dosificación de colesterol de acuerdo al método de Kim y Golberg (7). Los lípidos totales fueron investigados por métodos turbidimétricos (1). Los triglicéridos lo fueron según la técnica de Sigma (16). Los fosfolípidos se determinaron por el método de Belanger (1).

Los lípidos fueron extraídos con solventes orgánicos de acuerdo a la siguiente técnica: a 1 ml de inhibidor se le añadieron 5 ml de metanol y se agitó la mezcla durante 5 minutos. Luego se añadieron 5 ml de cloroformo, seguido de agitación por 10 minutos. Se centrifugó a 2.000 rpm por 10 minutos. Se obtuvo una fase superior y una inferior acuosa.

Se estudió el comportamiento cromatográfico del extracto lipídico en capa fina de sílica gel (Eastman Kodak). Los cromatogramas fueron revelados con rodamina y expuestos luego a vapores de yodo sublimado (Fernández R., comunicación personal).

**Precipitación de lipoproteínas.**— Las lipoproteínas fueron precipitadas con polisacáridos sulfatados (4) de acuerdo al siguiente esquema. A 1 ml del inhibidor puro se le añadieron 250 UI de heparina sódica y 0,5 ml de  $MnCl_2$  1M. La mezcla se incubó a 40°C durante 20 minutos, al cabo de lo cual se le añadieron 2,5 mg de sulfato de Protamina. Se centrifugó a 2000 rpm por 15 minutos y se dializó el sobrenadante contra solución salina de Dulbecco durante 18 horas. Paralelamente se corrió un control compuesto por inhibidor, solución de Dulbecco y sulfato de Protamina.

**Electroforesis de proteínas.**— Se utilizó un aparato Beckman a 8 mA y 200 voltios durante 16 horas. Se usó buffer de barbital sódico-ácido barbítico a pH 8,6.

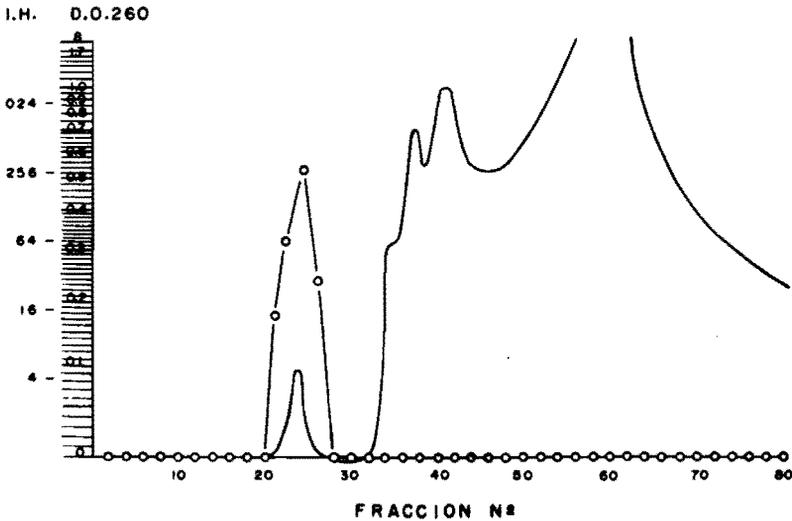
**Tratamientos físicos.**— El inhibidor fué dializado durante 18 horas contra solución de Dulbecco. Fué expuesto al calor durante una hora tanto a 56°C como a 100°C. Se hizo adsorción con caolín (libre de hierro) en suspensión al 25% en solución buffer de borato de sodio 0.05M, pH 9,0.

**Cultivos celulares.**— Se utilizaron cultivos de fibroblastos de embrión de pollo, cultivados en medio 199 adicionado con suero de ternera al 10%.

**Enzimas y reactivos.**— La digestión de proteínas se hizo con tripsina al 2,5% (tripsina 1:300, Nutritional Biochemical, Co.) durante una hora a 37°C. Se utilizó inhibidor de tripsina de soya (NBCo) para detener la acción de la tripsina.

## RESULTADOS

La separación cromatográfica en Sephadex G-100 produjo cinco picos diferentes de absorción a 260 nm, pero la actividad inhibitoria de la hemaglutinación apareció sólo relacionada con las fracciones contenidas en el primer pico (Fig. 1). Este eluyó junto con el volumen de exclusión, demostrado por cromatografía de azul dextrán. El inhibidor, obtenido por recolección de este pico, no dializó, y fué estable a 56°C durante una hora, aunque perdió gran parte de su actividad a 100°C durante el mismo lapso (Tabla I). Todos estos hechos indujeron a pensar que se trataba de una proteína o bien de otro compuesto ligado a una proteína. La presencia de proteína fué confirmada por la reacción de Lowry y su cuantificación fué



**Fig. 1.**— Elución del líquido alantoideo de huevos embrionados en Sephadex G-100. Se observan 5 picos de absorción a 260 nm. La actividad inhibitoria se superpone al primero de los picos. La lectura OD260 se señala con una línea continua. La actividad inhibitoria de la hemaglutinación (IH) de cada fracción está indicada con círculos.

**TABLA I**

**ACCION DE DIFERENTES TRATAMIENTOS FISICOS Y QUIMICOS  
SOBRE EL COMPUESTO INHIBIDOR DE LA HEMAGLUTINACION  
DE ARBOVIRUS PRESENTE EN EL LIQUIDO ALANTOIDEO  
DE HUEVOS EMBRIONADOS**

Tratamiento	Título inhibitorio
Diálisis	1:128
Calor 56°	1:64
100°	1:4
Tripsina	1:512
Heparina-MnCl <sub>2</sub> *	< 1:2
Kaolín*	< 1:2
Sin Tratamiento	1:128

\* Título del sobrenadante.

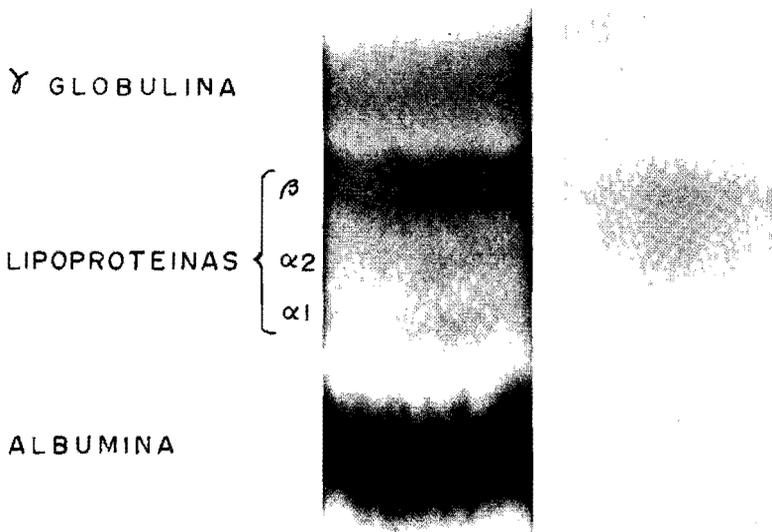
del orden de 430 mg/100 ml (Tabla II). Además, la electroforesis en papel produjo dos bandas que corresponden, por su situación, a las globulinas alfa-2 y beta del plasma humano (Fig. 2).

Sin embargo, la digestión del compuesto con tripsina durante una hora a 37°C, no sólo no inactivó al inhibidor sino que esta propiedad aumentó considerablemente después del tratamiento. Esto indicaba que la proteína estaba ligada a otro compuesto que a su vez era quien poseía la propiedad inhibitoria, y que quedaba mayormente expuesto después de la digestión con tripsina.

**TABLA II**

**COMPOSICION QUIMICA DEL INHIBIDOR.  
CUANTIFICACION DE SUS COMPONENTES**

Proteínas	430 mg/100 ml
Colesterol total	0,43 mg/100 ml
Lípidos totales	784 mg/100 ml
Triglicéridos	375 mg/100 ml
Fosfolípidos	105,5 mg/100 ml



**Fig. 2.—** Electróforesis del compuesto inhibidor en comparación con las proteínas normales del plasma humano. Obsérvese que la migración de las proteínas aviares corresponden a las globulinas alfa-2 y beta.

Se sospechó que se trataba de una lipoproteína, puesto que su actividad desaparecía con tratamiento con caolín, y es sabido que este compuesto es capaz de adsorber, entre otros, a las lipoproteínas. La característica lipoproteica quedó demostrada por la precipitación con heparina en presencia de cloruro de manganeso.

Habiendo establecido la conformación lipoproteica del inhibidor, se prepararon extractos con cloroformo-metanol para determinar los tipos de lípidos presentes. La capacidad inhibitoria desapareció de la fase acuosa del extracto y se observó muy débilmente en la fase de solventes orgánicos. Se hicieron determinaciones de colesterol, lípidos totales, triglicéridos y fosfolípidos, con resultados expuestos en la tabla II. Una fracción de 50 microlitros de este extracto fué colocada sobre sílica-gel en capa fina, junto con una cantidad similar de inhibidor puro y controles comerciales de colesterol, trioleína, tripalmitina, y una mezcla de lecitina-esfingomielina. La cromatografía fué corrida con una mezcla de cloroformo-metanol-a agua, en proporción 95:34:4, para observar lípidos polares, y con una mezcla hexano-dietiléter-ácido acético glacial 80:20:1, para observar triglicéridos. La mezcla hexano-dietiléter-ácido acético glacial resolvió el extracto lipídico en cuatro fracciones, de las cuales se han identificado colesterol y trioleína (Fig. 3). La mezcla cloroformo-metanol agua aparentemente nos indica la presencia de lecitina (Fig. 4).

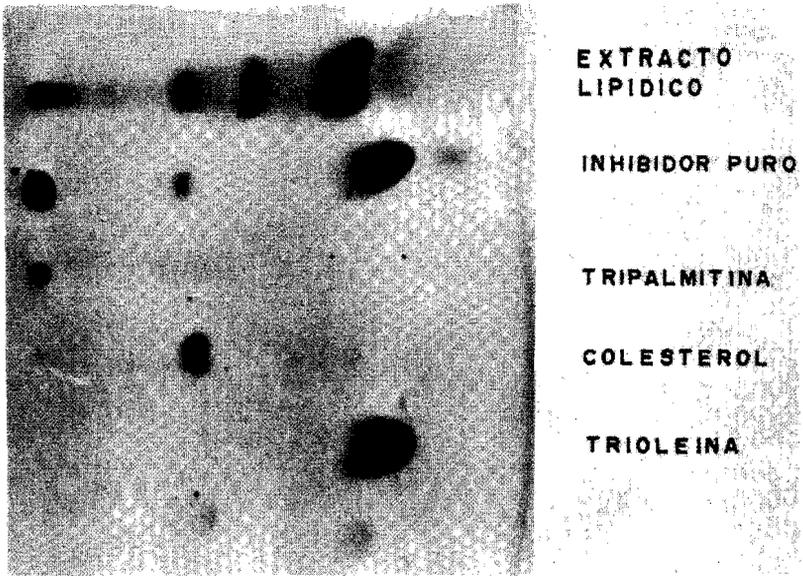


Fig. 3.— Cromatografía en capa fina de sílica gel desarrollada con mezcla de hexano-dietiléter-ácido acético glacial en proporción 80.20.1. Se demuestra la presencia de trioleína y colesterol, y dos fracciones no identificadas aún.

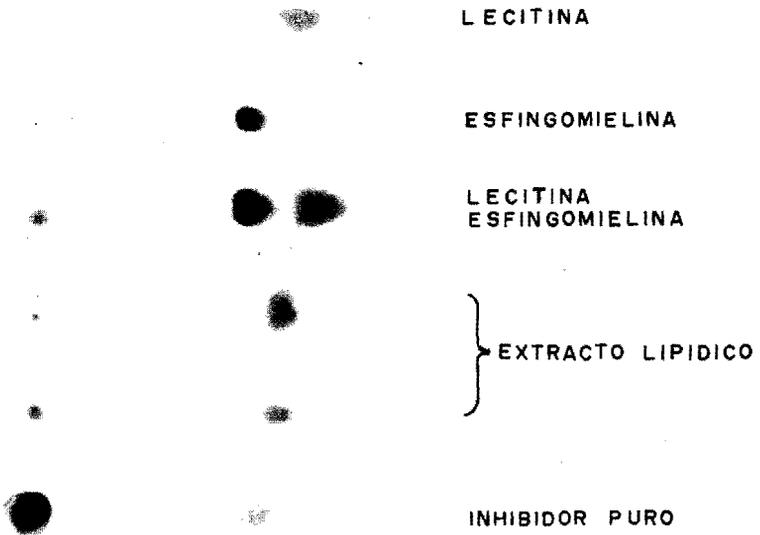


Fig. 4.— Cromatografía en capa fina de sílica gel desarrollada con una mezcla de cloroformo-metanol-agua en proporción 95.34.4. Se corrieron muestras comerciales de lecitina y esfingomielina, además del inhibidor puro y un extracto lipídico del mismo. El inhibidor migra con una Rf intermedio entre lecitina y esfingomielina.

El producto inhibidor es activo contra la hemaglutinación de la mayoría de 8 arbovirus probados de los grupos A y B. La tabla III muestra los títulos de actividad inhibitoria en un experimento tipo.

**TABLA III**  
**ACTIVIDAD DEL INHIBIDOR SOBRE LA HEMAGLUTINACION**  
**DE VARIOS ARBOVIRUS**

<b>GRUPO A</b>		
EEV		1:64*
EEE		1:1
EEO		—
<b>GRUPO B</b>		
Ilheus		1:8
San Luis		1:64
Dengue I		1:128
Dengue II		1:64
Bussuquara		> 1:256

\* La más alta dilución de inhibidor capaz de evitar la hemaglutinación de 8 unidades HA de antígeno.

Para establecer si el compuesto presentaba además, actividad inhibitoria sobre la capacidad infecciosa, se mezclaron partes iguales de inhibidor con virus purificado de la Encefalitis Equina Venezolana. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Paralelamente se hizo un control compuesto de virus purificado suspendido en solución de Dulbecco. Al cabo del período de incubación, se hizo titulación de la infecciosidad de la mezcla virus-inhibidor y del control, por inoculación en células de fibroblastos de embrión de pollo mantenida en medio 199 con suero de ternera al 2%. Igualmente se hizo titulación de la capacidad hemaglutinante de ambos. Los resultados expuestos en la tabla IV indican que hay inhibición total de la hemaglutinación, y que no se afecta la capacidad infecciosa del virus.

**TABLA IV**  
**ACTIVIDAD DEL INHIBIDOR SOBRE LA CAPACIDAD**  
**HEMAGLUTINANTE E INFECCIOSA DEL VIRUS**  
**DE LA ENCEFALITIS VENEZOLANA**

	HA	Título infeccioso
Virus + inhibidor	—	$1.45 \times 10^{13}$ DICT <sub>50</sub> /ml
Virus control	1:40.960	$1.45 \times 10^{13}$ DICT <sub>50</sub> /ml

## DISCUSION

Probablemente existen diferentes tipos químicos de inhibidores no específicos de la hemaglutinación de arbovirus (10, 12-14). En el compuesto que nos ocupa, se trata de lipoproteínas similares en su comportamiento electroforético a las globulinas plasmáticas humanas alfa-2 y beta, con un peso molecular superior a los 150.000, de acuerdo a su comportamiento con el Sephadex G-100. Su actividad inhibitoria está dada por su fracción lipídica, lo que hace recordar los estudios de Salminen (13, 14) sobre inhibidores de la hemaglutinación de los grupos A y B del complejo transmitido por garrapatas. Sin embargo, existen algunas diferencias entre los inhibidores sintéticos de Salminen, preparados con mezclas de colesterol-ácido palmítico y colesterol-lecitina, y las lipoproteínas aquí descritas. En efecto, Salminen concluye que los grupos A y B de los arbovirus comparten los mismos inhibidores no específicos, y que no existe diferencia en el comportamiento de la hemaglutinación con respecto a sus mezclas inhibitorias. Sin embargo, el inhibidor obtenido de huevos embrionados posee una actividad diferencial entre los grupos A y B, siendo más activo sobre el segundo de los nombrados. Entre los miembros probados del grupo A, es inhibitorio de la hemaglutinación del virus de la Encefalitis Venezolana, pero es totalmente inactivo contra el virus de la Encefalitis Equina del Oeste, y muy poco sobre la Encefalitis del Este. Ya Porterfield y Rowe (12) habían demostrado que algunas lipoproteínas del plasma humano tenían un comportamiento similar al descrito por nosotros para estas lipoproteínas aviares, primordialmente con respecto a su actividad sobre los grupos A y B, y a su incapacidad para inhibir la hemaglutinación del virus de la Encefalitis Equina del Oeste. Esto pudiera indicar similitud de su composición química.

Es evidente, a la luz de estos resultados, que existe una diferencia fundamental en la composición química de los virus EEV, EEE y EEO. Holden y cols. (6) detectaron diferencias entre estos virus de acuerdo a su comportamiento frente a un inhibidor inespecífico presente en sangre de aves, y que se cree que es un mucopolisacárido de estructura similar a la heparina. Al contrario de nuestros resultados, el virus de la EEV no era inhibido por ese factor, pero sí los otros dos virus. Sería interesante probar si estos inhibidores pudieran ser usados para la clasificación de los arbovirus.

Los estudios preliminares sobre la composición lipídica de las lipoproteínas aquí descritas, pone de manifiesto la presencia de trioleína, lecitina, colesterol, y otros dos componentes aún no identificados. De éstos, se sabe que el colesterol, cuando está unido a la lecitina, es capaz de producir el fenómeno inhibitorio, aunque estos dos últimos son inactivos cuando

se prueban separadamente (13). Igualmente, se sabe que la trioleína no posee actividad de este tipo (12). No se sabe aún si la actividad inhibitoria de este compuesto se ejerza de manera similar o si bien las dos fracciones aún no identificadas tengan un papel importante en su producción.

El mecanismo de acción de este compuesto no ha sido dilucidado aún.

Actualmente se sabe que el producto no actúa a nivel del eritrocito (Soto-Escalona A, en preparación), lo cual induce lógicamente a pensar que su acción se ejerza sobre la partícula viral. Se sospecha que su composición química es similar a la de los receptores eritrocitarios y actúe por competencia. El hecho comprobado de que el inhibidor es activo sobre la hemaglutinación pero es absolutamente inoperante sobre la capacidad infecciosa del virus, habla en favor de la existencia, al menos, de dos diferentes tipos de receptores virales. Uno que interacciona en la hemaglutinación con eritrocitos de ganso y otro, no susceptible a este inhibidor, responsable de la adsorción a la célula viva en la secuencia de infección del virus. Sin embargo, falta aún información para concluir sobre sus mecanismos de acción.

#### ABSTRACT

**Description of an inhibitor of arbovirus hemagglutinating activity isolated from allantoic fluid of embryonated eggs.** *Soto-Escalona A. (Instituto de Investigación Clínica. Apartado 1151. Maracaibo, Venezuela), Hernández H., Cárdenas C. Invest Clín 19( ): 144-155, 1978.*— The presence of an arboviral hemagglutination inhibitor in the allantoic fluid of embryonated eggs is described. It has been found to be lipoprotein in nature with an active part in the lipidic moiety. The study of the lipid fraction indicates the presence of lecithin, cholesterol, triolein and two fractions not yet identified. The compound inhibits the viral hemagglutination but not its infectious activity. The mechanism of action is discussed under the assumption that the substance has a similar chemical composition to that of the erythrocyte receptors and acts by competition on the viral receptors.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— BELANGER M: Profil lipidique dans l'hyperlipemie essentielle familiale. Aspects cliniques, biochimiques et genetiques. Laval Medical 35. 995-1021, 1964.
- 2— BIDWELL DE, MILLS GL: Serum nonspecific inhibitors of arbovirus hemagglutination. J Comp Pathol 78: 469-476, 1968.

- 3- CLARKE DM, CASALS J: Techniques for hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Amer J Trop Med Hyg* 7: 561-573, 1958.
- 4- CORNWELL DG, KRUGER FA: Molecular complexes in the isolation and characterization of plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 2: 110-131, 1961.
- 5- CHANOCK RM, SABIN AB: The hemagglutination of Western equine encephalomyelitis virus. recovery, properties and use for diagnosis. *J Immunol* 73: 338, 1954.
- 6- HOLDEN P, MUTH D, SHRINER RB: Arbovirus hemagglutinin-inhibitor in avian sera: inactivation with protamine sulphate. *Amer J Epidemiol* 84: 67-73, 1966.
- 7- KIM E, GOLDBERG M: Serum cholesterol assay using a stable Lieberman Burchardt reagent. *Clin Chem* 15: 1171, 1969.
- 8- KOPROWSKI H, LENNETTE EH: Pathogenesis of Venezuela equine encephalomyelitis virus infection in the developing chick embryo. *J Bacterio* 48: 463-472, 1944.
- 9- LOWRY OH, ROSEBROUGH WO, FARR AL, RANDALL RJ: Protein measurement with Folin reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
- 10- MEKLER LB, KHALTAYEVA LG, GAIDAMOVICH WY: Some properties of nonspecific inhibitors of arbovirus hemagglutination. *Acta Virol* 10: 343-347, 1966.
- 11- MUSSGAY M, WEIBEL J: Electron microscopic demonstration of purified Venezuelan equine encephalitis virus. *Virology* 19: 109-110, 1963.
- 12- PORTERFIELD JS, ROWE CE: Hemagglutination with arthropod-borne viruses and its inhibition by certain phospholipids. *Virology* 11: 765-770, 1960.
- 13- SALMINEN A: Chemistry of nonspecific inhibitor of hemagglutination by arthropod-borne viruses. *Virology* 16: 201-203, 1962.
- 14- SALMINEN A, RENKONEN OV, RENKONEN O: Nature of lipids inhibitors of tick borne encephalitis virus hemagglutination. *Ann Med Exp Biol Fenn* 38: 447-455, 1960.

- 15- SEMENOV BF, CHUNIKIN SP, BUTENKO AM, BEREZIN VV.  
Nonspecific inhibitors of hemagglutinating activity of arboviruses in sera of rodents and birds after firearm wounds. Problems of Virology 10: 200-202, 1967.
  - 16- SIGMA Technical Bulletin. N° 405, Dec. 1972.
  - 17- SVEDMYR A: Studies on a factor in normal allantoic fluid inhibiting influenza virus haemagglutination. Occurrence, physico-chemical properties and mode of action. Brit J Exp Pathol 29: 295-308. 1948.
  - 18- SZENTIRMAL A, BRAUN P, HORVATH I, HAUK M: A rapid screening test for determination of total alpha aminoacids in urine and serum. Clin Chem Acta 7: 459, 1963.
-