

0396 9
2eje



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

***Infección in vitro de células neurogénicas
de ratón por el virus del dengue***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A .

JOSE RAMOS CASTAÑEDA

DIRECTOR DE TESIS: DR. CELSO RAMOS GARCIA

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



A Gilma

“Contrary to widely held belief,
the goal of science is not truth.
That arcane and ancient sandbox
is the playground of philosophers...
If not truth, then what are scientists
after? Predictability.”

W. Peter Trower. Newsweek 1992, 24 aug.

Indice

Agradecimientos	iv
Abreviaturas	v
Introducción	
1.- El virus del dengue	1
2.- Tropismo viral	
2.1- Factores del hospedero que influyen en la susceptibilidad a la infección viral.	4
2.2.- Factores virales que determinan el tropismo.	5
3.- Receptores para virus	
3.1.- Estrategias metodológicas utilizadas en el estudio y caracterización de receptores para virus.	8
3.2.- Aspectos cinéticos de la interacción virus-receptor.	10
4.- Efecto de los virus en la síntesis de proteínas clulares	13
Hipótesis y Objetivos	15
Materiales y Métodos	16
Resultados	21
Discusión y Conclusiones	29
Referencias	33

Agradecimientos

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Neurovirología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velazco Suárez".

Agradezco el apoyo de todo el personal de la Subdirección de Investigación del INNyN, en particular a la Biol. Patricia Guevara por su valiosa ayuda; así mismo, a los integrantes de mi comite tutorial: Dr. Celso Ramos, Dr. Alejandro Alagón y Dr. Julio Sotelo y al M. en IBB. José Luis Imbert por su cooperación a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Finalmente, quiero dejar constancia de mi admiración y agradecimiento al Dr. Edmundo Lamoyi por sus imprescindibles comentarios críticos sobre este trabajo. Considero que el Dr. Lamoyi es el mejor inmunologo de México y, ciertamente, un ejemplar científico.

ABREVIATURAS

JEV	<i>Virus de la encefalitis japonesa</i>
WNV	<i>Virus del este del Nilo</i>
SLV	<i>Virus de la encefalitis de San Luis</i>
VSV	<i>Virus de la estomatitis vesicular</i>
HSV	<i>Virus herpes simplex</i>
F-MuLV	<i>Virus de la leucemia murina, cepa Friend</i>
M-MuLV	<i>Virus de la leucemia murina, cepa Moloney</i>
TMEV	<i>Virus de la encefalomielitis de Theiler</i>
HIV	<i>Virus de la inmunodeficiencia humana</i>
ECMV	<i>Virus de la encefalomiocarditis</i>
FMDV	<i>Virus de la enfermedad de boca y pies</i>
HCMV	<i>Citomegalovirus humano</i>
HBV	<i>Virus de la hepatitis B</i>
SFV	<i>Virus del bosque Semliki</i>
GALV	<i>Virus de la leucemia del mono gibbon</i>
HCV	<i>Virus de la hepatitis C</i>
BVDV	<i>Virus de la diarrea bovina</i>
HTLV-1	<i>Virus de la leucemia de células T humana, tipo 1</i>
MHV	<i>Virus de la hepatitis murina</i>

INTRODUCCION

1.- El virus dengue.

Los virus dengue (serotipos 1 al 4) pertenecen a la familia *Flaviviridae*, éstos son virus envueltos y poseen un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 11 kilobases; el extremo 5' del genoma tiene un Cap de tipo I y una región no traducida de aproximadamente 100 bases después de la cual se encuentra un marco abierto de lectura (aproximadamente 10 kilobases) que codifica para una poliproteína que es procesada por proteasas celulares y virales; la región 3' no traducida del genoma consta de aproximadamente 500 bases, en esta región no existe un cadena de poli A o esta es menor de 10 bases (1); la organización del genoma se muestra en la Figura 1a.

El virión es esférico y la nucleocápside carece de simetría aparente (Figura 1b); mide aproximadamente 50 nm y está constituido por tres proteínas estructurales C, E y M (2). La proteína C está asociada al RNA viral, tiene un peso molecular relativo (PMr) de aproximadamente 14 kilodaltones (kDa) (2). La proteína E es una proteína glicosilada que está integrada en la membrana de lípidos y tiene un PMr de 51 a 59 kDa, es una proteína superficial en la cual se encuentran las principales funciones biológicas y antigénicas del virus. Así, se ha demostrado que la proteína E es la responsable de la unión a las células susceptibles; además en esta proteína se encuentran epitopes de neutralización, hemaglutinación y los inductores de anticuerpos responsables del fenómeno de "facilitación inmunológica" (2-7). La proteína M es altamente hidrofóbica y forma parte de la membrana del virus, tiene un PMr de 8 kDa y es uno de los productos de proteólisis del intermediario glicosilado preM, aparentemente se asocia con la proteína E para estabilizar la estructura del virión y colaborara en la unión al receptor celular (2).

El virus dengue es transmitido al humano por la picadura del mosquito *Aedes aegypti*; la infección se asocia con un cuadro febril autolimitado que en ocasiones puede complicarse con un cuadro de fiebre hemorrágica/síndrome de choque por dengue (FHD/SCD) (2). Se estima que la incidencia anual en el mundo es de aproximadamente 100 millones de casos y de unos 33 mil casos mortales reconocidos desde mediados de los años 50's (4).

En los humanos la patología más importante es la de los casos de FHD/SCD, en los cuales los hallazgos clínicos y de laboratorio más relevantes son el aumento del hematocrito y la trombocitopenia (5). Para explicar esta patología se han propuesto dos hipótesis, a) la "facilitación inmunológica" y b) el incremento de la virulencia (4,6).

La hipótesis de la "facilitación inmunológica", tiene un mayor respaldo epidemiológico y de laboratorio. Así, se sabe que la probabilidad de desarrollar un cuadro hemorrágico es mayor en pacientes que tienen anticuerpos contra un serotipo y posteriormente se infectan con cualquiera de los otros serotipos; la hipótesis sostiene que durante la primera infección se generan anticuerpos no neutralizantes que "facilitan" la penetración del virus al macrófago; estos anticuerpos se han detectado en el suero de pacientes con fiebre hemorrágica y en infección experimental inducida en simios (7). La infección del macrófago provoca, entre otros fenómenos, la liberación de sustancias

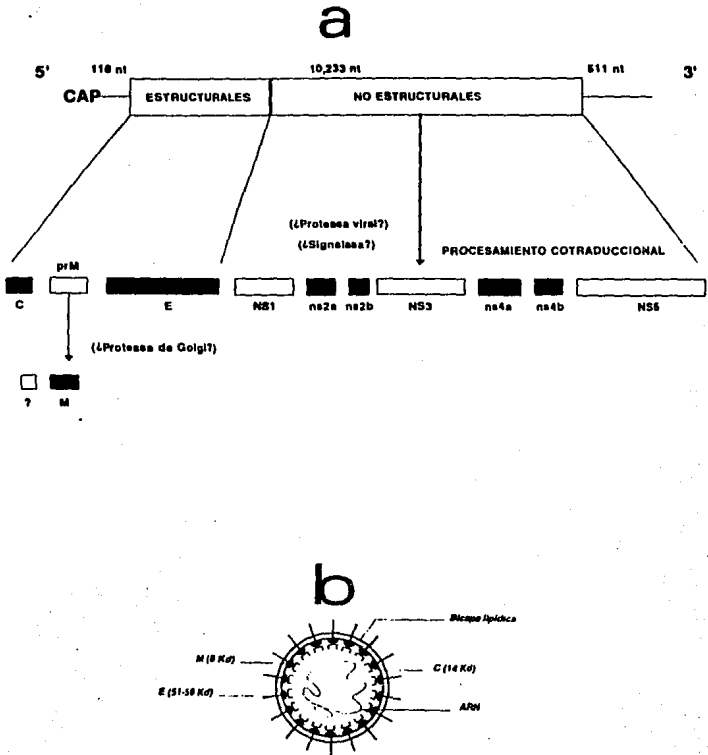


FIGURA 1.- El virus dengue. Organización del genoma (a) y estructura del virión (b). Modificado de la referencia 2.

vasoactivas, en particular la serotonina y el C3a, que promueven la extravasación de líquidos y, consecuentemente, la hemoconcentración.

Por otro lado, la hipótesis que apoya el incremento en la virulencia y su asociación con casos hemorrágicos propone que algunos virus poseen una elevada virulencia; esta hipótesis se basa en los reportes de casos de dengue hemorrágico asociados con infecciones primarias, sin embargo, a pesar del extenso estudio molecular de virus aislados de casos clínicos de varias regiones del mundo, no hay una clara correlación entre la cepa de virus y los casos hemorrágicos (8).

En el ratón la infección por dengue causa un padecimiento neurológico cuya severidad depende de la edad y de la vía de inoculación (9,10). En este animal y en el humano, los virus dengue se replican principalmente en células del sistema retículo endotelial en las cuales la infección parece estar mediada por un receptor sensible a la tripsina (11). No obstante, en el ratón lactante, el virus se replica preferentemente en neuronas del sistema nervioso central (SNC), los estudios inmunohistoquímicos de cortes de cerebro de ratones infectados demostraron la presencia del antígeno viral en el citoplasma de las neuronas, sin embargo, no se observó antígeno asociado a las células gliales ó al endotelio vascular; el examen histológico de las lesiones cerebrales causadas por la replicación del virus, muestra la necrosis de amplias zonas del cerebro con escaso infiltrado inflamatorio (12); estos datos contrastan con los observados en ratones infectados por JEV (13); sin embargo, ambos estudios sugieren que la infección de las neuronas está asociada a una alteración funcional y la muerte de la neurona.

Se cree que los flavivirus pueden llegar al SNC por vía sanguínea (14); así, luego de una ronda de replicación en los macrófagos se presenta una elevada viremia de tal forma que los virus pueden alcanzar el cerebro a través de la barrera hematoencefálica o de los plexos coroideos. No se ha encontrado evidencia de que el virus se replique en las células del endotelio vascular, no obstante, esto no sería una limitante pues se ha demostrado que otros virus que infectan al SNC (virus neurotrópicos), entre ellos algunos flavivirus, pueden atravesar el endotelio sin infectarlo o causar daño al tejido (15).

La infección del SNC del ratón por los virus dengue es dependiente de la edad del animal (5), sin embargo, parece no estar restringida por el contexto genético, lo cual difiere del comportamiento de otros flavivirus (9). Algunos, de los factores del virus que influyen en la capacidad de infectar al sistema nervioso (neurotropismo) son la cepa del virus y el número de pasajes *in vivo* e *in vitro*; así, los flavivirus aumentan su neurotropismo cuando se pasan en cultivo de células o por inoculación al cerebro del ratón lactante (2). El incremento en el neurotropismo está asociado a una mutación en la proteína E (15a).

Imbert y colaboradores demostraron que varios serotipos y cepas de los virus dengue infectan principalmente neuronas en cultivos primarios de células del SNC de ratón (16); la infección es productiva ya que el virus se libera al medio en aproximadamente el 30 % del inoculo inicial, lo cual quizás sea reflejo del número limitado de neuronas susceptibles; en ese sentido, menos del 10 % de las neuronas presentes en el cultivo se infectan aún después de prolongados periodos de exposición al virus. La morfología de las neuronas infectadas es predominantemente bipolar aunque se pueden encontrar algunas neuronas

trípares, por lo que es probable que haya una subpoblación neuronal sensible a la infección. Una observación que apoya lo anterior es la susceptibilidad de diversas líneas celulares neurogénicas a la infección por JEV (17). Hase y colaboradores demostraron mediante microscopía electrónica que el virus infecta a las células NG108-15 pero no a células híbridas (17); los autores sugieren que la susceptibilidad de estas células puede deberse a que poseen el receptor para el virus, mientras que las células híbridas lo han perdido durante la formación del heterocarionte. Se desconoce la identidad del receptor neuronal para el virus dengue, no obstante, se ha sugerido que puede ser un receptor para neurotransmisor (9).

Existe controversia respecto a si los virus dengue se asocian con alteraciones neurológicas en humanos; en este sentido, se han documentado algunos casos de encefalitis asociada con infecciones primarias y secundarias por dengue, no obstante, estos casos parece ser más la excepción que la regla (18,18a).

2.- Tropismo viral

El tropismo viral es la capacidad que tienen los virus para infectar poblaciones discretas de células (19). Desde un punto de vista reduccionista, el tropismo viral depende de la expresión de factores del virus que al interactuar con factores celulares establecen una relación que determina en gran parte, la patología de las infecciones causadas por virus. Actualmente el tropismo viral es un campo de intenso estudio, tanto por sus aplicaciones inmediatas en la profilaxis y terapia de las enfermedades virales, como por los aportes en el conocimiento de las funciones celulares.

En principio, si un virus infecta a un órgano específico se puede establecer la relación causal que provoca el padecimiento. El hecho de que un virus produzca un cuadro patológico es resultado de la conjunción de una serie de factores tanto virales como de susceptibilidad del hospedero. Los factores que influyen en la susceptibilidad del hospedero a la infección viral son: la edad, el contexto genético, la vía de entrada y de diseminación y la participación de componentes celulares que intervienen en la replicación viral (19); la participación de receptores celulares para virus se discutirá más adelante. Por otro lado, los factores virales que determinan el tropismo son las proteínas virales de unión (PVU) y los factores *cis*- y *trans*-activadores de la replicación viral (19).

2.1.- Factores del hospedero que influyen en la susceptibilidad a la infección viral.

En el ratón existe información que documenta la dependencia de la infección con la edad; por ejemplo, la mayoría de los flavivirus inoculados por vía intracerebral provocan encefalitis mortal en el ratón lactante pero muy pocos en el ratón adulto (9); se desconocen las bases moleculares de esta restricción, sin embargo en un reporte reciente Ogata y colaboradores utilizando un modelo de infección experimental en rata, consistente en transplantar tejido cerebral inmaduro a animales adultos que posteriormente fueron infectados con JEV, observaron que solo el tejido inmaduro era sensible a la infección (20); esta diferencia se atribuye a la presencia en el tejido inmaduro de un receptor para el virus JE, el cual se expresa diferencialmente según la edad del animal.

Los flavivirus infectan solo a algunas cepas singénicas murinas (21); aparentemente la habilidad para resistir la infección está relacionada con una disminución en la replicación viral en los tejidos de estos animales y los ratones resistentes a la infección son más

susceptibles a la acción antiviral del interferón (22). Por otro lado, se sabe que los ratones A2G son resistentes a la infección por el virus de la influenza A; esta resistencia se hereda de manera autosómica dominante asociada al alelo Mx del cromosoma 16 del ratón; la resistencia está mediada por la acción del interferón alfa y beta, ya que cuando los ratones son inoculados con anticuerpos anti-interferón, la resistencia se pierde; así mismo, si se transfieren células con el cDNA que codifica para la proteína Mx en animales sensibles, éstos se convierten en resistentes, además, es común encontrar delecciones en el gene Mx que lo vuelven defectuoso en ratones sensibles (23-25). La limitación en la replicación del virus asociada con el contexto genético se ha observado en infecciones por herpesvirus, poxvirus, papovavirus, rhabdovirus, coronavirus, retrovirus y arenavirus (26-32). En la mayoría de los casos los genes que determinan la resistencia aparentemente se segregan independientemente, lo que sugiere que la resistencia es el resultado de una variedad de mecanismos (19).

El sitio de entrada es importante en las infecciones por virus neurotrópicos; éstos pueden invadir el SNC al ser transportados de manera retrógrada al cerebro luego de la infección de las placas neuromusculares (vía neural) o bien a través de la barrera hematoencefálica (vía sanguínea) (14). Los estudios clásicos con poliovirus demostraron que hay áreas del cerebro del ratón que siempre son infectadas independientemente de la vía de inoculación, mientras que hay otras que dependen del sitio de inoculación; por ejemplo, el núcleo septal y los bulbos olfatorios solo se infectan cuando el virus se inocula por vía transnasal (19); el VSV, HSV, herpes suis, reovirus tipo 3 y rabia muestran un comportamiento análogo (33-37). No están bien caracterizados los mecanismos que utilizan los virus que llegan al cerebro por vía sanguínea (14); un ejemplo que ilustra lo anterior es la selectividad que muestra el endotelio vascular cerebral a la infección por arbovirus neurotrópicos (15); aparentemente, no existe necesidad alguna de replicación viral en las células endoteliales para que diversos arbovirus puedan ser liberados a la región basolateral del tejido endotelial; por ello se especula que el nivel de la viremia es un factor de mayor importancia en la neuroinvasión (14). No obstante, un fenómeno relacionado y aún poco claro es el conocido por "efecto de provocación"; por ejemplo, si a un simio se le inocula el virus de la polio serotipo 1 por vía intracardiaca precedido de una inoculación intramuscular, la parálisis tiende a ocurrir más frecuentemente en el miembro inoculado intramuscularmente (19).

2.2 FACTORES VIRALES QUE DETERMINAN EL TROPISMO.

Una forma de entender al tropismo viral es como un fenómeno concertado entre factores virales y celulares (38), la presencia o ausencia de alguno de estos componentes, así como la expresión dependiente del ciclo de replicación viral y celular determinarían el destino de la infección, a saber: estado refractario de la célula a la infección, establecimiento de la infección y muerte celular o establecimiento de una infección persistente.

Aunque históricamente se ha prestado mayor atención al aislamiento y caracterización de proteínas virales de unión, no es menos importante la participación de elementos virales e intracelulares que permiten la expresión y replicación viral; así por ejemplo, se han descrito elementos potenciadores (enhancers) que están compuestos por secuencias genómicas virales cortas (50-100 pares de bases), que frecuentemente se encuentran repetidas en "tandem" y que estimulan la transcripción viral, por ejemplo en los

papovavirus, retrovirus, herpesvirus y hepadnavirus (39-43). Estas secuencias determinan la infección viral en células específicas, pero además actúan de manera dependiente del estado de maduración, así por ejemplo, en el caso de la infección por poliomavirus de células embrionarias de ratón se sabe que el elemento potenciador es una secuencia de 245 pares de bases que tiene dos dominios funcionales los cuales modulan la actividad transcripcional del virus según el estado de diferenciación celular (44). Por otro lado, el patrón del padecimiento causado por la infección viral también está influenciado por estas secuencias; por ejemplo, los retrovirus F-MuLV y M-MuLV producen eritroleucemia y linfomas de línea T, respectivamente y poseen elementos potenciadores en sus regiones repetidas invertidas terminales (LTR); cuando se producen recombinantes de estos virus de tal forma que la región del elemento potenciador de uno se encuentre en el contexto genético del otro, el patrón de enfermedad corresponde con la secuencia reguladora contenida en el LTR (45). En cierto sentido, estas regiones son esenciales para la actividad transcripcional, pero se han definido elementos no esenciales para la transcripción viral y que modifican la virulencia y el tropismo viral; se sabe que hay una base en la región 5' no traducida (U472) que confiere la neurovirulencia en poliovirus (46), hallazgos similares se han reportado con el TMEV y Sindbis (47,48); aparentemente, en estos casos, la capacidad de infectar neuronas y causar un padecimiento neurológico, depende de la estructura secundaria que adquiere el genoma de RNA y que permite la expresión viral en esas células (49). Otro ejemplo relevante es el caso de los HSV 1 y 2; en éstos existen por lo menos dos segmentos no esenciales para el crecimiento en cultivo de células que son factores de neurovirulencia y los cuales se encuentran en la región promotora tardía γ_1 ; no obstante, se desconoce el mecanismo molecular por el que estos genes modulan la expresión viral (50,51). En los reovirus la neurovirulencia está asociada al gen S1 (hemaglutinina viral), sin embargo, no está claro si el producto de expresión de este gen es la proteína viral de unión o si existe otro mecanismo por el que este gen confiera el neurotropismo (52).

En muchos casos las actividades intracelulares que actúan de manera *trans* activadora son desconocidas pero, como en el caso del HIV, los factores *trans* activadores pueden ser estimulados por sustancias como los ésteres de forbol, lo que sugiere que éstos factores *trans* pueden ser factores de transcripción (53).

La interacción virus-membrana plasmática es el primer paso importante en el tropismo viral (38). La interacción del virus con la célula está mediada por las proteínas virales de unión (PVU) y los sitios celulares de unión; es importante enfatizar que las PVU pueden estar constituidas por más de una proteína del virión, como en el caso de los herpesvirus y picornavirus o por una sola proteína como es el caso de los virus dengue (3,54,55). En algunos casos se han definido los dominios de unión en las PVU mediante técnicas de mutagénesis dirigida o a través de mapeo de epítopos neutralizantes con anticuerpos monoclonales (56,57,58). Es evidente que los elementos que confieren el tropismo celular se encuentran en regiones discretas de las PVU; en el caso del virus de la influenza, los estudios de cristalografía de rayos X demuestran que el dominio de unión a la célula se encuentra en el extremo distal de la cabeza globular de la hemaglutinina viral (59). En otros casos, la región de unión está definida por una superestructura formada por varias proteínas del virión; algunos picornavirus muestran una topología similar en la superficie externa caracterizada por grandes protuberancias rodeadas por depresiones por debajo

del plano superficial que están distribuidas, cada cinco veces, alrededor de un eje de simetría icosaédrico; estas depresiones están formadas por una parte de la proteína de la cápside (VP1) y del extremo carboxilo terminal de la proteína VP3 (55). Un ejemplo notable de como las PVU participan en el tropismo, es mediante su modificación por cambios inducidos; Neda y colaboradores. (60), modificaron por medios químicos la PVU de un retrovirus murino, en los cuales la actividad glucolítica de la PVU permite la absorción a la membrana; por esta metodología demostraron que el cambio de la especificidad en la actividad glucolítica de la PVU, cambia la especificidad celular; se han reportado observaciones similares con el virus de la influenza, el cual se une a residuos de ácido siálico en la membrana de las células blanco; el cambio de un aminoácido en la PVU modifica la especificidad por el carbohidrato al que se une en la membrana plasmática (61).

3.- RECEPTORES PARA VIRUS

La primera interacción que se establece entre el virus y su célula blanco es la unión a la membrana, esta primera interacción está mediada por receptores celulares para el virus siendo la naturaleza de estos receptores la que determinará la forma en que el virus (su genoma) será internalizado (38); por ejemplo, dependiendo del origen y tipo de célula blanca algunos virus pueden llevar a cabo diversos tipos de internalización lo cual es reflejo de diferencias intrínsecas de los receptores en las membranas de esas células; así, los flavivirus infectan a células de mosquito principalmente mediante la interacción de sus membranas, mientras que en células de mamífero la internalización parece estar mediada por un receptor celular (62). Aunque está claro que la presencia de receptores celulares es uno de los elementos que determinan el tropismo de algunos virus, su distribución en los tejidos no siempre correlaciona con la localización de los sitios de replicación del virus (38,63); por ejemplo, el receptor para poliovirus es una molécula ubicua, sin embargo, el virus solo se replica en algunos tejidos del huésped (64). Algunos virus pueden utilizar diversos receptores como es el caso de algunos retrovirus murinos y del HIV (65-69,86). Otros virus, relacionados o no, pueden compartir receptores celulares, por ejemplo el virus Visna, SFV y LDHV (ver Tabla I) lo que sugiere que la propiedad de unión a una célula puede establecer una relación evolutiva conservada (38,70).

La naturaleza química de los receptores celulares es diversa e incluye azúcares simples o complejos, glicolípidos, fosfolípidos y glicoproteínas (71-76). Aunque la caracterización estructural y fisicoquímica de la interacción virus-receptor se ha hecho en gran parte, utilizando sistemas virus-azúcar, actualmente se considera que los fenómenos relacionados con la unión de los virus a las proteínas celulares explican mejor la patogénesis viral, básicamente por dos razones; a) la expresión de una proteína de membrana plasmática está regulada a varios niveles y este hecho podría influir en el efecto que ejercen sobre el tropismo viral los factores del huésped (19,38) y b) algunos receptores realizan funciones de comunicación celular y si éstos son susceptibles de "activarse" por la unión del virus, entonces se podrían explicar algunos fenómenos donde la replicación viral o la respuesta inmune del huésped parece no ser el evento principal en la patogénesis (77), por ejemplo, una cepa defectiva del F-MuLV provoca eritroleucemia en el ratón, la unión de este virus a eritroblastos se lleva a cabo a través de receptores para eritropoyetina y se sabe

que la unión del virus promueve la proliferación de eritroblastos de la misma manera en que lo hace la eritropoyetina, por lo que es posible que la unión promueva la eritroleucemia (78). Por esto, es importante aislar y caracterizar las proteínas celulares que específicamente unen virus; en la Tabla I se muestran los receptores celulares conocidos para algunos virus, así como las funciones que naturalmente tienen estas proteínas en las células.

Tabla I.- RECEPTORES PARA VIRUS PRESENTES (PROTEÍNAS) EN LA MEMBRANA CELULAR.

Virus	Receptor	PMr (kDa)	Función Celular	Referencias
Poliavirus	PVR	100	desconocida	80,81
Rhinovirus	ICAM -1	95	Adhesión intercelular	82,83
Semliki Forest	H-2(K,D)/HLA(A,B)	44	Reconocimiento celular	84
LDHV	Ia	30-33	Reconocimiento celular	85
HIV	CD4/CD26	58/120	Reconocimiento celular	66,67,86
Epstein-Barr	CD21	140	Receptor para C3d	87
Citomegalovirus ¹	β 2-Microglobulina	12	Reconocimiento celular	88
Visna	Ia	30-33	Reconocimiento celular	89
Sarampión	CD46	58-68	Activación de complemento	90
MHV	Antígeno carcinoembrionario	110	Antígeno de diferenciación	91
Rabia	Receptor nicotínico	280	Receptor para acetilcolina	92
Reovirus tipo 3	Receptor β -adrenérgico	67	Receptor para nor adrenalina	93
Yaccinia	EGF-R	180	Receptor para el factor de crecimiento del epidermo.	94
F-MuLV	EPO-R	62-64	Receptor para eritropoyetina	78
Hepatitis B ²	IgA-R	80	Receptor para IgA polimérica	95
MuLV-E/GALV	Transportador Y ⁺	67	Translocador de aminoácidos catiónicos	96,97
ECHO-1	Integrina VLA-2	120-210 y 130(β)	Receptor para matriz extracelular	98
Sindbis ³	Receptor de alta afinidad para laminina	67	Receptor para matriz extracelular	99
TGEV/HCV	Aminopeptidasa N	150	Ecto-enzima	100,101
LCMV	desconocido	120-140	desconocida	102
TMEV	desconocido	34	desconocida	103
FeLV-A	desconocido	135-140	desconocida	79
Adenovirus	desconocido	34-42 y 78	desconocida	104
Coxsackie ⁴	Rp-a	50	desconocida	105
Polyoma	desconocido	50-95	desconocida	106
BVDV	desconocido	50	desconocida	107
HTLV-1	desconocido	31-70	desconocida	108

1= También se ha reportado un receptor de 30/34 kDa en fibroblastos humanos (109).

2= También se ha reportado un receptor de 35 kDa en hepatocitos humanos (110).

3= También se ha reportado un receptor de 74/100 kDa en células NG108-15 (111).

4= También se ha reportado un receptor de 275 kDa en células HeLa (112).

3.1.- ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES PARA

VIRUS

Las estrategias metodológicas más frecuentemente utilizadas para la caracterización de receptores celulares parten de la demostración de que exista una molécula presente en la membrana de las células sensibles a la infección viral y que este ausente en las células no sensibles, la cual se puede realizar por tres enfoques:

1) Primero se realizan experimentos de unión del virus (ó PVU) con la célula blanco, seguidos de la recuperación del complejo virus-receptor por inmunoprecipitación (77); esta metodología presenta dos problemas, en primer lugar no siempre la unión virus receptor es estable en las condiciones de concentración de detergente y fuerza iónica del amortiguador de precipitación; para solventar este problema se han utilizado reactivos entrecruzadores que estabilizan la interacción al formar enlaces covalentes intermoleculares, sin embargo, esta modificación introduce otro tipo de problema como es la especificidad del complejo formado o la posterior disociación del complejo con objeto de caracterizar la proteína entrecruzada (79). En segundo lugar, el rendimiento de las reacciones de inmunoprecipitación es relativamente bajo y complica la purificación del receptor.

2) Se han utilizado anticuerpos anti-idiotipo generados contra anticuerpos neutralizantes anti-virus como ligandos del receptor celular en una cromatografía de afinidad (93,99,110,111); ya que el epitope de neutralización es el sitio de la PVU que interactúa con el receptor celular, los anticuerpos contra el idiotipo del anticuerpo neutralizante representan la imagen del sitio de unión al receptor celular, por lo que estos anticuerpos se pueden acoplar a un soporte de cromatografía. De esta forma la elución del receptor de la columna es relativamente sencilla y el rendimiento en la purificación del receptor se incrementa; sin embargo, esta metodología está limitada por el hecho de que no siempre el epitope de neutralización es el sitio de unión al receptor celular (58,113).

Cuando se sabe que la PVU es solo una proteína del virión, una variante del procedimiento descrito anteriormente es la utilización de la proteína viral como ligando en la cromatografía (104); el problema es la obtención de PVU en una cantidad suficiente para acoplarla a una columna, no obstante, actualmente por medio de técnicas de DNA recombinante se pueden obtener cantidades suficientes de una proteína expresada en sistemas eucariotes.

3) El enfoque utilizado con mayor éxito en el aislamiento de receptores virales se basa en la obtención de anticuerpos monoclonales contra proteínas de membrana plasmática celular que tengan la habilidad de bloquear la unión del virus a la célula blanco (90,98-101); se asume que cualquier anticuerpo que bloquee la infección viral, será un anticuerpo contra el receptor viral (aunque esto último puede ser discutible). Estos anticuerpos son utilizados en la purificación del receptor celular y en ensayos de inmunohistoquímica tendientes a establecer la correlación entre la distribución de receptores y los hallazgos patológicos asociados en infecciones *in vivo* (76).

Existen otras metodologías enfocadas a proporcionar evidencias de la existencia de receptores proteínicos sin que ello implique el aislamiento de la molécula; por ejemplo, el virus de la polio infecta exclusivamente células de primates así que se puede localizar el sitio del cromosoma en donde reside la sensibilidad por medio de la generación de heterocariotes entre células de ratón y humanas; si se sigue mapeando, se puede tener una idea bastante aproximada de la identidad del gen, de hecho, de esta manera se definió el primer receptor celular para un virus, el receptor para polio (113,114).

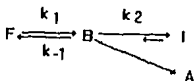
El ensayo de unión en fase sólida conocido por "virus overlay protein blot assay, VOPBA" (89,101,102,108) utiliza proteínas que se extraen de tejidos o células sensibles y se separan por SDS-PAGE, posteriormente son transferidas a un soporte de nitrocelulosa, el cual se incuba con el virus y la unión del virus al receptor se puede evidenciar por medio de anticuerpos dirigidos contra el virus. Una objeción a esta técnica es que la preservación del sitio de unión en la proteína celular en las condiciones desnaturalizantes del SDS-PAGE es bastante cuestionable, sin embargo uno de los receptores para virus mejor caracterizados, el del virus de la hepatitis murina, fue detectado precisamente por esta metodología (115).

Uno de los objetivos al aislar y caracterizar el receptor celular es el de clonar y expresar el gen que lo codifica en sistemas eucariotes (96,97,116); con este material se pueden realizar experimentos de transfección en células resistentes con el fin de conferirles sensibilidad a la infección. No obstante, aún con toda esta información el análisis del tropismo viral mediado por receptores celulares está lejos de ser concluyente; por ejemplo, mediante el uso de diversas metodologías, se estableció que una molécula relacionada con la familia del antígeno carcino-embriionario es el receptor celular para el MHV (116); sin embargo, recientemente se ha reportado que otros factores pueden estar involucrados en el tropismo ya que los animales resistentes a la infección por MHV, expresan funcionalmente al receptor (117) y por otro lado, algunas células sensibles a la infección no lo expresan (118); por lo que se ha postulado la existencia de un segundo receptor (119); no obstante, es posible que modificaciones post-traduccionales en la molécula del receptor influyan en la especificidad.

3.2.- ASPECTOS CINÉTICOS DE LA INTERACCIÓN VIRUS-RECEPTOR

Desde el punto de vista fisicoquímico la interacción virus- receptor es poco conocida por lo que no se ha podido desarrollar un modelo cinético general (62,77,120,121). Antes de describir los modelos descritos a la fecha, es conveniente precisar algunos conceptos; como ya se mencionó la molécula en el virión que sirve de enlace con el receptor celular (Unidad del Receptor Celular, URC) es la PVU y la estructura que contiene uno o más URC y que une efectivamente al virión se llama Sitio Receptor Celular (SRC); es pertinente hacer la distinción entre URC y SRC pues ambos conceptos surgen de supuestos cinéticos diferentes, a saber: a) Existen más URC que SRC en la célula; b) La avidéz de SRC para un virus es mayor que la afinidad del URC y c) El reclutamiento de URC en SRC provoca cambios en el movimiento y tal vez, en la composición lipídica local de la membrana celular. De hecho, se considera que mientras la unión del virus a la URC es monovalente, la formación del SRC es resultado de interacciones multivalentes (62). Existen tres modelos cinéticos que representan la unión del virus a la célula, éstos se presentan en la figura 2 (121).

El primer modelo (fig.2a) tiene como reacción de equilibrio:



donde F, es la fracción de virus libre; B, es la fracción de virus unido; I, la fracción de virus internalizado; A, la fracción de virus que se inactiva durante la unión y k representa la constante de equilibrio de cada reacción, con el subíndice menos para cada reacción reversa. La constante de afinidad (Ka) se expresa en los siguientes términos:

$$K_a = k_{-1}/(k_1)(k_2)$$

esta ecuación es válida suponiendo que solo una pequeña porción del virus se inactiva y que la reacción de internalización es un proceso irreversible (62,120,121). La cinética muestra un proceso de pseudo-primer orden comparable con la reacción enzima-sustrato (62). Este modelo predice una alta dependencia con la densidad de receptores, y se lleva a cabo cuando el número de receptores es relativamente pequeño. Esto tiene implicaciones biológicas importantes ya que en este caso la K_a debe de ser alta para sostener la infección en un medio diluido, por ejemplo, la circulación sistémica en un organismo vivo (ver el caso de rinovirus y HIV, Tabla 2); *in vitro*, donde la concentración de virus puede llegar a ser alta (de más de 300 partículas virales por célula), la reacción solo se ve limitada por la difusión de la partícula viral a la membrana celular.

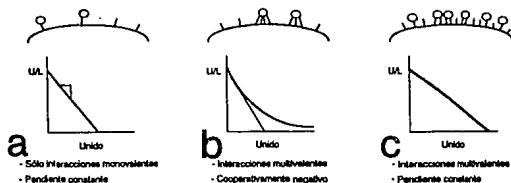
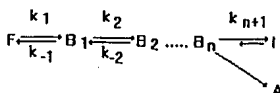


FIGURA 2.- Modelos de INTERACCIÓN VIRUS-CÉLULA. Interacción monovalente (a); interacción multivalente (b) e interacción multivalente con restricción estérica. En las gráficas se muestra lo unido (U) contra la fracción unido/libre (U/L). Modificado de la referencia 121.

El segundo y tercer modelos (fig.2b y 2c respectivamente) parten del hecho de que los virones poseen múltiples copias de la PVU en su superficie y ello promueve la formación de enlaces multivalentes con los receptores celulares; la ecuación de estado que define el equilibrio, en ambos casos, es la siguiente:



donde B_1 , B_2 ... y B_n son los estados de unión del virus a la membrana celular y que corresponden a la unión de una molécula (B_1), a dos moléculas (B_2) hasta n moléculas del receptor (B_n). El segundo modelo propone una saturación de receptores por la formación de enlaces multivalentes, en este caso la K_a se calcula suponiendo prácticamente nulos los efectos de difusión lateral de los receptores en la membrana y su estado de fluidez (62,120,121); la cinética muestra una cooperatividad negativa, sin embargo, ésta se debe tomar con precaución ya que otros mecanismos como la unión monovalente combinada con la unión inespecífica o la presencia de dos poblaciones de receptores en la membrana, pueden provocar el efecto de cooperatividad negativa (121). La expresión matemática de la

Ka en estos casos es compleja. El tercer modelo supone una saturación espacial de los receptores por unión multivalente; la diferencia con el anterior modelo es que mientras en el segundo la limitante es el número de receptores, en este la limitante es el número de enlaces posibles entre los receptores y las PVU en la partícula viral; como es evidente en este caso, la afinidad de la interacción, depende únicamente del área efectiva de unión a la membrana, la cual se define tanto por el número de PVU que se encuentran en el plano apropiado de interacción con los receptores celulares como por la propia superficie de la membrana celular (121). En ambos modelos la formación de enlaces multivalentes provoca un ligero aumento de la afinidad, sin embargo, en estos casos la unión se ve favorecida por el alto número de receptores celulares (ver el caso de baculovirus y SFV en la Tabla 2); esto podría explicar la idea de que los virus que se unen con una relativamente baja afinidad a sus células blanco, tienen una alta densidad de receptores celulares y si esto es así, los receptores en estas células deben de ser moléculas ubicuas y simples como los azúcares o lípidos (38,121).

En general la afinidad de la interacción virus-receptor celular es alta. Esto se debe en gran medida a la capacidad de los virus de formar enlaces multivalentes con sus receptores celulares; la Tabla 2 muestra una comparación de las constantes de afinidad de diversos sistemas biológicos. El hecho de que la interacción virus-célula tenga una afinidad de por lo

Tabla II.- COMPARACIÓN DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD (KA) Y LA DENSIDAD DE SITIOS RECEPTORES EN DIFERENTES SISTEMAS BIOLÓGICOS LIGANDO/RECEPTOR.

Sistema Ligando/receptor	Ka ^a (M ⁻¹)	Ka ^b (Ka/cel)	Densidad ^c (rc/cel)	Referencia
Lisozima/sustrato	10 ³	--	--	122
Anticuerpo/antígeno	10 ⁵ -10 ¹⁰	--	--	123
Toxina cólera/célula	10 ⁹	--	--	124
Ig E/mastocito	10 ⁹	10 ¹⁶	4x10 ⁴	125
FMDV/célula	5x10 ¹²	>10 ¹⁶	--	126
Rinovirus 14/célula	4x10 ⁸	2x10 ¹⁰	10 ⁴	121
Adenovirus 2/célula	10 ⁷ -10 ⁸	--	10 ⁴	121
Baculovirus/célula	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵ -10 ⁷	121
VSV/célula	10 ⁶	--	3x10 ⁵	121
SFV/célula	10 ⁷	>10 ⁷	10 ⁶	84,121
HIV/célula	10 ⁹	--	3x10 ³	127

a= Constante de afinidad expresada en 1/mol.

b= Constante de afinidad total, debida a interacción multivalente, expresada como la Ka/célula.

c= Densidad de sitios receptores, expresada como número de sitios receptores/célula.

menos tres órdenes de magnitud mayor que la afinidad de la interacción ligando-receptor

establece una limitante metodológica en la caracterización de los receptores para virus, pues cualquier ensayo en el que se pretenda competir un ligando monovalente contra un virus fallará por el hecho de que no se podrán establecer las condiciones de equilibrio necesarias para detectar la unión específica; en otras palabras, la interacción virus-célula es, en comparación a la del ligando monovalente-receptor, prácticamente irreversible.

La unión del virus a la membrana es un fenómeno relativamente insensible a la temperatura; la cual, en todo caso, influye en la difusión del virus al modificar ligeramente la viscosidad del medio de cultivo (62,121). No obstante, la unión se puede llevar a cabo a 4°C y se estima que la tasa de unión se incrementa entre 1.3 y 2 veces por cada 10°C en el rango de 10° a 40°C según el tipo de virus (62); así mismo, el pH del medio puede influenciar la interacción en dos formas; varios grupos han reportado que cuando el pH del medio extracelular es ácido, la interacción virus-célula que se favorece es la fusión de membranas y esto ha permitido proponer que los virus que son internalizados por endocitosis mediada por receptores se desnudan fusionando su membrana con la del endosoma cuando en esta vesícula disminuye el pH (128); por otro lado, el pH puede modificar la conformación de la PVU, uno de los ejemplos más conocidos es la hemaglutinación por flavivirus, los cuales aglutinan eritrocitos de ganso en el rango de pH 6 a 7.5, siendo una característica de cada serotipo el pH óptimo de hemaglutinación (5).

Finalmente, se ha debatido mucho el papel que juegan los lípidos en la unión del virus a la célula; aunque no hay una posición de consenso, parece que la composición local de lípidos tiene una influencia más determinante en los eventos posteriores a la unión que en la unión misma (129).

4.- Efecto de los virus en la síntesis de proteínas celulares.

Después de la unión e internalización del virus éste compete con el aparato de transcripción y traducción celular para formar nuevos viriones, lo que puede provocar cambios sutiles en la expresión de genes celulares y fenómenos de supresión de algunas funciones celulares (síntesis de proteínas celulares, DNA, etc.). A continuación se describen algunos de estos fenómenos con énfasis en aquellos causados por virus RNA.

Los virus cuyo genoma es de DNA y los de RNA que forman un intermediario de DNA para transcribir sus mensajeros (familia *Retroviridae*) compiten con las actividades celulares que permiten la transcripción de sus genomas (130). En este contexto se han descrito los siguiente fenómenos: 1) Inhibición de la transcripción celular, ya sea por inhibición de la RNA polimerasa II o porque la RNA polimerasa viral sea más eficiente en utilizar los abastos celulares de ribonucleótidos trifosfato; otra forma de inhibir la transcripción celular es la generación de un intermediario viral que bloquee la elongación de las cadenas nascentes de RNA heteronuclear como se ha descrito en el caso de VSV (131); 2) Estimulación de la actividad transcripcional celular por factores virales contenidos en el virión; algunos virus, como el HSV, tienen una proteína estructural que interactúa con factores de transcripción como el OTF-1 que aumenta la transcripción de los genes tempranos α virales (132); 3) Modificación en la actividad de los factores de transcripción celulares, ya sea porque los productos virales modulen el estado de fosforilación de factores de transcripción celulares y con ello modulen la actividad del factor de transcripción o porque actúen en conjunto con factores celulares que transactiven genes virales o

transrepriman genes celulares (132); 4) Inducción o expresión de factores que se unen a DNA; se han descrito diversos factores virales que se unen al DNA celular ya sea como productos de oncogenes, o bien análogos no oncogénicos de factores de transcripción como E1A en el caso de adenovirus (133).

Estos fenómenos provocan en la célula infectada, cambios estructurales y metabólicos tales que en muchas ocasiones modifican el fenotipo celular de normal a transformado y son considerados uno de los elementos iniciales en la oncogénesis (134).

En el caso de los virus RNA de cadena positiva, pareciera que solo fuera necesario utilizar las actividades celulares de traducción para la expresión de sus proteínas; sin embargo, el hecho de que el RNA viral se encuentre en una proporción extremadamente pequeña con respecto al total de mensajeros celulares ha obligado a los virus a desarrollar mecanismos que permitan la traducción preferencial de sus genomas (130,135). La consecuencia del fenómeno anterior es la supresión de la síntesis de las proteínas de la célula hospedera (Shut Off) (136). Aunque no se conoce con certeza el mecanismo por el cual la infección viral establece el shut off se ha observado que algunos virus inhiben a la RNA polimerasa II a través de un producto viral (131); por otro lado, se sabe que durante la infección viral se altera el equilibrio osmótico de la célula (137), esto ha llevado a proponer que el cambio en la concentración iónica del citoplasma induce una disminución en la traducción de mensajeros al disminuir la vida media de éstos (137,138).

En algunos casos la supresión de la síntesis de proteínas no es total; se piensa que así como el RNA viral es mas resistente a los cambios iónicos, ciertos RNA mensajeros celulares pueden resistir y potenciar su expresión (137). Desde luego, el estudio de estos fenómenos tienen mayor relevancia en células excitables en donde la transducción de señales y la expresión selectiva de proteínas no asociada a factores de transcripción virales, pueden modificar sustancialmente el comportamiento celular.

Un tema poco estudiado es la modificación del patrón de transcripción celular asociado con la unión del virus a la célula. En el caso del virus Epstein-Barr, la unión a su receptor (CD21) en linfocitos B inmaduros promueve su diferenciación *in vitro* (139); el retrovirus F-MuLV promueve la expresión de hemoglobina en mioblastos al unirse a su receptor (78). Aparentemente la unión del virus a su receptor transduce una señal que induce una cascada de segundos mensajeros que promueve cambios celulares. A este respecto, el HSV provoca la activación específica de la proteína cinasa dependiente de diacilglicerol/ Ca^{++} (PKC) y el HCMV induce la activación de los proto-oncogenes fos y jun, por un mecanismo en el cual pueden intervenir la PKC y la proteína cinasa dependiente de Ca^{++} /Calmodulina (PKA) (140,141).

HIPOTESIS

Los virus que pertenecen a la familia *Flaviviridae* tienen diversos patrones de neurovirulencia que se ha observado en humanos y en animales de experimentación. Esta diversidad puede depender de la presencia de factores de la célula, tales como los receptores para virus o factores que regulan la expresión o estabilidad del RNA viral. Hay evidencias experimentales que sugieren la participación de receptores para virus en células neuronales de ratón; sin embargo, no se tiene evidencia directa de este fenómeno. La hipótesis del presente trabajo se fundamenta en lo siguiente:

Si los virus dengue infectan a las neuronas a través de un receptor en la membrana, estas células se pueden caracterizar por ensayos de inmunocitoquímica no sólo por su contenido en neurotransmisores sino por la expresión de algunas proteínas cuya síntesis depende del estado de maduración celular; los ensayos de inmunofluorescencia con doble fluorocromo permitirán delimitar el tipo de neuronas sensibles a la infección. Además, si la infección está mediada por un receptor en la membrana, el tratamiento de las células con enzimas que destruyan al receptor, impedirá la infección; por otro lado, los ensayos de unión en fase sólida permitirán conocer la naturaleza del receptor que une al virus.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- 1.- Caracterizar las células susceptibles a la infección por el virus dengue serotipo 2 NGC en cultivos primarios de cerebro de ratón.
- 2.- Analizar la infección por el virus en células de neuroblastoma de ratón.
- 3.- Analizar la posibilidad de que la infección por el virus dengue en células de neuroblastoma de ratón sea mediada por un receptor en la membrana celular.

MATERIALES Y METODOS

VIRUS.- En todos los experimentos se utilizó la cepa prototipo Nueva Guinea C del serotipo 2 del virus dengue (DEN 2 NGC), la cual se aisló del suero de un paciente con diagnóstico de dengue clásico durante una epidemia en Nueva Guinea en 1944 (5). El stock viral fue proporcionado por el Dr. D. Gubler (CDC.Fort Collins, CO). Este virus tiene por lo menos 37 pases en cerebro de ratón lactante y 6 en células de mosquito TRA-284. Antes de usarlo, el stock de virus se pasó 2 veces en cerebro de ratón recién nacido y se expandió en células TRA-284 una vez. Las células infectadas se lisaron, por 10 ciclos de congelación y descongelación; el lisado se clarificó por centrifugación a 10,000xg a 4°C por 30 min. Al sobrenadante se agregó suero de ternera a una concentración final de 30 % (v/v) y se conservó en congelación a -70°C. El virus se tituló mediante la técnica de placa lítica en células LLC-MK2 (142). En algunos experimentos el lisado celular infectado se concentró con el sistema Ultrafree LGC (Millipore Bedford, MA) o bien por precipitación con polietilenglicol (PEG) de acuerdo al método descrito por Gould & Clegg (143), de la siguiente manera: el virus se precipitó con NaCl y PEG 6000 (Sigma PM 6,000) hasta una concentración de 0.5 M y 7% (p/v) respectivamente, con agitación en frío durante 2 h a 4°C en la oscuridad y el virus se obtuvo por centrifugación a 10,000xg por 30 min a 4°C; el paquete se resuspendió en amortiguador TGEN (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, Glicina 0.2 M, EDTA 1mM, NaCl 0.1 M) y se volvió a centrifugar a 10,000xg por 5 min a 4°C, el sobrenadante se colocó en un gradiente discontinuo de sacarosa (20 y 50 %) en TGEN y se centrifugó a 100,000xg por 3 h a 4°C; el virus se recuperó de la interfase del gradiente; la sacarosa se eliminó por diálisis contra el amortiguador TGEN y al concentrado viral se le agregó albúmina serica bovina (ASB) a una concentración final de 10 % (p/v) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

CULTIVO PRIMARIO DE CELULAS DE CEREBRO DE EMBRION DE RATON.-

El cultivo se realizó según la técnica descrita por Sotelo y cols, (144). A embriones de 12 días se les amputó la región cefálica, las cuales se colocaron en medio # 1 de cultivo (DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 10% de suero de caballo inactivado a 56°C por 30 min., dextrasa 1%, Insulina cristalina 80 U/ml, NaHCO₃ 1.5 g/l, L-glutamina 0.2 mM y mezcla de antibióticos) el cual se preincubó a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. El tejido se disgregó suavemente pasándolo a través de agujas de diferentes calibres; las células se resuspendieron en medio de cultivo # 1 a una densidad de 10⁵ células/ml y se sembraron en placas de 6 pozos las cuales se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Después de 7 días de cultivo, el medio se reemplazó por medio de cultivo # 2 (medio de cultivo # 1 sin suero fetal bovino, con 20% de suero de caballo y 10 mg/ml citosil arabinosido, este último de Sigma) y se continuó la incubación por tres días más.

LINEAS CELULARES.- La Tabla III muestra el tipo y las características de las células utilizadas en este trabajo. Las células 3T3 Balb/c, Neuro 2a, PC12 y C6 se obtuvieron del American Type Culture Collection (Rockville, MD) y las células N1E-115 y NCB 20 fueron

proporcionadas por el Dr. M. Niremborg (NIH, Bethesda MA). Las células se cultivaron en medio DMEM-alta glucosa/HEPES 20 mM (GIBCO, Gaithersburg, MD) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, Gaithersburg, MD) o 5% de suero de ternera (IN VITRO, México D.F.) para las células 3T3 Balb/c y Penicilina-Estreptomicina (100 UI/ml y 100 µg/ml respectivamente); al medio para las células NCB 20 se le adicionó mezcla de Hipoxantina, Aminopterina y Timidina (0.1 mM, 0.4 µM y 0.1 mM respectivamente) y al medio de cultivo de las células N1E-115 se añadió 10% de suero de caballo y 2.5% de suero de ternera (IN VITRO, México D.F.).

Tabla III.- LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.

CELULA	ORIGEN	ESPECIE	COMENTARIOS
Neurogénicas: Neuro 2A	Neuroblasto	Ratón	Clona no secretora del neuroblastoma C1300.
N1E-115	Neuroblasto	Ratón	Clona noradrenérgica del neuroblastoma C1300. Son estimuladas a diferenciación con DMSO o dbAMPc.
NCB 20	Neuroblasto	R+H ¹	Híbrido de fusión por virus SF de NG108-15 con cerebro de hamster.
PC 12	Neuroblasto	Ratón	Clona dopaminérgica de feocromocitoma murino. Son estimuladas a diferenciación con NGF.
Otras: C6	Glia radial	Ratón	Clona de astrocitoma murino.
3T3 Balb/c	Fibroblasto	Ratón	Se utiliza para ensayos de transfección.
LLC-MK2	Epitelio	Simio	Se utiliza para cuantificar virus en ensayos de placa lítica.
TRA 284	Epitelio	Mosquito	Aislamiento y amplificación del virus dengue.

¹Híbrido ratón-hamster

INFECCION DE CULTIVOS CELULARES.- Se retiró el medio de cultivo y se lavó 2 veces con solución HBSS (KCl 5 mM, KH₂PO₄ 0.3 mM, NaCl 138 mM, NaHPO₄ 0.3 mM, CaCl₂ 1.3 mM, MgSO₄ 0.4 mM, pH 7.5); el virus se diluyó en HBSS-ASB 1% (p/v) y se agregó a 10, 1 o 0.1 unidades formadoras de placa/célula (MOI) según fuera el caso, luego se incubó en atmósfera de 5% de CO₂ por 1 h a 37°C; finalmente, se retiró esta solución y se agregó medio de cultivo fresco. Las células se incubaron durante 3, 5 ó 7 días, según el experimento. Los cultivos primarios se infectaron con aproximadamente 10⁶ unidades formadoras de placa/pozo.

ANTICUERPOS.- Los anticuerpos que se utilizaron fueron los siguientes: anti-DBH (Dopamina β-hidroxilasa), anti-ChAT (Colina acetil transferasa), anti-Serotonina, anti-

Histamina, anti-GABA (ácido gamma aminobutírico) y anti- NSE (Enolasa específica de neurona) los cuales se obtuvieron de INCSTAR (Syllwater, MN); anti- Sinaptofisina Clona SY 38 y anti- β Tubulina (Boehringer- Mannheim, Mannheim, RFA); anti- Actina y anti- NFH (Neurofilamentos de alto peso molecular) (Sigma, St. Louis, MO); anti- rblg-FITC (anti-Inmunoglobulina de conejo conjugada con isotiocianato de fluoresceína), anti- rblg-TxR (anti-Inmunoglobulina de conejo conjugada con rojo Texas), anti- molg-FITC (anti-Inmunoglobulina de ratón conjugada con isotiocianato de fluoresceína), anti- molg-TxR (anti-Inmunoglobulina de ratón conjugada con rojo Texas), anti- molg-HRP (anti-Inmunoglobulina de ratón conjugada con Peroxidasa de rábano), anti-rblg-HRP (anti-Inmunoglobulina de conejo conjugada con Peroxidasa de rábano), anti- molg-biotina (anti-Inmunoglobulina de ratón conjugada con biotina), S-B-HRP (complejo Streptavidina- Biotina- Peroxidasa de rábano), todos ellos de Amersham (Amersham UK). Los anticuerpos se utilizaron a las concentraciones recomendadas por los proveedores. El anticuerpo anti- PGFA (Proteína glial fibrilar ácida) fue proporcionado por el Dr. J. Sotelo (INNyN, México D.F.) (16).

Se utilizaron tres tipos de anticuerpos contra el virus dengue; 1) suero humano hiperinmune contra dengue conjugado a isotiocianato de fluoresceína (conjugado directo), el cual es una mezcla de sueros con títulos altos (inhibición de la hemaglutinación) de anticuerpos contra el virus dengue (142); el título para inmunofluorescencia del lote proporcionado por el Dr. G. Kuno (CDC San Juan Laboratories, PR) fué 1:100; 2) anticuerpo policlonal anti-dengue obtenido de líquido de ascitis hiperinmune de ratón inmunizado con una mezcla de suspensiones virales de los serotipos 1 y 2 del virus dengue, el título por ELISA fue mayor a 1:4,000 y fue proporcionado por J.L. Imbert (Centro de Investigaciones Microbiológicas, UAP. Puebla, México); 3) anticuerpo monoclonal 3H5 contra el serotipo 2 que fue proporcionado por el Dr. D. Gubler (CDC, Fort Collins, CO) la dilución de trabajo recomendada para inmunofluorescencia indirecta fue de 1:10.

INMUNOFLOURESCENCIA. - Las células se fijaron en acetona por 10 min a -20°C ; en algunos experimentos las células se fijaron con p-formaldehído (Sigma) al 4% en Solución balanceada de fosfatos (PBS) 10 mM pH 7.4 y se permeabilizaron con metanol absoluto durante 10 min a -20°C . Las preparaciones se incubaron por 15 min a temperatura ambiente con una solución al 10% de suero de ternera en PBS; posteriormente se agregó el primer anticuerpo diluido en ASB 0.1% (p/v)-Triton X 100 (Bio-Rad)-PBS y se incubó por 1 h a 37°C en cámara húmeda. Las muestras se lavaron 4 veces con ASB 0.1%-PBS, se agregó el segundo anticuerpo y se incubó por 1 h a 37°C . Cuando se realizó la inmunofluorescencia con doble fluorocromo los anticuerpos contra el virus y contra marcador de neurona se agregaron al mismo tiempo siempre y cuando estos hubieran sido generados en diferente especie animal (i.e. conejo/ratón); los anticuerpos anti-especie acoplados a Isotiocianato de fluoresceína ó Rojo Texas también se agregaron al mismo tiempo, en ambos casos respetando las concentraciones de anticuerpo óptimas para el ensayo. Cuando ambos "primeros" anticuerpos procedían de ratón se siguió el siguiente protocolo: el anticuerpo contra el virus se agregó primero, posteriormente se agregó el anticuerpo anti-Ig de ratón conjugado a Isotiocianato de fluoresceína concentrado 3 veces, a continuación se agregó el anticuerpo contra el marcador de la neurona, seguido de un anticuerpo anti-Ig de ratón acoplado a biotina y finalmente se añadió estreptavidina conjugada a Sulfordamina 100

(Boehringer-Mannheim). Las preparaciones se montaron en Elvanol (Elvanol 51-05 13% p/v-Glicerol 33% p/v-Tris-HCl 24 mM pH 8.5). Los experimentos control se realizaron con suero no inmune de ratón o de conejo.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.- Los cultivos primarios de neuronas se cosecharon después de 3 días de infección y las células se solubilizaron en frío en amortiguador de lisis (Tris-HCl 1.25 mM pH 6.8, SDS 1% p/v, PMSF 1 mM, Aprotinina 100 KIU/ml); la cantidad de proteína se determinó por el método de Lowry (145). Las muestras se separaron en geles de SDS-PAGE de 12% o 7.5% de acrilamida según el sistema discontinuo de Laemmli (146). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa siguiendo la técnica descrita por Towbin (147). Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon durante 2 h a 37°C con ASB 30% p/v-Tween 20 0.2% v/v- PBS 10 mM pH 7.4 se lavaron 3 veces con Tween 20 0.2% v/v- PBS 10 mM pH 7.4 (Tween-PBS) durante 10 min cada una y se incubaron 10 h a 4°C con anti-p38, anti-NF κ B ó anti- β Tubulina diluidos en Tween-PBS; después de lavar 3 veces se incubaron por 2 h a 37°C con el segundo anticuerpo y se lavaron con Tween-PBS 3 veces 10 min y 2 veces con PBS 10 mM pH 7.4 durante 10 min cada vez. Las membranas de nitrocelulosa se revelaron utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham UK.) siguiendo las instrucciones del proveedor.

TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE CELULAS N1E-115.- Se crecieron células N1E-115 en placas de 24 pozos y se trataron con Tripsina (Sigma) al 0.075% (p/v) en HBSS durante 15 min a 37°C, con 150 mU/ml de Neuraminidasa tipo V (de *C. perfringens*, Sigma) por 1 h a 37°C y con 10 mU/ml de Endo H (Boehringer-Mannheim) durante 12 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂; después las células se lavaron 3 veces con HBSS frío y se infectaron con el virus a una MOI de 1. El virus se diluyó en una solución de ASB 0.1% p/v-HEPES 25 mM- HBSS pH 7.2; después de 1 h de incubación en frío las células se lavaron 3 veces con HBSS frío, se agregó medio de cultivo completo precalentado a 37°C y se incubaron durante 3 y 5 días a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Los cultivos control no se trataron con las enzimas correspondientes. La tripsina se seleccionó porque en el macrófago existe un receptor para el virus el cual es sensible a la tripsina (11); la neuraminidasa, que hidroliza residuos de ácido siálico de N-glicoproteínas complejas, se utilizó ya que algunos virus se unen a receptores que contienen residuos de ácido siálico (61) y, finalmente, a la endoglicosilasa H ya que esta enzima hidroliza las manosas de N-glicoproteínas con alta manosa (148).

Para excluir la posibilidad de que el virus sea inactivado por la tripsina residual durante el periodo de absorción a la célula, la monocapa de células tratadas con tripsina o células control se dejaron en contacto con el virus según se describió hasta el momento en que se agrega el medio a 37°C y las células se cosecharon y homogenizaron en el mismo medio; una alícuota de este lisado celular se inoculó a cultivos de células TRA-284 y después de 7 días se detectó al virus por inmunofluorescencia.

ENSAYO DE UNION EN FASE SOLIDA.- Se obtuvieron proteínas de membrana plasmática de células N1E-115 y de células 3T3 Balb/c que no son permisibles a la infección por el virus dengue, de acuerdo a la técnica descrita por Takacs & Staehelin (149);

aproximadamente 10^8 células se lavaron en D-PBS frío (CaCl_2 0.9 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgCl_2 0.5 mM, NaCl 138 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, pH 7.2), las células se centrifugaron a 1,500 rpm por 15 min a 4°C; se midió el volumen del paquete celular y se agregó un volumen igual de los detergentes no iónicos Tween 20 y NP 40 en proporción de 7:3 (v/v) esta mezcla se utilizó al 5% en amortiguador TNM (Tris-HCl 20 mM pH 7.3, NaCl 145 mM, MgCl_2 1.5 mM, Aprotinina 100 KIU/ml, PMSF 1 mM). La mezcla se dejó reposar en hielo por 15 min, después se agregó sacarosa (50% p/v en TNM) hasta tener una concentración final de 3% p/v; la mezcla se trató en frío con un homogenizador de vidrio-teflón; la muestra se aplicó a un gradiente discontinuo de sacarosa (32% y 10% p/v en TNM), después de centrifugación a 81,000xg por 1 h a 4°C, las membranas se obtuvieron de la interfase del gradiente; la sacarosa se eliminó por dilución en 20 volúmenes de TNM y por centrifugación a 100,000xg por 1 h a 4°C. Las membranas se examinaron al microscopio de contraste de fase para verificar que la preparación no estuviera contaminada con núcleos o mitocondrias. Las proteínas de las membranas se extrajeron por incubación en una solución de Tritón X-100 1% v/v en TNM por 15 min a 4°C; la solución se centrifugó a 14,000 rpm en una centrifuga Eppendorf. Se determinó la concentración de proteína por el método de Bio-Rad, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las proteínas se separaron por electroforesis en SDS-PAGE (Laemmli) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa según la técnica descrita por Towbin (147). La membrana se bloqueó 2 h a 37°C con ASB 30% p/v- Tween 20 0.2% v/v- PBS 10 mM pH 7.4 y se lavó 10 min 3 veces con Tween 20 0.2% v/v- PBS 10 mM pH 7.4 (Tween-PBS); la membrana de nitrocelulosa se incubó con 10^5 UFP/mm² por aproximadamente 10 h a 4°C con una preparación semipurificada de virus diluido en ABS 1% p/v- HEPES 20 mM- D PBS; después se lavó 3 veces 10 min cada vez con la misma solución de dilución y 3 veces 10 min con Tween-PBS; el anticuerpo contra el virus se agregó diluido 1:10 en ABS 0.1% p/v- Tween-PBS (AT-PBS) y se incubó por 4 h a temperatura ambiente, en algunos experimentos se utilizó líquido ascítico hiperinmune y en otros casos se usó anticuerpo monoclonal contra el serotipo 2; las membranas de nitrocelulosa se lavaron 3 veces 10 min con Tween-PBS, y se incubaron por 1 h a 37°C con anticuerpo anti-ratón conjugado a biotina (Amersham, UK); se lavó 3 veces 10 min con solución Tween-PBS y se incubaron durante 1 h con [¹²⁵I]-Streptavidina (actividad específica 20-40 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$, Amersham, UK) a una concentración de 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ en Tween-PBS; finalmente, se lavaron 5 veces 10 min con Tween-PBS y 2 veces 10 min con PBS, la membrana se secó al aire en una campana de seguridad y se expuso durante 48 h a una película X-Omat (Kodak) a -70°C.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE SUBPOBLACIONES NEURONALES SENSIBLES A LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DENQUE SEROTIPO 2 NGC.

Imbert y colaboradores sugirieron que en los cultivos primarios de cerebro de embrión de ratón, había una subpoblación de neuronas susceptible a la infección por el virus dengue (16). Nuestros resultados muestran que los cultivos primarios tienen el máximo de neuronas infectadas al séptimo día después de la inoculación, lo que correlaciona con el estudio ya citado, las neuronas sensibles a la infección por el virus muestran una citoarquitectura similar a la reportada (16). En la figura 3 mostramos que las células que expresan el antígeno viral son neuronas ya que este (fluorescencia roja) ya que esta señal se colocaliza en células que expresan Neurofilamentos de alto peso molecular (NFH) que son marcadores específicos de neuronas (fluorescencia verde), (Figura 3b) y no en aquellas que expresan la Proteína Glia Fibrilar Ácida (PGFA) que es un marcador específico de astrocitos (figura 3c).

Un primer enfoque utilizado, fue tratar de definir a la subpoblación neuronal sensible a la infección utilizando como marcadores los neurotransmisores contenidos en las neuronas del cultivo primario (150), sin embargo estos ensayos proporcionaron poca información sobre el tipo de neurona susceptible; en un enfoque alternativo, decidimos utilizar algunos marcadores específicos de neurona que a su vez pudieran dar información sobre el estado de maduración neuronal ya que está bien documentada la dependencia de la infección neurotrópica de los flavivirus con la edad del animal (2,5,9,10,20). Para lograr esto se utilizaron anticuerpos anti-NFH y anti-Sinaptofisina (p38); estas proteínas tienen un patrón característico de expresión dependiente de la sinaptogénesis (152,153); los NFH se expresan principalmente al final de este proceso, mientras que la p38 cambia su patrón de distribución celular de predominantemente citoplasmática a predominantemente vesicular al final de la sinaptogénesis.

Los ensayos de inmunocitoquímica con doble fluorocromo, mostraron que el anticuerpo marcado con fluoresceína contra NFH correspondió con la del anticuerpo marcado con rojo texas contra el virus (Figura 3b), sin embargo, no ocurrió lo mismo cuando se utilizó el anticuerpo contra anti-p38 (no mostrado)

Expresión de NFH y p38 en cultivos primarios de células del SNC de embrión de ratón infectados con el virus dengue serotipo 2 NGC.

Las células infectadas mostraron un aumento en la señal fluorescente con anticuerpos anti-NFH y anti-p38. La Figura 4 muestra los patrones de distribución y expresión de ambas proteínas en las células no infectadas (Figuras 4a y 4c) y en células infectadas durante tres días (Figuras 4b y 4d). La distribución de los NFH en los cultivos sin infectar es similar a la que se observa en células en proceso de maduración, las cuales muestran escasas fibras de diámetro pequeño, mientras que en los cultivos infectados su distribución es semejante a la de cultivos diferenciados (Figuras 4a y 4b) (153). Por otro lado, en los cultivos sin infectar la p38 se encuentra casi exclusivamente en el citoplasma (Figura 4c) mientras que en los infectados se distribuye a lo largo de las prolongaciones celulares (Figura 4d); este patrón es característico de las neuronas inmaduras y maduras, respectivamente (152).

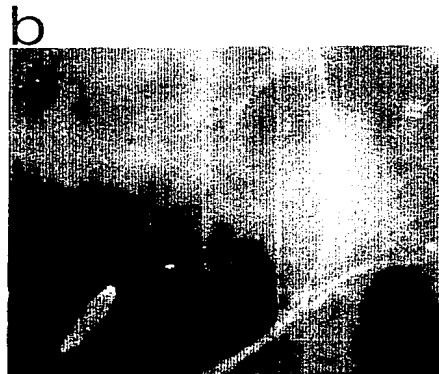


Figura 3.— Inmunofluorescencia de cultivos primarios de neuronas infectados con DEN 2 NGC.

Cultivos primarios de neuronas fueron infectados como se describe en materiales y métodos; después de 5 días de infección, muestras de estos cultivos se procesaron para inmunofluorescencia con: (a) anti-dengue; (b) anti-dengue (rojo) y anti-NFH (verde) ó (c) anti-dengue (rojo) y anti-PGFA (verde). Las fotografías fueron tomadas a 40X (a) y 64X (b y c).

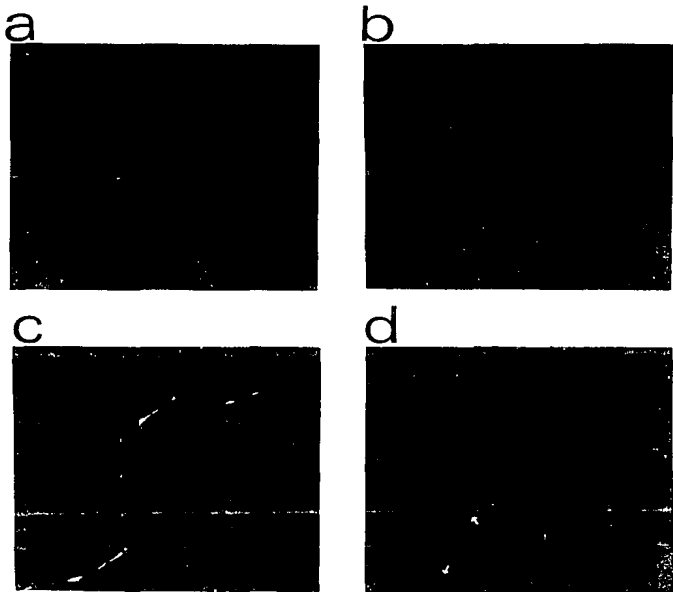


Figura 4.- Expresión de p38 y NFH en neuronas de cultivo primario de cerebro de ratón. Las neuronas de cultivos primarios no infectadas (a y b) e infectadas con el serotipo 2 (NGC) del virus dengue [5 días p.i.] (c y d) se procesaron para inmunofluorescencia con anticuerpos contra NFH (a y c) contra p38 (b y d). Las fotografías se tomaron a un aumento de 40X.

La estimación del aumento en la expresión de NFH y p38 se realizó mediante ensayos de electrotransferencia con proteínas de cultivos control e infectados (Figura 5). La densitometría de las autorradiografías de los cultivos infectados mostraron un incremento de 20 a 30 veces en la expresión de la p38, mientras que la de NFH fue de 10 a 15 veces; este incremento no se observó en la expresión de β -Tubulina (Figura 5).

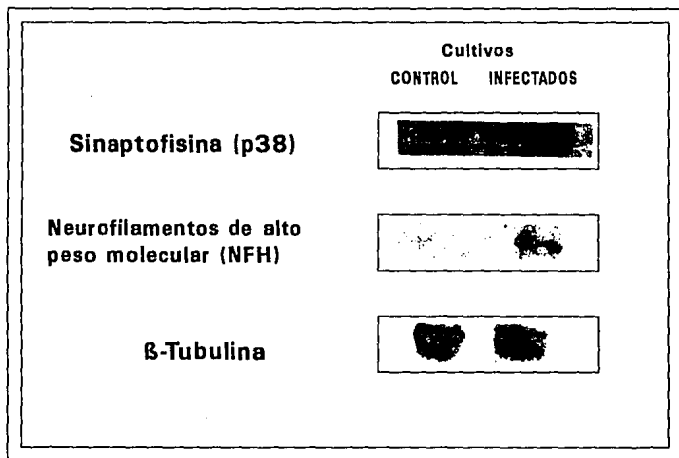


Figura 5.- Expresión de p38, NFH y β -Tubulina en cultivos primarios de cerebro de ratón infectados con el virus dengue. Cultivos primarios de cerebro de embrión de ratón fueron infectados en las condiciones descritas en Materiales y Métodos con el serotipo 2 (NGC) del virus dengue. Luego de 5 días de infección, a los cultivos sin infectar (Control) y los infectados (Infectada) se les agregó solución de lisis; se determinó la concentración de proteínas y 10 μ g de proteína de cada condición fueron cargados en gels de SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa. La inmunodetección se realizó utilizando segundos anticuerpos conjugados a Peroxidasa de rábano y la reacción se reveló con un kit comercial de quimioluminiscencia (Amersham, UK). Se muestran las autorradiografías de las bandas relevantes.

Sensibilidad de diversas líneas celulares a la infección por el virus dengue serotipo 2 NGC.

El estudio de la infección por el virus dengue en cultivos primarios de células neuronales es complicado debido principalmente a la heterogeneidad de los tipos neuronales y a la variabilidad de cultivo a cultivo. Por esta razón, diversas líneas neurogénicas de ratón fueron analizadas para determinar la susceptibilidad a la infección por el virus dengue.

En la Tabla IV se muestran las líneas celulares utilizadas y la detección del virus por inmunofluorescencia; se consideró una célula infectada cuando se observó una franca fluorescencia independientemente de su distribución; se estimó el número de células infectadas, contando 100 células por campo en 10 campos diferentes.

Tabla IV.- Sensibilidad de líneas celulares neurogénicas a la infección por el virus dengue serotipo 2 (NGC)

Días*	3			5			7			
	MOI**	0.1	1.0	10	0.1	1.0	10	0.1	1.0	10
C6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PC12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
NCB 20	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Neuro 2a	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
N1E-115	15±2.3 ^a	35±3.6	48±4.4	23±4.4	45±9.7	71±10.1	52±4.3	83±13.7	> 90 ^b	

*Días después de la infección.

**Multiplicidad de infección (MOI), partículas virales infecciosas/número de células.

N.D. = No se detectó fluorescencia.

a = Promedio del porcentaje de células fluorescentes por campo, más/menos (±) la desviación estándar de cuatro experimentos independientes.

Las células N1E-115 fueron las únicas sensibles a la infección. Estas células derivan de una clona adrenérgica del neuroblastoma C1300 y expresan receptores para noradrenalina, dopamina, y serotonina (154); las células en fase exponencial de crecimiento, tienen una apariencia esférica mientras que las de cultivos estacionarios tienden a desarrollar neuritas que les dan un aspecto de neuronas bipolares (155). Los cultivos que se utilizaron presentaban una mezcla de ambas poblaciones (Figura 6a).

Generalmente el antígeno viral se detectó desde el tercer día de infección; sin embargo a los 5 días post-infección (p.i.) éste se distribuyó finamente en el citoplasma, principalmente en la región perinuclear (Figura 6b); a los 7 días p.i. la inmunofluorescencia se observó en el cuerpo celular y en sus prolongaciones celulares (Figura 6c); además el antígeno viral se encontró asociado con vesículas que se localizan en las terminaciones de las prolongaciones celulares (Figura 6c, flecha). El patrón de la infección en esta línea celular es similar al que se observa en las neuronas de los cultivos primarios.

Análisis del receptor para el virus dengue serotipo 2 NGC en las células N1E-115.

La infección de las células N1E-115 puede estar mediado por un receptor específico



Figura 6.- Infección de células N1E-115 con el virus dengue. [a] Células N1E-115 no infectadas (contraste de fase, aumento 40X). [b y c] células N1E-115 infectadas con 0.1 MOI por 5 [b] y 7 [c] días p.i., las fotomicrografías de Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra dengue acoplados a isotiocianato de fluoresceína de los anteriores cultivos se tomaron a un aumento de 40X [b] y 64X [c].

en la membrana; para analizar la naturaleza química del receptor, las células se trataron con una proteasa (tripsina) y dos glicosilasas (neuraminidasa y endoglicosilasa H). La Tabla V muestra los resultados de tres ensayos cuyo coeficiente de variación fue menor del 10%. La disminución de la fluorescencia en células tratadas con tripsina ($p < 0.001$), sugiere que el receptor es de naturaleza proteínica. En todos los casos las células tratadas tuvieron una viabilidad comparable con las células control. Se realizaron experimentos para excluir la posible inactivación del virus por tripsina residual; en ninguno de los experimentos realizados con este fin se observaron diferencias entre las células no tratadas y las tratadas con tripsina por lo que la disminución en el número de células fluorescentes en los cultivos tratados con tripsina se debe a la degradación, por la acción de la tripsina, de proteínas de membrana de las células N1E-115.

Tabla V.- EFECTO DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO A CÉLULAS N1E-115 EN LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DENQUE SEROTIPO 2 (NGC)

Días*	5		7	
	% C.F.C.**	% Viabilidad	% C.F.C.	% Viabilidad
Tripsina	37 ± 14.8	82 ± 5.2	51 ± 21.2	73 ± 9.7
Neuraminidasa	95 ± 2.4	87 ± 3.1	97 ± 0.2	72 ± 3.6
Endo H	98 ± 1.2	85 ± 1.5	93 ± 1.0	76 ± 2.9

*Días después de la infección.

**Porcentaje de células fluorescentes (C.F.) respecto del control, más/menos (\pm) la desviación estándar de 3 experimentos independientes. El cálculo se realizó según la fórmula:

$$\% \text{ C.F.C.} = 100 (\# \text{ C.F. en la muestra tratada} / \# \text{ C.F. en la muestra no tratada})$$

Las células se infectaron a una MOI=1. La viabilidad se determinó por exclusión de colorante (azul tripano 4% en PBS).

ANÁLISIS DEL RECEPTOR PARA EL VIRUS DENQUE EN CÉLULAS N1E-115 MEDIANTE EL ENSAYO DE UNIÓN EN FASE SÓLIDA.

Para obtener mayor información sobre el receptor para el virus en las células N1E-115, se realizaron los ensayos de unión en fase sólida (*virus overlay protein blot assay*, VOPBA), el cual permite conocer el número y peso molecular de las proteínas que unen al virus; si el sitio de unión para el virus se conserva durante el proceso de desnaturalización, las proteínas fijas en la membrana de nitrocelulosa se unirán al virus lo cual puede revelarse con anticuerpos dirigidos contra el virus (90).

La Figura 7 muestra los resultados del ensayo de VOPBA utilizando proteínas de membrana obtenidas de células N1E-115 (líneas 2, 4 y 5) y de células 3T3 Balb/c (líneas 1 y 3). Las células 3T3 no son susceptibles al virus y se escogieron por su facilidad de manejo y por su rendimiento en proteínas de membrana. Cuando las proteínas de membrana de las células N1E-115 se incubaron con el virus y después con un anticuerpo monoclonal contra el serotipo 2, se reveló una banda de aproximadamente 80 kDa (Figura 7, líneas 2 y 4), la cual no se encontró en las proteínas extraídas de células 3T3 Balb/c (líneas 1 y 3); esta proteína aparentemente es específica ya que cuando se omitió la incubación con el virus, no se observó señal (líneas 1 y 2), ni cuando se omitió el anticuerpo contra el virus (línea 5). En

los experimentos donde se utilizaron anticuerpos policlonales se obtuvieron resultados similares.

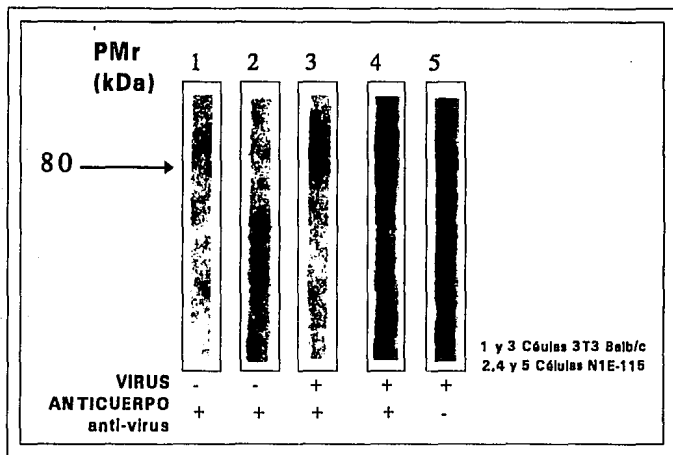


FIGURA 7.- ENSAYO DE UNIÓN EN FASE SOLIDA A PROTEÍNAS DE MEMBRANA CELULAR DEL VIRUS DENQUE SEROTIPO 2 (NGC). Proteínas de membrana de células 3T3 Balb/c (líneas 1 y 3) y de células N1E-115 (líneas 2, 4 y 5) fueron obtenidas según se describe en Materiales y Métodos; 10 µg de proteína total por carril fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa; los carriles se cortaron y se procesaron como ya se describió.

DISCUSION

El trabajo que aquí se presenta se basa en las observaciones realizadas por Imbert y colaboradores las cuales, como ya se ha dicho, sugieren que el virus dengue infecta preferentemente alguna subpoblación de neuronas y en la hipótesis de Thomas Monath sobre la existencia de receptores proteínicos en la membrana neuronal para los diversos Flavivirus (9,16). Así, intentamos analizar la posible asociación de la infección de células neuronales de ratón por el virus dengue con el tipo de neurotransmisor contenido en las células infectadas. Los ensayos de inmunofluorescencia con doble fluorocromo no mostraron colocalización de las señales del antígeno viral y el marcador de neurona. Pensamos que este resultado posiblemente se explique debido a la muerte de las células. Una interpretación alternativa surge de las observaciones de Schiller y Marchand; ellos demostraron que cuando las células PC12 son infectadas con el virus herpes suizo, estas muestran una disminución en la síntesis de neurotransmisores como L-DOPA, dopamina y noradrenalina (156). Por otro lado, es posible que durante la infección de las neuronas por el virus dengue haya una depolarización de la membrana que resulte en liberación constante del neurotransmisor (136). Tanto si la infección viral conduce a la muerte celular como si la infección afecta alguna función específica de la célula, el ensayo de inmunocitoquímica podría ser muy limitado. Una alternativa es la detección del genoma viral a tiempos cortos de infección, esto es, antes de que la infección altere el metabolismo celular, utilizando una técnica que combina la hibridación *in situ* con la detección de antígenos por inmunofluorescencia.

Ogata y colaboradores habían demostrado que la infección del ratón por JEV depende del grado de madurez del tejido neuronal (20), por ello decidimos utilizar algunos marcadores de maduración neuronal y tratar de hacer una correlación entre la expresión de estos marcadores y la sensibilidad a la infección. No obstante, los resultados por inmunocitoquímica no proporcionaron información adicional a la que ya se tenía, esto es las células blanco en estos tipos de cultivos expresan los marcadores de neurona madura, pero no estamos muy seguros de que la infección sea resultado del estado de madurez neuronal o si la infección es la responsable de la maduración, esto último porque en los cultivos primarios infectados se observó un aumento en la expresión de p38 y NfH (Figuras 4 y 5). Estas proteínas están asociadas con la sinaptogénesis, la p38 es una proteína de la membrana de vesículas sinápticas cuya expresión es mínima en los neuroblastos y se incrementa en la neurona que ya ha formado sinápsis (157), aparentemente la p38 es necesaria para el reconocimiento entre la vesícula sináptica y la membrana presináptica (157); por otro lado, los NfH aunque se expresan desde el inicio de la maduración neuronal, la forma fosforilada se detecta casi exclusivamente al final de la sinaptogénesis (158,159); la fosforilación de estas proteínas afecta su antigenicidad ya que la mayoría de los anticuerpos dirigidos contra NfH solo reconocen la forma fosforilada (159).

Se ha reportado que las neuronas de los cultivos primarios que se utilizaron en este trabajo son células totalmente diferenciadas ya que son electrofisiológicamente activas y liberan diversos neurotransmisores al medio de cultivo (151), sin embargo, nosotros no tenemos ninguna evidencia de que este sea el caso, ya que en las condiciones del cultivo primario sin infectar, la expresión de NfH y p38 debería ser alta y con el patrón de

distribución característico de las células maduras, aunque no podemos excluir la posibilidad de que los experimentos se hayan realizado fuera de la ventana de tiempo en la que la expresión de las citadas proteínas sea máxima. No obstante, el fenómeno descrito en los cultivos infectados es reproducible aún en las células N1E-115 indiferenciadas e infectadas con el virus dengue (Ramos-Castañeda, J. Imbert, J.L. Ortega, A. y Ramos, C. resultados preliminares). Es posible que el aumento en la síntesis de estas proteínas sea la consecuencia de la activación de sus genes inducida por la infección viral, un resultado preliminar que apunta en este sentido es la activación de factores de transcripción inducida por la infección viral en células N1E-115 (Ramos-Castañeda, J. Imbert, J.L. Ortega, A. y Ramos, C.). Observaciones análogas se han reportado en las infecciones causadas por β y γ Herpesvirus (140,141). Por otro lado es posible que la infección viral provoque cambios en el estado de fosforilación de NFH, p38 de tal forma que el aumento observado sea el de la forma fosforilada y no haya un aumento real de la síntesis; en otros sistemas se han observado cambios en los patrones de fosforilación de proteínas o activación de diversas cinasas durante la infección viral, ejemplos de lo anterior se han reportado con HIV y Adenovirus (164,165). El aumento en la transcripción de los genes de estas proteínas y la activación de cinasas no son eventos excluyentes, sin embargo para determinar cuál es el evento principal, se requeriría una combinación de ensayos de northern blot y de determinación de la actividad de fosforilación de diversas cinasas.

Aun cuando en las cultivos infectados se observó un aumento en la expresión de NFH y p38, no hubo una clara co-localización de estas y el virus. Este fenómeno se ha observado en la infección neurotrópica del virus de la linfocoriomeningitis (LCMV) en el ratón, donde se observó, en muestras de tejido cerebral de animales infectados, un aumento del mRNA para la somatostatina; sin embargo, se determinó que solo el 20 % de las células productoras del neuropéptido estaban infectadas por el virus, lo cual no era suficiente para explicar el aumento en el transcrito, lo cual sugiere que dicho aumento puede ser consecuencia indirecta de la infección (160).

En el presente trabajo, únicamente las células N1E-115 fueron susceptibles a la infección por el virus dengue (Tabla III). Estas células se caracterizan por su excitabilidad, la producción de catecolaminas y la capacidad para desarrollar una citoarquitectura característica de la estirpe neuronal; por ejemplo, a pesar de que las células N1E-115 y las Neuro 2a se derivan del neuroblastoma C1300; las células N1E-115 son excitables mientras que las Neuro 2a no lo son. Por otro lado las células N1E-115 difícilmente desarrollan neuritis de manera espontánea, mientras que las Neuro 2a forman largas prolongaciones espontáneamente (154,155,166). La susceptibilidad de las células N1E-115 se puede explicar por la existencia de receptores específicos para el virus; sin embargo, estos receptores no necesariamente tienen que ser receptores para neurotransmisores como lo ha propuesto Thomas Monath (9), ya que la composición de los receptores para neurotransmisores en la membrana de las células N1E-115 es similar al de las células PC12 (152) y estas últimas no son susceptibles a la infección viral (Tabla IV), por tanto es posible que las moléculas involucradas en la interacción virus-célula no sean receptores para los neurotransmisores.

El estudio del receptor para el virus en las células N1E-115 se abordó mediante el uso de diferentes estrategias:

a) Tratamiento de las células con proteasas; en las células NIE-115 tratadas previamente con tripsina disminuyó considerablemente el grado de la infección (60%, Tabla V); por el contrario, el tratamiento con neuraminidasa no disminuyó significativamente la infección. Esta observación coincide con el trabajo de Daughaday y colaboradores utilizando a macrófagos como célula blanco de la infección por el virus dengue (11). Los macrófagos son las células susceptibles a la infección más importantes tanto en humanos como en ratones infectados y, según Scott Halstead (4), la infección del macrófago en el humano está relacionada a la patología hemorrágica. Se piensa que la infección del macrófago, en presencia de anticuerpos no neutralizantes y heterotípicos, promovería la liberación de sustancias vasoactivas y de mediadores de la coagulación; esta liberación estaría relacionada al aumento en la entrada del virus a la célula mediado por dos receptores; uno de estos receptores sería, por llamarlo de alguna manera, el receptor natural, esta molécula tendría naturaleza proteínica ya que es sensible al tratamiento con Tripsina (11). El segundo receptor sería el receptor para Fc de inmunoglobulinas, este receptor sería utilizado cuando el virus se encontrara unido a anticuerpos no neutralizantes (4).

b) El ensayo de unión en fase sólida se utilizó para el estudio del receptor para el virus de la hepatitis murina (90). Mediante esta tecnología determinamos que el virus dengue se une a una proteína de aproximadamente 80 kDa (Figura 7). En este rango de peso molecular se encuentra el transportador de la serotonina y receptores para la histamina, la noradrenalina, la bradiquinina, la angiotensina, y el receptor para el factor neurotrófico ciliar CNTF (166-168). Es posible que la unión del virus a alguno de estos receptores pueda activar cascadas de transducción de señales como la cascada del AMP cíclico, la del inositol trifosfato y diacilglicerol o aumentos en la concentración citoplasmática de Ca^{++} . Nuestros experimentos preliminares sugieren que a tiempos cortos de infección (menores a 30 minutos), en los que solo es posible la unión del virus al receptor celular, se activan la proteína cinasa dependiente de Ca^{++} y diacilglicerol (PKC) y la fosfolipasa A₂ (PLA₂), sin que se observen aumentos en la concentración de AMP cíclico o aumentos en el flujo de Ca^{++} .

Las perspectivas que se abren con el estudio del neurotropismo de los virus dengue podrían contribuir a la comprensión de la patogénesis de la fiebre hemorrágica en el contexto de las interacciones del virus con las plaquetas ya que estas poseen receptores para diversas moléculas que a su vez tienen actividad en células del SNC (167,168). Una observación poco referida es el hecho de que se puede encontrar antígeno de dengue en las plaquetas de los pacientes con fiebre hemorrágica (169), entonces ¿es posible que el virus pueda fijarse a la membrana de la plaqueta y activarla de tal forma que su disminución sea debida al consumo de plaquetas?; luego, si el neurotropismo del virus dengue, observado en el ratón, está mediado por un receptor, ¿este mismo receptor pudiera estar también presente en las plaquetas? El trabajo que aquí se presenta pretende contribuir con evidencias de que en efecto existe un receptor en células neurogénicas para el virus dengue.

CONCLUSIONES

1.- La infección por el virus dengue de cultivos primarios de células de SNC de embrión de ratón promueve el aumento en la síntesis de algunas proteínas específicas de neuronas. Sin

embargo, la trascendencia de este fenómeno en la neurovirulencia del virus dengue no es clara.

2.- El virus dengue se une a una proteína de membrana de células N1E-115; esta proteína tiene un peso molecular aparente de 80 kDa y se encuentra ausente en la línea de fibroblastos murinos 3T3 Balb/c no susceptible a la infección por dengue.

REFERENCIAS

- 1.- Chambers T.J., Hahn C.S., Galler R. & Rice C.M. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Ann. Rev. Microbiol.* 1990; 44: 649-688.
- 2.- Monath T.P. Flaviviruses. *Virology*, 2nd ed. B.N. Fields, D.M.Knipe et-al editors. Raven Press Ltd. New York USA. 1990, pp 763-814.
- 3.- Anderson R., King A.D. & Innis B.L. Correlation of E protein binding with cell susceptibility to dengue 4 virus infection. *J. Gen. Virol.* 1992; 73: 2155-2159.
- 4.- Halstead S.B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science.* 1988; 239: 476-481.
- 5.- Schlesinger R.W. Dengue viruses. *Virology Monographs*, Vol. 16. S. Gard & C. Hallaver editors. Springer-Verlag. New York USA. 1977; pp. 75-84.
- 6.- Rosen L. The emperor's new clothes revisited, or reflection on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1977; 26: 337-343.
- 7.- Halstead S.B. In vivo enhancement of dengue virus infection in Rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J. Infect. Dis.* 1979; 140: 527-533.
- 8.- Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology.* 1990; 174: 479-493.
- 9.- Monath T.P. Pathobiology of the Flaviviruses. The *Togaviridae* and *Flaviviridae*. S.Schlesinger & M.J. Schlesinger editors. Plenum Press. New York USA. 1989, pp 375-441.
- 10.- Boonpacknavig S., Veltvirag O. & Boonpacknavig V. Infection of young adult mice with dengue virus type 2. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1981; 75: 647-653.
- 11.- Daughaday C. C., Brandt W.E., McDown J.M. & Russell P.K. Evidence for dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. *Infection and Immunity.* 1981; 32: 469-473.
- 12.- Imbert J.L. Tesis de Maestría. UACPyP/CCH. UNAM. 1990. Tutor Dr. Celso Ramos Garcia.
- 13.- Hase T., Dubois R.D. & Summers P.L. Comparative study of mouse brains infected with japanese encephalitis virus by intracerebral or intraperitoneal inoculation. *Int. J. Exp. Path.* 1990; 71: 857-869.
- 14.- Gonzalez-Scarano F. & Tyler K.L. Molecular pathogenesis of neurotropic viral infections. *Ann. Neurol.* 1987; 22: 565-574.

- 15.- Dropulic B. & Masters C.L. Entry of neurotropic arboviruses into the central nervous system: An in vitro study using mouse brain endothelium. *J. Infect. Dis.* 1990; 161:685-691.
- 15a.- Kawano H., Rostapshov R., Rosen L. & Lai C.J. Genetic determinants of dengue type 4 virus neurovirulence for mice. *J. Virol.* 1993; 67: 6567-6575.
- 16.- Imbert J.L., Guevara P., Ramos-Castañeda J., Ramos C. & Sotelo J. Dengue virus infects mouse cultures neurons but no astrocytes. *J. Med. Virol.* 1994; 42: 228-233 .
- 17.- Hase T., Summers P.L. & Ray P. Entry and replication of japanese encephalitis virus in cultured neurogenic cells. *J. Virol. Meth.* 1990; 30: 205-214.
- 18.- Kho L.K., Sumarno W.H., Jahja E.C. & Gubler D.J. Dengue hemorrhagic fever accompanied by encephalopathy in Jakarta, Indonesia. *Southeast Asia J. Trop. Med. Public Health.* 1981; 12: 83-86.
- 18a.-Chimelli L., Hahn M.D., Netto M.B., Ramos R.G., Dias M. & Gray F. Dengue: neuropathological findings in 5 fatal cases from Brazil. *Clin. Neurophatol.* 1990; 9: 157-162.
- 19.- Tyler K.L. & Fields B.N. Pathogenesis of viral infections. *Virology*, 2nd ed. B.N. Fields, D.M. Knipe et-al editors. Raven Press Ltd. New York USA. 1990, pp 191-239.
- 20.- Ogata A., Nagashima K., Hall W.W., Ichikawa M., Kimura-Kuroda J. & Yasui K. Japanese encephalitis virus neurotropism is dependent on the degree of neuronal maturity. *J. Virol.* 1991; 65: 880-886.
- 21.- Darnell M. & Koprowski H. Genetically determined resistance to infection with group B arbovirus. II. Increased production of interfering particles in cell cultures from resistant mice. *J. Infect. Dis.* 1974; 129: 248-256.
- 22.- Thimmapaya B., Weinberger C., Schneider R.J. & Shenk T. Adenovirus VA1 RNA is required for efficient translation of viral mRNA's at late times after infection. *Cell.* 1982; 31: 543-551.
- 23.- Staeheli P., Prautcheva D., Lunding L.G., Acklin M., Ruddle F., Lindenmann J. & Haller O. Interferon-regulated influenza virus resistance gene Mx is localized on mouse chromosome 16. *J. Virol.* 1986; 58: 967-969.
- 24.- Haller O., Arnheiter H., Lindenmann J. & Gresser I. Host gene influences sensitivity to interferon action selectively for influenza virus. *Nature (London).* 1980; 283: 660-662.
- 25.- Staeheli P., Grob R., Meier E., Sutcliffe J.C. & Haller O. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a non-sense mutation. *Mol. Cell Biol.* 1988; 8: 4518-

4523.

- 26.- Lopez C. Resistance to HSV-1 in the mouse is governed by two major independently segregating, non H-2 loci. *Immunogenetics*. 1980; 11: 87-92.
- 27.- O'Neill H. & Blanden R. Mechanisms determining innate resistance to ectromelia virus infection in C57Bl mice. *Infection and Immunology*. 1983; 41: 1391-1394.
- 28.- Brinton M. & Nathanson N. Genetic determinants of virus susceptibility: epidemiologic implications of murine models. *Epidemiol. Rev.* 1981; 3: 115-139.
- 29.- Lodmell D. Genetic control of resistance to street rabies virus in mice. *J. Exp. Med.* 1983; 157: 451-460.
- 30.- Bang F. & Warwick A. Mouse macrophages as host cells for the mouse hepatitis virus and the genetic basis of their susceptibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1960; 46: 1065-1075.
- 31.- Purchase H.G., Gilmore D.G., Romero C.H. & Okasaki W. Post infection genetic resistance to avian lymphoid leukosis resides in B target cell. *Nature (London)*. 1977; 270: 61-62.
- 32.- Oldstone M.B.A., Ahmed R., Buchmeier M., Blount P. & Tishon A. Perturbation of differentiated functions during viral infection *in vivo*. I. Relationship of lymphocytic choriomeningitis virus and host strains to growth hormone deficiency. *Virology*. 1985; 142: 158-174.
- 33.- Sabin A. & Olitsky P. Influence of host factors on neuroinvasiveness of vesicular stomatitis virus. *J. Exp. Med.* 1937; 67: 229-249.
- 34.- Anderson J. & Field H. The distribution of herpes simplex type I antigen in mouse central nervous system after different routes of inoculation. *J. Neurol. Sci.* 1983; 60: 181-195.
- 35.- Martin X. & Dolivo M. Neuronal and transneuronal tracing in the trigeminal system of the rat using the herpes virus suis. *Brain Res.* 1983; 273: 254-276.
- 36.- Fields B.N. Viral genes and tissue tropism. *Concepts in viral pathogenesis*. A.L. Notkins & M.B.A. Oldstone editors. Springer-Verlag. New York USA. 1984, pp 102-108.
- 37.- Baer G.M. Pathogenesis to the central nervous system. In *The natural history of rabies*; edited by Baer G.M. Academic Press. Orlando Fl. USA. 1975, pp 181-198.
- 38.- McClintock P.R. & Notkins A.L. Virus receptors. Expression, regulation and relationship to infectivity. In *Concepts in viral pathogenesis*; edited by A.L. Notkins & M.B.A. Oldstone. Springer-Verlag. New York USA. 1984, pp 97-101.

- 39.- Brister R., Chen H., Messing A., van Dyke T., Levine A. & Palmiter R. Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors. *Cell*. 1984; 37: 367-379.
- 40.- Davies N.L. Linney E. & Fan H. Suppression of leukemia virus pathogenicity by polyoma virus enhancers. *Nature (London)*. 1985; 314: 550-553.
- 41.- Nabel G. & Baltimore D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature (London)*. 1987; 326: 711-713.
- 42.- Lang J.C., Spandidos D.A. & Wilkie N.M. Transcriptional regulation of a herpes simplex virus immediate early gene is mediated through an enhancer-type sequence. *EMBO J*. 1984; 3: 389-395.
- 43.- Jameal S. & Siddiqui A. The human hepatitis B virus enhancer requires trans-acting cellular factors for activity. *Mol.Cell Biol*. 1986; 6: 710-715.
- 44.- Herbomel P., Bourachot B. & Yaniv M. Two distinct enhancers with different cell specificities coexist on the regulatory region of polyoma. *Cell*. 1984; 39: 653-662.
- 45.- Des Groseillers L. & Jolicoeur P. Mapping the viral sequences conferring leukemogenicity and disease specificity in Moloney and amphotropic murine leukemia virus. *J. Virol*. 1984; 52: 448-456.
- 46.- Evans D.M.A., Dunn G., Minor P.D., Schild G.C., Cann A.J., Stanway G., Almond J.W., Currey J.W. & Maizel J.V. Increased neurovirulence associated with a single nucleotide change in a noncoding region of the Sabin type 3 poliovaccine genome. *Nature (London)*. 1985; 314: 548-550.
- 47.- Stein S.B., Zhang L. & Roos R.P. Influence of Theiler's murine encephalomyelitis virus 5' untranslated region on translation and neurovirulence. *J. Virol*. 1992; 66: 4508-4517.
- 48.- Kuhn R.J., Griffin D.E., Zhang H., Niesters H.G.M. & Strauss J.H. Attenuation of sindbis virus neurovirulence by using defined mutations in non translated regions of the genome RNA. *J. Virol*. 1992; 66: 7121-7127.
- 49.- Pelletier J. & Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature (London)*. 1988; 334: 320-325.
- 50.- Chou J., Kern E.R., Whitley R.J. & Roizman B. Mapping of herpes simplex virus-1 γ 134.5, a gene non-essential for growth in culture. *Science*. 1990; 250: 1262-1266.
- 51.- McGeoch D.J. & Barnett B.C. Neurovirulence factor. *Nature (London)*. 1991; 358: 609.

- 52.- Kaye K., Spriggs D., Bassel-Duby R., Fields B. & Tyler K. Genetic basis for altered pathogenesis of an immune-selected antigenic variant of reovirus type 3 (Dearing). *J. Virol.* 1986; 59: 90-97.
- 53.- Wu F., García J., Mitsuyasu R. & Gaynor R. Alterations in binding characteristics of the human immunodeficiency virus enhancer factor. *J. Virol.* 1984; 52: 238-247.
- 54.- Johnson D.C., Wittels M. & Spear P.G. Binding to cells of virosomes containing herpes simplex virus type 1 glycoproteins and evidence for fusion. *J. Virol.* 1984; 52: 238-247.
- 55.- Rossmann M.G. & Palmenberg A.C. Conservation of the putative receptor attachment site in picornaviruses. *Virology.* 1988; 164: 373-382.
- 56.- Turner D.L., Duncan R. & Lee P.W.K. Site-directed mutagenesis of the C-terminal portion of reovirus protein σ_1 , evidence for a conformation dependent receptor binding domain. *Virology.* 1992; 186: 219-227.
- 57.- Spriggs D.R. & Fields B.N. Attenuated reovirus type 3 strains generated by selection of hemagglutinin antigenic variants. *Nature (London).* 1982; 297: 186.
- 58.- McClintok P.R., Prabhakar B.S. & Natkins A.L. Anti-idiotypic antibodies to monoclonal antibodies that neutralize coxsackievirus B₄ do not recognize viral receptors. *Virology.* 1986; 150: 352-360.
- 59.- Weis W., Brown J., Cusack S., Paulson J., Skehel J. & Wiley D. Structure of the influenza virus hemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature (London).* 1988; 333: 426-431.
- 60.- Neda H., Wu C.H. & Wu G.Y. Chemical modification of an ecotropic murine leukemia virus results in redirection of its target cell specificity. *J. Biol. Chem.* 1991; 226: 14143-14146.
- 61.- Rogers G.N., Paulson J.C., Daniels R.S., Skehel J.J., Wilson I.A. & Wiley D.C. Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature (London).* 1983; 304: 76-
- 62.- Hase T., Summers P.L. & Eckels K.H. Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral monocytes. *Arch. Virol.* 1989; 104: 129-143.
- 63.- Lomberg-Holm K. Attachment of animal virus to cells: an introduction. *Virus receptors, part 2; animal viruses.* K. Lomberg-Holm & L. Philipson editors. Chapman and Hall. London U.K. 1981, pp 1-20.
- 64.- Harter D.H. & Choppin P.W. Adsorption of attenuated and neurovirulent poliovirus strains to central nervous system tissues of primates. *J. Immunol.* 1965; 95: 730-736.

- 65.- Somerfelt M.A. & Weiss R.A. Retrovirus receptors and cell tropism. Concepts in viral pathogenesis III. A.L. Notkins & M.B.A. Oldstone editors. Springer-Verlag. New York USA. 1990, pp 99-105.
- 66.- Maddon P.J., Dalgleish A.G., McDougal J.S., Clapham P.R., Weiss R.A. & Axel R. The T₄ gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*. 1986; 47: 333-348.
- 67.- McDougal J.S., Kennedy M.S., Sligh S.P., Cort S.P., Mawle A. & Nicholson J.K.A. Binding of HTLV-III/LAV to T₄⁺ T cells by a complex of the 110 K viral protein and the T₄ molecule. *Science*. 1986; 231: 382-385.
- 68.- Harouse J.M., Bhat S., Spitalnik S.L., Laughlin M., Stefano K., Silberger D.H. & Gonzalez-Scarano F. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cells lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science*. 1991; 253: 320-323.
- 69.- Yahi N., Baghdiguain S., Moreau H. & Fantini J. Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. *J. Virol*. 1992; 66: 484-485A.
- 70.- White J.M. & Littman D.R. Viral receptors of the immunoglobulin superfamily. *Cell*. 1989; 56: 725-728
- 71.- Paulson J.C., Sadler J.E. & Hill R.L. Restoration of specific myxovirus receptors to asialoerythrocytes by incorporation of sialic acid with pure sialyltransferases. *J. Biol. Chem*. 1979; 254: 2120-2124.
- 72.- Shultze B. & Herrler G. Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as receptor determinant to initiate the infection of cultured cells. *J.Gen.Virol*.1992; 73: 901-906.
- 73.- WuDunn D. & Spear P.G. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol*. 1989; 63: 52-58.
- 74.- Superti F., Hauttecover B., Morelec M.J., Goldoni P., Bizzini B & Tsiang H. Involvement of gangliosides in rabies virus infection. *J. Gen. Virol*. 1986; 67: 47-56.
- 75.- Schlegel R., Tralka S., Willingham M.C. & Pastan I. Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine; is phosphatidylserine a VSV binding site? *Cell*. 1983; 32: 639-646.
- 76.- Tignor G.H., Smith A.L. & Shope R.E. Utilization of host proteins as virus receptors. Concepts in viral pathogenesis. A.L. Notkins & M.B.A. Oldstone editors. Springer-Verlag. New York USA. 1984, pp 109-116.

- 77.- Holmes K.V. The biology and biochemistry of cellular receptors for enveloped virus. Virus receptors, part 2; animal viruses. K. Lomberg-Holm & L. Philipson editors. Chapman and Hall. London U.K. 1981, pp 85-115.
- 78.- Li J-P., D'Andrea A.D., Lodish H.F. & Baltimore D. Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor. Nature (London). 1990; 343: 762-764.
- 79.- Ghosh A.K., Bachmann M.H., Hoover E.A. & Mullins J.I. Identification of a putative receptor for subgroup A Feline Leukemia virus on feline T cells. J. Virol. 1992; 66: 3707-3714.
- 80.- Sheply M.P., Sherry B. & Weiner H.L. Monoclonal antibody identification of a 100 kDa membrane protein in HeLa cells and human spinal cord involved in poliovirus attachment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988; 85: 7743-7747.
- 81.- Mendelson C.L., Wimmer E. & Racaniello V. Cellular receptor for poliovirus : molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. Cell. 1989; 56: 855-865.
- 82.- Greve J.M., Davis G., Meyer A.M., Forte C.P., Connolly-Yost S., Marlor C.W., Kamarck M.E. & McClelland A. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. Cell. 1989; 56: 839-847.
- 83.- Stauton D.E., Merluzzi V.J., Rothlein R., Barton R., Marlin S.D. & Springer T.A. A cell adhesion molecule, ICAM-1 is the major surface receptor for rhinovirus. Cell. 1989; 56: 849-853.
- 84.- Helenius A., Morein B., Fries E., Simons K., Robinson P., Schirmmacher V., Terhorst C. & Strominger J.L. Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2K and H-2D) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki Forest virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978; 75: 3846-3850.
- 85.- Inda T. & Mims C.A. Mouse Ia antigens are receptors for Lactate Dehydrogenase virus. Nature (London). 1984; 309: 59-61.
- 86.- Callebaut C., Krust B., Jacotot E. & Hovanessian A.G. T cell activation antigen, CD26 as a cofactor for entry of HIV in CD4+ cells. Science. 1993; 262: 2045-2050
- 87.- Figerioth J.D., Weiss J.J., Tedder T.F., Strominger J.L., Biro P.A. & Fearon D.T. Epstein-Barr virus receptor is the C3d receptor CR2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984; 81: 4510-4514.
- 88.- Grundy J.E., McKeating J.A. & Griffiths P. Cytomegalovirus strain AD169 binds β_2 microglobulin in vitro after release from cells. J.Gen.Virol. 1987; 68: 777-784.

- 89.- Dalziel R.G., Hopkins J., Watt N.S., Dutia B.M., Clarke H.A.K. & McConnell I. Identification of a putative cellular receptor for the lentivirus visna virus. *J.Gen.Virol.* 1991; 72: 1905-1911.
- 90.- Döring R.E., Marciel A., Chopra A. & Richardson C.D. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell.* 1993; 75: 295-305.
- 91.- Williams R.K., Jiang G-S. & Holmes K.V. Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 5533-5536.
- 92.- Hanham C.A., Zhao F. & Tignor G.H. Evidence from the anti-idiotypic network that the acetylcholine receptor is a rabies virus receptor. *J. Virol.* 1993; 67: 530-542.
- 93.- Co M.S., Gaulton G.N., Tominaga A., Homcy C.J., Fields B.N. & Greene M.I. Structural similarities between the mammalian β -adrenergic and reovirus type 3 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985; 82: 5315-5318.
- 94.- Epstein D.A., Marsh Y.V., Schreiber A.B., Newman S.R., Todaro G.J. & Nestor J.J. Epidermal growth factor occupancy inhibits vaccinia virus infection. *Nature (London).* 1985; 318: 663-665.
- 95.- Neurath A.R., Kent S.B.H., Strick N. & Parker K. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell.* 1986; 46: 429-436.
- 96.- Kim J.W., Closs E.I., Lorraine M.A. & Cunningham J.M. Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature (London).* 1991; 352: 725-728.
- 97.- Wang H., Kavanaugh M.P., North R.A. & Kabat D. Cell-surface receptor for ecotropic murine retrovirus is a basic amino-acid transporter. *Nature (London).* 1991; 352: 729-731.
- 98.- Bergelson J.M., Shepley M.P., Chan B.M.C., Hemler M.E. & Finberg R.W. Identification of the Integrin VLA-2 as a receptor for Echovirus 1. *Science.* 1992; 255: 1718-1720.
- 99.- Wang K-S., Kuhn R.J., Strauss E.G., Ou S. & Strauss J.H. High-affinity laminin receptor is a receptor for sindbis virus in mammalian cells. *J. Virol.* 1992; 66: 4992-5001.
- 100.- Delmas B., Gelfi J., L'Haridon R., Vogel L.K., Sjöström H., Norén O. & Laude H. Aminopeptidase N is a major receptor for the enterovirus TGEV. *Nature (London).* 1992; 357: 417-420.
- 101.- Yeager C.L., Ashmun R.A., Williams R.K., Cardellicchio C.B., Shapiro L.H., Look A.T. & Holmes K. V. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature (London).* 1992; 357: 420-422.

- 102.-Borrow P. & Oldstone M.B.A. Characterization of Lymphocytic Choriomeningitis virus - binding protein (s): a candidate cellular receptor for the virus. *J. Virol.* 1992; 66: 7270-7281.
- 103.-Kilpatrick D.R. & Lipton H.L. Predominant binding of Theiler's viruses to a 34-kilodalton receptor protein on susceptible cell lines. *J. Virol.* 1991; 65: 5244-5249.
- 104.-Hennache B. & Boulanger P. Biochemical study of KB-cell receptor for adenovirus. *Biochem. J.* 1977; 166: 237-247.
- 105.-Mapoles J.L., Krah D.L. & Crowell R.L. Purification of a HeLa cell receptor protein for group B coxsackievirus. *J. Virol.* 1985; 55: 560-566.
- 106.-Marriott S.J., Griffith G.R. & Consigli R.A. Octyl β -D-Glucopyranoside extracts polyomavirus receptor moieties from the surfaces of mouse kidney cell. *J. Virol.* 1987; 61: 375-382.
- 107.-Xue W. & Minocha H.C. Identification of cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus using anti-idiotypic antibodies. *J. Gen. Virol.* 1993; 74: 73-79.
- 108.-Gavalchin J., Fan N., Lane M.J., Papsidero L. & Poiesz B.J. Identification of a putative cellular receptor for HTLV-1 by a monoclonal antibody, Mab 34-23. *Virology.* 1993; 194: 1-9.
- 109.-Nowlin D.M., Cooper N.R. & Compton T. Expression of a human cytomegalovirus receptor correlates with infectibility of cells. *J. Virol.* 1991; 65: 3114-3121.
- 110.-Petit M-A., Capel F., Dubanchet S. & Mabit H. PreS1-specific binding proteins as potential receptors for hepatitis B virus in human hepatocytes. *Virology.* 1992; 187: 211-222.
- 111.-Ubol S. & Griffin D.E. Identification of a putative alphavirus receptor on mouse neural cells. *J. Virol.* 1991; 65: 6913-6921.
- 112.-Krah D.L. & Crowell R.L. Properties of the deoxycholate-solubilized He La cell plasma membrane receptor for binding group B coxsackieviruses. *J. Virol.* 1985; 53: 867-870.
- 113.-Harrison S.C. Common cold virus and its receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 783.
- 114.-Kaelbling M., Eddy R., Shows T.B., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Klinger H.P. & O'Hara B. Localization of the human gene allowing infection by gibbon ape leukemia virus to human chromosome region 2q11-q14 and to the homologous region on mouse chromosome 2. *J. Virol.* 1991; 65: 1743-1747.
- 115.-Boyle J.F., Weismiller D.G. & Holmes K.V. Genetic resistance to mouse hepatitis virus

- correlates with absence of virus binding activity on target tissues. *J. Virol.* 1987; 61: 185-189.
- 116.-Duekster G.S., Pensiero M.N., Cardellicchio C.B., Williams R.K., Jiang G-S., Holmes K.V. & Dieffenbach C.W. Cloning of mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *J. Virol.* 1991; 65: 6881-6891.
- 117.-Yokomori K. & Lai M.M.C. The receptor for mouse hepatitis virus in the resistant mouse strain SJL is functional: implications for the requirement of a second factor for viral infection. *J. Virol.* 1992; 66: 6931-6938.
- 118.-Yokomori K. & Lai M.M.C. Mouse hepatitis virus utilizes two carcinoembryonic antigens as alternative receptors. *J. Virol.* 1992; 66: 6194-6199.
- 119.-Compton S.R., Stephensen C.B., Snyder S.W., Weismiller D.G. & Holmes K.V. Coronavirus species specificity: murine coronavirus binds to a mouse-specific epitope on its carcinoembryonic antigen-related receptor glycoprotein. *J. Virol.* 1992; 66: 7420-7428.
- 120.-Incardona N.L. The chemical nature of virus-receptor interaction. *Virus receptors, part 2; animal viruses.* K. Lomberg-Holm & L. Philipson editors. Chapman and Hall. London U.K. 1981, pp 157-168.
- 121.-Wickham T.J., Granados R.R., Wood H.A., Hammer D.A. & Shuler M.L. General analysis of receptor-mediated viral attachment to cell surfaces. *Biophys. J.* 1990; 101: 56-62.
- 122.-Johnson C.H. & Knowles J.R. The binding of inhibitors to alfa chymotrypsin. *Biochem J.* 1966; 101: 56-62.
- 123.-Bell G.I. & Delisi C.P. Antigen binding to receptors on immunocompetent cells. I. simple models and interpretation of experiments. *Cell. Immunol.* 1974; 10: 415-431.
- 124.-Keusch G.T. Specific membrane receptors: pathogenic and therapeutic implications in infectious diseases. *Rev. Infec. Dis.* 1979; 1: 517-529.
- 125.-Kulczycki A. & Metzger H. The interaction of Ig E with rat basophilic leukemia cells. II Quantitative aspects of the binding reaction. *J. Exp. Med.* 1974; 140: 1676-1695.
- 126.-Thorne H.V. & Cartwright S.F. Reactions of the virus of Foot-and-mouth disease with cells and cell debris. *Virology.* 1961; 15: 245-257.
- 127.-Lamarre D., Ashkenazi A., Fleury S., Smith D.H. Sekaty R-P. & Capon D.J. The MHC-binding and gp120 binding functions of CD4 are separable. *Science.* 1989; 245: 743-746.
- 128.-Marsh M. & Helenius A. Virus entry into animal cells. *Adv. Virus Res.* 1989; 36: 107-151.

- 129.-Bramhall J. & Wisnieski B. The role of lipids in virus-cell interactions. Virus receptors, part 2; animal viruses; K. Lomberg-Holm & L. Philipson editors. Chapman and Hall. London U.K. 1981, pp 143-153.
- 130.-Knipe D.M. Virus-Host cell interactions. Virology, 2nd ed. B.N. Fields, D.M. Knipe et-al editors. Raven Press Ltd. New York USA. 1990,pp 293-316.
- 131.-Marvaldi J., Sekellick M., Marcus P. & Lucas-Lenard J. Inhibition of mouse L cells protein synthesis by ultraviolet-irradiated vesicular stomatitis virus requires viral transcription. Virology. 1978; 84: 127-133.
- 132.-Preston D.M., Frame M.C. & Campbell M.E.M. A complex formed between cell components and an HSV structural polypeptide binds to a viral immediate early gene regulatory DNA sequence. Cell. 1988; 52: 425-434.
- 133.-Berk A.J., Lee F., Harrison T., Williams J. & Sharp P.A. Pre-early adenovirus 5 gene product regulated synthesis of early viral messenger RNAs. Cell. 1979; 17: 935-944.
- 134.-zur Hausen H. Viruses in human cancer. Science. 1991; 254: 1167-1173.
- 135.-Benjamin T. & Vogt P.K. Cell transformation by viruses. Virology, 2nd ed. B.N. Fields, D.M. Knipe et-al editors. Raven Press Ltd. New York USA. 1990, pp 317-367.
- 136.-Schneider R.J. & Shenk T. Impact of virus infection on host cell protein synthesis. Ann. Rev. Biochem. 1987; 56: 317-332.
- 137.-Carrasco L. The inhibition of cell functions after viral infection. A proposal general mechanism. FEBS letters. 1977; 76: 11-15.
- 138.-Kristensson K. & Norrby E. Persistence of RNA viruses in the central nervous system. Ann. Rev. Microbiol. 1987; 22: 565-574.
- 139.-Hutt-Fletcher L.M. Synergistic activation of cells by Epstein-Barr virus and B-cell growth factor. J. Virol. 1987; 61: 774-781.
- 140.-Boldogh I., AbuBakar S & Albecht T. Activation of proto- oncogenes: an immediate early event in human cytomegalovirus infection. Science. 1990: 247: 561-564
- 141.-Hayashi K. Effect of protein kinase C inhibitors with different action mechanisms on Epstein-Barr virus replication. Intervirology. 1992; 33: 217-224.
- 142.-Centers for disease control. Dengue diagnostic laboratory procedures for the Americas: a manual. CID, Public Heald Departament. San Juan Laboratories, San Juan PR, 1981.

- 143.-Gould E.A. & Clegg J.C.S. Growth, titration and purification of alphavirus and flavivirus. *Virology: a practical approach*. B.W.J. Mahy editor. Oxford University Press. 1985, pp.43-78.
- 144.-Sotelo J., Gibbs C.J., Gadjusek D.C., Hock Toh B. & Wurth M. Method for preparing cultures of central neurons:cytochemical and immunochemical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980; 77: 653-657.
- 145.-Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
- 146.-Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (London)*. 1970; 227: 680-685.
- 147.-Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 76: 4350-4354.
- 148.-Trimble R.B. & Maley F. Optimizing hydrolysis of N-linked high-mannose oligosaccharides by endo- β -N-acetyl glucosaminidase H. *Anal. Biochem.* 1984; 141: 515-522
- 149.-Takács B.J. & Staehelin T. Biochemical Characterization of cell surface antigens using monoclonal antibodies. *Immunological Methods*. Vol II. Academic Press. 1981, pp. 27-55.
- 150.-Arenander A.T. & de Vellis J. Development of the nervous system. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*, 5th ed. G.J. Siegel, et-al editors. Raven Press, New York USA. 1994, pp. 573-605.
- 151.-Sotelo J., Gibbs C.J. & Gadjusek D.C. Central neurons in culture in the study of spongiform encephalopathies. *Adv. Cell. Neurobiol.* Vol. 5. Academic Press. 1984, pp. 251-268.
- 152.-Schilling K., Blanco Barco E., Rhinehart D. & Pilgrim Ch. Expression of synaptophysin and neuron-specific enolase during neuronal differentiation *in vitro*: effects of dimethyl sulfoxide. *J. Neurosci. Res.* 1989; 24: 347--354.
- 153.-Carden M.J., Trojanowski J.Q., Schlaepfer W.W. & Lee V. M.-Y. two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J. Neurosci.* 1987; 7: 3489-3504.
- 154.-Najit H.C., Vijverberg H.P.M. & van den Bercken J. The dopamine response in mouse neuroblastoma cells is mediated by serotoninine 5HT₃ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 1986; 127: 271-274.

- 155.-Kimhi Y., Palfrey C., Spector I., Barak Y. & Littauer U.S. Maturation of neuroblastoma cells in the presence of dimethyl sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1976; 73: 462-466.
- 156.-Schiller B. & Marchand C. M.-F. Effects of pseudorabies virus on the neuronal properties of PC12 cells. *J. Neurochem.* 1991; 56: 898-906.
- 157.-Wiedenmann B. Synaptophysin: a widespread constituent of small neuroendocrine vesicles and a new tool in tumor diagnosis. *Acta Oncologica.* 1991; 30: 435-440.
- 158.-Cochard P. & Paulin D. Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of mouse embryo *in vivo*. *J. Neurosci.* 1984; 4: 2080-2094.
- 159.-Dahl D. & Bignami A. Neurofilament phosphorylation in development. A signal for axonal maturation. *Exp. Cell Res.* 1986; 162: 220-230.
- 160.-Lipkin W.I. Wilson M.C & Oldstone M.B.A. Molecular insights into infections of the central nervous system. Immunologic mechanisms in neurologic and psychiatric disease. B.H. Waksman editor. Raven Press. 1990, pp. 15-22.
- 161.-Clift-O'Grady, Linstedt A.D., Lowe A.W., Grata E. & Kelly R.B. Biogenesis of synaptic vesicle-like structures in a pheochromocytoma cell line PC-12. *J. Cell Biol.* 1990; 110: 1693-1703.
- 162.-Miñana M.D. Felipo V. & Grisolia S. Inhibition of protein kinase C induces differentiation in Neuro 2a cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 4335-4339.
- 163.-Blakely R.D., Berson H.E., Fremau R.T., Caron M.G., Peek M.M., Prince H.K. & Bradley C.C. Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature (London).* 1991; 354: 66-70.
- 164.-Cohen D.I., Tani Y., Tian H., Boone E., Samuelson L.E. & Lane H.C. Participation of tyrosine phosphorylation in the cytopathic effect of human immunodeficiency virus-1. *Science.* 1992; 256: 542-545.
- 165.-Bergelson J.M. & Finberg R.W. Integrins as receptors for virus attachment and cell entry. *Trends in Microbiol.* 1993; 287: 287-288.
- 166.-Strange P.G. The structure and mechanism of neurotransmitter receptors. *Biochem. J.* 1988; 249: 309-318.
- 167.-Ip N.Y. & Yancopoulos G.D. Neurotrophic factors receptors: just like other growth factor and cytokine receptors?. *Curr. Op. Neurobiol.* 1994, 4: 400-405.
- 168.-Bähler M., Cesura A. M., Fisher G., Kuhn H., Klein R.L. & da Prada M. Serotonin organelles of rabbit platelets contain synaptophysin. *Eur. J. Biochem.* 1990; 194: 825-829.

169. Boompucknavig S., Vuttiviroj O., Bunnag C., Bhamarapravati N. & Nimmannitya S. Demonstration of dengue antibody complexes on the surface of platelets from patients with dengue haemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1979; 28: 881-884.