

Tesis de Posgrado

Influencia de factores biológicamente activos sobre células en cultivo : Efectos de la infección viral sobre la fibronectina pericelular

Castagnino, Carlos Gustavo

1989

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Castagnino, Carlos Gustavo. (1989). Influencia de factores biológicamente activos sobre células en cultivo : Efectos de la infección viral sobre la fibronectina pericelular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2249_Castagnino.pdf

Cita tipo Chicago:

Castagnino, Carlos Gustavo. "Influencia de factores biológicamente activos sobre células en cultivo : Efectos de la infección viral sobre la fibronectina pericelular". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2249_Castagnino.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

TESIS
2249
ej.2

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

"Influencia de factores biológicamente activos sobre
células en cultivo: efectos de la infección viral
sobre la fibronectina pericelular"

Autor: Licenciado Carlos Gustavo Castagnino

Directora: Prof.Dra. María Isabel Berría

Lugar de trabajo: Departamento de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad de Buenos Aires

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas

1 9 8 9

- 2249 -
ej. 2

A mis padres.

Agradecimientos:

A la Dra. María I. Berría, por su constante estímulo y apoyo, desde mis comienzos en la tarea científica.

Al Dr. Eduardo F. Lascano, por su permanente ejemplo de rigurosidad y dedicación.

A Rubén F. Iacono, por su valiosa y afectuosa colaboración.

A la Sra. Perla Alvarez, por su ayuda en el tipeado del manuscrito.

A Rosa Bacardit, por muchas razones, sin las cuales esta Tesis no hubiese sido posible.

INDICE

1. INTRODUCCION	6
1.1. Las matrices extracelulares.....	6
1.2. Fibronectina: estructura, funciones e importancia de su estudio.....	8
1.3. Células fibroblásticas.....	13
1.4. Células astrogliales.....	14
1.5. Efectos virales sobre la ME.....	16
1.6. Virus Herpes simplex.....	17
1.7. Virus Junín.....	19
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIALES Y METODOS	23
3.1. Cultivos celulares.....	23
3.2. Tinción inmunoenzimática	24
3.3. Infección viral	27
4. RESULTADOS	29
4.1. Inmunomarcación de FN en cultivos fibroblásticos.	29
4.2. Inmunomarcación de FN en cultivos astrocitarios..	33
4.3. Inmunomarcación simultánea de FN y GFAP en culti- vos astrocitarios	37
4.4. Detección de virus infectivo y antígenos virales en cultivos fibroblásticos y astrocitarios infec- tados con HSV-1	41
4.5. Inmunomarcación simultánea de Ag-HSV-1 y FN en cultivos fibroblásticos y astrocitarios	48
4.6. Detección de virus infectivo y antígenos virales en cultivos fibroblásticos y astrocitarios infec- tados con VJ	55
4.7. Inmunomarcación simultánea de Ag-VJ y FN en cul- tivos fibroblásticos y astrocitarios	61
5. DISCUSION	65
5.1. Inmunomarcación de FN en cultivos fibroblásticos.	66

5.2. La FN en cultivos de células astrocitarias	67
5.3. Acción citopatogénica del HSV-1 sobre cultivos fibroblásticos y astrocitarios	69
5.4. Efectos de la infección por HSV-1 sobre la FN pericelular	70
5.5. Acción citopatogénica del VJ sobre cultivos fibro- blásticos y astrocitarios	73
5.6. Efectos de la infección por VJ sobre la FN peri- celular	74
6. CONCLUSIONES	75
7. BIBLIOGRAFIA	77

1. INTRODUCCION

1.1. Las matrices extracelulares

Durante centenares de millones de años, las células procariontas en primer término, y las eucariotas luego, permanecieron aisladas, y recién hace 600 a 700 millones de años aparecieron las primeras asociaciones estables de células eucariotas, gracias a la producción de una matriz extracelular. Son estas matrices las que permiten la integración de las células en tejidos, de los tejidos en órganos y de estos en organismos. Las matrices son secretadas por las células y establecen con ellas una interacción activa y compleja. Las heterogéneas moléculas que las forman regulan el comportamiento e influyen en la diferenciación, proliferación, forma y funciones metabólicas de la célula.

El enorme avance obtenido en el conocimiento de las matrices extracelulares (ME) se ha debido, en parte, a la demostración gradual de que casi todos los aspectos referentes al estudio de estas matrices pueden ser analizados a nivel celular. Una gran proporción de los trabajos encontrados en la literatura han incluido el uso de cultivos celulares. Sin embargo, es arriesgado afirmar que la matriz objeto de estudio sea similar a la encontrada in vivo. ¿Por qué, entonces, el interés de estudiarlas en sistemas in vitro?.

En el final de la década de 1960 se tenía noción de que los componentes de las matrices eran producidos por células diferenciadas específicas.

En el comienzo de los '70 quedó claro que pequeñas cantidades de las mismas clases de materiales eran producidas por una amplia variedad de tipos celulares.

Otro importante aporte fue el descubrimiento de que los mis-

mos componentes están presentes tanto alrededor de las células individuales como en los grandes dominios acelulares del tejido conectivo. Durante este período se caracterizó fisicoquímicamente a algunos componentes particulares de la ME.

Además, numerosos estudios sugirieron que el dominio pericelular de células individuales incluía materiales de gran heterogeneidad en cuanto a composición y características físicas. Se comenzaba a visualizar que cada célula estaba rodeada por una estructura gelatinosa, enmarañada y dinámica, que podía tamizar, seleccionar, almacenar, repeler, atraer y aún modificar los materiales que entraban a, o salían de la célula.

Por otra parte, la ME sobre la que las células se asientan es una extensión de las mismas y participante activa en la regulación de la función celular: la ME es una entidad informacional, en el sentido que recibe, imparte e integra señales estructurales y funcionales.

La diferenciación funcional inducida por las ME es mediada, en algunos tipos celulares, por cambios en la forma de la célula: la estructura es en gran parte el mensaje requerido para mantener la expresión génica diferenciada (7, 102). La unidad funcional incluye a la célula más la ME, y en un contexto más amplio, la unidad es el órgano entero.

El modelo de la reciprocidad dinámica (3), basado en los fenómenos precedentemente descriptos, postula que la ME ejerce una influencia sobre la expresión génica vía proteínas de membrana y componentes del citoesqueleto. A su vez, la asociación con polirribosomas afecta la estabilidad de los ARNm y la velocidad de síntesis proteica, mientras que su interacción con la matriz nuclear puede afectar el procesamiento de los ARNm y, posiblemente, las tasas de transcripción.

Las cuatro familias de macromoléculas que integran la base

de la ME están constituidas por: glicoproteínas estructurales, colágenos, elastina y proteoglicanos.

Las glicoproteínas estructurales son las que principalmente median las interacciones de la célula con su entorno, y son sintetizadas por las células del mésoquima y ciertos tipos de células epiteliales. Han aparecido muy tempranamente en el curso de la filogenia, hallándose en metazoarios primitivos como las esponjas. (57)

Los primeros aislamientos y caracterizaciones de glicoproteínas estructurales se remontan a la década del 60, y luego de un período de desconocimiento relativo, el progreso mayor se logró en los últimos años, en particular gracias al descubrimiento de formas solubles en plasma de macromoléculas tales como FN, condronectina y vitronectina, o de productos solubles en las secreciones de ciertos tumores transplantables de ratón, para el caso de laminina y nidógeno.

Esta familia de glicoproteínas está integrada en una enumeración que no llega a ser exhaustiva, por: fibronectina (FN), laminina (LN), condronectina, hialuronectina, entactina, factor de Von-Willebrand, vitronectina, osteonectina, mesonectina, nidógeno, trombospondina, elastonectina.

De todas ellas, la mejor estudiada es, sin lugar a dudas, la FN.

1.2. Fibronectina: estructura, funciones e importancia de su estudio

En 1973, se descubrió la presencia de una proteína de alto peso molecular en la superficie de fibroblastos normales en cultivo (47). Esta proteína, denominada posteriormente fibronectina (fibros: fibra, nectere: unir) era secretada por los fibroblastos al medio de cultivo, y resultó ser inmunológicamente idéntica

tica a una proteína plasmática conocida desde 1948, llamada entonces globulina insoluble en frío (CIg), por su tendencia a precipitar con el criofibrinógeno. Su estudio se intensificó cuando se tuvo conocimiento de que fibroblastos transformados carecían de FN en sus superficies (47).

Las FNs son glicoproteínas implicadas en una gran variedad de procesos, particularmente aquellos relacionados con las interacciones de las células con las ME (49,43,85). Estos procesos incluyen adhesividad, morfología, organización del citoesqueleto, migración, diferenciación, transformación oncogénica, fagocitosis y hemostasis.

Durante los últimos 15 años, las investigaciones llevadas a cabo en muchos laboratorios han analizado la expresión, estructura y funciones de la FN, así como de sus receptores de la superficie celular. Estos estudios han revelado que la FN tiene una compleja estructura molecular, la que consiste en varios dominios específicos (89) con propiedades de unión a diversas moléculas del ambiente pericelular. Los complejos fenómenos en que participa la FN pueden ser considerados en función de esta estructura.

Las moléculas individuales de FN son dímeros (53) constituidos por polipéptidos similares pero no idénticos.

Se han distinguido dos formas principales de FN (36): una forma dimérica, soluble, presente en el plasma y otros fluidos corporales, que es sintetizada -en el organismo- principalmente por hepatocitos (FN plasmática); y una forma dimérica o multimérica por entrecruzamiento y sintetizada por muchos tipos celulares, que luego de su secreción es depositada como largas fibrillas insolubles en la ME (FN celular).

Existen diferencias en la estructura primaria no sólo entre

las FNs plasmática y celular, sino también entre subunidades de cada tipo.(50)

Independientemente de su heterogeneidad, todas las subunidades de FN muestran una organización modular común en su estructura primaria, que contiene una serie de unidades repetitivas homólogas, llamadas de homología I , II y III. Además de estas similitudes estructurales, los diferentes tipos de subunidades de FN comparten propiedades funcionales comunes, que corresponden a dominios para unirse a otras moléculas de la matriz o de la superficie celular. Cada subunidad tiene dos sitios de unión para heparina, dos para fibrina, uno para colágenos y uno o más para unirse a receptores celulares. El sitio de unión a las células común a todas las FNs incluye la secuencia Arg-Gly- Asp-Ser, que es compartida con otras moléculas matriciales.

A pesar de la existencia de múltiples formas de FN, existe una sola copia del gen de FN en los genomas de rata y hombre. Este gen tiene unas 75 kB de base de largo, contiene alrededor de 50 exones y es transcrito a partir de un solo promotor en un transcripto primario único, el que da lugar a los diferentes mensajeros de FN a través de un complejo patrón de empalmes alternativos que ocurren entre regiones diferentes.(50,34)

La molécula tiene 2477 aminoácidos en el producto primario de traducción. Los métodos de biología molecular han sido muy útiles para determinar las secuencias responsables de la unión específica a otras moléculas, así como en el aislamiento y caracterización de los receptores de la superficie celular para FN. La misma secuencia ha sido hallada en otras proteínas adhesivas como vitronectina, trombospondina, factor de Von Willebrand y colágenos. Todas estas moléculas interactúan con la célula a través de diferentes receptores que, sin embargo, com-

parten propiedades comunes. Estos receptores han sido agrupados con el nombre de integrinas (9,64,40,75). Estas están constituidas por subunidades unidas no covalentemente (alfa y beta) que son proteínas integrales. La familia ha sido tentativamente dividida en 3 grupos, cada uno con una cadena beta común y diferentes cadenas alfa. Estas últimas están determinadas por la naturaleza del ligando o por el tipo celular que le da origen. Aunque se requieren ambas subunidades para la unión a las moléculas matriciales, serían las beta las que participan en el reconocimiento de la secuencia Arg-Gly-Asp-Ser y están muy conservadas en la evolución (70), mientras que las alfa determinarían la especificidad de la unión a cada tipo particular de molécula adhesiva.

En mamíferos, la síntesis de FN ya se observa desde el estadio de 16 células. Poco tiempo después se la encuentra asociada a movimientos morfogénéticos. Luego de la gastrulación, la FN está ampliamente distribuida en casi todos los espacios extracelulares, incluidas las membranas basales de los epitelios y la ME del tejido conectivo. Aunque es ubicua en el embrión, se ha correlacionado su presencia a la ocurrencia de migraciones celulares (22,23,96), siendo particularmente evidente en la migración de las células de las crestas neurales (96) y las células germinales primordiales (2), así como en la invasión del timo por precursores linfoides en el embrión de aves (23). La cesación de los movimientos coincide, generalmente, con la desaparición local de FN.

Por otra parte, en numerosos estudios in vitro se ha observado que la FN y el citoesqueleto se hallan íntimamente relacionados (44). Fibras de la ME que contienen FN se alinean con haces de microfilamentos de actina (39,48). En cambio, células transformadas que carecen de FN y microfilamentos organizados reorganizan sus microfilamentos cuando son tratadas con FN (1).

Estos hallazgos llevan al concepto de la posible conexión física entre la FN extracelular y la actina intracelular a través de las integrinas. Estas se unirían extracelularmente con FN e intracelularmente con talina (44), una de las proteínas del complejo de unión de los microfilamentos a la membrana plasmática.

El estudio de la FN ha adquirido importancia creciente debido al hallazgo de su rol de molécula polifuncional, moduladora del comportamiento celular, sobre todo en referencia a cambios en el ambiente pericelular inmediato.

Los cultivos primarios de células disociadas han sido extensamente utilizados en el estudio de la estructura y funciones de las células eucariotas, así como en el análisis de los efectos que ciertos agentes biológicamente activos, como los virus y ciertas drogas, pueden ejercer sobre ese sistema in vitro.

Cuando un tejido es transferido a un frasco de cultivo, pierde el anclaje físico y los aportes de su ambiente humoral, tanto de los provenientes del resto del órgano como del organismo entero.

El medio de cultivo y el gas del frasco y/o de la cámara reemplazan al ambiente humoral, y la cara interna del recipiente al anclaje de las células en el organismo. Sin embargo las células no adhieren directamente al plástico o al vidrio sino que se unen a específicas proteínas de adhesión adsorbidas a esas superficies. Estos factores pueden ser producidos por las mismas células o estar presentes en el suero agregado al medio de cultivo. Los factores de este tipo incluyen a componentes de la ME y del suero tales como FN, LN, vitronectina, trombospondina y colágenos.

La adición, o pretratamiento de una superficie de vidrio o plástico con componentes de la ME, puede facilitar el cultivo

de algunas células y modular el comportamiento y la expresión génica de otras (7,8,32). La probada regulación del comportamiento celular in vitro por moléculas de la ME sugiere un papel similar en el desarrollo in vivo, ya que componentes de la matriz, solos o en combinación, influyen en la adhesión, migración, diferenciación, formación de prolongaciones neuronales y división celular.

1.3. Células fibroblásticas

Los fibroblastos, cuyo nombre denota al tipo celular responsable de la síntesis de las fibras del tejido conectivo, han sido ampliamente utilizados en el estudio de las ME, tanto en lo que hace a sus componentes como a nivel de la expresión de los genes que las codifican. Debido a su gran viabilidad y a su elevada tasa de división in vitro, el fibroblasto ha sido empleado como prototipo de célula mesenquimática en cultivos celulares.

En 1978, Hedman y col. (37) caracterizaron a nivel ultraestructural a la FN propia de cultivos de fibroblastos, mostrando que la FN extracelular estaba presente tanto en asociación con la membrana plasmática como en estructuras extracelulares. La asociada a membrana tenía una distribución despareja y representaba una porción minoritaria de la FN externa total, sobre todo en cultivos densos de edad avanzada. La forma extracelular de la FN se visualizaba en forma de cadenas de 50-500 nm de diámetro, se incrementaba con el tiempo de desarrollo in vitro y fue definida como la matriz del tejido conectivo en cultivo.

La FN unida al sustrato puede tener dos orígenes diferentes: a) derivar de la proteína asociada a membrana por aposición de nuevas moléculas y posterior movimiento de las células; o

b) provenir de la FN soluble secretada en grandes cantidades al medio, la que puede agregarse para formar las fibras de FN, tal como ocurre en el caso del colágeno.

1.4. Células astrogliales

Las células astrogliales desempeñan un papel fundamental en la formación y mantenimiento de las funciones neuronales, ya que guían a neuronas jóvenes que migran a través del Sistema Nervioso Central (SNC) en desarrollo, modifican el líquido extracelular, intervienen en el intercambio nutricional y de metabolitos con las neuronas, así como en la eliminación de desechos, remueven los restos celulares de la actividad endocítica resultante de la necrosis celular durante el desarrollo, enfermedad o injuria, y promueven el crecimiento neurítico sobre las superficies astrogliales (97,26).

En el proceso de formación del SNC de mamíferos tienen lugar dos migraciones principales: la de las células destinadas a constituir las neuronas corticales, y la de los conos axonales hacia sus blancos neuronales específicos. Las primeras parecen ser guiadas por la glía radial, y es poco lo que se sabe respecto de los conos de crecimiento axonal (27).

Varias líneas de evidencia indican que ciertas matrices extracelulares sirven como sustrato para la migración de neuronas y la extensión de axones del Sistema Nervioso Periférico durante el desarrollo. La FN aparece en la senda migratoria de las células de las crestas neurales inmediatamente antes del comienzo de la migración y declina con su finalización (23).

Según experimentos recientes, los componentes de la ME pueden también jugar un papel en el desarrollo del SNC. Se ha detectado inmunorreactividad para FN en los tramos iniciales del ca-

mino migratorio de los precursores de las células granulares del cerebelo (35) y en la corteza cerebral de ratón (93) y gato (17) en desarrollo.

Los cultivos primarios de astrocitos han sido ampliamente utilizados para el estudio de muchas de las funciones astrogliales (28), ya que mantienen el fenotipo de las células presentes en el tejido neural donante y exhiben la capacidad de diferenciarse y adquirir caracteres específicos. Así, Abney sostiene (28): "el tiempo de desarrollo de las células gliales es muy similar en cultivos de células disociadas e in vivo", sugiriendo que en la génesis glial los relojes biológicos son más importantes que la información posicional.

Las células gliales, derivadas de embrión o animal neonato, luego de adherirse al sustrato adquieren una morfología similar a células epiteliales, muy adheridas entre sí, con pocos microfilamentos y organelas. Son muy semejantes a glioblastos in vivo y, en la rata, aparecen el día 12,5, es decir en la época en que empieza a formarse la zona marginal y las células ventriculares comienzan a producir una serie de células diferenciadas. Algunas células, llamadas de tipo A, no tienen filamentos intermedios, aunque puede haber escasa vimentina en sus citoplasmas. Estas células se pueden transformar en colonias tipo C (28), que son astroblastos o astrocitos jóvenes. Estos se dividen en dos tipos: células sólo positivas para vimentina, consideradas glioblastos, y en células que contienen vimentina y proteína gliofibrilar ácida (GFAP), en sus filamentos intermedios. Esta última es el constituyente principal de los filamentos intermedios de astrocitos maduros. Las proporciones de vimentina y GFAP varían con el grado de diferenciación y función de la célula (90).

Los eventos descriptos determinan la aparición de células

estrelladas, inmóviles, GFAP-positivas y con apariencia de astrocitos fibrosos, pero con características antigénicas de astrocitos protoplasmáticos o tipo 1 (81).

En lo que respecta a neuroblastos y oligodendroblastos, también presentes en esta clase de cultivos, degeneran en las dos primeras semanas de incubación a menos que se tomen recaudos especiales.

En forma similar a lo que sucede in vivo, las ME influyen en algunas de las funciones de células en cultivo provenientes de tejidos neurales (33, 76).

La FN promueve la adhesión de células de las crestas neurales a sustratos de colágeno y promueve su migración (84).

También la FN y la LN son efectivas en la promoción del crecimiento de neuritas de una amplia variedad de neuronas centrales y periféricas (46, 82) en cultivo.

A pesar de la importancia que las ME parecen tener en el desarrollo del sistema nervioso, es muy escaso el conocimiento que se posee sobre la identidad de las células responsables de la síntesis y deposición de estas matrices. Hay trabajos recientes que demuestran la síntesis y secreción de FN (68, 80) y LN (66) por células astrocitarias en cultivo primario.

Es con el objeto de evaluar la capacidad del astrocito para producir y estructurar una matriz pericelular, que muchos investigadores han recurrido a los cultivos celulares, dado el carácter homogéneo del sistema in vitro y la aptitud de diferenciación celular exhibida por sus constituyentes.

1.5. Efectos virales sobre la ME

La modificación de la forma celular puede estar acompañada de una alteración de la ME, ya que es conocido que ciertas dro-

gas que afectan el citoesqueleto producen una disminución en la retención de la FN pericelular (56).

Es conocida, también, la acción de virus transformantes que inducen una distribución anormal de las proteínas del citoesqueleto (19) y la concomitante pérdida de FN asociada a la superficie celular (74,77,99). El tratamiento con FN exógena restablece la morfología celular normal (1).

Con respecto a la infección viral productiva, es escaso el conocimiento que se posee en cuanto a su repercusión sobre la ME. Las infecciones con virus Herpes simplex y Junín, que producen diferentes efectos en la morfología y diferenciación celulares, constituyen modelos potencialmente útiles para el estudio de los efectos de agentes biológicamente activos sobre la matriz pericelular.

1.6. Virus Herpes simplex

El virus Herpes simplex (HSV) (83) es un miembro de la familia Herpesviridae, que se identifican por su ADN lineal de doble cadena, cápside de simetría icosaédrica conteniendo 162 capsómeros ensamblados en el núcleo, y una envoltura lipoproteica con espículas de 8 nm de longitud. El diámetro de los viriones varía de 220 a 300 nm. El ADN viral presenta 2 componentes unidos covalentemente llamados S y L. Cada componente consiste en una secuencia principal flanqueada por dos secuencias repetitivas invertidas.

Los viriones purificados contienen de 15 a 35 especies de proteínas estructurales además de otras proteínas como ATPasa y proteína kinasa. Las proteínas del HSV forman 5 grupos (α , β_1 , β_2 , δ y γ_2), cuya síntesis es regulada coordinadamente y poseen requerimientos y cinética de síntesis similares. Cada

grupo de proteínas está secuencialmente ordenado en forma de cascada y sus cantidades relativas varían en diferentes momentos de la replicación del virus.

El HSV se caracteriza por su ciclo reproductivo relativamente corto, destrucción eficaz de la célula huésped y capacidad para establecer infección latente primariamente, pero no exclusivamente, en ganglios del sistema nervioso. Como casi todos los herpesvirus tiene afinidad por células de origen ectodérmico, aunque in vitro es capaz de multiplicar en una gran variedad de tipos celulares.

Los efectos citopáticos del HSV en cultivos celulares en monocapa(63) incluyen aglutinación y redondeamiento celular, y formación de células gigantes multinucleadas por fusión de células adyacentes y reclutamiento de núcleos. En ambas formas los núcleos de las células infectadas poseen cuerpos de inclusión. Dependiendo de la cantidad de virus presente, los focos pueden ser dispersos, o todas las células resultan infectadas y se desprenden.

La presencia de células multinucleadas se atribuye a la fusión de membranas plasmáticas inducida por glicoproteínas virales (69).

Respecto de los efectos sobre tejidos nerviosos, desde los primeros trabajos llevados a cabo en cultivos organotípicos de SNC (61), se ha visto que el HSV infecta células neuronales y oligo y astrogliales con muerte de todas ellas. En ellos se vio que producía diversos efectos a nivel del núcleo y del citoplasma, observándose la formación de sincicios que incluían células gliales (24). En trabajos llevados a cabo in vivo se observa que el virus se une a astrocitos y sinaptosomas pero no a cuerpos neuronales. En ratones inoculados intracerebralmente la fracción glial contiene el virus infectivo (100).

1.7. Virus Junín

El virus Junín, agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina (12,104), pertenece a la familia Arenaviridae, cuyos componentes se caracterizan por poseer ARN de cadena simple, labilidad al éter y otros solventes lipídicos y poseer dentro de la partícula viral un número considerable de gránulos semejantes a ribosomas, que son los responsables del aspecto arenoso que es característico del grupo. Producen infecciones persistentes tanto en reservorios naturales como en cultivos celulares. La infección del hombre por algunos miembros del grupo está asociada a enfermedades que pueden resultar fatales.

En cuanto a la composición química, se ha establecido que está constituido por ARN de cadena simple y, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, se confirmó que a semejanza de otros virus pertenecientes al mismo grupo, el ARN está fragmentado en 4 fracciones mayores y 3 menores. Se han identificado 6 polipéptidos constituyentes del virión, de los cuales 4 son glicoproteínas. El virus Junín es capaz de replicar in vitro en una gran variedad de células de diverso origen (4). Las líneas establecidas más utilizadas son Vero, BHK y HeLa. Además se ha detectado multiplicación viral en una gran diversidad de cultivos primarios: riñón de cobayo, conejo y hámster, fibroblastos de pollo y de ratón, así como en cultivos derivados de Sistema Nervioso Central: explantos de cerebelo y monocapas de encéfalo de ratón (5) y rata. Solamente en algunas líneas establecidas ha sido detectado efecto citopático evidente (104).

El VJ multiplica en el citoplasma de la célula infectada y emerge por brotación. Estudios por microscopía electrónica en cultivos de encéfalo de ratón (58) permitieron comprobar

que el mismo se visualiza como una partícula pleomórfica, redondeada u oval, con un diámetro promedio de 110-130 nm pero con amplias variaciones individuales. Como características estructurales presenta una envoltura periférica de composición lipoproteica y estructura membranosa, una banda electrodensa y una zona central con los gránulos semejentes a ribosomas.

2 . OBJETIVOS

El objeto de la presente Tesis se basa en dos puntos principales:

- a) La caracterización inmunocitoquímica de la FN presente en 2 sistemas de células en cultivo, de orígenes y funciones diferentes. Por un lado, fibroblastos embrionarios de rata, considerados como prototipo de célula mesenquimática. Por el otro, células astrocitarias, derivadas de encéfalo de rata recién nacida, un ejemplo de célula neural.
- b) El estudio de la infección de 2 virus de reconocido neurotropismo (Herpes simplex y Junín) sobre estos sistemas celulares in vitro, principalmente en referencia a su repercusión sobre la matriz pericelular presente en los mismos.

Para el análisis de la FN en sus diferentes localizaciones -intracelular o formando parte de la ME- se debía disponer de una técnica que permitiera detectar su presencia con adecuada sensibilidad y especificidad.

La inmunocitoquímica ya no es sólo una serie de procedimientos que facilitan la descripción de la morfología en términos bioquímicos; sino que , mediante el uso de anticuerpos monoclonales, ha expandido a la bioquímica estudiando los procesos in situ, sin necesidad de aislar los constituyentes del tejido en forma previa a su estudio. Utilizando la especificidad de las inmunoglobulinas se pueden detectar constituyentes específicos en células o tejidos preparados para ser observados al microscopio óptico o electrónico. Dentro de estas técnicas se destacan las inmunoenzimáticas que, además de su elevada sensibilidad, se pueden combinar con las tinciones tradicionales, así como con histoquímica enzimática, autorradiografía tradicional e hibridización in situ.

El método "peroxidasa anti-peroxidasa" (PAP) presenta la

ventaja adicional, con respecto a los de peroxidasa conjugada, de una alta conservación de la actividad de la enzima, al estar unida al anticuerpo por uniones débiles y no covalentemente.

En forma adicional, con la utilización de procedimientos de doble tinción, es posible visualizar simultáneamente dos antígenos en el mismo preparado, y así analizar con precisión las relaciones topográficas existentes entre esas dos sustancias.

El empleo de esta metodología permite estudiar a la ME, un factor esencial para la integridad de los tejidos, así como de los cultivos de células disociadas, tanto en condiciones basales como bajo la acción de factores biológicamente activos como son los virus Herpes simplex y Junín, de acción diversa sobre la célula huésped.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Cultivos celulares

A) Cultivo de fibroblastos

Se prepararon cultivos primarios de fibroblastos a partir de embriones de rata Wistar de 15-18 días de gestación. Las paredes corporales del tronco fueron disecadas con tijeras, los trozos resultantes se suspendieron en solución de Hank y se disgregaron por pipeteo reiterado, con posterior disrupción enzimática mediante ciclos de 20 min. de tripsina al 0,25% (Gibco, USA). Al sobrenadante obtenido se le agregó medio de crecimiento, constituido por medio esencial mínimo de Eagle (MEM) (Flow Labs., USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gensa, Argentina) para luego centrifugarlo a 800 rpm durante 5 min. El correspondiente pellet celular fue resuspendido en el mismo medio nutritivo y sembrado en frascos plásticos a una concentración de 600.000 células por ml. A las 24 hs de incubación a 37°C se obtuvo una monocapa confluyente que 3-4 días más tarde fue disociada en tripsina al 0,25%. Las células desprendidas fueron resuspendidas en medio de crecimiento y sembradas en tubos de Leighton a una concentración de 300.000 cél./ml. Después de un día de este primer subcultivo, el suero fue reducido al 2% para mantenimiento, para ser luego omitido 24 hs antes de procesar las monocapas según técnica de peroxidasa anti-peroxidasa (PAP).

B) Cultivo de Astrocitos

Se obtuvieron hemisferios cerebrales de ratas neonatas (24-48 hs de vida). Luego de eliminar meninges y vasos sanguíneos adherentes, los tejidos neurales fueron seccionados con tijeras de punta fina y digeridos con tripsina al 0,25% durante

15 min. Las células disociadas se suspendieron en MEM con suero fetal bovino al 10% y se sembraron en frascos de plástico. A los 8-10 días de incubación a 37°C, el cultivo mixto de células neuronales y gliales se tripsinó y la suspensión resultante fue sembrada en tubos de Leighton a una concentración de 400.000 cél./ml. Cambiando el medio a las 24 hs se eliminaron las neuronas remanentes, obteniéndose una monocapa homogénea de células astrocitarias inmaduras, como pudo comprobarse por marcación de la proteína constituyente de los filamentos intermedios de astrocitos, es decir la proteína gliofibrilar ácida (GFAP).

3.2 Tinción inmunoenzimática por técnica PAP (91,92)

A) Inmunomarcación de FN

Las monocapas desarrolladas en cubreobjetos de vidrio en tubos de Leighton fueron lavadas con buffer Tris salino 0,05 M suplementado con seroalbúmina bovina al 1% (TS-BSA).

a) Cuando se recurrió a fijación con metanol se empleó la siguiente secuencia:

- 1- Fijación con una mezcla de metanol y ácido acético glacial al 5% en CO₂ sólido triturado, durante 2 min.
- 2- 3 lavados con TS-BSA de 5 min c/u.
- 3- Incubación con suero de conejo anti-FN humana, generosamente provisto por el Dr. John S. Rudge, Dpt. of Biology, Univ. of California, San Diego, USA; el que fue aplicado en dilución 1/100 en TS con 5% de suero normal de cabra, durante 30 min. a temperatura ambiente (TA).
- 4- 3 lavados de 5 min. con TS-BSA.
- 5- Incubación con suero de cabra anti-IgG de conejo (Cappel Labs., Cochranville, USA), diluido 1/100, durante 30 min.

a TA.

6- 3 lavados de 5 min. con TS-BSA.

7- Incubación con complejo peroxidasa anti-peroxidasa de conejo (Cappel Labs., Cochranville, USA), diluido 1/100 durante 30 min. a TA.

8- 3 lavados de 5 min. con TS.

b) Cuando se empleó fijación con paraformaldehído, en forma previa se procedió a incubar las monocapas con el anticuerpo primario (anti-FN), diluido 1/100, durante 30 min. a TA; un lavado de 5 min. con TS-BSA; fijación con paraformaldehído al 4% en PBS 0,1 M, pH 7,2, durante 15 min. a 4°C. Luego se continuó la técnica del paso 4 hasta el 8 como en el procedimiento descrito anteriormente.

c) En el caso de fijación doble, en forma previa se procedió a incubar las monocapas con el anticuerpo anti-FN diluido 1/100 durante 15 min a 4°C, 3 lavados con TS de 1 min. c/u; fijación con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min y refijación con metanol-ácido acético al 5% durante 2 min. en CO₂ sólido triturado. Luego se procedió como en los pasos 3 a 8 del ítem 3.2.

En todos los casos la detección de peroxidasa se realizó con 3,3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro (Fluka Labs., Suiza) al 0,03% con la adición de H₂O₂ al 0,05%. Después de varios lavados con agua destilada los preparados fueron deshidratados en etanol de concentraciones crecientes y xilol absoluto, y montados sobre portaobjetos.

En algunas ocasiones los preparados fueron teñidos suavemente con hematoxilina de Mayer, a fin de visualizar los núcleos celulares.

Se realizaron tinciones controles reemplazando en cada

Caso el anticuerpo primario por suero normal de conejo o TSC. Como testigo negativo de FN se utilizaron monocapas de células Vero, que carecen de FN en su ME.

B) Inmunomarcación simultánea de 2 antígenos

En el caso de tinción doble para la detección simultánea de FN y proteínas intracelulares, se procedió según una adaptación del método de Tramu (98), que recurre a la peroxidasa conjugada para marcar 2 antígenos diferentes en cortes histológicos.

- a) Ag-Herpes y FN: Luego de la marcación de FN extracelular, revelada con DAB, las monocapas fueron lavadas con agua destilada y tratadas con HCl 0,1 M para evitar la reacción de la peroxidasa con el segundo cromógeno. Después de varios lavados con agua destilada, los preparados fueron refijados con metanol-ácido acético a -20°C durante 20 min, lavados con etanoles de 96° a 50%; seguidos de lavados en agua corriente y en TS 0,005 M, luego incubados en TSC durante 15 min y con suero de conejo anti-HSV-1 (Dako Lab, Dinamarca), en una dilución 1/1000 durante 60 min. El anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo fue usado 1/50 y el PAP conejo 1/250. El cromógeno revelador de la reacción fue 1-Cl,4-naftol (Sigma, USA). Después de varios lavados con agua destilada, los preparados fueron montados sobre un portaobjetos con glicerina tamponada.

Tanto en los procedimientos de tinción simple como doble se hicieron controles reemplazando el anticuerpo primario por suero normal de conejo.

- b) Ag-Junín y FN: Se procedió primero a la inmunomarcación de antígeno viral. Las monocapas infectadas y testigos fueron fijadas con metanol-ácido acético, en forma similar a la FN

intracelular. En este caso, el anticuerpo primario (anti-VJ) cedido gentilmente por el Dr. Julio G. Barrera Oro, USAMRID, Maryland, USA, era una mezcla de anticuerpos monoclonales contra diferentes antígenos del VJ; y fue aplicado en una dilución 1/500, incubándose durante 96 hs a 4°C para aumentar la sensibilidad de la reacción. El anticuerpo secundario, conejo anti-IgG de ratón (Bio Yeda, Israel) se utilizó en una dilución 1/50 y el PAP ratón (Bio Yeda, Israel) en dilución 1/50. El cromógeno usado en la revelación fue DAB. Luego del tratamiento con HCl se procedió a marcar FN como ya fue descrito. La reacción fue revelada con 1-Cl,4-naftol.

- c) GFAP y FN: En la inmunotinción de GFAP y FN en cultivos astrocitarios se procedió de manera similar al ítem a), siendo el anticuerpo primario de la segunda reacción un suero de conejo anti-GFAP, cedido por el Dr. Lawrence F. Eng (Veterans Administration Medical Center, Palo Alto, California, USA), en dilución 1/250, al igual que el PAP conejo.

3.3 Infección viral

- a) El virus Herpes simplex tipo 1 original (cepa Mc Intyre), fue provisto por laboratorios del Center for Disease Control, Atlanta, USA, a través del Dr. Milford H. Hatch. A distintos días post-siembra las monocapas fueron inoculadas con HSV-1 a mdi variables. Los cultivos infectados, así como los correspondientes controles fueron procesados desde el día 1 al 4 post-inoculación (pi), la mitad para tinción con colorante de Giemsa y la otra mitad para inmunomarcación.

Para evaluar la cinética de infectividad del HSV-1 en cultivos fibroblásticos y astrocitarios, fueron reservados tubos en que se cosechó el sobrenadante diariamente.

La infectividad se midió por efecto citopático en células fibroblásticas o astrocitarias, según el origen del sobrenadante.

- b) El virus Junín, cepa XJ Cl₃, correspondió al pasaje habitualmente utilizado en el Depto. de Microbiología, Fac. de Medicina, UBA. Las monocapas se infectaron con 100.00 UFP/ml, realizándose las sucesivas cosechas de los sobrenadantes por el método de unidades formadoras de placas (UFP) en células Vero (31).

Los cultivos infectados y sus correspondientes controles fueron procesados para las tinciones con Giemsa y PAP a los 7 días pi, cuando la recuperación de virus es máxima.

4. RESULTADOS

4.1 Inmunomarcación de FN en cultivos fibroblásticos

El ensayo de diversas condiciones de fijación de las monocapas celulares y de variados esquemas de incubación de los anticuerpos primarios, posibilitó la detección diferencial de la FN presente en cultivos de fibroblastos embrionarios de rata.

La fijación con metanol más ácido acético helado, en forma previa a la incubación con el anticuerpo primario, permitió teñir a la FN intracelular, que se localizaba particularmente en el área perinuclear (Fig. 1a).

Para visualizar la FN extracelular, tanto asociada directamente con la membrana plasmática como formando parte de la ME, se recurrió a la fijación con paraformaldehído a pH fisiológico luego de la incubación con el suero anti-FN. De esta manera se logró una marcación nítida y delicada de la FN pericelular, visualizada como una red de fibras de grosor variable, orientadas predominantemente a lo largo del eje longitudinal de las células (Fig. 1b). Los cuerpos celulares, en cambio, permanecieron negativos a la tinción. En preparados en que los núcleos se tiñeron con hematoxilina, las fibras aparecieron tanto delineando los cuerpos celulares, como en los contactos célula-célula y célula-sustrato (Fig. 1c).

Con el objeto de obtener una óptima visualización simultánea de ambos tipos de FN -intracitoplasmática y extracelular-, también se probaron diversos fijadores y esquemas de incubación. Los mejores resultados para la preservación de la antigenicidad, así como de la especificidad de la reacción (mínima coloración de fondo) derivaron de la aplicación de un procedi-

miento de doble fijación y doble incubación con el anticuerpo primario, según se describe en Materiales y Métodos. De acuerdo a estas condiciones de procesamiento, la inmunorreactividad intracelular mostró la típica coloración granular perinuclear, en tanto que la reacción extracelular se evidenciaba como haces de fibras pericelulares localizados por debajo de los cuerpos y prolongaciones, y que alcanzaba una mayor intensidad en los contornos y en las conexiones intercelulares (Fig. 1d).

En cambio, cuando la doble fijación se ensayó en forma previa a la incubación con el anticuerpo anti-FN, la marcación intracitoplasmática demostró ser comparativamente deficiente. De la misma manera, los resultados obtenidos cuando se utilizó un solo fijador conteniendo paraformaldehído al 4% y metanol ácido fueron menos satisfactorios para ambas localizaciones de FN.

Los controles de especificidad de la reacción, llevados a cabo con suero normal de conejo como anticuerpo primario no mostraron coloración inespecífica cuando fueron usados en las mismas concentraciones que el anticuerpo anti-FN. Otro tipo de controles se realizó recurriendo a células Vero, que es sabido que no sintetizan FN, y que en consecuencia no mostraron tinción intra ni extracelular.

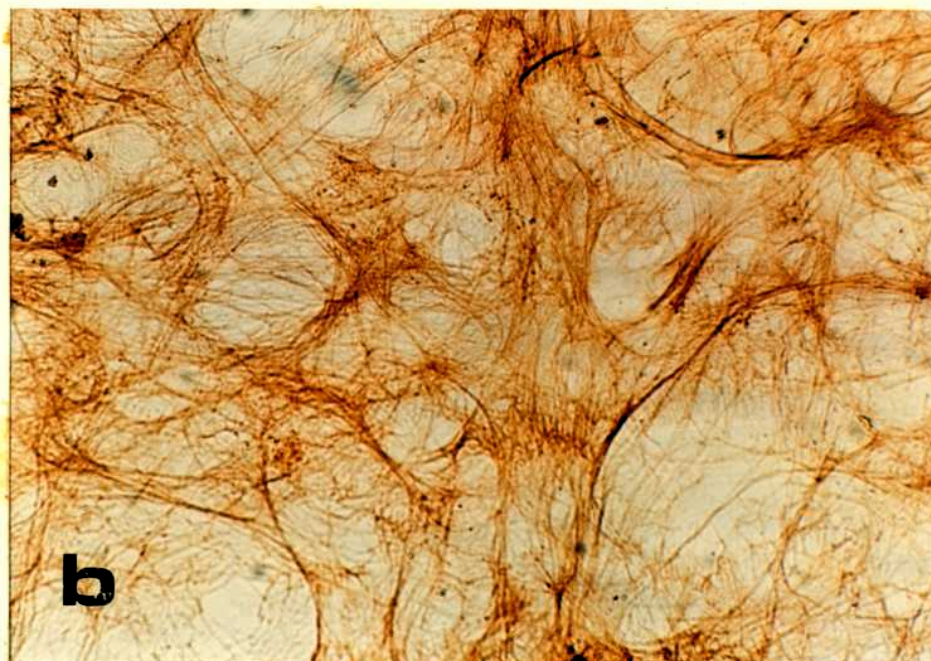


Fig 1.: Monocapa de fibroblastos de embrión de rata, en su primer subcultivo. Tinción de FN por el método PAP, utilizando DAB como revelador.

- a : 2 días de edad. Fijación con metanol-ácido acético helado. Se observan gránulos intracitoplasmáticos FN-positivos de localización perinuclear (flechas).360x.
- b : 5 días de edad. Fijación con paraformaldehído posterior a la incubación con el anticuerpo primario. Densa red de fibras positivas de ubicación pericelular.x360.

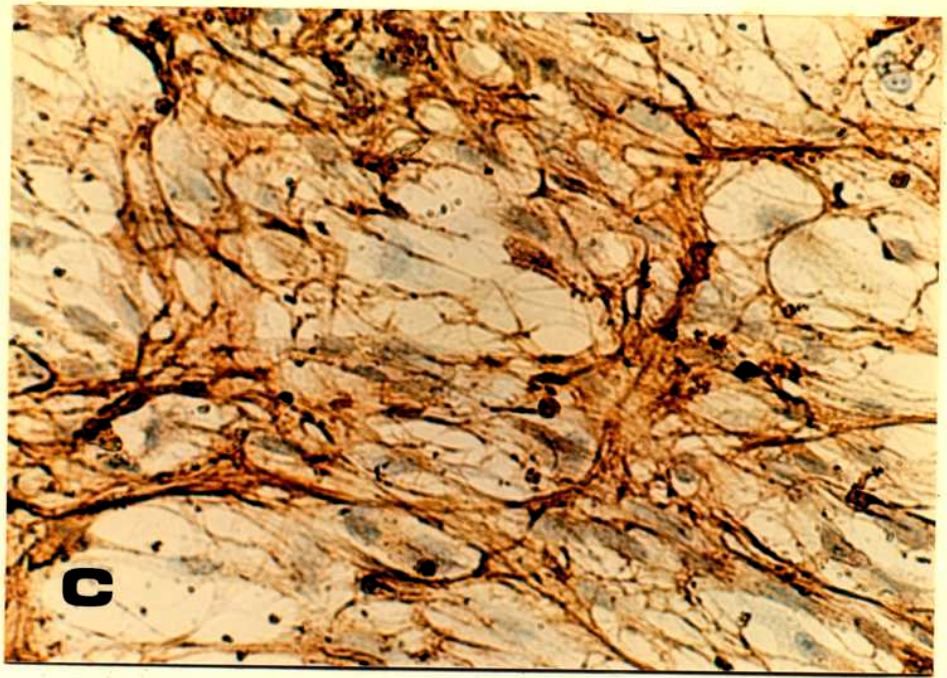


Fig. 1 c: Cultivo similar a b. Fijación con paraformaldehído. Tinción de los núcleos celulares con hematoxilina. Las fibras FN-positivas se observan generalmente paralelas al eje longitudinal de las células, ubicándose por encima y por debajo de los cuerpos celulares y en sus prolongaciones. x360.

d: 2 días de edad. Doble fijación con paraformaldehído y metanol-ácido acético. Neta coloración granular citoplasmática y de fibras pericelulares. x360.

4.2. Inmunomarcación de FN en cultivos astrocitarios

Para la inmunodetección de FN en cultivos astrocitarios se aplicaron los mismos procedimientos utilizados en cultivos de fibroblastos, realizándose las observaciones a diferentes tiempos después de la siembra de las células, con el fin de caracterizar la presencia de FN en diferentes estadios de la evolución del cultivo. A los 30 min. post-siembra, los astrocitos recién adheridos eran en su mayoría esféricos y, en ocasiones, exhibían pseudopodios. Si bien algunas células eran FN negativas, la mayoría presentaba diversos grados de positividad citoplasmática (Fig. 2a). 90 min. más tarde, los astrocitos jóvenes eran poligonales o ahusados y se encontraban en proceso de expansión de sus prolongaciones, aunque también se observaron algunos con características de células móviles o en división (Fig. 2b). Todas las células presentes en el cultivo mostraban FN perinuclear (Fig. 2b) sin indicio alguno de FN matricial.

A las 24 hs de incubación in vitro, las células, aún indiferenciadas y en proceso de división y formación de contactos intercelulares, continuaban exhibiendo FN predominantemente intracelular, si bien ya se evidenciaban escasas fibrillas FN positivas que delineaban los bordes celulares (Fig.2c) .

Tres días después, cuando la monocapa ya se había completado, hubo una notable caída en la marcación citoplasmática, y al mismo tiempo un incremento evidente de la FN incorporada a la ME (Fig. 2d). Las fibras pericelulares se ubicaban por encima y por debajo de las células y a lo largo de los bordes, o bien se extendían de un astrocito a otro continuando las prolongaciones (Fig. 2d). Eran escasas las células que

aún mostraban FN citoplasmática.

De las observaciones realizadas se infiere que las células astrocitarias inmaduras en cultivo primario sintetizan y secretan FN, la que pasa a formar parte de la matriz pericelular; a la vez, la incorporación de FN, que es más intensa en las primeras horas de incubación in vitro, disminuye paulatinamente en períodos más avanzados de la evolución astrocitaria.

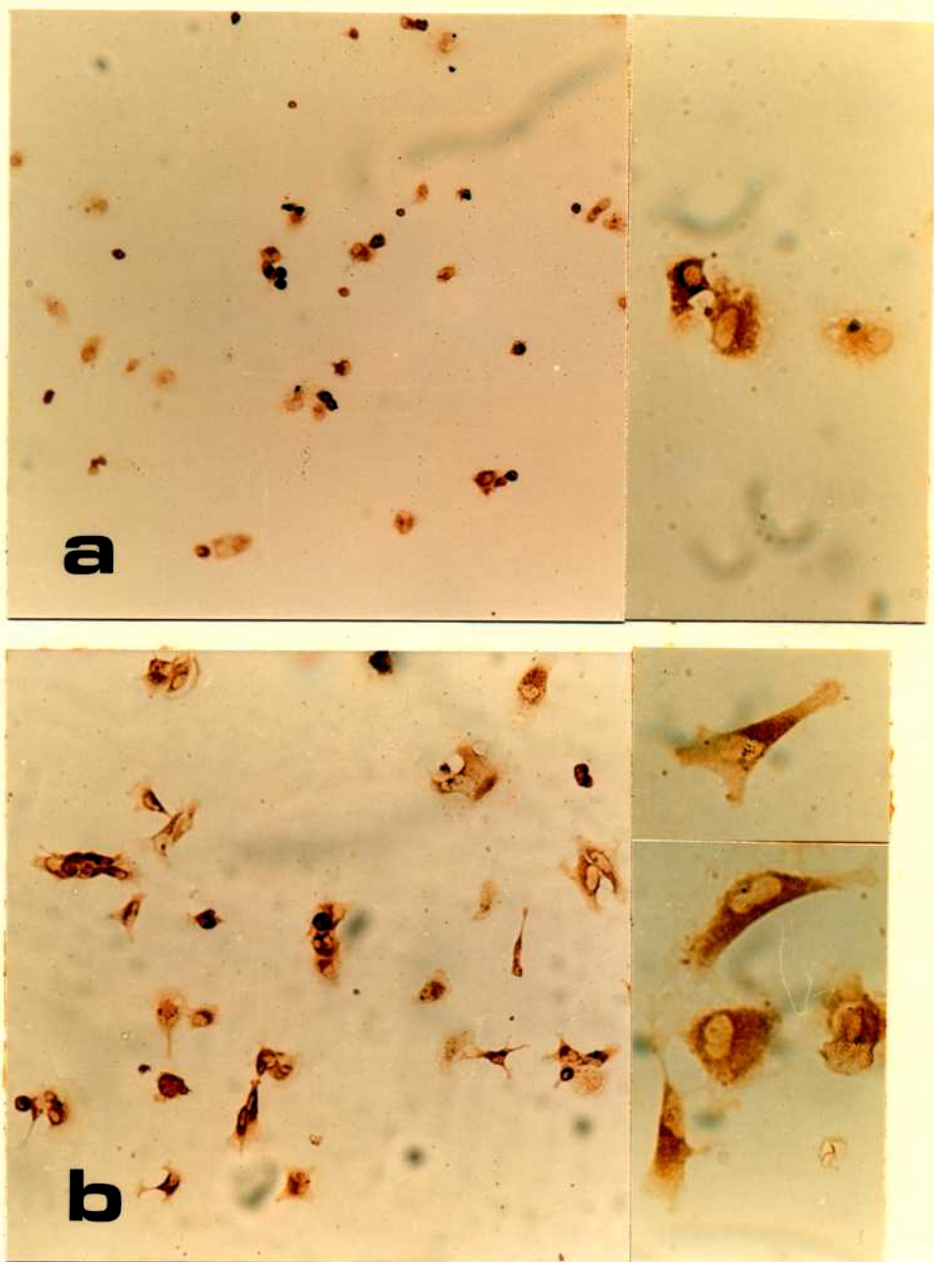


Fig. 2: Monocapa de astrocitos de encéfalo de rata neonata, en su primer subcultivo. Tinción de FN por el método PAP, utilizando DAB como revelador.

- a: 30 min de edad. Células en expansión, con diversos grados de positividad. x60. Inserto: detalle de la misma figura. x360.
- b: 2 hs de edad. Células móviles o en división, con positividad en uno o dos polos perinucleares. x60.

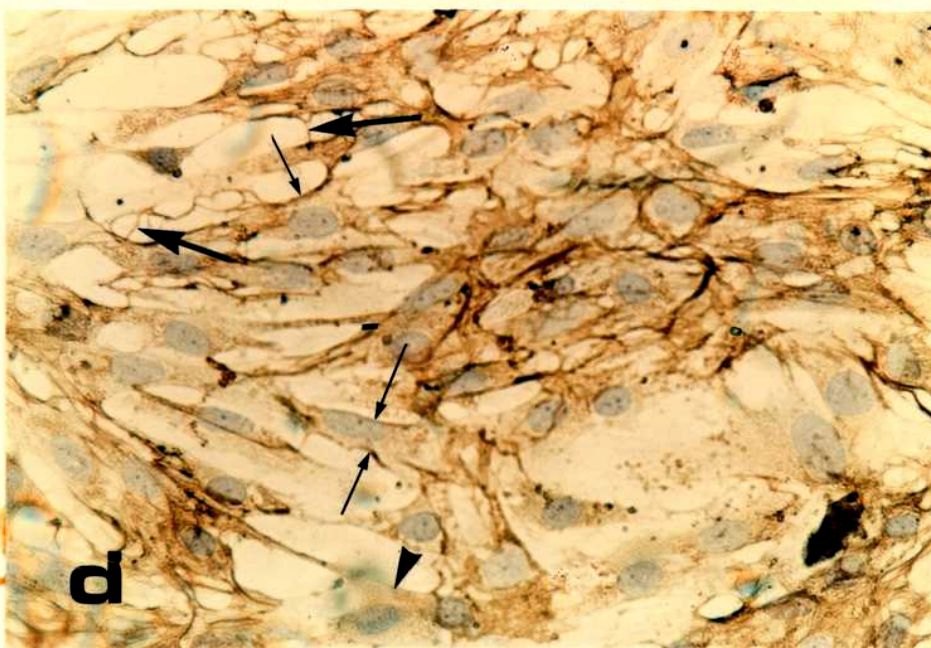
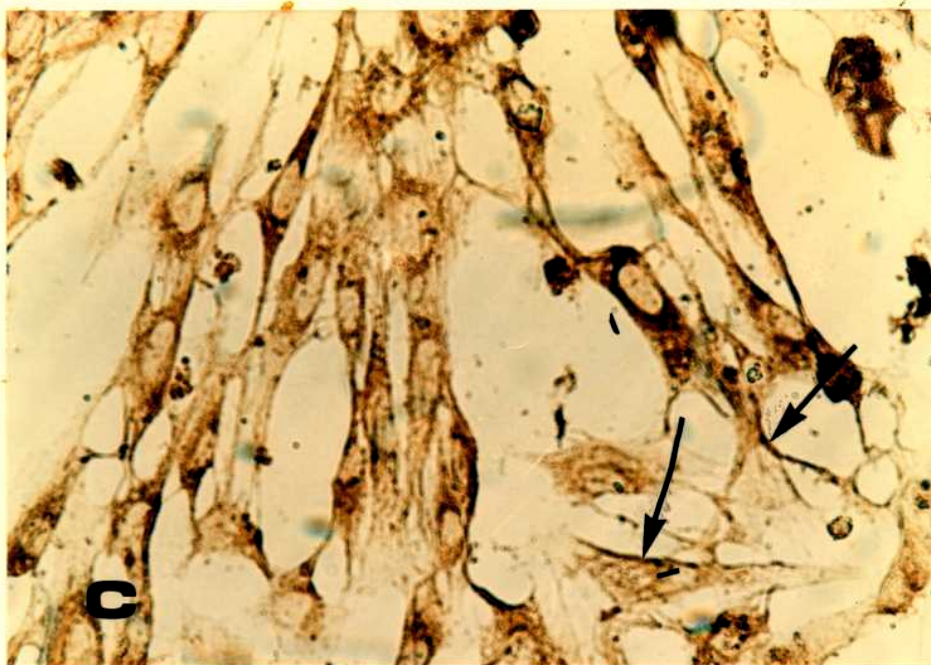


Fig 2. c: 1 día de edad. Persiste la marcación de FN intracitoplasmática y se agrega la detección de FN extracelular, la que se evidencia por fibras asociadas a la membrana plasmática. (flechas). x 360.

d: 4 días de edad. Fibras FN-positivas, localizadas en los bordes celulares (flechas pequeñas), por debajo de las células (punta de flechas pequeñas) y entre células (flechas grandes). Hay células que muestran débil tinción de FN intracitoplasmática (puntas de flechas grandes). x 360

4.3. Inmunomarcación simultánea de FN y GFAP en cultivos astrocitarios

Una vez demostrada la presencia de FN en cultivos de células astrogliales inmaduras, era de interés estudiar a esta glicoproteína en cultivos diferenciados tanto morfológica como bioquímicamente. Por ello fue necesario asociar la presencia de FN con la simultánea detección de la principal proteína constituyente de los filamentos intermedios de astrocitos maduros, la GFAP. Se debió recurrir, entonces, a técnicas de doble inmunotinción, que consisten en secuencias sucesivas de marcación por el método PAP, reveladas con dos cromógenos diferentes para FN y GFAP.

La inmunomarcación de FN extracelular revelada con DAB fue seguida por una refijación con metanol ácido para permitir la penetración de los anticuerpos anti-GFAP al citoplasma. Con el fin de eliminar la actividad de la peroxidasa de la primera reacción, se trató la monocapa con HCl diluido, el que inactiva a la enzima. La segunda secuencia de inmunotinción fue revelada con 1-Cl, 4-naftol, cuya coloración azul contrasta claramente con el marrón dorado de la DAB.

A los 21 días de incubación, se observaron numerosos grupos de células GFAP positivas que ocupaban una porción mayoritaria de la monocapa (Fig. 3a). Estos astrocitos diferenciados, fuertemente inmunoteñidos, se situaban sobre una red de filamentos de FN (Fig. 3b).

En el proceso de diferenciación astrocitaria, parte de sus citoplasmas se retrae y hay un reordenamiento del citoesqueleto -particularmente de los filamentos intermedios- para formar las finas prolongaciones características del astrocito maduro. Al producirse este fenómeno las células parecían perder el contacto con la FN que delineaba los bordes celulares (Fig. 3c). Por otra parte, en preparados teñidos para FN in-

tracelular, todavía se observaban algunas células débilmente positivas.

Los resultados obtenidos confirman la naturaleza astrocitaria de los cultivos. Además, de las observaciones realizadas surge que las células astrocitarias, ya desde sus primeras horas de desarrollo in vitro son capaces de sintetizar y secretar FN, la que tiende a incorporarse a la ME. Esta incorporación, que se observó intensa en los primeros días, disminuye luego pero no desaparece, ni aún en los estadios más avanzados del astrocito en cultivo.

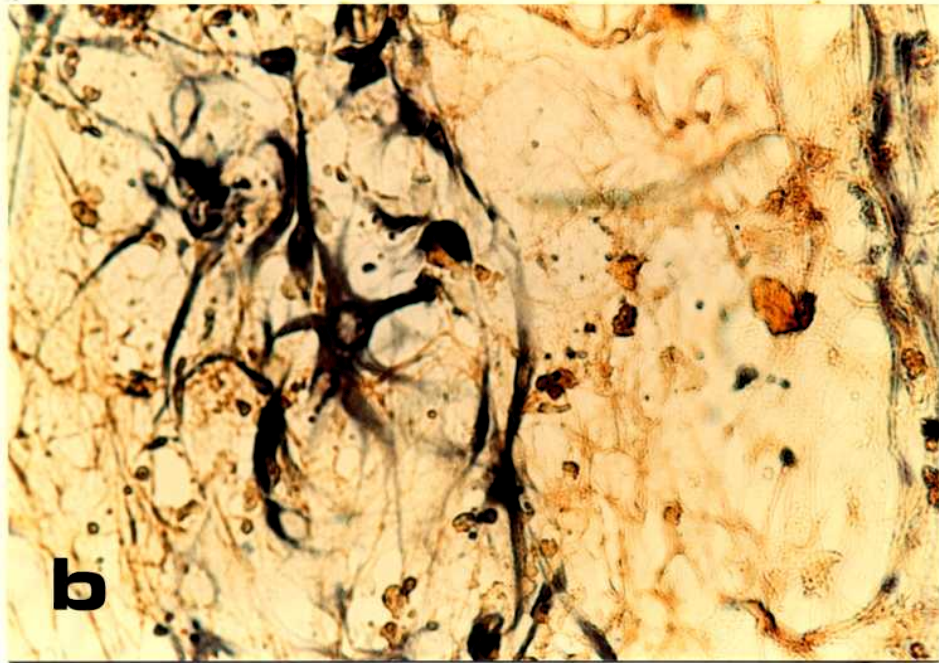
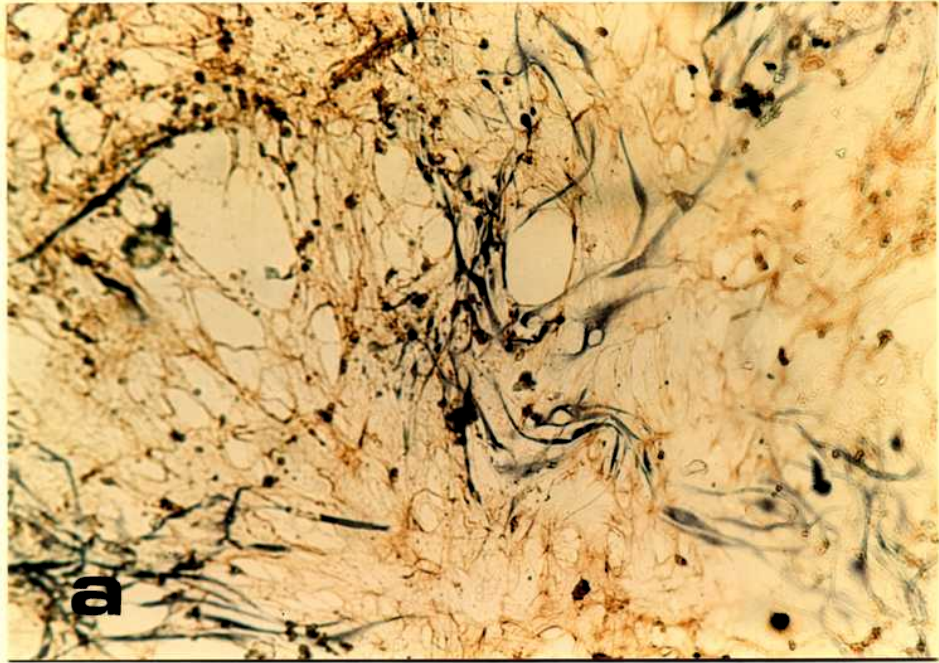


Fig. 3: Monocapa de astrocitos de encéfalo de rata en su primer subcultivo. 21 días de edad. Doble marcación por método PAP: FN con DAB(marrón dorado) y GFAP con 1-Cl, 4-Naftol (azul grisáceo).

a: Se observan varios focos de astrocitos GFAP-positivos sobre una red FN-positiva. x114

b: Astrocitos GFAP positivos sobre la red de FN fibrilar.x360.

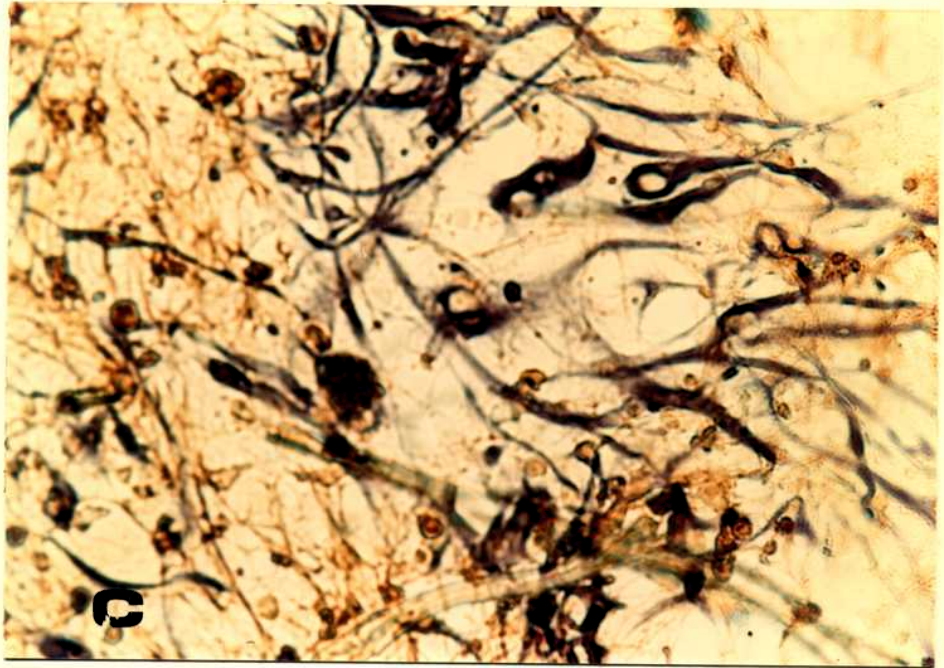


Fig. 3. c: Foco de astrocitos maduros GFAP positivos y de morfología ahusada o estrellada. La retracción de sus cuerpos celulares ha originado huecos en la monocapa. Ausencia de FN fibrilar en la periferia de astrocitos maduros. x360.

4.4. Detección de virus infectivo y antígenos virales en cultivos fibroblásticos y astrocitarios infectados con virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1)

El virus Herpes simplex, pese a poseer tropismo por células de origen ectodérmico en el organismo entero, es capaz de replicar y producir alteraciones metabólicas y morfológicas con la subsiguiente muerte celular en una gran variedad de células en cultivo (5).

Es posible, sin embargo, detectar la replicación viral aún antes de que se manifiesten estos efectos mediante la inmunomarcación de los antígenos virales específicos. Además, con la utilización de este método, es posible correlacionar el tipo de alteración morfológica con la localización del antígeno viral en la célula.

En nuestro sistema de fibroblastos embrionarios infectados con HSV-1, el virus liberado al sobrenadante pudo detectarse ya a las 12 hs pi, aunque el incremento mayor de título infectivo se produjo entre las 24 y 48 hs pi, alcanzando el máximo alrededor de las 72 hs pi. A partir de ese momento el virus infectivo comenzó a disminuir, y a las 96 hs eran muy pocas las células que permanecían adheridas al sustrato, pese a que el título del sobrenadante era todavía elevado (Fig. 4).

En cuanto a los efectos citopáticos producidos por el HSV-1, se observó lo siguiente:

- a) Fusión celular, evidenciada en la formación temprana de células multinucleadas que presentaban tinción para antígeno viral en citoplasma y/o núcleos (Fig. 5a), con intensidad creciente con el tiempo de infección.
- b) Redondeamiento celular, manifestado por la presencia de

células esféricas, carentes de prolongaciones, o, cuando las tenían, cortas y delgadas. Todas ellas poseían fuerte positividad para antígeno HSV-1 (Ag HSV-1) (Fig. 5b).

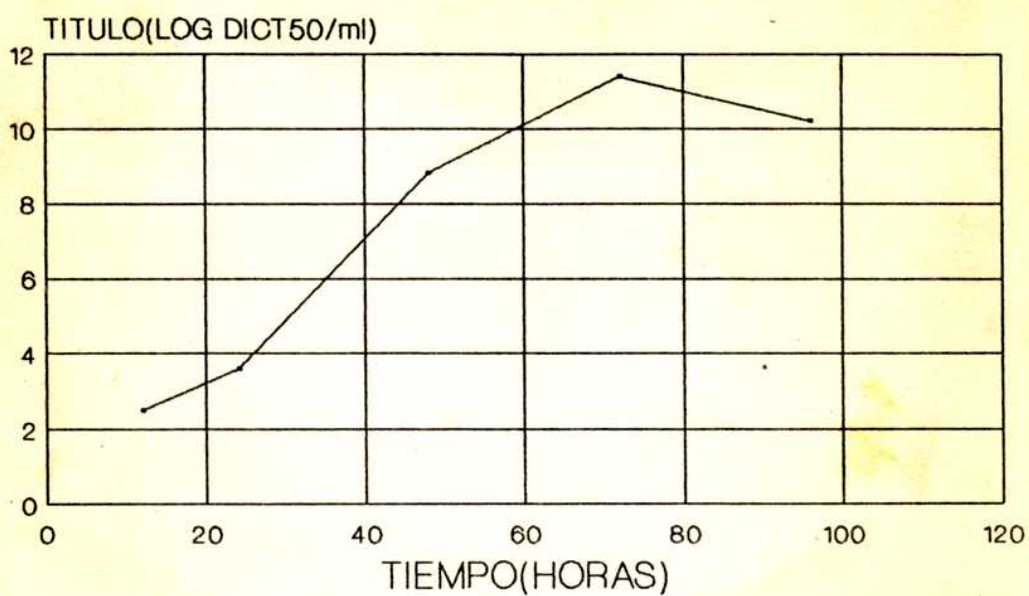
c) A los conocidos efectos descritos en los ítems anteriores se agregaba un tercer tipo de alteración morfológica, que consistía en una combinación de ambos. Se observaba la presencia de células multinucleadas, densamente teñidas para Ag viral y aspecto arborescente, constituidas por un cuerpo esferoide y voluminoso del que partían prolongaciones profusamente ramificadas (Fig. 5b).

La especificidad de la tinción fue corroborada por la observación de fibroblastos con débil o nula tinción, que alternaban con las Ag-HSV-1 positivas descritas precedentemente (Fig. 5c).

La cinética de producción de virus infectivo en cultivos astrocitarios posee características similares a la de cultivos fibroblásticos, aunque los títulos alcanzados son menores, para todos los tiempos analizados (Fig. 6). La tasa de liberación de virus infectivo aumentó en forma sostenida desde las 12 hs pi y alcanzó su punto máximo alrededor de las 72 hs pi. Después del 4º día pi, las células remanentes eran escasas aunque pudo medirse virus infectivo en cantidades apreciables.

En estos cultivos astrogliales infectados con HSV-1, la presencia de replicación viral pudo caracterizarse a través de la inmunodetección de sus antígenos, en áreas en que las células infectadas no presentaban alteraciones evidentes. La marcación apareció en focos de positividad (Fig. 7a), en los cuales los astrocitos finalmente se redondeaban y desprendían (Fig. 7b). Las etapas más avanzadas de la infección mostraban sincicios y redondeamiento astrocitario, en forma similar a lo descrito en cultivos fibroblásticos.

CURVA DE INFECTIVIDAD HERPES SIMPLEX TIPO I



En cultivos fibroblasticos

Fig. 4

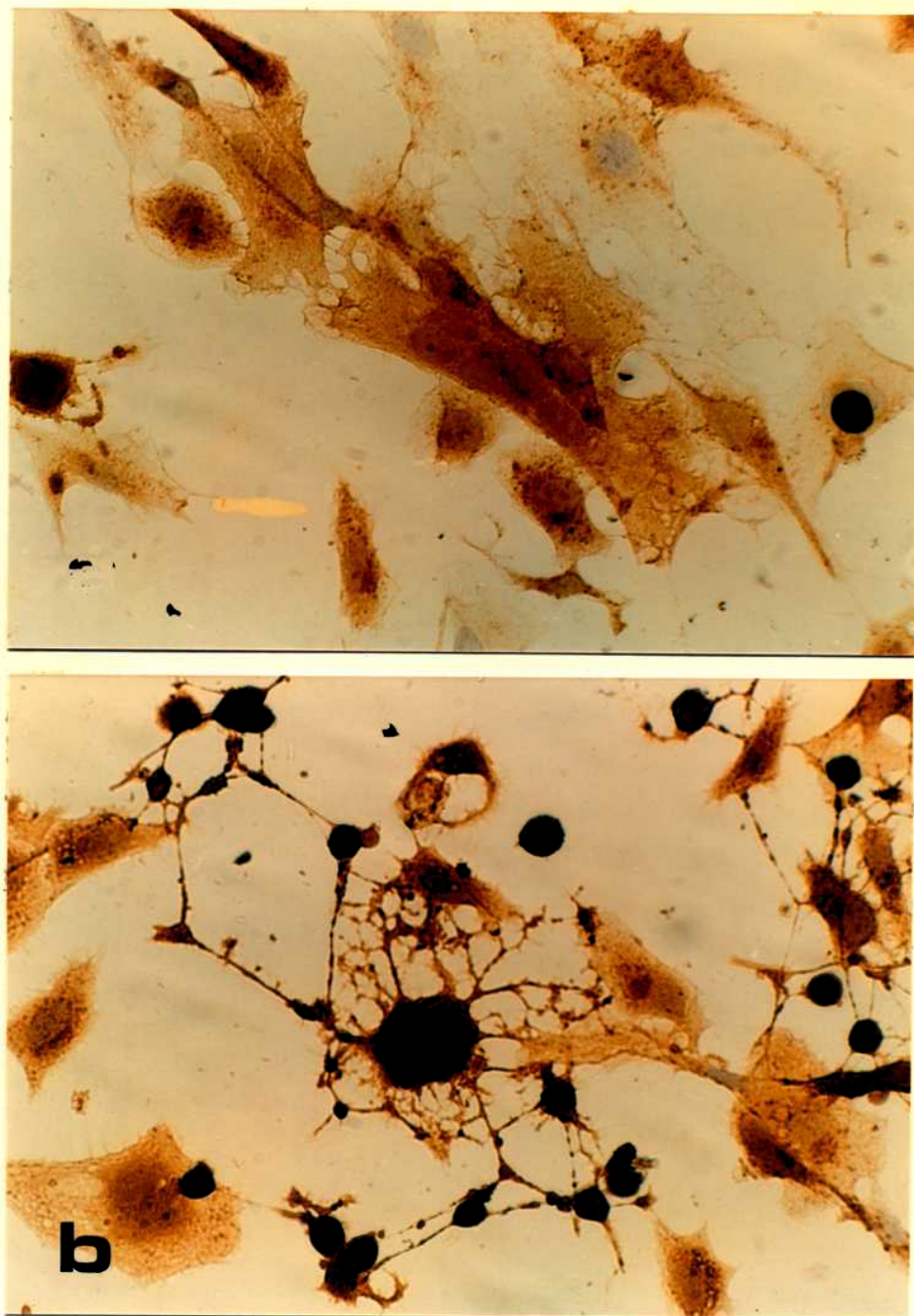


Fig. 5.: Monocapa de fibroblastos de embrión de rata, en su primer subcultivo. 4 días de edad, en su tercer día pi con Herpes simplex-1, a una mdi de 10. Tinción de antígeno viral por método PAP, utilizando DAB como revelador.

- a: Un campo del preparado que muestra positividad en sincicios bajo proceso de fusión. En la vecindad, células débilmente positivas. x360.
- b: Otro campo del mismo preparado. Positividad en células multinucleadas que exhiben prolongaciones dendríticas y, en ocasiones, redondeamiento del cuerpo celular por retracción del citoplasma y vacuolización. x360.

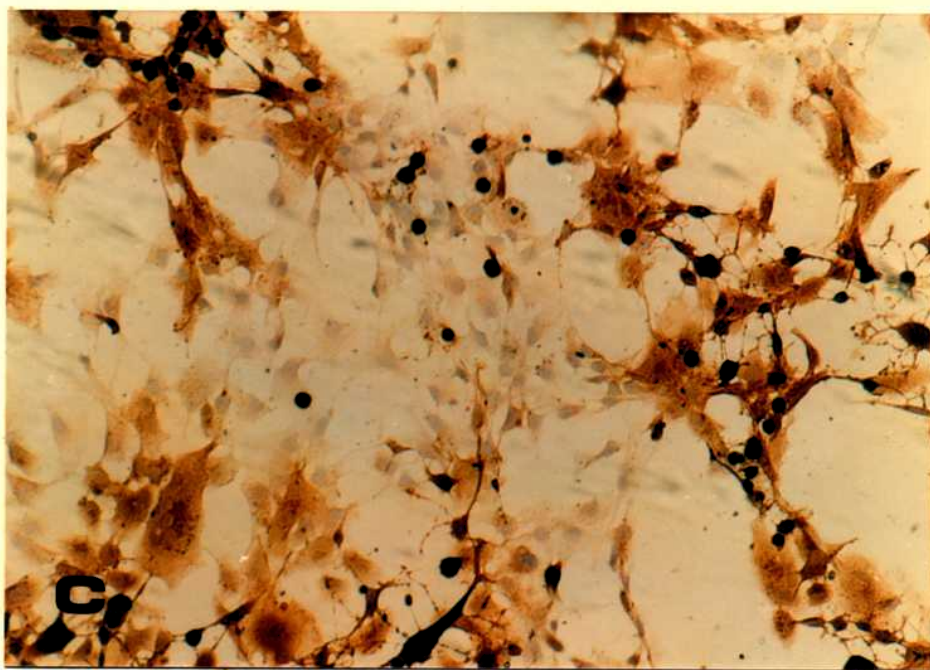
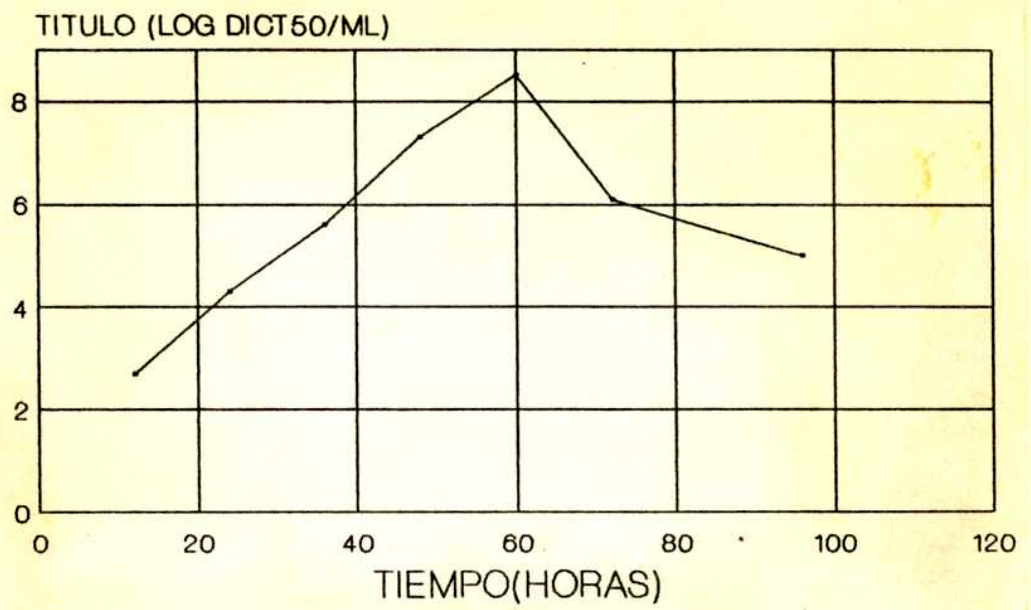


Fig. 5 c :: Intensa marcación de Ag viral tanto en células mononucleares como en policariocitos, que coexisten con células negativas. x144.

CURVA DE INFECTIVIDAD HERPES SIMPLEX TIPO I



En cultivos astrocitarios

Fig. 6

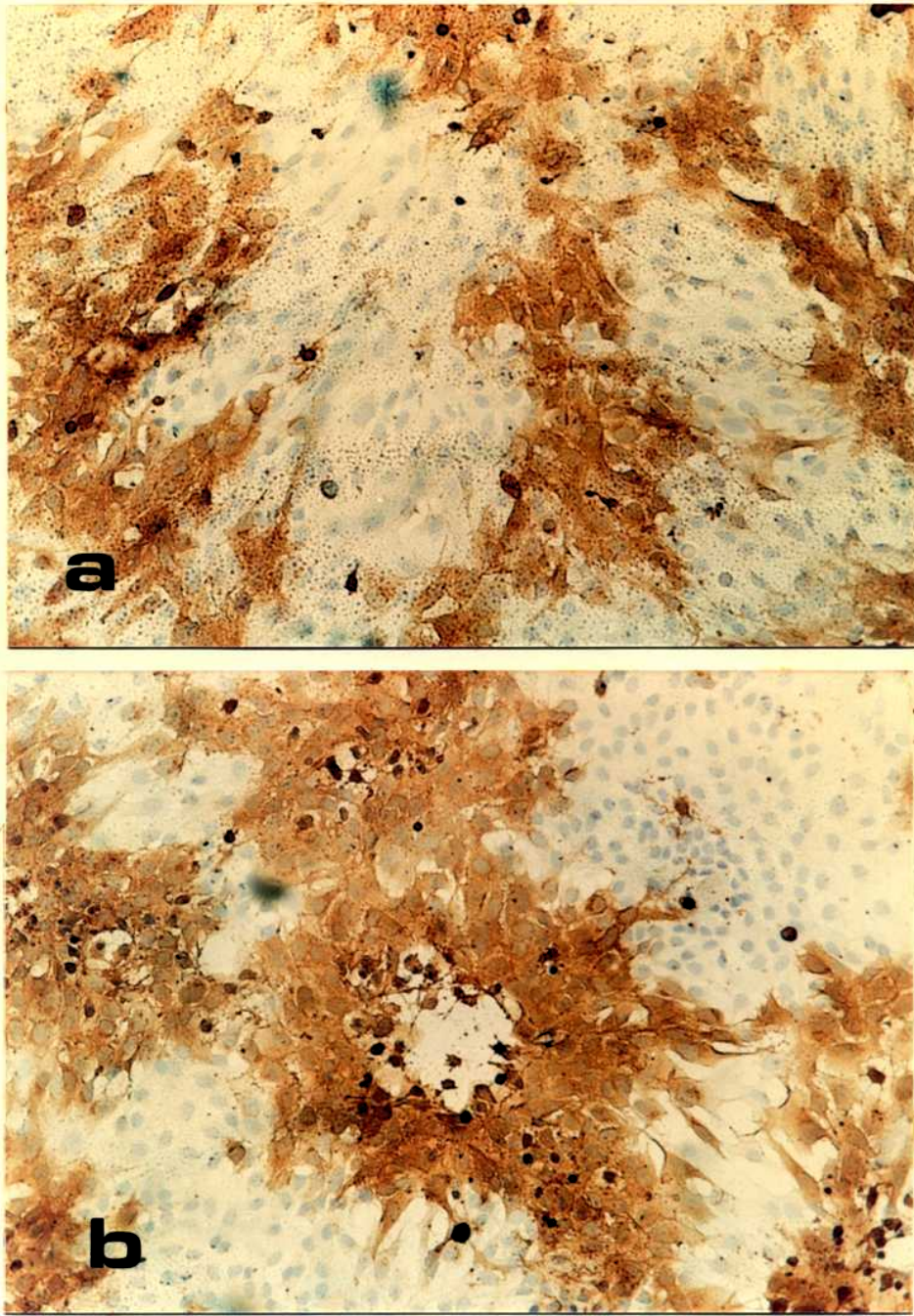


Fig. 7: Monocapa de astrocitos de ratas neonata, en su primer subcultivo. 5 días de edad, incluyendo 4 días de infección con Herpes simplex-1, a una mdi de 1.

a: focos de células inmunomarcadas alternan con zonas negativas. x144.

b: en el centro de un foco de infección, área de lisis con desprendimiento celular. x144.

4.5. Inmunomarcación simultánea de Ag-HSV-1 en cultivos fibroblásticos y astrocitarios

Los fenómenos patogénicos inducidos por el HSV-1 sobre la morfología celular podían tener su correlato a nivel de la ME, o más precisamente a nivel de la FN, una de las principales glicoproteínas de conexión de la superficie celular-y a través de receptores transmembranales al citoesqueleto- con el resto de las matrices.

A fin de correlacionar, en la misma monocapa, la presencia de antígenos virales localizados en las células, con la distribución de FN pericelular, se desarrolló una técnica de doble marcación por el método PAP, procedimiento que recurre a la tinción sucesiva de los dos antígenos con cromógenos diferentes, similar al utilizado para teñir GFAP y FN en cultivos astrocitarios (ítem 4.3).

Los cultivos fibroblásticos infectados presentaban zonas negativas para el Ag-HSV-1 donde la matriz de FN permanecía indemne; en cambio, en las áreas en donde se observaba acción citopática y positividad para el Ag viral, el patrón fibrilar característico mostraba alteraciones evidentes. En sincicios con signos de intensa síntesis de proteínas virales -que se traduce en una fuerte inmunotinción de núcleos y citoplasma- la matriz de FN se veía alterada, con interrupción, acumulación y desprendimiento de fibras (Fig. 8a). Sobre algunos de los fibroblastos infectados sólo llegaban a observarse restos de FN sin organización fibrilar (Fig. 8b). Las células gigantes, de finas prolongaciones dendríticas, carecían de FN observable en su superficie (Fig. 8c).

En etapas tempranas de la infección de astrocitos jóvenes la tinción para Ag-HSV-1 sólo se observaba sobre células o sincicios aislados, en los cuales fue notable la ausencia de FN pericelular; en contraste, el resto de la monocapa no infectada no mostraba alteraciones detectables (Fig. 9a). Gradualmente, la marcación se hizo más intensa, tanto en sincicios como en células redondeadas, a la vez que aumentaba el tamaño de los poliocariocitos y el número de núcleos. Concomitantemente hubo una pérdida de FN pericelular (Fig. 9b). Al mismo tiempo, las fibras remanentes en los bordes de los sincicios parecían más gruesas que las de cultivos controles (Fig. 9b). Es de destacar, que algunos astrocitos positivos para el Ag-HSV-1 carecían tanto de efecto citopático como de cambios en la FN matricial (Fig. 9c). Por otra parte, el desarrollo de sincicios modificó drásticamente los patrones de FN, con la aparición de células multinucleadas casi carentes de FN pericelular y cuyas prolongaciones, tipo filopodio, se interconectaban. Allí, la típica red de FN fue reemplazada por una distribución en parches y fibras engrosadas (Fig. 9d). En algunas células uni o multinucleadas, con signos de retracción y marcadas intensamente para Ag viral, no se detectó FN pericelular (Fig 9e).

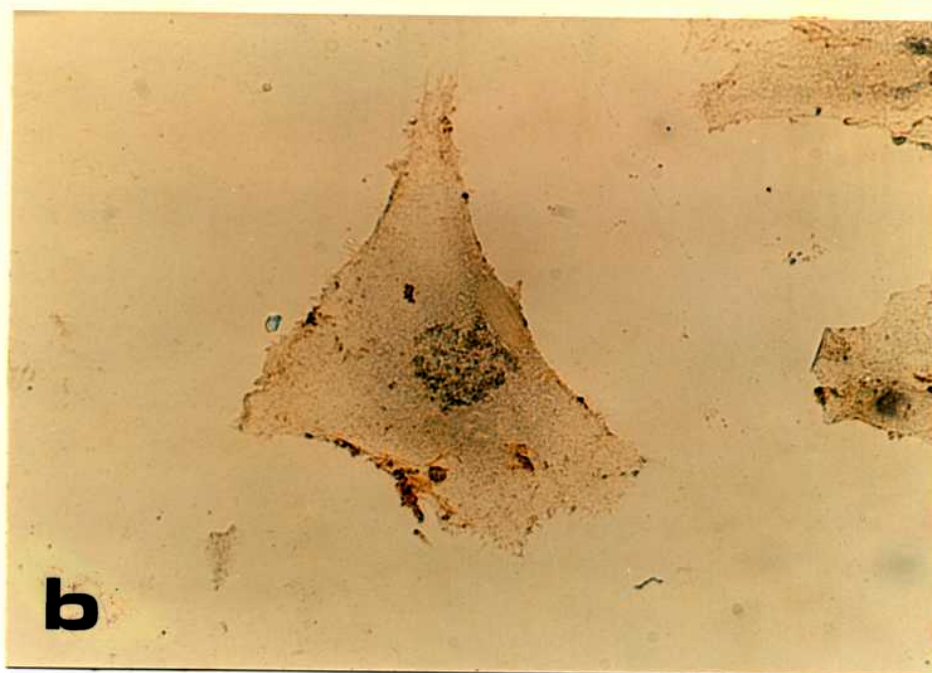


Fig. 8: Monocapa de fibroblastos de embrión de rata, en su primer subcultivo. 3 días de edad, incluyendo 1 día de infección con HSV-1. Doble marcación por método PAP: FN con DAB (marrón dorado) y antígeno viral con 1-Cl, 4-Naftol (azul).

a: La marcación de proteínas virales es evidente en núcleos (punta de flecha) y en citoplasmas perinucleares (flechas) de los sincicios. Las fibras de FN se observan interrumpidas (flechas pequeñas) o acumuladas en parches. x360.

b: Célula infectada con inmunorreactividad citoplasmática para antígeno viral, con restos de FN en los bordes celulares y sin organización fibrilar. x360.

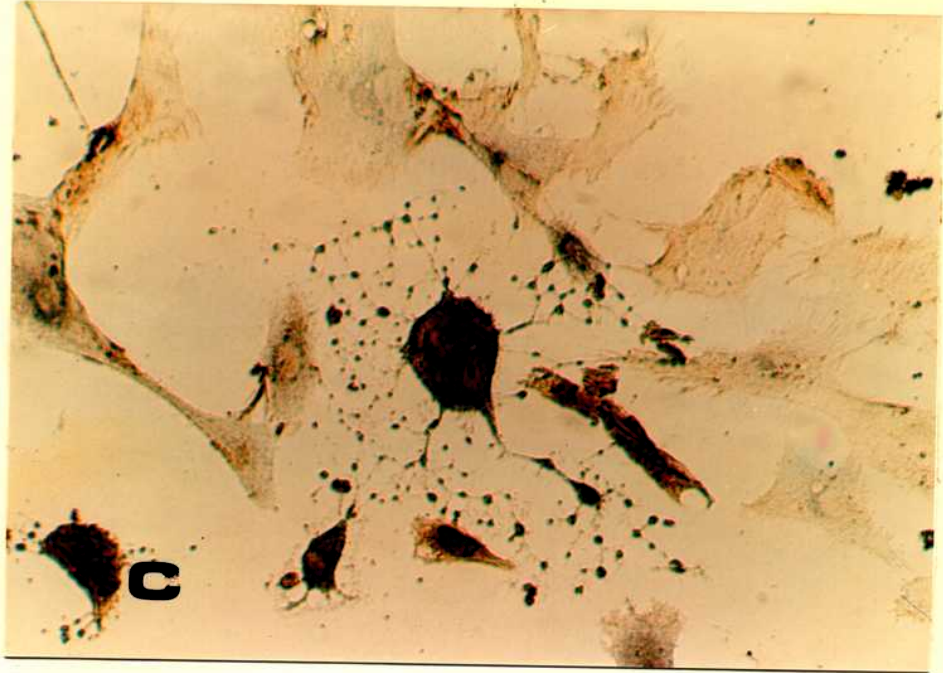


Fig. 8. c: Célula de características aberrantes intensamente teñida para HSV. De su cuerpo redondeado parten finas prolongaciones que se ramifican y que presentan engrosamientos nodulares de diámetro variable. No se observan restos de FN fibrilar. x360.

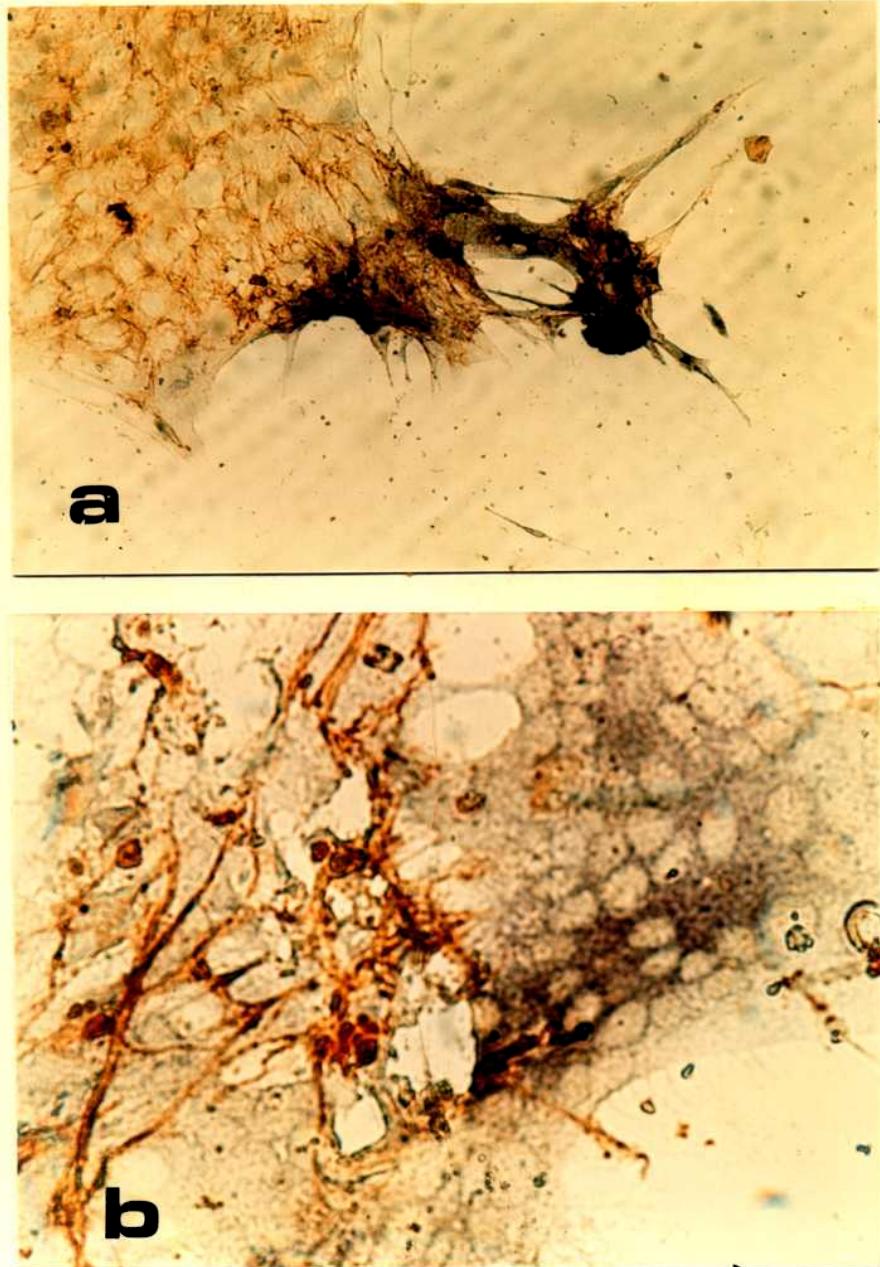


Fig. 9: Monocapa de astrocitos de rata recién nacida, en su primer subcultivo. 10 días de edad incluyendo 1 día de infección con Herpes simplex tipo 1, a una mdi de 10. Doble marcación por método PAP: FN con DAB (marrón dorado) y antígeno viral con 1-Cl, 4-Naftol (azul grisáceo).

- a: La red de FN inmunomarcada sólo se ve interrumpida sobre un sincicio positivo para Ag-HSV. x144.
- b: Enorme sincicio, con más de 30 núcleos, con escasa positividad, mientras algunas zonas citoplasmáticas están fuertemente teñidas. Las fibras de FN, más gruesas que en cultivos controles, se encuentran en los márgenes de policariocito. x360.

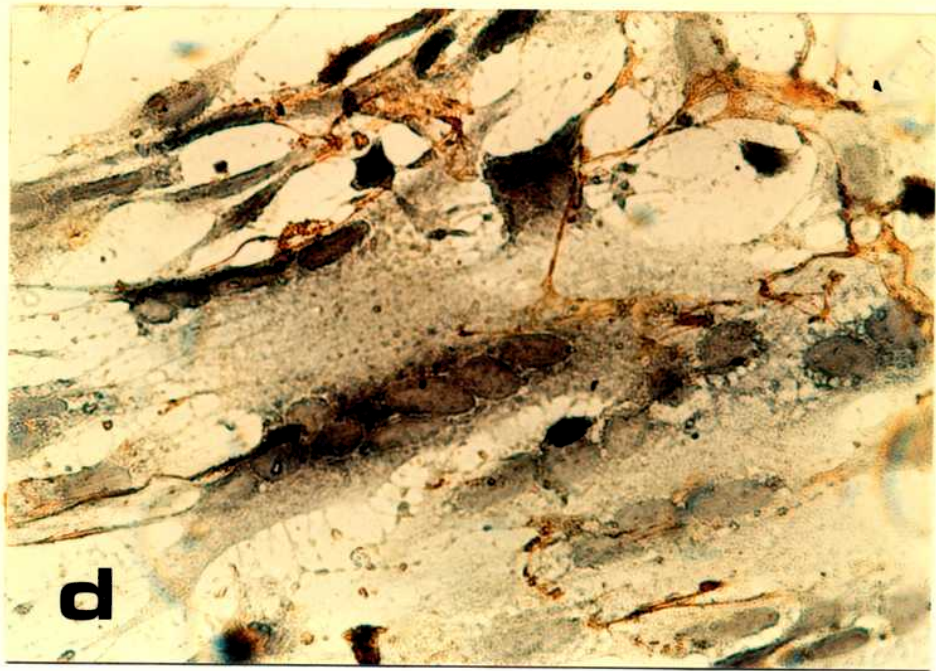
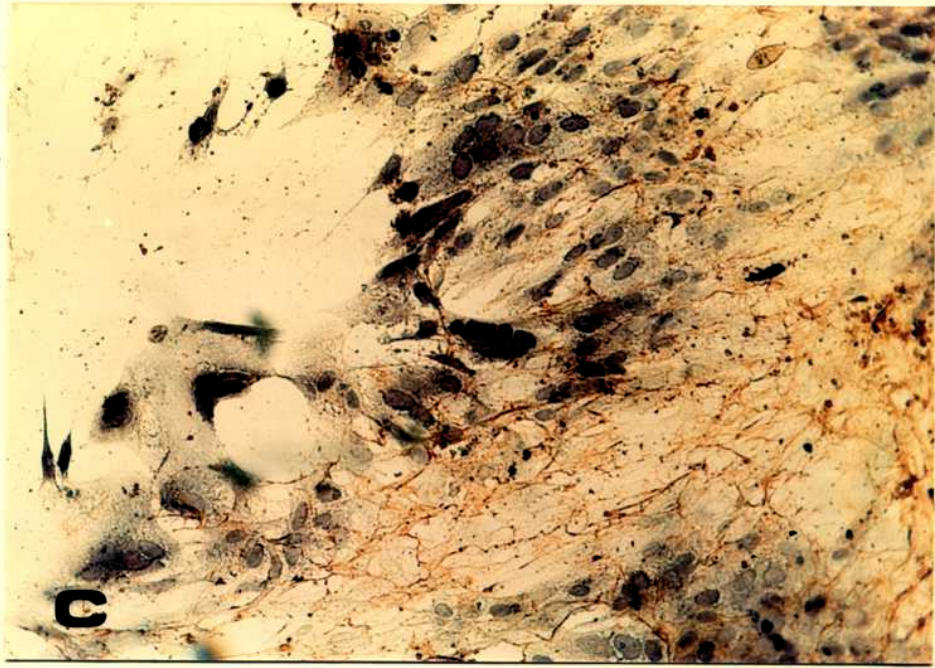


Fig. 9: c: Otra zona infectada del mismo cultivo, con evidente presencia de antígeno viral en los núcleos celulares, sobre todo en la periferia de los mismos. La FN pericelular parece no haber sido afectada. x144.

d: Policariocitos con positividad para Ag-HSV en sus núcleos y citoplasmas muestran FN fibrilar de aspecto anómalo. x360.



Fig. 9 e: Ausencia de FN asociada a células con prolongaciones dendríticas, fuertemente teñidas para Ag-HSV. x144.

La inmunomarcación del Ag-VJ se extiende en todo el citoplasma de las células estrelladas (Fig. 13), mientras que las células Ag-VJ negativas conservan la forma poligonal o ahusada.

4.6. Detección de virus infectivo y antígenos virales en cultivos fibroblásticos y astrocitarios infectados con virus Junín

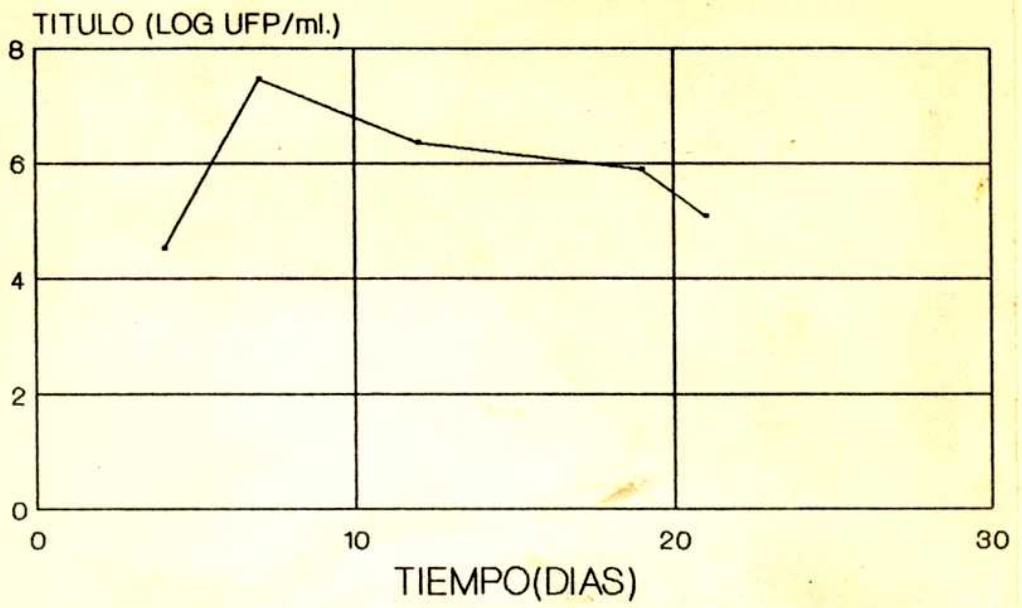
El virus Junín (VJ) multiplica en una gran variedad de células de mamíferos, sin aparente restricción al nivel de entrada (4). Sin embargo, pese a que no se conocen ciclos abortivos, la replicación es pobre y cursa sin efecto citopático, salvo en algunas líneas celulares establecidas como Vero (18, 31) y MRC-5 (103), en que se han desarrollado ensayos de placas para cuantificar virus infectivo.

Los títulos infectivos más altos encontrados en estudios secuenciales sobre cultivos fibroblásticos, se observaron entre los días 7 y 10 pi (Fig. 10). A los 7 días pi la inmunomarcación de Ag-VJ se visualizaba en focos de células positivas que no diferían morfológicamente de las negativas que las rodean (fig. 11). La tinción es citoplasmática con apariencia granular o reticular (Fig. 11b).

En monocapas de estirpe astrocitaria, la curva de infectividad posee una modalidad similar a la descrita para cultivos fibroblásticos, con títulos máximos a los 7 días pi. Al igual que lo que sucede con el HSV-1, los títulos de los sobrenadantes son menores en células astrogliales que en fibroblastos (Fig, 12).

En células astrogliales, el VJ es capaz de acelerar la maduración in vitro (6), a través de un aumento de la GFAP y la aparición de células diferenciadas morfológicamente. Los astrocitos difieren fenotípicamente de los de la misma edad presentes en cultivos sin infectar, ya que existe un achicamiento del cuerpo celular y un aumento de los espacios intercelulares, al tiempo que se observa que las prolongaciones se alargan y afinan.

CURVA DE INFECTIVIDAD VIRUS JUNIN



En cultivos fibroblasticos

Fig. 10

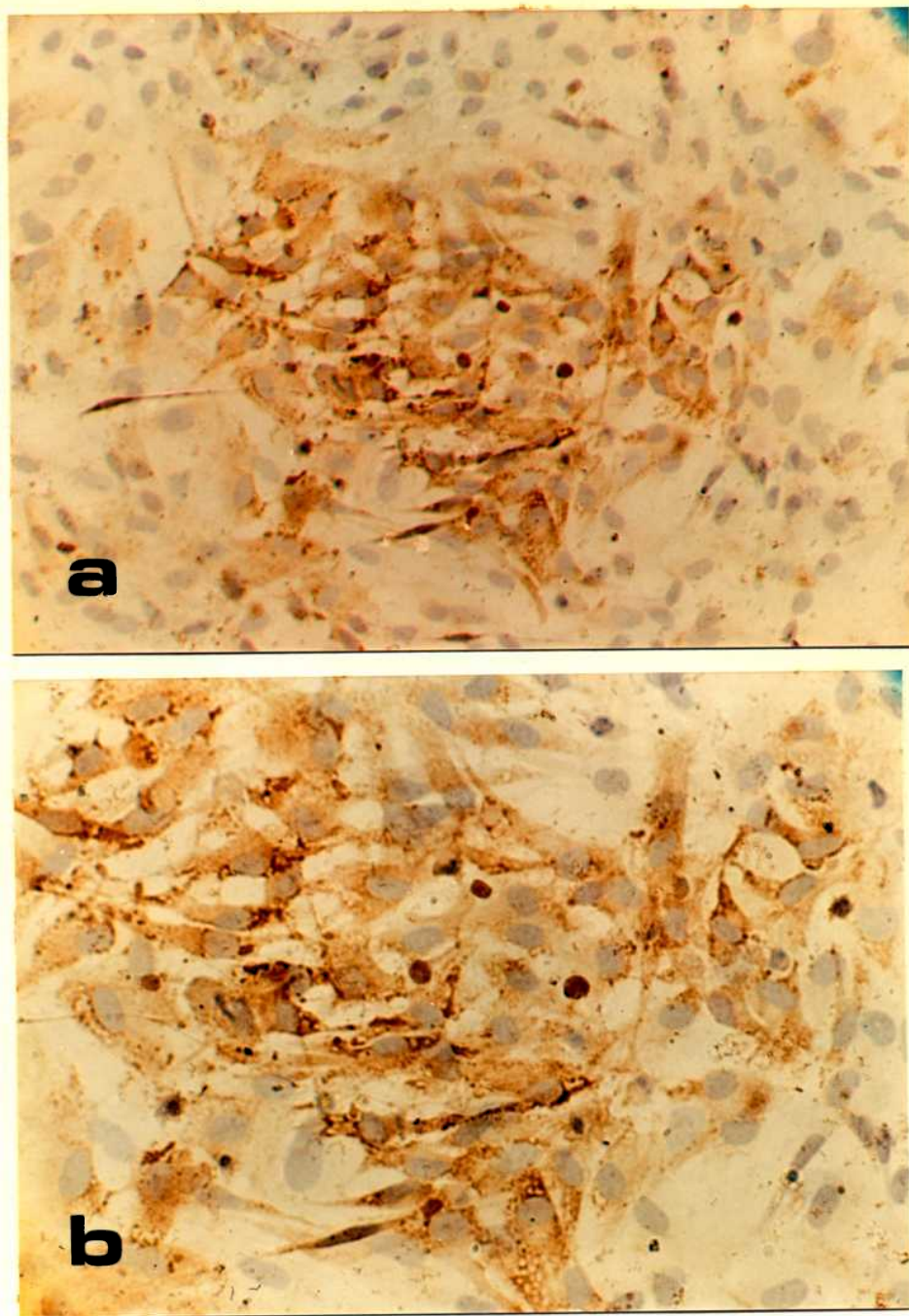
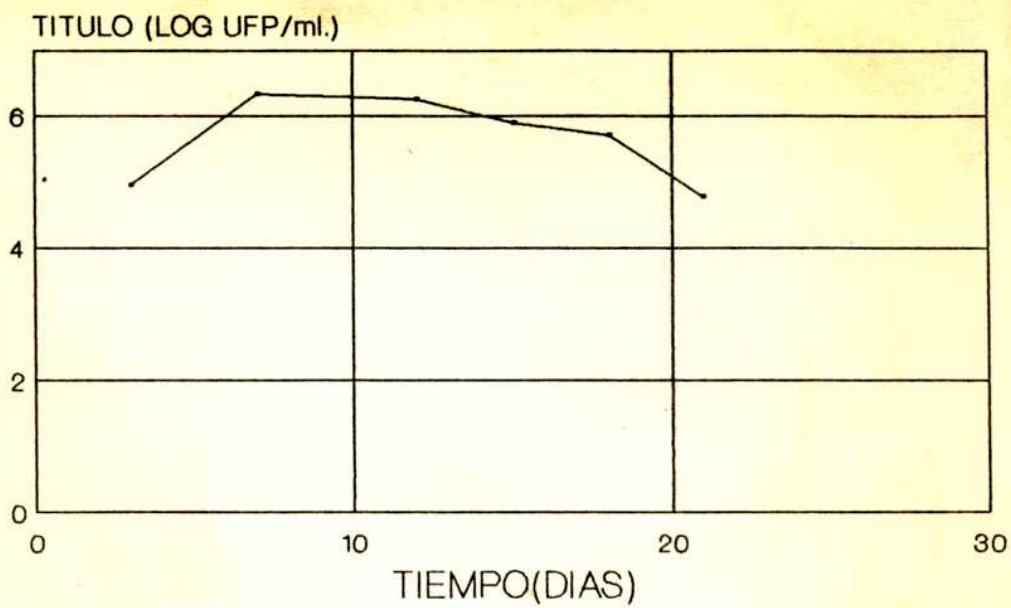


Fig. 11: Monocapa de fibroblastos de embrión de rata, en su primer subcultivo. 9 días de edad, incluyendo 7 días de infección con virus Junín. Marcación de antígeno viral por método PAP, usando DAB como revelador.

- a: foco de inmunomarcación en área constituida por células sin alteraciones morfológicas evidentes. x144.
- b: a mayor aumento se visualiza la diferente intensidad de la marcación, que se evidencia por acúmulos granulares (flechas) o por distribución reticular (punta de flecha).x230.

CURVA DE INFECTIVIDAD VIRUS JUNIN



En cultivos astrocitarios

Fig. 12

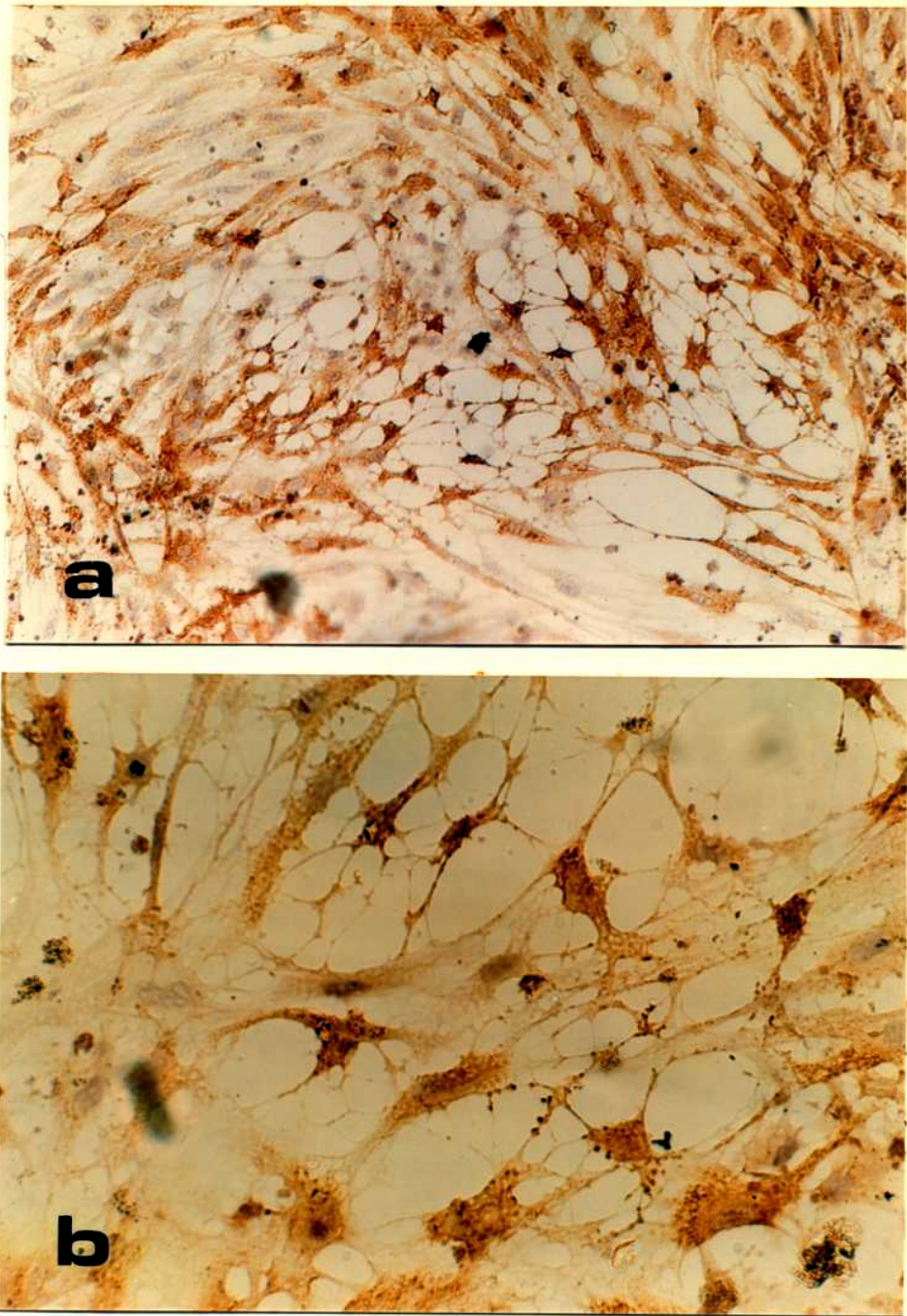


Fig. 13: Monocapa de astrocitos de embrión de rata, en su primer subcultivo. 11 días de edad, incluyendo 7 días de infección por virus Junín. Marcación de antígeno viral por método PAP, usando DAB como revelador.

a: Las células fuertemente inmunomarcadas exhiben el aspecto típico de astrocitos diferenciados. Débil tinción en algunas células que mantienen el aspecto chato y ahusado de los astroblastos. x144.

b: Detalle de a, para mostrar la distribución característica del antígeno viral en los astrocitos madurados. x230.

4.7. Inmunomarcación simultánea de antígenos de VJ y FN en cultivos fibroblásticos y astrocitarios

Para la inmunomarcación de Ag-VJ y FN extracelular por la técnica PAP se debió realizar una variante, con el fin de lograr una óptima tinción de ambos antígenos. La mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos contra varias proteínas del VJ que constituye el anticuerpo primario de la reacción, debió incubarse por el lapso de 4 días para obtener resultados satisfactorios. Por otra parte, la revelación con DAB reporta mayor sensibilidad que la llevada a cabo con 1-Cl,4-naftol, ya que es superior en la detección de antígenos presentes a bajas concentraciones o en casos en que los anticuerpos primarios posean baja afinidad. Este es el caso de los anticuerpos anti-VJ, y por esa razón se decidió recurrir a la DAB como revelador de la tinción de Ag-VJ y el 1-Cl,4-naftol para la de FN.

En los cultivos fibroblásticos, la matriz reticular de FN no pareció alterarse en el entorno de las células Ag-VJ positivas (Fig. 14a). No pudieron observarse diferencias en cuanto al grosor, integridad o densidad de las fibras, respecto de células Ag-VJ negativas (Fig. 14b).

En cultivos astrocitarios el VJ es liberado al sobrenadante como virus infectivo durante un lapso superior a las 3 semanas, aunque los niveles máximos aparecen alrededor de los 7 días pi y permanecen una semana más.

En cuanto a la repercusión de la infección de VJ sobre astrocitos, pese a afectar la morfología de los mismos además de aumentar la capacidad fagocítica (51), no se detectaron modificaciones en la FN pericelular (Figs. 15a y 15b).

En cultivos con mayor tiempo de infección no parece haber variaciones.

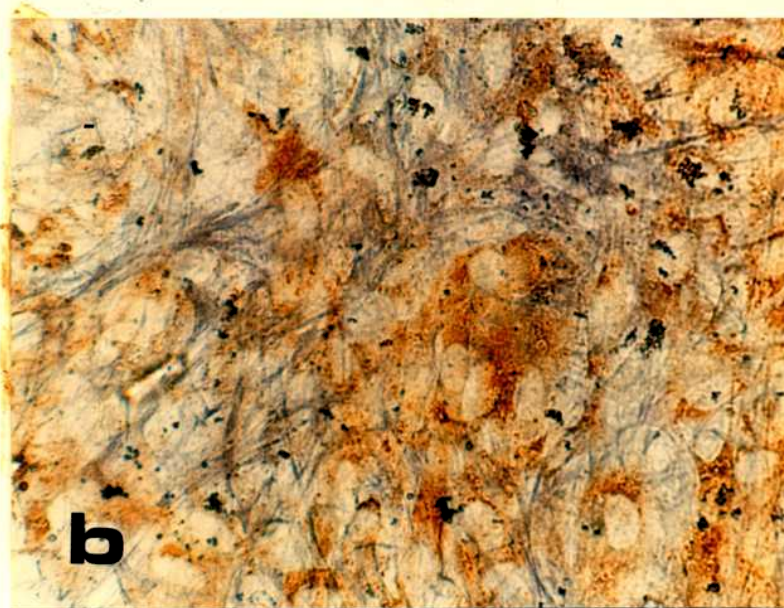
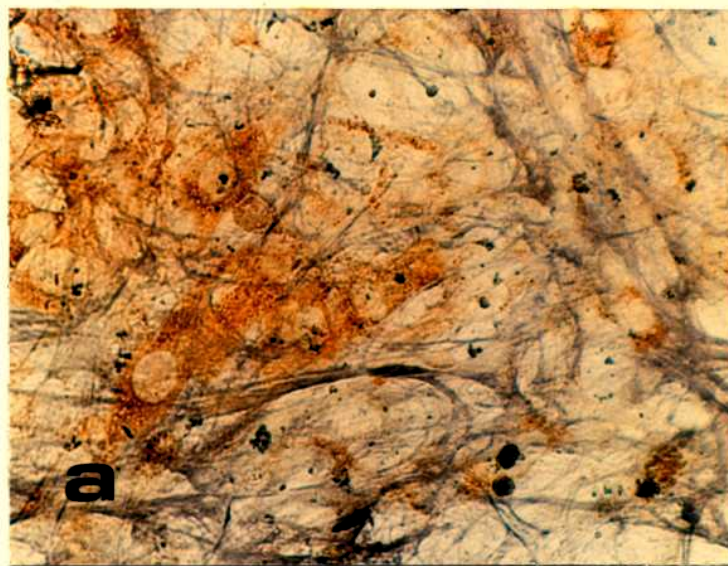


Fig. 14: Monocapa de fibroblastos de embrión de rata, en su primer subcultivo. 9 días de edad, incluyendo 7 días de infección con virus Junín. Doble marcación por método PAP: FN con 1-Cl,4-Naftol (azul grisáceo) y antígeno viral con DAB (marcación dorado)

- a: áreas de inmunomarcación, constituidas por células sin aparentes cambios morfológicos se observan sobre un fondo de células negativas. x144.
- b: detalle de a, para mostrar coexistencia de citoplasmas francamente teñidos para antígeno viral y de una red de FN pericelular. x360.

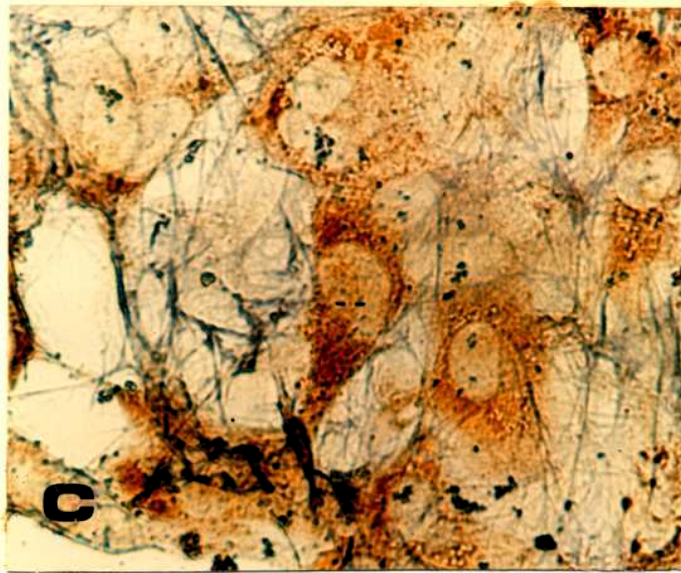


Fig. 14 c: A mayor aumento, para corroborar el mantenimiento de la red de FN en torno a 2 células positivas para antígeno viral. x580.

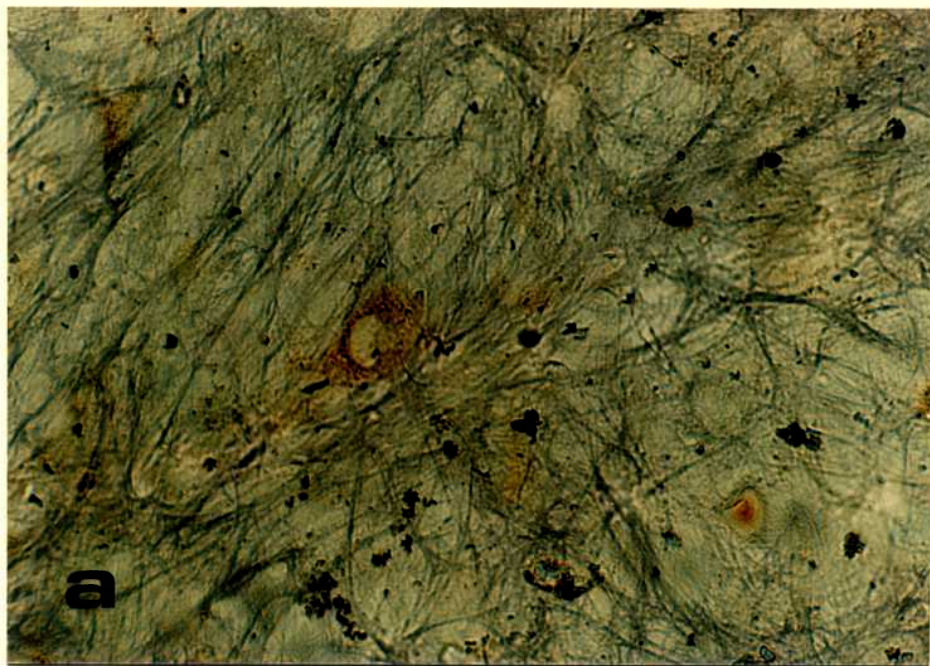


Fig. 15: Monocapa de astrocitos de rata neonata, en su primer subcultivo. 11 días de edad, incluyendo 7 días de infección con virus Junín. Doble marcación por método PAP: FN con 1-Cl,4-Naftol (azul grisáceo) y antígeno viral con DAB (marrón dorado).

- a: En la monocapa se visualizan escasas células positivas para antígeno viral, con persistencia de la red de FN extracelular. x360.
- b: Otra área mostrando mayor generalización e intensidad de la infección. Pese a ello, la matriz de FN pericelular se mantiene indemne. x360.

5. DISCUSION

Los cultivos celulares han probado ser el sistema in vitro que mejor reproduce los caracteres morfológicos y biológicos de los tejidos animales. Además, tienen la ventaja de que en ellos pueden controlarse a voluntad un número limitado de variables. Sin embargo, se debe tener cautela con respecto a eventuales extrapolaciones de resultados obtenidos en estos sistemas, que precisamente se caracterizan por obviar condiciones que son propias del organismo entero.

Los cultivos primarios de fibroblastos representan un modelo adecuado de células mesenquimáticas, y han sido asiduamente utilizados en gran cantidad de estudios en diversos campos de la biología celular, tales como ultraestructura, fisiología, farmacología, diferenciación, envejecimiento, interacción virus-célula, etc.

Por otra parte, las células disociadas de encéfalo de rata recién nacida han sido el modelo más utilizado como ejemplo de células astrogliales en cultivo.

Estas y otras clases de células en cultivo dependen, en cuanto a sus propiedades biológicas y bioquímicas, de los factores del medio. Entre ellos se incluyen las moléculas solubles presentes en el medio de cultivo, la fase gaseosa de intercambio con él, y el sustrato donde las células se asientan, el cual está formado por las paredes del frasco de cultivo y la matriz extracelular secretada por las células.

5.1. Inmunomarcación de FN en cultivos fibroblásticos

Dado que en la extensa bibliografía existente sobre inmunomarcación de FN en fibroblastos cultivados, había sido la inmunofluorescencia la técnica más empleada (99,37,101), se decidió poner a punto una metodología recurriendo a un procedimiento de mayor sensibilidad, como es la técnica PAP, y que a la vez permite la simultánea visualización de la monocapa por tinciones convencionales, y el acceso a una mejor imagen por combinación con instrumental óptico especial (contraste de fase, campo oscuro, Nomarski, interferencia, polarización).

Nuestro método, que recurre a variadas condiciones de fijación y esquemas de incubación de los anticuerpos primarios, permitió la inmunotinción de la FN con elevada sensibilidad y especificidad en los diferentes dominios en que ella se localizaba.

La fijación a muy baja temperatura con una mezcla de metanol y ácido acético -procedimiento ya empleado con éxito en la inmunotinción de antígenos del virus Junín (59)- produjo una marcación citoplasmática de mayor nitidez que otros fijadores ensayados, que incluyeron paraformaldehído (PF), PF más glutaraldehído, metanol, Carnoy y Bouin.

En cuanto a la FN extracelular, la técnica PAP aquí empleada confirmó resultados obtenidos por inmunofluorescencia (37,101). Además, gracias a la buena fijación lograda con paraformaldehído previa a la incubación con el anticuerpo primario, se logró preservar la inmunorreactividad, la que se evidenció exclusivamente como FN fibrilar, tanto en la cara ventral -asociada a los contactos adhesivos- y dorsal de la célula, como en los bordes del soma y las prolongaciones.

El procedimiento de doble incubación con el suero anti-FN,

antes y después de una doble fijación con PF y metanol ácido, produjo una delicada marcación de la FN citoplasmática (antes de ser secretada) y matricial (polimerizada en fibras). Es probable que la muy breve fijación con metanol ácido precipite rápidamente a la glicoproteína y, por otro lado, favorezca la penetración de los anticuerpos al disolver los lípidos de membrana. El alcohol ácido a muy baja temperatura ya ha sido referido como un excelente preservador de la antigenicidad (42), ya que permite detectar a la FN de tejidos incluidos en parafina con la misma sensibilidad que en cortes por congelación de tejidos no fijados. Junto a la aplicación de métodos ultraestructurales (30,37,72,29), el procedimiento aquí descrito ofrece ventajas en cuanto a poder optar por el tipo de FN que se desea inmunomarcarse.

5.2. La FN en cultivos de células astrocitarias

La FN en su forma celular ha sido encontrada en la ME de diversas clases de células en cultivo (43,49,29). En cuanto a las de tipo astrocitario, la presencia de FN fue descrita por primera vez por Vaheri y col. (99), quienes por inmunofluorescencia la detectaron en líneas gliales normales y neoplásicas.

Sin embargo, estudios posteriores no lograron detectar FN en la ME de cultivos primarios derivados de encéfalo de rata, lo que motivó una larga controversia acerca de la expresión o no de FN por estas células neurales. Es de destacar que en uno de esos trabajos (79) no se especifica la edad del cultivo, mientras que en otro (94), no se refieren datos acerca de las condiciones de fijación de la monocapa ni otros detalles de la inmunotinción.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran la temprana síntesis de FN por células astrocitarias derivadas

de encéfalo de rata neonata, visualizada a través de la inmunomarcación citoplasmática. En las primeras horas post-siembrala marcación es predominantemente perinuclear y no matricial, pero paulatinamente se observa la aparición de fibras asociadas al entorno celular.

A medida que aumenta la edad del cultivo, la red fibrilar es más densa, y al mismo tiempo se sigue detectando FN intracelular, aunque más débilmente y en menor número de células, lo que indica que se sigue sintetizando y depositando, pero probablemente en forma más lenta que en la inmediata post-siembrala.

Estos resultados indican que la FN pericelular sería necesaria para la adhesión y expansión de los astrocitos inmaduros, pero, a medida que el cultivo se hace más denso, estableciéndose los contactos célula-célula. al tiempo que disminuye la tasa de división y la movilidad celular, la síntesis de FN decae.

En base a métodos inmunocitoquímicos y por iodinación, Price y Hynes (80) refieren, aunque sin especificar la edad del cultivo, que los astrocitos cultivados poseían muy escasa FN en sus superficies pese a que la sintetizaban en cantidades comparables a fibroblastos.

En nuestras monocapas de edad más avanzada, los astrocitos maduros GFAP positivos, aparecen sobre la red de FN, pero sin mostrar restos de la glicoproteína asociada a su superficie, como sucede en estadios más tempranos.

En algunos sistemas de células en cultivo ya se ha detectado una modulación de la expresión de FN según el grado de diferenciación. Las FNs secretadas al medio por células musculares lisas, así como su capacidad de ser incorporadas a la ME, variaban según fueran células poco o muy diferenciadas (73). En otro trabajo (88) se informa que la FN de pulmón humano es más similar al tipo celular, en tanto que la de adulto se asemeja

más a la de tipo plasmático, lo que indicaría un cambio durante la ontogénesis.

Entre los mecanismos involucrados, además de las variaciones debidas a la diversa expresión de FN durante el desarrollo, pueden incluirse la modulación de las integrinas y otros receptores de las ME, así como la degradación por proteasas pericelulares.

Pese a que sólo se ha detectado FN en meninges y paredes de vasos sanguíneos en SNC de animales adultos (87), durante el desarrollo del SNC se evidencian regiones intensamente teñidas para FN que delinear la ruta migratoria de las neuronas granulares del cerebelo (35) y en las zonas que contienen aferentes corticales cerebrales tempranos (93). En ambos casos, la detección de FN cesa cuando la migración se ha completado.

Estas observaciones, junto a la conocida propiedad de la FN para promover la formación de neuritas in vitro (46), sugieren un papel en la guía de las neuronas y sus axones durante el desarrollo temprano. Por otra parte, es conocido que la FN induce la proliferación de astrocitos en cultivo, además de estimular su migración(32).

El conjunto de estos datos sugiere que los astrocitos jóvenes pueden ser -al menos parcialmente- los responsables de la síntesis de la FN presente en el SNC en desarrollo.

De los trabajos llevados a cabo tanto en nuestro laboratorio como en otros, se deduce la importancia de realizar análisis secuenciales, dado el carácter transitorio y dinámico de las funciones ejercidas por las ME a lo largo de la maduración, tanto in vivo como in vitro.

5.3. Acción citopatogénica del virus Herpes simplex tipo 1 sobre cultivos fibroblásticos y astrocitarios

Los cultivos infectados con HSV-1 presentaron los caracte-

rísticos efectos de fusión, redondeamiento y arracimamiento celular, tanto en fibroblastos como en astrocitos.

En la infección por Herpes simplex se conocen dos mecanismos por los cuales algunas proteínas codificadas por el virus inducen fusión celular. En uno de ellos, la transcripción y la traducción son prerequisites para la iniciación de la fusión, y es llamado fusión desde adentro (FFWI) (25). El otro tipo de fusión, que no los requiere y es más rápido y dependiente de la temperatura, se denomina fusión desde afuera (FFWO) (25), ya que parece producirse por alteración de la membrana plasmática por proteínas virales exógenas.

Según nuestros resultados, en las etapas iniciales de la infección, las células multinucleadas con sus citoplasmas débilmente teñidos para Ag viral podrían producirse por FFWO, en tanto aquellas con núcleos y citoplasmas intensamente positivos se podrían originar por uno u otro de los mecanismos.

5.4. Efectos de la infección por virus Herpes simplex tipo 1 sobre la FN pericelular

La doble marcación inmunocitoquímica de antígeno viral y FN extracelular permitió determinar la precisa correlación entre la extensión de la infección viral y el tipo de efecto citopático con la eventual repercusión en la distribución de la FN matricial.

La FN pericelular de cultivos infectados presentaba características diversas:

- a) Aspecto normal, fibrilar, tanto sobre fibroblastos y astrocitos sin marcación para antígenos virales, como sobre células fuertemente teñidas pero sin redondeamiento ni formación de sincicios.
- b) Fibras engrosadas en los márgenes de algunos sincicios y áreas de intensa necrosis.

c) Parches o gránulos sin organización fibrilar, sobre el sustrato o el borde de algunas células uni o multinucleadas.

Sin embargo, el aspecto más remarcable consistía en la notable pérdida de fibras de FN sobre amplios sectores de la monocapa, principalmente en los estadios terminales de la infección. En el caso de células de aspecto arborescente, pese a que no se visualizó FN asociada a sus superficies, estas permanecían adheridas al sustrato.

En un trabajo de fibroblastos en cultivo transformados por virus, Nigg y col. (77) mostraron, en experimentos con virus que no inducen una modificación sustancial de la forma celular, las células poseen su citoesqueleto intacto, así como su matriz de FN inalterada. En cambio, células transformadas por el virus del sarcoma de Rous o el virus de Abelson que presentan evidentes cambios morfológicos, contienen pocas placas de adhesión y carecen de FN pericelular casi por completo.

Según nuestras observaciones la pérdida o modificación de los patrones normales de FN, también está asociada a cambios en la forma, y por lo tanto a la estructura del citoesqueleto.

Existían estudios previos que se habían referido a la afectación del citoesqueleto durante la formación de policariocitos en cultivos infectados con HSV (38). Se comprobó que se produce una despolimerización de microtúbulos y que las fibras de tensión (stress fibers) constituidas por actina, pierden temporalmente su conexión con la membrana plasmática. Este fenómeno podría resultar en la afectación de las integrinas, que, se sabe, están conectadas a través de la talina (44) con los microfilamentos de actina. De esta manera se induciría una unión anormal de la FN con sus receptores de membrana, con la subsiguiente pérdida de conexión de las fibras con la superficie celular.

La pérdida de FN parece ser un evento previo o simultáneo a la fusión, ya que aún en períodos más precoces de la infección a baja mdi, donde casi toda la monocapa presentaba aspecto normal, la FN estaba ausente sobre algunos sincicios aislados.

Con respecto a algunas células o policariocitos que permanecían adheridos pese a la ausencia aparente de FN pericelular, Curtis y Mc Murray observaron un fenómeno similar (13), cuando describen adhesión de fibroblastos aún después de la inhibición de FN con péptidos que compiten por sus receptores y en ausencia de síntesis proteica.

Sin embargo, en etapas avanzadas de la infección de nuestros cultivos, las células se desprendían del sustrato. La conocida acumulación de la glicoproteína D viral en áreas de adhesión de células infectadas (78), sugiere intrincadas relaciones del virus con zonas en que el citoesqueleto se relaciona con la ME (10).

Por otra parte, es conocida la acción de virus transformantes que inducen redondeamiento y pérdida de FN pericelular (1, 47,99,101,77). Se han postulado varios mecanismos para explicar este fenómeno, tales como fosforilación de receptores y proteínas asociadas con ellos (41), inducción de proteasas que degradan FN (16,45,74) y disminución de los niveles de colágeno requeridos para proteger a la FN frente a esas proteasas (15).

Con respecto a la infección viral productiva, es escasa en cambio la información disponible acerca de su repercusión sobre la ME. Sin embargo, se conocen algunos ejemplos de interacciones de FN con partículas virales o algunos de sus componentes. En uno de estos trabajos se vio que, luego de la infección con HSV, partículas virales luego de ser sedimentadas por ultracentrifugación se agrupaban en conglomerados formados por

un material que se inmunoteñía para FN (20). La degradación de la FN por las proteasas inducidas durante la infección por HSV (21) podría explicar la pérdida de la FN detectada en nuestros estudios.

Sin embargo, aún no existen pruebas directas que expliquen el mecanismo por el cual la infección viral, productiva o transformante, afecta la unión de la matriz pericelular con la superficie celular, ya sea a través de la desorganización del citoesqueleto, la desaparición de receptores, o la ruptura de la unión de éstos con las moléculas de la matriz.

En trabajos llevados a cabo con micelas lipídicas que contenían glicoproteínas de la envoltura de ciertos virus (Parainfluenza tipo 1, Influenza A y Parotiditis), se vio que se unían específicamente a la FN (52,54). Dada la comprobada unión de algunos componentes virales a la FN, se postula un papel en la adsorción y opsonización de los virus en el organismo entero.

5.5. Acción citopatogénica del virus Junín sobre cultivos fibroblásticos y astrocitarios

Durante el curso de una infección productiva in vitro, los virus pueden producir:

- a) Un ataque letal por productos tóxicos del genoma viral o disrupción de las funciones regulatorias celulares.
- b) Infección persistente sin efecto citopático, donde las células infectadas pueden tener tanto apariencia morfológica como velocidad de crecimiento normales, pero pueden mostrar anomalías en algunas de sus funciones. En este caso, puede producirse la inserción de antígenos extraños al huésped o una alteración de los antígenos del huésped de la superficie

celular, que en el organismo pueden provocar una respuesta de hipersensibilidad retardada.

El VJ persiste por largos períodos en cultivos fibroblásticos, con liberación de virus infectivo, pero sin producir alteraciones morfológicas evidentes.

En células astrocitarias en cultivo, el VJ acelera la diferenciación morfológica a través de un reordenamiento de los componentes del citoesqueleto (6).

5.6. Efectos de la infección por VJ sobre la FN pericelular

En nuestros estudios inmunocitoquímicos de fibroblastos infectados con VJ, las células en que se evidenciaba presencia de antígenos virales no mostraban modificaciones en su FN matricial pericelular.

Tampoco pudieron observarse cambios en la FN matricial de cultivos astrocitarios infectados, salvo los que tienen lugar en células maduras espontáneamente.

Las células infectadas con VJ, a pesar de soportar la replicación viral por lapsos prolongados, no sufren modificaciones sustanciales en la organización del citoesqueleto ni de los complejos de adhesión al sustrato. La matriz pericelular, que contribuye decisivamente en la adhesividad y el mantenimiento de la morfología celular, tampoco parece afectarse, en los dos sistemas estudiados.

6. CONCLUSIONES

La utilización de una metodología expresamente adecuada permitió caracterizar a la FN, tanto en células fibroblásticas, en que la FN había sido extensamente estudiada, como en células astrocitarias en cultivo primario, cuya presencia había suscitado divergencias en los trabajos llevados a cabo hasta entonces en varios laboratorios.

Los estudios secuenciales dejaron en claro que la FN posee diferentes localizaciones a lo largo de la evolución del cultivo, y señalan la importancia de este procedimiento en ocasión del análisis funcional de los componentes celulares en etapa de desarrollo.

La acción de un virus que modifica la morfología celular, como es el HSV-1, induce una alteración sustancial en la distribución de la FN asociada a la superficie de las células infectadas. Cuando se detectó antígeno viral, pero no alteraciones en la forma de la célula, la FN matricial permaneció con escasas modificaciones, respecto de las células no infectadas. Tanto los fibroblastos como los astrocitos jóvenes en cultivo, presentaron similares efectos citopáticos con repercusión sobre la FN pericelular.

El VJ, que no provoca acción citopática aparente en fibroblastos y que induce aceleración de la maduración en astrocitos, no tuvo una influencia evidente sobre la estructura de la FN de células infectadas.

De acuerdo con estas observaciones, se concluye que la acción de ciertos factores biológicamente activos sobre la organización de los elementos que mantienen la forma celular, como el citoesqueleto o los complejos de unión al sustrato, producen una pérdida o redistribución de la FN pericelular.

Se hace evidente la necesidad de estudios inmunocitoquí-

micos y ultraestructurales en combinación con análisis de la expresión génica -tanto a nivel de la transcripción y la maduración de los transcritos como de los polipéptidos resultantes- para el acceso a un conocimiento más preciso de las relaciones estructurales y funcionales que existen entre las células y sus matrices pericelulares.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1- Ali IU, Mautner RP, Lanza RP, Hynes RO: Restoration of normal morphology, adhesion and cytoskeleton in transformed cells by addition of a transformation-sensitive surface protein. Cell 11:115-126, 1977.
- 2- Alvarez-Buylla A, Merchant-Larios H: Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration. Exp Cell Res 165:362-368, 1986.
- 3- Ben-Ze'ev A: The relationship between cytoplasmic organization, gene expression and morphogenesis. TIBS 11:478-481, 1986.
- 4- Berría MI, Lascano EF: Propagación del virus Junín en cultivos celulares. Ciencia e Investigación 33:355-358, 1977.
- 5- Berría MI, Lascano EF: Comparative study of Junín and Herpes simplex viruses in mouse brain monolayer cultures. Medicina 41:459-466, 1981.
- 6- Berría MI, Lascano EF: Astrocytic differentiation induced by Junín virus in rat brain cell cultures. Acta Neuropathol (Berl) 66:233-238, 1985.
- 7- Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH: The influence of extracellular matrix on gene expression: is structure the message? J Cell Sci Suppl 8:327-343, 1987.
- 8- Blum JL, Zeigler ME, Wicha MS: Regulation of rat mammary gene expression by extracellular matrix components. Exp Cell Res 173:322-340, 1987.
- 9- Buck CA: Integrin, a transmembrane glycoprotein complex mediating cell substratum adhesion. J Cell Sci suppl 8:231-250 1987.

- 10- Burridge K, Molony L, Kelly T: Adhesion plaques: sites of transmembrane interaction between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci Suppl* 8: 211-229, 1987.
- 11- Cornbrooks CJ, Carey DJ, Mc Donald JA, Timpl R, Bunge RP: In vivo and in vitro observations on laminin production by Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 80:3850-3854, 1983.
- 12- Coto CE: Junín virus. *Prog Med Virol* 18:127-142, 1974.
- 13- Curtis ASG, Mc Murray H: Conditions for fibroblast adhesion without fibronectin. *J Cell Sci* 86:25-33, 1986.
- 14- Chakrabarty S, Brattain MG, Ochs RL, Varani J: Modulation of fibronectin, laminin and cellular adhesion in the transformation and differentiation of murine AKR fibroblasts. *J Cell Physiol* 133:415-425, 1987.
- 15- Chan LM, Hatier C, Parry G, Werb Z, Bissel MJ: Collagen-fibronectin interactions in normal and Rous sarcoma virus transformed avian tendon cells: possible mechanisms for increased extracellular matrix turnover after transformation. *In vitro Cell Devel Biol* 23:308-314, 1987.
- 16- Chen JM, Chen WT: Fibronectin-degrading proteases from the membrane of transformed cells. *Cell* 48:193-203, 1987.
- 17- Chun JJM, Shatz CJ: A fibronectin-like molecule is present in the developing cat cerebral cortex and is correlated with subplate neurons. *J Cell Biol* 106:857-872, 1988.
- 18- Damonte EB, Coto CE: Análisis de los factores que condicionan la formación de placas en células Vero infectadas por virus Junín. *Rev Asoc Argent Microbiol* 6:15-22, 1974.
- 19- David-Pfeuty T, Singer SJ: Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and α -actinin in cultured

- fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. Proc Natl Acad Sci USA 77:6687-6691, 1980.
- 20- Dienes HO, Knoblich A, Falke D: Loss of surface fibronectin after infection of cultured cells by HSV-1 and 2. Arch Virol 86:223-237, 1985.
- 21-Dierich MP, Landen B, Schultz T, Falke D: Protease activity on the surface of HSV-infected cells. J gen Virol 45: 241-244, 1979.
- 22- Duband JL, Rocher RS, Chen WT, Yamada KM, Thiery JP: Cell adhesion and migration in the early vertebrate embryo: location and possible role of the putative fibronectin receptor complex. J Cell Biol 102:160-178, 1986.
- 23- Dufour S, Duband JL, Kornblihtt AR, Thiery JP: The role of fibronectins in embryonic and cell migrations. TIG 4: 198-203, 1988.
- 24- Ecob-Johnston MS, Whwtsell WO: Host cell response to Herpes virus infection in central and peripheral nervous tissue in vitro. J gen Virol 44:747-757, 1979.
- 25- Falke D, Knoblich A, Muller S: Fusion from without induced by Herpes simplex virus type 1. Intervirology 24:211-219, 1985.
- 26- Fallon JR: Preferential outgrowth of Central Nervous System neurites on astrocytes and Schwann cells as compared with non glial cells in vitro. J Cell Biol 100:198-207, 1985.
- 27- Fedoroff S, Vernadakis A (eds.). Cellular Neurobiology: A Series. "Astrocytes" vol 1. Academic Press Inc., Orlando USA, 1986.
- 28- Fedoroff S, Neal J, Opas M, Kalnins VI: Astrocyte cell lineage. III. The morphology of differentiating mouse as-

- trocytes in colony cultures. *J Neurocytol* 13:1-20, 1984.
- 29- Fromme HG, Voss B, Pfautsch M, Grote M, von Figura K, Beeck H: Immunoelectron microscopic study on the location of fibronectin in human fibroblast cultures. *J Ultrast Res* 80:264-269, 1982.
- 30--Furcht LT, Mosher DF, Wendelschafer-Crabb G: Immunocytochemical localization of fibronectin (LETS protein) on the surface of L6 myoblasts: light and electron microscopic studies. *Cell* 13:263-271, 1978.
- 31- Giovanniello OA, Weber EL, Rabinovich RD: Un nuevo ensayo de placas para la cuantificación del virus Junín. *Rev Arg Microbiol* 13:17-22, 1981.
- 32- Goetschy JF, Ulrich G, Aunis D, Ciesielsky-Treska J: Fibronectins and collagens modulate the proliferation and morphology of astroglial cells in culture. *Int J Devl Neurosc* 5:63-70, 1987.
- 33- Grinspan JB, Lieb M, Stern J, Rupnick M, Williams S, Pleasure D: Rat brain microvessel extracellular matrix modulates the phenotype of cultured rat type 1 astroglia. *Devl Brain Res* 33:291-295, 1987.
- 34- Gutman A, Kornblihtt AR: Identification of a third region of cell specific alternative splicing in human fibronectin mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7179-7182, 1987.
- 35- Hatten ME, Furie MB, Rifkin D: Binding of developing mouse cerebellar cells to fibronectin: a possible mechanism for the foundation of the external granular layer. *J Neurosc* 2:1195-1206, 1982.
- 36- Hayashi M, Yamada KM: Differences in domain structures between plasma and cellular fibronectins. *J Biol Chem* 256:11292-11300, 1981.
- 37- Hedman K, Vaheri A, Wartiovaara J: External fibronectin

of cultured human fibroblasts is predominantly a matrix protein. *J Cell Biol* 76:748-760, 1978.

- 38- Heeg V, Haase W, Brauer D, Falke D: Microtubules and microfilaments in HSV-infected rabbit kidney cells. *Arch Virol* 70:233-246, 1981.
- 39- Heggeness MH, Ash JF, Singer SJ: Transmembrane linkage of fibronectin to intracellular actin containing filaments in cultured human fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 312:414-417, 1978.
- 40- Hemler ME, Huang C: Fibronectin receptor structures in the family of heterodimers. *Nature* 326:607-609, 1987.
- 41- Hirst R, Horwitz A, Buck C, Rohrschneider L: Phosphorylation of the fibronectin receptor complex in cells transformed by oncogenes that encode tyrosines kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6470-6474, 1986.
- 42- Hølund B, Clausen PP, Clemmensen I: The influence of fixation and tissue preparation on the immunohistochemical demonstration of fibronectin in human tissue. *Histochemistry* 72:291-299, 1981.
- 43- Horman H: Fibronectin - mediator between cells and connective tissue. *Klin Wochensh* 60:1265-1277, 1982.
- 44- Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckerle MC, Burridge K: Interaction of plasma fibronectin receptor with talin- a transmembrane linkage. *Nature* 320:531-533, 1986.
- 45- Howett MK, High CS, Rapp F: Production of plasminogen activator by cells transformed by herpes viruses. *Cancer Res* 38:1075-1078, 1978.
- 46- Humphries MJ, Akiyama SK, Komoriya A, Olden K, Yamada KI: Neurite extension of chicken peripheral nervous system

- neurons on fibronectin: relative importance of specific adhesion sites in the central cell-binding domain and the alternatively spliced type III connective segment. *J Cell Biol* 106:1289-1297, 1988.
- 47- Hynes RO: Alteration of cell surface by viral transformation and by proteolysis. *Proc. Natl Acad Sci USA* 70:3170-3174, 1973.
- 48- Hynes RO, Destree AT: Relationships between fibronectin (LETS protein) and actin. *Cell* 15:875-886, 1978.
- 49- Hynes RO, Yamada KM: Fibronectins: Multifunctional modular proteins. *J Cell Biol* 95:369-377, 1982.
- 50- Hynes RO: Molecular Biology of fibronectin. *Ann Rev Cell Biol* 1:67-90, 1985.
- 51- Iacono RF, Berría MI, Lascano EF: Early enhancement of phagocytic activity in cultured astrocytes after Junín virus infection. *Com Biol* 7:305-313, 1989.
- 52- Julkunen I, Hautanen A, Keski-Oja J: Interaction of viral envelope glycoproteins with fibronectin. *Infect Immun* 40:876-881, 1983.
- 53- Keski-Oja J, Mosher D, Vaheri A: Dimeric character of fibronectin, a major cell surface associated glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 74:699-706, 1977.
- 54- Keski-Oja J, Hautanen A, Julkunen I: Fibronectin and viral pathogenesis. *Rev Infect Dis* 9(suppl 4):S404-411, 1987.
- 55- Kleinman HK, Luckenbill-Edds L, Cannon FW, Sephel GC: Use of extracellular matrix components for cell culture. *Analit Biochem* 166:1-13, 1987.

- 56- Kurkinen M, Wartiovaara J, Vaheri A: Cytochalasin B releases a major surface associated glycoprotein, fibronectin, from cultured fibroblasts. *Exp Cell Res* 111:127-137, 1978.
- 57- Labat-Robert J: La fibronectine et son role dans les interactions cellules-matrice. *C R Societe de Biologie* 180: 142-150, 1986.
- 58- Lascano EF, Berría MI: Ultrastructure of Junín virus in mouse whole brain and mouse brain tissue cultures. *J Virol* 14:965-974, 1974.
- 59- Lascano EF, Berría MI, Candurra NA: Diagnosis of Junín virus in cell cultures by immunoperoxidase staining. *Arch Virol* 70:79 - 82, 1981.
- 60- Lascano EF, Berría MI: Immunoperoxidase study of astrocytic reaction in Junín virus encephalomyelitis of mice. *Acta Neuropathol (Berl)* 59:183-188, 1983.
- 61- Leetsma JE, Bornstein MB, Sheppard RD, Feldman LA: Ultrastructural aspects of Herpes simplex virus infection in organized cultures of mammalian nervous tissue. *Lab Invest* 20:70-78, 1969.
- 62- Lehto VP, Virtanen I: Cellular fibronectin restores stress fibers and focal adhesion sites on monesin-exposed cultured human fibroblasts. *J Submicrosc Cytol* 16:119, 1984.
- 63- Lennette E: Diagnostic procedures of viral and rickettsial infections. 4th ed. American Public Health Association, Washington. pp 654-655, 1969.
- 64- Leptin M: The fibronectin receptor family. *Nature* 321:728, 1986.
- 65- Letourneau PC, Madsen AM Palm SL, Furcht LT: Immunoreactivity for laminin in the developing ventral longitudinal

- pathway of the brain. Dev Biol 125:135-144, 1988.
- 66- Liesi P, Dahl D, Vaheri A: Laminin is produced by early rat astrocytes in primary cultures. J Cell Biol 96:920-924, 1983.
- 67- Liesi P, Kaakkola S, Dahl D, Vaheri A: Laminin is induced in astrocytes of adult brain by injury. EMBO J 3:678-686, 1984.
- 68- Liesi P, Kirkwood T, Vaheri A: Fibronectin is expressed by astrocytes cultured from embryonic and early postnatal rat brain. Exp Cell Res 163:175-185, 1986.
- 69- Manservigi R, Spear PG, Buchan A: Cell fusion induced by herpes simplex virus is promoted and suppressed by different viral glycoproteins. Proc Natl Acad Sci USA 74:3813-3917, 1977.
- 70- Marcantonio EE, Hynes RO: Antibodies to the conserved cytoplasmic domain of the integrin subunit react with proteins in vertebrates, invertebrates and fungi. J Cell Biol 106:1765-1772, 1988.
- 71- Mauro A, Bertolotto A, Germano I, Giaccone G, Giordana MT, Migheli A, Schiffer D: Collagenase in the immunohistochemical demonstration of laminin, fibronectin, and factor VIII/RAg in nervous tissue after fixation. Histochemistry 80:157-163, 1984.
- 72- Meier S, Drake C: SEM localization of cell-surface-associated fibronectin in the cranium of chick embryos utilizing immunolabelled microspheres. J Embryol exp Morphol 80:175-195, 1984.
- 73- Millis AJ, Hoyle M, Mann DM, Brennan MJ: Incorporation of cellular and plasma fibronectins into smooth muscle cell extracellular matrix in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 82:2746-2750, 1985.

- 74- Miyasaki K, Ashida Y, Kihira Y, Mashima K, Yamashita J, Horio T: Transformation of rat liver cell line by Rous sarcoma virus causes loss of cell surface fibronectin, accompanied with secretion of metalloproteinase that preferentially digests the fibronectin. *J Biochem* 102:569-582, 1987.
- 75- Mueller SC, Hasegawa T, Yamada SS, Yamada KM, Chen WT: Transmembrane orientation of the fibronectin receptor complex (integrin) demonstrated directly by a combination of immunocytochemical procedures. *J Histochem Cytochem* 36 297-306, 1988.
- 76- Mugnai G, Lewandowska K, Carnemolla B, Zardi L, Culp LA: Modulation of matrix adhesive responses of human neuroblastoma cells by neighboring sequences in the fibronectins. *J Cell Biol* 106:931-943, 1988.
- 77- Nigg EA, Sefton BM, Singer SJ, Vogts PK: Cytoskeletal organization, vinculin phosphorylation, and fibronectin expression in transformed fibroblasts with different cell morphologies. *Virology* 151:50-65, 1986.
- 78- Norrild B, Virtanen I, Lehto VP, Pedersen J: Accumulation of Herpes simplex virus type 1 glycoprotein D in adhesion areas of infected cells. *J gen Virol* 64:2499-2503, 1983.
- 79- Paetau A, Mellstrom K, Westermarck B, Dahl D, Haltia M, Vaheri A: Mutually exclusive expression of fibronectin and glial fibrillary acidic protein in cultured brain cells. *Exp Cell Res* 129:337-344, 1980.
- 80- Price J, Hynes RO: Astrocytes in culture synthesize and secrete a variant form of fibronectin. *J Neurosci* 5:2205-2211, 1985.
- 81- Raff MC, Miller RH, Noble M: A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303:390-396, 1983.

- 82- Rogers SL, Letourneau PC, Palm SL, Mc Carthy J, Furcht LT: Neurite extension by peripheral and central nervous system neurons in response to substratum-bound fibronectin and laminin. *Dev Biol* 98:212-220, 1983.
- 83- Roizman B, Batterton W: Herpes viruses and their replication. In: *Virology*, Fields et al. eds. Raven Press, New York 497-526 , 1985.
- 84- Rovasio DA, Delouvee A, Yamada KM, Timpl R, Thiery JP: Neural crest cell migration : requirements for exogenous fibronectin and high cell density. *J Cell Biol* 96:262-273, 1983.
- 85- Ruoslahti E, Engvall E, Hayman EG: Fibronectin: current concepts of its structure and functions. *Coll Res* 1:95-128, 1981.
- 86- Saga S, Chen WT, Yamada KD: Enhanced fibronectin receptor expression in Rous sarcoma virus-induced tumors. *Cancer Res*, 48:5510-5513, 1988.
- 87- Schachner M, Scoonmaker G, Hynes RO: Cellular and subcellular localization of LETS protein in the nervous system. *Brain Res* 158:149-158, 1978.
- 88- Sekiguchi K, Klos AM, Hirohashi S, Hakomori S: Human tissue fibronectin: expression of different isotypes in the adult and fetal tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 141:1012-1017, 1986.
- 89- Sekiguchi K, Hakomori S: Domain structure of human plasma fibronectin. *J Biol Chem* 258:3967-3973, 1983.
- 90- Sensenbrenner M, Labourdette G, Delaunoy JP, Pettman B, Devilliers G, Moonen G, Bock E: Morphological and biochemical differentiation of glial cells in primary cultures. In "Tissue culture in Neurobiology". Raven Press, New York, pp 385-395 , 1980.

- 91- Sternberger LA, Hardy PJR, Cuculis JJ, Meyer HG: The unlabeled antibody enzyme method of immunocytochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (Horseradish peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18:315-333, 1970.
- 92- Sternberger LA: *Immunocytochemistry*. 3rd ed. John Wiley & Sons, New York, pp 195-196, 1986.
- 93- Stewart GR, Pearlman AL: Fibronectin-like immunoreactivity in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 7:3325-3333, 1987.
- 94- Stieg PE, Kimelberg HK, Mazurkiewicz JE, Banker GA: Distribution of glial fibrillary acidic protein and fibronectin in primary astroglial cultures from rat brain. *Brain Res* 199:493-500, 1980.
- 95- Tamkun JW, De Simone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, Hynes RO: Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46:271-282, 1986.
- 96- Thiery JP, Duband JL, Tucker GC: Cell migration in the vertebrate embryo. *Ann Rev Cell Biol* 1:91-113, 1985.
- 97- Tomaselli KJ, Neugebauer KM, Bixby JL, Lilien J, Reichardt LF: N-cadherin and integrins: two receptor systems that mediate neuronal process outgrowth on astrocytes surfaces. *Neuron* 1:33-43, 1988.
- 98- Tramu G, Pillez A, Leonardelli J: An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 26:322-324, 1978.
- 99- Vaheri A, Ruoslahti E, Westermark B, Pontén J: A common cell-type specific surface antigen in cultured human glial cells and fibroblasts: loss in malignant cells. *J Exp Med* 143:64-71, 1976.

- 100- Vahlne H, Svennerholm B, Sandberg M, Hamberger A, Lycke E: Differences in attachment between Herpes simplex type 1 and type 2 viruses to neurons and glial cells. *Infect Immun* 28:675-680, 1980.
- 101- Wartiovaara J, Linder E, Ruoslahti E, Vaheri A: Distribution of fibroblast surface antigen. Association with fibrillar structures of normal cells and loss upon viral transformation. *J Exp Med* 140:1522-1533, 1974.
- 102- Watt FM: The extracellular matrix and cell shape. *TIBS* 11:482-485, 1986.
- 103- Weber L, Guerrero LB, Boxaca LB: MRC₅ cells: a model for Junin virus persistent infection. *J Gen Virol* 66:1179-1183, 1985.
- 104- Weissenbacher MC, Laguens RP, Coto CE: Argentine haemorrhagic fever. *Curr Top Microbiol Immunol* 134:79-116, 1987.
- 105- Wujek JR, Akeson RA: Extracellular matrix derived from astrocytes stimulates neuritic outgrowth from PC12 cells in vitro. *Devl Brain Res* 34:87-97, 1987.
- 106- Yohkaichiya T, Hoshiai H, Uehara S, Yajima A: Fibronectin localization in the mouse embryo from the two cell stage to the morula stage. *Tohoku J exp Med* 154:95-100, 1988.

M. I. Berría

DRA. M. I. BERRÍA
PROF. PEG. ADJUNTA
DEP. MICROBIOLOGÍA
FAC. MEDICINA U.B.A.

C. G. Castagnino
C. G. CASTAGNINO