

29 87



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**" INFECCION DE CULTIVOS DE CELULAS DEL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL POR VIRUS DEL DENGUE "**

Tesis Profesional

Que para obtener el Titulo de:

B I O L O G O

p r e s e n t a

PATRICIA DORA GUEVARA SALAZAR

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	2
1.1 ASPECTOS GENERALES DEL VIRUS DEL DENGUE	2
1.2.1 Clasificación	2
1.2.2 Características Estructurales	2
2. VECTORES	4
3. ANTECEDENTES GENERALES	6
3.1 EPIDEMIOLOGIA DEL DENGUE	6
3.2 EPIDEMIOLOGIA EN MEXICO	7
4. ENCEFALOPATIAS VIRALES CON ENFASIS EN LA DEL DENGUE	8
5. SINTOMATOLOGIA NEUROLOGICA	12
6. ESTUDIOS "in vivo" E "in vitro"	14
6.1 HIPOTESIS DE FACILITACION INMUNE	15
7. CULTIVO DE CELULAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL ..	17
8. OBJETIVOS	22
9. MATERIALES Y METODOS	23
9.1 MEDIOS DE CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO	23
9.2 PREPARACION DE PLACAS DE CULTIVO	24
9.3 MATERIAL BIOLÓGICO	24
9.4 DISECCION, DISPERSION Y SIEMBRA	25
9.5 INFECCION DE LOS CULTIVOS CON EL VIRUS DEL DENGUE	28
9.6 TECNICAS DE INMUNOHISTOQUIMICA	28
9.7 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA	29
9.8 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA LOCALIZACION SIMULTANEA DE VARIOS ANTIGENOS ..	30

10.	RESULTADOS	33
10.1	Infección viral de los cultivos	33
10.2	Tropismo del virus del dengue	33
10.3	Sensibilidad de las cepas de ratón al virus .	35
11.	DISCUSION	46
12.	CONCLUSIONES	51
	APENDICE 1	
	PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CRECIMIENTO	52
	APENDICE 2	
	OPTIMIZACION DE LA DISPERSION DEL TEJIDO FETAL ...	53
	APENDICE 3	
	EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS	54
	REFERENCIAS	56

RESUMEN

En este trabajo se investigó el tropismo de dos serotipos de virus del dengue (DEN-2 NGC, DEN-2 IND, DEN-2 MEX y DEN-4 H241) en cultivo de células de cerebro de ratón con el fin de entender algunos aspectos de la patogénesis de ésta enfermedad. Se realizaron ensayos de infecciones con cada una de las cuatro cepas de virus. Usando anticuerpos específicos como marcadores para identificar a las células en cultivo así como al virus, se demostró que las cuatro cepas infectan neuronas y no lo hacen con el resto de las poblaciones celulares que se encuentran en el cultivo; como: macrófagos, fibroblastos y sobre todo astrocitos, los cuales se ha reportado se infectan "in vivo". Los resultados obtenidos con este sistema, demuestran que la infección de neuronas bipolares y multipolares "in vitro", podría correlacionarse con la presentación de alteraciones neurológicas "in vivo".

1. INTRODUCCION

1.1. ASPECTOS GENERALES DEL VIRUS DEL DENGUE.

1.2.1 Clasificación

El grupo de arbovirus más grande y biológicamente definido contiene subgrupos representantes de diferentes taxones. Los arbovirus que se clasificaban serológicamente en grupos A y B se colocaron respectivamente en los géneros *Alfavirus* y *Flavivirus* (1,2), los cuales hasta 1984 se clasificaron como miembros de la familia *Togaviridae*. Recientemente el Comité Nacional para la Nomenclatura de los virus clasificó a la familia *Flaviviridae* por separado. Esta familia consta de 65 especies relacionadas, incluyendo a los cuatro serotipos del virus del dengue (DEN-1 al DEN-4) (3).

1.2.2 Características Estructurales

El virión esférico del dengue tiene un diámetro aproximado de 50 nm. y está protegido por una cubierta protéica (4). El genoma viral consiste de una cadena sencilla de RNA infecciosa, de polaridad positiva (PM 3.9XE6) con características de RNA mensajero y con aproximadamente 11000 nucleótidos de longitud (5).

Hay tres sistemas diferentes de nomenclatura, los cuales

se han usado para las proteínas de los flavivirus (6). En el sistema más reciente propuesto por Rice y colaboradores (1985) se designó a las proteínas (en el orden de 5' a 3') como C, prM (M), E, NS1, ns2b, NS3, ns4b y NS5. Las proteínas estructurales son: la glicoproteína E (envoltura) (PM 50000 a 650000 daltones), la proteína C (nucleocapside) (PM 14000 daltones) y un péptido pequeño M (PM 8000 daltones) que funciona como una proteína no estructural. Los nombres alternativos más antiguos para estos polipéptidos son V2(C), NV2(prM), V1(M), V3(E), NV3(NS1), NV4(NS3) y NV5(NS5) (7,8). Usando la nomenclatura basada en el tamaño de la proteína y los prefijos "p" y "gp" para las proteínas y glicoproteínas (41), los polipéptidos del DEN-2 también se conocen como GP20(prM), GP60(E), el antígeno soluble fijador de complemento, GP46(NS1), P67(NS3) y P98(NS5) (9).

2. VECTORES

Los cuatro diferentes serotipos del virus del dengue son transmitidos de personas infectadas a personas sensibles, principalmente por la hembra hematofaga del mosquito Aedes aegypty, el vector de la fiebre amarilla. Estas especies pican durante el día y se reproducen en aguas dulces acumuladas, cerca del habitat humano (10).

Además de Aedes aegypty, se han encontrado otros mosquitos, eficientes vectores del dengue, por ejemplo: Ae. triseriatus, que se encuentra en Estados Unidos y es el vector principal de la encefalitis viral de la Crosse; (11). Ae. mediovittatus, especie forestal peridoméstica, encontrada en Puerto Rico (12). Ae. albopictus, mosquito asiático, recientemente descubierto en los estados Unidos y Brasil. Este mosquito que se alimente de sangre humana tiene habitats tanto rural como urbano, también se ha demostrado que transmite al virus del dengue transovarialmente (de mosquitos hembras a su descendencia a través de la infección de los huevecillos) y de hombre a hombre (13).

También se han aislado varias cepas de DEN-2 en Alto Volta y Costa de Marfil a partir de los mosquitos Ae. africanus, Ae. luteocephalus, Ae. opala y del grupo Ae. funcifer-Taylori; además desde 1966 a 1970, se aislaron en Nigeria, los virus DEN-1 y DEN-2 en niños con fiebre inespecífica y el virus DEN-2

3. ANTECEDENTES GENERALES

3.1. EPIDEMIOLOGIA DEL DENGUE

En el grupo de las enfermedades transmitidas por artrópodos, se encuentra la enfermedad del dengue, producida por alguno de los cuatro serotipos del virus del mismo nombre. Estos virus están ampliamente distribuidos en muchas regiones tropicales y subtropicales. Hasta 1945, el dengue se consideraba limitado a regiones de Asia, Africa y Australia. Sin embargo en los últimos 20 años, en la región del Caribe se han presentado varias epidemias. La primera fué en 1963 y abarcó Jamaica, Puerto Rico, Antillas menores y Venezuela (17); la segunda en 1969 en las Islas del Caribe, en donde se reportaron 500,000 casos y durante ésta, se aisló el serotipo DEN-2 (18); en febrero de 1977 se inició una tercera epidemia en Jamaica, que afectó a más de 60,000 personas y se extendió a las Bahamas, Cuba, Puerto Rico, Grenada, Surinam y Venezuela (19). En 1978 esta epidemia penetró a Centroamérica por Honduras (20) y más tarde se extendió a El Salvador, Guatemala y México (16). En 1977 se presentó una epidemia en Cuba donde se reportaron 477,438 casos de dengue clásico y se logró aislar al serotipo DEN-1 (21). En 1981 se presentó nuevamente en Cuba una epidemia causada por el serotipo DEN-2, en la cual se notificaron 344,203 casos, entre niños y adultos. Hasta esa fecha no

se había reportado ninguna epidemia de DEN-2 en esta isla. Los enfermos presentaron síndrome febril, acompañado algunas veces por hemorragia y en ocasiones choque y muerte (22).

3.2. EPIDEMIOLOGIA EN MEXICO

En México, en 1984 se notificaron 27,312 casos en 23 estados, con epidemias mayores en los estados de Puebla, Guerrero, Colima, Jalisco, Nayarit, Sinaloa, Sonora, Veracruz, Michoacán, Morelos y Nuevo León entre otros, siendo el DEN-1 el serotipo predominante: el DEN-2 fué aislado en cuatro casos de Puerto Vallarta, Jalisco, Oaxaca y Chiapas. En Mérida, hubo 5,390 casos de dengue clásico, mas seis confirmados de dengue febril hemorrágico con tres defunciones. El DEN-4 se aisló en tres de los pacientes con enfermedad hemorrágica, uno de los cuales falleció.

En el años de 1983 el DEN-4 era predominante en el sur, el DEN-1 en el noroeste y el DEN-2 en el suroeste del país. Es probable que en los años próximos pudiese circular el DEN-3 o se pudieran presentar casos aislados o epidemias del dengue hemorrágico, debidas a la infección secuencial de cuando menos dos serotipos diferentes, principalmente DEN-1 y DEN-2 o DEN-1 y DEN-4 (19,23,24).

4. ENCEFALOPATIAS VIRALES CON ENFASIS EN LA DEL DENGUE.

Los flavivirus integran un género de más de 60 virus relacionados inmunológicamente, la mayoría de los cuales son transmitidos por artrópodos, este grupo es medicamente importante, ya que 28 de ellos (46%) se asocian a enfermedades en humanos (Tabla 1). También se ha reportado que 8 (13%) flavivirus causan enfermedades en animales silvestres y domésticos de importancia económica (Tabla 2) (4).

Dentro de la familia flaviviridae se encuentra el subgrupo del virus del Dengue, agentes que pueden causar infecciones experimentales agudas o subagudas en ratones, éste incluye los serotipos DEN-1 Hawai y DEN-2 NGC. La categoría de tropismo reportado en el ratón para estos dos serotipos es de tipo vascular sin necrosis o inflamación y para DEN-3 H-87 y DEN-4 H-241 de tipo neurotrópico. Sin embargo estudios recientes han demostrado que el serotipo DEN-2 NGC, es también neurotrópico en ratones lactantes de dos días de edad, cuando el virus es inoculado por vía intracerebral, estos ratones al quinto día post-infección presentaron signos de daño cerebral, parálisis de las extremidades posteriores y pérdida de la orientación, (26).

Aunque los mecanismos de encefalopatía producida por el virus del dengue no se han definido, se han buscado correlaciones con estudios "in vivo" en ratones, observandose funda-

mentalmente parálisis grave, así como la presencia de virus en neuronas y células gliales (26,27,28,29).

Sin embargo aún no existe evidencia confiable que demuestre que el virus es capaz de llegar, invadir y replicarse en el sistema nervioso central (SNC) o periférico del hombre, ya que aparentemente el virus no atraviesa la barrera hematoencefálica.

TABLA 1. Flavivirus Asociados con Enfermedades en Animales de Importancia Económica.

Virus	Especies Afectadas	Enfermedad	Distribución	Incidencia
Encefalitis japonesa	Caballo	Encefalitis	Asia	Baja-moderada Regionalmente alta
	Cerdo	Espermatogénesis disminuida	Asia	Alta
Enfermedad de Louping	Principalmente: ovejas, también ganado, cerdos, caballos, urogallo rojo cautivo y venado.	Encefalitis	Norte de Escocia, Irlanda	Moderada
Wesselsbron	Oveja, ocasionalmente ganado	Aborto, hepatitis/hemorragia, malformación congénita	Africa	Baja-Moderada
Meningo-encefalitis del pavo Israel	Pavos	Encefalitis	Israel	Brotos en 1950
Fiebre hemorrágica de Omsk	Ratones almizcleros silvestres	Encefalitis	Oeste de Siberia	Epizootias intermitentes.
Oeste del Nilo	Caballos	Encefalitis	Africa, Europa	Rara
Kunjin	Caballos	Encefalitis ^a	Australia	Rara
Encefalitis del Valle Murray	Caballos	?Encefalitis ^b	Australia	?Rara

a) Badman et al (1984). b) Asociación en base a grupos serológicos unicamente.
Tomado de Monath (1986)

TABLA 2. Flavivirus Asociados con Síndromes de Enfermedades en Humanos, número total de casos estimados y Vectores Involucrados en su transmisión.

Síndrome Predominante	Prevalencia de enfermedad humana (total de casos reportados) ^a			
	Muy alto (>10 ⁵)	Alto (10 ⁴ - 10 ⁵)	Moderado (10 ² - 10 ⁴)	bajo (<10 ²)
Enfermedades febriles	Dengue (M)	West Nile (M)	-	Banzi (M), Bouboui (M), Bussuquara Ilheus (M), Sepik (M), Spondweni (M), Wesselsbron (M), Zika (M), Rio Bravo (N), Tyuleiny (N).
Encefalitis	Encefalitis japonesa (M)	Encefalitis transmitida por garrapatas (G).	Encefalitis de Sn. Louis (M), de Rocio (M), y del Valle Murray (M), enfermedad del bosque de Kyasanur.	West Nile, Powassan (T), Fiebre hemorrágica de Omsk, Kunjin (M), Enfermedad de louping (G), Ilheus, Apoi (N), Nagishi (G), dengue Rio Bravo, ? Modoc (N).
Fiebre hemorrágica	Dengue, Fiebre amarilla (M).	Enfermedad del bosque de Kyasanur.	Fiebre hemorrágica de Omsk (G).	—

a: Modo de transmisión: (M) mosquito; (G) garrapata; (N) vector desconocido o no transmitidas por un vector tomado de Monath (1986).

5. SINTOMATOLOGIA NEUROLOGICA

El dengue es una virosis aguda (30) y su espectro clínico varía desde un cuadro febril limitado que se caracteriza por mialgias, artralgias, cefaleas, dolor retro-ocular, erupción cutánea, etc., hasta las formas graves que pueden manifestarse como fiebre hemorrágica por dengue (FHD) o como Síndrome de Choque por dengue (SCD).

Ocasionalmente se han presentado algunas manifestaciones neurológicas en pacientes con dengue, durante brotes que han ocurrido en países del sureste asiático, Africa, el pacífico occidental y la región de las Americas (31).

La mayoría de los casos de dengue con complicaciones neurológicas se han reportado en zonas endémicas y se ha observado que no parecen estar asociados con algún serotipo particular (32). Es interesante mencionar que durante la epidemia de dengue ocurrida en Grecia en 1928, se presentaron muchos casos con problemas neurológicos, inclusive hubo algunos casos fatales por encefalitis, pues la mayoría de los pacientes presentaron parálisis de las extremidades inferiores, epilepsia, temblores y amnesia (33).

Las complicaciones neurológicas frecuentemente encontradas en los pacientes con dengue son entre otras: dolor de cabeza, delirio, irritabilidad, depresión, vértigo, insomnio e

inquietud. Casi todos estos signos están asociados con la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, recientemente se han presentado casos mas severos que se acompañan de encefalitis, los signos asociados con este cuadro son: letargo, somnolencia, coma, ataques, rigidez de nuca y paresia (34).

El cuadro clínico anterior se observó en países asiáticos, preferentemente en niños. En un estudio realizado en Indonesia de los casos fatales por dengue, el 72% presentaron uno o más signos de encefalitis (35).

6. ESTUDIOS "in vivo" E "in vitro"

En la FHD/SCD (Fiebre hemorrágica por dengue/Síndrome de choque por dengue) se piensa que está implicada una reacción inmunopatológica durante una segunda infección con un serotipo heterólogo del dengue.

Se han señalado algunas evidencias para explicar la facilitación inmune en experimentos "in vivo" e "in vitro", realizados en células que presentan el receptor Fc de origen tanto humano, como murino y aviario, mas varias líneas celulares de macrófagos en donde el aumento en la replicación del virus dependiente de anticuerpos de flavivirus heterotípicos o anticuerpos homotípicos en concentraciones subneutralizantes se ve favorecida.

En sistemas "in vitro", el fenómeno de facilitación de infección viral por anticuerpos se ha descrito para un número de flavivirus, incluyendo al virus del dengue tipo 1 al 4, el virus del West Nile, fiebre amarilla, encefalitis transmitida por garrapata y el virus de encefalitis del Valle Murray, así como uno o mas representantes de las siguientes familias: alfavirus, poxvirus, bunyavirus, rabdovirus, coronavirus, herpesvirus y reovirus (36,2,37,10).

Las infecciones facilitadas por anticuerpos en algunos sistemas "in vivo", en donde las viremias aumentadas con DEN-2

han sido detectadas en monos rhesus inyectados intravenosamente con anticuerpos de suero humano antiDEN-2, antes de la infección con el virus, así como en otros estudios en donde las viremias fueron facilitadas en monos rhesus infectados inicialmente con virus del dengue tipos 1,2,3 o 4 y retados de 6 semanas a 6 meses mas tarde con heterólogos del dengue tipo 2. El pico promedio de los titulos de viremia fueron significativamente más altos en monos con infección secundaria comparados con aquellos de los virus con infección primaria. Estos estudios facilmente reproducibles apoyan la hipótesis de que la severidad del dengue en humanos puede ser regulada por anticuerpos (38).

6.1. HIPOTESIS DE FACILITACION INMUNE

Se ha propuesto que la facilitación por anticuerpos IgG presentes en cantidades subneutralizantes de la infección primaria (en una persona previamente infectada con un serotipo del dengue diferente) se combinan con el virus de la infección secundaria para formar complejos inmunes. Estos complejos se unen a los receptores Fc de los fagocitos mononucleares (principalmente macrófagos y monocitos), facilitando la entrada a las células y la multiplicación viral. Estas células mononucleares infectadas después llegan a ser blanco de una respuesta de eliminación inmune (principalmente mediada por células T activadas, complemento y el sistema de coagulación), y libera-

ción de mediadores químicos que incrementan la permeabilidad vascular, hemorragia extensiva y choque (39,40,41). Esta hipótesis de facilitación se apoya en datos epidemiológicos donde se sugiere que una gran mayoría de FHD/SCD ocurre durante la infección secundaria. Sin embargo, no cada uno de los que experimentan una segunda infección llegan a ser afectados por FHD/SCD, (de hecho, la enfermedad severa se desarrolla en solamente de 1 a 3% de los casos) (42).

También se ha sugerido que la secuencia de infección de los serotipos del dengue es un factor de riesgo importante DEN-1 seguido por DEN-2, están asociados con el riesgo mas alto de FHD/SCD (43).

7. CULTIVO DE CELULAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Desde 1907, Harrison mostró que las células nerviosas sobreviven "in vitro", en cultivos mantenidos en medios artificiales (44), y ya desde las dos décadas pasadas, se ha avanzado notablemente en la metodología relacionada con el mantenimiento de tejido nervioso "in vitro".

Los procedimientos empleados para obtener células del cerebro disociadas incluye: disociación enzimática (tripsina, pronasa), disociación mecánica (mallas de nylon, jeringa), o bien una combinación de ambas (45).

Sotelo y colaboradores (1980), utilizaron los polos cefálicos completos de embriones de rata o de ratón al onceavo día de gestación y por medio de disociación mecánica, obtuvieron una suspensión compuesta por células neuronales y no neuronales. Estas últimas forman una capa confluyente sobre las cuales se establecen las diferentes poblaciones neuronales, bajo condiciones semejantes al proceso natural de maduración. Las observaciones morfológicas han demostrado que las células disociadas tienden a reagruparse y muy pocas permanecen aisladas. Unos días después de la evolución del cultivo, muchas clases de neuronas centrales morfológicamente diferenciadas pueden ser identificadas. La adición del inhibidor citocilarabinosido a estos cultivos completamente diferenciados, evita la proliferación activa de las células no neuronales y permite la madu-

ración de las poblaciones neuronales así como de algunas células gliales, las cuales cesaron su división antes de la adición de este inhibidor de proliferación celular (46). Debido a que las células del cerebro tienen diez veces más receptores de insulina que otras células (47), y la molécula de insulina es bioquímicamente similar a la mayoría de los factores de crecimiento conocidos (48,49), los cultivos neurales requieren de grandes cantidades de insulina (80 UI/litro) y glucosa (10 g/litro) en el medio ya que se ha demostrado que promueven la maduración neural.

La monocapa celular que sirve de sostén a las neuronas está formada principalmente por astrocitos, oligodendrocitos y fibroblastos. Los hallazgos de Autillo-Tovati y col. (1986) en relación al papel que desempeñan las interacciones neuroastrogliales durante la maduración "in vitro" de neuronas mesencefálicas embrionarias, indican que los astrocitos pueden sintetizar factores neurotróficos que interactúan en forma específica sobre subpoblaciones neuronales localizadas regionalmente.

En estos cultivos se encuentran pocos oligodendrocitos y se piensa que la adición de citocilarabinosido durante la segunda semana del cultivo previene su crecimiento (50).

Las células gliales del cerebro de ratas y ratones recién nacidos, cultivados sobre una superficie de plástico, pueden desarrollarse como poblaciones de células puras. En estos cul-

tivos las células neuronales degeneran durante los dos primeros días y algunos oligodendroblastos sobreviven aproximadamente una semana. Por otra parte se ha mostrado que las delgadas células de forma poligonal de estos cultivos se multiplican activamente y forman una monocapa en un período de 2 semanas (51). La caracterización de estas células en los cultivos se ha hecho a nivel de microscopía electrónica (52), y se ha visto que después de 7-10 días en cultivo, se presentan en estas células pocos microfilamentos dispersos aleatoriamente, siendo más abundantes después de 25 días. Su organización en haces es similar a la observada en astrocitos fibrilares. Esta diferenciación morfológica se efectuó en paralelo con el desarrollo bioquímico de la proteína glial fibrilar ácida (PFGA), un marcador específico de astrocitos fibrilares (53). Otros marcadores gliales específicos, tales como la proteína S-100 y la anhidrasa carbónica, también se han encontrado en estas células (54,55).

La obtención rutinaria y simplificada de cultivo de células del SNC sin perder mucho de su complejidad, permite su manipulación experimental ilimitada en diferentes áreas de las neurociencias. Algunos autores han tenido éxito en el cultivo de células disociadas de ciertas áreas del cerebro. Hartikka y Hefti (1988), con este sistema demostraron que el factor de crecimiento nervioso (NGF) es capaz de afectar la supervivencia y diferenciación en el desarrollo de neuronas colinérgicas del septum, estriado y núcleo basal (56).

La relación existente entre el sistema nervioso central y el sistema inmune cada vez es más explorada. Fontana y otros investigadores (57), han demostrado que los astrocitos al ser estimulados con gama-interferon pueden jugar un papel muy importante como células presentadoras de antígenos, en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La utilización de estos principios experimentales en cultivos de astrocitos, han servido en el estudio de patologías neurológicas como las enfermedades desmielinizantes (58), en el estudio de algunos virus neurotrópicos; como el coronavirus JMH, en donde se establece la importancia de la relación virus-astrocito (59).

Se sabe que el medio ambiente creado y regulado por células de tipo glial determina fundamentalmente la habilidad de un sistema neural para desarrollarse adecuadamente o regenerarse exitosamente.

Un modo de explotar las interacciones neurona-glia es determinando cuándo y cómo se regula la actividad biológica. Los estudios realizados por Giulian y su grupo (1985), indican que los péptidos producidos en el sistema nervioso ayudan a controlar el crecimiento y diferenciación de las células gliales (60, 61), así mismo estos factores pueden influenciar las asociaciones celulares en la maduración de los sistemas neurales.

El desarrollo del sistema nervioso descansa en las interac-

ciones complejas entre las células gliales para regular funciones metabólicas y proveer una organización estructural. Las formas en que la astroglia, oligodendroglia, microglia, y células de Schwann contribuyen al desarrollo del tejido neural permanece aún sin conocerse (62).

8. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar técnicas básicas de cultivo de tejidos, así como la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas como una herramienta en la identificación celular "in vitro".

OBJETIVO PARTICULAR

Estudiar la interacción del dengue con células del sistema nervioso central de origen murino en cultivos primarios.

9. MATERIALES Y METODOS

Los cultivos primarios de células del sistema nervioso central se obtuvieron según la técnica de Sotelo y colaboradores (1980) (46).

9.1. MEDIOS DE CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO

Los medios de cultivo están constituidos por la fórmula comercial de medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (MMED), adicionado con suero bovino fetal, suero de caballo y altas concentraciones de insulina y glucosa, preparados para un litro de medio de cultivo, conservados y refrigerados a 4°C hasta su utilización.

En el apéndice 1, se describe la composición de los medios de cultivo utilizados, y en el apéndice 2 se enlistan el material, equipo y reactivos utilizados.

Para llevar a cabo esta técnica se requiere un ambiente en condiciones de esterilidad, ya que los medios de cultivo contienen nutrientes que favorecen el crecimiento de bacterias y hongos, los cuales atacan y destruyen el cultivo, además de que pueden llegar a producir toxinas que afectan el crecimiento celular. Por estas razones es necesario que la manipulación se lleve a cabo en un área esteril y que todo el material en el área de sembra-

do, incluyendo el instrumental esten esterilizados.

Se trabajó en una campana de flujo laminar y para extremar precauciones, se utilizó un mechero Bunsen.

9.2. PREPARACION DE PLACAS DE CULTIVO

Se utilizaron placas de 6 pozos para cultivo y su preparación consistió en colocar un cubreobjetos de vidrio estéril en cada uno de los pozos.

Se hicieron alicuotas de medio de crecimiento y se mantuvieron en incubación durante una hora a 37°C con atmósfera húmeda, 7.5% de dióxido de carbono y 92.5% de aire antes de la siembra.

9.3. MATERIAL BIOLÓGICO

Como fuente celular se utilizaron embriones de ratón, obtenidos de hembras al doceavo día de gestación de dos diferentes cepas, cepa NIH, (del bioterio de la Unidad del Sistema Nervioso del INNN), así como la cepa Balb/c, (obtenidos del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas).

Las cepas del dengue obtenidas del Laboratorio del dengue del Instituto de Investigaciones Biomédicas, cre-

cieron en cerebro de ratón lactante o en cultivos de células de mosquito TRA-284. Posteriormente se titularon en cultivos de células de riñón de mono LLC-MK2, por el ensayo en placa, dando los siguientes valores:

DEN-2 NGC	1.75X10E7 PFU/ml.
DEN-2 MEX	7.70X10E9 PFU/ml.
DEN-2 IND	7.50X10E9 PFU/ml.
DEN-4 H241	2.50X10E9 PFU/ml.

9.4. DISECCION, DISPERSION Y SIEMBRA

Las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical y el útero con los embriones se extrajo en condiciones asépticas, las camadas generalmente contenían de 8 a 10 fetos. Los embriones cada uno con aproximadamente 6 mm. de longitud, se colocaron en una caja de Petri estéril en donde inmediatamente después se les amputó la región cefálica con tijeras de iridectomía y se les colocó en un tubo de centrifuga de 10 ml. que contenía 5 ml. de medio de crecimiento, previamente incubado a 37°C. Para obtener una suspensión celular homogénea, el tejido se disoció mecánicamente haciéndolo pasar a través de una jeringa de 3 ml. con agujas de número 18 y 19 sucesivamente, la jeringa se llenó y vació de 4 a 5 veces en cada cambio de aguja. Esta suspensión celular se llevó a un volumen final del medio de crecimiento a 37°C (120 ml); y

se agregaron 3.0 ml. a cada pozo de las cajas de cultivo ya preparadas, se colocaron en la incubadora inmediatamente después de la siembra, bajo las mismas condiciones de temperatura y porcentaje de CO₂. Para permitir que la monocapa celular se estableciera en los cultivos, estos se mantuvieron sin cambio de medio durante los primeros cinco días. El cambio se efectuó al sexto día, utilizando el medio de mantenimiento núm. 2. En esta etapa, las diferentes poblaciones celulares que componen a estos cultivos primarios ya se encontraban morfológicamente bien diferenciados, (fig. 1). El medio núm. 2 de mantenimiento, se dejó durante dos días más, para permitir que las células se habituaran al cambio de medio y para obtener una completa maduración de la población neuronal.

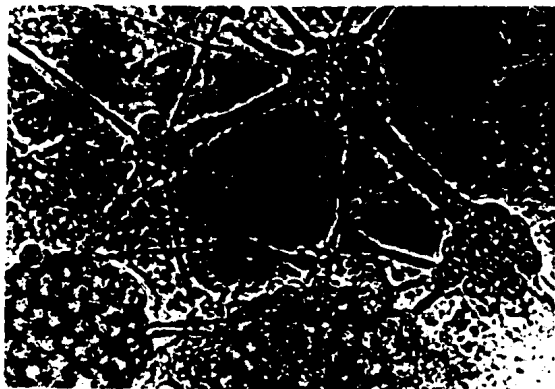


Fig. 1 Cultivo de células del sistema nervioso central de ratón, con sus poblaciones celulares bien diferenciadas. 40X. Microscopía de contraste de fases.

9.5 INFECCION DE LOS CULTIVOS CON EL VIRUS DEL DENGUE

La infección con las cuatro cepas del virus del dengue, se llevó a cabo 8 días después de establecidos los cultivos, las diluciones de los stocks de virus de cada serotipo a lavar fueron: 3:25, 3:50, 3:100, 3:200 y 3:300. Los días 2,5,7,9 y 15 post-infección, después de coleccionar los sobrenadantes, se sacaron los cubreobjetos con la monocapa celular, se lavaron con buffer fosfatos (PBS) pH 7.4 0.01M y se fijaron en acetona a -20°C de 1 a 2 min., guardandose en congelación hasta su procesamiento con diferentes técnicas inmunohistoquímicas. Los cultivos control se mantuvieron bajo las mismas condiciones, pero sin el inóculo viral.

9.6 TECNICAS DE INMUNOHISTOQUIMICA

La utilización de estas técnicas se debe a la alta especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, que permite descubrir antígenos in situ, sin aislarlos de sus componentes circulantes. Coons y Kaplan en 1950, establecieron como procedimiento práctico una técnica que involucra el uso de fluoresceína para marcaje de anticuerpos, sin perjudicar significativamente su reactividad (63,64,65).

9.7 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

En los métodos de tención de inmunofluorescencia directa, el fluorocromo se conjuga directamente al anticuerpo primario (66).

Procedimiento:

- 1.- Cubreobjetos con monocapas celulares de cultivos infectados y no infectados, fijados en acetona fría de 1 a 2 min.
- 2.- Hidratar las monocapas celulares con PBS (solución reguladora de fosfatos) de 10 a 15 min.
- 3.- Remover el PBS con la pipeta o con una gasa absorbente.
PRECAUCION: NO TOCAR EL TEJIDO NI DEJAR QUE SE SEQUE (*).
- 4.- Cubrir cada monocapa con una o dos gotas (aproximadamente de 100 a 150 ul) del antisuero conjugado con fluoresceína: FICT-Suero humano antiviral del dengue 1:1000 y mantener los cubreobjetos en cámara húmeda a temperatura ambiente, durante 30 min.
- 5.- Remover los cubreobjetos de la cámara húmeda y enjuagar con PBS el exceso de antisuero de la monocapa. Continuar lavando las monocapas con más PBS, durante 10 min.

- 6.- Secar el exceso de PBS de los cubreobjetos con una gasa absorbente. (*)
- 7.- Colocar una gota de elvanol (solución montadora) sobre un portaobjetos y colocar el cubreobjetos con la monocapa en contacto con el elvanol. Dejar secar.
- 8.- Observar la preparación en un microscopio de campo obscuro usando filtros apropiados para el marcaje de fluoresceína.

9.8 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA LOCALIZACION SIMULTANEA DE VARIOS ANTIGENOS

En los métodos de tinción indirecta se emplea un procedimiento de dos etapas, ésta involucra la aplicación de un anticuerpo primario no conjugado, seguido por un anticuerpo conjugado con un fluorocromo derivado de una segunda especie y dirigido contra la fracción globular del anticuerpo primario.

Para la localización de varios antígenos en una sola sección de tejido, se utiliza la combinación de isotiocianato de fluoresceína (FICT) e isotiocianato de tetrametil rodamina (TRICT), esta técnica de doble tinción de inmunofluorescencia implica la aplicación secuencial de anticuerpos apropiadamente conjugados con la intervención de lavados con buffer de fosfatos.

Procedimiento:

- 1.- Cubreobjetos con monocapas celulares de cultivos infectados y no infectados, fijados con acetona fría de 1 a 2 min.
- 2.- Hidratar las monocapas celulares con PBS de 10 a 15 mins.
- 3.- Remover el PBS con la pipeta pasteur o con una gasa absorbente. PRECAUCION: NO TOCAR EL TEJIDO NI DEJAR QUE SE SEQUE (*).
- 4.- Cubrir cada monocapa con una o dos gotas del antisuero primario diluido: Suero de ratón antiviral del dengue 1:50 y mantener los cubreobjetos en cámara húmeda a temperatura ambiente, durante 30 min.
- 5.- Remover los cubreobjetos de la cámara húmeda y enjuagar con PBS el exceso del antisuero de la monocapa. Continuar lavando con PBS, durante 10 min.
- 6.- Secar el exceso de PBS de los cubreobjetos con una gasa absorbente (*).
- 7.- Aplicar una o dos gotas de la dilución del anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína: FICT-Suero de conejo antisuero de ratón 1:50. Incubar los cubreob-

- 8.- Remover los cubreobjetos de la cámara húmeda y enjuagar con PBS el exceso de antisuero. Continuar lavando con PBS, durante 10 min.
- 9.- Aplicar una o dos gotas del siguiente antisuero primario diluido (dirigido contra un antígeno diferente al usado en el paso 4) y mantener los cubreobjetos en cámara húmeda a temperatura ambiente, durante 30 min.
- 10.- Repetir pasos 5 y 6.
- 11.- Aplicar una o dos gotas de la dilución del anticuerpo secundario conjugado con rodamina (TRICT). Incubar las monocapas en una cámara húmeda a temperatura ambiente, durante 30 min.
- 12.- Repetir pasos 5 y 6.
- 13.- Secar el exceso de PBS de los cubreobjetos y colocar una gota de etanol sobre un portaobjetos y colocar el cubreobjetos con la monocapa en contacto con el etanol. Dejar secar.
- 14.- Observar la preparación usando un microscopio de campo oscuro con filtros apropiados para el marcaje de fluoresceína y rodamina.

10. RESULTADOS

10.1. Infección viral de los cultivos

Para demostrar la replicación del virus del dengue en cultivos de células del SNC de ratón, los cultivos se infectaron con diferentes concentraciones de virus cuyos títulos ya se mencionaron anteriormente.

En diferentes días post-infección se buscó la presencia del virus en estas células. Las infecciones con DEN-2 MEX, DEN-2 IND y con DEN-2 NGC mostraron que el virus se encuentra ya a las 24 horas en escasas células aumentando su número los días 5 y 7 para DEN-2 MEX, y para DEN-2 IND, Tabla 3, Gráfica 1, y los días 2 y 5 para DEN-2 NGC, Tabla 4. Con DEN-4 H 241, se encontraron resultados positivos los días 1,2,4 y 7 (datos no mostrados).

10.2. Tropicismo del virus del dengue.

Para determinar en cual de los tipos celulares se replicó el virus del dengue, se realizó la tinción de doble inmunofluorescencia usando anticuerpos obtenidos en ratón contra el virus del dengue y anticuerpos de conejo ya sea anti PGFA o anti enolasa específica de neuronas. Los resultados demostraron que la localización del virus es en neuronas, alrededor del núcleo con distribución citoplásmica

y a lo largo de los axones y dendritas; la morfología de las neuronas infectadas correspondió preferentemente al tipo bipolar (aún cuando no todas las células de esta subpoblación se infectan) (Fig. 2), también se observa infección de neuronas multipolares pero en menor proporción, indicando una susceptibilidad variable de la población neural a la infección. La distribución del virus fué invariable, independientemente del serotipo utilizado; Figs. 2,3,4,5.

En estos cultivos el cien por ciento de las poblaciones de astrocitos (Fig. 6), (aún en cultivos de astrocitos 80% puros), macrófagos (Figs. 7A,B,C) y fibroblastos no se detectó el virus por lo que al parecer permanecen sin infectarse.

Para caracterizar un tipo celular dentro de la línea monocito-macrófago, en estos cultivos se llevaron a cabo tinciones de esterasa no específica y la prueba funcional de fagocitosis positiva, ambas propiedades características de macrófagos, así como una tinción de PAP (peroxidasa antiperoxidasa), con un anticuerpo monoclonal anti membrana de macrófago, (estos ensayos se realizaron una sola vez, solo para identificar a este tipo celular).

Una vez identificado el tipo celular infectado, se trató de comprobar, si a mayor concentración del inóculo viral se infectaban las otras poblaciones celulares, y en-

contramos que las células infectadas siguieron siendo neuronas multipolares y bipolares, predominando la infección en estas últimas, sin haber infección aparente de las demás poblaciones celulares.

10.3. Sensibilidad de las cepas de ratón al virus.

Con respecto a las dos cepas de ratón utilizadas para este trabajo: NIH y Balb/c, aparentemente las dos son igualmente susceptibles al virus del dengue, mostrando el mismo patrón de distribución celular para los cuatro diferentes serotipos.

TABLA 3. INFECCION DE CULTIVOS DEL SNC DE RATON CON VIRUS DEL DENGUE-2 MEXICANO E INDONESIA.

Virus ^a			Número de neuronas ^d fluorescentes	
DEN-2 MEX TRA8 ^b CRL4 ^c			5 días	7 días
(x10 ⁸)				
9.2			51	216
4.6			60	533
2.3			82	281
1.1			5	100
0.8			16	98
CONTROL			—	—
DEN-2 IND TRA12 CRL4				
(x10 ⁸)				
9.0			28	114
4.5			54	457
2.2			5	512
1.1			27	294
0.8			16	274
CONTROL			—	—

a) TITULO DEL VIRUS: DEN-2 MEX TRA 8 CRL4 7.7x10⁹ PFU/ml.

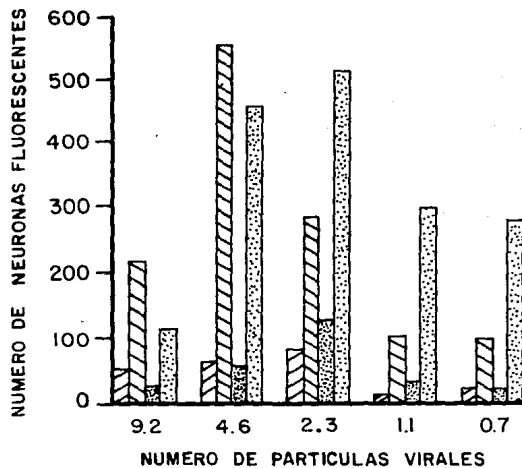
DEN-2 IND TRA 12 CRL4 7.5x10⁹ PFU/ml.

b) TRA8 Cultivo de células de mosquito TRA, page 8




c) CRL4 Células de cerebro de ratón lactante, page 4

d) Las observaciones fueron únicas y la técnica usada de doblefluorescencia indirecta.

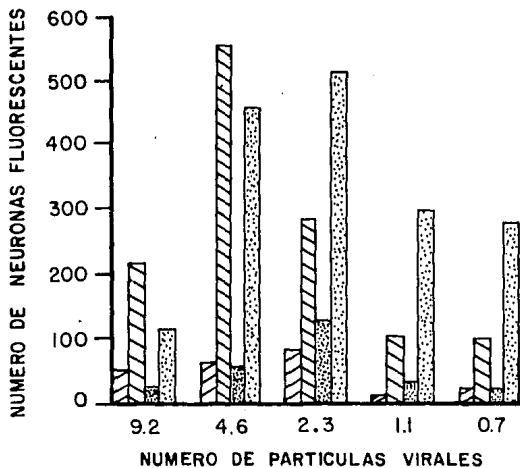
**Graf:1 NEURONAS EN CULTIVO INFECTADAS CON VIRUS
DEL DENGUE-2 MEXICANO E INDONESIA**



TITULO DEL VIRUS: DEN 2 MEX TRA8 CRL4 7.7×10^9 PFU/ml.
DEN 2 IND TRA12 CRL4 7.5×10^9 PFU/ml.

5° dia 7° dia
DEN-2 MEX.  
DEN-2 IND  

Graf.1 NEURONAS EN CULTIVO INFECTADAS CON VIRUS DEL DENGUE-2 MEXICANO E INDONESIA



TITULO DEL VIRUS: DEN 2 MEX TRA 8 CRL 4 7.7×10^9 PFU/ml.
 DEN 2 IND TRA 12 CRL 4 7.5×10^9 PFU/ml.

	5° dia	7° dia
DEN-2 MEX.		
DEN-2 IND		

TABLA 4. NEURONAS INFECTADAS CON VIRUS DEL DENGUE-2 NGC.

Virus ^a DEN-2 NGC (x10 ⁶)	Número de neuronas fluorescentes ^b	
	2 días	5 días
1.2	15	61
0.6	57	760
0.3	121	583
0.2	112	477

a) Título del virus DEN-2 NGC 1.75×10^7 PFU/ml.

b) Promedio de dos cinéticas de infección, con tinción indirecta de doble fluorocromo.

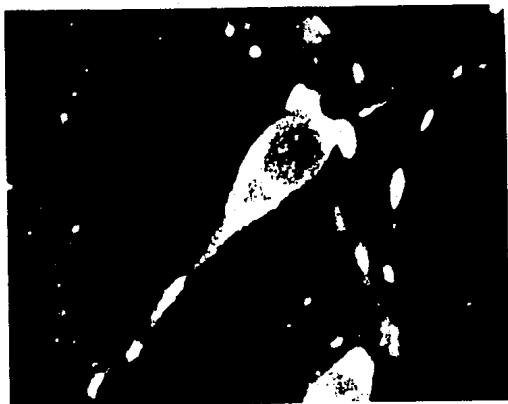


Fig. 2 Cultivo de células del SNC de ratón (cepa NIH), mostrando neurona bipolar, 15 días post-infección con virus DEN-2 NGC, identificada con suero humano anti virus del dengue, marcado con fluoresceína. 100X.

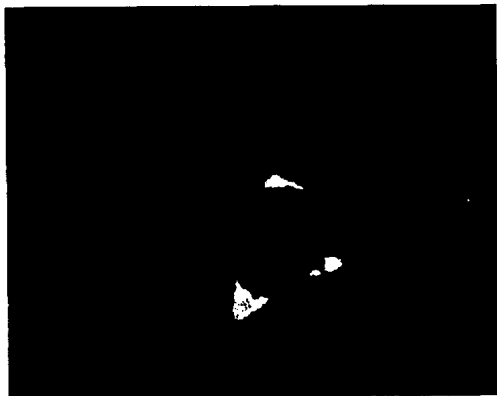


Fig. 3 Tinción de doble inmunofluorescencia indirecta de cultivo de células de cerebro de ratón (cepa NIH), post-infección con virus del DEN-2 NGC.

A) Tinción FICT anti virus del DEN-2 NGC.

B) Tinción TRICT anti enolasa específica de neuronas.

A y B representan el mismo campo microscópico. 100X.

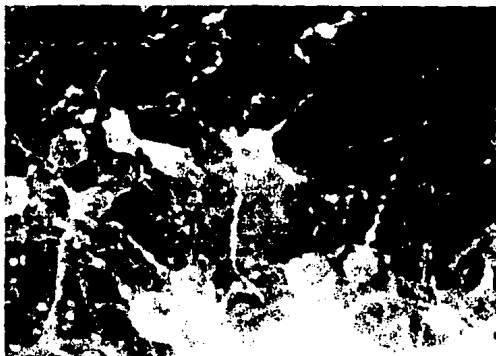


Fig. 4 Tinción de inmunofluorescencia indirecta de cultivo de células del SNC, identificando un acúmulo de neuronas, 4 días post-infección con el virus del DEN-2 MEX SMP4, (ratón cepa Balb/c). 40X.



Fig. 5 Tinción de inmunofluorescencia indirecta de cultivo de células del SNC, identificando un acúmulo de neuronas, 5 días post-infección con el virus del DEN-2 IND TRA12 (ratón cepa Balb/c). 40X.



Fig. 6 Tinción de dobleinmunofluorescencia indirecta de cultivo de células del SNC de ratón (cepa NIH), 5 días post-infección con virus DEN-2 NGC.

- A) Neurona bipolar (flecha) infectada con virus del dengue, identificada con FICT anti virus DEN-2.
B) Acúmulo de astrocitos identificados con TRICT anti PGFA.
A y B son fotografías del mismo campo. 100X.

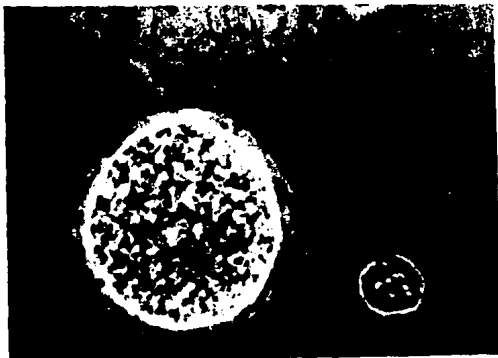


Fig. 7 A) Tinción de esterasa. 100X.



Fig. 7 B) Prueba funcional de fagocitosis positiva, al mismo tipo de células, aparentemente de la línea monocito-macrófago, en cultivo de células del SNC de ratón, las cuales permanecen sin infectarse con DEN-2. 100X.

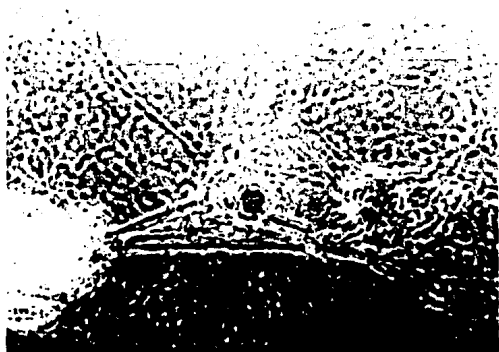


Fig. 7 C) Tinción con PAP (peroxidasa anti peroxidasa), en cultivo de células del SNC de ratón, con un anticuerpo monoclonal anti membrana de macrófago. 40X.

11. DISCUSION

Las ventajas de emplear cultivos de células en estudios de cerebro intacto son múltiples; quizá la más importante sea la de obtener a las neuronas depositadas en un solo plano, con todas sus comunicaciones intercelulares desarrolladas en el mismo extracto, lo que permite analizar la complicada morfología y fisiología en células integras, lo cual no se puede lograr en estudios "in vivo". Por otra parte, el acceso es más directo y simple a la neurona y ofrece posibilidades ilimitadas para su estudio en el laboratorio, así como para reproducir experimentalmente condiciones patológicas, simulando mecanismos que participan en enfermedades del sistema nervioso, por ejemplo la infección de las células con el virus del dengue bajo condiciones controladas. Simultáneamente es posible observar la dinámica funcional del sistema nervioso al analizar las condiciones neurales y la relación de independencia que guardan las diferentes estirpes celulares cerebrales. En suma el cultivo de células cerebrales nos ofrece la oportunidad de investigar pequeños fragmentos funcionales del sistema nervioso separados del organismo intacto (68,69).

La utilización de las técnicas de doble fluorocromo en los cultivos sometidos a la infección, permitieron visualizar la presencia del virus del dengue (cuatro serotipos utilizados: DEN-2 NGC, DEN-2 MEX, DEN-2 IND y DEN-4 H 241), así como la identificación de las diferentes poblaciones celulares que

forman el cultivo. Nuestros resultados mostraron que el virus se encuentra en la población neuronal, preferentemente en neuronas bipolares, la presencia del virus en las células gliales fué negativa, dato que contrasta con las observaciones hechas por Bhamarapravati (1964) y Sriurairatna (1973), en donde con técnicas de inmunofluorescencia la infección con el virus del dengue es detectada en neuronas así como en astrocitos en cortes de cerebro de ratón lactante (26,27). Los datos encontrados en este estudio son particularmente interesantes, debido a que se sabe que los astrocitos son efectivos como células capaces de presentar al antígeno, por su ubicuidad y habilidad de fagocitar, procesar y presentar antígeno viral en el contexto de Ia (57,58,59), además por poseer receptores para Fc podrían presentar el fenómeno de facilitación inmunológica ya demostrado con dengue "in vivo" e "in vitro" (36,2,37,10). Por lo tanto puede pensarse que al invadir el virus el SNC, éstas poblaciones celulares deben jugar un papel muy importante en la respuesta inmune, lo sorprendente es que al parecer los astrocitos no son susceptibles a la infección por el virus del dengue, aunque existe la posibilidad de una infección latente o que el virus sea producido en cantidades tan bajas que no sea detectable.

Otra población celular detectada en estos cultivos por medio de un anticuerpo monoclonal anti membrana de macrófagos, tinción de esterasas y prueba funcional de fagocitosis positiva, fueron los macrófagos, que permanecieron sin infectarse con

el virus del dengue. Un mecanismo inmunopatológico potencial en la facilitación de la replicación viral en éstas células de la línea monocito-macrófago, mediada por anticuerpos complemento o recientemente interferón (2,11,41,75,76), ha sido demostrada "in vivo" e "in vitro" con dengue, pero de la cual aún no hay evidencias de participación en el SNC.

La comparación de las tinciones de inmunofluorescencia obtenidas con antisueros contra diferentes estirpes celulares de los cultivos apoya la idea de que el virus del dengue presenta neurotropismo, preferentemente a neuronas bipolares y en menor proporción a neuronas multipolares, este resultado podría correlacionarse con ciertas neuropatías observadas en estudios "in vivo", donde 4 y 5 días post-infección, se observó parálisis de las extremidades posteriores en ratones lactantes, inoculados intracerebralmente con el virus del dengue (28).

Ejemplo de algunos estudio realizados con diferentes tipos de virus son: el virus de Theiler, un picornavirus que puede producir parálisis aguda o crónica en ratones. Estos virus cuando se inoculan vía intracerebral ocasionan una fase inicial caracterizada por parálisis flácida, necrosis neuronal y proliferación de la microglia; la fase tardía de la enfermedad se caracteriza por parálisis espástica, desmielinización e infiltración mononuclear. Se ha demostrado además, que al infectar cultivos de células del SNC de ratón, el virus de Theiler causa lisis de oligodendrocitos y neuronas así como una infección persistente de astrocitos y macrófagos (70).

Otro virus que se ha reportado en astrocitos pero no en neuronas es el virus de la Deshidrogenasa láctica (LDHV), el cual causa una infección persistente en ratones C58, asociada clinicamente con poliencefalitis (71).

El tropismo específico de un virus en particular por determinado huésped y/o tejido, es un factor importante que interviene en la virulencia. Como consecuencia de los diferentes tropismos se producen diferentes patrones de enfermedad.

Se desconoce el sitio de replicación del virus del dengue en las neuronas, es muy probable que además del citoplasma se realice en las dendritas en las que se ha reportado se encuentran además del R.E.R. (Retículo Endoplasmico Rugoso) todos los constituyentes necesarios para la replicación viral (72).

La replicación viral dentro de las neuronas de los cultivos infectados y la liberación posterior y sostenida hasta por 15 días de virus infectante en los sobrenadantes provee de un posible mecanismo de infección por difusión pasiva hacia el resto de las poblaciones celulares, de esta manera la concentración de virus en los sobrenadantes aún cuando sea baja es sostenida por tiempo suficiente para infectar la mayoría de las células vecinas, dada la cercanía con las infectadas. Pero al no ser así, una explicación de la diferente susceptibilidad, podría ser que la forma de transmisión sea de neurona a neurona por las sinapsis y no a través de receptores específicos.

Los cultivos de células del cerebro han sido de gran utilidad en el estudio de algunos virus, por ejemplo, para entender una etapa importante de la patogénesis por Reovirus se ha logrado aislar, purificar y caracterizar el receptor celular de Reovirus tipo 3 el cual es un receptor beta adrenérgico. También se ha demostrado que el tropismo está relacionado con la interacción de estructuras virales con receptores celulares específicos y se ha sugerido que es posible que haya diferencias en las interacciones virus-receptor, particularmente en aquellas que involucran moléculas neurotransmisoras y una variedad de familias de receptores (73).

El papel patológico de la inflamación en el sistema neural, el cual es probable que varíe con la magnitud de la expresión de los antígenos virales sobre las células neurales blanco, o la citotoxicidad mediada por células T (74), anticuerpos, CCDA (Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos) mediada por macrófagos, astrocitos o células de la microglia se desconoce para muchos virus incluyendo el virus del dengue.

APENDICE 1

MEDIO DE CRECIMIENTO (Sotelo y cols., 1980) (46).

Medio de Cultivo No. 1

Medio Mínimo Escencial Modificado por Dulbecco (MEMMD) (Labs. Flow, Virginia)	80%
Suero Bovino Fetal (Labs. SIGMA)	10%
Suero de Caballo (Labs. "IN VITRO")	10%
Dextrosa (Labs. Pisa)	10g/litro
Insulina Cristalina de Acción Rápida (Labs. Lilly)	80 UI
Bicarbonato de Sodio (Labs. Baker)	1.5g/litro
Penicilina (Labs. Pisa)	5000 U/ml
Estreptomina (Labs. Pisa)	5000g/ml
L-glutamina (Labs. Flow, Virginia)	10ml/litro

MEDIO DE MANTENIMIENTO

Medio de Cultivo No. 2

Es como el anterior pero sin Suero Bovino Fetal.

Suero de Caballo inactivado	20%
Citocilarabinosido (Labs. SIGMA)	10mg/litro

APENDICE 2

OPTIMIZACION DE LA DISPERSION DEL TEJIDO FETAL.

El sistema de dispersión utilizado originalmente, consiste de una dispersión mecánica, pasando el tejido por una serie de agujas hipodérmicas de diametro en orden decreciente (núm. 18, 19, 20), en este trabajo se omitió la aguja 20, para evitar el daño celular excesivo por el estres mecánico, al hacer pasar de una aguja a la siguiente en la serie a las células embrionarias, además en estos dos pasos iniciales es dónde se obtienen casi todas las células viables del proceso de dispersión por agujas, probablemente porque los fragmentos de tejido no dispersado ya está demasiado dañado por el proceso como para rendir más células viables.

Por otra parte, es difícil establecer la proporción exacta de cada tipo histológico en éstos cultivos, debido a que éstos varían de un cubreobjetos a otro (46), partiendo de esta observación, y para obtener una suspensión celular homogénea, (aunque sabemos que se trabaja con células embrionarias aún no bien diferenciadas), ésta se llevó a un volúmen final con medio 1 ya incubado, este volúmen se determinaba de acuerdo al número de placas de 6 pozos y frascos de cultivo a utilizar, llenando con 3 ml. a cada pozo y 5 ml. para cada frasco de cultivo.

APENDICE 3

EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS.

EQUIPO:

Campana de flujo laminar. Labconco Biohazard Cabinet.

Camara de incubación, con atmósfera húmeda y control de CO₂.

Mechero Bunsen.

Microscopio invertido IM 35 Zeiss, Oberkochen Alemania. Para observaciones con luz transmitida y campo oscuro con filtros (longitud de onda de excitación 440-490nm; emisión 520-560) para fluorescencia y (longitud de onda de excitación 546nm; emisión 580-600nm).

MATERIAL:

Cajas de poliestireno (Falcon New Jersey) de 6 pozos.

Frascos de poliestireno 25 cm cúbicos (Falcon New Jersey). American type culture collections.

Cubreobjetos de 22x22 mm. y portaobjetos. Corning. México.

Cajas de Petri estériles.

Estuche de disección.

Tubo de centrifuga de plástico estéril.

Frascos de vidrio de 400 y 100 ml. estériles.

Jeringas de plástico estériles de 3 ml.

Agujas del número 18 y 19.

Pipetas estériles de 5 y 10 ml.

Pipeta Pasteur.

Cámara húmeda (caja de cipsaware y esponja humeda).

REACTIVOS:

Alcohol etílico.

Acetona a -20 grados C.

Buffer PBS (Solución reguladora de fosfatos) pH 7.4 0.01 mM.

Elvanol (solución montadora para técnicas de inmunohistoquímica, hecha a base de polivinil alcohol, glicerol, agua destilada, tis buffer 0.1 M, pH 8.5.

ANTICUERPOS:

Suero humano anti virus del dengue conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FICT), 1:1000.

Suero de ratón antiviral del dengue. 1:50.

Obtenidos por el Q.F.B. José Luis Imbert del Lab. del Dengue del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Suero de conejo anti IgG de ratón, 1:50, conjugado con FICT. SIGMA.

Suero de conejo anti proteína glial fibrilar ácida (PGFA), 1:50, obtenida en el Laboratorio de Neuroinmunología del INNN, por la Q.B.P. Alejandra Zamora.

IgG de conejo anti enolasa específica de neuronas. 1:10. INCSTAR Corporation.

IgG de cabra conjugado con isotiocianato de tetrametil radamina (TRICT) anti IgG de conejo. SIGMA.

REFERENCIAS

- 1.- Porterfield, J.S. (1980). Arbovirus-structure and clasificación. Med. Trop. Sept-oct; 4:93-98.
- 2.- Peiris, J.S.M., Gordon, S., Unkeless, J.C., Porterfield, J.S. (1981). Monoclonal anti-Fc receptor IgG blocks antibody enhancement of viral replication in macorphages. Nature. 289: 189-191.
- 3.- Westaway, E.G., Brinlón, M.A., Gardanovich, S. Ya., Horzinek, M.C., Igarashi, A., Kaariainen, Lvov, D.K., Porterfield, J.S., Russell, P.K., and Trent, D.W., (1986). Flaviviridae. Intervirology. Vol. 24; 183.
- 4.- Monath, T.P. (1986). Pathobiology of the flavivirus. Chap. 12. In the togaviridae and flaviviridae. Schlesinger and Mj. Schlesinger (eds.). Plenum Press, New York and London. Pp 374-440.
- 5.- Cleaves, G.R. (1985) Identification of dengue type 2 virus-specific high molecular weight proteins in virus-infected BHK cells. Journal of General Virology. 66: 2767-2771.
- 6.- Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R., Shin, S.J., Sheets, R.L. and Strauss, J.H. (1985). Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. Science. 229: 726-733.
- 7.- Castle, E., Mowak, T., Leidner, U., Wengler, G. and Wengler, G. (1985). Sequence analysis of the viral core protein and the membrane-associated proteins V1 and NV2 of the flavivirus West Nile virus and of the genome sequence for these proteins. Virology. 147: 264-274.

- 8.- Wengler, G., Castle, E., Leidner, U., Nowak, T. and Wengler, G. (1985). Sequence analysis of the membrane protein V3 of the flavivirus West Nile virus and of its gene. *Virology*. 147: 264-274.
- 9.- Smith, G.W. and Wright, P.J. (1985). Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected Vero and *Aedes albopictus* cells. *Journal of General Virology*. 66: 559-571.
- 10.- Halstead, S.B. (1988). Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. *Science*. 239: 476-481.
- 11.- Den Surv. LSJPR.No. 9, febrero. 1983.
- 12.- Den Surv. LSJPR. No. 5, septiembre. 1982.
- 13.- CDC Editorial Note. (1987). Jan 9, Vol. 257. No. 2, Pp 166.
- 14.- Den Surv. LSJPR. No.8, enero. 1983.
- 15.- Mackonald, W.W. In *Disease and Urbanization*, E.J. Clegg and Garlick, Eds. (Taylor and Francis, London, 1980), Pp 1-12.
- 16.- Carrada, B.T., Bravo, M.C. (1987). La epidemiología del dengue en America 1982-1984. Quinta Parte. *Epidemiología* 29 (1). Enero-Febrero: 15-25.
- 17.- Ehrenkranz, N.J., Ventura, A.K., Cuadrado, R.R., Pond, W.L. and Porter, J.E. (1971). Dengue in Caribbean countries and the southern United States. Past, present and potential problems. *N. Engl. J. Med.* 28: 1460-1469.
- 18.- Halstead, S.B. (1980). Immunopathological parameters of the togavirus: *Biology, Structure, Replication* (R.W. Schlesinger (eds.)). Pp 107-174.

- 19.- Bres, P. (1979). Historical review of dengue 1: Implications of its introduction in the western hemisphere in 1977. In Dengue in the Caribbean, 1977. Washington, D.C., Organización Panamericana de la Salud. Pp 4-10.
- 20.- Andino, A. (1978). Primer informe sobre la epidemia en San Pedro Sula. Departamento de Epidemiología. Ministerio de Salud Pública de Honduras.
- 21.- Organización Panamericana de la Salud: Programa de eliminación del dengue y erradicación del Aedes aegypti en Cuba. Bol Epidemiol. 1982; 3: 7-10.
- 22.- Organización Panamericana de la Salud: La campaña cubana contra Aedes aegypti, al cabo de un año. Bol Epidemiol. 1983; 4: 8-10.
- 23.- Carrada, B.T., Vazquez, V.L., López, G.I. (1984). Ecología del dengue y el Aedes aegypti. Investigación preliminar. Salud Pública Mex.; 26: 63-73, 170-189, 297-311 y 505-615.
- 24.- Carrada B.T. (1984). El dengue como problema de salud pública. Avances y perspectivas. Bol Med Hosp Infant Mex; 41: 301-306.
- 25.- Karabatsos, N. (1985). International Catalogue of arbovirus: Am Soc Trop Med Hyg. 361-168.
- 26.- Sriurairatna, S., Bhamarapavati, N. and Phalavadhtana O. (1973). Dengue Virus Infection of Mice: Morphology and Morphogenesis of Dengue type-2 Virus in Suckling Mouse Neurons. Infect. Immunity. 8: 1017-1028.
- 27.- Bhamarapavati, N., Halstead, B.S., Sookavachana, P. and Boonyapaknavik. V. (1964). Studies on dengue virus infection I. Immunofluorescent localization of virus in mouse tissue. Arch Pathol. 77: 538-543.

- 36.- Burstin, S.J., Brandriss, M.W., Schlesinger, J.J. (1983).
J Immunol. 130: 2915.
- 37.- Stephenson, J.R., Porterfield, J.S., (1981). J. Immunol.
127: 659.
- 38.- Halstead, S.B. (1977). In vivo enhancement of dengue virus
infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody.
The Journal of Infectious Diseases. 140 (4) October: 527-533.
- 39.- Halstead, S.B. (1980). Dengue haemorrhagic fever. A public
health problem and a field for research. Bull Who; 58: 1-21.
- 40.- Halstead, S.B. (1981). The pathogenesis of dengue: Molecular
epidemiology in infectious disease. Am. J. Epidemiol. 114:
632-648.
- 41.- Morier, L. Kouri, G. Guzman, G. Soler, M. (1987). Antibody-
dependent enhancement of dengue 2 virus in people of white
descendent in Cuba. The Lancet. May 2; 1028-1029.
- 42.- Tikki Pang (1987). Dengue-specific IgM and Dengue haemorrhagic
fever/shock. The Lancet, April 25; 988.
- 43.- Sangkawibha, N., Rojanasuphot, S., Ahandrik, S. (1984). Risk
factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic
study in Rayong, Thailand I: the 1980 outbreak. Am. J. Epide-
miol. 120: 653-669.
- 44.- Harrison, R.G. (1907). Observations on the living developing
nerve fiber. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 4:140-143.
- 45.- Sensenbrenner, M. (1977). Dissociated brain cells cultures.
In Cell Tissue and Organ Cultures in Neurobiology. Differen-
tiation of cells in primary cultures. Academic Press. 191-214.

- 46.- Sotelo, J., Clarence, J., Gibbs, Jr. D., Gajdusek, C., Tho, B.H. and Wurt, M. (1980). Method for preparing cultures of central neurons: Cytochemical and immunochemical studies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 (1): 653-657.
- 47.- Havrankova, J., Roth, J.m and Browntein, M. (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. Nature (London). 272: 827-829.
- 48.- Chochinov, R.H. and Daughday, W.H. (1976). Current concepts in somatostatin and others biologically related growth factors. Diabetes. 25: 994-1007.
- 49.- Frazier, W.A., Angeletti, R.H. and Bradshaw, R.A. (1972) Nerve growth factor and insulin. Science. 176: 482-488.
- 50.- Autillo-Touat, A., Araud, D. and Seite, R. (1986). Role des interactions neuro-astrogliales dans la maturation in vitro des neurones mesencephaliques embrionaire: etude en microscopie electronique et par radioautographie. Bulletin de l'Association des Anatomistes. 70: 13-16.
- 51.- Booher, J. and Sensenbrenner, M. (1972). Growth and cultivation of dissociated neurons and glia cells form embrionic chick, rat and human brain in flask cultures. Neurobiology. 2: 97-105.
- 52.- Moonen, G., Cam, &., Sensenbrenner, M. and Mandel. P. (1975). Variability of the effects of serum-free medium, dibutyryl cyclic AMP or theophylline on the morphology of cultured new-born rat astroblasts. Cell Tiss. Res. 163: 365-372.
- 53.- Dahl, D. and Bignami, A. (1979). Astroglial and axonal proteins in isolated brain filaments. Biochimia et Biophysica Acta. 578: 305-316.

- 54.- Lim, R., Turriff, D.E., Troy, S.S., Moore, B.W. and Eng, L.F. (1977). Glia maturation factor: effect on chemical differentiation of glioblasts in culture. *Science*. 195: 195-196.
- 55.- Sensenbrenner, M., Jaros, G.G., moonen, G., Meyer, E.J. and Mandel, P. (1977). Effects of conditioned media on nerve cell differentiation "in vitro". *S.Afr. J. Sci.*
- 56.- Hartikka, J. and Hefti, F. (1988). Comparison of nerve growth factor's effects on development of septum, striatum and nucleus basalis cholinergic neurons in vitro. *Journal of Neurosciences Research*. 21: 264-352.
- 57.- Fontana, A., Fierz, W. and Wekerle, H. (1984). Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic Y-cell lines. *Nature*. 307: 273-276.
- 58.- Sun, D. and Wekerle, H. (1986). Ia restricted encephalitogenic T lymphocytes mediating EAE lyse autoantigen-presenting astrocytes. *Nature*. 320: 70-72.
- 59.- Massa, P.T., Dorries, R. and Meulen V. ter. (1986). Viral particles induce Ia antigen expression on astrocytes. *Nature*. 320: 543-546.
- 60.- Giulian, D., Baker, T.J. (1985). Peptides released by ebeoid microglia regulate astroglial proliferation. *J. Cell Biol.* 101: 2411-2415.
- 61.- Giulian, D., Lachman, L.B. (1985). Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science*. 228: 497-499.

- 62.- Giulian, D., Vaca, K. and Johnson, B (1988). Secreted peptides as regulators of neuron-glia and glia-glia interactions in the developing nervous system. *Journal of Neurosciences Research*. 21: 487-500.
- 63.- Coons, A.H. and Kaplan, M.H. (1950). Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of luorescent antibody. *J. Exp. Med.* 91: 1.
- 64.- Thompson, A.R. (1977). *Techniques in clinical immunology*. Chap. 5. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London. Edinburgh. Melbourne. Pp 85-115.
- 65.- Nowotny, A. (1979). *Basic Exercises in immunochemistry*. Exercise NO. 12-15. A laboratory manual. Second revised and enlarged edition. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, Ney York. Pp 41-53.
- 66.- DeLellis, R.A.M.D. (1981). *Diagnostic Immunohistochemistry*. Chap. 2. Basic Techniques of immunohistochemistry. Masson Monographs in Diagnostic Pahtology. New York. Pp 7111-16.
- 67.- Nairn, R.C. (1976). *Fluorescent Protein Tracing*. Churchill Livingston, London.
- 68.- Johnson, D.D. Cultured neural cells and tissues as models of their "in vivo" counterparts. In: Fedoroff, S. and L. Hertz, (eds.). *Cell Tissue and organ cultures in Neurobiology*. 667-682. Academic Press, New York, 1977.
- 69.- Sotelo, M.J. y Guevara, S.P. (1987). Cultivo de tejido cerebral; aplicaciones en neurologia. *Neurologia-Neuropsiquiatria-Psiquiatria*. 27: 141-146.

- 70.- Graves, M.C., Bologna, L., Siegel, L. and Londe, H. (1986). Theiler's virus in brain cell cultures: Lysis of neurons and oligodendrocytes and persistence in astrocytes and macrophages. *Journal of Neurosciences Research*. 15: 491-501.
- 71.- Gonatas, K.N., Greene, M. I. and Waksman, B.H. (1986). Genetic and molecular aspects of demyelination. *Immunology Today*. 7 (5): 121-126.
- 72.- Brinton, A.M. (1986). Replication of flaviviruses. Chap 11. In the togaviridae and Flaviviridae. Schlesinger and Mj. Schlesinger (eds.). Plenum Press, New York and London. Pp 327-373.
- 73.- Hdy, D.G., Rubin, D.H. and Fields, B.N. (1982). Molecular basis of reovirus neurovirulence: Role of the M2 gene in avirulence. *Proc Natl. Acad. Sci., USA*. 1298.
- 74.- Kurame, I. et al. (1984). Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Virol.* 52: 223.
- 75.- Kurane, I., Meager, A. and Ennis, F.A. (1986). Induction of interferon alpha and gamma from human lymphocytes by dengue virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 67: 1653-1661.
- 76.- Kurame, I., Ennis, F.A. (1988). Production of interferon alpha by dengue virus-infected human monocytes. *J. Gen Virol.* 69 (2): 445-449.