

11661



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ONTOGENIA DEL RECEPTOR NEURONAL PARA EL
VIRUS DENGUE SEROTIPO 2 EN EL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL DEL RATON

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRA EN MICROBIOLOGIA
P R E S E N T A :
QFB. MARIA MARTHA GARCIA FLORES

DIRECTORES DE TESIS: DR. ARTURO ORTEGA SOTO
DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA



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 esta 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.

J U R A D O

PRESIDENTE

DR. ALVARO AGUILAR SETEN

VOCAL

DRA. BLANCA AHYDE RUIZ DIAZ

SECRETARIO

DR. ARTURO ORTEGA SOTO

1er. SUPL.

DR. JORGE REYES ESPARZA

2do. SUPL.

DR. VICENTE MADRID MARINO

A mis padres, Guadalupe y Maximino

A mis hermanos José Francisco y Víctor Manuel

A mis cuñadas Elyia y Evelia

*A mis sobrinas Johana Evelia, Nayeli Estefanía
y Gabriela*

A mi profesor Raúl Mar

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr Arturo Ortega Soto, por la oportunidad que me brindó para colaborar con él; por sus enseñanzas, su paciencia y amistad.

A mi coautora, la Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, por creer en mí, por su apoyo incondicional y amistad.

Al Dr. Abel Ciprian Carrasco, por haberme brindado la oportunidad de estar en la FESC y por haber creído en mí.

Al Dr. Raúl Mar, ya que gracias a su maravillosa manera de exponer su cátedra me motivó para adentrarme en el mundo de los virus.

A la Dra. Blanca Anydé Ruiz Díaz, por su valiosa colaboración en la revisión del trabajo y por su paciencia.

Al Patólogo Clínico Pedro García Ramírez, porque siempre creyó en mí y por su apoyo.

A mis amigos Ana Lilia, Yolanda, Lupita y Alvaro, por haber sabido cultivar nuestra amistad por tanto tiempo.

A Martha Laura y Maricarmen Morales, quienes han seguido mi vida profesional muy de cerca y con quienes comparto este logro.

A las QBP's Iraís Méndez y Elisa del Bosque, por su amistad, sus sabios consejos, sus intervenciones en momentos difíciles y por su apoyo incondicional.

A la M en C Antonieta Cote, por su amistad, espontaneidad y apoyo incondicional.

A los Drs. Eduardo Pérez y Marco González por haber creído en la amistad y por brindármela.

A los M en C Martha E. Ruiz y Oscar B Acosta, por su amistad, valiosa colaboración y apoyo, sin los cuales no hubiera sido posible concluir este trabajo.

Al Dr. Tomás López por su asesoría y comentarios para este trabajo.

Al M en C Alfonso Bernabé, por su amistad, generosidad y apoyo incondicional.

A mis compañeros del laboratorio 23 del Depto. de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV, especialmente a Penélope, Alicia, Eva, Lino, Lulu, Mónica, Adán, Alejandro, Rosy, César, Jorge, Clara, Maru, Anita y Blanca, por compartir sus experiencias conmigo, su comprensión y paciencia durante mi estancia con ellos.

A mis compañeros del Centro Médico La Raza, especialmente a Ana Felicidad, Ana Luisa, Luis David, Sofía, Roberto, Lili, Carý, Paty, Maru, Juan, Felipe, Lauris y Estelita, por su apoyo y amistad.

A mis compañeros de la FESC-UNAM, en especial a María Esther, Martha Lilia, Margarita, Rosy, Martina, Guadalupe, Ismael, Enrique, Jose Antonio, Eduardo y Benjamín, por sus consejos tan alentadores, apoyo y amistad.

Al Técnico Especialista del Bioterio del CINVESTAV, Fernando Cuevas González; al Dibujante del Depto. de Genética y Biol.Mol. del CINVESTAV Israel Vázquez Montiel y al IME José Antonio Sánchez Gutiérrez del Depto. de Ingeniería de la FESC, por su disponibilidad y apoyo técnico.

ABREVIATURAS

AMP _c	Adenil monofosfato cíclico
anti DEN	Anticuerpos contra el Virus Dengue
anti IgG	Anticuerpos contra Inmunoglobulina G
AP-1	Proteína activadora 1
ASV 17	Virus del sarcoma de ave 17
ATF	Factores activadores de la transcripción
[γ ³² P]dATP	Desoxiadenosín trifosfato con fósforo 32 en la posición gamma
CaM cinasa	Proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina
CAT	Transportador de aminoácidos catiónicos
CRE	Elemento responsivo a AMP _c
DAG	Diacilglicerol
DEN	Virus del Dengue
DEN 2	Virus Dengue serotipo 2
DEN 1-4	Virus Dengue serotipos 1, 2, 3 y 4
DF	Fiebre clásica del Dengue
DFH/DSS	Fiebre hemorrágica del Dengue y/o síndrome del choque del Dengue
DNA	Acido desoxiribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
FBS-MSV	Virus del osteosarcoma Finkel-Biskis-Jenkins de ratón
FeLV-B	Virus B de la leucemia felina
GABA	Acido gamaaminobutírico
GALV	Virus de la leucemia del mono Gibon
HA	Hemagiutinina
HSV	Virus herpes simple
HCMV	Citomegalovirus humano
IFN _γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
IP3	Inositol trifosfato

ISRE	Elemento de respuesta estimulado por IFN
JAK	Cinasa Janus
JEV	Virus de la Encefalitis Japonesa
kDa	Kilodaltones
LCMV	Virus de la Coriomeningitis linfocítica
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MLV-A	Virus antotrópico de la leucemia murina
MLV-E	Virus ecotrópico de la leucemia murina
nt	Nucleótido
NTF	Factor neural trófico
PAGE	Gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos
PBST	Amortiguador de fosfatos con Tween 20
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMP _c
PKC	Proteína cinasa C
PMSE	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Acido ribonucleico
RNA _m	Acido ribonucleico mensajero
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIF	Factor inducible en <i>cis</i>
SRE	Elemento responsivo a suero
SRF	Factor responsivo a suero
SNC	Sistema Nervioso Central
SRP	Partícula de reconocimiento de señal
tm	Dominio transmembrana
VIE	Virus de la inmunodeficiencia humana

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

iii

Figura 1. Distribución Mundial de Dengue Clásico en 1995.	4
Figura 2. Representación esquemática de la morfología del Virus Dengue.	7
Figura 3. Organización del genoma de los <i>Flavivirus</i> .	10
Figura 4. Conformación de las proteínas de los <i>Flavivirus</i> en el retículo endoplásmico.	10
Figura 5. Procesamiento del polipéptido que codifica para prM-E-NS1.	11
Figura 6. Configuración molecular de algunos receptores virales.	15
Figura 7. Mecanismos generales de la transducción de señales que activan diferentes tipos de receptores.	21
Figura 8. Ensayos de unión del virus en fase sólida de los 18 tratamientos probados.	31
Figura 9. Ensayos de unión del virus en fase sólida de los tratamientos 18, 19 y 20.	32
Figura 10. Ensayos de unión del virus en fase sólida en presencia y ausencia del DEN 2.	33
Figura 11. Unión del DEN 2 a la proteína de 65 kDa de la membrana neuronal durante el desarrollo del SNC del ratón.	35
Figura 12. Análisis densitométrico de la expresión de la proteína de 65 kDa, receptor neuronal a la que se une el DEN 2 durante el desarrollo del cerebro del ratón.	36
Figura 13. Actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 en tejido cerebral de ratones de 1 día postnatal infectado con DEN 2.	37
Figura 14. Actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 en tejido cerebral de ratón de 1, 3, 4 y 5 días postnatales infectado con DEN 2.	39

Figura 15. Actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 en tejido cerebral de ratón de 6, 7, 8 y 76 días postnatales infectado con DEN 2.	40
Figura 16. Análisis densitométrico de la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 en tejido cerebral de ratón de 1, 3-5 días postnatales infectado con DEN 2.	41
Figura 17. Correlación entre el patrón de expresión de la proteína de 65 kDa, receptor neuronal para el DEN 2 y la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 en tejido cerebral de ratón de 1, 3-6 días postnatales infectado con DEN 2.	42
Figura 18. Modelo propuesto del mecanismo de activación del receptor neuronal para el DEN 2 y las probables cascadas de señalización que dispara.	48
Tabla I. Complejos antigénicos de Flavivirus definidos por pruebas de neutralización cruzada, vectores principales y porcentajes de transmisión de vectores.	7
Tabla II. Propiedades de las proteínas estructurales y no estructurales de los <i>Flavivirus</i> .	8
Tabla III. Algunas propiedades biológicas de las proteínas celulares que usan los virus como receptores.	16
Tabla IV. Clasificación de los neuroreceptores.	19

AGRADECIMIENTOS		i
ABREVIATURAS		ii
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS		iii
INDICE		iv
I. RESUMEN		1
II. INTRODUCCION		3
II.1 Agente Causal del Dengue		6
II.1.1 <i>Morfología y estructura de los viriones</i>		6
II.1.2 <i>Organización del genoma viral y procesamiento post-traducciona</i>		9
II.2 Sistemas de replicación e infección del Virus Dengue		12
II.3 Receptores virales		13
II.4 Receptores neuronales		17
II.4.1 <i>Clasificación y activación</i>		18
II.4.2 <i>Cascadas de señalización y expresión de genes tempranos</i>		20
II.4.2.1. <i>Expresión de c-fos</i>		20
II.4.2.2. <i>Expresión de c jun</i>		22
III. JUSTIFICACION		23
IV. OBJETIVOS		24
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL		25
VI. MATERIALES Y METODOS		26
VI.1 Virus		26

VI.2.	Animales	25
VI.3	Células	26
VI.4	Anticuerpos	26
VI.5	Preparados membranales	27
VI.6	Ensayo de unión del virus en fase sólida (<i>Virus Overlay Protein Blot Assay</i> , VOPBA)	27
VI.7	Preparación de extractos nucleares	28
VI.8	Detección de la interacción DNA-proteína mediante ensayos de retardo de entrada al gel (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assays</i> , EMSA)	29
VII.	RESULTADOS	30
VII.1	Interacción del Virus Dengue 2 con proteínas membranales de neuronas de ratón	30
VII.2	Ontogenia de la proteína de 65 kDa a la que se une el Virus Dengue 2	30
VII.3	Actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1	34
VII.4	Correlación entre la ontogenia de la proteína de 65 kDa a la que se une el Virus Dengue 2 y la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1	38
VIII.	DISCUSION	43
VIII.1	Ontogenia del receptor neuronal	44
VIII.2	Actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1	45
VIII.3	Correlación entre la ontogenia del receptor neuronal y la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1	47
IX.	CONCLUSIONES	49
X	PERSPECTIVAS	50
XI	BIBLIOGRAFIA	51

I. RESUMEN

El dengue es una enfermedad viral aguda que causa alta morbilidad y mortalidad a humanos menores de 15 años que viven en regiones tropicales y subtropicales localizadas a los 40° de latitud norte y 30° de latitud sur donde prevalece el mosquito transmisor del género *Aedes* sp. Dicha enfermedad, en México como en el resto del mundo se ha convertido en un problema de salud pública, a la fecha no existen métodos efectivos de prevención, ni de control del vector transmisor. El dengue sigue siendo un desafío para la medicina y la biología molecular.

El agente causal, es el Virus Dengue del que se han identificado cuatro serotipos antigénicamente diferentes, presentan envoltura, genoma de tipo RNA de cadena sencilla con polaridad positiva y pertenecen al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. En humanos es principalmente linfotrópico aunque también muestra el neurotropismo universal que exhiben los *Flavivirus* en roedores. En el ratón la infección con Virus Dengue causa padecimientos neurológicos que dependiendo de la vía de inoculación y edad del animal pueden llegar a causar encefalitis letales.

Aunque se han identificado proteínas que son empleadas por el virus como receptor, el mecanismo de patogenicidad de la infección del Virus Dengue o de algún otro *Flavivirus* se desconoce. Así se ha determinado a una proteína de 65 kDa que se expresa en la superficie de células de neuroblastoma como el receptor para el Virus Dengue serotipo 2. También se ha mostrado que al interactuar el Virus Dengue 2 con su receptor en las células de neuroblastoma dispara cascadas de segundos mensajeros que activan a la cinasa de proteína dependiente de Ca^{2+} / diacilglicerol (PKC), lo que sugiere que también esta activada la producción del protooncogene *c-fos* y en consecuencia la formación del factor de transcripción AP-1 e incrementada su actividad de unión a DNA.

En este trabajo estudiamos la ontogenia del receptor neuronal para el Virus Dengue serotipo 2 en ratones Balb/c de 1, 3 y 5 días prenatales, 1, 3-10, 12, 14, 17 y 76 días postnatales así como en células de las líneas N1B-115 (neuroblastoma) y J-774 (macrófagos) como controles positivo y negativo respectivamente. Para identificar la presencia del receptor para el Virus Dengue se emplearon ensayos de unión del virus en fase sólida (*overlay*) en las membranas de nitrocelulosa donde se encontraban transferidas las proteínas membranales de neuronas. Para examinar los efectos de activación del posible receptor neuronal (proteína de 65 kDa) se llevó a cabo la evaluación de la interacción del factor de transcripción AP-1 a secuencias consenso de DNA, mediante ensayos de retardamiento de entrada al gel con extractos crudos nucleares de tejido cerebral de ratones de 1, 3-8 y 78 días postnatales infectados y sin infectar con Virus Dengue 2.

Los resultados muestran que la proteína de 65 kDa, posible receptor neuronal para el Virus Dengue 2 se expresa diferencialmente durante la ontogenia del cerebro de ratón, observándose un incremento en su expresión desde el día 5 prenatal hasta el 7 postnatal con un máximo al día 1 postnatal, después del cual se reduce a niveles no detectables. En cuanto a los efectos de activación del receptor neuronal, también se encontró un incremento considerable en la actividad de unión del factor de transcripción AP-1 a DNA respecto del control sin infectar al día 1 con subsecuente disminución hasta el día 5 postnatal. También se muestra una correlación entre el incremento en la expresión y el efecto de activación del receptor neuronal durante la primera semana de vida del animal de tal manera que la proteína receptor puede ser alguna de las que están participando importantemente durante la sinaptogénesis y que su presencia además de conferirle susceptibilidad a la infección al Virus Dengue 2 activa genes de expresión temprana que, posiblemente activen genes de respuesta tardía para proteínas virales. Con estas bases se propone un modelo acerca del mecanismo de activación del receptor neuronal del Virus Dengue 2 y las probables cascadas de señalización que dispara. Este trabajo aporta nueva evidencia de las bases moleculares que pueden explicar la susceptibilidad a la infección por *Flavivirus* que causan encefalitis.

II. INTRODUCCION

El dengue es una infección viral aguda que en el humano produce un síndrome benigno o maligno denominados respectivamente: fiebre clásica del dengue (DF) y fiebre hemorrágica del dengue o síndrome del choque de dengue (DFH / DSS). El Virus Dengue (DEN) agente causal de dicha enfermedad se encuentra distribuido en regiones tropicales y subtropicales localizadas a los 40° de latitud norte y 30° de latitud sur, donde reside la mitad de la población mundial. En México predomina sobre todo en áreas costeras hacia la zona meridional del país ^{1,2,3} (Figura 1).

El humano es el único hospedador susceptible conocido universalmente, siendo mayormente afectados los menores de quince años de edad¹. Aunque en monos *Rhesus* jóvenes, también se ha mostrado experimentalmente susceptibilidad a la infección por Virus Dengue ⁴.

Respecto a la incidencia no se cuenta con cifras que indiquen la frecuencia real. A pesar de ello, a nivel mundial hasta 1995 se estimaron más de 100 millones de casos de DF y aproximadamente 250 mil casos de DFH / DSS por año. La tasa de mortalidad para DF es muy baja, mientras que para DFH / DSS varía del 10 al 40 % ¹.

La DF se presenta durante la primera infección causando un cuadro febril autolimitado, cuyas manifestaciones clínicas son fiebre, exantema, dolor articular, muscular y linfadenopatía. La forma más severa de la enfermedad DFH / DSS se presenta en infecciones secundarias secuenciales con un serotipo diferente del virus, es decir, cuando la primera infección es con cualquier serotipo seguida de otra, especialmente con el serotipo 2 (1-2, 3-2 ó 4-2). Algunas de las manifestaciones que presentan incluyen alteraciones en el sistema nervioso central (SNC), coagulación intravascular diseminada, aumento de la permeabilidad vascular, hemorragias internas que pueden provocar choque hipovolémico. Se ha visto que el DFH / DSS se desarrolla entre 5 y 10 % de los pacientes que previamente presentaron DF ^{1,5}.

Anteriormente se pensaba que las manifestaciones neurológicas eran ocasionadas por la vasculitis a nivel de SNC y era, por tanto, poco probable que el Virus Dengue (linfotrópico) directamente lo infectara. Sin embargo, recientemente un estudio retrospectivo llevado a cabo en Rio de Janeiro de cinco casos fatales de dengue asociados con encefalopatía, mostró la presencia del antígeno viral en el SNC ⁶. Posteriormente se realizaron otros estudios que apoyan la evidencia, los cuales han sido realizados en Malasia ⁷, Guayana Francesa ⁸ y México ⁹. Lo novedoso de estos estudios es que ponen de manifiesto el potencial neurovirulento del Virus Dengue, mismo que presentan la gran mayoría de miembros de la familia a la que pertenece.

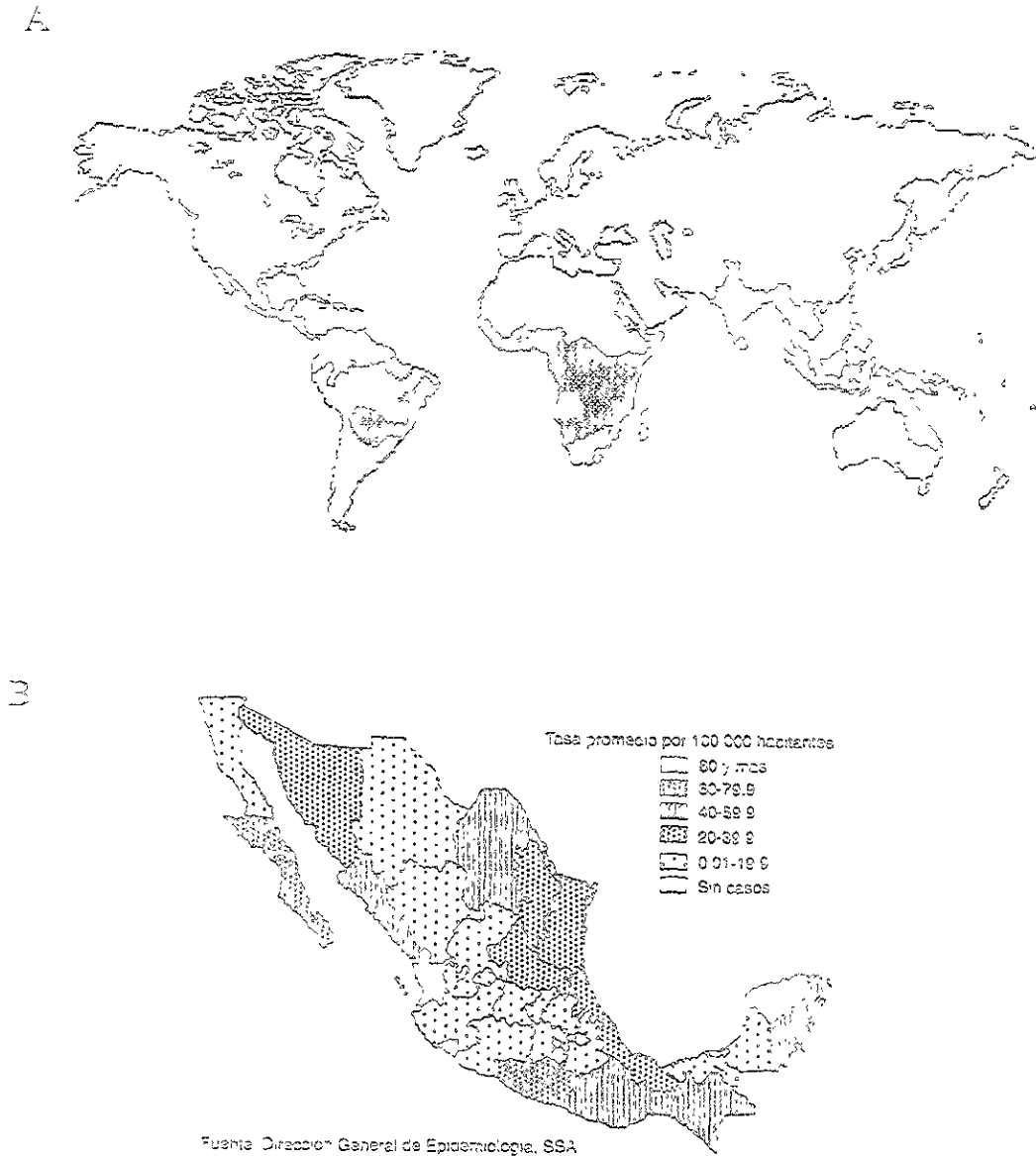


Fig. 1. Distribución mundial de Dengue Clásico en 1995. Panel A, muestra las zonas de riesgo (■) y de reciente actividad (●). Panel B, muestra la tasa promedio por 100 000 habitantes de la distribución de Dengue Clásico en la República Mexicana durante el período 1978-1994. Tomada de las referencias 1 y 2.

El DEN es transmitido de un humano infectado a uno susceptible mediante la picadura de un mosquito, siendo el transmisor mas eficiente el *Aedes aegypti* por lo que se ha considerado el vector principal 10.

La dispersión tan rápida del dengue en áreas tropicales y subtropicales del mundo (especialmente en América), la elevada frecuencia de brotes en zonas endémicas como en epidémicas y la alta morbilidad/mortalidad han sido atribuidas principalmente a la inexistencia de métodos de prevención efectivos y a la falta de un tratamiento específico, por lo que, el dengue se ha convertido actualmente en un problema de salud pública 1, 2. El desafío para la medicina y la biología molecular sigue siendo el encontrar un tratamiento efectivo.

Las patogénesis de los síndromes DF y DFH/DSS no se conocen con claridad. Algunas evidencias indirectas sugieren que los causantes de las diferentes manifestaciones de la enfermedad son factores tanto del virus como del hospedador. Halstead ha planteado que la forma más severa de la enfermedad se debe a la presencia de anticuerpos heterotípicos no neutralizantes en el hospedador los cuales facilitan la entrada del DEN a macrófagos vía receptor Fcγ, que es activado disparando diferentes cascadas que incluyen al complemento, coagulación y fibrinólisis, dichas cascadas producen factores con actividad proinflamatoria, anticoagulante y/o fibrinolítica que al ser secretadas recolectan células, activan linfocitos B y otros sistemas que producen cambios en la hemostasia y en la permeabilidad del endotelio 5, Leon Rosen sostiene que los aislados virales sufren variaciones antigénicas mientras circulan en la naturaleza y que estas mutaciones favorecen la aparición de cepas más virulentas que al infectar primariamente a un individuo le causan la forma severa de la enfermedad 11. Además nuestro grupo ha mostrado que la activación del receptor Fcγ del macrófago dispara cascadas de fosforilación que involucran a la cinasa de proteína activada por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinasa*, MAPK) y llevan a la activación de la transcripción de genes tempranos (como *c fos* 12) y tardíos (como *IL6*, *IL1* y *TNF* 13) que también producen factores con actividad proinflamatoria, anticoagulante y/o fibrinolítica, apoyando lo postulado por Halstead.

En el SNC de humano la patología y patogénesis de las infecciones por DEN son desconocidas. Se ha observado que las manifestaciones clínicas de la encefalitis coinciden con la fase virémica de la enfermedad, por lo que se ha postulado que el DEN atraviesa la barrera hematoencefálica para infectar al cerebro 6. En el ratón la infección es dependiente de la edad y el análisis histológico muestra necrosis en diferentes regiones del cerebro y leve reacción inflamatoria. Además en cultivos primarios de tejido cerebral de ratón infectados se ha detectado al DEN en las neuronas pero no en los astrocitos, esta selectividad para infectar neuronas sugiere que dichas células

expresan un receptor viral que media la infección¹⁵. Respecto a dicho receptor que le confiere la susceptibilidad a la infección por DEN en el hospedador, existe controversia ya que primero se identificó un tipo altamente sulfatado de heparan y luego a una proteína de 65 kDa que se expresa en células NIE-115 de neuroblastoma de ratón y células SK-N-SH de neuroblastoma humano¹⁶. Aunque es probable que el primero actúe como correceptor o receptor de baja afinidad y el segundo como receptor de alta afinidad^{17, 18, 19}.

Varias estrategias han sido exploradas para desarrollar un método de control y una vacuna efectiva sin resultados favorables por lo que se hace importante entender los mecanismos moleculares de propagación y patogénicos ocasionados por el DEN, para desarrollar estrategias alternativas que permitan resolverlas.

II.1 Agente causal del Dengue

El DEN presenta cuatro serotipos (DEN 1-4) que forman uno de los ocho subgrupos antigénicos en que se han clasificado los aproximadamente 70 miembros reconocidos que constituyen el género *Flavivirus* (por medio de pruebas de neutralización cruzada)(Tabla I).

Dentro de este género se encuentran otros patógenos humanos como: el Virus de la Fiebre Amarilla (YFV), el Virus de la Encefalitis Japonesa (JEV) y el Virus de la Encefalitis de San Luis (SLEV). El género *Flavivirus* pertenece a la familia *Flaviviridae*, la cual contiene otros dos géneros, el género del *Virus de la Hepatitis C humana* y el género *Pestivirus*¹⁰.

II.1.1 Morfología y estructura de los viriones

Morfológicamente los viriones maduros son de forma esférica y tienen una ribonucleoproteína icosaédrica de aproximadamente 30 a 35 nm, que está rodeada por una envoltura lipídica de 7 a 10 nm de grueso que exhibe peplómeros cortos dándole un diámetro aproximado de 40 a 50 nm. Posee un genoma de tipo RNA de cadena sencilla y polaridad positiva que funciona como mensajero codificando para una poliproteína, misma que al ser procesada postraduccionalmente da lugar a tres proteínas estructurales (C, M y E) y siete no estructurales (NS₁, NS_{2A}, NS_{2B}, NS₃, NS_{4A}, NS_{4B} y NS₅). La proteína C es una proteína muy básica que se une al RNA para formar la nucleocápside o el core viral (complejo que es infeccioso), rodeando a la nucleocápside el virus presenta una membrana lipídica en la que se encuentran inmersas dos proteínas la E (de envoltura) y M (de membrana) cuya función es unir a la nucleocápside y la proteína E (Figura 2)^{17, 18}. La estructura, maduración y posible función se ha resumido en la Tabla II.

La proteína E presumiblemente tiene un papel importante en el tropismo celular por estar

TABLA 1. Complejos antígenicos de *Flavivirus* definidos por pruebas de neutralización cruzada, vectores principales y porcentajes de transmisión de vectores

VECTOR PRINCIPAL	% DE TRANSMISION	COMPLEJO ANTIGENICO	VIRUS
GARRAPATA	22	ENCEFALITIS TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS TYULENIY	- (ENCEFALITIS RUSA DE PRIMAVERA-VERANO), ENCEFALITIS CENTRAL EUROPEA. - FEBRE HEMORRAGICA OMSK. - ENCEFALITIS OVINA DEL BOSQUE KYASANUR - (LANGAT, MURCIELAGO PHNOM-PENH, ISLAS DEL CAREY), NEGHESI, POWASSAN, KARSIE, CRANTA ROYAL - TYULENIY, ARRECIFE SAUMAUREZ, MEASAN.
MOSQUITO	53	ENCEFALITIS JAPONESA NTAYA S. UGANDA DENGUE	- ENCEFALITIS JAPONESA - ENCEFALITIS DE SAN LUIS - ENCEFALITIS MURRAY VALLEY - OESTE DEL NILO, KUNJIN, USUTU, KOKOBERA, STRATFORD, ALFUY, KOUTANGO. - NTAYA, (TEMBUSU, YOKOSE) - MENINGOENCEFALITIS DEL PAVO DE ISRAEL - S. UGANDA, EANZI, BOUSOU, EDGE-HILL - DENGUE 1, DENGUE 2, DENGUE 3, DENGUE 4.
NINGUNO	20	RIO BRAVO MODCC	- RIO BRAVO, MURCIELAGO ENTEBEE, MURCIELAGO DAKAR, MURCIELAGO BUKALUSA - MODCC, COWBONE, JUTIAPA, SAL VIEJA, SANTA PERLITA

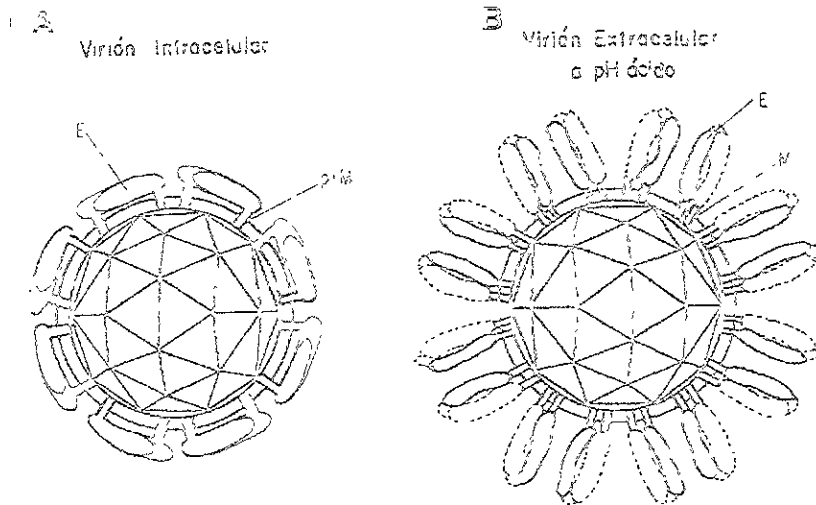


Figura 2. Representación esquemática de la morfología del Virus Dengue. Panel A: Virión inmaduro, mostrando el precursor de la proteína M (prM) y los dímeros de la proteína de envoltura (E). Panel B: Virión maduro, exhibiendo el arreglo a trímeros de la proteína de envoltura (E) a pH ácido y la proteína estructural M. Tomada y modificada de las referencias 13 y 25

Tabla II PROPIEDADES DE LAS PROTEINAS ESTRUCTURALES Y NO ESTRUCTURALES DE LOS Flavivirus

Proteína	PW (kDa)	Función	Propiedades adicionales	Corte N _t	Corte C _t	Hidrofobicidad (YF) en %	Carga neta (YF)	Dom. asociada a membrana	Glicosilación en NH ₂ -t
C (anclaje)	12.3-13.7	Enlace a RNA; precursor de la nucleocápside; secuencia p1M señal	NH ₂ heterogéneo; básico, anclaje hidrofóbico	M	S	4.0	+2.5	SI	NO
C (virión)	10.5-11.7	Desdoblamiento?; Eventos tempranos?	NH ₂ heterogéneo; básico; nucleocápside del virus	M	DC	3.7	+2.6	NO	NO
p1M	18.1-19.0	Morfogénesis viral y/o transporte	Anclaje transmembranal; dominio luminal, p1M/E heterodímero; precursor M; asociada a membrana	S	S	3.9	+5	SI	SI
p1	9.8-10.7	?	Dominio luminal; 6 C- C residuos conservados	S	DL	3.1	+1	NO	SI
M	8.2-8.5	Componente espicular del virión; enlace y entrada	Anclaje transmembranal; ceto-dominio; proteína de membrana del virus	DL	S	4.8	+4	SI	NO
E	53.3-54.3	Ensamblaje del virión; enlace al receptor; fusión a membrana; principal antígeno viral	Anclaje transmembranal; 12 C- C residuos conservados; proteína de envoltura	S	S	4.1	-5	SI	SI/NO
NS1	39.2-40.0	Maduración del virus?, Anticuerpos protectivos	Forma asociada a membrana y secretada; dímero; antígeno C1	S	L?	3.4	-7	NO?	SI
NS2A	23.7-25.4	Maduración de NS1	Hidrofóbico; poco conservada	L?	DC	5.6	+9	?	NO
NS2B	13.8-14.5	Asociada a membrana; componente replicasa/proteasa	Hidrofóbico; poco conservada	DC	DC	5.4	-1	?	NO
NS3	68.5-69.5	Proteasa, helicasa	Dominio suina-proteasa; Motivo de enlace N1P; muy	DC	DC	3.9	0	NO	NO
NS4A	16.0-16.4	Componente de replicasa asociada a membrana	Hidrofóbico; poco conservada	DC	S	5.6	-2	?	NO
NS4B	26.5-27.9	Componente de replicasa asociada a membrana	Hidrofóbico; poco conservada	S	DC	4.9	+3	?	NO
NS5	100-104	RNA polimerasa	Motivo GDD; muy conservada	DC	N/A	3.9	+14	NO	NO

C = Corte después de residuos dibásicos en citoplasma, DL = Corte después de residuos dibásicos en el lumen, L = Lumén, S = Señales del lumen, M = Meticionin amino-peptidasa celular, E1 porcentaje de hidrofobicidad esta dado por el contenido de Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Val, Trp, Tyr, I.e. Tomada de la referencia 20

involucrada en la unión del virus a los receptores celulares y a la fusión intraendosomal catalizada a pH ácido 22, se ha observado que la unión de dicha a los receptores de la superficie celular correlaciona con la susceptibilidad a la infección viral 23. Además, cuando se inducen mutaciones en ésta se ha visto afectada la virulencia 24, sugiriendo su participación en la unión del virus a los receptores celulares. La proteína E (P.M. de 53-63 kDa) que puede o no encontrarse glicosilada esta constituida por cerca de 500 aminoácidos en tres dominios: dominio I o central, dominio II o de dimerización y dominio III; la superficie lateral de este último (residuos 303-395), forma un módulo semejante al del extremo carboxilo terminal de inmunoglobulinas (IgG), y dentro de él existe una secuencia consenso de tres aminoácidos R-G-D (Arg-Gli-Asp), residuos que parecen estar implicados en la virulencia y en la unión del virus a los receptores celulares 24, 25, 26.

II.1.2 Organización del genoma viral y procesamiento postraducciona

El genoma del DEN consta de 10 723 nt, en su extremo 5' tiene un cap de tipo 1 y una región no traducida de aproximadamente 98 nt, el extremo 3' la región no traducida consta de 454 bases y carece de cadena de poli(A). La secuencia restante corresponde al marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína de 3 386 aminoácidos (NH₂-C--prM--M--E--NS₁--NS_{2A}--NS_{2B}--NS₃--NS_{4A}---NS_{4B}--NS₅-COOH) (Figura 3) 27, una parte (NS_{2A}, NS_{2B}, NS₃, NS_{4A}, NS_{4B} y NS₅) es procesada en el citosol y otra (C,prM/M, E y NS₁) en el lumen del retículo endoplásmico (RE) por peptidasas señal celulares y por proteasas virales (Figura 4) 28. La forma como se lleva a cabo dicho procesamiento se desconoce aunque se ha postulado un modelo (Figura 5) para la parte del procesamiento que se realiza en el RE 29, inicia con el reconocimiento de la secuencia señal en prM por una ribonucleoproteína citoplásmica llamada partícula de reconocimiento señal (SRP) para que luego la proteasa NS₃ (codificada por el virus) catalice el corte en el péptido señal de prM y subsecuentemente sea liberada al citoplasma la proteína de la cápside (C). La interacción de la secuencia señal de prM con SRP también induce la apertura de un canal acuoso que probablemente esta constituido por Sec 61p denominado complejo heterotrimérico. El canal es necesario para que la secuencia señal de prM pueda acomodarse a lo largo de la membrana desde el citoplasma hacia el RE hasta llegar al lumen. Posteriormente se une formando un asa que permite al polipéptido de prM acomodarse de manera paralela a lo largo de la membrana pero ahora desde el lumen del RE hacia el citoplasma, dicho acomodamiento da como resultado que el extremo amino terminal de la señal permanezca del lado citoplásmico de la membrana del RE y deje expuesta la señal de prM hacia el lumen para que cuando corte la enzima señal peptidasa, deje el extremo amino terminal del

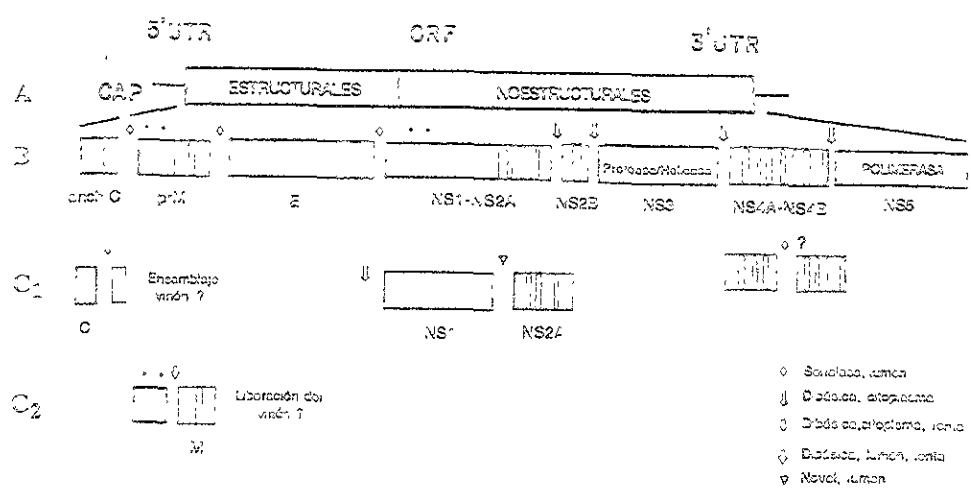


Figura 3. Organización del genoma de los *Flavivirus*. A: genoma viral con las regiones que codifican para las proteínas estructurales y no estructurales, el CAP en el extremo 5' y la región no traducida (UTR) de los extremos 3' y 5'. B: genes de las proteínas estructurales (C, M y E) y no estructurales (NS1-5). C₁ y C₂: modificación postranscripcional de las proteínas maduras. Las zonas oscuras señalan las regiones formadas con aminoácidos no cargados. * sitios probables de N-glicosilación. Tomada de las referencias 21 y 28.

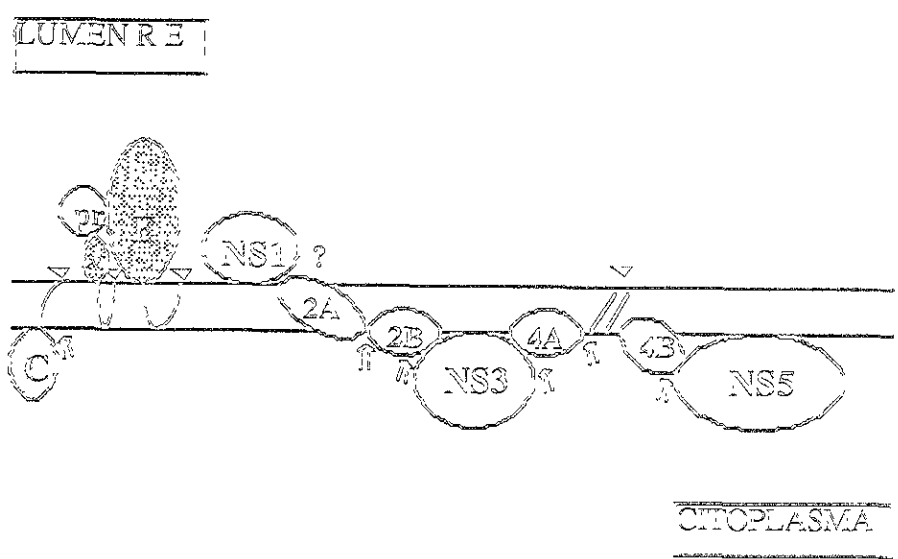


Figura 4. Conformación de las proteínas de los *Flavivirus* en el retículo endoplásmico (RE). prM-E-NS1 queda en el RE y NS2A-NS5 en el citoplasma. Las proteínas son colocadas de izquierda a derecha de acuerdo a su colocación en el precursor. (∥) segmentos hidrofóbicos procesados por señalasas del hospedero. (▽) procesado por la serina-proteasa viral. (?) procesado por proteasas no identificadas. Tomada de la referencia 28

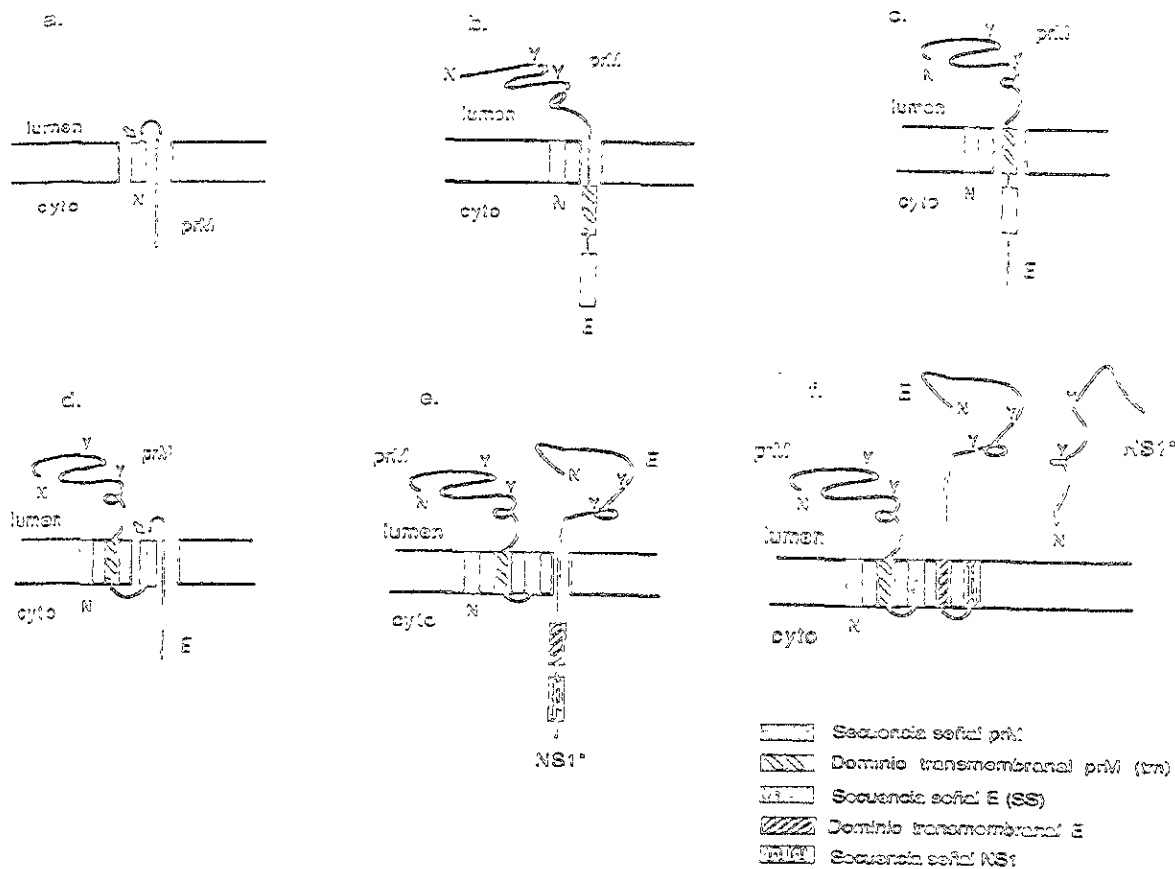


Figura 5. Procesamiento del polipéptido que codifica para prM-E-NS1. La membrana del retículo endoplásmico (RE) se muestra separando la región del lumen de la del citoplasma. a. Una vez reconocida la secuencia señal de prM se abre un canal acuoso y el extremo amino terminal (N) de la señal permanece del lado citoplásmico de la membrana, posteriormente se inicia la translocación de prM a través del canal acuoso formando un doblez. La enzima señal-peptidasa, corta en la secuencia señal de prM (\downarrow), liberando N de la proteína procesada en la membrana intralumen. b. El ectodominio principal de prM se transloca y diglicosila (Y) y el péptido señal prM se incorpora a la membrana lipídica. c. El dominio transmembranal (tm) de prM interrumpe transitoriamente la translocación de prM, al ponerse en contacto con el canal acuoso (interacción poco estable que impide la integración de prM a la membrana). d. La secuencia señal de E en este momento es reconocido llevándose a cabo la integración estable de prM Markoff y cols.²⁹ proponen que se requiere la apertura de un segundo canal acuoso para que se efectue la translocación a través del mismo canal formando un doblez de la proteína E naciente. El extremo carboxilo terminal de prM es incorporado a la membrana con orientación hacia el lado citoplásmico (\downarrow indica el sitio de corte de la enzima señal-peptidasa en la secuencia señal de E). e. Término de la translocación del ectodominio principal de E. El extremo carboxilo terminal de prM se gira hacia el ambiente lipídico de la membrana, E es diglicosilada (Y) y el corte de E-SS se lleva a cabo liberando el extremo amino terminal de E. f. El dominio transmembranal en E interrumpe transitoriamente la translocación de E. El reconocimiento subsecuente de la señal NS1* tiene como resultado la integración estable de E en la membrana, la translocación de NS1* vía un tercer canal acuoso, el corte en la secuencia señal NS1* y la glicosilación de la proteína NS1* como carece del dominio de anclaje a la membrana, se encuentra libre en el lumen del RE. NS1* es la proteína truncada del aminoácido 5166 en adelante. Tomada de la ref. 29.

de prM hacia este lado (Figura 5a). La fijación del péptido señal de prM a la membrana es inmediata después de su acomodamiento. Mientras en el lumen se lleva a cabo la translocación del ectodominio principal de prM así como una doble glicosilación sobre ella (Figura 5b). La translocación de prM a lo largo de la membrana y hacia el lumen del RE se interrumpe transitoriamente cuando el péptido comprendido entre los residuos 243-263 denominado como dominio transmembranal *tm* de prM (con residuos hidrofóbicos), se pone en contacto con el canal acuoso (Figura 5c). Esta interacción no es suficiente para el anclaje del dominio transmembranal de prM a la membrana, entonces gira formando una asa que permite al polipéptido de la secuencia señal de E acomodarse de manera paralela a lo largo de la membrana desde el citoplasma hacia el lumen del RE. La secuencia señal de E es reconocida para llevar a cabo la integración del dominio transmembranal de prM a la membrana (probablemente por la apertura de un segundo canal acuoso) de manera que el carboxilo terminal de prM queda incorporado a la membrana orientado hacia el lado citoplásmico. Aquí mismo queda expuesta la señal de E hacia el lumen para que corte la enzima señal peptidasa y la proteína E naciente pueda ser traslocada (Figura 5d). El carboxilo terminal de prM sufre un giro dentro del ambiente lipídico de la membrana, al mismo tiempo la proteína E es diglicosilada y cortada (en la señal) liberando el extremo amino terminal dentro del RE para que posteriormente se lleve a cabo la traslocación del ectodominio principal de la proteína E (Figura 5e). El dominio transmembranal de E interrumpe transitoriamente la translocación de E, el reconocimiento de la secuencia señal de NS₁ tiene como resultado la integración estable de la proteína E en la membrana; la translocación de la secuencia señal NS₁ vía un tercer canal acuoso, el corte en la secuencia señal de NS₁ (carente de dominio de anclaje a membrana) y la glicosilación de la proteína NS₁ provocan su liberación hacia el lumen del RE (Figura 5f). La ruptura proteolítica de este precursor prM es realizada por una proteasa celular para producir la proteína M, prM, mientras que E y NS₁ son traslocadas, cortadas y glicosiladas después del eficiente reconocimiento del amino terminal del péptido señal prM. En el citoplasma el procesamiento de las proteínas no estructurales se lleva a cabo mediante rompimientos que siguen la organización topológica del precursor (NS₁, NS_{2A}, NS_{2B}, NS₃, NS_{4A}, NS_{4B} y NS₅) 29.

11.2 Sistemas de replicación e infección del Virus Dengue

La aparente diversidad en el tropismo celular del DEN en sistemas *in vivo* también es observada en sistemas *in vitro*. El DEN se replica en una gran variedad de cultivos primarios y cultivos celulares continuos derivados de muchos tejidos de mamíferos, aves y artrópodos. Entre los sistemas *in vivo* se encuentran los ratones lactantes inoculados intracerebralmente, mosquitos adultos

inoculados en tórax y larvas ¹⁰. Entre los sistemas *in vitro* dentro de los cultivos primarios están los de células de SNC de embrión de ratón ³⁰ y cultivos frescos de monocitos ³¹, mientras que entre los cultivos celulares continuos, las células LLC-MK2, C636, TRA 284, VERO, HepC2, NIE-115 y SK-N-SH ^{10, 16, 32, 33}.

La presencia de receptores tejido específico sobre la superficie celular puede influenciar el tropismo celular. A estos receptores tejido específico se les ha denominado receptores virales.

II. 3 Receptores virales

Los receptores virales son un grupo de moléculas de naturaleza química diversa que determinan, en gran medida, la patogénesis de las enfermedades causadas por virus, es aceptado que la presencia del receptor viral en la membrana celular le confiere a ésta la susceptibilidad a la infección ^{34, 35, 36}. Entre los receptores virales aquellos de naturaleza protéica son los más relevantes ya que en primer lugar, podrían explicar fenómenos como el de la dependencia de la infección con el grado de diferenciación celular o bien los efectos de diversos estímulos extracelulares en la sensibilidad celular a la infección, por el hecho de que la expresión de proteínas este sujeta a diversos tipos de regulación; en segundo lugar, porque podrían provocarse fenómenos como la inducción de la proliferación y la modificación selectiva del patrón de expresión genética como consecuencia de una modificación del metabolismo de la célula por efecto de las señales de transducción originadas por la interacción del virus con su receptor.

El estudio de los receptores virales se ha desarrollado de manera significativa gracias a técnicas novedosas como el bloqueo de la adherencia viral o infectividad con anticuerpos monoclonales contra antígenos de la superficie celular, la transferencia del gene para un receptor putativo a una línea celular que no es permisible a la infección viral para demostrar que las células reestablecen el gene que le confiere la capacidad para unir al virus y ser infectadas por éste, gracias a esto se ha podido descubrir nuevos receptores, identificar el sitio de enlazamiento del virus e inclusive determinar las funciones normales del receptor ^{35, 36, 37}. Así se han identificado moléculas como la Hemaglutinina (HA, que contiene residuos de ácido siálico) como el receptor para el Virus de la Influenza ³⁸, la glicoproteína CD4 para el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), el transportador de aminoácidos catiónicos (CAT) para el virus de la Leucemia Murina Escotópica (MLV-E), a los transportadores de fósforo inorgánico Ram. 1/ GLVR 2 y GLVR 1 para el Virus Amfotrópico de la Leucemia Murina (MLV-A) y los Virus B de la Leucemia Felina (FeLV-B) y del mono Gibón (GALV) respectivamente, ^{36, 39, 40}, a la molécula de adhesión celular ICAM-1 para Rhinovirus y al miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas receptor para el Poliovirus ³²,

de los cuales se conoce la topología de la molécula e inclusive en algunos de ellos se ha identificado el sitio de unión primaria del virus (Figura 6). En la tabla III se muestran ejemplos de receptores virales que no se han identificado completamente como es el caso de la proteína CD₂₁ de los linfocitos B que funciona como receptor de C3b de complemento, misma que es utilizada por el Virus Epstein-Barr, de la que se desconoce la topología de la molécula y el sitio de unión primario 41, así mismo del receptor para el Virus de la Coriomeningitis Linfocítica (LCMV) solo se conoce que es una proteína de un peso molecular entre 120 y 140 kDa 42. Varios aspectos generales son evidentes. Miembros de la misma familia de virus no necesariamente tienen receptores similares ni en la topología de la molécula ni en su naturaleza química. Algunos virus se unen a proteínas, otros a carbohidratos y algunos otros a ambos. Muchos de los receptores virales tienen funciones de reconocimiento y adhesión celular, tales como CD4 e ICAM-1 otros con múltiples segmentos transmembranales funcionan como moléculas transportadoras. Así el receptor para MLV-E es un transportador de aminoácidos catiónicos (CAT) como Arginina, Lisina y Ornitina el cuál funciona independientemente de Na⁺, el receptor Ram-1/GLVR 2 y GLVR-1 para MLV-A y para GALV y FeLV-B respectivamente ambos son transportadores de fósforo inorgánico (P_i) cuya función es dependiente de Na⁺ 36.

A nivel del SNC y en particular entre neuronas participan receptores que son activados por cambios en el potencial de membrana debidos a la alteración en la concentración de K⁺ y Na⁺. Así se han descrito receptores para neurotransmisores como la acetilcolina y los receptores β-adrenérgicos 43, que se han identificado como proteínas a las cuales se unen respectivamente el Virus de la Rabia 44, 45 y el Reovirus tipo 3 46. Recientemente se ha determinado como receptor del Virus de la Encefalitis Equina Venezolana a una proteína de 32 kDa que está unida a laminina 47. Lo que sugiere fuertemente que los virus neurotrópicos pueden unirse a receptores que están expresados sobre células neuronales.

Para algunos virus se ha propuesto el reconocimiento de receptores adicionales que parecen conferirles formas alternas de entrada a las células blanco 28, 45. Ejemplos de ello son: HIV, que reconoce a la glicoproteína CD4 48 y a la galactosil ceramida 49 y el Adenovirus tipo 2 se unen a un receptor para las proteínas fibrosas y también al de las integrinas α_vβ₃α_vβ₅ 35.

Existen evidencias de que un mismo receptor puede estar expresado en varios tejidos lo que permite explicar porque algunos virus neurotrópicos pueden replicarse tanto en tejido neural como extraneural 28. El virus de la polio puede replicarse tanto en neuronas como en células del tracto intestinal ya que su receptor (un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas) se encuentra

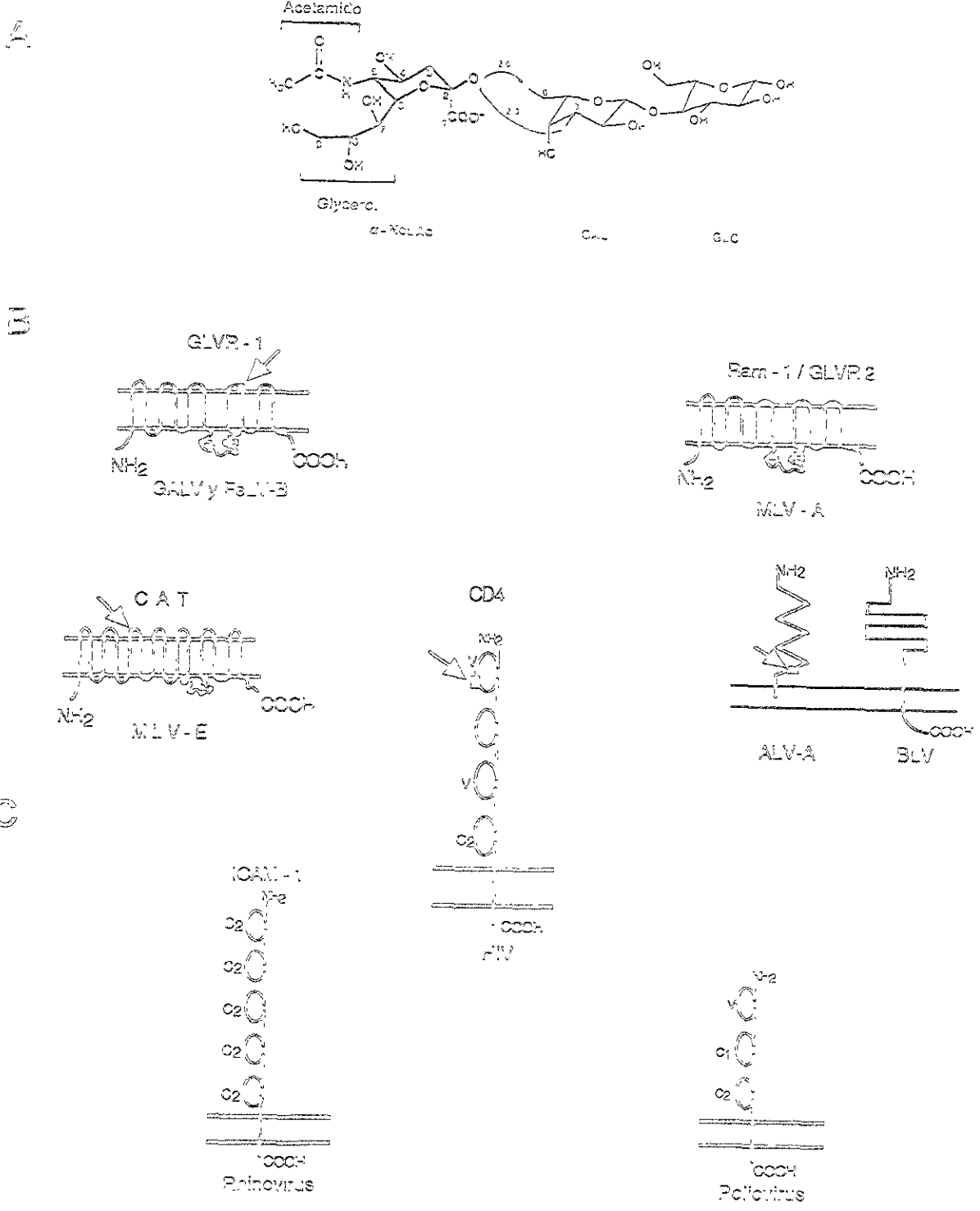


Figura 5. Configuración molecular de algunos receptores virales. Panel A: Acido salicílico de la nemaglutinina receptor para el Virus de la influenza. Panel B: Proteínas receptores para algunos *Retrovirus* (GALV, FeLV-B, MLV-A, MLV-E, HIV, ALV-A y BLV). Panel C: Proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas receptores para miembros de diferentes géneros. Tomada y modificada de las referencias 13 y 25.

GLVR-1: Proteína Pit1-Receptor para GALV; Ram-1: receptor para el *Retrovirus* amotrópico murino. GLVR-2 Proteína Pit2-Receptor para el *retrovirus* amotrópico Moloney; CAT: transportador de aminoácidos catiónicos.

Tabla III. Algunas propiedades biológicas de las proteínas celulares que usan los virus como receptores.

Nombre	RECEPTOR	Peso Molecular en kDa	Función Celular
virus del bosque Semliki (SFV)	H2(KD)/HLA(A,B)	44	Reconocimiento celular
Citomegalovirus humano (HCMV) ¹	β_2 -Microglobulina	12	Reconocimiento celular
virus Visna	La	30/33	Reconocimiento celular
virus del Sarampión	CD46	58-68	Activación de complemento
virus de la hepatitis Murina (MHV)	Antígeno Carcino- embrionario	110	Antígeno de diferenciación
Reovirus 3	Receptor β -Adrenérgico	67	Receptor para Noradrenalina
virus Vaccinia	EGF-R	180	Receptor para EGF
virus de la leucemia murina, cepa Friend (F-MuLV)	EPO-R	62/64	Receptor para Eritropoyetina
virus de la hepatitis B (HBV) ²	Ig A-R	80	Receptor para Ig A
virus Sindbis ³	Receptor de alta afinidad para laminina	67	Receptor para matriz extracelular
Coronavirus humano (HCV)	Aminopeptidasa N	150	Ecto-enzima
virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)	desconocido	120/140	desconocida
virus de la encefalomiелitis de Theiler (TMEV)	desconocido	34	desconocida
virus de la leucemia felina A (FeLV-A)	desconocido	135 a 140	desconocida
Adenovirus	desconocido	34/42/78	desconocida
virus Coxsackie ⁴	R ₂ - a ⁴	50	desconocida
Poliomavirus	desconocido	95/50	desconocida
virus de la diarrea viral bovina (BVDV)	desconocido	50	desconocida
virus de la leucemia de células T humanas, serotipo 1 (HTLV-1)	desconocido	31 a 70	desconocida

Se ha determinado otro receptor con peso molecular diferente. 1. En fibroblastos humanos de 30/34 kDa, 2. En hepatocitos humanos de 30 kDa, 3. En células neurogénicas de 74/100 kDa, 4. En células HeLa de 275 kDa. ⁴ Designación de los autores, se desconoce la identidad celular. Tomada y modificada de la referencia 30

expresado en dichas células 35, 50.

También se han descrito receptores de baja afinidad o correceptores, los cuales son moléculas ubicuas presentes en muchos tejidos, cuya función principal parece ser concentrar a los virus sobre la superficie celular así como participar en la unión del virus al receptor de alta afinidad. Se ha pensado que durante este proceso los virus se unen débilmente a los correceptores y al encontrarse cerca del receptor de alta afinidad se llevan a cabo cambios conformacionales en el virus y/o en el correceptor que facilitan al virus su unión con el receptor de alta afinidad. Así, se ha determinado que la manosa 6 fosfato es el correceptor para el Virus Varicela-Zoster 51 y el herpes simple 52, 53. Para el DEN, se ha postulado la presencia de una diversidad de receptores, debido a su capacidad para replicar tanto en células de vertebrados como de invertebrados 10. A la fecha, para el vector se han identificado como receptores a dos glicoproteínas, de 40 y 45 kDa 52, y a un polipéptido de 80 kDa 54, en células C6/36 y a un polipeptido de 67 kDa en células de intestino del mosquito *Aedes albopictus* 54.

Por lo que respecta al hospedador, estudios realizados por el grupo de Chen, han mostrado que una molécula ubicua del tipo heparán altamente sulfatado es el receptor para el DEN 17, aunque no definen si esta molécula es la única requerida para la infección viral 55. Recientemente se ha identificado a una proteína de 65 kDa en células de neuroblastoma de ratón (N1E-115) y de humano (SK-N-SH) 12 sin que se halla determinado si es el receptor completo o es una parte del complejo receptor.

11.4 Receptores neuronales

El crecimiento, diferenciación y división celular en general está profundamente influenciado por interacciones célula-célula. En el SNC la interacción entre las propiedades intrínsecas al linaje neuronal y las señales extracelulares producidas por otras células parece regular los procesos del desarrollo, incluyendo la proliferación, migración y las características de diferenciación celular. Las neuronas en particular tienen como tarea fundamental recibir, conducir y transmitir señales mediante el mecanismo denominado transmisión sináptica, que es de dos tipos: eléctrica y química 56. La transmisión eléctrica es la vía más común que emplea la neurona, aunque puede utilizar también el acoplamiento eléctrico directo a través de uniones comunicantes. Dicho mecanismo tiene la ventaja de que la transmisión ocurre sin demora y la desventaja de que no puede ejercer control sobre la sinapsis 56. En la transmisión sináptica química, la despolarización de la membrana presináptica (consecuencia del influjo de Ca^{2+} , provocada por la apertura de canales dependientes de voltaje) dispara la liberación exocítica del neurotransmisor almacenado en vesículas sinápticas.

El neurotransmisor difunde a través de la hendidura sináptica y se une a proteínas receptoras en la membrana postsináptica; es rápidamente removido por degradación enzimática o por difusión y/o captura en las terminales nerviosas o células gliales circundantes. Este mecanismo permite la regulación del proceso de neurotransmisión sináptica 56.

II. 4. 1 *Clasificación y Activación*

La comunicación interneuronal ocurre por medio de neurotransmisores, activando receptores que, en general, pertenecen a dos grandes familias:

(1) Receptores ionotrópicos, los cuales son canales iónicos, (2) Receptores metabotrópicos, que son receptores acoplados a proteínas G. Una gran cantidad de ellos han sido identificados y clasificados (Tabla IV) 43.

Los canales iónicos abiertos por ligando, están involucrados en la señalización sináptica rápida en células eléctricamente excitables. Son proteínas multiméricas complejas, formadas por varias subunidades que se ensamblan entre sí para formar el canal. Se activan por unión de un neurotransmisor a una o varias subunidades, la(s) cual(es) sufren cambios conformacionales que abren el canal, permitiendo la entrada rápida de iones, lo que cambia el estado de polarización de la membrana postsináptica. Se han clonado los canales iónicos de apertura por ligando para acetilcolina, GABA, glutamato, glicina y serotonina 43.

Los receptores acoplados a proteínas G, son proteínas monoméricas que contienen siete segmentos transmembranales. Son activados por neurotransmisores clásicos, neuropéptidos, hormonas peptídicas y por varias opsinas y sustancias odorantes. La unión al receptor induce la activación de enzimas como la adenilato ciclasa, fosfolipasa A₂, C β o directamente de un canal iónico dependiente de voltaje, lo cual da lugar a un incremento en los niveles de segundos mensajeros como el AMP cíclico (AMP_c), iones de calcio (Ca²⁺) y diacilglicerol (DAG), que a su vez activan a sus cinasas blanco que respectivamente son la cinasa de la proteína dependiente de AMP_c (PKA), la cinasa de la proteína dependiente de calcio-calmodulina (CaM cinasa) y la cinasa C de proteína (PKC). Estas últimas tendrán efectos tanto sobre proteínas de citoesqueleto como también sobre factores de transcripción e incluso la maquinaria de transcripción celular para la expresión de genes tempranos 57, 58, 59. Se han clonado más de 200 diferentes receptores acoplados a proteínas G entre los que se encuentran el de trombina, histamina H1 y H2, vasopresina VIA, V2, bradiquinina BK-2 (Tabla IV) 43.

En otras células animales así como en oligodendrocitos y astrocitos se ha identificado un tercer grupo de receptores. Los receptores de muchos factores de crecimiento y diferenciación, los cuales

Tabla IV. Clasificación de los neuroreceptores.

RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G

Acetilcolina muscarínico M1, M2, M3, M4, M5	
Adrenérgico α 1A, α 1B, α 1C, α 2A, α 2B, α 2C, β 1, β 2, β 3	
Adenosina A1, A2A, A2B, A3	Angiotensina II AT1A, AT2B
Bradiquinina BK-2	Bombesina BRS-3
CSA anafilotoxina quimiotáctica	Calcitonina CT-R-A,B
Canabinoide AMP _c	Gastrina/Celocistocinina CCK-A,B
C-C Quimocina CKR-i	CRH
Dopamina D1, D2, D3, D4, D5	Endotelina
FMLP R-I, II	FSH
Glucagon	GHRH
GnRH	Gastrina liberadora del péptido
Histamina H1, H2	IL-8
Lutropina LSH-R	Feromona P.M un factor
Mas protooncogen	MSH 1, 2, 3, 4, 5
Glutamato metabotrópico 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	Neurocinina 1, 2, 3
Neuromedina B	Neurotensina
NPY 1, 3	Octopamina
Olfatorio (>100)	Opióideo μ , δ , κ
Opsina azul, roja, verde y rodopsina	Oxitocina
PACAP	Postaglandina E
PTH EP2, 3	Secretina
Serotonina 5HT-1A, 1B, 1D, 1E, 1F, 2A, 2B, 3A, 3B, 6, 7	Tromboxano A2
Somatostatina 1, 2a, 2B, 3, 4, 5	TR3
Trombina	Vasopresina V1A, V2
TSH	
VIP	

Huérfanos: EDG-1, G 1CD, Glucocorticoides induciendo GPCR de células T, R334, RTA, UL33, US27, US28, C3, ECRF3, ZK643, 3 EBV inducida por GPCR EB11, 2 del linfoma GPCR de Burkitt, GPCR activador plaquetario.

CANALES IONICOS ABIERTOS POR LIGANDO (41)

Acetilcolina α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, β 1, β 2, β 3, β 4, γ , δ y ϵ		
GABA α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α 6, β 1, β 2, β 3, γ 1, γ 2, γ 3, δ , ρ 1 y ρ 2		
Glutamato NR1, 2A, 2B, 2C, 2D, GluR1, 2, 3, 4		
Glicina α 1, α 2, α 3	GMP _c	Serotonina 5-HT-3

poseen actividad intrínseca de tirosina cinasa y generalmente son de un solo segmento transmembranal. Al ser activados se dimerizan y transfosforilan, iniciando así varias vías de señalización que involucran la fosforilación en residuos de tirosina de sus proteínas blanco, que a su vez activan a la PKC o a la cinasa de la proteína activada por mitógenos (MAPK) 60, 61.

II. 4. 2 Cascadas de señalización y expresión de genes tempranos

La culminación de las vías de señalización se lleva a cabo en el núcleo, con la activación de factores de transcripción que controlan la expresión de genes específicos. Así se han definido tres vías generales de señalización nuclear: (1) en la que las cinasas citoplásmicas activadas translocan al núcleo donde actúan sobre los factores de transcripción nuclear para aumentar la actividad de unión a DNA o las funciones de transactivación; (2) un factor de transcripción latente en el citoplasma que es activado por fosforilación directa y subsecuentemente translocado al núcleo y (3) liberación de factores de transcripción o de proteínas inhibitorias en el citoplasma que se activan por fosforilación para que puedan translocar al núcleo donde van a activar la expresión de genes (Figura 7) 62. Un ejemplo de gene de respuesta temprana cuyo control es a nivel transcripcional es *c-fos*.

II.4.2.1 Expresión de *c-fos*

El protooncogen *c-fos* se describió primero como un oncogen codificado por el Virus del Osteosarcoma Finkel-Biskis-Jenkins de ratón (FBJ-MSV), posee varios elementos que regulan su expresión que se localiza en la región 5' entre los que se encuentran el elemento responsivo a suero (SRB) localizado a -310 pb y funciona como un elemento activador inducible, se une a una proteína nuclear de 67 kDa llamada factor responsivo a suero (SRF) que forma parte de un complejo. Otro elemento que regula la expresión de *c-fos* se localiza a -60 pb es CRE el elemento responsivo a AMP_c, que se une a la proteína CREB y es activado por una CaM cinasa. El producto de la codificación de *c-fos* es una proteína de 62 kDa llamada FOS y funciona como un activador de la expresión de genes 63, 64. Se han descrito varios patrones de señalización que pueden inducir la expresión de *c-fos*, entre los que se encuentran: PKC, PKA, CaM cinasa y las cinasas janus (JAK) (Figura 7) 65, 66, 67, 68, 69.

La familia JAK, son cinasas de tirosina no receptores, la integran hasta el momento Tyk2, JAK1, JAK2 y JAK3, éstas tienen como sustrato a las proteínas STAT, las cuales al ser fosforiladas se asocian y forman complejos heterodímeros u homodímeros con capacidad de translocarse a núcleo en donde se unen al DNA en el elemento de respuesta estimulados por IFN γ (ISRE) llamado SIE

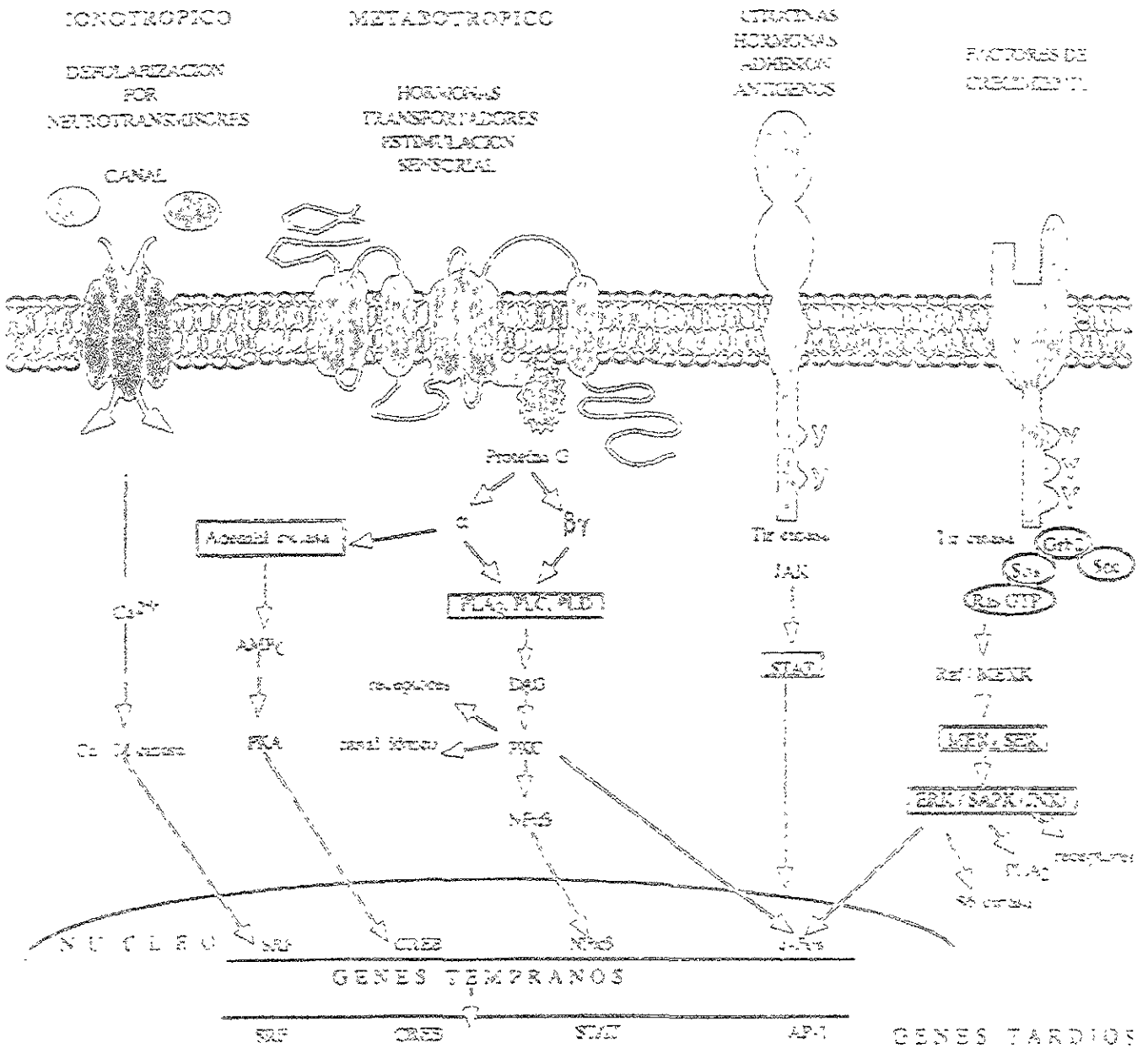


Figura 7 mecanismos generales de la transducción de señales que activan diferentes tipos de receptores. Los canales iónicos de apertura por ligando o receptores de voltaje están involucrados en la señalización sináptica rápida entre células excitables. Los receptores con actividad de tirosina cinasas (o fosfatas) junto con los receptores acoplados a proteínas G asociados a proteínas tirosina cinasas citoplasmáticas, usan diferentes mecanismos para la transducción de señales de la superficie celular que resulta en la activación de una cascada común de serina / tronina cinasas que son responsables de transmitir la señal generada hasta que la maquinaria transcripcional en le núcleo. Tomada y modificada de la referencia 62.

59, 70, 71, misma que se localiza en -100 a -50 pb, activando la respuesta a PDGF siendo blanco del factor inducible en *cis* (SIF) que es similar al factor de transcripción ISGF-3 72. Se han descrito secuencias SIF en las regiones promotoras de ciertos genes como: *c-fos*, FcγRI, la sintetasa de ácido nítrico tipo II 71, 73. También se ha demostrado que la vía de las proteínas STAT pueden ser reguladas tanto activando como inhibiendo transcripción por las MAPK 74.

11.4.2.2 *Expresión de c-jun*

El protooncogen *c-jun* también fue identificado como oncogen de otro virus, el del sarcoma del ave 17 (ASV-17), consiste de un sólo exón y tiene varios elementos en la región 5' que regulan su expresión: un elemento parecido a la caja TATA, la caja CAAT y entre estos dos elementos un sitio de unión AP-1, lo que sugiere que *jun* regula su propia transcripción, en la región 3' contiene varios poli(A) y secuencias ATTTA que indican que su RNA_m tiene una vida media corta. Este tiene una elevada homología con la secuencia de los aminoácidos de la proteína activadora transcripcional GCN4 de levadura de cerca del 44% en la región carboxilo terminal y codifica para la proteína JUN de 40 kDa que es capaz de formar homodímeros y unirse al DNA. El protooncogene *c-jun* junto con *jun B* y *jun D* forman una familia y entre ellos existe una elevada homología, tanto en el dominio activador de la transcripción como en el de unión al DNA^{63,64,75,76}. En células de mamíferos la familia de MAPK consta de miembros denominados cinasas que regulan las señales extracelulares (*extracellular-signal-regulated kinases*, ERKs), que son activadas por fosforilaciones en residuos tirosina o treonina. Se sabe que los sustratos de ERK son factores de transcripción, uno de estos es c-Jun, el cual es fosforilado en su sitio de transactivación serina 63 y 73. Otras isoformas de MAPK, parecen fosforilar a c-Fos bajo condiciones similares 60, 61. En tanto que JUN es fosforilada por JNK para inhibir la transcripción 77.

Las proteínas FOS y JUN funcionan directamente como reguladores de la transcripción al formar la proteína activadora 1 (AP-1) 58, 63, 64, 75, 77, 78. AP-1 es una familia de factores de transcripción conformados por homo y heterodímeros de las proteínas Jun (*v-Jun*, *c-Jun*, *Jun B*, *Jun D*), Fos (*v-Fos*, *c-Fos*, *Fos B*, *Fra 1* *Fra 2*) o factores activadores de la transcripción (ATF2, ATF3 / ERF1, B-ATF) los cuales activan la transcripción de genes que llevan a cabo funciones tales como proliferación celular y supervivencia. La actividad transcripcional se lleva a cabo una vez que el factor de transcripción se une al DNA en un sitio común consenso que es 5'-GATCCTTCGT-3'. La activación de AP-1 la llevan a cabo la PKC y las MAPK 59, 60, 77.

III. JUSTIFICACION

La capacidad neuropatogénica del DEN aún no está completamente entendida. En ratones se ha observado una selectividad del DEN para infectar neuronas inmaduras⁴⁵ y mayor severidad de la infección en etapas tempranas del desarrollo similar a la observada con el Virus de la Encefalitis Japonesa, otro miembro de la familia *Flaviviridae* que no ha sido estudiada. Lo anterior sugiere que algunos factores de maduración del SNC tienen un papel en la susceptibilidad; así mismo existe la posibilidad de que las moléculas de la superficie neuronal que actúan como receptores virales cambien con la edad⁷⁹. Estudios de infección con DEN en células de neuroblastoma de ratón N1E-115 han mostrado que una proteína de 65 kDa presente en la membrana de estas células es el receptor viral¹². Así mismo se ha observado que la interacción DEN-receptor neuronal provoca un incremento en la expresión de las proteínas sinaptofisina y neurofilamentos de alto peso molecular⁸⁰ y modificación en la expresión génica, consecuencia de la activación de cascadas de señalización por la unión del virus al receptor neuronal. Lo anterior hace pensar que el DEN puede actuar como un ligando tipo hormona, péptido o neurotransmisor. Ensayos de infección del DEN en neuronas, realizados por nuestro grupo, han mostrado la presencia de segundos mensajeros (Ca^{2+} , IP_3 y DAG) que activan a la PKC, lo que sugiere fuertemente que el DEN al unirse a su receptor neuronal induce cascadas de segundos mensajeros que activan dicha cinasa y es probable que active al factor de transcripción AP-1 a nivel nuclear, ya que PKC activa genes tempranos como *c-fos* (comunicación personal).

El presente trabajo analiza la infección del DEN 2 en neuronas de ratón durante el desarrollo del SNC y pretende: 1) demostrar que la susceptibilidad a la infección la confiere un receptor neuronal, 2) dar una explicación de por qué existe mayor severidad de la infección en etapas tempranas del desarrollo y 3) evidenciar la activación del factor de transcripción AP-1 a nivel nuclear, como consecuencia de la unión del DEN a su receptor neuronal.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer la ontogenia del receptor neuronal para el Virus Dengue serotipo 2 en sistema nervioso central de ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estandarizar las condiciones para el ensayo de unión del virus en fase sólida con el Virus Dengue serotipo 2 utilizando preparaciones membranales de neuronas de ratón Balb/c de 3 días postnatales.
2. Establecer el patrón de expresión del receptor neuronal para el Virus Dengue 2 en ratones Balb/c durante el desarrollo.
3. Determinar la unión a DNA del factor de transcripción AP-1 durante el desarrollo del SNC del ratón después de la infección con Virus Dengue 2.
4. Correlacionar el patrón de expresión del receptor neuronal para el Virus Dengue 2 con la funcionalidad del mismo en las células susceptibles a la infección.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para determinar la ontogenia del receptor neuronal para el Virus Dengue 2 se diseñaron dos tipos de experimentos, ensayos de unión del virus en fase sólida (*Virus Overlay Protein Blot Assay*, VOPBA) y ensayos de retardamiento de entrada al gel (*Electrophoretic Mobility Shift Assays*, EMSA)

El primer acercamiento se llevó a cabo con proteínas membranales de neuronas extraídas de cerebro de ratones de la cepa Balb/c de 5, 3 y 1 días prenatales y de 1, 3-10, 12, 14, 17 y 76 días postnatales, separadas electroforéticamente en condiciones desnaturizantes y transferidas a membranas de nitrocelulosa. El ensayo de unión del virus en fase sólida, consistió en exponer las membranas con DEN 2, antiDEN, antiIgG acopiada a peroxidasa; la inmunorreacción anterior fue detectada empleando un sistema de quimioluminiscencia que se registró sobre película Kodak X-Omat. A los polipéptidos inmunopositivos de nuestro interés se les hizo un análisis densitométrico. Dicho ensayo nos permitió determinar la expresión de la proteína receptor neuronal para el Virus Dengue 2 durante el desarrollo del SNC, aunque nos faltaba establecer un correlato funcional del receptor en las células susceptibles.

Para determinar si durante el desarrollo del SNC el receptor neuronal, transduce señales que llegan a promueven la unión al DNA del factor de transcripción AP-1 en el núcleo, una vez que el Virus Dengue 2 interactúa con él, se llevaron a cabo ensayos de retardamiento de entrada al gel. En estos ensayos se utilizaron extractos crudos nucleares de células neuronales de ratones de 1, 3-8 y 76 días postnatales infectadas con el Virus Dengue 2 y un oligonucleótido de doble cadena con una secuencia consenso del factor de transcripción AP-1 marcado con [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP. El complejo DNA-proteína formado en el gel de poli(acrilamida) no desnaturizante fue detectado sobre película Kodak X-Omat. A las bandas correspondientes a los complejos se les hizo un análisis densitométrico.

VI. MATERIALES Y METODOS

VI. 1 Virus

Se utilizó la cepa prototipo Nueva Guinea C del serotipo 2 del Virus Dengue (DEN 2 NCC), obtenida del suero de un paciente con Dengue Clásico durante la epidemia de 1944 en Nueva Guinea, proporcionada por el Dr. Celso Ramos del INSP. Los virus se pasaron dos veces en cerebro de ratón recién nacido, se propagaron en células de mosquito TRA-284; la purificación se llevó a cabo utilizando un gradiente discontinuo de sacarosa (20 % y 50 %) el virus se recuperó de la interfase y posteriormente fué titulado mediante la técnica de placa lítica en células LLC-MK281. Las soluciones con título de virus de 1.6×10^7 pfu / ml (solución concentrada de DEN 2) fueron alicuotadas y almacenadas hasta su uso a -70°C . También se usaron diluciones 1 : 100, 1 : 500 y 1 : 1 000 a partir de dicha solución.

VI. 2 Animales

Se emplearon ratones de la cepa Balb/c de 5, 3 y 1 días prenatales, de 1, 3 a 10, 12, 14, 17 y 76 días postnatales. Se usaron 3 lotes de 270 animales en promedio. Los animales se sacrificaron por decapitación para diseccionar el cerebro y congelados se guardaron a -70°C hasta su uso.

VI. 3 Células

Se usaron las líneas celulares N1E-115 de neuroblastoma de ratón y J774 de macrófagos de ratón como control positivo y negativo respectivamente. Las células se cultivaron en D-MEM (Gibco, Gaithersburg, MO) suplementado con 20 mM HEPES, 10% Suero Fetal Bovino y 1% Penicilina - Estreptomicina; las células N1E-115 fueron suplementadas con 10% suero de caballo.

VI. 4 Anticuerpos

Se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal 3H5, específico para el Virus Dengue serotipo 2 (antiDEN 2) donados por el Dr. Celso Ramos y como anticuerpo secundario el conjugado de anticuerpos de cabra contra IgG de ratón acoplada a peroxidasa de rábano (antiIgG*) (Bio-Rad, Laboratories).

VI. 5 Preparados membranales

El tejido cerebral se descongeló y se lavó con PBS pH 7.2 (2.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 138 mM NaCl, 8.1 mM Na_2PO_4) posteriormente se agregaron 19 volúmenes de una solución 0.32 M de sacarosa, 5 mM EDTA y 1 mM de fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) para lizar las células por efecto mecánico con ayuda de un politrón, la suspensión celular obtenida se centrifugó a 10000 x g por 10 min para obtener el sobrenadante que inmediatamente se centrifugó a 45000 x g durante 15 min a 4°C. La pastilla con las proteínas membranales se resuspendió en una solución amortiguadora de Tris pH 7.4 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF) según Tokans y Staehelin⁸². Posteriormente se determinó la concentración de proteínas mediante el micrométodo de Bradford⁸³, la solución membranar se distribuyó en alícuotas y se guardaron a -70°C hasta su uso.

VI.6 Ensayo de unión del virus en fase sólida (*Virus Overlay Protein Biot Assay*, VOPBA)

Los preparados membranales de extractos totales de tejido cerebral de ratón se hirvieron en una solución amortiguadora (para obtener concentraciones finales de 2% SDS, 62.5 mM TRIS-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 5% de 2-mercaptoetanol y 0.001% azul de bromofenol) de las cuales 30 µg de proteínas totales por carril fueron separadas mediante electroforesis en gel preparativo o no-preparativo de poliacrilamida al 10% y/o 7.5% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)⁸⁴. Posteriormente las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa según la técnica descrita por Towbin y Staehelin⁸⁵. La membrana se tiñó con Rojo de Ponceau S para verificar que la cantidad de proteína cargada y transferida fuera igual en todos los carriles. La membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas fue bloqueada con una solución amortiguadora de TRIS-HCl pH 7.4 (50 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA); 5% leche descremada y 0.1% Tween 20 en agitación por 2 h a 37°C. Se lavó tres veces con PBST pH 7.4 (10 mM PBS, 0.2% de Tween 20). Posteriormente se incubó a 4°C durante toda la noche con el virus. Al término de este tiempo de incubación, la membrana se lavó 6 veces por 10 min; haciendo los tres primeros con PBST pH 7.4, 1% leche descremada y los 3 restantes con PBS pH 7.4 (10 mM, 1% leche descremada) incubándose con el anticuerpo primario (antiDEN) durante una hora a 37°C después del cual se lavó como previamente se indicó. Finalmente, se incubó con el anticuerpo secundario (antiIgG*) durante una hora a 37°C y nuevamente se lavó de la manera descrita. La inmunorreacción llevada a cabo sobre la membrana de nitrocelulosa fue detectada mediante el sistema ECL (Amersham Pharmacia, Biotech.), método no radiactivo para la detección de

antígenos específicos inmovilizados, los cuales forman un complejo antígeno-anticuerpo primario-anticuerpo secundario, este último marcado con peroxidasa de rabano, que por la oxidación del sustrato luminol (diazilhidrazida) en presencia del peróxido y la peroxidasa de rabano da un producto excitado que emite luz, capturada sobre una película radiográfica Kodak X-OMAT, la inmunoreactividad de las bandas de 65 kDa se cuantificaron, empleando el programa ZeroDscan del densitómetro Eagle Eye II, Stratagene. Los valores obtenidos de densidad óptica se procesaron con ayuda del programa Prisma Graph Pad. Los resultados presentados son el producto de por lo menos tres experimentos independientes.

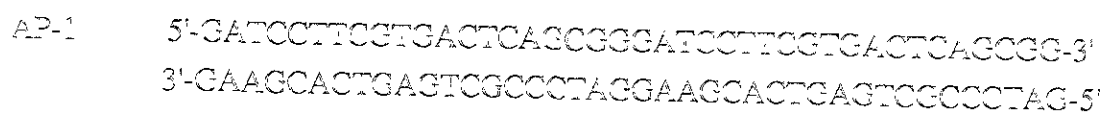
VI. 7 Preparación de extractos nucleares

El tejido cerebral recién disecado se disgregó suavemente pasándolo a través de agujas de diferentes calibres, las células se resuspendieron en PBS, contarón y se ajustaron a una densidad de 5.0×10^5 células/ml, las cuales se infectaron con una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0.1 de la solución concentrada del DEN 2 (1.3×10^7 pfu/ml) y se procesaron según la técnica de Dignam, modificada por Schaffner⁸⁵ para obtener sus extractos nucleares. Dicha técnica consiste en obtener el paquete celular después de haber lavado con PBS frío y centrifugar 5 minutos a 2000 rpm en una centrífuga clínica. El botón se resuspendió en 400 μ l de la solución tampón A fría HEPES-HCl pH 7.9 (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, PMSF 0.1 mM, DTT 0.1 mM, 0.5 μ l/ml mezcla de inhibidores de proteasas (IP) 4 mg/ml [aprotinina, leupeptina, pepstatina], 1 mM Na_2MoO_4). La suspensión se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se mantuvo en hielo por 15 minutos posteriormente se agregaron 25 μ l de una solución de NP-40 al 10% y se agitó en vortex violentamente por 10 segundos. La fracción nuclear se obtuvo centrifugando la muestra anterior por 30 segundos a 28000 x g en frío, el sobrenadante se retiró con ayuda de una bomba de vacío y al botón de núcleos se le añadieron 50 μ l de la solución tampón C fría (20 mM HEPES-HCl pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 mM PMSF, 2 μ l DTT 1 mM, 1 μ l/ml mezcla IP 4 mg/ml, 10 mM Na_2MoO_4). La suspensión de núcleos se agitó por 15 minutos a muy baja velocidad en frío, transcurrido este tiempo se obtuvo el extracto nuclear mediante centrifugación a 28000 x g por 5 minutos. Se descartó el botón, mientras que el sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo, se le determinó la concentración de proteína por la microtécnica de Bradford, se alíquotó y guardó a -70°C hasta su uso. Se usaron como control negativo células tratadas con PBS y como control positivo células con 12-o-tetradecanoilforbol-13 acetato (TPA) un potente activador de PKC el cual ejerce un efecto mitogénico e incrementa la actividad de unión a DNA de AP-1 en diversos tejidos celulares⁸⁷.

VI.8 Detección de la interacción DNA-proteína mediante ensayos de retardo de entrada al gel (*Electrophoretic Mobility Shift Assays*, EMSA)

El estudio de la respuesta funcional o la actividad de un receptor puede llevarse a cabo evaluando la interacción con secuencias consenso de DNA del factor de transcripción AP-1 por el método de retardo de entrada al gel (EMSA) 88. En este ensayo se utilizaron extractos crudos nucleares de las células a las que se ha unido el virus, un oligonucleótido de doble cadena con una secuencia consenso en este caso del factor de transcripción AP-1 y el complejo DNA-proteína que se forme será detectado en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante. El DNA al interactuar con proteínas modifica su movilidad, de tal modo que una secuencia unida a proteínas tiene una menor movilidad en el gel que una no unida a proteínas.

Se utilizó DNA con la secuencia consenso de unión para AP-1 TGACTCA marcada con fósforo radioactivo. La secuencia de los oligonucleótidos de doble cadena (dc) fué la siguiente:



El oligonucleótido fué marcado en el extremo 5' por fosforilación con $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ con la enzima T4 polinucleótido cinasa.

La reacción de unión proteína-DNA se llevó a cabo a 4°C y la mezcla de reacción consistió en: 10 µg de proteína del extracto nuclear, 1 µg/µl de poli(dIdC), 4mM de espermidina y 4 mM de MgCl_2 , el volumen se ajustó con la solución tampón D (20 mM HEPES pH 7.9, 60 mM KCl, glicerol al 20%, 0.25 mM EDTA, 0.125 mM EGTA, 1 mM DTT) considerando un volumen final de 20 µl incluyendo al DNA marcado radioactivamente. Esta mezcla se incubó 10 minutos. Al término de este tiempo se agregaron de $0.5-1.0 \times 10^5$ cpm del DNA marcado (aproximadamente 1 ng de DNA marcado) y se incubó por 10 minutos más. Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida 6% no desnaturalizante previamente corrido 45 minutos a 100 volts. En el carril del extremo se agregó el colorante (azul de bromofenol 0.1 % en glicerol 20 %), y posteriormente el gel se corrió a 100 volts en 50 mM de Tris/50 mM de ácido bórico/1 mM EDTA hasta que el frente del colorante recorrió más del 80% de la longitud del mismo. Una vez terminada la corrida, el gel se fijó con etanol 10% acético 10% por 15 minutos, se secó y se expuso en una película radiográfica Kodak X-Omat, las bandas obtenidas en la autorradiografía se cuantificarán mediante densitometría de la manera descrita en la sección V.6.

VII. RESULTADOS

VII.1 Interacción del Virus Dengue 2 con proteínas membranales de neuronas de ratón.

Para determinar si el DEN 2 interactúa con una(s) de las proteína(s) separadas de los extractos totales de las membranas neuronales de ratón y para conocer el peso molecular aproximado de ellas se realizarán ensayos de unión del virus en fase sólida (*Virus Overlay Protein Blot Assay*, VOPBA). De los dieciocho tratamientos que se probaron en el *overlay* con las proteínas membranales de neuronas de ratón de 3 días postnatales (transferidas de un gel preparativo de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (Figura 8), se determinó que entre el tratamiento 18, 19 o 20 se encuentra el óptimo (Figura 8B). Con estos últimos tratamientos se llevo a cabo el *overlay* sobre una membrana con las proteínas transferidas de un gel no preparativo al 10% (Figura 9A), la inmunoreactividad resultante se muestra en la figura 9B donde se puede apreciar la unión del DEN a 3 o 4 proteínas en los carriles 1, 2 y 4, también se muestran las señales menos intensas mientras más diluido se ha usado el virus por lo que se determinó trabajar con las condiciones del tratamiento 18 (carril 1, figura 9B) [dilución 1:100 de la solución concentrada del DEN 2, 1:100 del primer anticuerpo antiDEN y 1:5 000 del segundo anticuerpo antiIgG*]. Como control de inespecificidades del primer anticuerpo se usaron anticuerpos policlonales del virus del Síndrome del Ojo Azul (SCA) la autorradiografía se muestra el carril 3 de la figura 9B y al comparar con el que tiene antiDEN 2 (carril 2) no se observa la unión del DEN 2 a la proteína de 65 kDa, además se observa la presencia de fondo inespecífico.

La especificidad de unión del DEN 2 a la proteína de 65 kDa se mostró en un ensayo con las condiciones estandarizadas donde se encontraba ausente el antígeno viral. La figura 10 muestra el *overlay* con las proteínas membranales de neuronas de ratón de 3 días postnatales transferidas de un gel no preparativo al 10% en presencia (carril 1) y en ausencia del DEN 2 (carril 2), en el último no se observa el virus unido a la proteína de 65 kDa.

VII.2 Ontogenia de la proteína de 65 kDa a la que se une el Virus Dengue 2

Para evidenciar si la proteína de 65 kDa a la que se une el DEN 2 se expresa diferencialmente en el tejido cerebral de ratón durante el desarrollo del SNC se llevaron a cabo ensayos de *overlay* con muestras de tres lotes de proteínas membranales de neuronas de ratón de 5, 3 y 1 días prenatales;

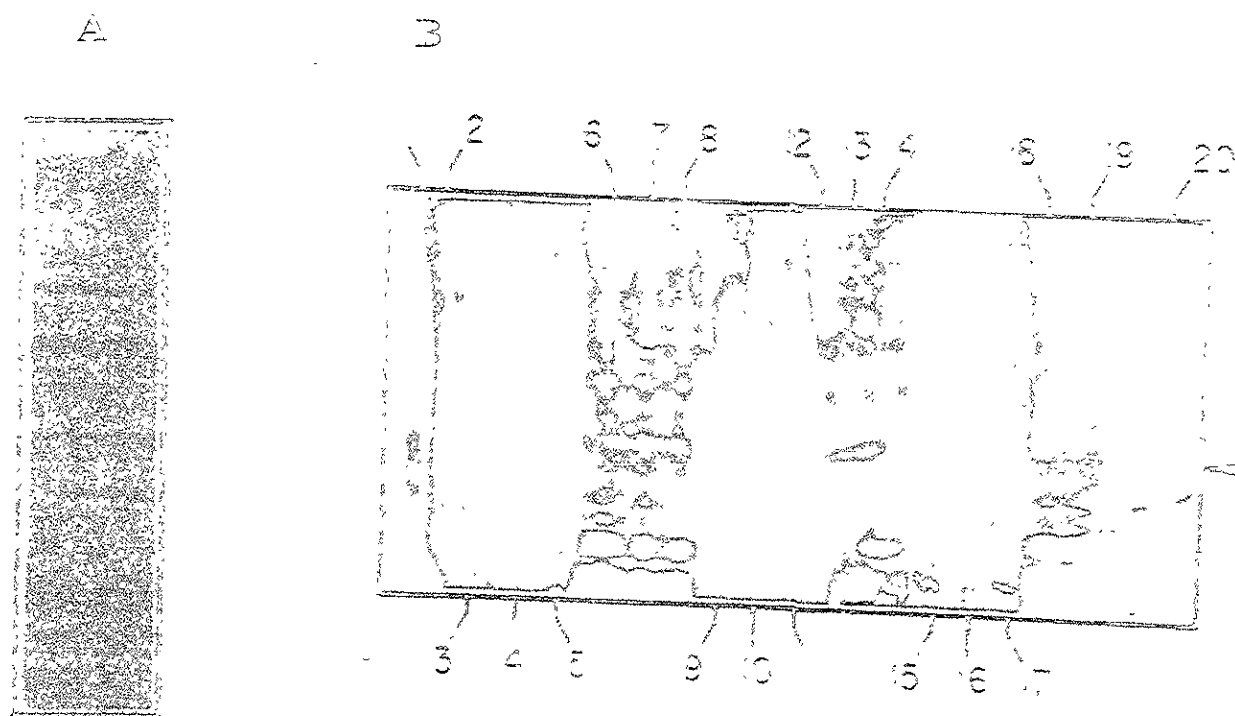


Figura 8. Ensayo de unión del virus en fase sólida de los 18 tratamientos probados. Panel A: separación electroforética en condiciones desnaturalizantes de las proteínas membranales de cerebro de ratón de 3 días postnatales. Gel preparativo al 10% teñido con azul de Coomassie R-250. Panel B: inmunodetección de los 18 tratamientos probados con diferentes diluciones de Virus Dengue 2 NGC (DEN 2), suero antiDengue (antiDEN) y antiIg G acoplada a peroxidasa (antiG⁺). Carriles 1 y 2 tratados solo con antiG⁺ en dilución 1:2000 y 1:5000 respectivamente; carriles 3, 4 y 5 con 1:100, 1:500 y 1:1000 de DEN 2 respectivamente, 1:10 de antiDEN y 1:2000 de antiG⁺; carriles 6, 7 y 8 con 1:100, 1:500 y 1:1000 de DEN 2 respectivamente, 1:10 de antiDEN y 1:5000 de antiG⁺; carriles 9, 10 y 11 con 1:100, 1:500 y 1:1000 de DEN 2 respectivamente, 1:50 de antiDEN y 1:2000 de antiG⁺; carriles 12, 13 y 14 con 1:100, 1:500 y 1:1000 de DEN 2 respectivamente, 1:50 de antiDEN y 1:5000 de antiG⁺; carriles 15, 16 y 17 con 1:100, 1:500 y 1:1000 de DEN 2 respectivamente, 1:100 de antiDEN y 1:2000 de antiG⁺; carriles 18, 19 y 20 con 1:100, 1:500 y 1:1000 de DEN 2 respectivamente, 1:100 de antiDEN y 1:5000 de antiG⁺. Los polipéptidos inmunopositivos se revelaron usando el kit ECL (Amersham) y fueron expuestos en film Kodak X-OMAT durante 7 min.

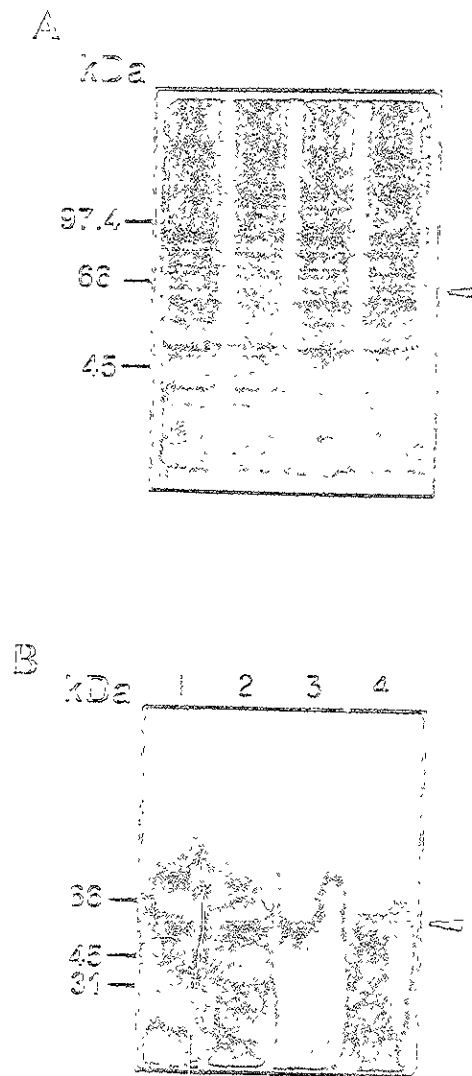


Figura 9. Ensayo de unión del virus en fase sólida de los tratamientos 18, 19 y 20. Panel A: separación electroforética en condiciones desnaturalizantes de las proteínas membranales de cerebro de ratón de 3 días postnatales. Gel al 10% teñido con azul de Coomassie R-250. Panel B: Inmanodetección de los tratamientos 18, 19 y 20. Carriles 1, 2 y 4 tratados con DEN 2 en diluciones 1:1000, 1:100 y 1:500 respectivamente, 1:100 de antiDEN y 1:5000 de antiG*; carril 4 (control del primer anticuerpo) tratado con DEN 2 en dilución 1:500, suero antiSíndrome del ojo azul (antiSCA) diluido 1:3000 y antiG* 1:5000. Los polipéptidos inmunopositivos se revelaron usando el kit ECL (Amersham) y fueron expuestos en film Kodak X-OMAT durante 3 min.

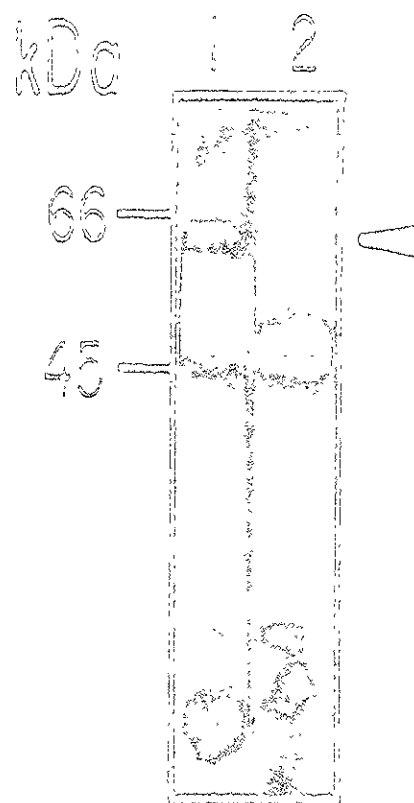


Figura 10. Ensayo de unión del virus en fase sólida en presencia y ausencia del DEN 2. Inmunodetección de preparados membranales de cerebro de ratón de 3 días postnatales. Carril 1 tratado con una dilución 1:100 de DEN 2, 1:100 de antiDEN y 1:5000 de antiG*; carril 2 solo se trató con una dilución 1:100 de antiDEN y 1:5000 de antiG*, excluyendo al DEN 2. Los polipéptidos inmunopositivos se revelaron usando el kit ECL (Amersham) y fueron expuestos en película Kodak X-OMAT durante 15 min.

de 1, 3 a 10, 12, 14 y 17 días postnatales y de 76 días postnatales como control negativo. También se utilizaron como controles preparados membranales de las líneas celulares de macrófagos J-774 (negativo) y de neuroblastoma de ratón N1B-116 (positivo). Al mismo tiempo se llevaron a cabo ensayos en ausencia del DEN 2 de algunas muestras de proteínas membranales de neuronas de ratón como controles de inespecificidad del virus.

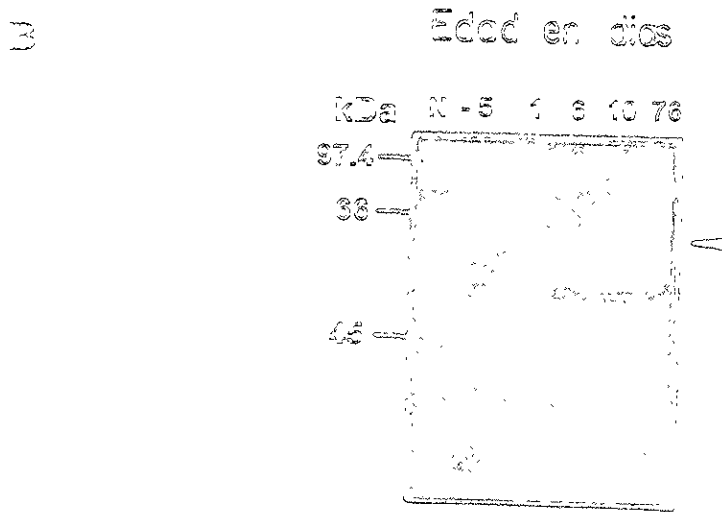
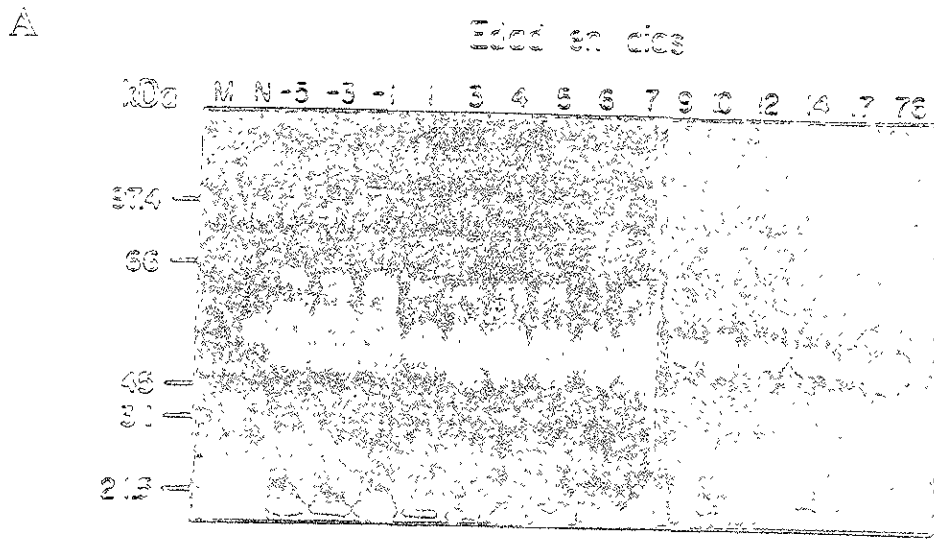
La inmunodetección de un ensayo del lote 2 se muestra en la figura 11A (la de los lotes 1 y 3 no se muestran), en ella se observa que la proteína de 65 kDa a la que se une el DEN 2 se encuentra expresada en las neuronas del ratón de 5 días prenatales hasta el de 7 postnatales y después si es que se encuentra expresada, son tan bajos sus niveles que nuestro sistema no la ha podido detectar. La inmunodetección de un ensayo realizado sin el DEN 2 muestra la ausencia de la banda 65 kDa en los diferentes días probados (Figura 11B).

Se obtuvieron por densitometría los datos de la intensidad de la señal de los ensayos llevados a cabo con las muestras de los tres lotes los cuales se usaron para construir una gráfica de la expresión de la proteína de 65 kDa a la que se une el DEN 2 durante el desarrollo del SNC del ratón del lote 2 y otra del porcentaje de la intensidad de la señal respecto del valor máximo obtenido con ayuda del programa Prisma Graph Pad las que se encuentran en la figura 12, donde se puede apreciar que la proteína de 65 kDa a la que se une el DEN 2 se encuentra expresada en el SNC de ratones de 5 días prenatales, va aumentando hasta el día 1 prenatal en que su expresión es la máxima, luego sufre un considerable decremento en los de 1 día postnatal y después de ese su expresión parece que se mantiene constante hasta el día 7 posteriormente parece que se deja de expresar o si se expresa lo hace a tan bajos niveles que nuestro sistema no la ha detectado.

VII. 3 Actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1

Con objeto de explorar si por efecto de la unión del DEN 2 a la proteína de 65 kDa han sido activadas algunas cascadas de señalización que llegan a promover la unión al DNA del factor de transcripción AP-1 (Proteína Activadora 1) se llevaron a cabo ensayos de retardo de entrada al gel (EMSA) con extractos crudos nucleares obtenidos de suspensiones celulares de cerebros de ratón infectadas con el DEN 2.

Primero se llevó a cabo el ensayo con extractos nucleares de suspensiones celulares de cerebros de ratón de 1 día postnatal infectadas con el DEN 2. La figura 13 muestra respectivamente la autorradiografía y gráfica del porcentaje de intensidad de la señal con respecto al control de dicho ensayo donde se puede observar que las células estimuladas con TPA e infectadas con el DEN 2 estimulan la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 (carril 3 y 4 Figura 13 A). Además la estimulación que ejerce el DEN 2 es mayor que la del TPA (Figura 13 B).



N = Clona Adrenérgica N1E-115

Figura 11. Unión del DEN 2 a la proteína de 65 kDa de la membrana neuronal durante el desarrollo de SNC del ratón. Panel A: Inmunodetección de los preparados membranales de 5, 3 y 1 día prenatal y 1, 3-10, 12, 14, y 17 días postnatales. Panel B: Inmunodetección de los preparados membranales de 5 días prenatales y 1, 6 y 10 días postnatales, excluyendo al DEN 2. Los polipéptidos inmunopositivos se revelaron usando el kit ECL (Amersham) y fueron expuestos en film Kodak X-OMAT durante 12 min. M = línea celular de Macrófagos J 774. N = Clona adrenérgica N1E-115.

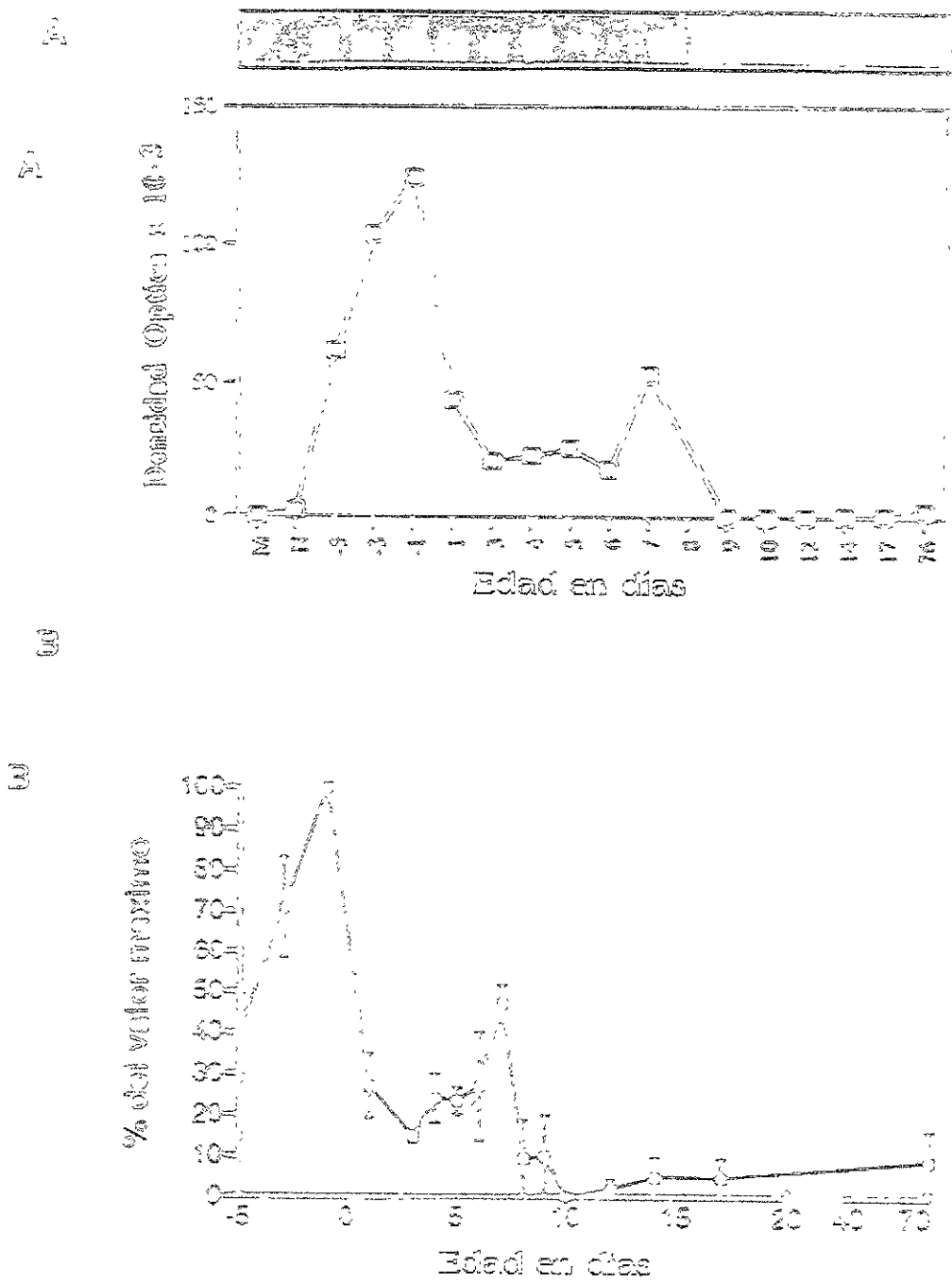


Figura 12. Análisis densitométrico de la expresión de la proteína de 65 kDa receptor neuronal a la que se une el DEN 2 durante el desarrollo del cerebro de ratón. Panel A: densidad óptica del ensayo del lote número dos. Panel B: Porcentaje del valor máximo de los tres lotes procesados con error promedio estándar. La detección se llevó a cabo mediante ensayo de unión del virus en fase sólida.

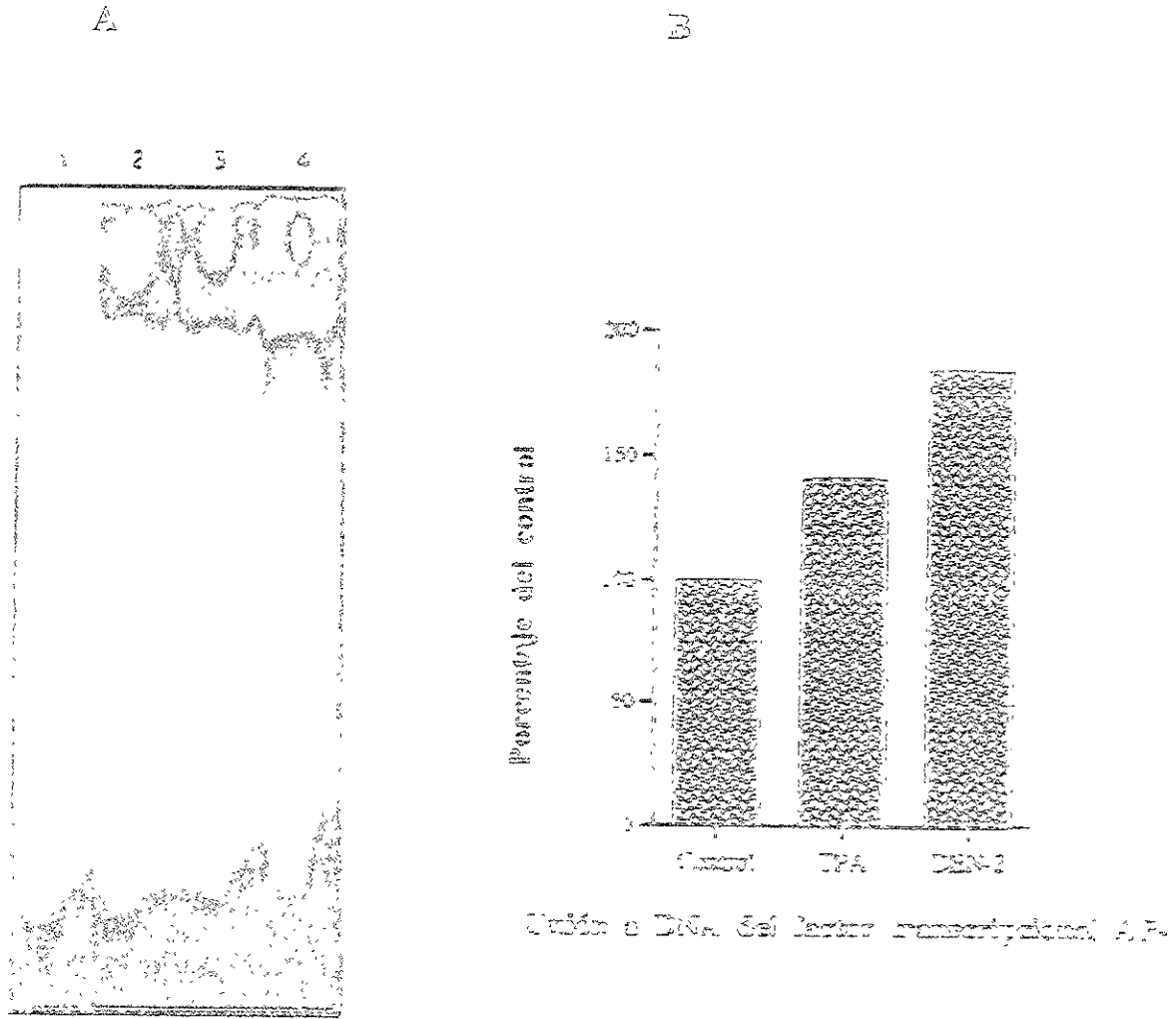


Figura 13. Actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 en tejido cerebral de ratones de 1 día postnatal infectado con DEN 2. Panel A: Autorradiografía del ensayo. Carril 1 sonda libre; carril 2 tejido sin infectar ni estimulado; carril 3 estimulado con TPA (13-Acetoato de 12-O-decanoil foróol) y carril 4 infectado con DEN 2. Panel B: Análisis densitométrico de la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 expresada en porcentaje del control. La detección se llevo a cabo mediante ensayo de retardo de entrada al gel empleando una sonda con la secuencia consenso para AP-1 marcada con [32]ATP y expuesta en película Kodak X-OMAT durante 22 hrs.,

Posteriormente se llevó a cabo el estudio con extractos nucleares de suspensiones celulares de cerebros de ratón de 1, 3-3 y 76 días postnatales infectadas con el DEN 2. La figura 14 muestra la autorradiografía correspondiente a los ensayos realizados con los extractos nucleares de suspensiones celulares de cerebros de ratón de 1, 3, 4 y 5 días pos-natal infectadas con el DEN 2. Donde se puede observar que las células infectadas con el DEN 2 estimulan más la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 carriles 5, 7, 9 y 11, que la de sus controles negativos carriles 4, 6, 8 y 10. La figura 15 muestra la autorradiografía correspondiente a los ensayos llevados a cabo con los extractos nucleares de suspensiones celulares de cerebros de ratón de 6, 7, 8 y 76 días postnatal infectadas con el DEN 2, donde se ha observado que se estimula más la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 en los controles negativos (carriles 5, 7, 9 y 11) que en las células infectadas con el DEN 2 (carriles 4, 6, 8 y 10).

El análisis densitométrico de estos resultados, se muestra en la figura 16, donde se observa que en las células del día 1 postnatal la infección con DEN 2 ejerce una mayor estimulación de la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 y conforme se van madurando disminuyen hasta que en las células de 8 días postnatales el DEN 2 ya no es capaz de llevar a cabo dicha estimulación.

VII.4 Correlación entre la ontogenia de la proteína de 65 kDa a la que se une el DEN 2 y la estimulación de la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1

Con los resultados del análisis densitométrico de los ensayos de unión del virus en fase sólida y de los de retardamiento de entrada al gel (Figura 12A y 16 respectivamente), se ha construido la gráfica del porcentaje de la intensidad de la señal respecto del control para los días 1 y 3-6 postnatales (Figura 17), donde se puede observar que la expresión de la proteína de 65 kDa a la que se une el DEN y la estimulación de la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 que induce la interacción DEN 2-receptor neuronal se comportan de forma muy similar, ya que tanto la expresión como la estimulación después del día 1 postnatal se va disminuyendo hasta el día 6 postnatal.

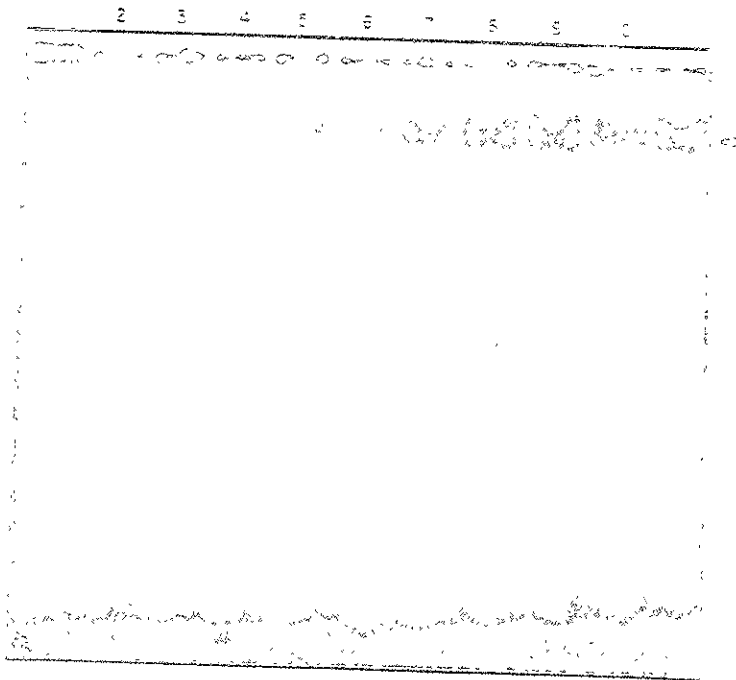


Figura 14. Actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 en tejido cerebral de ratón de 1, 3, 4 y 5 días postnatales infectado con DEN 2. Carril 1 sonda libre; carriles 2 y 3 tejido cerebral de 1 y 76 días postnatales respectivamente estimulado con TPA (13-Acetato de 12-O-decanoil forbol); carriles 4, 5, 8 y 10 tejido cerebral sin infectar de 1, 3, 4 y 5 días postnatales respectivamente; carriles 6, 7, 9 y 11 tejido cerebral infectado con DEN 2 de los mismos días. La actividad de unión a DNA del factor de transcripción fue detectada empleando como sonda la secuencia consenso para AP-1 marcada con $[^{32}P]ATP$ y por exposición autoradiográfica en película Kodak X-OMAT expuesta durante 96 h.

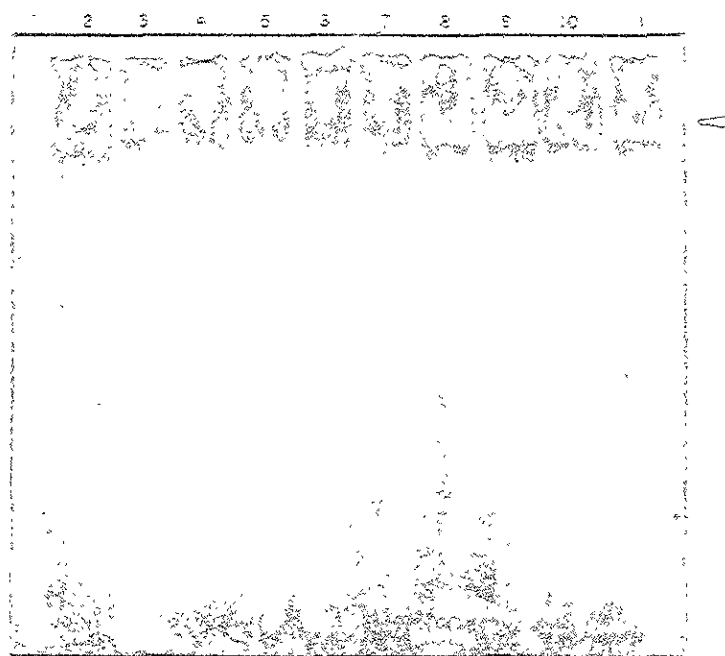


Figura 15. Actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 en tejido cerebral de ratón de 1, 6, 8 y 76 días postnatales. Carril 1 sonda libre; carriles 2 y 3 tejido cerebral de 1 y 76 días postnatales respectivamente estimulado con TPA (13-Acetato de 12-O-decanoil forbol); carriles 4, 6, 8 y 10 tejido cerebral sin infectar de 1, 6, 8 y 76 días postnatales respectivamente; carriles 5, 7, 9 y 11 tejido cerebral infectado con DEN 2 de los mismos días. La actividad de unión a DNA del factor de transcripción fue detectada empleando como sonda la secuencia consenso para AP-1 marcada con $[\gamma^{32}P]ATP$ y por exposición autoradiográfica en película Kodak X-OMAT expuesta durante 75 h.

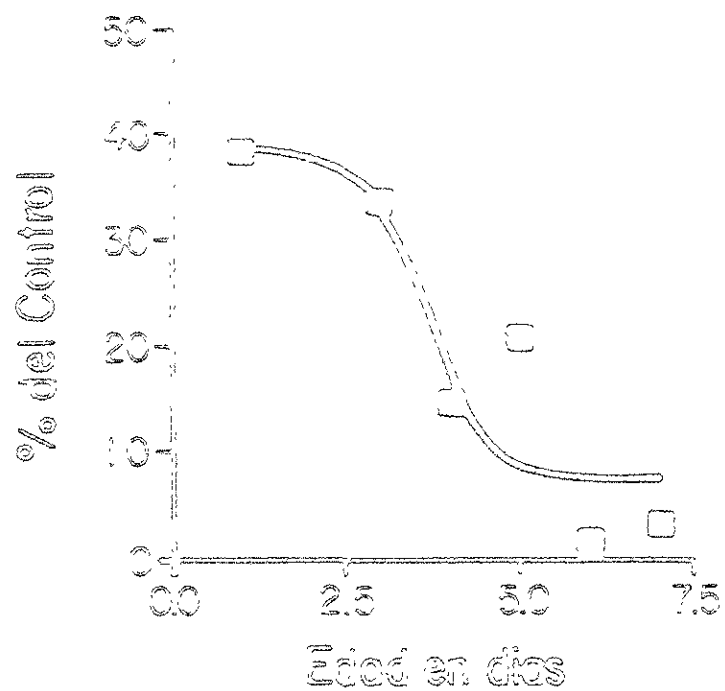


Figura 16. Análisis densitométrico de la actividad de unión a DNA de factor de transcripción AP-1 en tejido cerebral de ratón de 1, 3-6 días postnatales infectado con DEN 2. Se expresa en porcentaje del control.

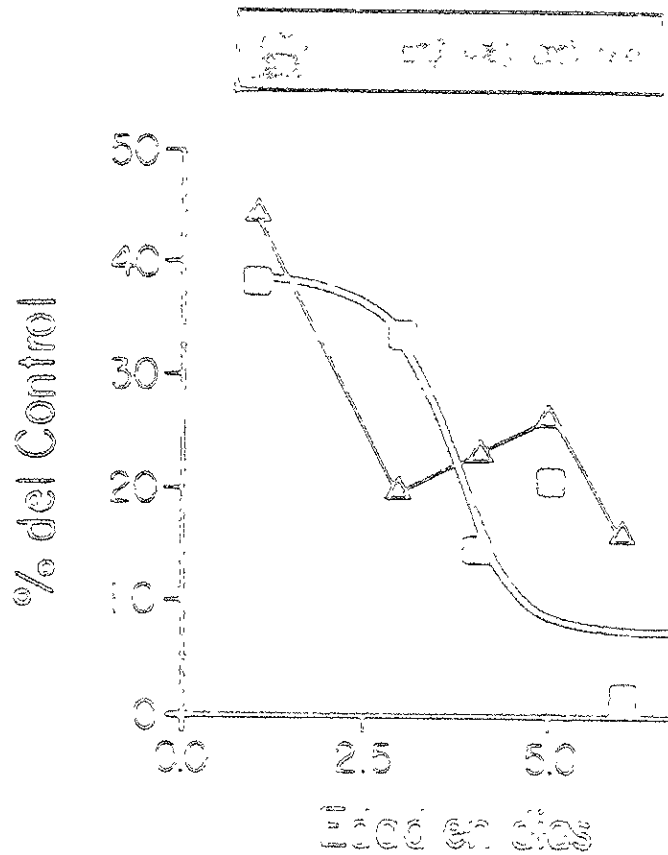


Fig 17. Correlación entre la expresión de la proteína de 65 kDa receptor neuronal para el DEN 2 y la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 en tejido cerebral de ratón de 1 y 3-5 días postnatales infectado con DEN 2. (Δ) Expresión del receptor neuronal en D.O. x 10³. (◻) Actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 en % del control.

VIII. DISCUSION

El neurotropismo y padecimientos neurológicos causadas por Flavivirus recientemente han sido observados en infecciones con DEN tanto en el humano como en animales de experimentación ^{14, 89}. En algunos casos de brotes epidémicos de fiebre clásica y hemorrágica del dengue han sido reportadas alteraciones en el SNC y se ha detectado al antígeno viral en el cerebro de casos fatales ^{8,6,9} y en el líquido cefalorraquídeo durante la fase aguda de la enfermedad ^{7, 8} e inclusive en muestras sanguínea ⁷. Sin embargo la patología y patogénesis de las infecciones del SNC humano por DEN son desconocidas. En infecciones experimentales del SNC de ratón, el DEN replica principalmente en neuronas pero no en células gliales ni en el endotelio vascular ¹⁴. En el ratón la infección es dependiente de la edad y el análisis histológico muestra necrosis en diferentes regiones del cerebro y leve reacción inflamatoria. Además, en infecciones de cultivos primarios de tejido cerebral de embrión de ratón se ha detectado al DEN en las neuronas pero no en astrocitos ¹⁵, esta selectividad para infectar neuronas inmaduras coincide con lo observado por Ogata ⁷⁹, quien documenta susceptibilidad diferencial de las células neuronales para el JEV otro miembro del género Flavivirus, sugiriendo que estas células expresan un posible receptor viral solo durante un cierto tiempo del desarrollo neuronal ^{15, 79}. Respecto al posible receptor que pudiera conferirle susceptibilidad a la infección por DEN en las células blanco del hospedador se ha determinado a un tipo de heparan altamente sulfatado ¹⁷, aunque no se ha definido si es la única molécula que se requiere para la infección y a una proteína de 65 kDa que se expresa en células de neuroblastoma humano y de ratón ¹⁶.

Para identificar posibles receptores virales deben llevarse a cabo primero ensayos de tamizaje y luego confirmatorios; entre los primeros se encuentran los ensayos de unión del virus al receptor inmovilizado (Ensayo de unión del virus en fase sólida o *Virus Overlay Protein Blot Assay*, *VOPBA*) o al receptor sobre las células. Entre las segundas la transfección del gene del posible receptor viral a una línea celular no susceptible a la infección. Por ensayos de unión del virus en fase sólida se han identificado tanto receptores para DEN en el vector ³²⁻⁶⁴, como en el hospedero ^{16, 17, 18, 19, 26}.

Nuestros resultados han mostrado mediante ensayos de unión del virus en fase sólida que una proteína de 65 kDa de la membrana de neuronas de ratones *Balb/c* modula la unión del DEN 2 y la infección de dichas células. El hecho de que se haya descrito en cultivo de células de neuroblastoma humano y de ratón un receptor de tipo protéico con un peso molecular de 65 kDa ¹²

nos permite pensar que se trata del mismo receptor que hemos determinado.

VIII. 1 Ontogenia del receptor neuronal

El desarrollo del sistema nervioso que se inicia desde la gastrulación, conlleva la interacción de eventos celulares e involucra una restricción gradual durante el desarrollo potencial de células individuales. Durante el desarrollo del SNC la diferenciación celular depende de una serie de señales que finalmente controlan la transcripción de genes específicos. Cuando las células sufren diferenciación celular autónoma, estas señales son iniciadas por herencia de determinantes citoplásmicos de distribución asimétrica y son perpetuadas por una cascada interna de interacciones entre factores nucleares que regulan la transcripción. Con células cuyo destino es más plástico las señales críticas derivan del ambiente y controlan directamente la expresión o actividad de factores de transcripción nuclear 90, 91.

El establecimiento de un patrón definitivo de conexiones neuronales es un proceso gradual que puede considerarse que se realiza en seis fases. Primera, una población uniforme de células precursoras neuronales es inducida a diferenciarse desde el ectodermo. Segunda, estas células neuronales comienzan a diferenciarse, dando surgimiento a células gliales y neuronas inmaduras. Tercera, las neuronas inmaduras migran desde las zonas germinales a su posición final. Cuarta, las neuronas extienden sus axones, que se proyectan hacia la vecindad de sus blancos eventuales. Quinta, los axones forman conexiones sinápticas con subpoblaciones seleccionadas de células blanco. Finalmente, algunos de los contactos sinápticos que son formados inicialmente se modifican para generar el patrón definitivo de conexiones neuronales 92.

El DEN 2 se une específica y predominantemente a una proteína de 65 kDa de las proteínas membranales de neuronas de ratones Balb/c desde los días 5 prenatal hasta el 7 postnatal, lo que hace pensar que esta proteína con la que interactúa el virión es su receptor. El que se tengan evidencias de que el DEN solo infecta neuronas inmaduras 24, 82 hace pensar que el receptor es neuronal.

Hemos determinado en el sistema murino que una proteína de 65 kDa es el receptor neuronal para el DEN 2 y sugerimos que es el mismo que se encuentra expresado en la superficie de las células de neuroblastoma de humano y de ratón ya que tienen el mismo peso molecular.

No fue posible determinar si la proteína de 65 kDa es todo el receptor o solo una parte del complejo multimérico, ya que la separación electroforética de las proteínas de membrana se hizo en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes.

La presencia de un receptor específico para el Virus Dengue también ha sido descrita para el serotipo 1 en las líneas celulares HepG2 (de hepatoma humano) y Vero (de riñón de mono) 27, la

reciente identificación de dos glicoproteínas de 40 y 45 kDa para el serotipo 4 y para el serotipo 2 en células C636 y de intestino de mosquito *Aedes albopictus*, respectivamente un polipeptido de 80 y 67 kDa⁵⁵. Y hacen pensar en la existencia de diferentes receptores para el virus o en que se trate del mismo pero presentado en diferentes ambientes en la superficie celular como ha sido sugerido por Marianneau²⁷.

Nuestros ensayos también han mostrado la señal incrementada de la expresión de la proteína de 65 kDa a la que se une el Virus Dengue los días 5, 3 y 1 prenatal y, 1, 3-7 postrnatal siendo ésta de manera relevante el día 1 prenatal (Figura 13A), datos que apoyan fuertemente que la susceptibilidad a la infección esta mediada por la presencia del receptor neuronal y que dicha expresión depende del estado de desarrollo de las neuronas ya que va decreciendo conforme aumenta la edad (Figura 13A). La gran mayoría de cambios fisiológicos dentro del SNC del ratón que incluyen axonogénesis, sinaptogénesis y mielinización progresan rápidamente durante la primera semana y generalmente concluyen hacia finales de la segunda semana de vida^{93, 94}. El período crítico para la infección por el Virus Dengue 2, según los resultados de nuestro grupo⁸⁴, corresponde al de la sinaptogénesis ya que se evidenció una sobreexpresión de las proteínas sinaptofisina y la forma fosforilada de los neurofilamentos de alto peso molecular cuando el virus lleva a cabo la infección⁸⁴. Estos datos nos permiten sugerir que el receptor protéico de 65 kDa tiene una participación importante durante la sinaptogénesis en este lapso se encuentra sobreexpresada y que conforme se va concluyendo esta etapa del desarrollo se van disminuyendo sus niveles hasta que llegan a ser no detectables por nuestro sistema. Estos resultados corroboran lo sugerido por Ogata y cols. sobre la infección del virus de la encefalitis japonesa a células neuronales inmaduras quienes referían que la alteración en la expresión de las moléculas de la superficie neuronal que actúan como receptores para el virus, cambian con la edad⁸³.

La presencia del receptor confiriéndole a las neuronas susceptibilidad a la infección por el Virus Dengue 2 durante este lapso puede ser un modelo que permita explicar la dependencia de la edad de los animales susceptibles a encefalitis letales por *Flavivirus*. De este comportamiento se puede establecer una correlación entre la edad y la expresión de la proteína a la que se une específicamente el Virus Dengue 2; ya que conforme avanza la edad y por ende se va madurando el SNC del ratón, el virus va perdiendo la capacidad de unión a la proteína de membrana de 65 kDa, el posible receptor que media la infección de neuronas, misma que parece perderse a partir del día 8 postrnatal.

VIII. 2 Actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1

Se ha mosurado que la unión de algunos virus al receptor del hospedador que le confiere la

susceptibilidad a la infección puede activar mecanismos que disparan cascadas de señalización que llegan a promover cambios en el interior de dicha célula, a su vez pueden inducir la diferenciación celular o la expresión diferencial de proteínas. Como por ejemplo el Virus Epstein-Barr al unirse a su receptor la glicoproteína CR2 expresada sobre la superficie de los linfocitos B induce la producción de factores de crecimiento que llevan a la proliferación de estas células ⁷⁸; también se ha mostrado que se induce la expresión de la mioglobina en mioblastos cuando la glicoproteína (gp55) del F-MuLV se une al receptor de la eritropoietina EPO-R (miembro de la superfamilia de receptores de citocinas) ⁷⁹. De igual forma se han llevado a cabo estudios para elucidar las vías de señalización que están involucradas en la inducción de la expresión de proteínas, así como por ejemplo se ha visto que cuando F-MuLV activa al receptor EPO-R dispara una cascada de señalización en la que participa STAT1. Así mismo cuando el HSV se une a su receptor dispara una cascada de señalización en la que interviene PKC, que lleva a un incremento en la transcripción de los genes tempranos *fos* y *jun* ⁸⁰, mientras que la unión de HCMV a la β_2 -microglobulina induce un aumento en la formación del factor de transcripción AP-1 ⁸¹.

Los mecanismos que pueden explicar lo anterior son la intervención de la PKC o de la cascada de las MAPK. La interacción entre el factor AP-1 y su elemento *cis*-activador media un incremento en la transcripción del promotor del oncogen *fos* en respuesta a los esteroides de forbol así como el estímulo con factores del crecimiento, tales como EGF y NTF mismos que participan en la alteración de algunos oncogenes incluyendo *c-Ha-ras*, *v-src*, poliomavirus medio T, *v-mos*, *c-fos* y *v-raf*.

Nuestro grupo ha mostrado previamente que el tratamiento de células de neuroblastoma de ratón (N1E-115) con Virus Dengue 2 provoca una translocación de la PKC del citoplasma a la membrana plasmática y la liberación de ácido araquidónico, por lo que parece factible encontrar al receptor funcional en las células permisibles, por alguna de las vías de señalización que estimulan la actividad de unión al DNA del factor de transcripción AP-1.

Los resultados aquí obtenidos muestran un incremento en la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 respecto del control sin infectar del día 1 al 5 postnatal, mostrando un máximo de actividad al día 1 postnatal (figura 17). Lo que sugiere fuertemente que el receptor neuronal ha sido activado después de que el Virus Dengue 2 se une a él.

Dicha activación probablemente dispara cascadas de señalización vía PKC o MAPK hasta núcleo, que van a provocar la transcripción de genes tempranos como *c-fos* y *c-jun* que intervienen en la formación del factor de transcripción AP-1. El que se encuentre incrementada la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 sugiere que se encuentra también activada la transcripción de genes tardíos que posiblemente se encuentran sintetizando más receptor proteico para que el

virus tenga mayores posibilidades de infección.

VIII. 3 Correlación entre la ontogenia del receptor neuronal y actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1

Aparentemente existe una correlación entre la expresión de la proteína de 65 kDa (posible receptor neuronal) y la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 los días 1 y 3-5 postnatal lo que pudiera estar indicando que la activación del receptor ocurre durante el mismo lapso en que la presencia del receptor media la infección neuronal (figura 18). Después de este día la actividad se va perdiendo probablemente porque junto con el proceso de maduración del SNC del ratón se van perdiendo los sitios de unión del virus. Una posible explicación del patrón diferencial de decrementos en la actividad de unión del factor de transcripción AP-1 conforme avanza la edad, es que el receptor también se expresa de una manera diferencial en el desarrollo.

Con base en los resultados anteriores hemos propuesto un modelo acerca del mecanismo de activación del receptor neuronal del Virus Dengue 2 y las probables cascadas de señalización que dispara (figura 18).

Hasta ahora el controlar el Dengue por la reducción del vector responsable de la transmisión o prevenirlo con una vacuna efectiva, no ha tenido resultados satisfactorios. La identificación de un receptor en las células permisibles a la infección permitiría desarrollar estrategias alternativas a las vacunas que prevengan la entrada viral en las células, como el producir anticuerpos monoclonales que lleven a cabo el bloqueo del receptor viral, la síntesis de péptidos que mimeticen el receptor viral o el desarrollo de alguna droga que lo bloquee.

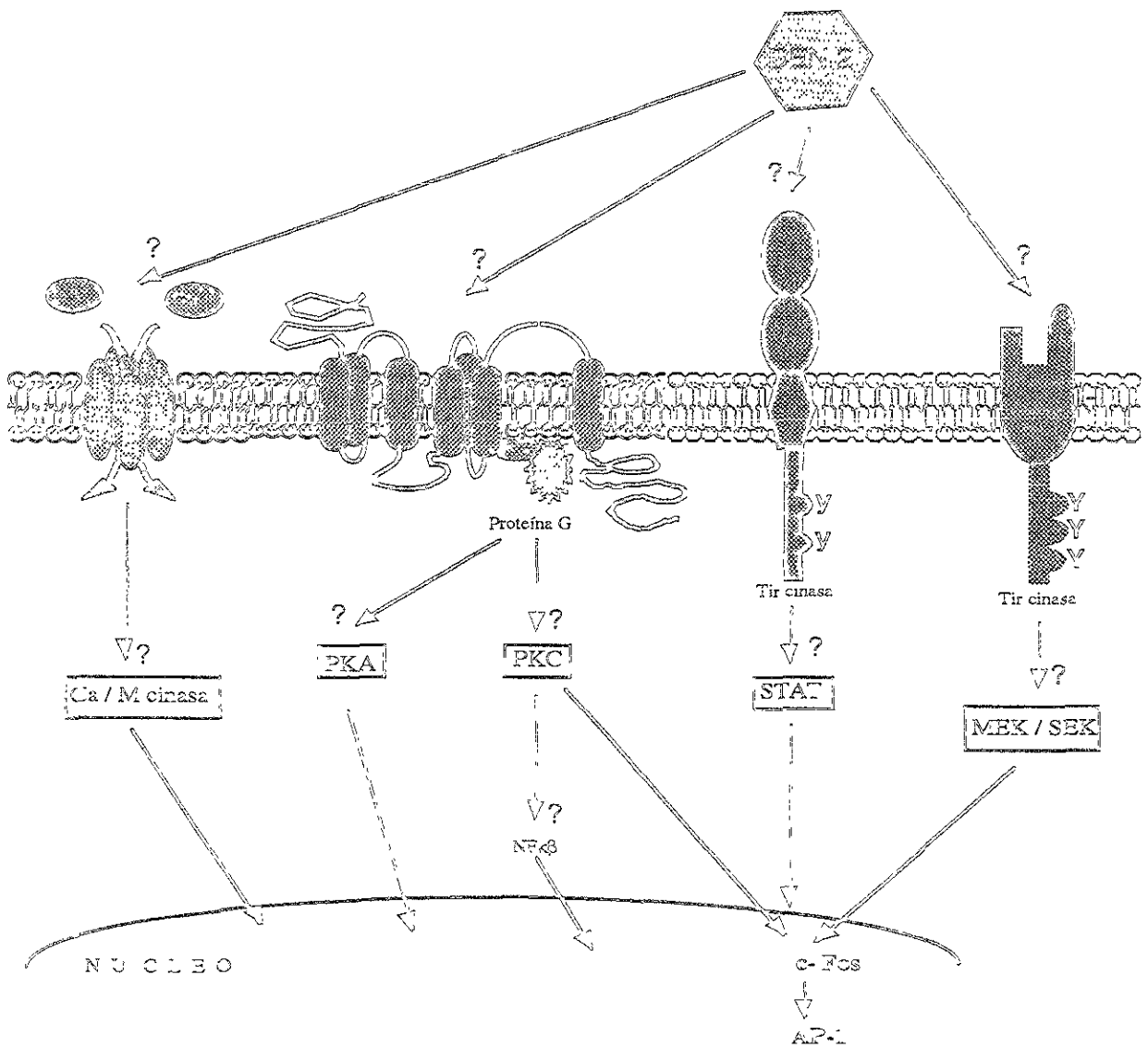


Figura 18. Modelo propuesto del mecanismo de activación del receptor neuronal del Virus Dengue 2 y las probables cascadas de señalización que dispara.

IX. CONCLUSIONES

- 1) Se demostró por ensayos de unión del virus en fase sólida que la expresión de la proteína de 65 kDa en neuronas de ratón Balb/c les confiere susceptibilidad a la infección por Virus Dengue serotipo 2. Considerándose por ésto el posible receptor neuronal.
- 2) Se determinó que la proteína de 65 kDa participa en el desarrollo del SNC del ratón y tiene una expresión diferencial dependiente del estado de madurez del mismo.
- 3) Se demostró que la unión del Virus Dengue serotipo 2 a la proteína de 65 kDa activa cascadas de señalización que llegan al núcleo, incrementando la unión del factor de transcripción AP-1 a sitios consenso de DNA.
- 4) Se aporta nueva evidencia de las bases moleculares que permiten explicar las encefalitis causadas por *Flavivirus*.

X. P E R S P E C T I V A S

1. Clonar el cDNA de la proteína de 65 kDa para transformar células no susceptibles a la infección por DEN 2 para demostrar que esta proteína es el receptor neuronal.
2. Elucidar las cascadas de señalización que se transducen desde la membrana hasta el núcleo mediadas por la interacción DEN 2-receptor neuronal con el objeto de desarrollar terapias.

XI. BIBLIOGRAFIA

- 1 Monath Thomas P. (1994) Dengue: The risk to developed and developing countries *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91:2395-2400.
- 2 Montesano-Castellanos R. Ruiz-Matus C. (1995) Vigilancia epidemiológica del dengue en México *SALUD PUBLICA DE MEXICO* Suplemento 37:64-76.
- 3 Gordon C. Cook (1996): *Manson's Tropical Diseases* 20 Ed W.B.Saunders Co, pp 1779.
- 4 Bray M., Men R. and Lai Ching-Juh (1996) Monkeys Immunized with Intertypic Chimeric Dengue Viruses are Protected against Wild-Type Virus Challenge. *J. Virol.* 70:4162-4166.
- 5 Hairstead S.B. (1988) Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. *Science* 239:476-481.
- 6 Miagostovich MP., Ramos PG., Nicol AF., Nogueira RM., Cuzzi-Maya T., Oliveira AV., Marchevsky RS., Mezquita RR. and Schatzmayr MG.(1997) Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin.Neuropathol.* 16(4):204-8.
- 7 Lum LC., Lam SK., Choy VS., George R. and Harun F. (1996) Dengue encephalitis and true entity? *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 54(3):256-9.
- 8 Hommel D., Talarmin A., Deubel V., Reynes JM., Drouot MT., Sarthou JL. and Hulin A. (1998) Dengue encephalitic in French Guiana, *Res Virol.*149(4):235-8.
- 9 Ramos C., Sanchez G., Pando RN., Baquera J., Hernandez D., Mota J., Ramos J., Flores A. and Liausas E. (1998) Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic. *J. Neurovirol.* 4(4):465-8.

- 10 Monath Thomas P. Flaviviruses. In: *Fields Virology* ed by BN Fields, DM Knipe and PM Howley. pp.961-1023 lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, PA. 1995.
- 11 Rosen L. (1977) The emperor's new clothes revisited or reflections on the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 26:337-343.
- 12 Cote-Velez J Antonieta, Ortega Enrique and Ortega Arturo (1999) Low affinity Fcy receptors on murine macrophages: mitogen-activated protein kinase activation and AP-1 DNA binding activity. *Immunology lett.* 67:3:251-5.
- 13 Arriaga Pizano Lourdes Andrea (1998) Regulación de la expresión de interleucina 6 a partir de la activación del receptor Fcy en macrófagos. Tesis de Maestría CICATA - IPN, pp52.
- 14 Monath T P. Pathobiology of Flavivirus. In: *The Togaviridae and Flaviviridae.* ed. by Schlesiger S. Schlesiger MJ. . Plenum Press. New York. 1989:pp.375.
- 15 Imbert JL., Guevara P., Ramos-Castañeda J., Ramos C. and Sotelo J. (1994) Dengue virus infects mouse cultured neurons but not astrocytes *J. Med. Virol.* 67:685-691.
- 16 Ramos-Castañeda J., Imbert JL., Barron BL and Ramos C. (1997) A 65 kDa trypsin-sensible membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastome cell. *J. Neurovirol* 3:435-44.
- 17 Chen Y., Maguire T., Hileman RC., Fromm JR., Esko JD., Linnardi RJ., and Marks RM. (1997) Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Medicine* 3:866-871.
- 18 Putnak JR., Kanasa-Thasan N. and Innis BL. (1997) A putative cellular receptor for dengue viruses. *Nature Medicine.* 1:628-9.

- 19 Bergstrom T., Trybala E. and Spillmann (1997) Heparan sulfate and viral tropism. *Nature Medicine* 3:1177.
- 20 Chambers J.T., Hahn Ch., Galler R. and Rice M.Ch. (1991) Flavivirus genome, organization, expression and replication. *Annu.Rev.Microbiol.* 44:649-683.
- 21 Mc Minn Peter C. (1997) The molecular basis of virulence of the encephalitogenic Flaviviruses. *J.Gen. Virol.* 78:2711-2722.
- 22 Guirakhoo F., Heinz F.X., Mandl C.W., Holzmann H. and Kunz C. (1991) Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick borne encephalitis virions. *J. Gen.Virol.* 72:1323-1329.
- 23 Anderson R., King A.D. and Innis B.Z. (1992) Correlation of E protein binding with cell susceptibility to dengue 4 virus infection. *J. Gen.Virol.* 73:2155-2159
- 24 Rey F.A., Heinz F.X., Mandl Ch., Kunz Ch, and Harrison S.C. (1995) The envelope glycoprotein from Tick-Borne Encephalitis virus at 2A° resolution. *Nature* 375: 291-298.
- 25 Helenius A. (1995) Alphavirus and Flavivirus Glycoproteins: Structures and Functions. *Cell* 81:651-665.
- 26 Heinz F.X., Stiasny K., Püschner-Auer G., Holzmann H., Allison S.L., Mandl Ch.W and Kunz Ch (1994) Structural Changes and Functional Control of the Tick-Borne Encephalitis Virus Glycoprotein E by the Heterodimeric Association with Protein prM. *Virus Genes* 198:108-117.
- 27 Graenberga A., Woo W.S., Biedrzycka A. and Wright P.J. (1988) Partial nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the structural proteins of Dengue virus type 2, New Guinea C and PUO-218 strains. *J.Gen.Virol.* 59:1391-1398.
- 28 Charles M Rice. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: *Fields Virology* ed by BN Fields, DM Knipe and PM Howley. pp.931-960 Lippincott-Raven

Publishers, Philadelphia, PA, 1995.

- 29 Markoff L. (1989) In vitro processing of Dengue virus structural proteins cleavage of the pre-membrane protein *J.Virol.* 53:3345-3352.
- 30 Ramos Castañeda J. (1994) Infección *in vitro* de células neurogénicas de ratón por el virus Dengue Tesis de Maestría. Departamento de Biología Celular Facultad de Ciencias UNAM.
- 31 Marchette N.J., Halstead S.B., O'Rourke T., Scott McN.R., Bancroft H. and Vanopruks V. (1979) Effects of immune status on dengue 2 virus replication in cultured leukocytes from infants and children *Infect. Immun.* 24: 27-30.
- 32 Salas -Benito JS., and del Angel RM. (1997) Identification of two surface proteins from C636 cells that bind dengue type 4. *J.Virol.* 71:7246-7252.
- 33 Marinneau P., Megret F., Olivier R., Morens DM. and Deubel V. (1996) dengue 1 binding to hepatoma HepG2 and VERO cells surfaces differs. *J.Gen.Virol.* 77:2547-2554.
- 34 Tyler K. and Fields B.N. (1990) Pathogenesis of viral infections. In: Fields Virology. 2nd Edition. Raven Press New York pp 191-239.
- 35 Haywood M.A. (1994) Virus Receptors: Binding, Adhesion, Strengthening and Changes in viral Structures. *J.Virol* 58(1):1-5.
- 36 Weiss R.A and Taylor Ch.S. (1995) Retrovirus Receptors *Cell*: 82:531-533.
- 37 Kennedy P.E. (1990) The use techniques in studying viral pathogenesis in the nervous system. *T.I.N.S.* 13(10): 424-430.
- 38 Weis W., Brown J.H., Cusack S., Paulson J.C., Skehel J.J. and Wiley D.C. (1988) Structure of the Influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature.* 333:426-431.

- 39 Kim J.W., Closs E.I., Albritton L.M. & Cunningham J.M. (1991) Transport of cationic amino acid by the mouse ecotropic retrovirus receptor *Nature* 352:725-728.
- 40 Wang H., Kavanaugh M.P., North R.A. & Kabat D. (1991) Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter *Nature* 352:729-731.
- 41 Figeroth J.D., Weiss J.J., Tedder T.F., Strominger J.L., Biro P.A. and Fearon D.T. (1984) Epstein-Barr virus receptor is the C3d receptor CR2. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81:4510-4514.
- 42 Borrow P. and Oldstone M.B.A. (1992) Characterization of Lymphocytic Choriomeningitis virus-binding protein(s): a candidate cellular receptor for the virus. *J.Virol.* 66:7870-7281.
- 43 Civetti O. The Neuroreceptors: one key for many locks. (1995) *J. of receptor & signal transduction research* 15(1-4):161-172.
- 44 Hanham C.A., Zhao F. and Tignor G.H. (1993) Evidence from the anti-idiotypic network that the acetylcholine receptor is a rabies virus receptor *J.Virol.* 67:530-542.
- 45 Lentz T.L. (1981) Rabies virus receptors *Trends.Neurosci.* 8:360-364.
- 46 Co M.S., Gautton G.N., Tominaga A., Homey C.J., Fields B.N., and Greene M.J. (1985) Structural similarities between the mammalian β -adrenergic reovirus type 3 receptors *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 82:5315-5318.
- 47 Ludwig G.V., Kondig J.P. and Smith J.F. (1996) A putative receptor for venezuelan equine encephalitis from mosquito cells. *J.Virol* 70:5592-5599.
- 48 Sttentau Q.J. and Weiss R.A. (1988) The CD4 antigen physiological ligand and HIV receptor *Cell* 52:631-633.

- 49 Bath S., Spitalnick S.L., Gonzalez-Scarano F. and Silberberg D.H. (1991) Galactosyl ceramide or a derivative is an essential component of the neural receptor for human immunodeficiency virus type envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58:7131-7134.
- 50 Mendenson C.L., Wimmer E. and Ricanelli V. (1989) Cellular receptor for Poliovirus; molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a new member of the Immunoglobulin superfamily *Cell* 56:855-865.
- 51 Gabel C.A., Dubey L, Steinberg S.P., Stermen D., Gershan M.D. and Gershan A.A. Varicella zoster virus glycoprotein oligosaccharides are phosphorylated during post-translational maturation. *J.Virol.* 63:4264-4276.
- 52 Wu Dumn D. and Spear P.G. (1989) Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J.Virol* 62:52-58.
- 53 Bergstrom T., Trybala E. and Spillmann (1997) Heparan sulfate and viral tropism *Nature Medicine* 3:1177.
- 54 Muñoz ML, Cisneros A., Cruz J., Das P., Tovar R. and Ortega A. (1998) Putative dengue receptors from mosquito cells. *FEMS. Microbiol Lett.* 168(2):251-8.
- 55 Putnak JR., Kanasa-Thanan N. and Innis BL. (1997) A putative cellular receptor for dengue viruses. *Nature Medicine.* 1:628-9.
- 56 Kandell E.R., Schwartz J.H., and Jessel T.M. (1991) Principles of Neural Science Third edition Ed. Appleton & Lange pp 18-32.
- 57 Birbaumer L. and Birbaumer M. (1995) Signal transduction by G proteins: 1994 Edition. *J. of receptor & signal transduction research* 15(1-4):213-252.
- 58 Pieroni J.P., Jacobowitz O. Chen J. and Lyengar R. (1993) Signal recognition and integration by G_s stimulated adenylyl cyclases *Curr.Op,Neurobil.* 3:345-351

- 59 Berridge M. (1984) Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *J.Biochem* 220:345-360c
- 60 Seger R. and Krebs E.G. (1995) The MAPKs signaling cascade *The FASEB J.* 9:726-735.
- 61 Cano E. and Mahadevan L.C. (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs *TIBS* 20:117-122.
- 62 Narayan n. Bath. (1995) Signal transduction mechanisms in glial cells. *Dev. Neurosci.* 17:267-284.
- 63 Morgan J.I. and Curran T. (1991) Stimulus transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun *Annu. Rev. Neurosci.* 14:421-451.
- 54 Curran T. (1988) Fos and Jun. The AP-1 connection. *Cell* 55:395-397.
- 65 Nairn A.C., Hemmings h.c. and Greengard P. (1985) Protein kinases in the brain. *Ann.Rev.Biochem.* 54:931-976.
- 66 Hug H. and Sarre T.F. (1995) Protein Kinase C isoenzymes :divergence in signal transduction? *Biochem J.* 291:329-343.
- 67 Schulman H. (1993) The multifunctional Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinases *Curr.Op.Cell Biol.* 5(2):247- 253.
- 68 Morgan S., Thompson M.A., and Greenberg M.E. (1991) a Ca²⁺- regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin dependent kinases. *Science* 952:1427-1430.
- 59 Irlé J.N. (1996). STATs: Signal transducers and activators of transcription, *Cell* 84:331-334.

- 70 Darnell J., Matsudaira P., Zipursky S.L., Berk A., Baltimore D. and Lodish H. (1994) *Molecular cell biology*. 2a.ed, Scientific American Books, New York 1344.
- 71 Bhat GJ, Thekumkara, W.G. Thomas, K.M. Conrad, K.M. Baker (1994). Angiotensin II stimulates is-inducing factor-like DNA binding activity. Evidence that the AT1A receptor activates transcription factor-Stat 1 and/or a related protein *J Biol Chem* 269: 31443-9.
- 72 Wagner B.J., T.E Hayes, C.J. Hoban and B.H. Cochran (1990). The SIF binding element confers *sis*/ PDGF inducibility onto the *c-fos* promoter, *EMBO J* 9 (13) 4477-4484.
- 73 Diaz—Guerra M.J.M., M Velasco, P Martin-Sanz, L Bosca (1996). Evidence for common mechanisms in the transcriptional control of type II nitric oxide synthase in isolated hepatocytes. Requirement of NF-kappa B activation after stimulation with bacterial cell wall products and phorbol esters. *J Biol Chem* 271: 30114-20.
- 74 Rajotte D, HB Sadowski, A Haman, K Gopalbhai, S Meloche, L Liu, G Krystal, T. Hoang (1996). Contribution of both STAT and SRF/TCF to *c-fos* promoter activation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor *Blood* 88: 2906-16.
- 75 Bohmann D., Bos T.J., Admon A., Nishimura T., Vogt P.K. and Tjian R. (1987) Human proto-oncogen *c-jun* encodes a DNA binding protein structural and functional properties of transcription factor AP-1 *Science* 238:1386-1392.
- 76 Vogt P.K. and Bos T.J. (1989) The oncogen *jun* and nuclear signaling. *TIBS* 14:172-175.
- 77 Michel Karin., Zheng-gang Liu. and Ebrahim Zandi. (1997) AP-1 Function and regulation. *Curr.Op.Cell. Biol.* 9:240-6.
- 78 Lamb P. and McKnight S.L. (1991) Diversity and specificity in transcriptional

LIBRARY
UNIVERSITY OF THE
STATE OF TEXAS
AT AUSTIN

regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *TIBS* 16:417-422.

79 Ogata A., Nagashima K., Hall W.W., Schikawa M., Kimura-Kurada J. & Yasui K. (1991) Japanese Encephalitis virus neurotropism is dependent on the degree of neural maturity *J. Virol.* 65:880-886.

80 Ramos-Castafieda J., Imbert J.L., Ortega A. and Ramos C. (1994) Synaptophysin and Neurofilament Expression in Neurons Infected with Dengue Virus. *Archives of Medical Research.* 25: 219-222.

81 Centers for disease control. Dengue diagnostic laboratory procedures for the Americas: a manual. (1981) CID. Public Health Department. San Juan Laboratories. San Juan Puerto Rico.

82 Tokans B.J. & Staehelin T. Biochemical characterization of cell surface using monoclonal antibodies. *Immunological Methods Vol II Academic Press.* 1981; pp 27-55.

83 Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation in microgram quantities of protein utilizing of the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

84 Laemmli U.K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄ *Nature (London)* 227:680-685.

85 Towin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA;* 76:4350-4354

86 Scriber E., Matthias P., Muller M.M. and Schaffner W. (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts", prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Research* 17: 6419.

87 Herchman H.R. (1991) Primary response genes induced by growth factors and

- tumors promoters annu. Rev. Biochem. 50:281-319.
- 88 May E.G, Orchard K (1993) An EMSA-based method for determining the molecular weight of a protein-DNA complex *Nucleic Acids Research*. 21(14):3335-3336.
- 89 Rout CG., Deolankar RP., Kolhapure ., Goverdhan MK. (1996) Susceptibility bred rodents to the experimental infection with dengue virus type 2. *Acta .Virol*. 40:3: 143-146.
- 90 Narayan R.Bath (1995) Signal transduction mechanism in glial cells *Dev. Neurosci*. 17:267-284.
- 91 Wong Ch.C., Warsh J.J., Sibony D. and Li P.P. (1994) Differential ontogenetic appearance and regulation of stimulatory G protein isoforms in rat cerebral cortex by thyroid hormone deficiency. *Developmental Brain Research* 79:136-139
- 92 Nowakowski RS, Hayes NL (1999) CNS development: an overview. *Dev Psychopathol* 11:3:395-417
- 93 Ullensvang K., Lehere K., Storm-Mathisen J. and Danbolt N. (1997) Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter proteins GLAST *Eur.J.Neurosci*. 9:1848-1655.
- 94 Oliver KR., Scallan MF., Dyson H., Fazakerley JK. (1997) Susceptibility to a neurotropic virus and its changing distribution in the developing brain is a function of SNC maturity. *J. Neurovirol*. 338-48.
- 95 Chu J, Gui CY, Fan J, Tang XD, Qiao RL (1998) STAT1 is involved in signal transduction in the EPC induced HEL *Cell Res* 8(2):105-17