

# Estudio preliminar in vitro de la infección por enterovirus 71 en células TE-671

NATALIA HOUGHTON TRIVIÑO<sup>1</sup>  
MARLÉN MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ<sup>1</sup>  
DIOSELINA PELÁEZ<sup>3</sup>  
JAIME E. CASTELLANOS<sup>1,2</sup>

## RESUMEN

**Objetivo.** Realizar el seguimiento de la infección in vitro por enterovirus 71 (EV71) sobre células TE-671, evaluando la presencia de los antígenos virales y la pérdida de viabilidad en diferentes tiempos de infección. **Materiales y métodos.** Se infectaron cultivos de células TE-671 con diferentes diluciones de EV71, aislado de un caso de parálisis flácida aguda (3364-COL-94), y por varios tiempos posinfección (6, 12, 24, 48, 72 horas). Los cultivos se procesaron por una técnica de inmunoperoxidasa indirecta para obtener las proporciones de infección en cada condición. Simultáneamente, se realizó una prueba de viabilidad por el método bioquímico del MTT para evaluar la pérdida de la viabilidad celular debida a la infección. **Resultados.** Aunque por inmunocitoquímica se detectó infección desde las 6 horas después de la inoculación (pi), el efecto citopático y la mortalidad celular fueron drásticos después de 48 horas pi. De esta manera, el mejor tiempo para la detección de los antígenos virales fue a las 12 horas pi, momento en el cual la muerte celular no es tan grave, lo cual permite una adecuada detección del antígeno viral. **Conclusiones.** Se ratificó la alta recep-

tividad de las células TE-671 a la infección por EV71, la cual se correlaciona con el importante efecto citopático evidenciado por la prueba de MTT, lo cual convierte a esta línea celular en un recurso eficiente para el aislamiento y la identificación de EV71 y, también, para estudios de su biología básica. **Palabras clave:** enterovirus 71, neurotropismo, cultivo celular, inmunocitoquímica, TE-671.

*Infectio 2005; 9(1):*

## ABSTRACT

**Objective.** To study in vitro infection of TE-671 cells by Enterovirus 71 (EV71), determining viral antigens and cell mortality due to infection at different infection times. **Materials and methods.** TE-671 cells were infected with dilutions of a clinical isolate of EV71 (3364-COL-94) at various postinfection (pi) times (6, 12, 24, 48, 72 hours). Cell cultures were processed by an indirect immunoperoxidase technique to find cell infection percentages for each condition. Simultaneously, infected and non-infected cell cultures were processed by MTT viability test, to evaluate cytopathic effect due to the virus. **Results.** Despite viral antigens were initially detected at 6 hours pi, only after 48 hours pi cellular mortality and cytopathic effect were most evident. Viral antigens were detected with low cell mortality at 12 hours pi. **Conclusion.** The high susceptibility of TE-671 to EV71 infection was confirmed, which correlates well with strong cytopathic effect induced by EV71 infection. This cell line is a useful tool for viral isolation and identification of this virus, as well as for basic research. **Key words:** Enterovirus 71, neurotropism, cell culture, immunocytochemistry, TE-671 cells.

<sup>1</sup> Instituto de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Laboratorio de Neurociencias, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>3</sup> Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

*Autor para correspondencia:*

Jaime E. Castellanos castellanosjaime@unbosque.edu.co  
Instituto de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia. Transversal 9A Bis No.132-55, Laboratorio 205, Edificio de Rectoría. Teléfono: (571) 633 1368, extensión 272 o 209. Fax: (571) 625 2030

## INTRODUCCIÓN

El enterovirus 71 (EV71) pertenece al género *Enterovirus*, familia *Picornaviridae*, que incluye los virus ARN más pequeños hasta ahora conocidos (1); fue identificado y caracterizado por primera vez de casos con enfermedad neurológica ocurridos entre 1969 y 1973 en California (EE.UU.)(2). Desde entonces ha sido reconocido como agente causal de brotes y epidemias de diversos tipos de enfermedad neurológica, entre las que se destaca la parálisis flácida aguda, la cual es clínicamente indistinguible de la observada en la poliomielitis, enfermedad paralítica causada por el poliovirus salvaje (2-9).

El aumento de su actividad epidémica en los últimos años lo posiciona como el enterovirus neurovirulento más importante en la era de erradicación de la poliomielitis (2,4,10). Su actividad epidémica en Colombia es desconocida hasta el momento, a pesar de haberse determinado su asociación con un caso de parálisis flácida aguda ocurrido en 1994 en el municipio de Ocaña, Norte de Santander (11,12). Por tanto, se hace necesaria la búsqueda y la identificación de este agente en los casos de parálisis flácida aguda notificados al programa de vigilancia y control de la poliomielitis en Colombia (12) ya que, en la actualidad, sólo se llega a la detección de enterovirus no polio (ENP) sin la identificación del serotipo.

La amplia distribución geográfica en todo el mundo, su asociación etiológica con epidemias no sólo de enfermedad neurológica sino de otras entidades clínicas, la variedad de respuesta del huésped (13,14) y la dificultad de aislamiento de algunas variantes, convierten al EV71 en un patógeno que debe ser estudiado más profundamente. Las dificultades para el aislamiento y su identificación hacen probable que no todos los casos que ocurren sean diagnosticados y reportados (11). Por tanto, es necesario establecer medios *in vitro* que permitan en forma efectiva y con relativa sencillez el aislamiento, la identificación y el estudio de EV71.

La línea celular TE-671, obtenida a partir de un rhabdomiosarcoma humano, expresa marcadores y proteínas de tipo neuronal (receptor nicotínico de acetilcolina) y de tipo muscular (desmina y mioglobina) y, además, presenta una baja diferenciación neuronal tras la estimulación con factores solubles (15,16). Estas características musculares y neuronales la convierten en un modelo apropiado para el aislamiento de EV71, pues la expresión de receptores celulares

de diferentes tejidos hacen que el virus tenga mayor opción de adherencia y posibilita el estudio de diversos receptores celulares relacionados con su tropismo.

Evidentemente poseen una alta receptividad a la infección por EV71, característica que comparte con la línea celular del rhabdomiosarcoma humano RD (10,15,17-20) y constituye una herramienta efectiva y valiosa del diagnóstico y estudio de EV71, como lo evidencian los trabajos sobre cambios en la expresión génica debidos a la infección y sobre la actividad proapoptótica de la proteasa viral (18,21).

Por tal razón, en este trabajo nos propusimos estudiar la infección *in vitro* de EV71 en esta línea celular, usando una técnica de inmunocitoquímica indirecta por peroxidasa (fácil, confiable y económica) y una cuantificación bioquímica del proceso lítico inducido por el virus en las células con el propósito de avanzar en la adecuación de un modelo de diagnóstico y, además, dar luz a procesos virales celulares que pudieran estar jugando un papel importante en la infección por EV71.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención del inóculo viral y titulación

La cepa viral de EV71, 3364-COL-94, utilizada en este estudio, se aisló en el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud (INS) de Colombia a partir de las heces de un paciente de 6 años con parálisis residual, proveniente del municipio de Ocaña (Norte de Santander) el cual fue notificado en 1994 al Programa de Erradicación de la Poliomielitis del INS (12). El linaje viral se propagó en células TE-671. El título del virus cosechado se calculó por el método de producción de efecto citopático sobre monocapas celulares. Se sembraron las células TE-671 en cajas de 96 pozos previamente tratadas con poli-L-lisina (10 µg/ml); luego, se infectaron con 50 µl de las diluciones virales (1/10 hasta 1/100.000) por cuadruplicado y se incubaron por 5 días a 37 °C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Al cabo de los 5 días, se evaluó el efecto citopático en cada uno de los pozos y se calculó el título viral por el método de Reed y Muench (22). Se obtuvo un título de 10<sup>4.96</sup> *tissue culture infectant dose* 50 (TCID<sub>50</sub>).

### Mantenimiento del cultivo celular

La línea celular TE-671 se cultivó en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) con un suplemento de 5% o 10% de suero fetal bovino (SFB), más penicilina-estreptomicina (10.000 U/ml y 10 µg/ml, respectivamente) y anfotericina (0,25 µg/ml). Las células se mantuvieron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> y se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y se subcultivaron con tripsina al 0,25% en cajas de 24 pozos a una razón de 2.000 células/pozo sobre cubreobjetos de vidrio pretratados con poli-L-lisina (10 µg/ml), en las condiciones mencionadas anteriormente.

### Infección de los cultivos

Las células se infectaron adicionando 400 µl de cada dilución viral sobre la monocapa celular. El inóculo se incubó a 37 °C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por una hora para permitir la adsorción viral. Después de este tiempo, el inóculo se retiró y se cambió por DMEM fresco. Se realizaron dos cultivos, cada uno con dos réplicas de cada condición con sus respectivos controles sin infectar. Después de cada tiempo de infección, las células infectadas se fijaron con paraformaldehído al 4% por 30 minutos a temperatura ambiente.

Se realizaron dos experimentos independientes; en el primero se ensayaron las diluciones virales 1/5, 1/25, 1/125 y 1/625 con tiempos de infección de 24, 48 y 72 horas. Bajo estas condiciones se presentó una alta mortalidad celular, razón por la cual se realizó una segunda prueba empleando diluciones virales menores (1/10, 1/100 y 1/1000) y tiempos de infección menos prolongados (6, 12 y 24 horas).

### Inmunocitoquímica

Las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS seguido de inactivación de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,5% en metanol al 50% y bloqueo de los sitios inespecíficos con suero bovino de recién nacido (SRN) al 10% en PBS. El anticuerpo primario monoclonal de ratón, tipo IgG anti-EV71 (*Chemicon Int.*) se preparó en SRN al 5% (dilución 1/25), y se incubó por 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda. El anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de ratón (*Vector Lab.*, dilución 1/200, Cat BA-9200) se preparó igualmente en SRN al 5% y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente seguido por la adi-

ción de estreptavidina acoplada a peroxidasa (*Vector Lab.*, Cat. SA-5004, 1 µg/ml) por 30 minutos a temperatura ambiente. Se reveló con diaminobenzidina al 0,1% en Tris-HCl, pH 7,2, y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,02% en proporción 1:1.

Simultáneamente, se procesaron células no infectadas como controles negativos y, también, células infectadas en las que se omitió el anticuerpo anti-EV71. Posteriormente, las laminillas se tiñeron con Hemalun de Mayer y se deshidrataron con etanol en concentraciones ascendentes y xileno. Las láminas se montaron en láminas portaobjetos con resina líquida (Entellan®). Para mayor economía, todos los anticuerpos se incubaron usando la técnica de capilaridad sobre placa en cámara húmeda (23).

### Cuantificación de la infección y análisis

Se contaron en campos, al azar, 500 células entre infectadas y no infectadas en un microscopio de luz a un aumento de 400X y se calculó el porcentaje de infección. Las células infectadas presentaban en su citoplasma un evidente precipitado color café. Además, se obtuvo el número de células por mm<sup>2</sup>, por recuentos del número de células presentes en cuatro campos para cada condición evaluada. El número de células por mm<sup>2</sup> se calculó como la relación entre el número de células contadas y el valor constante de 0,2852 que equivale al valor del área en mm<sup>2</sup>, en el que se realizó el recuento. Estos conteos se hicieron con el propósito de brindar una aproximación de la tasa de destrucción celular en cada tiempo de infección evaluado y su efecto sobre los porcentajes de infección obtenidos. Finalmente, se analizaron estadísticamente los resultados obtenidos empleando la prueba ANOVA y el de diferencias mínimas significativas para evaluar las diferencias entre las proporciones de infección de cada dilución viral en un tiempo de infección determinado y viceversa.

### Ensayo de MTT

Para este ensayo se sembraron 20.000 células por pozo en cajas de 96 pozos y se incubaron por 24 horas en las condiciones mencionadas anteriormente. Posteriormente, se infectaron con 100 µl de las diluciones virales 1/10, 1/100 y 1/1000 por 6, 12, 24, 48 y 72 horas pi en tres experimentos por duplicado. Cumplido cada uno de los tiempos, se retiró el sobrenadante de las

células, se lavó con PBS estéril por 5 minutos y, luego, se adicionaron 100  $\mu$ l de solución de MTT (0,5 mg/ml, bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) y las cajas se incubaron por 100 minutos a 37 °C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, se retiró el sobrenadante y las sales de formazán se disolvieron con 100  $\mu$ l de dimetil-sulfóxido por incubación durante 10 minutos. Las placas se agitaron suavemente y se realizó la lectura de absorbancia a 570 nm en un lector de ELISA (*Stat Fax 2100*). Finalmente, se compararon los valores de absorbancia obtenidos para las células infectadas en cada tiempo de infección con el valor de absorbancia obtenido con las células sin infectar en cada uno de los tiempos de evaluación.

## RESULTADOS

Las células infectadas por EV71 mostraron efecto citopático (ECP) que se caracterizó por retracción del citoplasma celular que condujo a que las células se tornaran redondas y, finalmente, se desprendieran de la superficie del cultivo; fue más evidente en los tiempos mayores después de la infección. Las células presentaron ECP desde tiempos tempranos pi (figura 1) y en los tiempos pi más prolongados (48 y 72 horas) el

ECP fue extremo, lo cual condujo a la desaparición casi total de la monocapa celular.

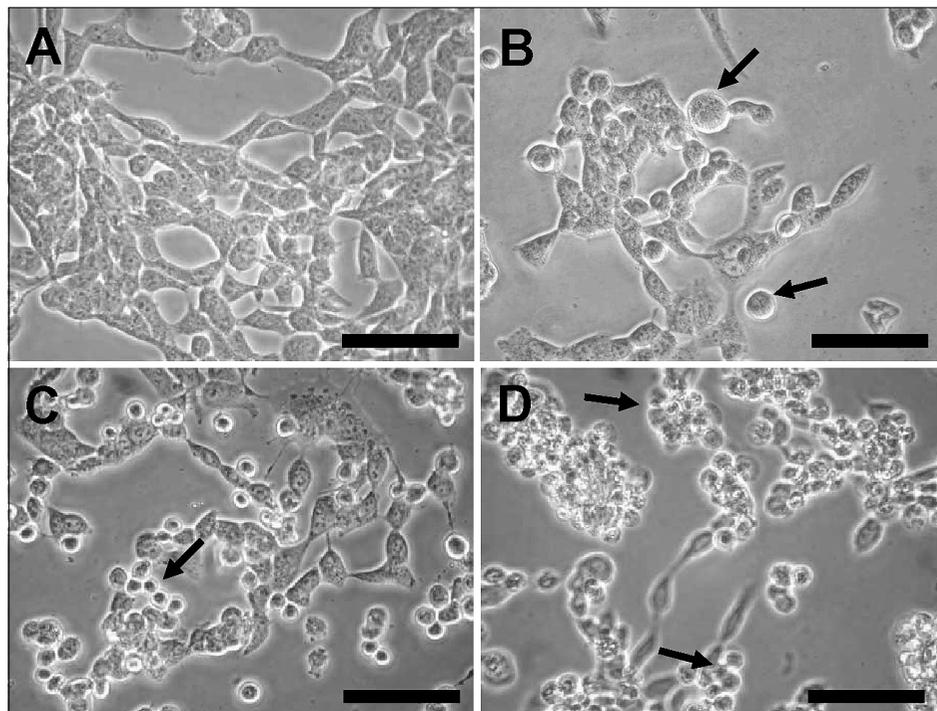
Se ratificó una alta susceptibilidad de la línea celular TE-671 a la infección por EV71 puesto que los antígenos virales se detectaron desde las 6 horas pi (véase figura 2B) con la técnica de inmunocitoquímica por peroxidasa indirecta. La intensidad de la marcação de las células infectadas fue mayor en los tiempos pi más prolongados. En los tiempos pi de 48 y 72 horas, la mayoría de las células se desprendió y las pocas que quedaron mostraron morfología alterada y fuerte inmunorreactividad (véase figura 2C-F).

Para los tiempos de 6, 12 y 24 horas pi, los porcentajes de infección en general disminuyeron en función de suspensiones virales menos concentradas (véase figura 3). Por ejemplo, los porcentajes de células infectadas a las 12 horas pi, usando las diluciones de virus 1/10, 1/100 y 1/1000, fueron de 26,4%, 14,1% y 4,9%, respectivamente. Además, el ECP no fue tan acentuado como en los tiempos pi mayores (48 y 72 horas) en los cuales la cuantificación del porcentaje de infección se dificultó y fueron independientes de la dilución viral inoculada (véase figura 4).

Antes de las 24 horas pi no se observaron cambios evidentes de la viabilidad celular (véase figura 5),

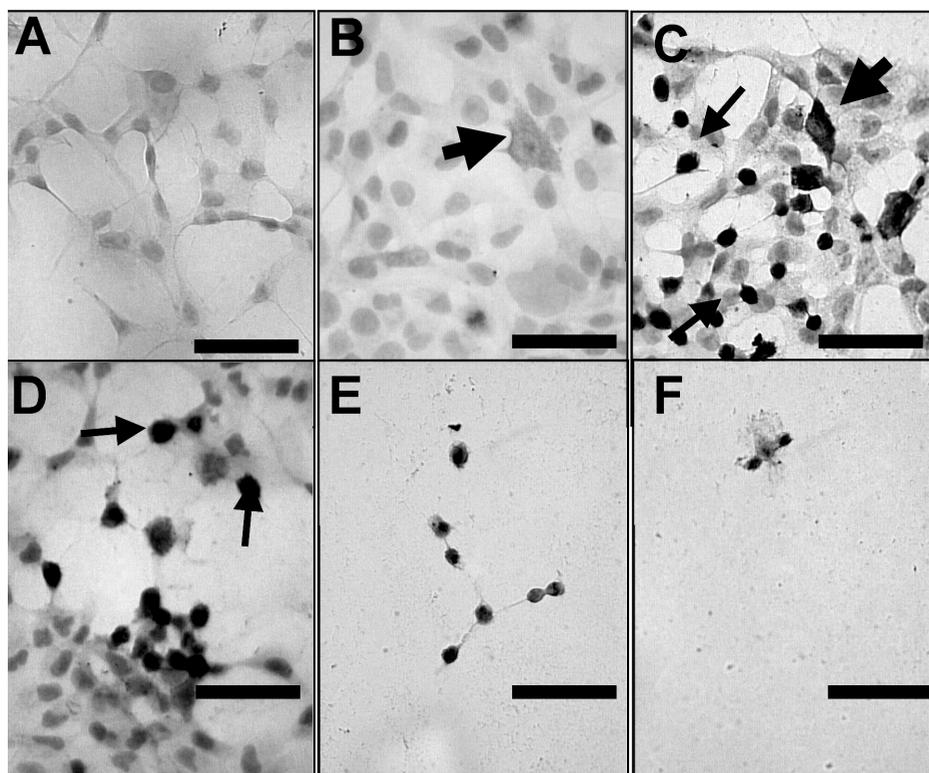
**Figura 1**

### FOTOMICROGRAFÍAS DE CÉLULAS TE-671 EN CONTRASTE DE FASE



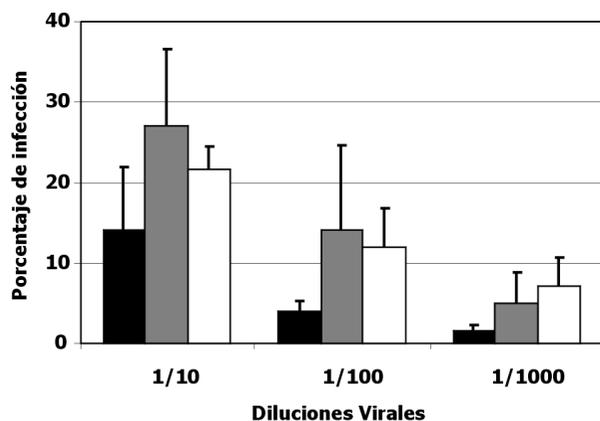
A. CÉLULAS NO INFECTADAS, B, C y D imágenes de células infectadas a las 6, 12 y 24 horas respectivamente. Desde las 6 horas pi, aparecen células con aspecto redondeado (flechas), indicativo de efecto citopático. El número de estas células aumenta gradualmente con los tiempos post-inoculación. La barra corresponde a 100  $\mu$ m.

**Figura 2** ASPECTO DE CÉLULAS TE-671 PROCESADAS POR UNA TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE EV71



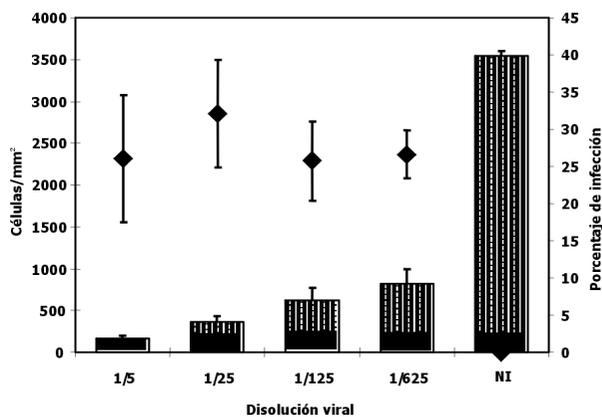
SE OBSERVAN CÉLULAS inmuno-reactivas (flechas gruesas) y células con indicios de efecto citopático fuertemente marcadas (flechas delgadas). Obsérvese el bajo número de células a los mayores tiempos post-inoculación (E y F). A, células no infectadas. B, C, D, E y F cultivos infectados y procesados para inmunocitoquímica a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-infección respectivamente. La barra corresponde a 100 μm.

**Figura 3**

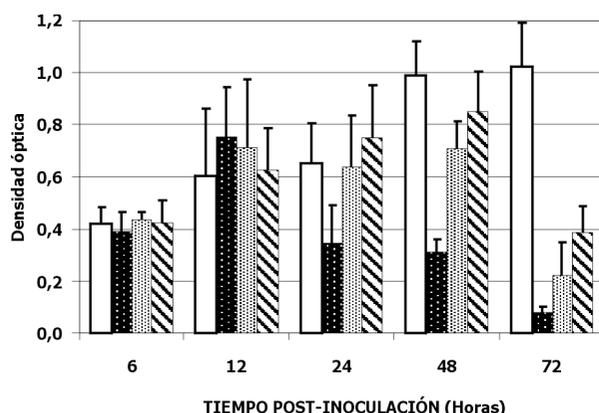


**COMPARACIÓN DE LOS PORCENTAJES** de infección en células TE-671 usando diferentes diluciones de inóculo viral, 6 horas (barra negra), 12 horas (barra gris) y 24 horas (barra blanca). Existen diferencias significativas (\*) entre los porcentajes de infección en función del tiempo pi. y de la dilución viral ( $p < 0,05$ ). Los datos son el promedio  $\pm$  D.S de dos experimentos independientes por duplicado.

**Figura 4**



**RELACIÓN ENTRE EL PORCENTAJE** de infección (rombos negros, eje de la derecha) y células remanentes (barras grises, eje de la izquierda) en cultivos TE-671 infectados con EV71 por 48 horas. El porcentaje de infección es independiente de la dilución viral inoculada, pero el número de células/mm<sup>2</sup> disminuye al aumentar la cantidad de virus usado. NI, células no infectadas. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  D.S. de dos experimentos independientes por duplicado. Un comportamiento similar se observó a las 72 horas pi.

**Figura 5**

VALORES DE ABSORBANCIA en la prueba de MTT para citotoxicidad de cultivos infectados y no infectados a diferentes tiempos post-inoculación. Barra blanca, control de células no infectadas. Las barras negras, grises y rayadas, corresponden a células inoculadas con diluciones de EV71 1/10, 1/100 y 1/1000 respectivamente. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  D.S. de tres experimentos independientes por duplicado. El porcentaje de muerte celular con el inóculo más concentrado (1/10) está entre el 50 y el 90% a las 24 y 72 horas p.i. respectivamente.

pero el número de células y la viabilidad celular sí disminuyeron drásticamente en tiempos posteriores (48 y 72 horas) (figuras 4 y 5) y los porcentajes de infección fueron iguales a las 12 y 24 horas pi ( $P > 0,05$ ). A las 6 horas pi los porcentajes de infección aún son muy bajos y en los tiempos de 48 y 72 horas pi la cantidad de células remanentes es escasa. Teniendo en cuenta estos resultados, se puede proponer que al usar altos inóculos virales se logra detectar el antígeno viral a las 12 horas pi, evidenciándose los mayores porcentajes de infección y el menor efecto lítico, lo cual favorece la identificación del virus.

## DISCUSIÓN

Gracias al programa de erradicación de la poliomielitis, no se detecta poliovirus salvaje autóctono en Colombia ni en la región de las Américas como agente causal de enfermedad parálitica desde 1991. En Colombia, sin embargo, se producen aislamientos de enterovirus no-polio en el 13,1% de los 160 casos en promedio de parálisis flácida aguda notificados anualmente desde 1999 (24).

La dinámica de la circulación de EV71 en Colombia se desconoce a pesar de haber sido detectado en el país desde 1994 (11,12). Por otra parte, el aumento en la actividad epidémica de EV71 en los últimos tiempos ha conducido a muchos países al inicio de su vigilancia epidemiológica (2). Por lo tanto, se requiere esta-

blecer modelos *in vitro* que permitan su aislamiento y confirmación y, además, realizar estudios sobre la virología de este agente.

En este trabajo encontramos que la línea celular TE-671 permitió la replicación eficiente de un aislamiento clínico de EV71, evidenciada por la detección por inmunocitoquímica de los antígenos virales y la aparición de ECP desde las 6 horas pi, lo cual demuestra que esta línea celular es un modelo propicio para el aislamiento y el diagnóstico de este virus.

Se ha observado que en la línea clonal RD hay inducción de ECP desde las 3 horas pi y la aparición de vesículas en el citoplasma celular inducidas por el virus, las cuales están rodeadas de partículas virales que aumentan su número gradualmente (20), lo que indica replicación viral activa (14). Además, se ha reportado que la transcripción viral de EV71 en estas células se inicia a partir de las 8 horas pi (18). Los datos reportados en este trabajo ratifican esas observaciones pero, igualmente, nos llevan a concluir que un tiempo de 6 horas pi no sería adecuado para el diagnóstico de EV71 en las células TE-671 mediante inmunocitoquímica, pues no siempre la replicación viral en ese momento asegura una buena expresión de antígenos virales para poder ser detectados por esta metodología. Un tiempo de 12 horas pi podría ser apropiado para emplear una técnica inmunocitoquímica para el diagnóstico de EV71 a partir de muestras clínicas de pacientes con enfermedad neurológica.

Los tiempos de infección 48 y 72 horas evaluados ocasionaron una destrucción celular drástica. Este efecto es posiblemente debido a la apoptosis celular inducida por el virus, pues es un fenómeno descrito para EV71 en la línea celular RD en la que se involucra la acción de la proteasa viral 2A (21). Sin embargo, nuestro estudio no permitió determinar si esta destrucción celular es ocasionada por un efecto apoptótico o necrótico inducido por la cepa de EV71 evaluada. Esta destrucción celular ocasionó que los porcentajes de infección fueran independientes de la dilución viral inoculada, muy posiblemente porque la mortalidad celular observada tras la infección condujo a la detención de la replicación viral por destrucción del sustrato celular (figura 4). Los ensayos de MTT permitieron identificar claramente que el EV71 efectivamente disminuye la viabilidad celular a partir de las 24 horas de infección, lo cual se hace más evidente en tiempos más prolongados.

Se prevé que cepas circulantes de EV71 pudieran estar evolucionando rápidamente hasta volverse más virulentas y desatar una gran epidemia como las pre-

sentadas en varios países, lo cual haría aún más necesario un sistema de aislamiento e identificación de EV71. El presente trabajo ha permitido evaluar una metodología que podría contribuir al estudio de la epidemiología y la virología del EV71, además de ayudar al entendimiento de factores involucrados en su patogenia.

## REFERENCIAS

1. **King AM, Brown F, Christian P, Hovi T and Hyypia T.** Picornaviridae. En: van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DH, Calisher CH, editors. Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. New York: Academic Press; 2000. p. 657-73.
2. **McMINN PC.** An overview of the evolution of Enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol Rev* 2002;26:91-107.
3. **ABUBAKAR SC, SHAFE N, CHUA KB, LAM SK.** Molecular detection of Enteroviruses from an outbreak of hand, foot and mouth disease in Malaysia in 1997. *Scand J Infect Dis* 1999;31:331-5.
4. **BROWN BA, OBERSTE MS, JAMES PA.** Molecular epidemiology and evolution of Enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol* 1999; 73:9969-75.
5. **CHAN IG, PARASHAR UD, ZAKI SR, HO KK.** Deaths of children during outbreaks of hand foot and mouth disease in Sarwak, Malasya. *Clin Infect Dis* 2000;31:678-83.
6. **DA SILVA E, FILLIPS A, CORTES I.** Evidence of Enteroviruses 71 infectious in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990;85:131-2.
7. **DIETZ V, ANDRUS J, OLIVE M, COCHI S.** Epidemiology and clinical characteristics of acute flaccid paralysis associated with non-polioviruses isolation: the experience in the Americas. *Bull WHO* 1995;73:1049-50.
8. **HO M.** Enterovirus 71: the virus, its infections and outbreaks. *J Microbiol Immunol Infect* 2000;33:205-16.
9. **SHIH RS, STOLLAR V, LIN JY, CHANG SC, CHEN GW, LI ML.** Identification of genes involved in the host response to enterovirus 71 infection. *J Neurovirol* 2004;10:293-304.
10. **LIN TY, CHU C AND CHIU CH.** Lactoferrin inhibits Enterovirus 71 infection of human embryonal rhabdomyosarcoma cells in vitro. *J Infect Dis* 2002;186:1161-4.
11. **PELÁEZ D.** Caracterización molecular de enterovirus no-polio procedentes de casos de parálisis residual (tesis). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 1998.
12. **PELÁEZ D, OBERSTE S, BOSHELL J, BROWN B.** Enterovirus no polio de casos con parálisis residual, Colombia, 1992-1995. *Biomédica* 1999;19:144-58.
13. **HO M, CHEN ER, TWU SJ.** An epidemic of Enterovirus 71 infection in Taiwan. *N Engl J Med* 1999;341:929-35.
14. **WEN Y-Y, CHANG T-Y, CHEN ST, LI C, LIU H-S.** Comparative study of Enterovirus 71 infection of human cell lines. *J Med Virol* 2003;70:109-18.
15. **MORK SJ, MAY EE, PAPASOZOMENOS CH, VINOES SA.** Characteristics of human medulloblastoma cell line TE-671 under different growth conditions in vitro: a morphological and immunohistochemical study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1986;12:277-89.
16. **STRATTON MR, DARLING J, PILKINGTON GJ, LANTOS PL, REEVES BR, COOPER CS.** Characterization of the human cell line TE-671. *Carcinogenesis* 1989;10:899-905.
17. **LEONG PWF, LIEW K, LIM W, CHOW VTK.** Differential display RT-PCR analyzes of Enterovirus 71-infected rhabdomyosarcoma cells reveals mRNA expression responses of multiple human genes with know and novel functions. *Virology* 2002; 295:147-59.
18. **LI ML, HSU TA, CHEN TC, CHANG SC.** The 3C protease activity of Enterovirus 71 induces human neural cell apoptosis. *Virology* 2002;293:386-95.
19. **RAMP U, GERHARZ CD, ENGERS R, MARX N, GABBERT HE.** Differentiation induction in the human rhabdomyosarcoma cell line TE-671. A morphological, biochemical and molecular analysis. *Anticancer Res* 1995;15:181-8.
20. **RANGEL SR, DA SILVA RR, KILIPPIS AM.** Ultrastructural and immunocytochemical study on the infection of Enterovirus 71 in rhabdomyosarcoma (RD) cells. *J Submicrosc Cyt Path* 1998;30:71-5.
21. **KUO RL, KUNG SH, HSU, YY, LIU WT.** Infection with Enterovirus 71 or expression of its 2A protease induces apoptotic cell death. *J Gen Virol* 2002; 83:1367-76.
22. **PAYMENT P, TRUDEL M.** Isolation and identification of viruses. En: Payment P, Trudel M, editors. *Methods and techniques in virology*. New York: Marcel Dekker Inc; 1993. p. 30-3.
23. **QUIROGA NY, MARTÍNEZ M, CASTELLANOS JE, HURTADO H.** Evaluación de una técnica capilar modificada para inmunohistoquímica en cultivos adheridos a cubreobjetos de vidrio. *Biomédica* 1999; 19:245-9.
24. **PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION/WHO.** Poliovirus surveillance in the Americas. *Polio Weekly Bulletin* 2004;19:1-2.