

03062
201.4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

IIACPP

INFECCION EXPERIMENTAL EN EL RATON
CON EL VIRUS DEL DENGUE

TESIS

Que para obtener el Grado de
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P r e s e n t a

JOSE LUIS IHERT PALAFOX

Asesor: Dr. Celso Ramos G.

MEXICO , D. F.

1980 1980

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

Jurado asignado :

FRESDENTE	Dr. Julio Sotelo M
PRIMER VOCAL	Dr. Celso Ramos G
SECRETARIO	Dra. Carmen Soler C
SUPLENTE	Dra. Blanca L. Barron
SUPLENTE	Dr. Edmundo de I. Lamoyi V
ASESOR DEL TEMA	Dr. CELSO RAMOS G
SUSTENTANTE	QFB JOSE LUIS IMBERT FALAFOX

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. , bajo la dirección del Dr. Celso Ramos G. y apoyo financiero (beca crédito) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología .

INDICE

RESUMEN

1. Español

2. Inglés

I. INTRODUCCION

1. Dengue clásico	1
2. Dengue hemorrágico	2
3. Epidemiología	4
4. Características físicas , químicas y biológicas del virus .	6
5. Características del vector	10
6. Encefalitis por flavivirus	11
7. Aspectos principales de la patogénesis	14
a) Infección extraneural	14
b) Neuroinvasión	14
c) Patología en el sistema nervioso central	17
d) Respuesta inmune	23

II. PLANTEAMIENTO

III. OBJETIVOS DEL TRABAJO

IV. DISEÑO EXPERIMENTAL

V. MATERIALES

VI. METODOS

1. Inoculación de los ratones recién nacidos	29
2. Preparación de la suspensión de cerebro de ratón lactante infectado	29
3. Obtención de los órganos de ratón	30
4. Cultivo de células de mosquito (TRA-284)	32
5. Inmunofluorescencia indirecta y directa en TRA-284	33

6. Técnicas histológicas	33
7. Prueba de inmunoperoxidasa indirecta para detectar antígeno viral en cortes de tejido	34
8. Preparación de fluido ascítico de ratón hiperinmunizado con virus dengue	36
9. Precipitación de inmunoglobulinas del fluido ascítico	36
10. Purificación de IgG de ratón mediante cromatografía de intercambio iónico	37
11. Marcaje de las IgG de ratón con biotina	38
12. Cultivo de células de riñón de mono LLC-MK2	40
13. Cuantificación de virus mediante la técnica de placa en células LLC-MK2	40
14. Cultivos mixtos de células del Sistema Nervioso Central de embrión de ratón	41
15. Cultivos de astrocitos	42
16. Tinciones con doble fluorocromo	42
17. Titulación de los anticuerpos de ratón mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación	43
VII. RESULTADOS	
1. Producción y purificación de las IgG antidengue	46
2. Identificación de los serotipos	46
3. Determinación de las dosis letales medias (LD ₅₀)	46
4. Determinación de los porcentajes de sobrevivencia	46
5. Tropicismo del virus del dengue (in vivo)	50
6. Estudios de inmunohistoquímica	50
7. Infección de cultivos de sistema nervioso central	65
8. Tropicismo del virus del dengue (in vitro)	69
VIII. DISCUSION	74
IX. CONCLUSIONES	81
X. BIBLIOGRAFIA	82

RESUMEN

Hemos investigado el tropismo del virus del dengue en ratones Balb/c recién nacidos así como también su virulencia . Las cepas utilizadas para este estudio fueron Dengue 2 Nueva Guinea C (NGC) , Dengue 2 Mexicana (MEX) , Dengue 2 Indonesia (IND) y Dengue 4 H-241 .

La determinación de las LD_{50} para las 4 cepas por vía intracerebral fué de $10^{-7.10}$, $10^{-6.86}$, $10^{-6.79}$ y $10^{-8.0}$ mientras que por vía intraperitoneal fué de $10^{-0.6}$, $10^{-1.59}$, $10^{-2.47}$ y $10^{-1.49}$ respectivamente . No se observaron diferencias en los valores en sí , pero al comparar la disminución de las tasas de mortalidad respecto al tiempo , se notó que las cepas consideradas prototipo Dengue 2 (NGC) y Dengue 4 (H241) aparentemente se han vuelto más neurovirulentas que neurotrópicas lo cual es contrario a lo observado con las cepas silvestres Dengue 2 (MEX) y Dengue 2 (IND) .

Al inocular a ratones recién nacidos por vía intraperitoneal con cada una de las 4 cepas para determinar su tropismo , se detectó virus capaz de infectar células de mosquito con Dengue 2 (NGC) en bazo , músculo , cerebro y médula espinal los días 3 , 9 y 12 ; con Dengue 2 (MEX) en cerebro y médula espinal los días 9 y 12 ; con Dengue 2 (IND) en bazo , músculo , cerebro y médula espinal el día 12 ; con Dengue 4 H-241 en músculo , cerebro y médula espinal el día 12 . No se detectó virus con ninguna de las cepas en hígado , riñon , pulmón , corazón y timo .

En otro lote de ratones recién nacidos inoculados por vía intraperitoneal con Dengue 2 NGC , estudios de inmunohistoquímica demostraron el antígeno viral en bazo , músculo , médula espinal , cerebro y además en hígado , riñón , pulmón , corazón y timo . El antígeno viral de Dengue 2 NGC se demostró exclusivamente en neuronas del sistema nervioso central y abarcó áreas como corteza , bulbos olfatorios , hipocampo , plexos coroides , tallo cerebral , cerebelo (células de Purkinje) y médula espinal .Se observó además una proliferación de células gliales las cuales por tinciones de doble fluorocromo no mostraron marca viral , sugiriendo que no hay infección .

Además se investigó el tropismo de las 4 cepas de virus en cultivos de células del cerebro de ratón , tratando de entender algunos aspectos de la patogénesis de esta enfermedad . Se realizaron también cinéticas de infección con las cuatro cepas de virus y se infectaron cultivos puros de astrocitos.

Usando anticuerpos específicos como marcadores para identificar a las células en cultivo así como al virus , se demostró que las 4 cepas infectan y destruyen neuronas y no lo hacen con el resto de las poblaciones celulares que se encuentran en el cultivo como macrófagos , fibroblastos y células gliales (astrocitos) , las cuales se ha reportado son infectadas "in vivo"

Los resultados que mostraron la infección de neuronas bipolares y multipolares " in vitro " confirman los estudios " in vivo " pues demuestran que las células blanco de la infección por el virus del dengue son las neuronas . Lo anterior correlaciona con el daño difuso característico de este tipo de infección en su forma encefalítica .

ABSTRACT

We have investigated the tropism and virulence of the dengue virus in newborn Balb/c mice. The strains used for this investigation were Dengue 2 New Guinea C, Dengue 2 Mexican, Dengue 2 Indonesia and Dengue 4 H-241.

The determination of the DL_{50} for the 4 strains administered intracerebrally was established as $10^{-7.19}$, $10^{-6.86}$, $10^{-6.79}$ and $10^{-6.0}$; for the intraperitoneal dosage it was established as $10^{-0.6}$, $10^{-1.59}$, $10^{-2.47}$ and $10^{-1.49}$ respectively. There were no observable differences found in the values obtained, but comparing the decrease in mortality rates in relation to time, the prototype strains (Dengue 2 NGC and Dengue 4 H-241) had apparently become more neurovirulent, which is contrary to what was observed in wild strains (Dengue 2 Mex and Dengue 2 Ind).

After administering independently each of the four strains intraperitoneally to newborn mice in order to determine tropism, the following characteristics were detected:

- virus capable of infecting mosquito cells with Dengue 2 NGC in spleen, muscle, brain and spinal cord on days 3, 9 and 12;
- virus capable of infecting mosquito cells with Dengue 2 Mex in brain and spinal cord on days 9 and 12;
- virus capable of infecting mosquito cells with Dengue 2 Ind in spleen, muscle, brain and spinal cord on day 12;

-virus capable of infecting mosquito cells with Dengue 4 H-241 in muscle , brain and spinal cord on day 12 . No virus was detected in liver , kidney , lungs , heart or thymus .

In another lot of newborn mice which received intraperitoneal inoculation of Dengue 2 NGC , the immunohistochemical studies showed the viral antigen in spleen , muscle , spinal cord , brain , liver , kidney , lungs , heart , and thymus . The viral antigen of Dengue 2 NGC was detected in neurons of the central nervous systems where it included the cortex , olfactory bulbs , hippocampus , choroidal plexus , cerebellum (Purkinje cells) and neurons of peripheral nervous system . There was also a proliferation of glial cells which did not show viral antigens by means of double immunofluorescence , suggesting the absence of infection .

We also investigated the tropism of the 4 strains of dengue virus using cultures of mice brain cells , in order to comprehend certain aspects of the pathogenesis of this disease . Kinetic infection assays were done with each of the four strains of the virus , and pure astrocyte cultures were infected .

Using specific antibodies as markers to identify viral cells in the culture , we demonstrated that the four strains infect and destroy neurons , but do not affect other cells in the culture such as macrophage , fibroblast and glial cells (astrocytes) even though these have been reported to become infected "in vivo" .

The results obtained which showed the "in vitro" infection of bipolar and multipolar neurons confirm the "in vivo" studies by demonstrating that neurons are the target cells in dengue infection. The afore-mentioned correlates with the diffuse damage of the encephalitic form characteristic in this type of infection.

I. INTRODUCCIÓN

El Dengue es una virosis aguda causada por alguno de los 4 serotipos del virus del mismo nombre . Es un Arbovirus que está clasificado dentro de la familia Flaviviridae (1) . Mediante pruebas de fijación de complemento , inhibición de la hemaglutinación y neutralización es posible identificar los 4 serotipos (2,3,4) . Recientemente con el empleo de anticuerpos monoclonales (5) dirigidos contra diferentes proteínas virales y el uso de técnicas que permiten el análisis del genoma viral , se han identificado variantes o sub-serotipos (6,7,8,9) .

1. DENGUE CLASICO

El espectro clínico de esta enfermedad varia desde un cuadro febril , hasta las formas graves que pueden manifestarse como fiebre hemorrágica o como síndrome de choque , con una letalidad de 10-40% . En la forma clásica (dengue primario) , después de un periodo de incubación de 2 a 8 días , el cuadro clínico se presenta bruscamente con fiebre intermitente bifásica , escalofríos , cefaleas , mialgias , artralgias , dolor retro-orbital , exantema maculo-papular en el tronco y extremidades , náusea y/o vómito . La exploración física del paciente puede mostrar hepatomegalia moderada , bradicardia y adenopatía cervical dolorosa . Los datos de laboratorio son normales , excepto leucopenia moderada .

2. DENGUE HEMORRÁGICO

El dengue secundario o hemorrágico se inicia con un cuadro febril elevado que al remitir, el estado general del paciente se agrava bruscamente y puede entrar en letargo presentando taquicardia, hipotensión, disminución en la perfusión tisular periférica, con manifestaciones hemorrágicas que incluyen por lo menos una prueba de torniquete positiva y cualquiera de los siguientes signos: petequias, púrpura, equimosis, epistaxis, hematemesis, gingivorragia o melena. Se presenta hepatomegalia en el 70 % de los casos y los exámenes de laboratorio muestran un incremento en el hematócrito (hemoconcentración), leucocitosis moderada, hipoalbuminemia, disminución del fibrinógeno, depresión de más del 50 % de los niveles de C3 y del proactivador de C3 y menos de 100,000 plaquetas/mm³.

Según la Organización Mundial de la Salud (10), los grados III y IV de la enfermedad se presentan con falla circulatoria manifestada por pulso rápido y débil, hipotensión marcada, escalofrío, cansancio y choque profundo haciéndose difícil detectar presión sanguínea y pulso.

La mayoría de los casos de esta enfermedad se presentan como dengue clásico o primario. Sin embargo, se pueden presentar complicaciones que se manifiestan como fiebre hemorrágica o bien como síndrome de choque hipovolémico.

Se han sugerido dos hipótesis para explicar las formas graves de la enfermedad . La primera propone que pueden existir diferentes grados de virulencia . Esta hipótesis fué propuesta cuando se presentaron varios casos de dengue hemorrágico en individuos con infección primaria (11) . El fenómeno de variación antigénica ha sido demostrada en otros flavivirus entre los cuales se encuentran el virus de la encefalitis japonesa , fiebre amarilla y encefalitis de San Luis (12,13,14) . Los diferentes serotipos del virus del dengue muestran una variación antigénica principalmente en la proteína de envoltura V3 (15) . Se han demostrado también varios subserotipos de dengue 2 y 4 que representan variantes antigénicos (16) .

La segunda hipótesis tiene una base inmunopatológica : la de la facilitación de la infección viral por anticuerpos (17,18) sostiene que la existencia previa de anticuerpos contra un serotipo y la siguiente reinfección con un serotipo diferente (infección secuencial heteróloga) dentro de un tiempo determinado , pueden ser condiciones importantes para que puedan presentarse manifestaciones severas de la enfermedad . Así , se ha demostrado que las reinfecciones por los serotipos 2 , 3 y 4 se asocian más frecuentemente con este fenómeno cuando los individuos han estado previamente en contacto con el serotipo 1 .

Sin embargo es posible que varios factores como la virulencia del virus , las infecciones secuenciales heterólogas , el estado inmunológico del huésped , la densidad del vector , etc. , puedan coadyuvar en la presentación de manifestaciones graves de la enfermedad .

3.EPIDEMIOLOGIA .

Es una enfermedad que esta distribuida principalmente en regiones tropicales y subtropicales del mundo y puede afectar a la población en general ; sin embargo en el sudeste asiático , la población infantil es frecuentemente la más afectada .

Hasta 1945 el dengue se consideraba limitado a regiones de Asia , Africa y Australia . Sin embargo , en los últimos 25 años , en la región del Caribe se han presentado tres grandes epidemias . La primera fué en 1963 y abarcó Jamaica , Puerto Rico , Antillas menores , y Venezuela . La segunda epidemia se presentó en 1969 en las islas del Caribe , en donde se reportaron 500,000 casos . Durante esta se aisló el serotipo 2 (17) . En febrero de 1977 comenzó la tercera epidemia en Jamaica , que afecto a más de 60,000 personas y se extendió a las Bahamas , Cuba , Puerto Rico , Grenada , Surinam y Venezuela (18) . En 1978 esta epidemia penetró a Centroamérica por Honduras , y más tarde se extendió a El Salvador , Guatemala y México (17) . En 1977 se presentó una epidemia en Cuba donde se reportaron 477,438 casos de dengue

clásico y se logró aislar al serotipo 1 . En 1981 se presentó nuevamente en Cuba una epidemia causada por el serotipo 2 y en la cual se notificaron 344,203 casos , de los cuales 9203 se consideraron graves , 1109 muy graves y se reportaron 159 defunciones entre niños y adultos . Hasta esa fecha no se había reportado ninguna epidemia de dengue 2 en esta isla (20,21) .

Actualmente se ha incrementado el número de epidemias de dengue en varias regiones del mundo ; una de las más recientes se presentó en Brasil durante 1986-1987 en la cual se aisló el serotipo 1 y se notificaron 140,000 casos (22,22b) .

En México los primeros reportes de dengue se presentaron en el sureste en 1978 y a partir de esta fecha se ha incrementado el número de casos reportados así como una distribución más amplia que abarca la mayoría de los estados de la República .

La Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud notificó de 1978 a 1987 ,un total de 38 ; 6,187 ; 48,592 ; 17,046 ; 30,904 ; 23,513 ; 27,312 ; 16,182 ; 21,975 y 7,698 casos , respectivamente . Durante 1983 y 1984 se registraron tasas superiores a 100 casos por 100,000 habitantes en varios estados de la República (22b,23,24) .

En 1986 se reportaron brotes epidémicos en Colima , Veracruz , Nuevo León , Oaxaca , Jalisco , Nayarit , Puebla y Morelos entre otros . La mayoría de los casos fueron de dengue

clásico , sin embargo , hubo casos esporádicos con manifestaciones hemorrágicas (25) .

A pesar de que en México , la mayoría de los casos reportados han sido de dengue clásico , es posible que haya o pueda haber algunos no epidémicos de dengue hemorrágico y de síndrome de choque . Debido a que se desconoce el número real de casos de dengue en México , se requiere una vigilancia epidemiológica constante en regiones endémicas que permita determinar el número de personas que han sido infectadas , y el serotipo que circula en esa región . Actualmente se sabe que los serotipos 1 , 2 y 4 circulan entre la población de México . Además se necesita un mayor esfuerzo para controlar la distribución del vector , así como una orientación adecuada de la población a fin de que participen en la eliminación de reservorios donde el mosquito deposita sus huevecillos . La práctica constante de esta actividad reducirá considerablemente la frecuencia de la enfermedad en la población .

4. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS , QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DEL VIRUS .

El virus del dengue es de forma esférica con un diámetro aproximado de 50 nanómetros . El genoma viral dentro de la nucleocapside consiste de una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva , con un coeficiente de sedimentación de 45 S y un peso molecular de 4 Kd (26) . El RNA viral contiene un marco de

lectura de 10,233 nucleótidos que comprende todo el RNA excepto 118 nucleótidos en el extremo 5' y 511 en el extremo 3' (27) . El genoma viral codifica para 3 proteínas estructurales y para varias proteínas no estructurales . Se ha propuesto la existencia de varios sitios de iniciación de la traducción , aunque hay evidencias consistentes con la idea del procesamiento de un precursor poliproteínico que puede dar origen a las proteínas estructurales y a las no estructurales , lo cual sugiere la existencia de un RNA mensajero monocistrónico (28,29) .

Los estudios de comparación del genoma viral de diferentes serotipos del virus del dengue usando pruebas de hibridación RNA-DNA , revelaron que hay una relación genética muy cercana entre los serotipos 1 y 4 (70% de homología) , del mismo modo los serotipos 3 y 4 comparten un 30 % de homología . Mediante esta tecnología parece ser que el serotipo 2 no tiene una relación cercana con los otros serotipos (30,31,32,33) . Por otro lado , utilizando la técnica de " huella de oligonucleótidos " para analizar el genoma de este virus , se han estudiado 42 cepas de dengue 2 que fueron aislados de diferentes regiones del mundo , identificando 5 variantes o topotipos del dengue 2 que son geográfica y genéticamente distintos (15,16,34,35,36) . La variación genética entre las cepas aisladas dentro de un área geográfica y tiempo definidos ,

identifica cambios en la población del virus , la cual puede estar relacionada a un caracter antigénico y/o de virulencia . Este cambio evolutivo en la secuencia de nucleótidos ha sido documentado en otros miembros de la familia Flaviviridae (97) .

Zhao y col (98) clonaron el genoma completo del dengue 4 , determinando la secuencia de nucleótidos de los genes que codifican para las proteínas estructurales . Estas proteínas están codificadas en un sólo marco de lectura en la región 5' , que representa aproximadamente el 25 % del genoma viral total . La porción restante del genoma , codifica para las proteínas no estructurales cuya secuencia ya se conoce (99) . La organización del genoma del virus del dengue es similar al de otros flavivirus así por ejemplo , entre el virus del dengue y el de la fiebre amarilla hay un 39 % de homología en la región que codifica para las proteínas estructurales (97) .

Las características más importantes de las tres proteínas estructurales del virus son : la proteína de la nucleocápside V2 (de 14 Kd) , es un polipéptido básico , no glicosilado el cual está en asociación con el RNA viral , dando lugar a la nucleocápside , la cual esta rodeada por un bicapa de lípidos con los que interacciona una proteína glicosilada transmembranal denominada V3 (31-59 Kd) , en la cual residen las principales actividades biológicas del virus como son : hemaglutinación , neutralización , unión a receptores celulares , tropismo , etc .

Utilizando diferentes criterios , se han podido identificar 4 grupos de determinantes antigénicos (de serotipo , de complejo de dengue , de subgrupo y grupo de flavivirus) presentes en esta glicoproteína . Finalmente , la proteína V1 (8 Kd) es un péptido no glicosilado y derivado por rompimiento proteolítico de un precursor glicosilado . La localización de esta proteína de membrana dentro del virión no es clara , pero se postula que es una proteína integral de membrana que puede interaccionar con la proteína V3 y también con el complejo RNA-proteína V2 (40) .

Kaufman y col (41) han analizado la capacidad de una variedad de anticuerpos monoclonales capaces de neutralizar y proteger pasivamente a ratones infectados por vía intracerebral con una dosis letal de dengue 2 . Los anticuerpos monoclonales protectores están dirigidos contra determinantes antigénicos que se encuentran en la proteína V3 que están distribuidos en 3 familias de epítopes espacialmente separados.

Se desconoce el número exacto y la función de las proteínas no estructurales . Sin embargo , varios grupos de investigación han demostrado que la administración pasiva de anticuerpos monoclonales contra la proteína no estructural NS1 , que también es la fracción soluble fijadora de complemento (42,43) , es capaz

de proteger a ratones infectados con dengue 2 (44) . Esta proteína está glicosilada y se localiza en la membrana de las células que están infectadas , aunque también se secreta al medio de cultivo . La clonación del gene que la codifica será importante para entender su función en la morfogénesis viral y también para su uso potencial como vacuna , ya que se ha demostrado que induce anticuerpos protectores o neutralizantes en humanos , monos y ratones (45, 46, 47, 48, 49) .

Las células infectadas con el virus del dengue muestran un período de eclipse de aproximadamente 12 hr y no se observa un bloqueo aparente de biosíntesis macromolecular en la célula huésped . La síntesis de proteínas específicas del virus está asociada al retículo endoplásmico rugoso (50,51,52) y la replicación del RNA se lleva a cabo en la región perinuclear . No se ha detectado una polimerasa asociada al virión , aunque es probable que varias proteínas no estructurales puedan participar en esta función (52) .

5. CARACTERISTICAS DEL VECTOR .

El virus del dengue es transmitido al hombre por la picadura de la hembra hematófaga del mosquito Aedes aegypti . Por otro lado este virus puede ser transmitido transovarialmente por ciertas especies de mosquito , y algunos son más eficientes que otros (53, 54, 55) . Este fenómeno puede permitir el mantenimiento natural

del virus y también puede explicar porque el virus es capaz de mantenerse activo durante largos periodos interepidémicos .

Gubler y col (50) han demostrado que el mosquito del género Aedes (gymnotopa) mediocittatus es un vector potencial en el mantenimiento del virus , ya que este mosquito permite la replicación del mismo , tiene una mayor susceptibilidad a la infección que Aedes aegypti y es capaz de transmitir el virus a hospederos vertebrados . Sin embargo , esta especie de mosquito no parece ser un vector importante en la transmisión epidémica de dengue , ya que todos los datos epidemiológicos colectados hasta la fecha, sugieren que la transmisión epidémica de dengue es más alta en áreas donde abunda el mosquito Aedes aegypti .

Recientemente el mosquito Aedes albopictus ha sido introducido al continente americano y se ha detectado en 15 estados de los E.U.A. (26,57,58) y en el Brasil en 3 estados . Si este vector llegara a participar en forma importante en la transmisión del virus en brotes epidémicos , puede verse modificado el patrón de la enfermedad , como ha sucedido en el sureste asiático , donde es el vector más importante en la transmisión y donde se presentan muchos casos de fiebre hemorrágica y síndrome de choque por dengue .

6.LAS ENCEFALITIS POR FLAVIVIRUS

Los flavivirus producen un espectro amplio de infecciones y

enfermedades del sistema nervioso central en forma natural y experimental , que dependen específicamente del virus , dosis de virus y otros factores que influyen en la respuesta del huésped .

Se ha observado que en los casos clínicos , muchos virus que generalmente están asociados con infecciones generalizadas o fiebres hemorrágicas - por ejemplo dengue , fiebre amarilla , fiebre hemorrágica de Omsk - ocasionalmente causan enfermedades con manifestaciones neurológicas (Fig 1) .

De esta manera se han definido tres tipos de patogénesis : *encefalitis fatal* generalmente precedida por una viremia temprana y una extensa replicación extraneural ; *encefalitis subclínica* , casi siempre precedida por baja viremia , establecimiento tardío de la infección en cerebro , y aclaramiento con mínima patología destructiva e infección inaparente , con trazas de viremia , replicación extraneural limitada y sin neuroinvasión . Un cuarto tipo es la *infección crónica persistente* (59,60) .

Todos los flavivirus son neurotrópicos en muchos huéspedes biológicos y aún en vectores artrópodos en los cuales el cerebro y los ganglios son los principales sitios de replicación (59) . En ratones el dengue , la fiebre amarilla y la fiebre hemorrágica de Omsk causan infecciones encefalíticas y presentan una patología similar a la de otros flavivirus neurotrópicos .

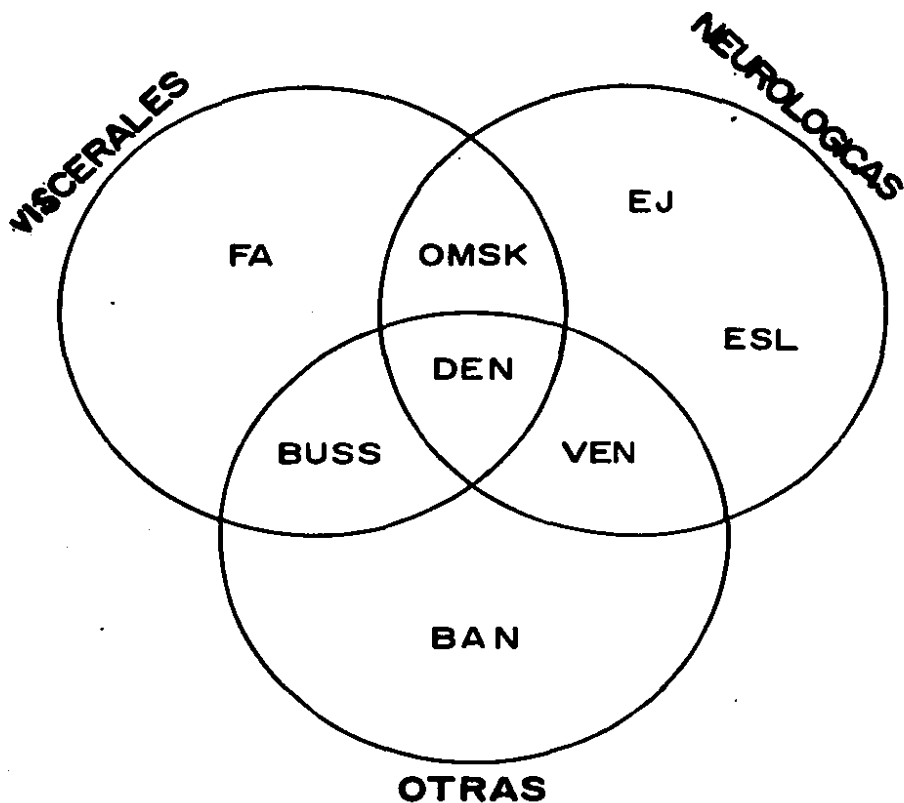


Fig. 1.- Patrones predominantes de enfermedad asociados con infecciones por flavivirus (SP) .

FA : fiebre amarilla ; BUSS : virus Bussuquara

EJ : encefalitis japonesa ; BAN : virus Banzi

ESL : encefalitis de San Luis ; DEN : dengue

VEN : virus del este del Nilo ; OMSK : virus Omsk .

Sin embargo , las cepas silvestres de dengue frecuentemente requieren de inoculaciones secuenciales en cerebro de ratón que llevan a un incremento de su neurovirulencia , considerada tanto en los altos títulos de virus como en el reducido tiempo promedio de sobrevivida de los ratones inoculados . Las cepas de fiebre amarilla no lo requieren y con el virus de Omsk no se conoce .

7. ASPECTOS PRINCIPALES DE LA PATOGENESIS .

a) Infección extraneural .- En las infecciones naturales o después de inoculaciones intradérmicas o subcutáneas experimentales el virus se deposita en el espacio intravascular y extravascular , replicándose primero en el sitio de inoculación y en los nódulos linfáticos que drenan el sitio (6) .

El conocimiento de los sitios principales de replicación del virus fuera del sistema nervioso central se ha obtenido con la titulación de tejidos y con estudios de inmunofluorescencia en animales experimentales . En el ratón , estos sitios extraneurales de replicación son similares a los de los otros flavivirus e incluyen músculo cardíaco y esquelético , osteo y condroblastos , tejido conectivo , células linfoides y del endotelio reticular , epitelio renal tubular , cerebro , corazón , pulmón , hígado , bazo y sangre .

El antígeno viral se ha demostrado en los músculos de arterias y arteriolas y ocasionalmente en venas capilares . En

ratones desnudos nu/nu y nu/+ se desarrolla la infección y una necrosis hialina acidofílica de las células de Kupffer , sin embargo , en este modelo , el cerebro es el órgano blanco principal para el crecimiento viral y la patogénesis ; pero la contribución de estos órganos y tejidos como una fuente de viremia e invasión del cerebro es incierta .

Los estudios realizados con ratones adultos inoculados intraperitonealmente , demostraron que además de que la infección fué clínicamente inaparente , el virus no se aisló de los tejidos pero se encontró antígeno viral por inmunofluorescencia en los leucocitos mononucleares hasta 3 semanas después de la inoculación . Las evidencias obtenidas de la deposición de complejos inmunes y glomerulonefritis proliferativa son análogas a las descritas en humanos con fiebre hemorrágica (62,63, 64, 65, 66, 67, 68, 69) .

En pacientes con dengue , ya se ha establecido el papel de los fagocitos mononucleares como células blanco y sitios de replicación principal . El virus se ha aislado de hígado , bazo , nódulos linfáticos , médula ósea , corazón , timo , pulmón y leucocitos de sangre periférica (70,71,72,73,74,) . El antígeno se ha detectado en el citoplasma de los leucocitos mononucleares de la piel , del bazo , de nódulos linfáticos , de sinusoides hepáticos , de alveolos y de la corteza del timo . Las partículas virales se han demostrado en macrófagos de glomerulo renal

(66,66,73,75) . Los altos niveles de fosfatasa ácida en suero originadas en los osteoclastos y el dolor de huesos asociado con la enfermedad de los pacientes sugiere que estas células también sean blanco de la replicación viral (66) .

El tropismo del virus por los leucocitos mononucleares también se ha demostrado en infecciones experimentales con monos . En éstos se ha observado que la replicación del virus se incrementa progresivamente en los tejidos linfoides y los leucocitos . También hay evidencias de replicación viral en sitios que son preferidos por otros flavivirus como músculo liso y esquelético , glándulas salivales y médula adrenal (66) .

b) Neuroinvasión .- Los estudios de encefalitis experimental realizados en ratones con algunos flavivirus entre ellos el dengue , han demostrado una relación entre el nivel de la viremia , el desarrollo de la infección en cerebro y la dispersión o aparición simultánea del antígeno viral en muchos sitios , lo que indicaría que la dispersión al sistema nervioso central es hematogena (76,77) . Sin embargo , el proceso por el cual los virus cruzan la barrera hematoencefálica no se conoce . Además , la capacidad de estos virus de replicarse en las células del endotelio vascular sugiere que podrían infectarlas y crecer a través de los capilares del parénquima cerebral .

Debido a que el antígeno viral se ha encontrado raramente en las células endoteliales de los capilares cerebrales por

inmunofluorescencia , y el reclutamiento perivascular de células inflamatorias específicas inmunológicamente para dengue no está demostrado , puede sugerirse que la presentación de antígeno no ocurre a este nivel como con otros virus (78,79,80,81,82,83,84) .

Existen pocas investigaciones sobre las rutas de diseminación de flavivirus al sistema nervioso central en humanos (85,86) . Al estudiar la distribución del antígeno y las lesiones histológicas en los cerebros de pacientes con Encefalitis Japonesa se encontró que las lesiones neurológicas son más extensas en el talamo , ganglio basal y cerebro medio que en áreas más próximas a los bulbos olfatorios . En este caso puede ser que los patrones neuropatológicos los determine más la vulnerabilidad selectiva de los diferentes centros neuronales que las rutas de dispersión viral (89,77) .

c) Patología en el sistema nervioso central .- El grado , caracter y distribución de las lesiones en el sistema nervioso central varía con el huésped y con la cepa de virus del dengue . La categoría de tropismo en ratón reportado para Dengue 2 NGC es de tipo vascular sin necrosis o inflamación al igual que para Dengue 1 Hawaii y es de tipo neurotrópico para Dengue 3 H-87 y Dengue 4 H-241 (87) .

Con microscopio de luz , los cambios inflamatorios en las meninges y en la periferia de los vasos se caracterizan por la infiltración de linfocitos , macrófagos y células plasmáticas . En

el parénquima cerebral , los infiltrados perivasculares rodean los pequeños vasos y también contienen principalmente linfocitos así como una cantidad moderada de histiocitos . Los agregados celulares o nódulos en el parénquima cerebral consisten de infiltrados de células mononucleares y posiblemente también de células residentes activadas de la microglia , la presencia del virus se ha detectado en neuronas y células de la glia (88,89) . Los cambios inflamatorios pueden ocurrir solos o acompañados de hinchamiento agudo , degeneración y necrosis de neuronas y neuronofagia . La proliferación y necrosis de células endoteliales , el edema perivascular y perineural , la degeneración esponjosa y las hemorragias focales pueden presentarse en algunos casos (88, 89, 89, 90, 91) .

En animales muy susceptibles , como el ratón lactante , el cual sucumbe rápidamente a la infección , los cambios inflamatorios son frecuentemente menos fuertes que en infecciones más prolongadas . Los cambios al nivel del microscopio de luz pueden ser sutiles en el momento de la muerte , pero con microscopía electrónica se revela una extensa replicación viral y una citopatología ultraestructural .

Al parecer , en huéspedes primates , el dengue y la fiebre amarilla raramente cruzan la barrera hematoencefálica y establecen infección del sistema nervioso central , a pesar del desarrollo de niveles excesivamente altos de viremia e infección extraneural y

el potencial encefalitogénico de algunas cepas de virus inadaptadas . Sin embargo la susceptibilidad de las células implicadas en otras vías de entrada al sistema nervioso central (olfatoria y por médula espinal) de dengue y fiebre amarilla no ha sido claramente determinada .

En monos infectados experimentalmente con algunos flavivirus y en casos fatales humanos las lesiones son globales en su distribución pero más prominentes en la materia gris del cerebro medio , talamo , pons , cerebelo y médula . La vulnerabilidad celular selectiva de esas regiones correlaciona con las manifestaciones clínicas . En algunos casos humanos , la constelación de hallazgos clínicos neurológicos permite una localización relativamente precisa al tallo cerebral , cerebro medio o cerebelo . La participación predominante del talamo , tallo cerebral , y cerebelo explicaría la ocurrencia frecuente de temblores , incoordinación motora y distonía en esas infecciones . La predilección por la médula y el cordón espinal cervical resultaría en una parálisis de neuronas motoras .

Las manifestaciones neurológicas en pacientes con dengue reportadas en los brotes que han ocurrido en países del sureste asiático , Africa , el Pacífico occidental y la región de las Américas son : dolor de cabeza , delirio , irritabilidad mental , depresión , vertigo , insomnio , inquietud , parálisis de extremidades inferiores , polineuritis , epilepsia , temblores ,

amnesia e inclusive se han presentado algunos casos fatales por encefalitis acompañados de letargia , confusión , somnolencia , coma , ataques , rigidez de nuca y paresia . Estas manifestaciones no parecen estar asociados con algun serotipo particular (89,92,93,94,95,96) .

El cuadro clinico anterior de encefalitis se observó en países asiáticos afectando principalmente a niños . En Indonesia los casos fatales por dengue que presentaron uno o más signos de encefalitis antes de morir fue del 72 % (97) .

Algunos pacientes con dengue en Jamaica y Cuba desarrollaron un cuadro similar al síndrome de Reyes y Guillain-Barre , pero no hubo evidencias de una asociación etiológica ni se ha obtenido información de la infección en cerebro de humanos (98,99,100) .

La patogénesis por dengue ha implicado la infección de macrófagos como el fenómeno central que determina la severidad de la enfermedad y el cual se ha considerado como el reto futuro a resolver por la biología molecular (101) . Eventos adicionales como los síntomas clinicos neurológicos , que probablemente reflejen interesantes diferencias en la vulnerabilidad selectiva de los subconjuntos neuronales , permanece sin conocerse . Con otros virus se ha sugerido que a nivel molecular es posible que haya diferencias en las interacciones virus-receptor , particularmente en aquellas que involucran receptores y moléculas neurotransmisoras (102, 103,104) .

Los receptores de virus de los que se tienen evidencias son : 1) C3d y moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) para el virus de Epstein Barr ; 2) CD4 para el virus de la inmunodeficiencia humana ; 3) moléculas de Ia y receptores Fc para virus de la deshidrogenasa láctica ; 4) receptores Fc para el virus del dengue ; 5) el receptor de acetilcolina para el virus de la rabia , y 6) el receptor beta 2 adrenergico para reovirus tipo 3 (101,103,105,124 , 125,126) .

Con este último tipo de virus han sido muy útiles los cultivos de las células del cerebro . 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 2 adrenérgico (105) . Se ha observado que el tropismo del virus corresponde con el patrón de expresión de los receptores celulares . Además , utilizando los cultivos primarios derivados de sistema nervioso se han definido líneas celulares en las que se observa en diferentes etapas de su desarrollo , expresión diferencial de los receptores . También se ha determinado el patrón de inmunoreactividad celular siendo este uniforme en el cuerpo celular y en neuritas . Por último , con el aislamiento de los serotipos de reovirus "rearrreglados" se han delineado los roles de cada una de las tres proteínas de capsida interna (s1, U1c y s3) .

Frecuentemente después de la recuperación de encefalitis

agudas por virus persisten problemas neurológicos residuales , e incluso cambios electroencefalográficos y disturbios psiquiátricos en los humanos . Sin embargo , las descripciones patológicas de tales casos son pocos para otros virus y no existen para dengue (59) .

El daño residual ha sido muy difícil de valorar en modelos animales . En ratones inoculados intraperitonealmente con dengue la parálisis de los miembros inferiores ocurre frecuentemente durante la fase aguda y algunos animales pueden sobrevivir a la inanición quedando con secuelas . Por otro lado los cambios en el comportamiento y la orientación , incapacidades de aprendizaje y problemas de memoria se han documentado en ratones y ratas infectadas con virus del Este del Nilo , el virus de Langat , el virus de la fiebre amarilla y el virus del valle de Murray (59) , pero no para dengue aunque es muy probable que no sucedan .

La desmielinización , característica de varias infecciones por alfavirus en modelos de roedores , no se ha descrito en infecciones experimentales por flavivirus . Los pocos casos humanos reportados de dengue con características clínicas que semejaban una desmielinización de las raíces de los nervios craneanos tal como se ve en el síndrome de Guillain-Barre , no han sido una característica de las infecciones en humanos por flavivirus (59,100) . En este caso puede ser que los oligodendrocitos no sean blancos de la infección y/o replicación

viral o bien no se efectue un daño autoinmune .

d) Respuesta inmune .- Los enfoques generales que se han empleado para caracterizar la respuesta inmune humoral y celular en SNC en infecciones por virus del dengue comprenden la respuesta inmune en la limitación de la diseminación viral demostrado varias veces con experimentos de inmunosupresión , en los cuales la encefalitis subclínica se convierte en letal (106,107,108) .

El papel patológico de la inflamación en el sistema nervioso central el cual es probable que varíe con la magnitud de la expresión de los antígenos virales sobre las células neuronales blanco , o la citotoxicidad mediada por células T (109,110) , anticuerpos , ADCC mediada por macrófagos , astrocitos o células de la microglia se desconoce para muchos virus incluido el dengue .

Otro mecanismo inmunopatológico potencial es la facilitación de la replicación viral en macrófagos mediada por anticuerpos , complemento o recientemente interferón (111,112,113) , demostrada "in vivo" e "in vitro" con dengue , pero del cual no hay evidencias de participación en sistema nervioso central .

II. PLANTEAMIENTO .

Hasta el momento no existen estudios que demuestren como el virus del dengue invade y se replica en el sistema nervioso central . Tampoco se sabe si pasa a través de la barrera hematoencefalica , empleando la vía hematológica y no se han considerado como alternativa , la diseminación viral por vía olfatoria y por la medula espinal

En lo que concierne a los mecanismos de la encefalopatía producida por el virus del dengue , estos apenas se empiezan a definir , buscando correlacionarlos con datos clínicos de sintomatología neurológica en estudios "in vivo" en ratones y monos.

Por otro lado , las cepas silvestres de dengue de orígenes geográficos diferentes no han sido comparadas respecto a características como son la virulencia y el tropismo , en parte debido a la carencia de modelos de laboratorio "in vitro" .

Por lo anterior , estudiamos la interacción de los serotipos Dengue 2 y Dengue 4 con las células del cerebro de los cultivos mixtos . Además investigamos " in vivo " el tropismo del virus del dengue en el ratón .

III. OBJETIVOS .

En base a las consideraciones anteriores los objetivos de este trabajo pueden dividirse en dos grupos :

Objetivo general .- Examinar la infección experimental en el ratón utilizando diferentes aislados del virus del dengue .

Objetivo específico I .- Detectar la presencia del virus en órganos y tejidos de ratones infectados , mediante cultivos de células e inmunohistoquímica

Objetivo específico II .- Identificar " in vitro " las células del Sistema Nervioso Central infectadas .

IV. DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL

ESTUDIO DE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DEL DENGUE

IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS CON ANTICUERPOS MONOCLONALES

INOCULACIÓN

IN VIVO

IN VITRO

INFECCIÓN DE RATONES

INFECCIÓN DE CULTIVOS
DEL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL (SNC) DE RATÓN

LD₅₀

LD₅₀

INTRAPERITONEAL

INTRACEREBRAL

DETECCIÓN DEL VIRUS
EN ÓRGANOS DE RATÓN
MEDIANTE CULTIVOS
DE CÉLULAS DE
MOSQUITO (TRA-234)

CINÉTICA POR
INMUNOFLUORESCENCIA

DETECCIÓN DEL VIRUS
EN LOS ÓRGANOS
MEDIANTE
INMUNOHISTOQUÍMICA

IDENTIFICACIÓN DE
CÉLULAS DEL (SNC)
MEDIANTE
MARCADORES
ESPECÍFICOS

V. MATERIALES BIOLÓGICOS , MEDIOS Y REACTIVOS .

Animales y células .- Se utilizaron ratones cepa balb/c y cepa NIH . Las líneas celulares fueron de riñón de mono LLC-MK2 ; de mosquito TRA-284 y de sarcoma 180-TG .

Virus .- Los serotipos de dengue se obtuvieron de los laboratorios San Juan del Center for Diseases Control de San Juan , Puerto Rico y se crecieron 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 . Los "stocks" se conservaron a -70°C y fueron : Dengue 1 Hawaii , cepa aislada de brote epidémico en 1944 ; Dengue 2 Nueva Guinea C (NGC) , cepa aislada de brote epidémico en 1944 ; Dengue 2 Mexicano (MEX) , cepa aislada de brote epidémico de dengue clásico en 1982 ; Dengue 2 Indonesia (IND) , cepa aislada de un brote epidémico en 1987 y , Dengue 4 H-241 , cepa aislada de brote epidémico en Filipinas en 1956 .

Medios de cultivo .- El medio para propagar y hacer ensayos de placa lítica con las células LLC-MK2 fué el 199 ; para los cultivos de TRA-284 se utilizó el medio L-15 (Leibovitz) y triptosa fosfato ; el cultivo de células del sistema nervioso central se realizó con medio MEM .

Los medios fueron de DIFCO y el resto de suplementos se obtuvieron de diferentes fuentes comerciales y del mejor grado de pureza disponible .

Anticuerpos .- Los anticuerpos empleados como marcadores ademas del producido contra dengue fueron : contra enolasa especifica de neuronas (Sigma) y contra proteina glial fibrilar Ácida (producido en el laboratorio de Neuroinmunologia del INNN) . El resto de anticuerpos contra dengue se obtuvieron de los laboratorios San Juan , Puerto Rico .

Soluciones .- Las soluciones de Alsever's , de dextrosa-gelatina-veronal , de borato salino PH 9.0 , de albumina bovina al 4 % , PH 9.0 , de borato salino-albumina bovina al 0.4 % y la suspensión de Kaolin al 23 % utilizadas para la inhibición de la hemaglutinación también fueron preparadas con reactivos de diferentes marcas .

TODOS LOS REACTIVOS SE CONSERVARON A 4°C .

VI. MÉTODOS

1. Inoculación de los ratones recién nacidos (48 a 72 hrs) .

Para determinar la cantidad de virus a usar en los ensayos se realizaron las LD₅₀ (dosis letal 50), diluyendo el virus "stock" con PBS FH 7.4 0.01 M - Albumina bovina al 0.1 % manteniendolo siempre a 4°C hasta la inoculación. Se inoculó a los ratones en el ángulo interno de la intersección de la fisura lambda del cráneo sin tocar las venas (0.02 ml vía intracerebral) ó en la parte baja del abdomen (0.05 ml vía intraperitoneal) y se mantuvieron en observación descartando los muertos en los primeros 7 días post-inoculación. En las 2 semanas siguientes se observaron signos y síntomas presentados por los ratones restantes anotando número de muertos por dilución y por día. Para calcular los valores de las LD₅₀ se usó el método de Reed and Muench (114) y se anotó el estado del animal con la escala siguiente :

- 0 = normal , come , camina y corre
- + = cola paralizada , avanza sin rumbo
- ++ = paraparesis , sin equilibrio , hiperexcitable
- +++ = tetraparesis , hechado , respiracion imperceptible
- ++++ = arqueado , moribundo .

2. Preparación de la suspensión de cerebro de ratón lactante .

Se sacaron los ratones del Revco y se descongelaron por 45 minutos . Luego se sumergieron en alcohol de 70 % por 15 minutos y

se secó el exceso de alcohol , con jeringa y aguja de 18 x 38 se atravesó el cráneo por el postencefalo succionando el cerebro . Extraídos los cerebros , se pesaron en una placa de Pétri pre-pesada mantenida en hielo y se hicieron las suspensiones "stock" de los virus al 20 % (p/v) con una solución 1:1 de suero fetal bovino inactivado a 56°C y buffer de fosfatos (PBS PH 7.4 0.01 M) , para lo cual se homogenizó en mortero estéril y después se transfirió a tubos estériles en los que se centrifugó a 3000 rpm/30'/4°C . Los sobrenadantes se pasaron en alícuotas de 0.5 a 1.0 ml. a viales estériles mantenidos a 4°C . Por último , se almacenaron en un congelador Revco , debidamente registrados (76).

3. Obtención de los órganos de ratón (Fig 2) .

Para observar la afinidad del virus por determinado(s) órgano(s) de los ratones , estos se inocularon con una LD₅₀ vía intraperitoneal según el procedimiento anterior . Los días indicados se cosecharon vivos , se anestesiaron con éter y se sujetaron desinfectándolos primero con benzal y después con alcohol del 70% . En seguida se cortó la piel a lo largo de tórax y abdomen y se lavó la superficie expuesta con benzal y alcohol . Se exsanguinó cortando la vena axilar y después se abrió la cavidad abdominal y la torácica . Se perfundió por el ventrículo izquierdo con PBS PH 7.4 0.01 M ó solución salina isotónica ó Hank's estériles . Posteriormente se extrajeron bazo , hígado ,

METODOLOGIA



1 LD₅₀ vía intraperitoneal

DIFERENTES DIAS
EXTRACCION DE ORGANOS

CÉREBRO TIMO CORAZON PULMON HIGADO BAZO RIRON MUSCULO MEDULA ESPINAL

SOLUCION DE HANK ESTERIL

SUSPENSION ORGANOS
30% peso/volumen

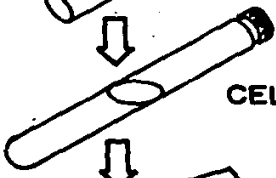


ALMACENAR VIAL (70°C)



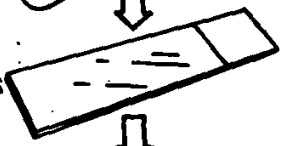
INOCULAR 0.1-0.2 ml
DE SUSPENSION

CELULAS TRA-284



INCUBAR (28°C)

5 y 10 DIAS DESPUES
GOTEAR SUSPENSION DE CELULAS



REALIZAR INMUNOFLUORESCENCIA

riñones , pulmón , corazón y timo . Del cráneo se extrajo el cerebro , la médula espinal de la porción toraco-lumbar de la columna y por último el músculo de alguna de las patas inferiores . Los órganos se fueron depositando en tubos estériles sumergidos en baño de hielo con 2 ó 3 ml de medio y antibióticos al 1 % . Se suspendió cada uno de los órganos al 30 % (p/v) macerándolos en medio Lit al 1% y se pasaron a viales estériles etiquetados guardándolos a -70°C . Con estas suspensiones se inocularon monocapas de células TRA-284 que crecieron en tubos .

4. Cultivo de células de mosquito (TRA-284) .

El aislamiento , la propagación y la identificación del virus se realizó infectando células TRA-284 (Toxorhynchites ambouensis) . Para lo cual se descongelaron células a 28°C , se suspendieron en medio Lit al 1 % y se pasaron a frascos de plástico . Se incubaron por 3 a 7 días a 28°C y se hicieron resiembras en tubos que se incubaron a 28°C pero en posición inclinada . Establecida la monocapa se quitó el medio viejo y se inoculó , con 0.05 ml (si era suero) o con 0.2 ml (si era suspensión de órganos) . Se adsorbió el virus incubando 1 hora a 28°C mojando la monocapa con movimientos leves cada 20 minutos y después se agregó 3 ml de medio fresco e incubó 10 días a 28°C . El día 5 se raspó una parte pequeña de la monocapa del fondo del tubo que se lavó con PBS PH 7.4 , se goteó la suspensión celular en pozos de portaobjetos con

teflón, se dejaron secar y en seguida se fijaron en acetona enfriada a -20°C por 10 minutos. El día 10 se hizo lo mismo con toda la monocapa. Las muestras se almacenaron a -20°C o se detectó virus del dengue con inmunofluorescencia directa e indirecta (115).

5. Inmunofluorescencia indirecta en células TRA 264.

Se descongelaron portaobjetos con teflon por 5 minutos, se lavaron con PBS y se secaron alrededor de los pozos. Se agregó a cada pozo 0.02 ml del primer anticuerpo (anti dengue hecho en ratón diluido 1/10, 1/25 o 1/50), y se incubó en atmósfera húmeda 30 minutos a 37°C . Se lavaron con PBS y después de secar alrededor de los pozos se aplicó el conjugado antirratón (IgG-FITC, 0.01 ml/pozo, dilución 1/75). Se incubó en atmósfera húmeda 30 minutos a 37°C y luego se lavó con PBS. Por último se montó con glicerina 30%-PBS 70%. Las preparaciones se almacenaron a -20°C hasta por lo menos 6 meses (115).

La inmunofluorescencia directa en células TRA-264 se realizó igual que la indirecta excepto que se pone solo el primer anticuerpo conjugado con FITC diluido 1:100 (115).

6. Técnicas histológicas.

La fijación se hizo según el método de Sainte-Marie; para esto los órganos frescos se dejaron en etanol al 95% a 4°C por 24 hrs. Luego se deshidrataron con cuatro baños de 1 a 2 hrs. de

alcohol absoluto y se aclararon toda la noche en xileno . Se impregnaron con 4 baños de parafina-cera por 1 a 2 hrs. y a 56°C . Se hicieron bloques con parafina limpia y se almacenaron a 4°C en desecador . Los cortes se obtuvieron en microtómo , haciendolos flotar a 40°C antes de montarlos en portaobjetos albuminizados . Después se secaron a 37°C por 30 minutos . La tinción fué con la técnica de hematoxilina y eosina .

7. Prueba de inmunoperoxidasa indirecta (IIP) , para detectar el antígeno viral en cortes de tejido .

Se modificó la técnica para hacer accesible el antígeno viral de los cortes parafinados . Brevemente : se desparafinó en horno a 60°C - 70°C por 18-24 horas y luego 2 baños de xileno de 3 minutos c/u . En seguida se hidrató con baños de 2 a 5 minutos en etanol absoluto, 96°, 90°, 75°, 50° y PBS . Los cortes se incubaron en tris-salino-sacarosa al 2.5 % , PH 7.8 a temperatura ambiente y luego a 37°C . Se cambiaron a tris-salino-tripsina al 0.1 % ó 0.025 % (Difco Lab. Detroit , MI) y 0.1 % de cloruro de calcio PH 7.8 a 37°C por 30 ó 60 minutos con agitación vigorosa . Se lavaron con tris-salino-sacarosa al 2.5 % PH 7.8 a temperatura ambiente 3 ó 4 veces por 10 minutos c/u , terminando con PBS . Se inactivó la actividad endógena de peroxidasa en metanol absoluto-peróxido de hidrógeno al 30% (24 : 1) por 45 minutos . Después se lavó con 3 cambios de PBS de 10 minutos c/u a temp. amb. y se bloqueó el

pegaje inespecifico incubando con suero de ratón normal diluido 1/10 por 10 a 20 minutos ; se escurrió el suero y se secó alrededor de las muestras . Se puso el primer anticuerpo hecho en ratón contra dengue marcado con biotina por 45 a 60 minutos , a 37°C , diluido 1/10 o 1/20 en atmósfera húmeda . Como controles se usaron anticuerpos contra IgA o contra micobacterium marcados con biotina y hechos en ratón . Al terminar de incubar se lavó con 3 cambios de PBS de 10 minutos c/u a temp.amb. , se puso la estreptavidina-peroxidasa (AMERSHAM , UK) por 30 a 45 minutos a 37°C diluida 1/20 ó 1/50 en PBS y se lavó con 3 cambios de PBS de 10 minutos c/u a temp.amb . El revelado fué por 5 a 10 minutos con 3 mg de 3,3'-diaminobenzidina en 5 ml de PBS PH 7.4 y 0.010 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % . (también se hizo con 2.5 mg de 4-cloro-1-naftol en 1 ml de metanol absoluto más 5 ml de PBS PH 7.4 y 0.010 ml de Peroxido al 30 %) . Se lavo inmediatamente con agua destilada desionizada , se dejó secar y se sumergió por 5 minutos en sulfato de cobre al 0.5 % en NaCl al 0.9 % . Se volvió a lavar inmediatamente con agua destilada desionizada y se contratiñó con hematoxilina o verde de metilo (116, 117, 118) .

El forraje de los portaobjetos se realizó poniendolos en alcohol de 96° acidificado con unas gotas de HCl , luego se secaron y se dejaron en albumina acuosa al 1 % por 5 a 10 minutos . Se secaron verticalmente y se fijaron con glutaraldehido acuoso al 2 % por 2 horas ó toda la noche . Por último se lavaron en agua

destilada , luego en solución reguladora de glicina 1M con PBS por 1 a 2 horas y nuevamente en agua destilada .

8. Preparación del fluido ascítico de ratón hiperinmunizado con virus del dengue .

Se usaron 2 lotes de 6 ratones machos cepa CD-1 de 4 semanas de edad inoculados con Dengue 1 Hawaii y con Dengue 2 NGC , ambos con 4 pases en cerebro de ratón lactante . Al grupo de ratones control se administró suspensión de cerebro de ratón lactante normal , sin virus . El esquema de inmunización por ratón fue : día 1 dosis de 0.1 ml intradérmica y 0.5 ml intraperitoneal . Día 4 dosis de 0.5 ml intradérmica y 0.1 ml intramuscular . Día 7 dosis de 0.5 ml intradérmica , 0.1 ml intramuscular y además dosis de 0.1 ml intraperitoneal de adyuvante completo de Freund . Día 25 dosis de 0.5 ml intraperitoneal . Día 29 dosis de 0.5 ml intraperitoneal y dosis de 1×10^6 /0.2 ml de células de sarcoma 180/TG intraperitoneal . Día 40 se cosechó el fluido ascítico con aguja del 18 y se obtuvo todo el suero . Ambos líquidos se almacenaron a -70°C . En promedio cada lote de ratones produjo 30 ml de fluido ascítico (15) .

9. Precipitación de inmunoglobulinas del fluido ascítico .

Se diluyó el líquido de ascitis con un volumen igual de PBS (0.15M NaCl , 0.01 M fosfato de sodio PH 7.2) a 4°C y se le agregó un volumen de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.2 M igual a el volumen del fluido

ascítico diluido ; (la concentración final del sulfato fué de 33 % de saturación en frío) , gota a gota con agitación moderada y constante por 2 horas . Después se centrifugó a 3000 rpm/4°C/20 minutos y la pastilla se disolvió en PBS a el volumen original del fluido y el procedimiento se repitió una vez más bajo las mismas condiciones . El último precipitado se disolvió en solución salina isotónica y boratos a una mitad del volumen original , y se dializó contra 100 volúmenes de PBS 0.01 M PH 7.5 a 4°C cada 8 horas por 2 días . Se checó precipitados y sobrenadantes con pruebas de inhibición de la hemaglutinación e inmunofluorescencia indirecta observando que los anticuerpos quedaron en el último precipitado . Estos quedaron almacenados a -70°C .

10. Purificación de IgG de ratón mediante cromatografía de intercambio iónico con DEAE-celulosa .

Se utilizó DE-52 preinchada y activada , otros procedimientos empleados se encuentran en la hoja de información del producto . Primero se equilibró el intercambiador iónico suspendiendo en buffer de fosfatos PH 8.0 , 0.2 M , (15 a 30 ml/gramo de DE-52 seco) y luego se vació la pasta en la jeringa de 10 ml evitando corrientes de convección , burbujas y que seicara . Se volvió a equilibrar con buffer de fosfatos PH 8.0 , 0.04 M midiendo la conductividad y PH . Previamente se determinó la concentración de proteína del líquido por el método de Lowry y se puso a dializar

18 a 24 horas en buffer de fosfatos PH 8.0 , 0.04 M . Se vació lentamente en la columna la solución de proteína concentrada , dializada y ajustando el flujo a una velocidad de 1 ml por cada 2.5 minutos se colectaron fracciones de 1 o 2 ml . Después sin dejar secar la parte de arriba , se lavó con buffer de fosfatos PH 8.0 , 0.04 M . Se monitoreó simultáneamente midiendo la densidad óptica . Por último se despegó el resto de proteínas con buffer de fosfatos PH 8.0 , 0.04 M y NaCl 0.5 M . Las fracciones se conservaron a -20°C hasta su uso . Nota.-El ajuste del PH de la solución reguladora de fosfatos se hizo sin alterar su molaridad (119) . Las tinciones de inmunofluorescencia indirecta en células de mosco infectadas con dengue y usando las fracciones colectadas ayudo a confirmar la presencia de los anticuerpos . (Fig. 9)

11. Marcaje de las inmunoglobulinas de ratón con biotina .

Primero se ajustó la concentración de las inmunoglobulinas por pervaporación a 4°C por 18 horas , a 10 mg/ml en PBS . Después se ajustó el PH mediante dialisis y agitación moderada con NaHCO₃ 0.5 M , PH 9.0 por 18 horas a 4°C . Aparte se disolvió el éster de biotina-N-hidroxisuccinimida con brazo de ácido caproico a una concentración de 50 mg/ml en N,N- dimetilformamida (SIGMA) , momentos antes de usarse . Se incubó el éster de biotina y el anticuerpo purificado en una proporción de 1:2 (peso/peso) por 4 horas a temperatura ambiente y en obscuridad . Se paró la

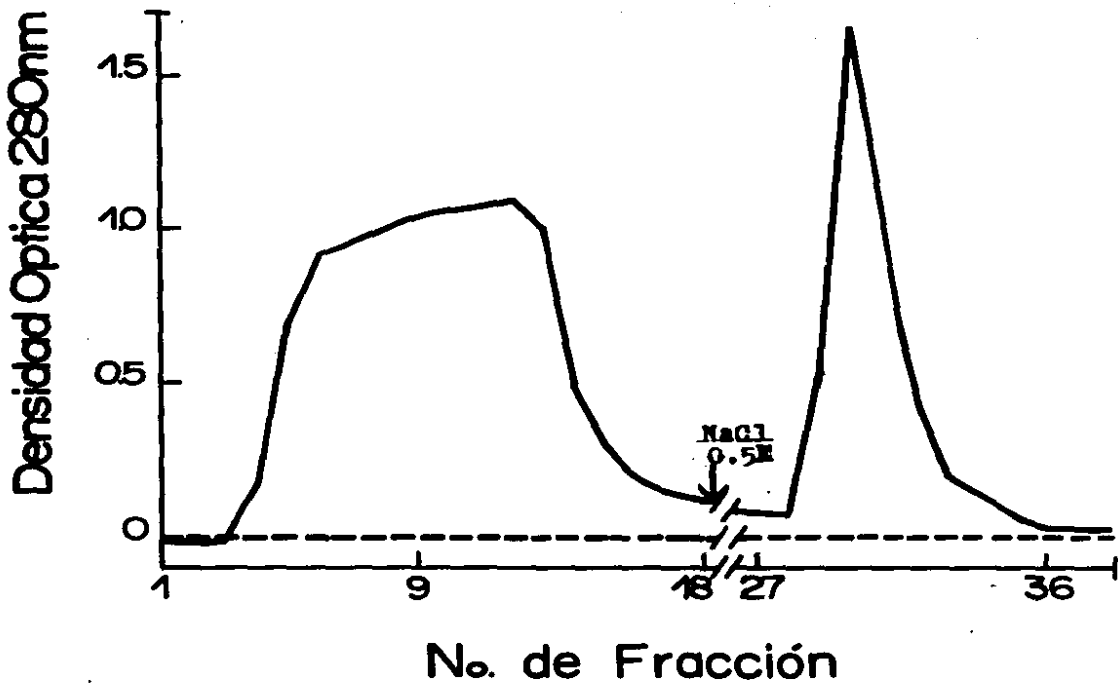


Fig. 2. - Cromatografía de intercambio iónico con DEAE-celulosa de los anticuerpos producidos en fluido ascítico de ratón contra dengue .

reacción agregando NH_4Cl 1 M acuoso para tener una concentración final de 0.1 M en la mezcla de reacción y por último la biolina libre se eliminó dializando 12 a 18 horas con el buffer de fosfatos . Se hicieron alícuotas manteniéndolas a -20°C .

12. Cultivo de células de riñón de mono (LLC-MK2) .

Las células se descongelaron en agua a 37°C , luego de extraídas del nitrógeno líquido y se transfirieron a frascos de 25 cm^2 con 5 ml de medio precalentado incubando a 37°C . A los 3 ó 4 días se quitó el medio ; se enjuagó la monocapa con Hanks , PBS o SSI ; se agregó 0.2 ml de tripsina-EDTA estéril (tripsina al 0.025 % y el EDTA a 30 mg/100 ml) a 37°C cubriendo apenas la monocapa durante 5 a 10 minutos . Después se agregó medio de crecimiento fresco con el que se terminó de separar las células suspendiéndolas con pipeteo moderado transfiriéndolas en seguida a frascos adecuados .

13. Quantificación de virus mediante la técnica de placa lítica en células LLC-MK2 .

Con estos estudios se determinó la cantidad de partículas virales infectivas de los "stocks" o de las diferentes muestras . Para esto se diluyeron las muestras con PBS-Alb al 0.1 % , manteniéndolas en baño de hielo . Después se agregó 0.2 ml/pozo de muestra ó dilución , en las placas de 6 pozos con células LLC-MK2 (costar 35 mm) de las que se ha decantado el medio , y se

distribuyó el inóculo rotando la placa suavemente . Se incubó a 37°C por 60 a 90 minutos para adsorber el virus , redistribuyendo y mojando la monocapa a intervalos de 20 minutos . En seguida se quitó el inóculo y evitando el secado de la monocapa se agregó inmediatamente 3 ml de medio para ensayo en placa lítica mantenido a 44°C , a cada pozo . Se dejó solidificar 10 a 15 minutos en la campana de flujo laminar , se invirtieron las placas , se las cubrió con papel aluminio y se incubaron por 7 días a 37°C con 6 % CO₂ en atmósfera húmeda . Por último se agregó 0.2 ml/pozo de colorante vital MTT y se volvió a incubar 30 a 60 minutos . Al final se contaron las zonas claras de lisis celular y se calcularon las unidades formadoras de placas (PFU) por ml (115) .

14. Cultivos mixtos de Células de Sistema Nervioso Central de embrión de ratón .

Los cultivos primarios de células del sistema nervioso central se obtuvieron según la técnica descrita (120) , brevemente esta consistió en la obtención de embriones de ratón cepas NIH o Balb/c de 12 días de gestación a los que se cortó las porciones cefálicas que se homogenizaron mecánicamente en medio de cultivo . La suspensión de células se vació en placas estériles de plástico de 6 pozos (Costar 35 mm) en los que se colocó previamente un cubreobjetos de 20x20 mm , y se incubó a 37°C en atmósfera húmeda

con 7.5 % de dióxido de carbono . Después de 8 días de establecidos los cultivos , se infectaron con virus del dengue serotipo 2 y serotipo 4 . Los días 2 , 5 , 7 , 9 y 15 post-infección después de colectados los sobrenadantes se sacaron los cubreobjetos y se lavaron con PBS PH 7.4 0.01 M para fijarlos en acetona enfriada a -20°C por 5 a 10 minutos , quedando así las preparaciones listas para teñir .

Los sobrenadantes de los cultivos infectados con Dengue 2 NGC colectados los días 1,6 y 15 se titularon con el ensayo de placa lítica usando células LLC-MK2 según lo descrito antes .

15. Cultivos de astrócitos de embrión de ratón .

Los cultivos de astrócitos , con un 90 % de pureza por lo menos , se obtuvieron según la técnica (21) . Estos cultivos después de 11 días de establecidos se infectaron con virus Dengue 2 NGC . En determinados días post-infección se sacaron los cubreobjetos y se procesaron de manera igual a la ya descrita .

16. Tinciones con doble fluorocromo .

Las tinciones de inmunofluorescencia indirecta con doble fluorocromo fueron con IgG-FITC-antiraton para el antígeno viral y IgG-RITC-anticonejo específico para las diferentes estirpes celulares . El procedimiento consistió en rehidratar y lavar con PBS por 5 minutos las monocapas de células ya fijadas a los cubreobjetos , enseguida se incubaron durante 30 minutos a 37°C

en atmosfera humeda con alguna de las siguientes combinaciones de los anticuerpos primarios : ratón anti dengue 1:100 y conejo anti proteína glial fibrilar ácida 1:50 ó bien ratón anti dengue 1:100 y conejo anti enolasa específica de neuronas 1:50 . Después se lavaron 3 veces con PBS 10 minutos c/u y se incubaron con los anticuerpos secundarios : IgG-FITC de cabra anti ratón 1:100 y IgG-RITC cabra anti conejo 1:50 . Posteriormente se lavaron las preparaciones y se montaron en elvanol . Las observaciones se hicieron con microscópio de epifluorescencia (Zeiss, West Germany) y con contraste de fase . Los cultivos control sin infectar dieron un bajo nivel de fluorescencia de fondo la cual no fue visible al fotografiar .

17. Titulación de anticuerpos de ratón mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación .

Las inmunoglobulinas purificadas se titularon mediante la inhibición de la hemaglutinación de eritrocitos de ganso por virus del dengue , para lo cual se extrajo asepticamente la sangre del ganso empleando Alsevers como anticoagulante . Se filtró con gaza estéril , se lavó con solución dextrosa - gelatina - veronal (DGV) centrifugando a 2000 rpm/4°C cada lavado . Se preparó una suspensión celular al 8 % en DGV estabilizando después a las células a 4°C por 24 horas . Se estandarizó diluyendo 1:24 en la solución de PH adecuado dando una densidad óptica de 0.75 a 490 nm

A las inmunoglobulinas se les removieron hemaglutininas inespecíficas con Kaolin y los eritrocitos de ganso estabilizados . Al final se emplearon diluidos 1:10 .

El título de la hemaglutinina viral fue la dilución más alta que mostró una aglutinación completa . para esto primero se hidrató el antígeno liofilizado y se estabilizó . Luego se diluyó 1:10 con solución salina de boratos y albumina bovina al 0.4 % PH 9.0 (BABS) mezclando fuertemente y manteniendolo en baño de hielo . Se puso 0.1 ml del antígeno diluido en el primer Pozo de la placa de microtitulación y 0.05 ml de BABS a los 11 pozos restantes y se diluyó desde el pozo 1 al 2 y así hasta acompletar los 12 pozos , desechando los últimos 0.05 ml . Se agregaron 0.05 ml de eritrocitos de ganso estandarizados en el luffer adecuado a cada uno de los 12 pozos , se sacudió la placa moderadamente para mezclarla y se dejó en un lugar con fondo blanco alejado de vibraciones a temperatura ambiente por 30 minutos .Por último se observó la hemaglutinación registrandola oportunamente .

La prueba de inhibición de la hemaglutinación requiere que el antígeno se diluya para contener 8 unidades hemaglutinantes por 0.025 ml , para lo cual se puso 0.05 ml del suero tratado en el primer pozo de la placa de titulación y 0.025 ml de BABS en cada uno de los 11 pozos restantes . Luego se diluyó desde el pozo 1 al 2 y así hasta acompletar los 12 pozos desechando los últimos

0.025 ml y se agregaron 0.025 ml del antígeno conteniendo las 8 unidades hemaglutinantes desde el pozo 2 hasta el 12 . Se sacudió la placa moderadamente para mezclarla y se dejó 18 a 24 horas a 4°C . Al día siguiente se sacó la placa cuidadosamente del refrigerador , se dejó a temperatura ambiente aproximadamente 30 a 60 minutos y se agregó 0.05 ml de eritrocitos de ganso estandarizados a cada uno de los 12 pozos . Se mezcló cuidadosamente y se dejó en un lugar con fondo blanco y alejada de vibraciones a temperatura ambiente por 30 a 60 minutos . La inhibición de la hemaglutinación dió como resultado un botón de células , la cual se registró oportunamente .

El título de la inhibición fue la dilución más alta del suero la cual causó la inhibición completa o casi completa de la aglutinación y se expresó como dilución del suero (115:122) . Los títulos para Dengue 1 fueron en fluido ascítico 1:2560 y en suero 1:10240 , para Dengue 2 en fluido 1:20480 y en suero 1:10240.

VII.RESULTADOS

1. PURIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS DE RATÓN CONTRA DENGUE .

La purificación de los anticuerpos anti-dengue del fluido ascítico se monitoreo mediante pruebas de inhibición de la hemaglutinación e inmunofluorescencia indirecta (Figura 3) .

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS SEROTIPOS DEL VIRUS (Tabla I) .

Los "stocks" de virus del dengue se propagaron en cultivos de células TRA-284 o en cerebro de ratón lactante , y su identificación se hizo con anticuerpos monoclonales serotipo específico mediante pruebas de inmunofluorescencia indirecta .

3. DETERMINACIÓN DE DOSIS LETALES MEDIAS (Figuras 4 y 5) .

Los títulos promedio de las LD_{50} de las 4 cepas de Dengue fueron similares tanto por vía intraperitoneal como por vía intracerebral .

4. DETERMINACIÓN DE PORCENTAJES DE SOBREVIVENCIA (Figura 4 y 5).

Al graficar los porcentajes de sobrevivencia durante 21 días post-infección para las dos vías de inculación usadas y para los serotipos del virus se observo que : Dengue 2 NGC y Dengue 4 H-241 causan menos muertes que Dengue 2 MEX y Dengue 2 IND por vía intraperitoneal . En cambio por vía intracerebral sucede a la inversa .

TABLA I

IDENTIFICACION POR INMUNOFLUORESCENCIA DE LOS SEROTIPOS DE
DENGUE CON ANTICUERPOS MONOCLONALES .

	ANTICUERPO				ANTICUERPO	
	MONOCLONAL				POLICLONAL	
	<u>DEN 1</u>	<u>DEN 2</u>	<u>DEN 3</u>	<u>DEN 4^a</u>	<u>HUMANO^b</u>	<u>RATON^c</u>
DEN 2 NGC	-	+	-	-	+	+
DEN 2 MEX	-	+	-	-	+	+
DEN 2 IND	-	+	-	-	+	+
DEN 4 H-241	-	-	-	+	+	+

a) Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales y policlonales de fluido ascítico de ratón .

b) Inmunofluorescencia directa con mezcla de sueros humanos con título alto por inhibición de la hemaglutinación .

c) Los "stocks" de virus provinieron de pasajes en cerebro de ratón lactante y de pasajes en células TRA-284

DOSIS LETALES MEDIAS LD50 VIA INTRAPERITONEAL

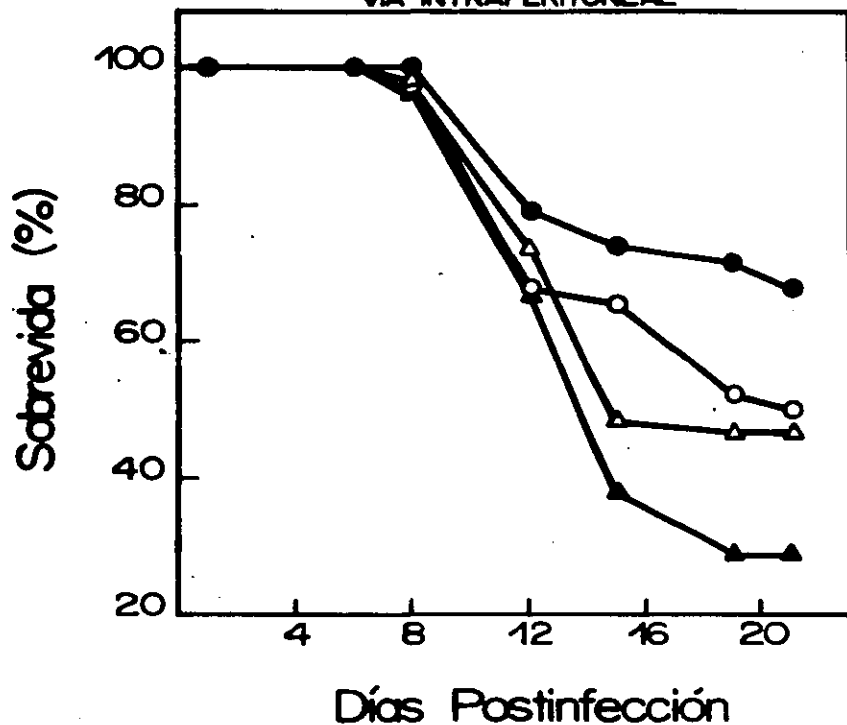


Fig. 4.- Relación entre la vía de administración y el porcentaje de supervivencia de ratones recién nacidos inoculados vía intraperitoneal, valor de la LD₅₀ :

▲ Dengue 2 Indonesia	10 ^{-2.47}
● Dengue 2 Mexicano	10 ^{-4.59}
○ Dengue 2 NGC	10 ^{-0.6}
◐ Dengue 4 H241	10 ^{-1.49}

DOSIS LETALES MEDIAS LD50 VIA INTRACEREBRAL

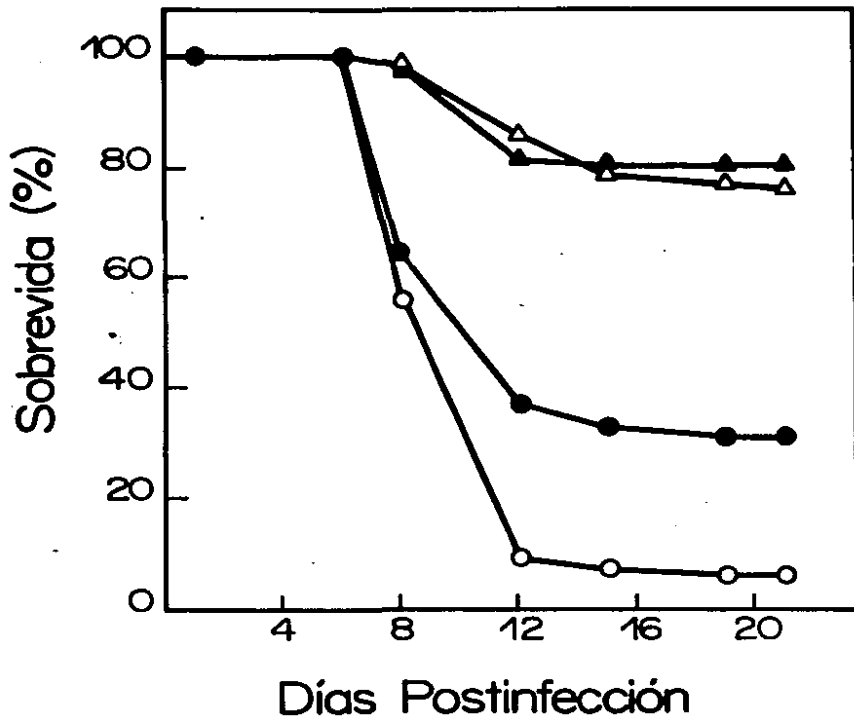


Fig. 5.- Relación entre la vía de administración y el porcentaje de sobrevivencia de ratones recién nacidos inoculados vía intracerebral, valor de la LD₅₀ :

△ Dengue 2 Indonesia	10 ^{-6.79}
▲ Dengue 2 Mexicana	10 ^{-6.86}
● Dengue 2 NGC	10 ^{-7.10}
○ Dengue 4 H241	10 ^{-8.0}

5. DETECCIÓN DE VIRUS CON CELULAS TRA-284 . (Tablos II,III,IV,V)

En ratones recién nacidos Balb/c de 24 a 48 hrs de edad que se inocularon con 1 LD50 por via intraperitoneal , se estudio la presencia del virus en diferentes organos durante los dias 3 , 6 , 9 y 12 post-inoculación . Para esto , se extrajeron los organos y se hicieron suspensiones que se inocularon en los cultivos de celulas TRA-284 . En estas monocapas se detecto con inmunofluorescencia a el serotipo Dengue 2 NAC en bazo y cerebro los dias 3 , 9 y 12 ; en musculo los dias 9 y 12 y en medula espinal el dia 9 ; Dengue 2 MEX se encontro en medula espinal y cerebro los dias 9 y 12 ; Dengue 2 IND en bazo , musculo , medula espinal y cerebro el dia 12 ; Dengue 4 H-241 en musculo , medula espinal y cerebro el dia 12 . El virus no se detecto en higado , riñon , pulmon , corazon ni timo .

No se estudiaron ratones inoculados intracerebralmente .

6. ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUIMICA .

En ratones recién nacidos Balb/c de 24 a 48 hrs de edad que se inocularon con 1 LD50 de Dengue 2 NAC por via intraperitoneal , se estudio la presencia del antigeno viral en diferentes organos durante los dias 6 , 9 , 12 y 15 postinoculación y asi mismo se evaluo el dafu tisular . Conforme los organos se extrajeron se procesaron de acuerdo al metodo ya descrito .

TABLA II

DETECCION DEL VIRUS DENGUE 2 NCC^a EN ORGANOS DE
RATONES INOCULADOS VIA INTRAPERITONEAL^b

ORGANOS	DIAS POSTINFECCION		
	3	9	12
BAZO	+	+	+
HIGADO	-	-	-
RINON	-	-	-
PULMON	-	-	-
CORAZON	-	-	-
TIMO	-	-	-
MUSCULO	NR ^c	+	+
CEREBRO	+	+	+
MEDULA ESPINAL	NR	+	NR

^aEnsayos por duplicado con "stock" Dengue 2 NCC proveniente de cerebro de raton lactante.

^bRatones Balb/c lactantes inoculados con 1 I.D.₅₀.

La suspension de los organos se inoculo en celulas TRA-284 y la presencia del virus se detecto con inmunofluorescencia.

^cNR = No Realizado.

TABLA III

DETECCION DEL VIRUS DENGUE 2 MEXICANO^a EN ORGANOS
DE RATONES^b INOCULADOS VIA INTRAPERITONEAL .

ORGANOS	DIAS POSTINFECCION		
	3	9	12
BAZO	-	-	-
HIGADO	-	-	-
RINON	-	-	-
PULMON	-	-	-
CORAZON	-	-	-
TIMO	-	-	-
MUSCULO	-	-	-
CEREBRO	-	+	+
MEDULA ESPINAL	-	+	+

a)Igual que Tabla II , pero con Dengue 2 MEX .

b)Igual que Tabla II .

TABLA IV

DETECCION DEL VIRUS DENGUE 2 INDONESIA^a EN ORGANOS
DE RATONES^b INOCULADOS VIA INTRAPERITONEAL .

ORGANOS	DIAS POSTINFECCION		
	3	9	12
BAZO	-	-	+
HIGADO	-	-	-
RINON	-	-	-
PULMON	-	-	-
CORAZON	-	-	-
TIMO	-	-	-
MUSCULO	-	-	+
CEREBRO	-	-	+
MEDULA ESPINAL	-	-	+

a) Igual que Tabla II , pero con Dengue 2 IND .

b) Igual que Tabla II . Se inoculó con 0.1 LD₅₀ .

TABLA V

**DETECCION DEL VIRUS DENGUE 4 H-241^a EN ORGANOS DE
RATONES^b INOCULADOS VIA INTRAPERITONEAL .**

ORGANOS	DIAS POSTINFECCION		
	3	9	12
BAZO	-	-	-
HIGADO	-	-	-
RINON	-	-	-
FULMON	-	-	-
CORAZON	-	-	-
TIMO	-	-	-
MUSCULO	-	-	+
CEREBRO	-	-	+
MEDULA ESPINAL	-	-	+

a) Igual que Tabla II , pero con Dengue 4 H-241 .

b) Igual que Tabla II .

Los mejores resultados fueron utilizando el sistema de biotina-estreptavidina-peroxidasa ya que los cortes de tejidos incluidos en parafina que fueron digeridos con tripsina permitieron una mejor localización y resolución del antígeno viral demostrando a éste en bazo , músculo , médula espinal y cerebro . Además en hígado , riñon , pulmón , corazón y timo también se observó la señal aunque con menos intensidad . Estos resultados se confirmaron con la tinción de inmunofluorescencia indirecta de cortes digeridos con tripsina que dió una menor localización y resolución del antígeno (figura 6) . Con la técnica de inmunoperoxidasa indirecta (PAP) los resultados fueron similares a los de inmunofluorescencia (datos no mostrados) .

La distribución del antígeno Dengue 2 NGC en el sistema nervioso central de ratón mediante inmunohistoquímica (Figuras 7 , 8 , 9 , 10 , y 11) fué en las siguientes áreas : corteza (frontal , parietal , temporal) , bulbos olfatorios , hipocampo (astas de Amn , giro dentado) , cerebro anterior (caudado/putamen , tálamo , ganglio basal) , tallo cerebral , cerebelo (células de Purkinje) , médula espinal (astas dorsales) , sistema nervioso periférico (ganglios paravertebrales , fascículos nerviosos) .

El día 6 postinfección no se observó infiltrado inflamatorio de ningún tipo , ni crónico ni agudo en el cerebro . El antígeno viral se demostró en las neuronas , y además en las células epiteliales de plexos coroideos pero estuvieron ausentes de otras

03062

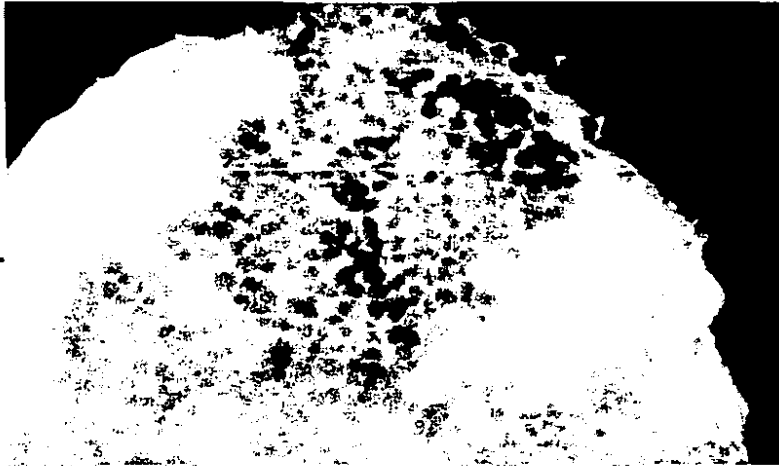


Fig. 6. - Corte de bazo (20X) de ratón balb/c incluidos en parafina , al sexto día postinoculación con $1 LD_{50}$ de dengue 2 NGC vía intraperitoneal . Inmunofluorescencia indirecta digiriendo previamente con tripsina .

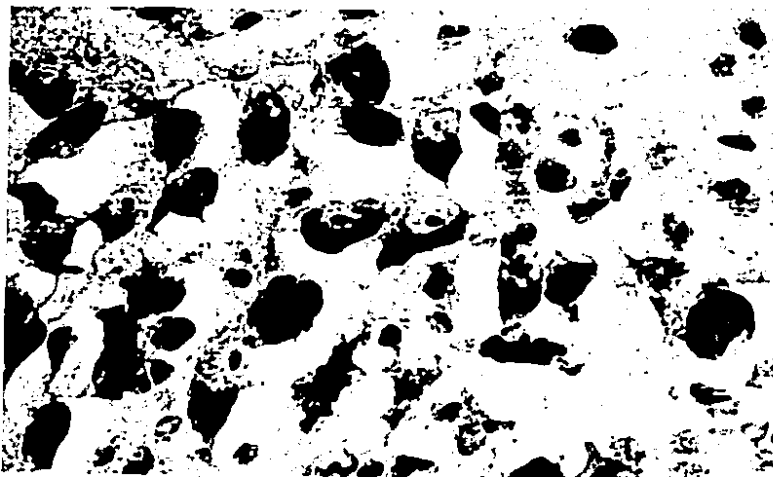


Fig. 7. - Sección de cerebro de ratón balb/c incluido en parafina de la región del tallo cerebral , al 6^o día postinoculación con 1 LD₅₀ de dengue 2 NGC vía intraperitoneal . La tinción se realizo digiriendo con tripsina , incubando con anticuerpo contra dengue marcado con biotina y despues con estreptavidina - peroxidasa . Se revelo con DAB y contratinte con hematoxilina . La distribución del antígeno viral en las neuronas es citoplásmico , (40X) .

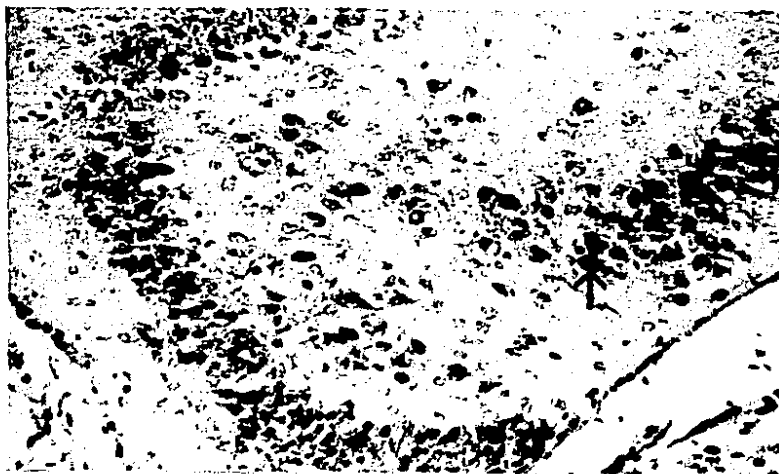


Fig. 8. - Corte de sección del hipocampo de cerebro de ratón balb/c incluido en parafina al 5^o día postinoculación con 1 LD₅₀ de dengue 2 NGC vía intraperitoneal . El antígeno viral se observa en la mayoría de neuronas , (20X) .



Fig. 9. - Sección que muestra la región del hipocampo y el ventrículo del cerebro de ratón al 3^o día post-inoculación. La marca que se observa en las células epiteliales de plexos coroides (↑), también se observa con inmunofluorescencia indirecta al 6^o día postinoculación (datos no mostrados), (10X).



Fig. 10. - Sección transversal de médula espinal de la región sacro-lumbar de ratón balb/c inoculado con $1 LD_{50}$ de dengue 2 NGC vía intraperitoneal al 9^o día - postinoculación . Se observa marca en neuronas de astas anteriores . La médula requirió descalcificar (16X) .



Fig. 11. - Sección transversal de médula espinal mostrando el antígeno viral en ganglio posterior y en fascículos nerviosos . 7^o día postinoculación con 1 LD₅₀ de dengue 2 NGC vía intraperitoneal ,(10X) .

células . Se observó proliferación de células gliales las cuales no tenían marca . Esto se confirmó con tinción indirecta de doble fluorocromo (IgG-FITC-antidengue e IgG-TRIC-anti proteína glial fibrilar ácida) (Figura 12) .

Durante el día 9 se observaron en cerebelo las células de Purkinje con eosinofilia (sugestiva de hipoxia cerebral) y de degeneración ; no hubo signos de inflamación , y se notó edema pericelular (agrandamiento de los espacios pericelulares y perivasculares) .

El día 15 se observó infiltrado inflamatorio subependimario con proliferación de células ependimarias en algunas áreas . El desarreglo del tejido aumentó llegando hasta la vacuolización pues hubo espacios que dejaron las células destruidas , se observó proliferación de células gliales sin indicios de infección ; las células de los plexos coroides tuvieron aspecto normal pero con marca y los ventrículos se observaron libres . Al día 13 la marca abarcó la corteza cerebral , los endotelios , el hipocampo y las neuronas de los bulbos olfatorios los cuales estaban destruidos . En el cerebelo la infección viral abarcó las tres capas y no únicamente las células de Purkinje como ocurrió el día 9 . Se observó desarreglo y destrucción de tal manera que hubo separación de las capas siendo la eosinofilia muy marcada . Así mismo se observó retraimiento y eosinofilia de las neuronas , indicando daño severo .

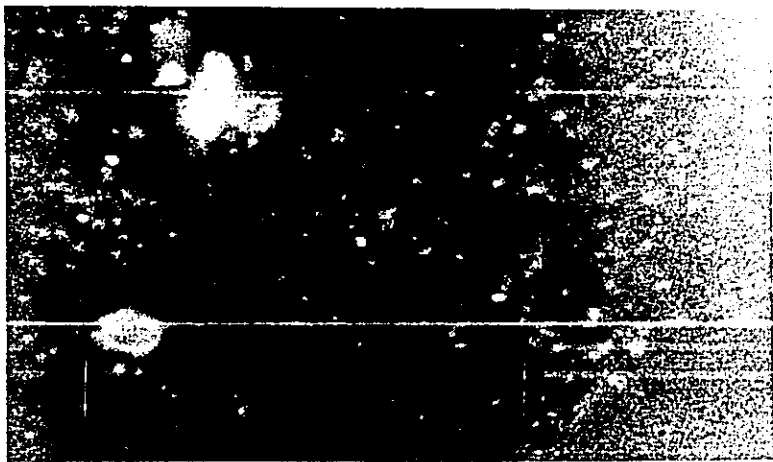
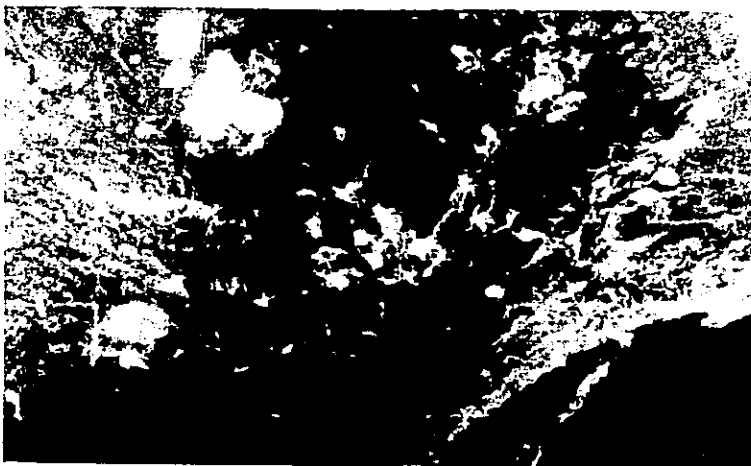


Fig. 12.- Doble inmunofluorescencia indirecta de sección de cerebro de ratón balb/c al 6^o día postinoculación con dengue 2 NGC . Se digirió con tripsina e incubo con anti-dengue y anti-proteína glial por 24 hrs. a 4^o C en Triton X-100 al 0.01 M en PBS . Los señales no coinciden (arriba virus y abajo proteína glial) , (40X) .

En los cortes de médula espinal 9 días postinfección , se observaron indemnes las meninges .No hubo vasos con infiltrado inflamatorio ni cromatolisis .No hubo retraimiento en las células ni estaba aumentada la microglia . La relación núcleo-citoplasma fue normal .

No se encontraron datos neuropatológicos característicos de encefalitis viral como son : edema ; congestión vascular ; infiltrado inflamatorio mononuclear , linfocitario y a veces macrófagos , proliferación de la microglia con núcleos que adoptan forma alargada semejando bastoncillos rectos , curvos ó estrellados (). Se buscaron también cuerpos de inclusión sin encontrarlos y en algunas neuronas se observaron concentraciones eosinofílicas intranucleares , aunque no pudo descartarse con certeza que se tratara del nucleolo .

7. INFECCIÓN DE LOS CULTIVOS DE SNC DE RATÓN . (tablas VI-VIII)

Para demostrar la replicación del virus del dengue en las células del cerebro de ratón , se infectaron los cultivos con diferentes concentraciones de virus (títulos anotados en tablas) , en diferentes días post-infección se buscó la presencia del virus en las células del sistema nervioso central del ratón . Las cinéticas de infección con Dengue 2 MEX y Dengue 2 IND (tabla VI y VII) y con Dengue 2 NGC (tabla VIII) mostraron que el virus se encuentra ya a las 24 horas en escasas células aumentando su número los días 5 y 7 para Dengue 2 MEX y Dengue 2 IND y los días 2 y 5 para Dengue 2 NGC . Con Dengue 4 H-241 también se encontraron resultados positivos los días 1 , 2 , 4 y 7 (datos no mostrados) .

Se observa que aún cuando Dengue 2 MEX y Dengue 2 IND se inoculan con un título 100 veces mayor , es hasta el 5^o día cuando empiezan a observarse neuronas infectadas , en cambio Dengue 2 NGC con menor número de partículas virales iguala e inclusive sobrepasa a las otras cepas en número de neuronas infectadas en el mismo día .

También los días 1 , 6 y 15 se determinó únicamente para Dengue 2 NGC , la cantidad de virus infeccioso en los sobrenadantes de los cultivos titulándolos con el ensayo en placa usando células LLC- MK2 . Estos resultados mostraron que el

TABLA VI

**CINETICA DE INFECCION DE CULTIVOS DEL SNC DE RATON
CON VIRUS DEL DENGUE^a "in vitro"**

VIRUS	NUMERO DE NEURONAS FLUORESCENTES ^b	
	5 DIAS	7 DIAS
9.2×10^8	51	216
4.6×10^8	63	593
2.3×10^8	82	281
1.1×10^8	5	150
8.0×10^7	16	98

a) Título de Dengue 2 MEX en células LLC-MK2 : 7.7×10^8 PFU/ml.

b) Promedio de 2 observaciones

TABLA VII

CINETICA DE INFECCION DE CULTIVOS DEL SNC DE RATON
 CON VIRUS DEL DENGUE^a "in vitro" .

VIRUS	NÚMERO DE NEURONAS FLUORESCENTES ^b	
	5 DIAS	7 DIAS
9.0×10^8	28	114
4.5×10^8	54	457
2.2×10^8	125	512
1.1×10^8	27	294
7.0×10^7	16	274

a) Título de Dengue 2 IND en células LLC-MK2 : 7.5×10^8 PFU/ml.

b) Igual que Tabla VI .

TABLA VIII

**CINETICA DE INFECCION DE CULTIVOS DEL SNC DE RATON
CON VIRUS DEL DENGUE^a "in vitro" .**

VIRUS	NÚMERO DE NEURONAS FLUORESCENTES ^b	
	2 DIAS	5 DIAS
0.2 x 10 ⁶	112	477
0.3 x 10 ⁶	121	583
0.6 x 10 ⁶	57	760
1,2 x 10 ⁶	15	61

^aTítulo de Dengue 2 NOC en células LLC-MK2 : 1.75x10⁷ PFU/ml.

^bIgual que Tabla VI .

inóculo inicial del virus (2.5×10^6 PFU/pozo) desaparece del cultivo a las 24 horas, se alcanza un máximo a los 6 días (2.6×10^6 PFU/pozo) que disminuye un poco al día 15 (9.9×10^5 PFU/pozo), sin que se llegue a alcanzar el título del inóculo.

8. DISTRIBUCIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE EN LAS CÉLULAS DEL SNC.

Al determinar el tipo de células en las que se replicó el virus mediante inmunofluorescencia, los resultados mostraron que la localización del virus fue en las neuronas (Figuras 13, 14 y 15), alrededor del núcleo con distribución citoplásmica y en los axones y dendritas; la morfología de las neuronas infectadas corresponde principalmente al tipo bipolar (y no todas las células de esta subpoblación son susceptibles de infectarse), también se observa infección de neuronas tripolares y multipolares pero en proporciones menores.

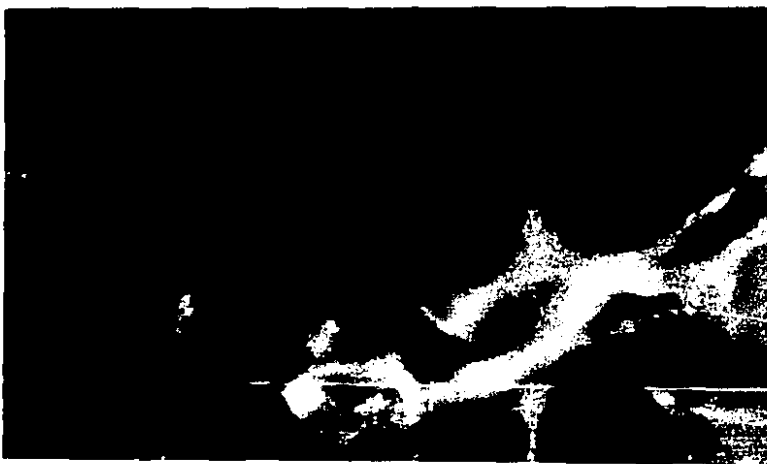
En estos cultivos, los macrófagos, los fibroblastos y los astrocitos (inclusive en cultivos 90% puros) (Fig 16) al parecer permanecen sin infectarse ya que no se detecta al virus.



Fig. 13. - Doble inmunofluorescencia indirecta de cultivo de células de cerebro de ratón NIH infectadas con dengue 2 NGC . Arriba neurona tripolar marcada con anticuerpos anti-dengue y abajo con anticuerpos anti-enzima específica de neuronas , (400X) .



Fig. 14. - Inmunofluorescencia indirecta de un cultivo de SNC de ratón balb/c a los 4 días postinoculación con virus . Se observan acumulos de neuronas infectadas con dengue 2 mexicano (arriba , 40X) y dengue 2 indonesia (abajo , 40X) .



15.- Inmunofluorescencia indirecta de un cultivo de SNC de ratón balb/c infectado con dengue . Se observa la morfología de una neurona multipolar (arriba , 100X) y varias bipolares (abajo , 100X) .



Fig. 16. - Doble inmunofluorescencia indirecta de cultivo de SNC de ratón NIH al 5^o día postinoculación con dengue 2 NOC . Arriba neurona bipolar marcada con anticuerpo anti-dengue y abajo acumula de astrocitos marcados con anticuerpos anti-proteína glial , (100X) .

VIII. DISCUSION.

Selección de cepas neurovirulentas de dengue .

Aún cuando las dosis letales medias de cepas silvestres y prototipo son semejantes , las curvas de sobrevivida sugieren que las cepas prototipo causan más muertes cuando se inoculan por vía intracerebral que por vía intraperitoneal . Un fenómeno parecido fué reportado por Schlesinger (129) quien observó que el virus del dengue pierde su patogenicidad para el huésped natural (hombre) conforme progresa la neurovirulencia en animales experimentales . Sin embargo , con las cepas silvestres sucede lo contrario : se observan más muertes por vía intraperitoneal que por vía intracerebral . Si este fenómeno ocurriera al analizar un número mayor de cepas silvestres , sugeriría a) que los pases en ratón o en células de mosquito seleccionan cepas neurovirulentas b) que la variación en la neurovirulencia sea consecuencia también de un probable tropismo celular y c) que al seleccionar cepas neurovirulentas se pierdan otros rasgos fenotípicos como el tropismo .

Neurotropismo "in vivo" .

La presencia del virus Dengue 2 NGC en bazo , músculo , médula espinal y cerebro durante casi todo el tiempo que duró la infección experimental podría indicar una diseminación por vía hematogena al SNC ; apoyada además por la demostración

inmunohistoquímica del virus en los pléxos coroides . Sin embargo , lo anterior no ocurrió en animales infectados con Dengue 2 MEX , Dengue 2 IND y Dengue 4 H-241 en los que se detectó el virus solo a los 9 y 12 días en músculo , médula espinal y cerebro , sugiriendo a) una diseminación no hematológica y b) cierto carácter neurotrópico compartido por las 4 cepas que son muy probablemente variantes genéticas . Por lo que una posible vía de acceso al cerebro con estas cepas podría ser la médula espinal a la cual llegarían los virus vía nervios autónomos , lo cual se ha demostrado ocurre con Semliki , Herpesvirus , Rhabdovirus y con el virus de la encefalitis de San Luis (65,66) .

El virus del dengue infecta neuronas "in vivo" .

Los estudios de inmunohistoquímica realizados en cortes de cerebro de ratones mostraron una susceptibilidad neuronal general a la infección con Dengue 2 NGC ya que la distribución topográfica del virus fué muy amplia . Además , el examen histopatológico del SNC de los ratones lactantes infectados mostró una encefalitis severa que se presentó gradualmente y se caracterizó por : necrosis neuronal y proliferación glial . Estos datos explicarían , con ciertas restricciones , la sintomatología neurológica difusa característica de las infecciones por dengue , donde los signos y síntomas varían desde un dolor de cabeza presente en las meningitis hasta convulsiones , parálisis y muerte en las encefalitis

Lo anterior sugiere que se requiere un estudio más completo del tropismo neuronal, como característica fenotípica potencial de los diferentes serotipos de dengue, el cual puede ayudar a analizar un aspecto de la patología que apenas se empieza a conocer y que es la encefalitis. Esta característica ya se demostró con reovirus tipo 3 el cual produce encefalitis aguda y fatal al afectar neuronas y células gliales y en cambio reovirus tipo 1 produce hidrocefalia al infectar células del endotelio, los cambios en la hemaglutinina viral producen efectos variados en el tropismo tisular (124,126).

El virus del dengue infecta neuronas "in vitro".

Los estudios "in vitro" al salvar las dificultades que imponen la vía de entrada y diseminación hacia el SNC "in vivo", facilitaron el acceso a los diferentes tipos celulares presentes en los cultivos permitiendo observar la morfología de las neuronas normales e infectadas y hasta cierto punto comparar con grupos similares a los que se encuentran "in vivo". Aún cuando no es posible extrapolar susceptibilidad y efectos de una infección viral "in vitro" a lo que ocurre "in vivo".

Las cuatro cepas de virus produjeron un patrón de fluorescencia similar en las neuronas infectadas, además al observar restos de neuronas fluorescentes se demostró que la infección causada por el virus puede terminar en lisis celular.

El tropismo específico de las 4 cepas de dengue , por diferentes tipos morfológicos de neuronas (bipolar y multipolar) en particular , además de ser un factor que interviene en la virulencia pudiera correlacionarse con la presentación de alteraciones neurológicas "in vivo" .

La susceptibilidad celular no incluye astrocitos .

Por otro lado , las tinciones con doble fluorocromo realizadas "in vivo" e "in vitro" no detectaron el antígeno viral en células gliales , específicamente astrocitos . Ni aún en cultivos con más de 90 % de pureza . Este dato contrasta con reportes de estudios realizados "in vivo" en los que se localiza el antígeno viral en este tipo de células (62,94,120) .

Los datos obtenidos "in vivo" e "in vitro" son interesantes ya que se sabe que los astrocitos rodean , sostienen , alimentan y posiblemente defienden a las neuronas . Son células presentadoras de antígeno (APC) viral en el Sistema Nervioso Central , en el contexto de Ia (69,84,127) . Además se ha demostrado que las células de la microglia expresan el antígeno F4/80 específico de macrófagos , poseen receptores para factor 3 de complemento y para Fc de IgG1/2b (127,128) , son Ia positivas y funcionan como APC por lo que es probable que estas células son de origen hematógeno y tienen la función de macrófagos tisulares .

Se piensa que en el daño tisular que se presenta durante el desarrollo de algunas formas de encefalitis viral participan

elementos inmunológicos y que en el curso de una respuesta inmune antiviral , los astrocitos y/o las células de la microglia funcionan como APC . Pudiera ser que el papel primario lo desempeñaran los astrocitos debido a que superan en número a las células de la microglia y porque además expresan más antígeno Ia .

Lo sorprendente aparentemente es que ni los astrocitos ni las células de la microglia , son susceptibles a la infección por virus del dengue . Dos explicaciones que habría que demostrar son : a) una infección inaparente y b) que el virus este siendo procesado por lo que el método de detección no lo resuelve .

La replicación viral en las neuronas y la liberación posterior y sostenida de virus a los sobrenadantes , hasta por 15 días , cuestiona de cierta manera la posibilidad de una infección inaparente , ya que aún cuando la liberación de virus en los sobrenadantes sea baja en número , se mantiene el tiempo suficiente como para infectar si no es que todas , si a la mayoría de las células vecinas . No es claro , con los datos de inmunofluorescencia , ¿ porqué no son infectadas todas las neuronas por el virus del dengue ? . Una explicación de la diferente susceptibilidad , podría ser que la forma de transmisión fuera de neurona a neurona a través de las sinapsis y no mediada por receptores específicos . La detección del RNA viral del dengue en el cerebro del ratón mediante técnicas de hibridación "in situ" arrojaría datos concluyentes

Comentarios sobre las técnicas .

La determinación del antígeno viral en los órganos de los ratones empleando la técnica de inmunohistoquímica biotina-estreptavidina-peroxidasa dio un tipo de información , valiosa al definir con precisión las células infectadas y el daño cerebral asociado . La técnica de doble fluorocromo mejorada por el empleo de tripsina y detergente , en los cortes de cerebro , identificó "in vivo" al antígeno viral , al neuronal y al astrocitico en forma simultánea .

Por otro lado , los cultivos de células de mosquito que tienen la ventaja de ser mucho más sensibles para detectar al virus del dengue que los cultivos de células de mamífero o la inoculación intracerebral de ratones recién nacidos , proporcionaron información sobre el estado real del virus al denotarlo en forma infectiva .

Debido a que no se realizaron , las técnicas de inmunohistoquímica , con las 3 cepas de virus restantes no pudo establecerse si el antígeno está presente únicamente en los días que se detecta con los cultivos o aparece en más .

Al examinar la infección en los cultivos primarios de células del cerebro de ratón por virus del dengue , estos sistemas de neuronas reducidos han probado nuevamente ser sistemas eficaces para estudiar la especificidad celular hacia el virus.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

En un breve análisis final , hay que comentar que sería muy interesante conocer en que forma los genes virales del virus del dengue , a través de sus proteínas determinan la interacción con las estructuras celulares neuronales , quizá receptores , estableciendo así las bases moleculares de otro aspecto de la enfermedad por este flavivirus .

1. LA INFECCION DE MEDULA ESPINAL SUGIERE A ESTA COMO VIA DE DISEMINACION Y ENTRADA AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL . LA REPLICACION DE LAS 4 CEPAS DE DENGUE EN CEREBRO DEMUESTRA ADEMAS EFECTIVAMENTE UN COMPORTAMIENTO NEUROTROPICO .
2. LA PRESENCIA DEL ANTIGENO Dengue 2 NGC EN NEURONAS DE TODAS LAS ESTRUCTURAS CEREBRALES SUGIERE QUE NO EXISTE UNA SUSCEPTIBILIDAD PARTICULAR A LA INFECCION Y TAMBIÉN QUE PODRIA CORRELACIONARSE CON LA PRESENTACION DE SINTOMATOLOGIA NEUROLÓGICA .
3. EL CARACTER "NEURONOTRÓPICO" DE LAS 4 CEPAS DE VIRUS SE CONFIRMA CON LOS ESTUDIOS "in vitro"
4. APARENTEMENTE NI ASTROCITOS NI MICROGLIA SON SUSCEPTIBLES A LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL DENGUE .
5. LAS LIMITACIONES DE LAS TÉCNICAS NO PERMITEN ESCLARECER EN FORMA DEFINITIVA SI OTROS TIPOS CELULARES SE ENCUENTRAN O NO INFECTADOS .

X. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Westaway,EG.,Brinton,MA.,Gaidamovitch,SY.,Horzinek,MC., Igarashi,A.,Kaariainen,L.,Lvov,DK.,Porterfield,JS., Rusell,PK., and Trent,DW..1985.Flaviviridae . Intervirology 24 : 183-192 .
- 2.- Inouye,S.,Matsuno,S.,Hasegawa,A.,Miyamura,K.,Kono,R., and Rosen,L..1980..Serotyping of dengue viruses by an immune adherence hemagglutination test. Am.J.Trop.Med.Hyg. 29 : 1369-1393 .
- 3.-Kuberski,TT., and Rosen,L..1977. A simple technique for the detection of dengue antigen in mosquitoes by immunofluorescence. Am.J.Trop.Med.Hyg. 26 : 533-537 .
- 4.- Kuberski,TT., and Rosen,L..1977.Identification of dengue viruses using complement fixing antigen produced in mosquitoes .Am J.Trop.Med.hyg. 26 : 538-543 .
- 5.- Gentry,MK.,Henchal,EA.,McCown,JM.,Brandt,E.WE.,and Dalrymple, JM..1982.Identification of distinct antigenic determinants on dengue- 2 virus using monoclonal antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 31 : 548-555 .
- 6.- Henchal,EA.,Gentry,MK.,McCown,JM., and Brandt,WE.. 1982 . Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. Am.J.Trop. Med. Hyg. 31 : 830 -836 .
- 7.- Henchal,EA.,McCown,JM.,Burke,DS.,Seguin,MC., and Brandt,WE.. 1985 . Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies . Am. J. Trop. Med. Hyg. 34 : 162 - 169 .
- 8.- Henchal,EA.,Repik,PM.,McCown,JM., and Brandt,WE.. 1986 . Identification of an antigenic and genetic variant of dengue 4 virus from the Caribbean. Am.J.Trop.Med.Hyg. 35 : 393-400 .

- 9.- Kerschner, JAH., Vorndam, AV., Monath, TP., and Trent, DW..1986. Genetic and epidemiological studies of dengue type 2 virus by hibridization using synthetic deoxyoligonucleotides as probes. *J.Gen.Virol.* 67 : 2645-2661 .
- 10.- World Health Organization . Technical guides for diagnosis , treatment , surveillance , prevention and control of Dengue hemorrhagic Fever . 1975 . WHO.,Geneva.
- 11.- Barnes,WJS.,and Rosen,L..1974 . Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a pacific island. *Am. J. Trop. Med. hyg.* 23 : 495 - 506 .
- 12.- Kimura-Kuroda,J., and Yasui,K.. 1983 . Topographical analysis of antigenic determinants on envelope glycoprotein V3 (E) of Japanese encephalitis virus , using monoclonal antibodies . *J.Virol.*, 45 : 124-132 .
- 13.- Schlesinger, JJ., Brandriss, MW., and Monath, TP..1983. Monoclonal antibodies distinguish between wild and vaccine strains of Yellow fever virus by neutralization , hemagglutination inhibition and immune precipitation of the virus envelope protein., *Virology* 125 : 8-17 .
- 14.- Monath, TP., Cropp, CB., Bowen, GS., and Gardner..1980. Variation in virulence for mice and rhesus mankeys among St.Louis encephalitis strains of different origin. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 29 : 948-962 .
- 15.- Trent, DW., Grant, JA., Rosen, L., and Monath, TP.. 1983. Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology* 128 : 271-284 .
- 16.- Monath, T.P., Wands, JR., Hill, L.J., Brown, NV., Marciniak, RA., Wong, MA., Gentry, MK., Grant, JA., and Trent, DW ..1986. Geographic classification of dengue-2 virus strains by antigen signature analysis . *Virology* 154 : 313-324 .
- 17.- Halstead, SB..1980. Immunopathological parameters of togavirus disease syndromes ; in *The Togaviruses : Biology , Structure*

- Replication , (RW.Schlesinger , eds.) , pp 107 - 174 ,
Academic Press , New York .
- 18.- Halstead, SB., Porterfield, JS., and O'Rourke, EJ.. 1980 .
Enhancement of dengue virus infection in monocytes by
flavivirus antisera. Am.J.Trop.Med. Hyg. 29 : 638-642 .
- 18.- Lopez-Correa,RH.,Cline,BL.,Ramirez-Ronda,C.,Bermudez,R.,
Sather,GE., and Kuno,G..1978 . Dengue fever with hemorrhagic
manifestations : A report of three cases from Puerto Rico .
Am. J. Trop. Med. Hyg. 27 : 1216 - 1224 .
- 20.- Guzman,MG.,Kouri,G.,Morier,L.,Soler,M., and Fernandez , A..
1984 . Casos mortales de dengue hemorragico en Cuba , 1981 .
Bull Pan Am Health Org 97 : 111-117 .
- 21.- Kouri,GP.,Guzman,MG., and Bravo,JR.. 1987 . Why dengue
haemorrhagic fever in cuba ? II. An integral analysis.Trans
R Soc Trop Med Hyg 81 (5) : 821-3 .
- 22.- Schatzmayer,HG.,Nogueira,RM., and Travassos Da Rosa,AP..
1966 . An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro.
Mem.Inst.Oswaldo Cruz. 81 : 245-246 .
- 22b.-Pinheiro,FP., 1989 . El dengue en las Américas , 1980-1987 .
Boletin epidemiológico . Organizacion Panamericana de la
salud . 10 (1) : 1-8 .
- 23.- Kaplan,JE.,Eliason,DA.,Sather,GE.,Schonberger,LB.,Cabrera-
Coello,L.,and Fernandez de Castro,J..1983. Epidemiologic
investigations of dengue infection in Mexico,1980. Am. J.
Epidemiology 117 : 335-343 .
- 24.- Dantes,HG.; Koopman,JS., Addy,CL., Zarate,ML., Marin,MA.,
Longini,Jr,IM., Gutierrez,ES., Rodriguez,VA., Garcia,LG.,
Mirelles,ER.. 1986. Epidemias de dengue en la costa del
Pacifico.Mexico-1984. Bol. Mensual Epidemiologia.1(2) : 6-11.
- 25.- Dantes,HG., Koopman,JS., Addy,CL., Zarate,ML., Marin,MA.,
Longini, Jr,IM., Gutierrez,ES., Rodriguez,VA., Garcia,LG.,
Mirelles,ER..1988. Dengue epidemics on the Pacific coast of

- Mexico . *Int J Epidemiol* 17(1) : 173-86 .
- 26.- Vezza,AC., Rosen,L., Repik,P., Dalrymple,J., and Bishop,DHL.. 1980. Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. *Am.J.Trop. Med. Hyg.* 29 : 643-652 .
 - 27.- Yaegashi,T.,Vakharia,VN.,Page,K.,Sasaguri,Y.,Feighny,R.,and Padmanabhan,R.. 1986. Partial sequence analysis of cloned dengue virus type 2 genome. *Gene.* 46 : 257-267 .
 - 28.- Westaway,EG.. 1977 . Strategy of the flavivirus genome : Evidence for multiple internal initiation of translation of proteins specified by Kunjin virus in mammalian cells . *Virology.* 80 : 320-335 .
 - 29.- Westaway,EG.. 1980 . Replication of flaviviruses , in : *The Togaviruses* (R.W.Schlesinger , ed.) , pp 531-581 , Academic Press , New York .
 - 30.- Blok,J.,Henchal,EA.,and Gorman,BM..1984.Comparison of dengue viruses and some other flaviviruses by cDNA- RNA hybridization analysis and detection of a close relationship between dengue virus serotype 2 and Edge Hill virus. *J. gen. virol.* 65 : 2173-2181 .
 - 31.- Blok,J..1985. Genetic relationships of the dengue virus serotypes. *J. gen. virol.* 66: 1323-1325 .
 - 32.- Blok,J.,Kay,BH.,Hall,RA.,Gorman,BM..1986. Isolation and characterization of dengue viruses serotype 1 from an epidemic in northern Queensland , Australia . *Arch Virol* 100(3-4) : 213-20 .
 - 33.- Mason,PW., McAda,PC., Mason,TL., and Fournier,MJ.. 1987 . Sequence of the dengue-1 virus genome in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural protein NS1. *Virology.* 161 : 262-267 .
 - 34.- Deubel,V., Kinney,RM., Trent,DW.. 1988 . Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus , Jamaica genotype : comparative

- analysis of the full-length genome . *Virology* 165(1) : 234-44
- 35.- Gruenberg,A., Woo,WS., Biedrzycka,A., Wright,PJ.. 1986 . Partial nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the structural proteins of dengue virus type 2 New Guinea C and PU0-218 strains . *J Gen Virol* 69(6) : 1391-8 .
- 36.- Walker,PJ., Henchal,EA., Blok,J., Repik,PM., Henchal,LS., Burke,DS., Robbins,SJ., and Gorman,BM.. 1988. Variation in dengue type 2 viruses isolated in Bangkok during 1988 . *J Gen Virol* 69(3) : 591-602 .
- 37.- Hahn,YS., Galler,R., Hunkapiller,T., Dalrymple,JM., Strauss,JH., and Strauss,EG.. 1988 . Nucleotide sequence of dengue 2 RNA and comparison of the encoded proteins with those of other flavivirus . *Virology* 162(1) : 187-196 .
- 38.- Zhao,B., Mackow,E., Buckler-White,A., Markoff,L., Chanock,RM., Lai,C-J., and Makino,Y.. 1986 . Cloning full - length dengue type 4 viral DNA sequences : analysis of genes coding for structural proteins . *Virology* 155 : 77 - 88 .
- 39.- Mackow,E., Makino,Y., Zhao,B., Zhang,YM., Markoff,L., Buckler-White,A., Guiler,M., Chanock,R., and Lai,CJ.. 1987 . The nucleotide sequence of dengue type 4 virus:Analysis of genes coding for Nonstructural proteins. *Virology* . 159 : 217-228 .
- 40.- Smith,GW., and Wright,PJ.. 1985 . Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus- infected Vero and *Aedes albopictus* cells . *J. gen. virol.* 66 : 559-571 .
- 41.- Kaufman,BM., Summers,PL., Dubois,DF., and Eckels,KH.. 1987 . Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection . *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36(2) : 427-434 .
- 42.- Putnak,JR., Charles,PC., Padmanabhan,R., Irie,K., Hoke,CH., Burke,DS.. 1988 . Functional and antigenic domains of the dengue-2 virus nonstructural glycoprotein NS-1 .

- Virology 163(1) : 93-103 .
- 43.- Winkler,G., Randolph,WB., Cleaves,GR., Ryan,TE., Stollar,V.. 1988 . Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer . Virology 162(1) : 187-96 .
- 44.- Henchal,EA., Henchal,ES., Schlesinger,JJ.. 1988 . Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus . J Gen Virol 69(8) : 2101-2107 .
- 45.- Brandt,WE.. 1988 . From the World Health Organization . Current approaches to the development of dengue vaccines and related aspects of the molecular biology of flavivirus . J Infect Dis 157(5) : 1105-11 .
- 46.- Deubel,V., Kinney,RM., Esposito,JJ., Cropp,CB., Vorndam,AV., Monath,TP., Trent,DW.. 1988 . Dengue 2 virus envelope protein expressed by a recombinant vaccinia virus fails to protect monkeys against dengue . J Gen Virol 69(8) : 1921-9 .
- 47.- Schlesinger,JJ., Brandriss,MW., and Walsh,EE.. 1985 . Protection against 17d-yellow fever encephalitis in mice by passive transfer of monoclonal antibodies to the nonstructural glycoprotein gp48 and by active immunization with gp48. J Immunol 135 : 2805-2809 .
- 48.- Schlesinger,JJ., Brandriss,MW., and Walsh,EE.. 1987. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus Non-structural glycoprotein NS1 . J Gen Virol 68 : 853-857 .
- 49.- Zhang,YM., Hayes,EP., McCarty,TC., Dubois,DR., Summers,PL., Eckels,KH., Chanock,RM., and Lai,CJ.. 1988 . Immunization of mice with dengue structural proteins and nonstructural protein NS1 expressed by baculovirus recombinant induces resistance to dengue virus encephalitis. J Virol 62(8):3027-31

- 50.- Cardiff,RD., Russ,SB., Brandt,WE., and Rusell,FK.. 1973 .
Cytological localization of dengue-2 antigens : an
immunological study with ultrastructural correlation.
Infection and Immunity 7(5) : 809-816 .
- 51.- Cardiff,RD., and Lund,JK.. 1976 . Distribution of dengue-2
antigens by electron immunocytochemistry . Infection and
Immunity . 3(6) : 1699-1709 .
- 52.- The Togaviridae and Flaviviridae. Edited by S.Schlesinger
and MJ.Schlesinger . Plenum Press , New York and London .,
Brinton,MA.. 1986 . Replication of Flavivirus . Chapter 11
pp 327-374 .
- 53.- Gubler,DJ., and Rosen,L.. 1976 . A simple technique for
demonstrating transmission of dengue virus by mosquitoes
without the use of vertebrate hosts . Am J Trop Med Hyg
25 : 146 - 150 .
- 54.- Khin,MM., and Than,KA.. 1983 . Transovarial transmission of
dengue 2 virus by Aedes aegypti in nature. Am J Trop Med
Hyg . 32 : 590-594 .
- 55.- Freier,JE., and Rosen,L.. 1988 . Vertical transmission of
dengue viruses by Aedes mediocvittatus . Am J Trop Med Hyg
39(2) : 218-22 .
- 56.- Gubler,DJ.,Nalin,S.,Tan,R.,Saipan,H., and Saroso,SJ.. 1979 .
Variation in susceptibility to oral infection with dengue
viruses among geographic strains. of Aedes aegypti . Am J
Trop Med Hyg . 28 : 1045-1052 .
- 57.- Hafkin,B., Kaplan,JE., Reed,C., Elliott,LR., Fontaine,R.,
Sather,GE and Kappos,K.. 1982 . Reintroduction of dengue
fever into the continental United States .I . Dengue
surveillance in Texas , 1980 . Am J Trop Med Hyg . 31 : 1222
1226 .
- 58.- Malison,MD., and Waterman,SH.. 1983 . Dengue fever in the
United States . A report of a cluster of imported cases and

- review of the clinical , epidemiologic , and public health aspects of the disease . JAMA 249 : 496 - 500 .
- 59.- The Togaviridae and Flaviviridae . Edited by S.Schlesinger and MJ.Schlesinger . Plenum Press , New York and London . Monath,TP.. 1986 . Pathobiology of the Flavivirus . Chapter 12 pp : 375-440 .
- 60.- Nathanson,N.. 1980 . Pathogenesis in St.Louis Encephalitis . (TP , Monath , ed) , American Public Health Association , Washington , D.C. pp 201-236 .
- 61.- Marchette,NJ., Halstead,SB., Falkler,Jr,WA., Stenhouse,A., and Nash,D.. 1973 . Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys .III . Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections . J Infect Dis . 128(1) : 23-30 .
- 62.- Bhamarapravati,N., Halstead,SB., Sookavachana,P., and Boonypaknavik,V.. 1964 . Studies on dengue virus infection I . Immunofluorescent localization of virus in mouse tissue . Archives of Pathology 77 : 538-543 .
- 63.- Boonpucknavig,V., Bhamarapravati,N., Boonpucknavig,S., Futradul,P., and Tanpaichitr,P.. 1976 . Glomerular changes in dengue hemorrhagic fever . Arch Pathol Lab Med .100 : 206-12.
- 64.- Boonpucknavig,S., Bhamarapravati,N., Nimmannitya,S., Phalavadhlana,A., and Siripont,J.. 1976 . Immunofluorescent staining of the surface of lymphocytes in suspension from patients with dengue hemorrhagic fever . Am J Path . 85 : 37-47 .
- 65.- Boonpucknavig,S., Boonpucknavig,V., Bhamarapravati,N., Nimmannitya,S.. 1979 . Immunofluorescence study of skin rash in patients with dengue hemorrhagic fever . Arch Pathol Lab Med . 103 : 463-466 .
- 66.- Boonpucknavig,S., Lohachitranond,C., and Nimmannitya,S..1979. The pattern and nature of the lymphocyte population response

- in dengue hemorrhagic fever . Am J Trop Med Hyg . 28 : 885-889 .
- 67.- Boonpucknavig,S., Vettiviroj,O., and Boonpucknavig,V.. 1981 . Infection of young adult mice with dengue virus type 2 . Trans Roy Soc Trop Med Hyg . 75 : 647-653 .
- 68.- Hotta,H., Murakami,I., Miyasaki,K., Takeda,Y., Shirane,H., and Hotta,S.. 1981 . Inoculation of dengue virus into nude mice . J Gen Virol . 52 :71-76 .
- 69.- Lam,KW., Burke,DS., Siemens,M., Cipperly,V., Li,C.Y., and Yam,LT.. 1982 . Characterization of serum acid phosphatase associated with dengue hemorrhagic fever . Clin Chem 28 : 2296-2299 .
- 70.- Dasaneyavaja,A., and Charansri,U.. 1961 . Bangkok , "First known isolation of a dengue virus from other human source than blood . " SEATO Med Res Monogr . No.2 .
- 71.- Nelson,ER., Bierman,HR., and Chulajata,R.. 1964 . Hematologic findings in the 1960 hemorrhagic fever epidemic (dengue) in Thailand . Am J Trop Med Hyg . 13 : 642-649 .
- 72.- Sumarmo,WH., Jahja,E., Gubler,DJ., Suharyono,N., and Sorensen,K. 1983 . Clinical observations on virologically confirmed fatal dengue infections in Jakarta , Indonesia . Bull . WHO . 61 : 693-701 .
- 73.- Yoksan,S., and Bhamarapravati,N.. 1984 . "Localization of dengue antigens in tissue specimens from fatal cases of dengue haemorrhagic fever ." in Proceedings of International Conference on DHF (University of Malaya , Kuala Lumpur) .
- 74.- Scott,RMcN., Nisalak,A., Cheamudon,U., Seridhoranankul,S., and Nimmannitya,S.. 1980 . Isolation of dengue virus from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever . J Infect Dis . 141 : 1-6
- 75.- Bhamarapravati,N., and Boonyapaknavig,V., 1966 . Immunofluorescent study of dengue virus in human cases .

Bull.WHO 35:50-55 .

- 76.- Brandt,WE., Cardiff,RD., and Russell,FK.. 1970 . Dengue virions and antigens in brain and serum of infected mice .
J Virol 6(4) : 500-506 .
- 77.- Johnson,RT.. 1980 . Selective vulnerability of neural cells to viral infections . Brain 103 : 447-472 .
- 78.- Fontana,A., Fierz,W., and Wekerle,H.. 1984 . Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines
Nature 307 : 273-276 .
- 79.- Goriatas,KN., Greene,MI., and Waksman,BH.. 1986 . Genetic and molecular aspects of demyelination . Immunology Today 7(5) : 121-126 .
- 80.- Graves,MC., Bologna,L.Siegel., and Londe,H.. 1986 . Theiler's virus in brain cell cultures : lysis of neurons and oligodendrocytes and persistence in astrocytes and macrophages . J Neuroscience Res 15 : 491-501 .
- 81.- Lipton,H.. 1975 . Theiler's virus infection in mice : an unusual biphasic disease process leading to demyelination . Infect Immunol 11 : 1147-1155 .
- 82.- Massa,PT., Dorries,R., and Meulen,ter V.. 1986 . Viral particles induce Ia antigen expression on astrocytes . Nature 320 : 543-546 .
- 83.- Massa,PT., Brinkmann,R., and Meulen,ter V.. 1987 . Inducibility of Ia antigen on astrocytes by murine Coronavirus JHM is rat strain dependent.J Exp Med 166:259-264
- 84.- Suzumura,A., Eliud,L., Weiss,SR., Silberberg,DH.. 1986 . Coronavirus infection induces H-2 antigen expression on oligodendrocytes and astrocytes . Science 232 : 991-993 .
- 85.- Baringer,JR.. 1975 . Herpes simplex virus infection of nervous tissue in animals and man . Prog Med Virol 20 : 1-5 .
- 86.- Monath,TP., Cropp,BC., and Harrison,AK.. 1983 . Mode of entry of a neurotropic Arbovirus into the Central Nervous System .

- Reinvestigation of an old controversy . Laboratory investigation . 48(4) : 399-409 .
- 87.- Karabatsos,N..(Editor) , 1985 , International Catalogue of Arboviruses . Publicado por : The subcommittee on information, Exchange of the American Committee on Arthropod-borne viruses y por la American Society of Tropical Medicine and Hygiene . pp 361-368 Third Ed .
- 88.- Craighead,JE., Sather,GE., Hammon,WM., and Danmin,GJ.. 1966 . Pathology of dengue virus infection in mice . Arch Pathol 81 : 232-239 .
- 89.- Fresh,JW., Reyes,V., Clarke,EJ., and Uylango,CV.. 1969 . Philippine hemorrhagic fever : A clinical , laboratory , and necropsy study . L Lab & Clin Med . Marzo 73(3) : 451-458 .
- 90.- Cole,GA., y cols. 1969 . Pathogenesis of type 1 dengue virus infection in suckling, weanling and adult mice. Am.J. Epidem. 89: 669-774 .
- 91.- Sriurairatna,S., Bhamarapravati,N., and Phalavachitana,O.. 1973 . Dengue virus infection of mice : morphology and morphogenesis of dengue type-2 virus in suckling mouse neurones . Infection and Immunity 8(6) : 1017-1028 .
- 92.- Sarkar,JR., Mendal,A., Chakravanty,SK., Chatterjee,S., Pal,SR.. 1969 . Isolation of dengue virus from the blood of a clinical case of encephalitis . Indian J Med Res 57 : 1616-1620 .
- 93.- Sumarmo,WH., Wulur,H., Jahja,E., Gubler,DJ., Sutomenggolo,TS., and Saroso,JS.. 1978 . Encephalopathy associated with dengue infection . Lancet February 25 : 449-450 .
- 94.- Acevedo,J., Casanova,MF., Antonini,AC., and Morales,H.. 1962. Acute polyneuritis associated with dengue . Lancet 1 : 1357 .
- 95.- Rodriguez,JJ., Singh,PB., Agarwal,S., Singh,MP.. 1962 . Dengue fever associated with encephalitis and myocarditis . J Assoc Phys Ind 30 : 414-415 .

- 96.--Gubler,DJ., Kuno,G., and Waterman,S.. 1983 . Neurological disorders associated with dengue infection . in : Proceedings of the International Conference on Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever (T . Pang and R . Pathmanathan , eds.) ,pp 290-306 . University of Malaya , Kuala Lumpur .
- 97.- Kho,LK., Sumarmo,WH., Jahja,EC., Gubler,IJ.. 1981 . Dengue hemorrhagic fever accompanied by encephalopathy in Jakarta , Indonesia . South east Asia . J Trop Med Publ Health 12 : 83-86 .
- 98.- Fraser,HS., Wilson,WA., Rose,E., Thomas,EJ., and Sissons,JGP.. 1978 . Dengue fever in Jamaica with shock and hypocomplementaemia , hemorrhagic , visceral and neurological complications . West Indian Med J . 27 : 106-116 .
- 99.- Terry,SI., Golden,MH., Hanchord,B., and Bain,B.. 1980 . Adult Reye's Syndrome after Dengue . Gut 21 : 436-438 .
- 100.-Estrada,GJR., Goyenechea,A., Herrera,C.. 1981 . Brote de polirradiculoneuritis aguda tipo Landry-Guillain-Barre-Strohl durante una epidemia de dengue . Rev Cub Hig Epid 19 : 252-265 .
- 101.-Halstead,SB.. 1988 . Pathogenesis of dengue : Challenges to molecular biology . Science 239(4839) : 476-81 .
- 102.-Greene,MI., Kokai,Y., Gaulton,GN., Powell,ME., Geller,H., and Cohen,JA.. 1987 . Receptor systems in tissues of the nervous system . Immunological Review 100 :
- 103.-Dalgleish,AG., Beverly,FCL., Clapham,PR., Crawford,DH., Greaves,MF., and Weiss,RA.. 1984 . The CD4(T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus . Nature 312 : 763-767 .
- 104.-Fields,BN., and Greene,MI.. 1982 . Genetic and molecular mechanisms of viral pathogenesis : implications for prevention and treatment . Nature 300 : 19-23 .

- 105.-Ventimiglia,R.,Greene,MI., and Geller,HM.. 1967 .
Localization of beta adrenergic receptors on differentiated cells of the central nervous system in culture . Proc Natl Acad Sci USA 84 : 5073-5077 .
- 106.-Pavri,KM., Sheikh,BH., Ghosh,SN., and Chodankar,VP.. 1977 .
Immunoglobulin E in sera of patients of dengue haemorrhagic fever (DHF) . Indian J Med Res 66(4) : 537-543 .
- 107.-Chaturvedi,UC., Tandon,P., and Mathur,A.. 1977 . Effect of immunosuppression on dengue virus infection in mice .
J Gen Virol . 36 : 449 -457 .
- 108.-Chaturvedi,UC., Tandon,P., Mathur,A., and Kumar,A.. 1978 .
Host defense mechanisms against dengue virus infection of mice . J Gen Virol . 39 : 293-302 .
- 109.-Kurane,I.,Hoblewaite,D., Brandt,WE., and Ennis,FA.. 1984 .
Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell - mediated cytotoxicity . J Virol . 52 : 223-230 .
- 110.-Pang,T., Devi,S., Blanden,RV., Lam,SK.. 1986 .
T cell-mediated cytotoxicity against dengue infected target cells . Microbiol Immunol 32(5) : 511-8 .
- 111.-Kurane,I., Meager,A., and Ennis,FA.. 1986 . Induction of interferon alpha and gamma from human lymphocytes by dengue virus-infected cells . J Gen Virol . 67 : 1653-1661 .
- 112.-Kurane,I., Ennis,FA.. 1986 . Production of interferon alpha by dengue virus-infected human monocytes . J Gen Virol 69(2) : 445-449 .
- 113.-Kontny,U., Kurane,I., and Ennis,FA.. 1988 . Gamma interferon augments Fc gamma receptor-mediated dengue virus infection of human monocytic cells . J Virol . 62(11) : 3928-33 .
- 114.-Reed,LV., and Muench,H.. 1938 . A simple method of estimating fifty per cent end points . Am J Hygiene . 27 : 439-457 .
- 115.-DDLPA : a manual , 1981 , Dengue Diagnostic Laboratory Procedures for the Americas : A Manual ., Center for

Infectious Diseases , San Juan Laboratories . , San Juan,
Puerto Rico 00936 .

- 116.-Buckland, RM.. 1966 . Strong signals from streptavidin-biotin.
Nature 320 : 557-558 .
- 117.-Shi, ZR., Itzkowitz, SH and Kim, YS.. 1968 . A comparison of
three immunoperoxidase techniques for antigen detection in
colorectal carcinoma tissues . J Histochemistry Cytochemistry
36(3) : 317-322 .
- 118.-Finley, JCW., and Petrusz, P., 1962 .The use of proteolytic
enzymes for improved localization of tissue antigens with
immunocytochemistry . Techniques in immunocytochemistry
volumenes 1 2 : 239-249 . Editado por Bullock , GR., and
Petrusz, P., Academic Press .
- 119.-Himmelhoch, RS., 1971 . Chromatography of proteins on Ion-
Exchange adsorbents . Methods in Emzymology . Academic
Press . XXII : 273-286 .
- 120.-Sotelo, J., Gibbs, C., Gajdusek, DC., Toh, BH., and Wurth, M..
1980 . Method for preparing cultures of central neurons ;
cytochemical and immunochemical studies . Proc Natl Acad Sci
(USA) 77 : 653-657 .
- 121.-Ken D. Mc Carty and J. De Vellis.. 1980 . Preparation of
separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from
rat cerebral tissue . J Cell Biology 85 : 890-902 .
- 122.-Clarke, D.H., and Casals, J.. 1958 . Techniques for
hemagglutination and hemagglutination inhibition with
- Arthropod-borne viruses . Am J Trop Med Hyg . 7 : 561-573 .
- 123.-Schlesinger, RW.. 1977 . "The Dengue viruses" .Virology
Monographs , Vol 16. Springer-Verlag, Vienna and New York .
- 124.-Rayne, CS., and Fields, BN.. 1973 . Ultrastructural features of
Reovirus type 3 encephalitis . J Neuropathol Exp Neurol
32 : 19 - 33 .
- 125.-Hdy, DB., Rubin, DH., and Fields, BN.. 1962 . Molecular basis

- of Reovirus neurovirulence : role of the M2 gene in avirulence . Proc Natl Acad Sci (USA) 79 :1298-1302 .
- 126.-Kilham,L., and Margolis,G.. 1969 . Hydrocephalus in hamsters ferrets , rats and mice following inoculation with Reovirus type 1 . Lab Invest 21 : 183 .
- 127.-Fontana,A., Frei,K., Bodmer,S., and Hofer,E.. 1987 . Immune - mediated encephalitis : On the role of antigen - presenting cells in brain tissue . Immunological Review 100 : 185-201 .
- 128.-Perry,VH., Hume,DA., and Gordon,S.. 1985 .Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain . Neuroscience 15 : 313-326 .
- 129.-Suri,NK., & Banerjee,K.. 1987 . Growth characteristics of Japanese encephalitis , West Nile & DEN-2 viruses in embryonic mouse brain cell cultures . Indian J Med Res 86 : 148-161 .