



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DEL RECEPTOR PARA EL VIRUS DENGUE EN CÉLULAS NEURONALES DE RATÓN

TESIS

Que para obtener el grado académico de Doctor en
Ciencias (Biología)

PRESENTA

M. en C. José Ramos Castañeda



Director de Tesis. Dr. Celso Ramos García.

México, D. F., enero de 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A mi hijo, Eduardo Sebastián.

A Josefina Durán Bedolla.

AGRADECIMIENTOS

El autor de esta tesis agradece a los miembros del comité tutorial por su apoyo, asesoría y paciencia.

Dr. Celso Ramos García (Director de Tesis), Dr. Fernando Montiel Aguirre, Dr. Ricardo Rosales Ledezma.

Así mismo, agradezco el continuo estímulo y ánimo en la elaboración de esta tesis de:

Dr. Mario Henry Rodríguez López y el Dr. Humberto Lanz Mendoza.

En particular debo reconocer la perseverancia con la que me recordaban mi compromiso en terminar este trabajo de:

Dr. Roberto Lara Lemus, Dr. Carlos Conde González, Dr. Eduardo García Zepeda.

... y a la Dra. Rosana Pelayo Camacho quien, con su solidaridad y simpatía, me proporcionó el ánimo para terminar este trabajo.

A todos ellos mi aprecio y gratitud eterna.

José Ramos Castañeda. Cuernavaca, Morelos a 23 de enero de 2009.

Now, give me that horizon.
Capt. Jack Sparrow.
Pirates of the Caribbean: The Legend of Jack Sparrow

INDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCION	
El virus Dengue	9
Tropismo viral	18
Receptores para virus	22
Efecto de los virus en la homeostasis celular	34
JUSTIFICACION	37
OBJETIVO GENERAL	37
OBJETIVOS PARTICULARES	38
HIPOTESIS	38
MATERIALES Y METODOS	
Células	39
Virus	39
Aislamiento de proteínas de membrana de células neurogénicas/cerebro de ratón por cromatografía de afinidad	40
Secuencias vírales y plásmidos utilizados	40
Expresión de proteínas recombinantes en bacteria y baculovirus	44
Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad	45
Ensayos de unión	45
Ensayos de competencia por la unión y bloqueo de la infección	47
Evaluación de la activación de Adenilato Ciclasa	48
Evaluación de la activación de la Proteína Cinasa C (PKC)	49
Evaluación del influjo de Ca ²⁺	50
Evaluación de la actividad de Fosfolipasa A2 (PLA2)	50
Fosforilación en residuos de Tirosina	51
RESULTADOS	
Determinación de proteínas que unen al DV en la línea celular N1E-115	52
Aislamiento de la proteína de 65 kDa por cromatografía de intercambio iónico	54

Expresión de la proteína E de DEN 2 (NGC) en bacteria	56
Expresión del Ectodominio de la proteína E por baculovirus	60
Ensayos de unión con las proteínas recombinantes producidas en baculovirus	64
Activación de mensajeros intracelulares por la unión del virus	70
 DISCUSION	 71
 REFERENCIAS	 92

RESUMEN

El virus Dengue (DV) es responsable de mas de 50 millones de casos anuales de fiebre por dengue/fiebre hemorrágica por dengue en el mundo (Organización Mundial de la Salud); la región de las Américas y en particular México, ha reportado un incremento de casos durante la pasada década por lo que las infecciones causadas por DV son un problema prioritario de salud publica. Incluidos en las prioridades de investigación definidas por la OMS se encuentra el estudio de la patología molecular de este virus en su hospedero y el desarrollo de modelos experimentales de infección.

El DV infecta a mosquitos, primates y al humano, sin embargo, solo este último desarrolla un cuadro clínico; experimentalmente, el ratón lactante es susceptible y desarrolla una encefalitis severa cuando se inocula intracerebralmente, mientras que los ratones jóvenes y adultos son resistentes. Se ha propuesto que la especificidad de la infección depende de la expresión de receptores celulares para el virus en la membrana de las células blanco; así pues, el estudio de los receptores celulares para el virus es un campo de intensa investigación por los potenciales beneficios en términos de desarrollo terapéutico a nivel de bloqueo de la unión del virus a su receptor celular y al nivel de manipulación de las vías de señalización activadas por la interacción del virus con su receptor. Se sabe que el DV interactúa con diversas moléculas (glucosaminoglicanos, chaperonas, lectinas, etc.) en una variedad de líneas celulares en cultivo, no obstante, en células dendríticas humanas, el virus se une a la molécula DC-SIGN; es claro que en el caso de las líneas celulares, el valor de los estudios está limitado por el hecho de que no son células blanco naturales y, en el caso de las células dendríticas humanas, de que no es posible el estudio *in vivo* de las interacciones virus receptor en humanos. En el caso del ratón, la neurona es la célula blanco *in vitro* e *in vivo* y, aunque no reproduce la enfermedad del humano, muchas manifestaciones de la infección por DV se comparten entre el humano y el ratón infectado, sin embargo nada se sabe de la molécula que sirve de receptor celular para este virus en las neuronas del ratón.

Esta tesis tuvo como objetivo analizar el receptor para el DV en células neuronales de ratón. Para ello analicé la molécula receptora en términos de su peso molecular y sensibilidad a enzimas glucolíticas y proteolíticas mediante un ensayo en fase sólida conocido como Virus Overlay Protein Blot Assay (VOPBA); así mismo se determinó la respuesta celular a la interacción virus-receptor mediante la evaluación de la actividad de varios mediadores de cascadas de señalización.

Usando esa estrategia metodológica observamos que la molécula que une a DV en la neurona del ratón es una proteína de aproximadamente 65 kDa de peso molecular y que se expresa únicamente en neuronas de la línea celular (N1E-115) y en extractos de células de sistema nervioso central de ratón. No fue posible determinar si había una relación de la unión del virus con la región del cerebro infectada por el virus (hipotálamo) en ensayos de unión directa o mediante el uso de fragmentos de la proteína E recombinante producidos en baculovirus. Estas proteínas recombinantes se utilizaron como ligandos en un ensayo de VOPBA para determinar las condiciones optimas de unión para la cromatografía de afinidad, sin embargo, ninguna de las dos proteínas utilizadas (el ectodominio que contiene el 80% de la proteína y el dominio III) unieron al virus como para ser retenidas en la columna de afinidad. No obstante lo anterior, determiné que la interacción virus-receptor activa por lo menos tres mediadores de transducción de señales: una tirosina cinasa, la activación de PKC y la activación de PLA2.

En conjunto puedo concluir que la molécula que une al virus en células neuronales del ratón tiene naturaleza proteínica de 65 kDa de peso molecular y que está ligado a una cascada de transducción de señales asociada a la activación de PLC, lo cual es consistente con lo recientemente reportado para el receptor de laminina (LAMR1) que también parece ser un receptor para dengue en células epiteliales de cerdo. Como se mencionó antes, este es un estudio que aborda la unión del DV en una célula sensible *in vivo* en el ratón y proporciona una base de conocimiento para el estudio de la patología en el ratón inducida por la infección viral; esto último ha cobrado recientemente mas importancia ya que se han reportado varios fenotipos de ratones humanizados como modelos de la enfermedad. De manera mas general, el receptor para DV probablemente sea un complejo de moléculas asociadas (glucosaminoglicanos, chaperonas, lectinas, etc.) cuya afinidad/especificidad no sea particularmente alta por DV, pero que en la combinación correcta se expresa específicamente en la célula blanco.

INTRODUCCION

1.- El virus Dengue.

El DV pertenece a la familia *Flaviviridae*, los miembros de esta familia son envueltos y poseen un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 10 kilobases; el extremo 5' del genoma tiene un Cap de tipo I y una región no traducida de alrededor de 100 bases, después de la cual se encuentra un marco abierto de lectura que codifica para una poliproteína que es procesada por proteasas celulares y virales, la región 3' no traducida del genoma consta de aproximadamente 500 bases, en esta región no existe un cadena de poli A (Lindenbach and Rice, 2003); el orden de los genes se muestra en la Figura 1.

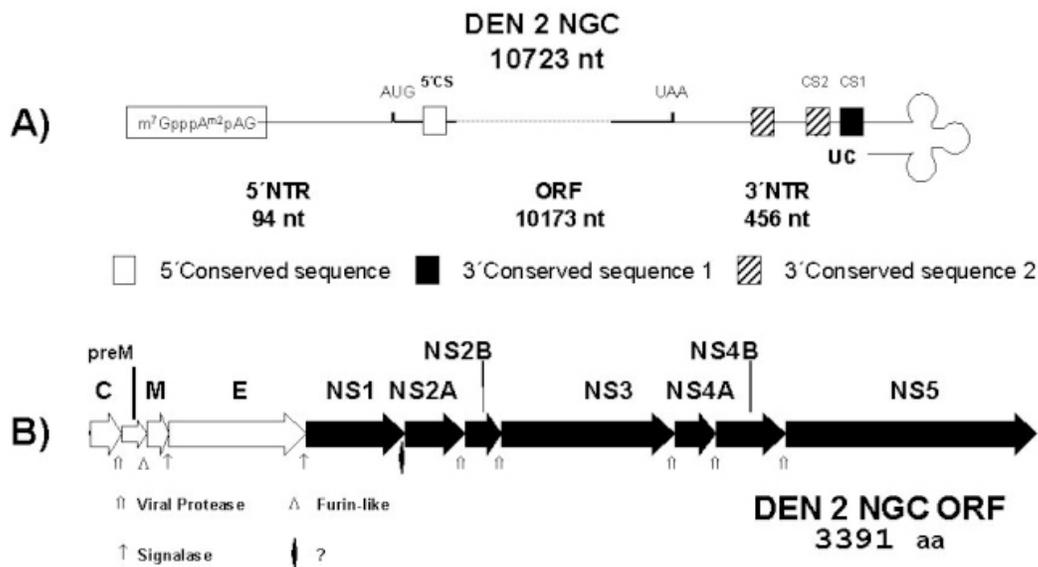


Figura 1. Esquema del genoma del virus Dengue y de la poliproteína resultado de la traducción del genoma.

El virión es esférico y de simetría icosaédrica (Figura 2); mide aproximadamente 50 nm y está constituido por tres proteínas estructurales C, E y M (Kuhn et al., 2002). La proteína C está asociada al RNA viral, tiene un peso molecular relativo (PMr) de aproximadamente 14 kilodaltones (kDa) (Lindenbach and Rice, 2003). La proteína E es una proteína glicosilada que está integrada en la membrana de lípidos y tiene un PMr de 51 a 59 kDa, es una proteína expuesta en la cual se encuentran las principales funciones biológicas y antigénicas del virus. Así, se ha demostrado que la proteína E es la responsable de la unión a las células susceptibles; además en esta proteína se encuentran epítopes de neutralización, hemaglutinación y los inductores de anticuerpos responsables del fenómeno de potenciación inmune (Mathews and Roehrig, 1984); la estructura del ectodominio ha sido resuelta por cristalografía de rayos X (Rey, 2003); así se determinó que el monómero está constituido de tres dominios (I al III) bien definidos por sus motivos estructurales: el dominio I está constituido por 120 residuos en tres segmentos (aa. 1-51, 137-189 y 285-302) y por su plegamiento constituye la región central del monómero; el dominio II está constituido por 178 residuos distribuidos en dos segmentos (aa. 52-136 y 190-284) los cuales se cree que participan en la dimerización de la proteína en la superficie del virión, además en esta región se encuentra el lazo “cd” (aa.98-113) el cual participa en la fusión de la membrana viral con la celular; el dominio III tiene una conformación similar a la de un dominio de inmunoglobulina y está constituido por 92 residuos (aa. 303-395), en este dominio se encuentran los epítopes neutralizantes que definen al serotipo y por lo tanto se cree que también se encuentra el sitio de unión al receptor celular ya que los anticuerpos neutralizantes de pacientes con Fiebre por Dengue predominantemente evitan la unión (Roehrig, 2003). La proteína M es altamente

hidrofóbica y forma parte de la membrana del virus, tiene un PMr de 8 kDa y es uno de los productos de proteólisis del intermediario glicosilado preM, aparentemente se asocia con la proteína E para estabilizar la estructura del virión y puede colaborar en la unión al receptor celular (Zhang et al., 2003). La estructura del virión maduro del DV ha sido descrita recientemente; el arreglo de los monómeros de la proteína E en la superficie de la membrana viral ha sido resuelto con base en los datos cristalográficos de el ectodominio en solución y las imágenes de criomicroscopía electrónica de las partículas virales aisladas (Kuhn et al., 2002). De esta forma, se sabe que los monómeros de proteína E se alinean dímeros antiparalelos sobre el plano de la membrana a pH neutro, esta es la razón por la que las imágenes de microscopía electrónica muestran un virión esférico con una superficie tersa; no obstante, sobre el plano paralelo a la membrana viral, los dominios III de cada monómero sobresalen en pequeñas protuberancias, este hecho se ha asociado a la presencia de sitios que unen Heparan sulfato, aunque no hay ninguna confirmación que el dominio III por si mismo tenga sitios que unan a esa molécula (Hung et al., 2004). La estructura del virión cambia radicalmente cuando el pH disminuye a niveles de vesículas endosomales (~5.5); los dímeros de proteína E transitan a una estructura trimérica donde el llamado péptido de fusión se localiza muy por encima del plano del dominio III; este rearreglo genera que el virión completo se “hinche”, sin perder la simetría icosaédrica. Es posible que esta transición permita la interacción del péptido de fusión con la membrana receptora endosomal e inestabilice la membrana viral para favorecer la fusión con la membrana endosomal.

La única modificación postraduccional que se lleva a cabo en la proteína E es la glicosilación y se ha especulado que esta modificación puede tener un papel relevante en

la unión del virus a la célula (Lindenbach and Rice, 2003; Pokidysheva et al., 2006). La proteína E tiene dos sitios potenciales de glicosilación en las posiciones Asn-67 y Asn-153, la glicosilación en éste último residuo esta conservada entre las proteínas E de los flavivirus mientras que la glicosilación en Asn-67 es característica de los DV (Heinz and Allison, 2003). Aparentemente la unión a los residuos negativamente cargados de los glucosaminoglicanos altamente sulfatados presentes en la membrana de las células, está mediada por los residuos glicano de la posición Asn-153, ya que mutaciones en esta posición permiten la fusión de la membrana virál con la membrana celular a pH alto (Guirakhoo et al., 1993); la glicosilación en el residuo Asn-67 se ha relacionado con el tropismo de la cepa viral ya que cepas vicerotrópicas están glicosiladas en dicha posición mientras que las cepas neurotrópicas no lo están (Kawano et al., 1993). En general se puede decir que, aún cuando la glicosilación de la proteína E influye en el tropismo viral, no hay evidencia que tenga un papel relevante en la unión a la membrana celular.

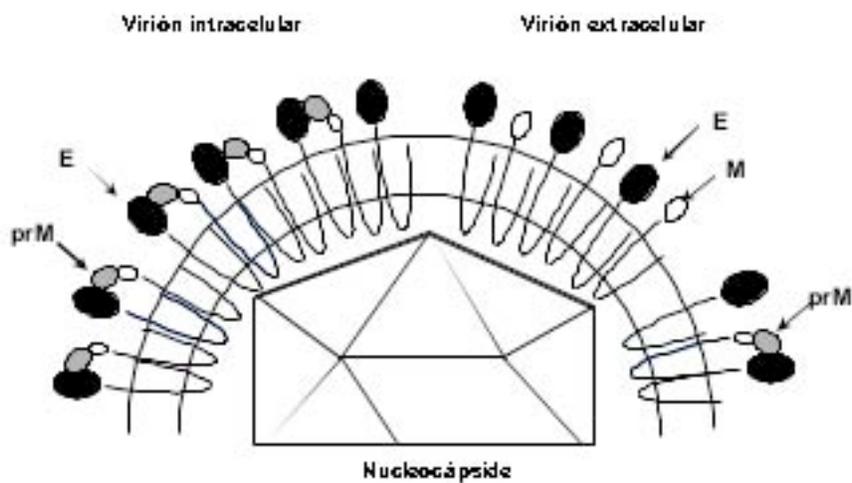


Figura 2. Esquema del virión inmaduro/maduro del virus Dengue

El DV es transmitido al humano por la picadura del mosquito *Aedes aegypti*; la infección se asocia con un cuadro febril autolimitado que en ocasiones puede complicarse con un cuadro de fiebre hemorrágica/síndrome de choque por dengue (FHD/SCD) (Monath, 1994). Se estima que en el mundo la incidencia anual es de aproximadamente 100 millones de casos y de unos 33 mil casos mortales reconocidos desde mediados de los años 50's (Thomas et al., 2003).

En los humanos la patología más importante es la de los casos de FHD/SCD, en los cuales los hallazgos clínicos y de laboratorio más relevantes son el aumento del hematocrito y la trombocitopenia (Martinez-Torres, 1995). Para explicar esta patología se han propuesto dos hipótesis, a) la potenciación inmune y, b) incremento de la virulencia (Bielefeldt-Ohmann, 1997). Propuesta por S. Halstead a fines de la década de los 60's (Halstead and Simasthien, 1970), la hipótesis de la potenciación inmune se basa en la observación de que los casos de FHD/SCD se presentan en zonas hiperendémicas donde la inmunidad cruzada no protectora, establece una precondition de riesgo; estudios *in vitro* y en animales de laboratorio demostraron que los anticuerpos no neutralizantes heterotípicos de alguna forma potencian la infección. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que las observaciones epidemiológicas iniciales fueron inexactas y que básicamente no hay correlación entre presentación de FHD/SCD y reacción inmune secundaria heterotípica (Chevillon and Failloux, 2003). No obstante, el valor del estado inmune del sujeto que es infectado por dengue, si afecta el desarrollo de la infección como se comentara más adelante. Ahora bien, todos los virus de RNA mutan en una proporción claramente mayor de lo que lo hacen los virus de DNA; los virus que se

replican en sistemas hospederos diferentes tienden a mutar todavía más por las diferentes presiones de selección que impone cada hospedero a la replicación. Dengue como muchos otros virus que tienen como hospedero vector un insecto, se enfrenta a diferentes presiones de selección, el balance y dinámica de replicación de las mutantes (quasiespecies) en una población del mismo serotipo podría determinar la virulencia de un “serotipo”, en otras palabras, a mayor variabilidad de la población del serotipo mayor capacidad de adaptación y por lo tanto, mayor virulencia (Chevillon and Failloux, 2003). Los más recientes hallazgos en el estudio de la fisiopatología de la FHD/SCD apuntan a que la capacidad de replicación del serotipo correlaciona con fenómenos que podrían desencadenar las manifestaciones hemorrágicas por ejemplo, insensibilidad al Interferón tipo I, invasión del endotelio vascular y liberación de IL-8, etc. (Medin et al., 2005; Shresta et al., 2004). Una predicción de esta hipótesis consiste en que dependiendo del grado de variabilidad de cada serotipo, siempre se puede encontrar al menos un marcador de la capacidad virulenta en el genoma de los virus aislados de casos hemorrágicos; en este sentido se sabe que ciertas estructuras en la región 3' no traducida del genoma de los genotipos de Dengue 2 están asociadas con casos hemorrágicos (Rico-Hesse, 2003) y que NS5, la polimerasa viral, aislada de casos hemorrágicos tiene una actividad ligeramente mayor que las NS5 aisladas de casos no hemorrágicos (R. Padmanabhan, comunicación personal).

En el ratón la infección por dengue causa un padecimiento neurológico cuya severidad depende de la edad y de la vía de inoculación (Hotta et al., 1981); en este animal y en el humano los DV se replican principalmente en células del sistema retículo endotelial, macrófagos y células dendríticas; además, el virus puede infectar a células del

tejido cerebral (Tyler and Fields, 1990). El virus se puede aislar desde el tercer día de infección del cerebro de ratones infectados por vía intraperitoneal y los estudios inmunohistoquímicos realizados a cortes de cerebro de estos ratones muestran la presencia del antígeno viral en el citoplasma de las neuronas y en la microglia exclusivamente; la replicación del virus produce necrosis de amplias zonas del cerebro con escaso infiltrado inflamatorio, por lo que se sugiere que la infección de las neuronas se asocia con alteración funcional y muerte de las mismas, dejando a un lado la reacción inmune como causa de la patología (Sanchez-Burgos et al., 2004).

Se cree que los flavivirus pueden llegar al SNC por vía hematológica (Tyler and Fields, 1990); posterior a su replicación en los macrófagos de sangre periférica que se acompaña de una elevada viremia; los virus pueden alcanzar el cerebro a través de la barrera hematoencefálica o de los plexos coroideos. Se ha demostrado que otros virus neurotrópicos, entre ellos algunos flavivirus, pueden atravesar el endotelio sin una alteración aparente (Dropulic and Masters, 1990), así mismo se ha demostrado que DV puede replicarse en células endoteliales en cultivo y que la infección se acompaña de la secreción de IL-8 que como es conocido puede tener efectos citotóxicos en ciertas poblaciones celulares (Huang et al., 2000).

La infección en el ratón está limitada por el contexto genético, la edad del animal, la cepa de virus y el número de pases *in vivo* e *in vitro*; así, los flavivirus aumentan su neurotropismo cuando se pasan en cultivo de células o por inoculación en cerebro de ratón lactante (Monath, 1990). Lo anterior se debe en parte a que las poblaciones virales son una mezcla de pseudo especies que son seleccionadas con base en el desempeño replicativo en el hospedero que infectan, de tal forma que solo las pseudo especies que

tienen una replicación vigorosa en el hospedero, son amplificadas y se convierten en dominantes (Holmes and Twiddy, 2003), es bien sabido que los virus aislados de casos humanos se replican pobremente en ratón y que los virus aislados de ratón pasados en células de mosquito tienen periodos largos de adaptación antes de alcanzar los títulos máximos de replicación (Monath, 1989).

In Vitro el DV infecta un amplio espectro de estirpes celulares de mamíferos e insectos; no obstante, las células blanco en humanos y en la infección experimental en ratón son principalmente las células del Sistema Retículo-Endotelial y las neuronas. De hecho, casi todos los flavivirus tienen cierto grado de neurotropismo; se ha sugerido que la diferencia en los patrones de infección del sistema nervioso central de los animales susceptibles por los flavivirus depende del tipo de molécula que el flavivirus use como receptor celular; en principio se postuló a los receptores para neurotransmisores como receptores para los flavivirus (Monath, 1989), pero dos evidencias sugieren que de existir un receptor celular éste no estaría relacionado con los receptores para neurotransmisores; la primera evidencia muestra que la susceptibilidad a la neuroinfección, en ratones, depende de la madurez del cerebro, ya que después del nacimiento solo algunas áreas del cerebro se mantienen susceptibles a la infección (Yasui, 2002); si la infección depende de la expresión del receptor, entonces éste solo se expresa durante el desarrollo de la maduración neuronal y los receptores para neurotransmisores se expresan en todo momento durante la vida del animal. La segunda evidencia es que el DV infecta neuronas pero no infecta células gliales (Sanchez-Burgos et al., 2004), ambas estirpes celulares comparten receptores funcionales para neurotransmisores; por lo que, si la infección depende de la presencia de este tipo de receptores, entonces, las células gliales deberían

ser infectadas por el DV. Por lo tanto, aún se desconoce la identidad del receptor celular para el virus; no obstante, se sabe que en células de riñón de mono, el virus se une a la membrana de estas células a través de glucosaminoglicanos altamente sulfatados (GGA's) (Chen et al., 1997); si bien las GGA's son moléculas que pueden servir de entrada al virus, definitivamente no son el receptor celular, pues *in vivo*, células con alto contenido de estas moléculas son refractarias a la infección y células con bajo contenido de GGA's, como las células del sistema retículo endotelial, son infectadas. Esto ha llevado a sugerir que el receptor celular específico para el virus debe ser una molécula diferente a los GGA's.

En el SNC del ratón, Imbert y colaboradores demostraron que los DV infectan principalmente neuronas (Imbert et al., 1994); la infección es productiva ya que el virus se libera al medio en aproximadamente el 30 % del inóculo inicial, lo cual quizás sea reflejo del número limitado de neuronas susceptibles; menos del 10 % de las neuronas presentes en el cultivo se infectan aún por largos periodos. La morfología de las neuronas infectadas es predominantemente bipolar, por lo que, es probable que haya una subpoblación neuronal sensible a la infección. Una observación que apoya lo anterior es la susceptibilidad, de diversas líneas celulares neurogénicas a la infección por JEV, Hase y cols., demostraron mediante microscopia electrónica que el virus infecta a las células NG108-15 pero no a células híbridas (Hase et al., 1990). Los autores sugieren que la susceptibilidad de las células NG108-15 se puede deber a que poseen el receptor para el virus, mientras que las células híbridas lo han perdido. En general, los flavivirus presentan diversos patrones de neuropatogenicidad, tal vez, esto se deba a que los virus utilizan diferentes receptores en las neuronas.

2.- Tropismo viral

El tropismo viral es la capacidad que tienen los virus para infectar poblaciones selectas de células (Tyler and Fields, 1990). Desde un punto de vista reduccionista, el tropismo viral depende de la expresión de factores del virus que al interactuar con factores celulares establecen una relación que determina la patología de las infecciones causadas por virus, en ese contexto, se pueden diferenciar dos conceptos relacionados al tropismo que más adelante se discutirán en extenso pero que es pertinente mencionar; para que una infección productiva se pueda establecer, la célula invadida por el virus debe ser permisiva, esto es, permitir la replicación completa y eficiente del virus, entendiéndose como eficiente la producción de virus infecciosos; por otro lado, es posible que la célula pueda ser invadida sin evidencia de replicación, por ejemplo en el caso de las células endoteliales cuando el virión es transportado de la luz del capilar al parenquima celular, en estos casos, las células son susceptibles al virus en el sentido de que tienen receptores celulares que les permiten invadir las células pero por diferentes situaciones no se llega a completar el ciclo de replicación, esto es lo que se conoce como susceptibilidad celular (Nathanson and Ahmed, 1997). Actualmente el tropismo viral es un campo de intenso estudio, tanto por sus aplicaciones inmediatas en la profilaxis y terapia de las enfermedades virales, como por los aportes en el conocimiento de las funciones celulares.

El análisis del tropismo viral está relacionado con el estudio de la patogénesis de las enfermedades causadas por virus. En principio, si un virus infecta a un órgano específico se puede establecer la relación causal que provoca el padecimiento. A nivel del

huésped los factores como la edad, el contexto genético, la vía de entrada y la diseminación, son elementos que limitan la capacidad virulenta del virus (Tyler and Fields, 1990).

En el ratón existe información que documenta la dependencia de la infección con la edad; por ejemplo, la mayoría de los flavivirus inoculados por vía intracerebral provocan encefalitis mortal en el ratón lactante pero muy pocos en el ratón adulto (Hotta, 1967); se desconocen las bases moleculares de esta restricción, sin embargo Ogata y cols (Ogata et al., 1991), demostraron que el tejido obtenido del SNC de ratón lactante es el blanco de la infección cuando se transplanta al cerebro de un ratón adulto y que posteriormente se infecta con el virus JE, mientras que el tejido adulto permanece refractario; esta diferencia se atribuye a la presencia en el tejido inmaduro de un receptor para el virus JE el cual se expresa diferencialmente según la edad del animal.

Indudablemente, el contexto genético del huésped es uno de los principales determinantes del desarrollo de una infección viral; así en el ratón, algunos flavivirus infectan solo a algunas cepas singénicas (Monath, 1990); aparentemente la habilidad para resistir la infección está relacionada con una disminución en la replicación viral en los tejidos de estos animales y los ratones resistentes a la infección son más susceptibles a la acción antiviral del interferón (Diamond, 2003); los ratones A2G son resistentes a la infección por el virus de la influenza A; esta resistencia se hereda de manera autosómica dominante asociada al alelo Mx del cromosoma 16 del ratón; la resistencia está mediada por la acción del interferón alfa y beta, ya que cuando los ratones son inoculados con anticuerpos anti-interferón, la resistencia se pierde; así mismo, sí se transfectan células con el cDNA que codifica para la proteína Mx en animales sensibles, éstos se convierten

en resistentes y el estudio de ratones sensibles mostró una delección en el gene Mx que lo vuelve defectuoso (Samuel, 2001). La limitación en la replicación del virus asociada con el contexto genético se ha observado en infecciones por herpesvirus, poxvirus, papovavirus, rhabdovirus, coronavirus, retrovirus y arenavirus (Frodsham and Hill, 2004). En la mayoría de los casos los genes que determinan la resistencia aparentemente se segregan independientemente, lo que sugiere que la resistencia es el resultado de una variedad de mecanismos. En el caso específico de Dengue, la respuesta antiviral mediada por Interferón tipo I parece ser la que determina el balance entre salud y enfermedad; células tratadas con Interferón tipo I previamente a la infección, impiden la replicación viral, mientras que células que son tratadas con IFN al momento de la infección sustentan la replicación viral de manera indistinta a los controles no tratados (Diamond et al., 2000); aún más se ha demostrado que algunas proteínas no estructurales de Dengue 2 son capaces de bloquear la señal dependiente de STAT (Ho et al., 2005; Jones et al., 2005; Munoz-Jordan et al., 2003), lo que vincula directamente la replicación viral con el bloqueo de la señal de IFN. Pichyangkul y colaboradores (Pichyangkul et al., 2003), reportaron que el número de células dendríticas periféricas aumenta y se sostiene durante el curso de las infecciones que resultan en cuadros relativamente benignos, mientras que disminuyen en sujetos que desarrollan formas hemorrágicas, estas células son las fuentes principales de IFN I y obviamente los niveles de esta citocina corren paralelos con la densidad de estas células dendríticas en la circulación periférica. En conjunto estas observaciones resaltan el papel del IFN I en el control de la infección por Dengue

El sitio de entrada al organismo influye en el tropismo, también secuencias en los genomas virales que permiten una expresión selectiva de productos virales conectados

con las patologías que pueden provocar ya sea porque la expresión solo afecta una estirpe celular que contiene el factor celular que interactúa con el viral o porque la expresión de este factor está relacionado de alguna manera con el ciclo celular o el estado de diferenciación (Nathanson, 1997). Todo lo descrito anteriormente evidencia el hecho de que el tropismo viral es el resultado de una compleja red de interacciones entre factores virales y celulares.

La interacción virus-membrana plasmática es el primer elemento a considerar cuando se analiza el tropismo viral por una estirpe celular específica. La interacción del virus con la célula puede estar mediada por las proteínas virales de unión (PVU) y los sitios celulares de unión; es importante enfatizar que las PVU pueden estar constituidas por más de una proteína del virión, como en el caso de los herpesvirus y picornavirus (Lomberg-Holm, 1981). La interacción del DV con la membrana plasmática está mediada por la proteína E, sin embargo, se ha sugerido que la proteína M tiene un papel importante durante la unión, ya sea estabilizando la interacción virus-receptor o participando directamente en la unión (Wang et al., 1999). Así, durante el evento de unión pueden participar diferentes proteínas virales, en algunos casos se han definido los dominios de unión en las PVU mediante técnicas de mutagénesis dirigida o a través de mapeo de epítopes neutralizantes con anticuerpos monoclonales. Es evidente que los elementos que confieren el tropismo celular se encuentran en regiones discretas de las PVU; en el caso del virus de la influenza, los estudios de cristalografía de rayos X demuestran que el dominio de unión a la célula se encuentra en el extremo distal de la cabeza globular de la hemaglutinina viral (Wiley and Skehel, 1977). En otros casos, la región de unión está definida por una superestructura formada por varias proteínas del

virión; algunos picornavirus como polio, rinovirus 14, mengovirus, ECMV y FMDV muestran una topología similar en la superficie externa caracterizada por grandes protuberancias rodeadas por depresiones por debajo del plano superficial que están distribuidas, cada cinco veces, alrededor de un eje de simetría icosaédrico; estas depresiones están formadas por una parte de la proteína de la cápside (VP1) y del extremo carboxilo terminal de la proteína VP3 (Racaniello, 1996). Un ejemplo notable de como las PVU participan en el tropismo, es mediante su modificación por cambios inducidos; Neda y colaboradores (Neda et al., 1991), modificaron por medios químicos la PVU de un retrovirus murino, en los cuales la actividad glucolítica de la PVU permite la adsorción a la membrana; por esta metodología demostraron que el cambio de la especificidad en la actividad glucolítica de la PVU, cambia la especificidad celular; se han reportado observaciones similares con el virus de la influenza, el cual se une a residuos de ácido siálico en la membrana de las células blanco; el cambio de un aminoácido en la PVU modifica la especificidad por el carbohidrato al que se une en la membrana plasmática (Glaser et al., 2005).

3.- Receptores para virus

Los virus envueltos se unen a la membrana celular por la unión a una molécula en la membrana celular, estas moléculas reciben el nombre genérico de receptores celulares (McClintock and Notkins, 1984). Aunque es claro que la presencia de receptores celulares es uno de los elementos que determinan el tropismo de algunos virus, su distribución en los tejidos no siempre se correlaciona con la localización de los sitios de replicación del virus; por ejemplo, el receptor para poliovirus es una molécula ubicua, sin

embargo, el virus solo se replica en algunos tejidos del huésped (Tyler and Fields, 1990). Los virus puede utilizar diferentes estrategias de unión a la célula lo cual depende de su origen y tipo; así, los flavivirus infectan a células de mosquito principalmente mediante la interacción con un receptor celular que permite la fusión de la membrana viral con la membrana plasmática, mientras que en células de mamífero la unión parece estar mediada por un receptor celular que esta asociado a la via endocitica de la célula (Hase et al., 1989). Algunos virus pueden utilizar diversos receptores como es el caso de algunos retrovirus murinos y del HIV (Harouse et al., 1991; Maddon et al., 1986; Somerfelt and Weiss, 1990). Algunos virus, relacionados o no, pueden compartir receptores celulares, por ejemplo el virus Visna, Semliki Forest Virus y Lactate Dehidrogenase Virus (Dalziel et al., 1991; Kowalchyk and Plagemann, 1985; Lundstrom, 2002), lo que sugiere que la propiedad de unión a una célula puede establecer una relación evolutiva conservada.

La naturaleza química de los receptores celulares es diversa e incluye azúcares simples o complejos, glicolípidos, fosfolípidos y glicoproteínas (McClintock and Notkins, 1984). Aunque la caracterización estructural y fisicoquímica de la interacción virus-receptor se ha hecho en gran parte, utilizando sistemas virus-azúcar, actualmente se considera que los fenómenos relacionados con la unión de los virus a las proteínas celulares explican mejor la patogénesis viral, básicamente por dos razones; a) la expresión de una proteína de membrana plasmática está regulada a varios niveles y este hecho podría influir en el efecto que ejercen sobre el tropismo viral los factores del huésped y b) algunos receptores realizan funciones de comunicación celular y si éstos son susceptibles de "activarse" por la unión del virus, entonces se podrían explicar algunos fenómenos donde la replicación viral o la respuesta del huésped parece no ser el evento

principal en la patogénesis (Holmes, 1981; McClintock and Notkins, 1984), por ejemplo, una cepa defectiva del F-MuLV provoca eritroleucemia en el ratón, la unión de este virus a eritroblastos se lleva a cabo a través de receptores para eritropoyetina y se sabe que la unión promueve la proliferación de eritroblastos de la misma manera en que lo hace la eritropoyetina, por lo que es posible que la unión del virus promueva la eritroleucemia (Li et al., 1990).

La caracterización de receptores celulares para virus es un campo de estudio intenso básicamente por que se puede decir que la presencia del receptor determina la susceptibilidad de la célula blanco y por que si conocemos y entendemos la forma en que un virus se une a la célula blanco, podemos modificar esa unión de tal forma que podemos bloquear la entrada del virus. Ambas razones parten del supuesto que los receptores para virus son específicos; no obstante el concepto de especificidad esta poco discutido, pongamos de ejemplo el caso del HIV (Pohlmann and Reeves, 2006), el virus en sus primeras rondas de replicación se une a la proteína CD4 y al coreceptor en los linfocitos T, sin embargo, para sostener la infección e infectar otras células, los siguientes ciclos infecciosos tienen que ser iniciados por la interacción con el receptor para quimiocinas C-X-C; el llamado coreceptor es necesario para la internalización, pero no para el enlace a la célula, así que el coreceptor es una molécula con una función mas cercana a las moléculas de reconocimiento vesicular (SNARE) que a un receptor (Sollner, 2004); una molécula mas cercana a una función de coreceptor es el heparan sulfato y en general los glucosaminoglicanos sulfatados (Olofsson and Bergstrom, 2005); estas moléculas son ubicuas y se puede especular que son los elementos celulares que “enganchan” a los virus a sus blancos celulares, esto es especialmente importante para

virus que son diseminados por vía hemática, pues la posibilidad de encontrar a su receptor “especifico” es proporcional a la concentración del virus en la sangre, esta concentración es, al inicio de la infección, pequeñísima, así que para que arrancara la infección se requeriría que el receptor específico estuviera en una cantidad inmensamente mayor que la concentración del virus lo cual es prácticamente imposible por razones cinéticas que mas adelante serán discutidas; así pues, para el caso de HIV tenemos tres “receptores” descritos, la eliminación de cualquiera de ellos reduce o evita por completo la infección, así que los tres son específicos en ese sentido, pero solo la molécula CD4 está vinculada al tropismo viral ya que el heparán sulfato está distribuido en prácticamente todas las células del organismo y aunque el receptor para quimiocinas está más restringido en su espectro celular de expresión, por si mismo no sostiene la unión a la célula blanco; así que el receptor “especifico” es la molécula CD4. El concepto de receptor específico es doble, en el sentido que tiene que cubrir los requisitos de interacción entre moléculas diferentes (afinidad o avidéz) así como explicar la distribución tisular y el tropismo. Ahora bien, el conocer y caracterizar el receptor viral permite entender la susceptibilidad de la célula blanco y diseñar métodos terapéuticos para bloquear la unión del virus a la célula, solo si el receptor es específico en los términos en que se ha definido; no obstante la misma definición tiene una debilidad argumental: se define en función de los hallazgos patológicos no en función de la capacidad efectiva de unión; un caso ilustrativo de esta debilidad es el caso del receptor para poliovirus; polio provoca un padecimiento neurológico que afecta a neuronas motoras; el receptor es la molécula CD155, el homólogo de ratón no une polio y la distribución tisular de CD155 incluye las neuronas motoras que son las células que al ser

dañadas provocan la patología (Hogle, 2002), hasta aquí CD155 es un receptor específico para polio, no obstante, las neuronas no son las únicas células que expresan al receptor y la unión se da independientemente del origen celular del CD155, así que es más probable que la patología y el tropismo estén asociados a factores celulares que se expresan después de la unión viral (Ohka and Nomoto, 2001). Una paradoja de este razonamiento es que no se requiere “especificidad” en la unión a la célula para establecer una relación de tropismo que explique la patogénesis, pues los eventos que ocurren corriente abajo de esta interacción son los que determinan el resultado final.

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

1) Primero se realizan experimentos de unión del virus (ó PVU) con la célula blanco, seguidos de la recuperación del complejo virus-receptor por inmunoprecipitación (Holmes, 1981); esta metodología presenta dos problemas, en primer lugar no siempre la unión virus receptor es estable en las condiciones de concentración de detergente y fuerza iónica del amortiguador de precipitación; para solventar este problema se han utilizado reactivos entrecruzadores que estabilizan la interacción al formar enlaces covalentes intermoleculares, sin embargo, esta modificación introduce otro tipo de problema como es la especificidad del complejo formado o la posterior disociación del complejo con objeto de caracterizar la proteína entrecruzada (Ghosh et al., 1992); en segundo lugar se tiene que realizar la purificación del complejo virus-receptor precipitado con objeto de tener una preparación pura del receptor cuyo rendimiento es bajo.

2) Se han utilizado anticuerpos anti-idiotipo generados contra anticuerpos neutralizantes anti-virus como ligandos del receptor celular en una cromatografía de afinidad (Kopecky et al., 1999; Pan et al., 1995); ya que el epítoto de neutralización es el sitio de la PVU que interactúa con el receptor celular, los anticuerpos contra el idiotipo del anticuerpo neutralizante, representan la imagen del sitio de unión al receptor celular que fácilmente se puede acoplar a un soporte de cromatografía, de esta forma la elución del receptor de la columna es relativamente sencilla, además de incrementar el rendimiento en la purificación del receptor; sin embargo, esta metodología está limitada por el hecho de que no siempre el epítoto de neutralización es el sitio de unión al receptor celular, por ejemplo, se sabe que los rinovirus se unen a la molécula ICAM-1 a través de la PVU, que es una superestructura análoga a la del virus de la influenza, estudios de difracción de rayos X demostraron que el sitio de unión es tan estrecho, que prácticamente es inaccesible al anticuerpo (Bella et al., 1998).

Una variante de este procedimiento es la utilización de la PVU como ligando en la cromatografía (Hennache and Boulanger, 1977); el problema es la obtención de PVU en una cantidad suficiente para acoplarla a una columna, no obstante, actualmente por medio de técnicas de DNA recombinante se pueden obtener cantidades suficientes de una proteína expresada en sistemas eucariontes.

3) Los anticuerpos que bloquean la unión del virus a la célula ha sido uno de los métodos utilizados con mayor éxito en el aislamiento de receptores virales; se obtienen anticuerpos monoclonales contra proteínas de membrana plasmática que tengan la habilidad de bloquear la unión del virus a la célula blanco (Dorig et al., 1993); ya sea por impedimento estérico o porque el epítoto en la proteína reconocido por el anticuerpo sea

el sitio de unión a la PVU. Estos anticuerpos son utilizados en la purificación del receptor celular y en ensayos de inmunohistoquímica tendientes a establecer la correlación entre la distribución de receptores y los hallazgos patológicos asociados en infecciones *in vivo* (Tignor G.H and Shope, 1984).

Existen otras metodologías enfocadas para proporcionar evidencias de la existencia de receptores proteínicos sin que ello implique el aislamiento de la molécula; por ejemplo, el virus de la polio infecta exclusivamente células de primates así que se puede localizar el sitio del cromosoma en donde reside la sensibilidad, por medio de la generación de heterocariontes entre células de ratón y humanas; si se sigue mapeando, se puede tener una idea bastante aproximada de la identidad del gen, de hecho, de esta manera se definió el primer receptor celular para un virus, el receptor para polio (Harrison, 1993).

El ensayo de unión en fase sólida conocido por "virus overlay protein blot assay, VOPBA" utiliza proteínas que se extraen de tejidos o células sensibles y se separan por SDS-PAGE, posteriormente son transferidas a un soporte de nitrocelulosa o nylon, el cual se incuba con el virus (Gershoni et al., 1986). La existencia de una proteína que sirva de receptor celular para el virus permite su unión la cual se puede evidenciar por medio de anticuerpos dirigidos contra el virus; una objeción a esta técnica es que la preservación del sitio de unión en la proteína celular en las condiciones desnaturalizantes del SDS-PAGE es bastante cuestionable, sin embargo uno de los receptores para virus mejor caracterizados, el del virus de la hepatitis murina, fue detectado precisamente por esta metodología (Boyle et al., 1987) y sigue siendo hasta la fecha un método de referencia para el estudio de moléculas de unión.

Uno de los objetivos para aislar y caracterizar el receptor celular para el virus es el de clonarlo y expresarlo en sistemas eucariontes (Dveksler et al., 1991; Kim et al., 1991); con este material se pueden realizar experimentos de transfección en células resistentes con el fin de conferirles sensibilidad a la infección. No obstante, aún con toda esta información el análisis del tropismo viral mediado por receptores celulares está lejos de ser concluyente; por ejemplo, mediante el uso de diversas metodologías, se estableció que una molécula relacionada con la familia del antígeno carcino-embriionario es el receptor celular para el MHV (Dveksler et al., 1991); sin embargo, se ha reportado que otros factores pueden estar involucrados en el tropismo ya que los animales resistentes a la infección por MHV, expresan funcionalmente al receptor (Yokomori and Lai, 1992b) y por otro lado, algunas células sensibles a la infección no lo expresan (Yokomori and Lai, 1992a); por lo que se ha postulado la existencia de un segundo receptor (Compton et al., 1992; Holmes et al., 2001; Yokomori and Lai, 1993). Este ejemplo ilustra la complejidad de la definición misma de receptor celular, ya que, aun cuando nivel celular se pueda caracterizar un receptor específico, a nivel de organismo, la designación de receptor específico para un virus debe incluir no solo a la molécula de unión, además, la explicación sobre la distribución, tropismo y resistencia/susceptibilidad órgano específica.

Poco se sabe de la interacción virus-receptor al equilibrio, esto es así porque no se conocen todos los factores relacionados con la naturaleza de esta interacción y además por limitaciones metodológicas que impiden desarrollar un modelo cinético general (Damm and Pelkmans, 2006; Jindrak and Grubhoffer, 1999; Saterbak et al., 1993; Wickham et al., 1990). Antes de comenzar a describir el modelo de trabajo de Wickham,

es conveniente precisar algunos conceptos: como ya se mencionó la molécula en el virión que sirve de enlace con el receptor celular (Unidad del Receptor Celular, URC) es la PVU y la estructura que contiene uno o más URC y que une efectivamente al virión se llama Sitio Receptor Celular (SRC); es pertinente hacer la distinción entre URC y SRC pues ambos conceptos surgen de supuestos cinéticos diferentes, a saber: a) Existen más URC que SRC en la célula; b) La avidéz de SRC para un virus es mayor que la afinidad del URC; c) El reclutamiento URC en SRC provoca cambios en el movimiento y tal vez, en la composición lipídica local de la membrana celular. De hecho, se considera que mientras la unión del virus a la URC es monovalente, la formación del SRC es resultado de interacciones multivalentes (Wickham et al., 1990). Wickham y cols., propusieron tres modelos cinéticos que representan la unión del virus a la célula, éstos se presentan en la siguiente figura 3:

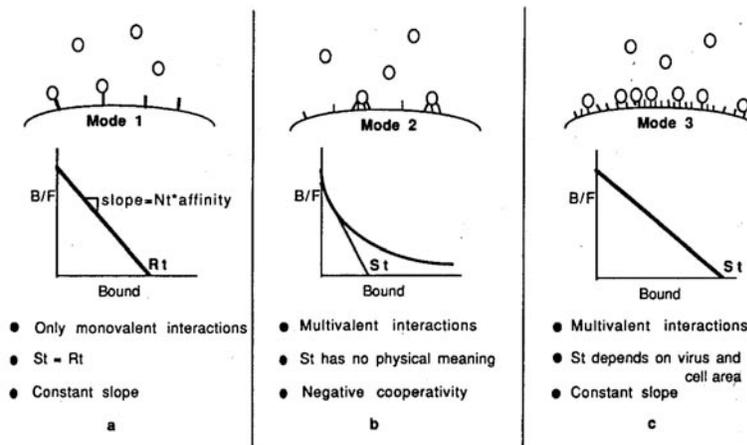


Figura 3. Modelos Cinéticos de Unión de Partículas Virales Receptores Celulares
(tomado de Wickham T.J, 1990)

Estos modelos consideran que solo una pequeña porción del virus se inactiva y la reacción de internalización es un proceso irreversible (Damm and Pelkmans, 2006). La cinética del primer modelo muestra un proceso de pseudo-primer orden comparable con la reacción enzima-sustrato, este modelo predice una alta dependencia con la densidad de receptores y se lleva a cabo cuando el número de receptores es relativamente pequeño. Esto tiene implicaciones biológicas importantes ya que en este caso la constante de afinidad (K_a) debe de ser alta para sostener la infección en un medio diluido, por ejemplo, la circulación sistémica en un organismo vivo; *in vitro*, donde la concentración de virus puede llegar a ser alta (de más de 300 partículas virales por célula), la reacción solo se ve limitada por la difusión de la partícula viral a la membrana celular. La relación entre receptores de alta y baja afinidad se ilustra en el caso de la interacción de HIV con sus receptores, así la K_a para la interacción CD4-HIV está en el orden nM (Fleury et al., 1991), CD4 es una molécula de adhesión y se considera que el hecho de que muchos receptores virales sean precisamente moléculas de adhesión es debido a que la interacción que establecen los virus con este tipo de proteínas es de alta afinidad (Wang, 2002); la K_a de la interacción entre HIV y los receptores para quimiocinas C-X-C está en el rango μM (Hoffman et al., 2000), los receptores de quimiocinas C-X-C son receptores que no están relacionados a ninguna función de adhesión celular, entonces, es valido suponer que la relativamente baja afinidad de la interacción esta vinculada con la razón por la que los receptores C-X-C sean solo coreceptores para HIV.

El segundo y tercer modelos parten del hecho de que los virones poseen múltiples copias de la PVU en su superficie y ello promueve la formación de enlaces multivalentes con los receptores celulares. El segundo modelo propone una saturación de receptores por

la formación de enlaces multivalentes, en este caso la K_a se calcula suponiendo prácticamente nulos los efectos de difusión lateral de los receptores en la membrana y su estado de fluidez (Incardona, 1981; Wickham et al., 1990); la cinética muestra una cooperatividad negativa, sin embargo, ésta se debe tomar con precaución ya que otros mecanismos como la unión monovalente combinada con la unión inespecífica o la presencia de dos poblaciones de receptores en la membrana, pueden provocar el efecto de cooperatividad negativa. El tercer modelo supone una saturación espacial de los receptores por unión multivalente; la diferencia con el anterior modelo es que mientras en el segundo la limitante es el número de receptores, en éste, la limitante es el número de enlaces posibles entre los receptores y las PVU en la partícula viral; como es evidente en este caso, la afinidad de la interacción, depende únicamente del área efectiva de unión a la membrana, la cual define tanto por el número de PVU que se encuentran en el plano apropiado de interacción con los receptores celulares como por la propia superficie de la membrana celular. En ambos modelos la formación de enlaces multivalentes provoca un ligero aumento de la afinidad, sin embargo, en estos casos la unión se ve favorecida por el alto número de receptores celulares, esto podría explicar la idea de que los virus que se unen con una relativamente baja afinidad a sus células blanco, tienen una alta densidad de receptores celulares en ellas y si esto es así, los receptores en estas células deben de ser moléculas ubicuas y simples como los azúcares o lípidos, por ejemplo, la K_a para la interacción galactosil ceramida-HIV se ha calculado en una magnitud cercana al rango mM, de la misma forma la K_a para la interacción ácido sialico-Influenza A (Conboy et al., 2002; Skehel and Wiley, 2000).

En general la afinidad de la interacción virus-receptor celular es alta. Esto se debe en gran medida a la capacidad de los virus de formar enlaces multivalentes con sus receptores celulares. El hecho de que la interacción virus-célula tenga una afinidad de por lo menos tres órdenes de magnitud mayor que la afinidad de la interacción ligando-receptor establece una limitante metodológica en la caracterización de los receptores para virus, pues cualquier ensayo en el que se pretenda competir un ligando monovalente contra un virus fallará por el hecho de que no se podrán establecer las condiciones de equilibrio necesarias para detectar la unión específica; en otras palabras, la interacción virus-célula es, en comparación a la del ligando monovalente-receptor, prácticamente irreversible (Damm and Pelkmans, 2006; Wang, 2002).

La unión del virus a la membrana es un fenómeno prácticamente insensible a la temperatura; la cual, en todo caso, influye en la difusión del virus al modificar ligeramente las condiciones del medio de cultivo; así pues, la unión se puede llevar a cabo a 4 °C y se estima que la tasa de unión se incrementa entre 1.3 y 2 veces por cada 10 °C en el rango de 10 a 40 °C según el tipo de virus (Wickham et al., 1995); así mismo, el pH del medio puede influenciar la interacción en dos formas; varios grupos han reportado que cuando el pH del medio extracelular es ácido, la interacción virus-célula que se favorece es la fusión de membranas y esto ha permitido proponer que los virus que son internalizados por endocitosis mediada por receptores se desnudan fusionando su membrana con la del endosoma cuando en esta vesícula disminuye el pH (Dimitrov, 2004); por otro lado, el pH puede modificar la conformación de la PVU, uno de los ejemplos más conocidos es la hemaglutinación por flavivirus, los cuales aglutinan

eritrocitos de ganso en el rango de pH 6 a 7.5, siendo una característica de cada serotipo el pH óptimo de hemaglutinación (Schlesinger, 1977).

4.- Efecto de los virus en la homeostasis celular.

Es un hecho que la replicación viral compite con el aparato de transcripción y traducción celular para formar nuevos viriones y que esto provoca todo tipo de cambios en la expresión de genes y fenómenos de activación/supresión de funciones celulares, antes de llevar a la muerte celular. Algunos de estos fenómenos podrían ser iniciados por la unión del virus a su receptor celular y si esto es así, una parte de la caracterización del receptor celular para un virus, en el sentido que Wang da al concepto de receptor fisiológico (Wang, 2002), consiste en la caracterización de las vías del metabolismo celular que la interacción virus-receptor afecta. A continuación se describen algunos ejemplos de cómo los virus modifican la homeostasis celular, con énfasis en aquellos causados por virus RNA.

Los virus cuyo genoma es de DNA y los de RNA que forman un intermediario de DNA para transcribir sus mensajeros (familia *Retroviridae*) compiten con las actividades celulares que permiten la transcripción de sus genomas. así pues, se han descrito los siguiente fenómenos: 1) Inhibición de la transcripción celular, ya sea por inhibición de la RNA polimerasa II o porque la RNA polimerasa viral sea más eficiente en utilizar los abastos celulares de ribonucleótidos trifosfato; otra forma de inhibir la transcripción celular es la generación de un intermediario viral que bloquee la elongación de las cadenas nacientes de RNA heteronuclear como se ha descrito en el caso de VSV (Berk, 2005; Dickinson et al., 1998; Marvaldi et al., 1977); 2) Estimulación de la actividad

transcripcional celular por factores virales contenidos en el virión; algunos virus, como el HSV, tienen una proteína estructural que interacciona con factores de transcripción como el OTF-1 que aumenta la transcripción de los genes tempranos virales (Nguyen-Huynh and Schaffer, 1998); 3) Modificación en la actividad de los factores de transcripción celulares, ya sea porque los productos virales modulen el estado de fosforilación de factores de transcripción celulares - y con ello modulen la actividad del factor de transcripción - o porque actúen en conjunto con factores celulares que transactiven genes virales o trasrepriman genes celulares (Tang and Maul, 2003); 4) Inducción o expresión de factores que se unen a DNA; se han descrito diversos factores virales que se unen al DNA celular ya sea como productos de oncogenes, o bien análogos no oncogénicos de factores de transcripción como E1A en el caso de adenovirus (Berk, 2005).

En el caso de los virus RNA de cadena positiva, pareciera que solo fuera necesario utilizar las actividades celulares de traducción para la expresión de sus proteínas; sin embargo, el hecho de que el RNA viral se encuentre en una proporción extremadamente pequeña con respecto al total de mensajeros celulares ha obligado a los virus a desarrollar mecanismos que permitan la traducción preferencial de sus genomas (Knipe, 1990). La estrategia mas utilizada por los virus para lograr la expresión preferencial de su genoma es la supresión de la síntesis de las proteínas de la célula hospedera (Clemens, 2005; Gebauer and Hentze, 2004); los mecanismos moleculares por los que los virus logran establecer el llamado “shut off” de la síntesis de proteínas celulares son diversos, por ejemplo, se ha observado que algunos virus inhiben a la RNA polimerasa II a través de un producto viral (Marvaldi et al., 1978); por otro lado, se sabe que durante la infección viral se altera el equilibrio osmótico de la célula (Carrasco et al.,

1989; Poranen et al., 2002), esto ha llevado a proponer que el cambio en la concentración iónica del citoplasma induce una disminución en la traducción de mensajeros al disminuir la vida media de éstos (Clemens, 2001; Holcik et al., 2000). En algunos casos la supresión de la síntesis de proteínas no es total; se piensa que así como el RNA viral es mas resistente a los cambios iónicos, ciertos RNA mensajeros celulares pueden resistir y potenciar su expresión (Meyer et al., 2004; Newbury, 2006). Desde luego, el estudio de estos fenómenos tiene mayor relevancia en células excitables en donde la transducción de señales y la expresión selectiva de proteínas no asociada a factores de transcripción virales, pueden modificar sustancialmente el comportamiento celular.

La modificación del patrón de transcripción celular asociado con la unión del virus a la célula es un área relativamente poco estudiada, pero que en la estrategia de replicación viral o en los fenómenos asociados a esta, resulta importante (Marsh and Helenius, 2006). En el caso del virus Epstein-Barr, la unión a su receptor (CD21) en linfocitos B inmaduros promueve su diferenciación *in vitro* (Brinkmann and Schulz, 2006); el retrovirus F-MuLV promueve la expresión de hemoglobina en mioblastos al unirse a su receptor que es el mismo para la eritropoyetina (Ruscetti, 1999). Aparentemente la unión del virus a su receptor transduce una señal que induce una cascada de segundos mensajeros que promueve cambios celulares. A este respecto, algunos gammaherpesvirus al interactuar con sus receptores provocan la activación específica de la proteína cinasa dependiente de diacilglicerol/ Ca^{++} (PKC) o inducen la activación de los proto-oncogenes fos y jun, por un mecanismo en el cual pueden intervenir la PKC y la proteína cinasa dependiente de Ca^{++} /Calmodulina (PKA) (Albrecht et al., 1990; Brinkmann and Schulz, 2006).

JUSTIFICACION.

El estudio de las interacciones entre los virus y la membrana de las células tiene un interés terapéutico pues si se puede evitar la unión del virus a la célula, la infección se evita; en este sentido, a pesar de que es la enfermedad causada por un virus RNA mas prevalente en el planeta, no hay terapia antiviral contra el Dengue, por ello, se ha considerado como una prioridad de investigación mundial el estudio de la interacción virus-receptor en Dengue (Halstead et al., 2005) . Desde luego, la perspectiva de una terapia específica para FD/FHD basada en esta interacción es un objetivo a largo plazo, sin embargo el estudio de las bases moleculares del reconocimiento virus-célula es en si mismo un elemento crucial para entender la patofisiología de la infección viral (Campbell, 2000; Wang, 2002) y, en un plano puramente básico, a los fenómenos relacionados al reconocimiento proteína-proteína en estructuras complejas (Compans and Roberts, 1994; Damm and Pelkmans, 2006; Jindrak and Grubhoffer, 1999). Hasta donde se sabe, la infección por Dengue tiene muchas características que en conjunto sugieren que la unión a la célula está mediada por un receptor celular fisiológico, sin embargo, aun se desconoce la identidad de este receptor, por ello resulta pertinente y relevante realizar un estudio que tenga como objetivo el aislamiento y la caracterización de esta molécula.

OBJETIVO GENERAL

Analizar algunas características bioquímicas y de respuesta fisiológica del receptor para el DV en neuronas de ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Producir la proteína E recombinante del DV serotipo 2 NGC.
2. Establecer un ensayo de unión para determinar los parámetros al equilibrio de la interacción virus-receptor.
3. Aislar al receptor por cromatografía de afinidad utilizando como ligando la proteína E recombinante del virus.
4. Caracterizar la respuesta celular a la unión del virus, mediante la determinación del estado de activación de algunos intermediarios de cascadas de señalización como PKC, PLA2, Influjos de Ca^{2+} AMPc.

HIPOTESIS

El receptor para el DV en las neuronas de ratón es una proteína que, para el caso de las células N1E-115 podría ser alguno de los receptores metabotrópicos para serotonina o histamina, neuropéptidos o bradikinina o para neurotrofinas como el CNTF que estas células expresan en su membrana.

MATERIALES Y METODOS

Células.- Se utilizaron células N1E-115 (neuroblastoma ratón), C6 (glioblastoma ratón), SK-N-SH (neuroblastoma humano) y, para algunos experimentos, las células U937 (macrófagos humano); todas ellas fueron crecidas en medio D-MEM (GIBCO) 4,500 mg Glucosa, 10 mM HEPES pH 7.4 y 10 % Suero Fetal Bovino excepto la línea U937 la cual fue crecida en RPMI 1640 (GIBCO) 10% Suero Fetal Bovino.

Virus. Se utilizo la cepa de referencia Dengue-2 (NGC) que fue donada por la Dra. Rebeca Ricco-Hesse (Yale Arbovirus Research Unit. New Heaven, Conneticut USA). El virus se ha mantuvo por pase en células C636 y fue titulado por el método de placa lítica. En algunos casos se utilizo virus semipurificado el cual fue obtenido de la siguiente manera : cultivos de células C636 fueron infectados a una multiplicidad aproximada de 0.1 Unidad Formadora de Placa por célula; los cultivos fueron cosechados cuando la infección alcanzo más del 90% de células positivas en un ensayo de inmunofluorescencia directa ; la suspensión celular se homogenizo por sonicación (5 golpes de 30 seg a una potencia de salida de 1 W), se clarifico centrifugando a 10,000xg durante 30 min a 4°C y al clarificado se le añadió PEG 6000 a una concentración final de 7% y NaCl a 0.5 M con el fin de precipitar las partículas vírales; luego se centrifugo a 10,000xg durante 30 min a 4 °C y el botón se resuspendió en amortiguador TGEN (Tris-HCl 50mM pH 7.5, Glicina 0.2 M, EDTA 1mM y NaCl 0.1M) a 1/10 del volumen original; esta suspensión fue aplicada a un gradiente discontinuo de sacarosa (20%/50%) y fue centrifugada a 100,000xg durante 4 hr a 4 °C, la fracción de partículas vírales se obtuvo de la interfase del gradiente y, después de recuperarla, se le diluyo con 10 ml de amortiguador TGEN y

fue centrifugada en las condiciones ya descritas, para eliminar la sacarosa; finalmente el botón fue resuspendido en 1 ml de TGEN y almacenado a -70 °C hasta su uso.

Aislamiento de proteínas de membrana de células neurogénicas/cerebro de ratón por cromatografía de afinidad.- Para intentar el aislamiento del receptor para el virus, se intento resolver las proteínas de membrana de células N1E-115 y extractos de cerebro de ratón obtenidas de la misma forma en que se describió en los anteriores apartados, adicionando un paso final de diálisis contra el amortiguador de inicio (Start Buffer, SB) por una cromatografía de afinidad utilizando una columna de Mono Q (Amersham) en un ensayo de FPLC. Las condiciones de la corrida fueron las siguientes: la columna se equilibrio con 10 volúmenes de SB (Tris-HCl 20 mM, pH 7) y aproximadamente 2 mg de fracción membranal purificada de células N1E-115 o 25 mg de la misma fracción subcelular obtenida del extracto de cerebro de ratón lactante, fueron aplicados a la columna a una razón de flujo de 1 ml/min; posteriormente, la columna fue lavada con 10 volúmenes de SB y el lavado fue colectado; la elusión se llevo a cabo usando dos concentraciones de contraion (0.5 M/1.0 M NaCl) por 5 volúmenes cada una. Las fracciones de lavado y elusión, respectivamente, se mezclaron y concentraron antes de ser aplicadas a SDS-PAGE/VOPBA.

Secuencias vírales y plásmidos utilizados. El primer intento para obtener proteína recombinante se realizo utilizando el plásmido pTT15 amablemente donado por el Dr. Radha Padmanabhan (Georgetown U); este plásmido produce el ectodominio de la proteína frente a un choque térmico y su construcción fue reportada previamente [(Trirawatanapong et al., 1992), Figura 5]. Por otro lado, la región del ectodominio del gene de la proteína E del serotipo 2 (NGC) del DV (aproximadamente 1340 pares de

bases) fue subclonado por PCR. La secuencia esta contenida en el plásmido pKT2.4 (amablemente donado por el Dr. Radha Padmanabhan, U. Georgetown), este es un derivado del pUC19 el cual tiene clonado un fragmento de 2.4 kilobases (kb) del genoma del virus que corresponde a toda la región de proteínas estructurales. La proteína recombinante comprende del aminoácido 22 al 445. Esto se hizo así porque se sabe que la proteína viral completa es inestable dentro de la bacteria (Deubel et al., 1991) de tal forma que la delección le confiere estabilidad; además, aunque no se sabe cual es la región de la proteína que interactúa con el receptor, se estima que el dominio que estructuralmente semeja al de inmunoglobulina (aproximadamente la región comprendida entre los aminoácidos 300 y 400), es el responsable de la unión al receptor celular y en esta construcción se conserva. La región que fue subclonada para expresar en baculovirus comprende desde el aminoácido 1 al 413. El DNA fue obtenido utilizando el sistema QIAprep-spin (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para clonar en el vector de expresión en bacteria el inserto se obtuvo por amplificación de la secuencia contenida en pKT2.4 por PCR utilizando el siguiente par de primers: 5'-GGG GCC ATA TGG ACA TAG TCT TAG AAC AT-3' y 5'-CCC CGG AGC TCA CAT TCC TAT CCA TGT GAT-3' agregando sitios de restricción Nde I y Xho I que se indican en negritas ; los siguientes primers se utilizaron para clonar en el vector de transferencia de baculovirus son los siguientes: 5'-GGG GCC AGA TCT ATG CGT TGC ATA GGA A-3' y 5'-CCC CGG TCT AGA TGG CCA TTC TCT TCG C-3' adicionando sitios Bgl II en sus extremos. Los productos de amplificación de PCR se clonaron en los plásmidos pET-14b utilizando técnicas estandarizadas de biología molecular. El plásmido pET-14b (Novagen) es un vector de expresión en *E.coli* el cual tiene el promotor de la RNA

polimerasa del fago T7 corriente arriba de los sitios necesarios para una eficiente traducción, además, en fase a estas se encuentra una marca de seis histidinas las cuales quedan en el extremo amino terminal de la proteína que se desea expresar y que sirven para purificarla proteína recombinante por afinidad utilizando una columna de Ni-agarosa; el plasmido resultante fue llamado pET14b-Eden2 (Figura 7). La cepa de *E.coli* hospedera para este plásmido es la BL21 (DE3), la cual está lisogenizada con el fago T7 cuya RNA polimerasa esta bajo el control del operón de lactosa, por lo que la transcripción de genes dependientes de la RNA polimerasa de T7 se induce en presencia de IPTG. Un esquema de la estrategia de clonación de la proteína E viral (aa. 1 al 430) y fragmentos de esta (dominio III, aa. 253 al 422 y EDB, aa. 1 al 253 y 422 al 430) en baculovirus se muestra en la Figura 9. Los baculovirus recombinantes fueron generados utilizando el sistema Bac to Bac (Gibco-BRL) siguiendo las instrucciones del proveedor. Este sistema utiliza un plásmido “lanzadera” el cual contiene los sitios para la transposición del transposón Tn7 los cuales flanquean al promotor de la polihidrina y al sitio de clonación; en particular la versión del plásmido que fue utilizada contiene una secuencia que codifica para seis histidinas corriente abajo y en fase con el sitio de inicio de la traducción, además de una secuencia que codifica para el sitio de corte de la Proteasa del TEV antes del sitio de clonación; con los plásmidos recombinantes se transformaron *E. coli* DH10Bac (Gibco-BRL) las cuales contienen el genoma completo del baculovirus AcNPV (bacmido) modificado de tal forma que flanqueado por los sitios de transposición del Tn7 se encuentra el péptido A de la b-Galactosidasa y fuera de estos el gene que confiere resistencia a Gentamicina; además, estas bacterias tienen un plásmido proveedor de las actividades necesarias para la transposición del gene de interés

al genoma del baculovirus. así pues, el bacmido recombinante fue seleccionado al elegir colonias blancas de un fondo de colonias azules donde no se llevo a cabo la transposición y retuvieron el péptido A. Finalmente, al transfectar células Sf9 con una preparación de DNA de alto peso molecular obtenida de las colonias blancas, se genero el stock de baculovirus recombinante. Las secuencias de DNA que fueron subclonadas en el plásmido lanzadera pFastBac HT (Gibco-BRL) se obtuvieron tanto por amplificación (PCR) como por el aislamiento de fragmentos del plásmido fuente generados durante la digestión con enzimas de restricción; en particular, la región correspondiente a los nucleótidos 1 a 1290 de la proteína E fue amplificada del plásmido pKT2.4 para lo cual se realizo un PCR con el siguiente par de oligonucleótidos iniciadores: 5'-GGG GCG AAT TCA TGC GTT GCA TAG GAA TAT CA-3' y 5'-CCC CGG AGC TCA TGT AAA CAC TCC TC-3' los cuales contienen sitios de restricción EcoR I y Pst I, que se indican en negritas, para clonar en la orientación y fase correcta(pFastBacD2E1.2). Por otro lado, el plásmido pKT2.4 fue digerido con BamH I y el fragmento de 507 pares de bases resultante de la digestión fue aislado y clonado en el sitio respectivo en pFastBac HT (pFastBacD2E.5). Para generar la proteína en la que se ha eliminado el dominio III, el plásmido pGemD2E1.2 (este plásmido fue preparado para producción de ribosondas con la misma región para generar el plásmido pFastBacD2E1.2 pero clonada en pGEM-4Z, Promega) será digerido con BamH I, esto generará un fragmento de 507 idéntico al ya subclonado y el resto del plásmido; este ultimo fragmento será aislado y religado para generar la secuencia truncada (pGemD2EDB); posteriormente, este plásmido será digerido con EcoR I y Pst I y el fragmento de 783 pares de bases resultante de esta reacción será subclonado en pFastBac HT (pFastBacD2EDB).

Expresión de proteínas recombinantes en bacteria y baculovirus.- Bacterias BL21 (DE3) fueron transformadas con el plasmido pET14b-Den2E. Las bacterias recombinantes se cultivaron a 37 °C hasta alcanzar una D.O._{590nm} de 0.6 en medio LB con 100 mg de Ampicilina/ml de medio de cultivo, luego se agregó IPTG a una concentración de 5 mM y se continuó la incubación por un periodo de 24 horas tomando alícuotas a 1, 3, 6, 9, 18 y 24 horas. El paquete celular se obtuvo por centrifugación y la pastilla se resuspendió en 1/100 del volumen original de cultivo en amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 2 mM, EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 1mM); la suspensión se sonicó con 12 pulsos de 30 seg, fue centrifugada a 10,000 g por 30 min a 4 °C y las proteínas en el sobrenadante se precipitaron con una solución saturada de (NH₄)₂SO₄ a una concentración final de 20%. El precipitado se resuspendió en PBS y se dializó contra Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 2 mM y glicerol 20 %. Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford y mediante western blot se verificó la presencia de la proteína viral recombinante; con este material se llevó a cabo la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad. La producción de la proteína E recombinante utilizando baculovirus fue realizada utilizando el sistema Xpress (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del proveedor, brevemente: los baculovirus recombinantes fueron generados al transfectar de acuerdo a las instrucciones del proveedor células Sf9 con Celfectin (Gibco-BRL) el DNA de alto peso molecular de las bacterias seleccionadas; los virus recombinantes fueron purificados del sobrenadante de cultivo de la transfección y luego de una ronda de amplificación en células Sf9 el stock de baculovirus se tituló por un ensayo en placa. Con estos stocks se infectaron cultivos de células Sf9 que fueron cosechados diariamente durante una semana para determinar el

momento óptimo de expresión de la proteína recombinante; las células infectadas fueron lisadas en PBS por 3 ciclos de congelación-descongelación y la suspensión fue centrifugada a 10,000g por 10 min a 4 °C para obtener una preparación cruda de proteínas; se realizaron ensayos de Western Blot para confirmar la presencia de la proteína viral recombinante.

Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad.- Los extractos proteínicos que contienen la proteína recombinante fueron sometidos a una cromatografía de afinidad en columna de Niquel-Agarosa (HiTrap, Amersham). Las columnas se equilibraron con amortiguador de unión (20 mM Na₂HPO₄, 0.5M NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7.4), luego, aproximadamente 5 ml de extracto proteínico se aplicaron a las columnas a un flujo de 2 ml/min, después de lo cual se lavo con 10 ml de amortiguador de unión y la proteína recombinante fue eluida de la columna con 5 ml de amortiguador de elución (20 mM Na₂HPO₄, 0.5 M NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7.4), recuperándose fracciones de 1ml. Todas las fracciones (flow-through, lavados y eluidos) fueron sometidos a SDS-PAGE y Western Blot, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra la etiqueta de 6 Histidinas (Boehringer-Mannheim) o contra el serotipo 2 del DV (3H5, amablemente donado por el Dr. G Stewart, Un. of Texas, Arlington).

Ensayos de unión. Los ensayos de unión entre membranas de células y virus semipurificado o los fragmentos de proteína E recombinante fueron llevados a cabo por una variación de un ensayo en fase sólida (Holmes et al., 1987). Las membranas se obtuvieron por una variación de la técnica descrita por Takacs y Staehelin (Takács and Staehelin, 1981). Las células se homogenizaron en D-PBS frío (CaCl₂ 0.9 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgCl₂ 0.5 mM, NaCl 138 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, Aprotinina

100 KIU/ml, PMSF 1 mM, pH 7.2) por 5 min en un POLITRON (Brickmann) a 10,000 rpm ; la fracción cruda de membranas se obtuvo por centrifugación a 10,000 rpm por 15 min a 4 °C en un rotor Sorval SS34; se midió el volumen del paquete de membranas y se agregó un volumen igual de Tween 20 y NP 40 en proporción de 7:3 (v/v); esta mezcla se utilizó al 5% en amortiguador TNM (Tris-HCl 20 mM pH 7.3, NaCl 145 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Aprotinina 100 KIU/ml, PMSF 1 mM) y se dejó reposar en hielo por 15 min, después se agregó Sacarosa (50% p/v en TNM) hasta tener una concentración final de 3% p/v; la mezcla se homogenizó en frío con 12 golpes de un Duncce y se aplicó a un gradiente discontinuo de Sacarosa (32 % y 10 % p/v en TNM), después se centrifugó a 81,000xg por 1 h a 4 °C y las membranas se obtuvieron de la interfase del gradiente; la Sacarosa se eliminó por dilución en 20 volúmenes de TNM y centrifugación a 100,000xg por 1 h a 4 °C. A la fracción de membranas se le determina concentración de proteína utilizando un reactivo comercial de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para otra serie de experimentos se obtuvieron cerebros de ratón lactante por disección, luego fueron incluidos en parafina para obtener cortes de 10 micras empleando una técnica convencional. El ensayo de unión en fase sólida para proteínas de membrana de células N1E-115 se realizó de la siguiente manera: las proteínas de las membranas fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa según la técnica descrita por Towbin; la membrana de nitrocelulosa se bloqueó 2 h a 37 °C con Albúmina Sérica Bovina (ASB) 30% p/v- Tween 20 0.2% v/v- PBS 10 mM pH 7.4 y se lavó 10 min 3 veces con Tween 20 0.2% v/v- PBS 10 mM pH 7.4 (Tween-PBS); la membrana de nitrocelulosa se incubó con 10⁵ Unidades Formadoras de Placa/mm² de una preparación semipurificada de virus diluido en ASB 1% p/v- HEPES 20 mM- D PBS por

aproximadamente 10 h a 4 °C o con las fracciones de la proteína E recombinante a una concentración de 1 ug/mm² resuspendida en el amortiguador anterior; después se lavó 3 veces con la solución de dilución y 3 veces con Tween-PBS; se agregó anticuerpo 3H5 contra el virus diluido 1:10 en ASB 0.1% p/v- Tween-PBS y se incubó por 4 h a temperatura ambiente; las membranas de nitrocelulosa se lavaron 3 veces con Tween-PBS, y se incubó por 1 h a 37 °C con anticuerpo anti-ratón conjugado a biotina (Amersham); posteriormente se lavo 3 veces con solución Tween-PBS y en algunos experimentos se incubó durante 1 h con [I125]-Streptavidina (20-40 mCi/mg, Amersham) a una concentración de 0.5 mCi/ml en Tween-PBS, mientras que en otros se incubó con Streptavidina-Biotina-Peroxidasa de rabano dilución 1:500 en Tween-PBS durante el mismo tiempo, en ambos casos la incubación transcurrió a temperatura ambiente. Finalmente, se lavo 5 veces con Tween-PBS y 2 veces con PBS. Cuando se uso radiación, la membrana se seco al aire en una campana de seguridad y se expuso durante 48 h a una película X-Omat (Kodak) a -70 °C; cuando se uso Peroxidasa, la reacción fue revelada por quimioluminiscencia usando un kit comercial (ECL, Amersham). Cuando se usaron cortes de cerebro embebidos en parafina como soporte sólido de la reacción virus receptor, se siguió esencialmente el mismo protocolo arriba mencionado empleando Peroxidasa.

Ensayos de competencia por la unión y bloqueo de la infección. Para establecer si la proteína recombinante tenia actividad de unión a la célula blanco y que sea capaz de competir con el virus por el sitio de unión se realizaron dos tipos de ensayos, el primero consistió de un ensayo de bloqueo de la infección de células N1E-115 realizado de la siguiente manera; las células fueron incubadas a 4 °C por 1 hora con diferentes

concentraciones de proteína viral recombinante disuelta en amortiguador de unión (gelatina 1% en solución balanceada de Hank's adicionada de HEPES 20mM pH 7.2, HBSS), los cultivos se lavaron tres veces con HBSS a 4 °C y se incubaron en las mismas condiciones con una suspensión del DV serotipo 2 NGC en amortiguador de unión a una multiplicidad de infección de 0.1. Después de lavar cinco veces con HBSS a 4 °C, se agregó medio de cultivo a 37 °C y se incubó por 5 días. Para determinar el número de células infectadas, las células se cosechadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal específico contra el DV serotipo 2 (3H5). El número de células infectadas se determinó contando aproximadamente 100 células totales en tres campos y de estas cuantas fueron positivas al antígeno viral. Los ensayos de competencia a la unión se llevaron a cabo esencialmente de la misma manera antes descrita para el ensayo de unión, solo que para este caso, previo a la incubación con virus semipurificado, se incubó con diferentes cantidades de proteína E recombinante y el ensayo se reveló tanto con anticuerpo monoclonal contra el virus como con anticuerpo contra la marca de 6 Histidinas de la proteína recombinante.

Evaluación de la activación de Adenilato Ciclasa.- Células N1E-115 fueron crecidas en placas de 24 pozos hasta una confluencia del 75% (aproximadamente 2×10^5 células), en ese momento fueron lavadas dos veces con solución de Hank's (GIBCO) adicionada de HEPES 20 mM pH 7.4 (HHBSS) enfriada en hielo. El stock viral fue diluido en HHBSS-Gelatina 1% (GIBCO) a una concentración aproximada de 2×10^5 PFU/0.5ml; 0.5 ml de esta suspensión fueron inoculados por pozo e incubados a 4 °C por 1 hr para sincronizar la unión. Al término de esta incubación, el virus no unido fue eliminado lavando dos veces con HHBSS frío. Otro grupo de células fueron incubadas en las mismas

condiciones con medio de cultivo sin virus como control negativo. Inmediatamente después del último lavado, se agregó medio de cultivo a 40 °C para lograr una temperatura de aproximadamente 37 °C y se continuó la incubación a 37 °C y 5% de CO₂ por 30 min. Como control de activación, otro grupo de células fueron incubadas con 20 uM Forskolina (Calbiochem) en las mismas condiciones. El AMP cíclico resultante fue medido usando el kit cAMP [¹²⁵I] Biotrak Assay System (Amersham) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los resultados de triplicados fueron calculados considerando la media de las lecturas del grupo de células incubadas con Forskolina el 100%.

Evaluación de la activación de la Proteína Cinasa C (PKC).- Células N1E-115 fueron infectadas de la misma forma en que se describió arriba. Como control de activación, un grupo de células fue incubada con solución A (25 mM HEPES-Tris, 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂, 33.3 mM glucose and 1 mM NaHPO₄ pH = 7.4) a la que se le adicionó KCl hasta una concentración final de 56 mM; además, se incluyó otro grupo de células a las que no se les realizó ningún tratamiento (control). La activación de PKC se determinó usando un ensayo de unión de un derivado del Forbol miristato marcado con tritio [³H-P(BTO)₂, 26 Ci/mmol, Amersham] a la membrana celular previamente reportado (Cid and Ortega, 1993). A continuación se describe brevemente el ensayo: inmediatamente después del último lavado con HHBSS, las células fueron lavadas un par de veces más en solución A a temperatura ambiente; en seguida se agregó solución A suplementada con 20 mM de ³H-P(BTO)₂ y 0.1% de Albúmina Sérica Bovina libre de ácidos grasos (SIGMA); las células fueron incubadas por 30 min a temperatura ambiente luego de cual fueron lavadas rápidamente tres veces con solución A enfriada en hielo y solubilizadas con 1 M NaOH; a estos lisados se les

agregó líquido de centelleo (Aquasol 2, DuPont) y la radiactividad se determinó en un contador de centelleo (Beckman). Los resultados se normalizaron a 100% usando el promedio de las lecturas del control.

Evaluación del influjo de Ca²⁺.- Las células N1E-115 fueron infectadas como ya se ha descrito. La activación de PKC inducida por 56 mM K⁺ se debe a que esa concentración, K⁺ despolariza la membrana de la célula, permitiendo la entrada de Ca²⁺ del medio de cultivo al citoplasma, con lo que se activa la Fosfolipasa C que a su vez produce diacilglicerol y con ello la activación de PKC (Ortega et al., 1991), por ello las condiciones experimentales de medición del influjo de Ca²⁺ fueron exactamente las mismas que para PKC, excepto que en la solución A fue reemplazado el ³H-P(BTO)₂, por ⁴⁵Ca²⁺ (1 uCi/ml, 5-50 mCi/mg, Amersham).

Evaluación de la actividad de Fosfolipasa A2 (PLA2).- Células N1E-115 fueron crecidas en cajas de Petri de 60 mm de diámetro hasta una confluencia del 50% (aproximadamente 1.5 x10⁶ células), en este momento se cambió el medio por D-MEM 2% SFB al que se le adicionó ³H-Acido Araquidónico (150-230 Ci/mmol, Amersham) a una concentración de 0.5 uCi/ml; las células fueron incubadas por aproximadamente 18 hrs a 37 °C y 5% CO₂. Después de esta incubación, las células fueron lavadas 3 veces con 0.5 ml de HHBSS-Gelatina 1% y a partir de ese momento, se tomó el medio de cultivo y se reemplazó por medio fresco cada 3 min; después de 12 minutos, se agregó 2 uM A23187(Calbiochem) o virus a una dosis aproximada de 10 MOI durante 12 minutos continuando con la cosecha de medio cada 3 minutos; después, se omitió al virus y se continuó lavando con medio HHBSS-Gelatina 1% por 12 minutos más. Toda la manipulación se llevó a cabo a 37 °C. Luego, las células fueron solubilizadas con 1 M

NaOH; a estos lisados y a las fracciones de medio colectadas, se les agregó Aquasol 2 y la radioactividad se determinó en un contador de centelleo. Los resultados se obtuvieron sumando a las cuentas obtenidas en la fracción celular, las de cada fracción de medio; los resultados fueron expresados en función de la fracción de radiactividad liberada al medio en cada tiempo (Ponzoni et al., 1992).

Fosforilación en residuos de Tirosina.- Células U937 fueron crecidas hasta una densidad de 5×10^5 células/ml, en ese momento fueron lavadas 2 veces con HHBSS-Gelatina 1%. Aproximadamente 10^7 células fueron entonces incubadas a 37 °C con HHBSS-Gelatina 1% o DV a dosis de 0.1 y 10 MOI por 30 min., tomándose alícuotas de aproximadamente 2×10^6 células cada 6 minutos a partir del primer minuto. Las alícuotas fueron inmediatamente sumergidas en N_{2liq} hasta su procesamiento. Los extractos proteínicos de estas células se obtuvieron agregando solución de lisis (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, NP-40 1%, SDS 0.1%, pH 7.4) suplementada con inhibidores de proteasa (Complete, Roche) y la mezcla de inhibidores de fosfatasa (2 mM Imidazol, 1 mM NaF y 1 mM Na_3VO_4 , concentraciones finales). La concentración de proteínas en estas muestras fue medida por la técnica de Bradford. Aproximadamente 10 ug de proteína total se resolvieron en un gel de SDS-PAGE al 7.5%, luego las proteicas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham). Se llevo a cabo la inmunodetección de las proteínas con residuos de tirosina fosforilada mediante un cóctel de anticuerpos anti-tirosina fosfato (PY-Plus, Zymed). Para evaluar la especificidad de la reacción antígeno anticuerpo, una membrana producida en paralelo con las mismas muestras fue incubada con una mezcla de PY-Plus y 10 mM de o-Tirosina Fosfato (SIGMA). La reacción fue revelada usando el reactivo ECL de Amersham.

RESULTADOS.

Determinación de proteínas que unen al DV en la línea celular N1E-115. Ensayos preliminares de VOPBA en fracciones membranales de cultivos primarios de células de SNC de embrión de ratón resultaron ambiguos, en parte porque son cultivos heterogéneos, pero además, porque resulta difícil tener una proporción reproducible de neuronas en general (entre el 20% y el 80% de células viables pueden ser neuronas de cultivo a cultivo); por ello se buscó una línea celular neurogénica que fuera sensible a la infección. En el trabajo previo de Maestría, se determinó que la línea celular N1E-115 era sensible a la infección por DEN 2 (NGC), aun mas, la infección es prácticamente abatida cuando las células son pretratadas con Tripsina, pero no cuando son pretratadas con Neuraminidasa, lo que sugiere que proteínas de membrana están involucradas en la interacción inicial con el virus. Para ampliar este resultado, se decidió preparar una fracción membranal de estas células y probar la capacidad del virus de unirse a las proteínas membranales por un ensayo de VOPBA. Aunque, como se verá mas adelante, el VOPBA es un ensayo relativamente inconsistente, en estos primeros experimentos, se logró demostrar que el virus se enlaza a una molécula de peso molecular de aproximadamente 65 kDa (fig 4, línea 3), esta interacción es especifica ya que no se detecta en ausencia de virus o cuando se reemplaza el anticuerpo específico con uno irrelevante pero del mismo isotipo (fig 4, líneas 1 y 7 respectivamente). Ya que el enlace es totalmente eliminado por el tratamiento con Tripsina de la membrana de nitrocelulosa (fig 4, línea 4), pero no es eliminado cuando se pretrata a la membrana con Neuraminidasa (fig 4, línea 5), podemos concluir que la unión se establece con la parte peptídica de una proteína de membrana. La fracción de membrana utilizada aquí contiene

tanto membrana plasmática como membrana de retículo endoplásmico y ya que para algunos virus se ha demostrado que hay receptores intracelulares asociados a RE (Crise et al., 1990), intentamos excluir esta posibilidad al incubar el extracto de proteínas de membrana con Endoglicosilasa H (Endo H), esta glicosilasa degrada los residuos de manosa que se encuentran en las glicoproteínas inmaduras que no han salido de RE, la sensibilidad a la digestión por Endo H es el ensayo estándar para determinar el tránsito RE-Golgi (Peters et al., 1983), si la proteína que une al virus es sensible a Endo H y disminuye su peso molecular, la banda que revela el VOPBA debería aparecer mas abajo que la que se detecta en ausencia del tratamiento con Endo H; como se puede observar (fig 4, línea 6) este no es el caso. El enlace del virus a la proteína de 65 kDa correlaciona con la sensibilidad de la célula a la infección ya que proteínas membranales de una línea resistente a la infección como el glioma C6, no muestran capacidad alguna de unión de la partícula viral (fig 4, línea 7); no obstante la presencia de esta proteína también se puede detectar en otras células neurogénicas de una especie distinta al ratón como lo es la línea neurogénica de humanos SK-N-SH (fig 4, línea 8), el peso molecular aparentemente alto es solo un efecto de que el ensayo de VOPBA se llevo a cabo en un experimento separado.

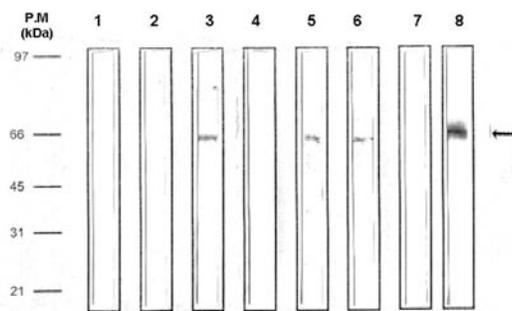


Figura 4. Proteínas que unen al virus Dengue. Extractos de proteínas de células N1E-115 (líneas 1-6), Glioma C6 (línea 7) y SK-N-SH (línea 8) fueron resueltos en SDS-PAGE, seguido de electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas con PBS (1-3, 7-8), Tripsina 0.075% en PBS (4), 150 mU/ml Neuraminidasa Tipo V (5) o 10 mU/ml Endoglicosilasa H (6), seguidos por incubación con una suspensión de Virus Dengue 2, 10^5 PFU/mm² (líneas 2-8) o PBS (1); después, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo anti-Dengue 2 monoclonal, 3H5, (1-6, 8) o con un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo (7). La flecha indica 65 kDa.

Aislamiento de la proteína de 65 kDa por cromatografía de intercambio iónico. Para aislar la proteína de 65 kDa de las células N1E-115, el extracto de proteína de membrana se aplicó a una columna de intercambio iónico en escala analítica y se resolvieron las proteínas por FPLC. No se encontró actividad de enlace por VOPBA en ninguna de las fracciones fluidas, pero tampoco en el volumen no retenido. Es posible que la proteína de 65 kDa este en una concentración baja en las células N1E-115 y que durante el proceso de separación sea diluida. Dado que es de esperarse que en el cerebro del ratón esta proteína este mejor representada que en los cultivos celulares, se intentó el aislamiento a partir de una preparación de membranas de cerebro de ratón lactante. La figura 5 muestra un resultado típico del aislamiento de proteínas que unen al VD por cromatografía de intercambio iónico: las líneas 1 a 3 muestran, respectivamente, el extracto proteínico total que fue aplicado a la columna, el volumen no retenido y el volumen eluido resueltos en un gel de SDS-PAGE y teñidos con azul de coomassie, las líneas 4 a 8 muestran los ensayos de VOPBA de cada muestra. En los extractos de cerebro de ratón lactante se puede detectar la proteína de 65 kDa (línea 4), no obstante el ensayo muestra un fondo inespecífico debido a la reacción con el segundo anticuerpo como lo demuestra el hecho de que las bandas inferiores a 65 kDa están presentes en ausencia de virus (línea 5) o de anticuerpo contra dengue (línea 6); por otra parte, tanto en el volumen no retenido (línea 7) como en el volumen eluido (línea 8) se puede encontrar cierta actividad de unión a la proteína de 65 kDa, sin embargo, dado que el fondo inespecífico aumenta considerablemente y de que la unión es significativamente menos intensa no podemos excluir la posibilidad de que la unión observada sea un artefacto debido al proceso de purificación; en cualquier caso, suponiendo que la proteína de 65 kDa se encuentre en

estas fracciones, se requeriría de pasos posteriores de purificación, para lo cual se requeriría escalar la cantidad inicial de extracto de proteínas membranales y, en una dimensión realista y practica, esto no es posible. No solo el número de animales es limitante, se sabe que la sensibilidad a la neuroinfección por flavivirus está determinada por la edad del animal, así, las zonas del cerebro que son sensibles a la infección por flavivirus son cada vez menores con respecto al tiempo (Sriurairatna et al., 1973); si, como se cree, la sensibilidad depende de la presencia del receptor, la ventana de tiempo en la que es posible obtener una preparación abundante en la proteína de 65 kDa es estrecha por lo que solo ratones de entre 2 a 5 días de nacidos podrían ser usados, esto llevaría a aumentar el número de animales a usar pues, en base unitaria, la cantidad de tejido obtenido por animal es solo de miligramos.

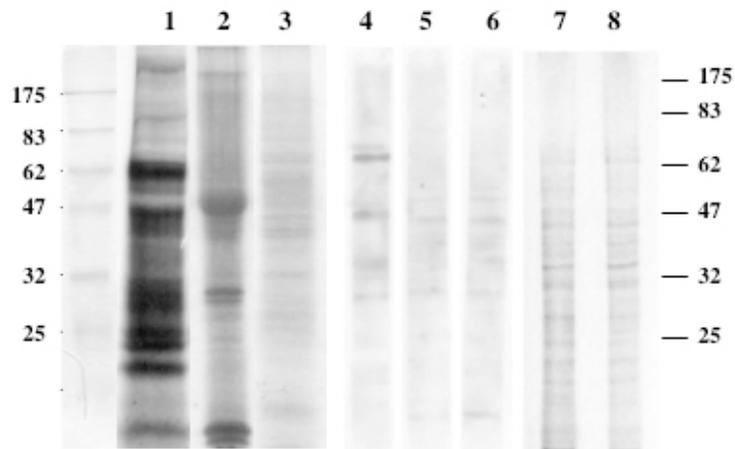


Figura 5. Separación de proteínas que unen al virus Dengue por cromatografía de intercambio iónico (Mono Q). Aproximadamente 25 mg de proteína total de una fracción membranal de cerebro de ratón lactante fueron resueltos en una columna de Mono Q en las condiciones referidas en Materiales y Métodos. Las primeras tres líneas muestran la tinción por azul de cómasse de la fracción total (línea 1), la fracción de lavado (línea 2) y el eluido de la columna (línea 3); ensayos de VOPBA de la fracción total (líneas 4-6) y de la fracción de lavado (línea 7) y eluida (línea 8) se realizaron de acuerdo a lo mencionado previamente.

Expresión de la proteína E de DEN 2 (NGC) en bacteria. Los resultados anteriores muestran que una aproximación fisicoquímica en la purificación de la proteína de 65 kDa es impracticable, por ello se decidió usar un método de afinidad. Se sabe que es posible aislar receptores celulares para virus usando las PVU como ligandos en una cromatografía de afinidad (Hennache and Boulanger, 1977), siempre y cuando los dominios en la PVU de interacción con el receptor celular se mantengan intactos; en el caso del virión de DV, se cree que el sitio de interacción con el receptor se encuentra en el dominio III de la porción expuesta (ectodominio) de la proteína E en el virión (Rey, 2003). Suponiendo que la interacción del ectodominio de la proteína E con el receptor celular sea análoga a la interacción de la partícula viral con la membrana de la célula blanco, es posible aislar el receptor celular usando la proteína E como ligando en una cromatografía de afinidad. Ahora bien, aunque es relativamente sencillo separar la proteína E del virión a partir del medio de cultivo de células infectadas, la purificación de esta proteína no ha sido exitosa en ningún caso, en parte se debe a que la región transmembranal de esta proteína hace que se agregue en solución, pero es probable que otros factores aun no determinados intervengan para evitar la purificación exitosa de la proteína E a partir del virión. Así pues, consideramos pertinente intentar la producción de la proteína E en bacteria. El primer vector que utilizamos fue un vector donado amablemente por el Dr. R. Padmanabhan (Georgetown University, USA); el control de la transcripción del plásmido que contiene la secuencia completa excepto por 21 aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína E del serotipo 2 (NGC) (ver figura 6) esta bajo el control de un promotor inducible por choque térmico; así pues la inducción de la proteína se lleva a cabo a 45 °C. La figura 7 muestra un experimento de

inducción típico; el panel A y B muestran los perfiles de expresión de lisados de bacterias incubadas a 37 °C y 45 °C (B) resueltos por SDS-PAGE y teñidos con azul de coomassie, las diferentes líneas muestran alícuotas de los cultivos incubados a la temperatura respectiva separados en intervalos de 15 minutos; los paneles C y D muestran el reconocimiento de proteínas de esos lisados celulares por un anticuerpo monoclonal específico contra el DEN 2 (NGC). Aunque es claro que el choque térmico induce la expresión de la proteína E recombinante (comparar panel C con D), aparentemente la proteína recombinante es degradada intracelularmente o se producen productos truncados en la traducción; es posible que la respuesta de estrés al choque térmico active mecanismos de degradación de proteínas que son reconocidas como mal dobladas, como podría ser el caso de una proteína de eucariote expresada en un sistema procariote; además, el hecho de que en esta construcción se mantenga la región transmembranal de la proteína podría causar la inestabilidad del polipéptido.

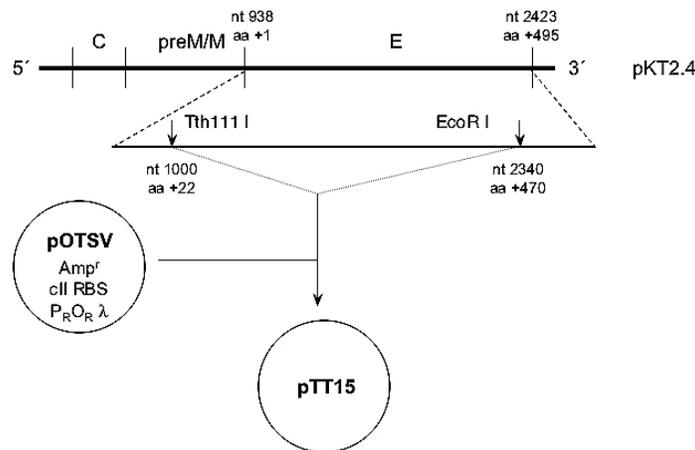


Figura 6. Estrategia de Clonación de la secuencia completa de la proteína E de DEN 2 (NGC) en pOTSv

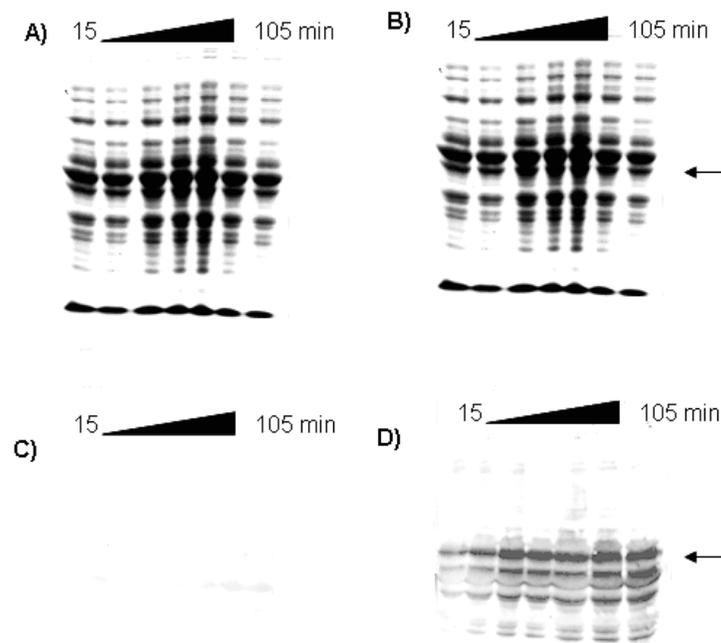


Figura 7. Inducción de la síntesis de proteína E DEN 2 (NGC) por choque térmico. Bacterias *E.coli* N5151 transformadas con el plásmido pTT115 fueron crecidas a 1 D.O. a 500 nm a 37 oC; para la inducción de la proteína recombinante el cultivo se dividió en dos, una parte se mantuvo a 37 oC (panel A y C) y otra parte se le aplico un choque térmico a 45 oC (panel B y D).Luego, a intervalos de 15 min, una alícuota de cada cultivo fue separada y con ella se obtuvo un suspensión de proteínas luego de la lisis de las bacterias. Los extractos proteínicos fueron resueltos en un gel de SDS-PAGE al 10% en dos geles separados, un gel fue teñido con azul de coomassie (panel A yB) y otro fue transferido para western blot de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos. La flecha indica el peso molecular esperado del ectodominio de la proteína E (48 kDa).

Para evitar estos problemas se decidió cambiar de plásmido de expresión y utilizar una bacteria comúnmente utilizada para expresión de proteínas recombinantes. El plásmido elegido fue el pET14-b, el promotor en este plásmido es inducible por IPTG y la proteína recombinante es producida como una proteína de fusión con una etiqueta de 6 Histidinas (6xHis) en el extremo amino. La estrategia de clonación se muestra en la figura 8. La inducción de la proteína E recombinante utilizando este sistema mostró una ligera ventaja con respecto al anterior sistema, pues en el western blot se observa como una sola proteína (panel A de la figura 9); sin embargo, la recuperación de la proteína recombinante es pobre y no mejora aún cuando la inducción se lleve a cabo a 30 °C (no mostrado); en un intento de mejorar la recuperación, los extractos de bacterias inducidas

con IPTG fueron fraccionados (fig 9 panel B) y como se puede observar, prácticamente toda la proteína inmunoreactiva se encuentra en la fracción particulada (B, líneas 2 de los paneles izquierdo y derecho); en un intento para solubilizar esta fracción, se decidió utilizar una mezcla de detergentes que permitiera mantener la conformación nativa de la proteína (panel B, líneas 4) pero no se logró. Adicionalmente, el rendimiento de proteína declinaba con el tiempo, esto se debe a que el plásmido es inestable y eventualmente se pierde durante la selección con Ampicilina, el reemplazo por Carbenicilina no mejoró tampoco la estabilidad. Hasta aquí concluimos que el sistema procariote no era el óptimo para obtener proteína E recombinante en cantidad y calidad suficiente como para purificarla y usarla como ligando en un cromatografía de afinidad.

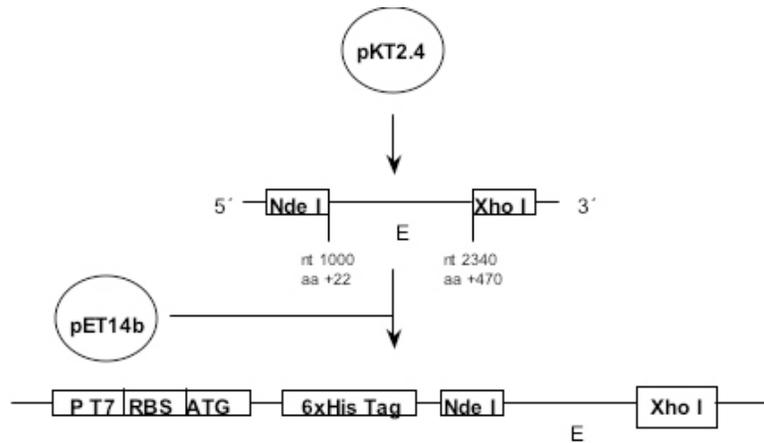


Figura 8. Estrategia de clonación de la proteína E en pET-14b.

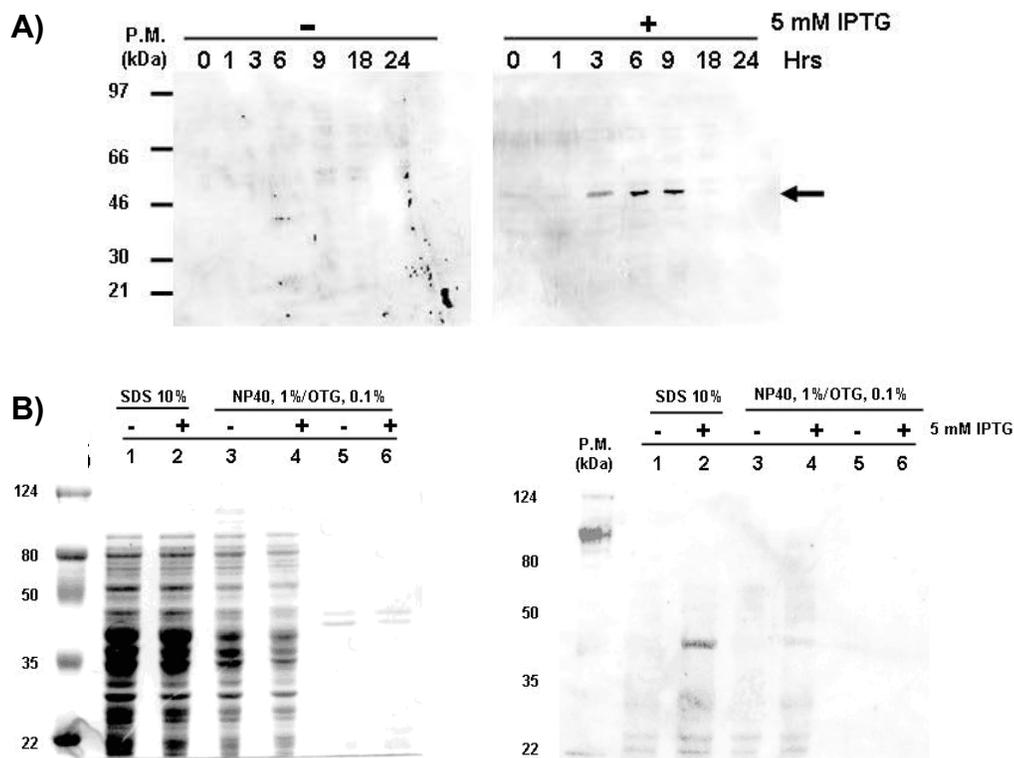


Figura 9. Producción de proteína E recombinante en células BL21 (DE3). Bacterias transformadas con el plásmido pET14-D2E fueron incubadas en ausencia (A panel izquierdo) y presencia (A panel derecho) de IPTG 5mM durante los tiempos indicados, después de lo cual se cosecharon las células y se obtuvieron extractos totales proteínicos; con estos se realizó un western blot utilizando un anticuerpo específico para la etiqueta de 6 Hisitidinas; la flecha indica la posición esperada de la proteína recombinante. Para obtener una fracción soluble en condiciones nativas, la fracción particulada de los extractos proteicos fue tratada con una mezcla de NP40 1%/Octilglucosido (OTG) 0.1% ambos en amortiguador de lisis; el panel B muestra la imagen del gel de poliacrilamida teñido con azul de coomasie (izquierda) y el western blot (derecha); como control de carga se utilizo un extracto total proteínico (SDS 10% líneas 1 y 2); las líneas 3 y 4 muestran la fase particulada luego de la extracción con NP40/OTG y las líneas 5 y 6 la fase soluble.

Expresión del Ectodominio de la proteína E por baculovirus. Consideramos que parte del problema en la expresión de la proteína E en bacteria se debía a que siendo esta una proteína de eucariota, la proteína podría tener problemas de doblaje y esto activar mecanismos de degradación o podría ella podría tender a agregarse de manera irreversible; adicionalmente, las dos construcciones utilizadas contenían la región transmembranal y estaban truncadas de 21 amino ácidos de la región amino terminal, ambos factores podrían influir en la estabilidad de la proteína recombinante. Por ello

decidimos construir un baculovirus que expresara el ectodominio completo de la proteína; para ello utilizamos el sistema Bac to Bac, que consiste en generar el DNA del baculovirus dentro de una bacteria apropiada y, después de recuperar el DNA de alto peso molecular, transfectar células de artrópodo para de esta manera recuperar los baculovirus del medio de cultivo luego de la transfección. Estimamos que siendo el sistema de baculovirus un sistema eucariota y que las modificaciones postraduccionales que podría sufrir el ectodominio de la proteína E no serían muy diferentes a las que se podrían presentar en células de mosquito en una infección natural, la posibilidad de recuperar el ectodominio de la proteína E en forma nativa deberían ser altas. Adicionalmente, se pensó conveniente generar un par de baculovirus adicionales; uno de ellos solo expresaría el sitio putativo de unión al receptor celular, el dominio III, el otro baculovirus que se construyó debería expresar una proteína deletada del dominio III para ser usada como control en los ensayos de unión en caso de se pudiera demostrar unión del dominio III a la proteína de 65 kDa. Las tres proteínas recombinantes serían expresadas como proteínas de fusión con una etiqueta de 6xHis en el extremo amino terminal para facilitar la purificación. La figura 10 muestra la estrategia de clonación.

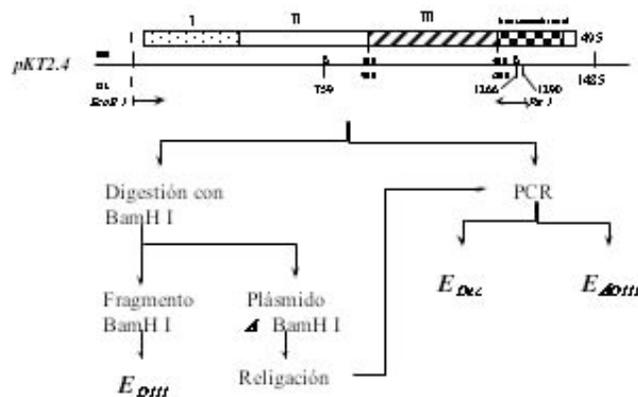


Figura 10. Estrategia de clonación en el vector lanzadera (shuttle) para la producción de baculovirus recombinante que expresen el dominio III (E_{DIII}) y una proteína E deletada del dominio III ($E_{\Delta DIII}$).

Como se muestra en la figura 11, la expresión de la proteína en la primera ronda de amplificación de los baculovirus fue muy buena en términos de inmunoreactividad, los polipéptidos correspondientes para el ectodominio y el dominio III aparecen como bandas únicas en los pesos moleculares esperados; el hecho de que no se observe inmunoreactividad en el caso de la construcción deletada del dominio III se debe a que el epítoto que reconoce el anticuerpo monoclonal utilizado en el wb se encuentra en dominio III (Crill and Roehrig, 2001).

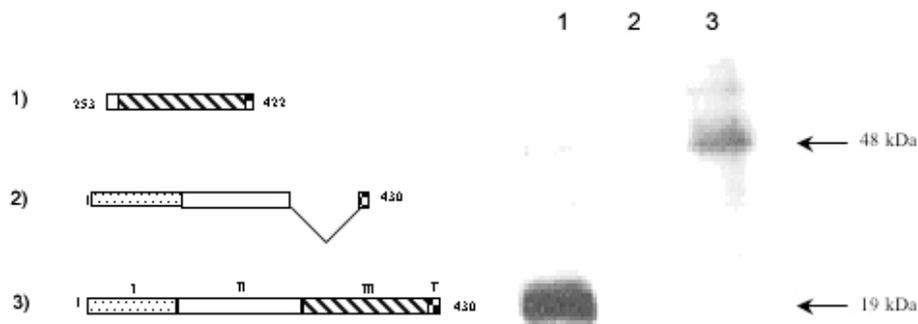


Figura 11. Expresión de fragmentos de la proteína E recombinante en baculovirus. Western blot de extracto de células SF9 infectadas con baculovirus recombinantes (las construcciones se muestran en el extremo superior) que expresan diversos segmentos de la proteína E del VD. La inmunodetección se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal específico (3H5).

Estos baculovirus se expandieron en células Sf9 y fueron titulados por métodos convencionales. La producción de la proteína recombinante se llevó a cabo utilizando una multiplicidad de infección de 10, después de 48 hrs, las células infectadas se lisaron y las proteínas fueron aplicadas a una resina de Ni-Agarosa y fueron separadas por FPLC de acuerdo a las recomendaciones del proveedor de la columna. La figura 12 muestra la inmunodetección de las diversas fracciones obtenidas en la cromatografía. Como se puede observar en ningún caso se logro purificar a homogeneidad (Plata, líneas 4-6 en ambos paneles) y, en el caso del ectodominio de la proteína E la inmunoreactividad se

reparte en polipéptidos de pesos moleculares crecientes por lo que pudieran ser oligómeros de la proteína recombinante (comparar panel A Plata con anti-Den, flecha). En estas condiciones es muy difícil calcular rendimientos relativos, no obstante, pensamos que la proteína se expresa en altas cantidades en las células Sf9 ya que la inmunoreactividad que se encuentra en el lisado es alta, no obstante el hecho de que se observe señal en el volumen de flujo, sugiere que el estado de agregación de la proteína en el lisado total influye en la afinidad por la resina. En el caso del dominio III recombinante es solo un poco mejor, aunque el fondo que se pega a la columna es relativamente alto, hay por lo menos una fracción (panel B línea 4 Plata/anti-Den) que constituye aproximadamente el 20% del total de la proteína y la inmunoreactividad es específica para este polipéptido. No se muestran los ensayos de purificación de la proteína deletada del dominio III porque desafortunadamente durante el transcurso de la amplificación del baculovirus respectivo, la expresión de la proteína nunca se confirmó, de cualquier forma, el lisado de las células infectadas con el baculovirus respectivo se uso como control.

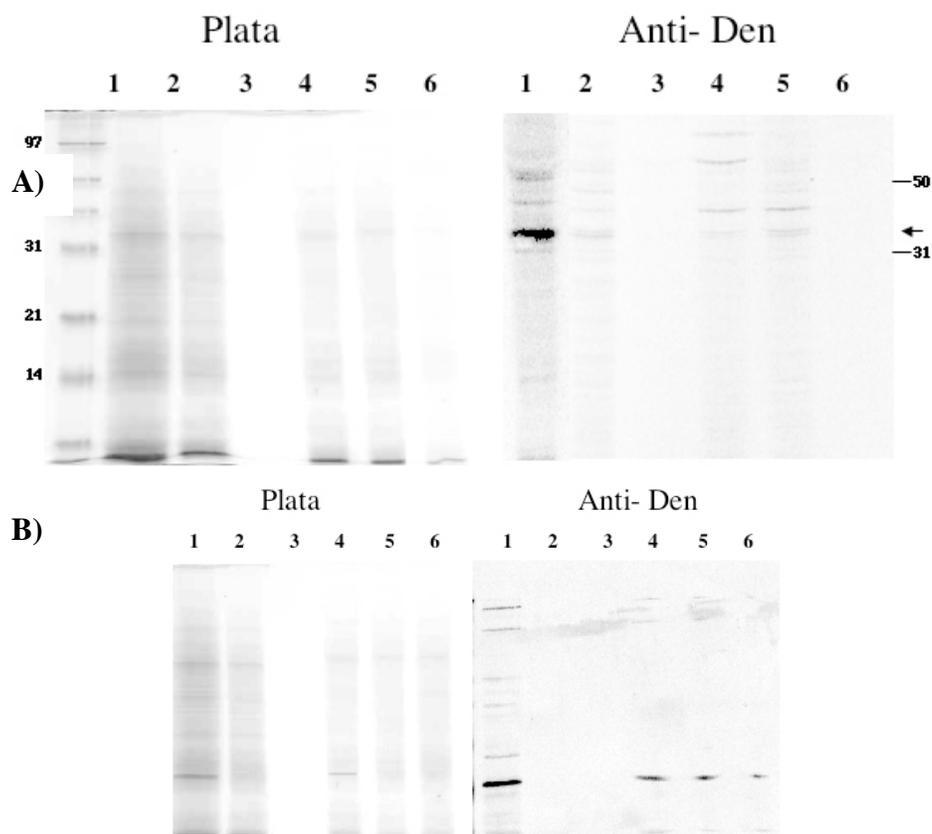


Figura 12. Purificación de las proteínas recombinantes producidas en Baculovirus. El panel A muestra la purificación del ectodominio de la proteína E; el panel B muestra la purificación del dominio III de la proteína E. Las líneas 1 representan el lisado celular total, líneas 2 el volumen de flujo, líneas 3 un pool de tres lavados y las líneas 4 a 6, el eluido cuando se aplica amortiguador de imidazol. Se corrieron dos geles paralelos, uno para teñir por la técnica de plata (Plata) y el otro para electrotransferir y realizar inmunodetección con el anticuerpo anti-dengue.

Ensayos de unión con las proteínas recombinantes producidas en baculovirus. A pesar de que la preparación de proteína no estaba pura a homogeneidad, se decidió de cualquier forma probar las fracciones eluidas en ensayos de VOPBA; después de todo, si las proteínas unían a la proteína de 65 kDa en solución, la preparación tal vez pudiera ser usada para realizar una purificación por afinidad. La figura 13 muestra el resultado de un experimento típico de VOPBA usando las preparaciones de proteína recombinante purificadas. Como es fácil apreciar, el ensayo no resulto tan limpio como el reportado inicialmente, esto se debe a que la preparación de membranas utilizada para estos

experimentos fue la preparación membranal de cerebro de ratón recién nacido. Decidimos utilizar esta preparación en lugar de la preparación de células N1E-115 ya que la cantidad de proteína requerida para el ensayo con estas células era mucho mayor que la que se requiere para el ensayo en proteínas de membrana de cerebro. La figura 13 muestra un experimento control para demostrar la especificidad del VOPBA con esta preparación; cuando se omiten al virus o al anticuerpo específico, hay bandas reactivas al segundo anticuerpo por debajo del marcador de 57 kDa, pero es claro que cuando se tiene el sistema completo, una banda de 65 kDa aparece. Así pues, la banda inespecífica de alrededor de 47 kDa sirvió de marcador de posición de la banda específica de 65 kDa de aquí en adelante.

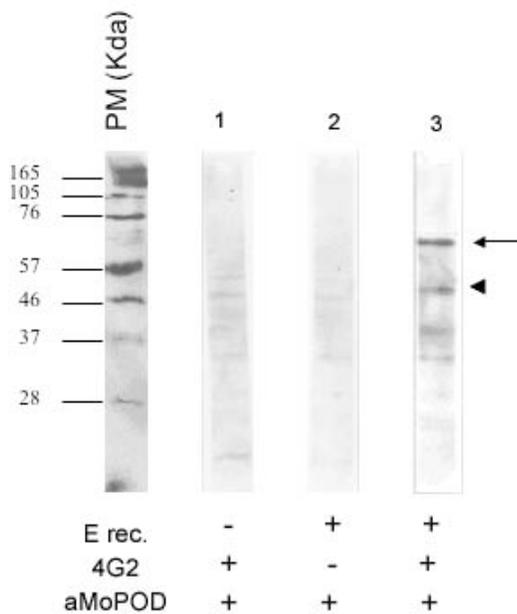


Figura 13. VOPBA para el receptor viral usando el ectodominio de la proteína E recombinante.

El ensayo VOPBA se realizó como se describe en Materiales y Metodos usando como ligando 1 ug/ml de proteína recombinante (E rec., líneas 2 y 3) y un anticuerpo monoclonal de alta afinidad para Flavivirus (4G2, líneas 1 y 3) que tiene su epítipo en el dominio III de la proteína E; para revelar la interacción se usó un anticuerpo anti-ratón acoplado a Peroxidasa (aMoPOD). La flecha indica la posición de la banda específica del receptor (aprox. 65 kDa) y la cabeza de flecha indica una banda inespecífica de referencia para los siguientes experimentos.

Cuando el ensayo se lleva a cabo, sustituyendo por las proteínas recombinantes al virus, el VOPBA muestra una clara señal positiva en el peso molecular esperado solo en el caso cuando se incubaba con el ectodominio de la proteína E, pero no así cuando se incubaba con el dominio III (línea B en la figura 14). Este resultado en cierta manera fue inesperado ya que es ampliamente considerado que el dominio III es el sitio de enlace con el receptor celular (Mukhopadhyay et al., 2005). Un estudio publicado durante el desarrollo de esta tesis reporta el mismo resultado (Bielefeldt-Ohmann et al., 1997).

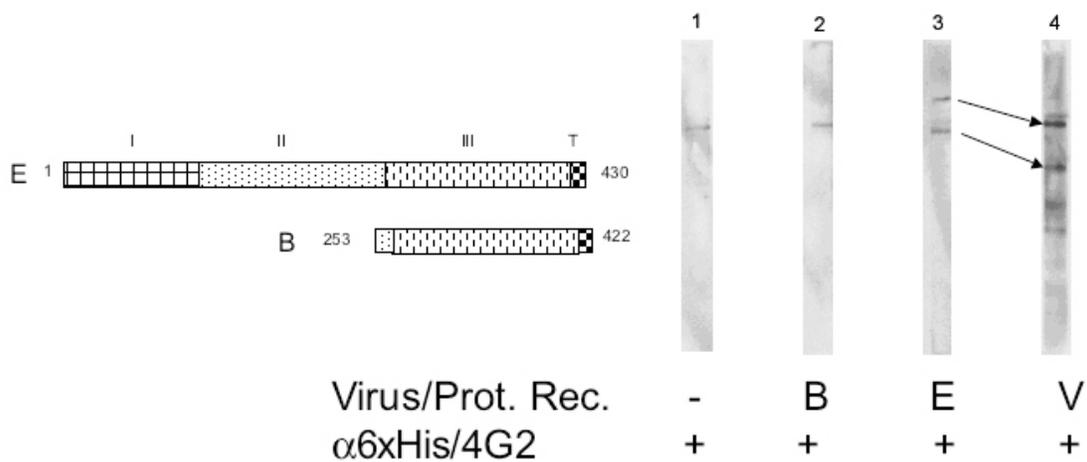


Figura 14. Reconocimiento del receptor de 65kDa por VD y proteínas recombinantes. Los ensayos VOPBA se realizaron de manera idéntica a como se describió anteriormente usando como ligandos un extracto de células Sf9 infectadas con un baculovirus control (ver texto, línea 1), suspensiones proteínicas recombinantes del dominio III (B, línea 2) y el ectodominio de la proteína E (E, línea 3) y una suspensión purificada de VD (V, línea 4). Las flechas entre las líneas 3 y 4 muestran las bandas homólogas para el receptor (superior) y la banda inespecífica que sirve de referencia (inferior). Para demostrar la interacción se utilizaron anticuerpos anti 6-Histidinas ($\alpha 6xHis$) en el caso de las proteínas recombinantes y anti-flavivirus (4G2).

Así pues, usando el ectodominio de la proteína se realizaron los restantes experimentos. El primero consistió en demostrar que el ectodominio reconoce a una proteína por un ensayo de sensibilidad a Tripsina, la figura 15 muestra un experimento típico. La

reactividad en VOPBA al ectodominio de la proteína E se elimina con el tratamiento con Tripsina, pero se mantiene con el tratamiento con Neuraminidasa, por lo tanto, sigue el mismo comportamiento en términos de unión que el virus completo.

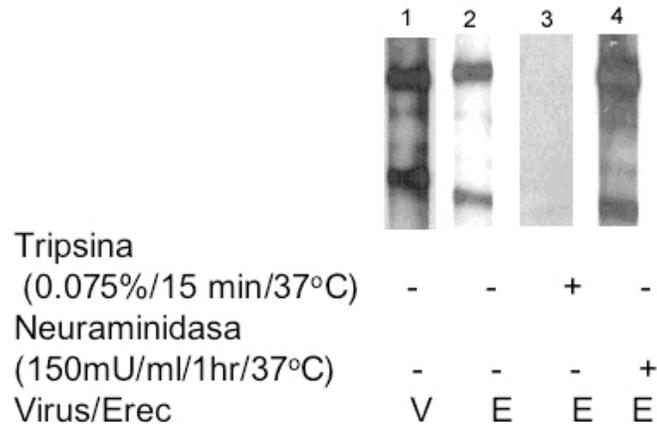


Figura 15. Sensibilidad de la interacción entre la proteína recombinante y el receptor de 65 kDa al tratamiento con enzimas. Proteínas de membrana de cerebros de ratón lactante fueron tratadas de acuerdo al tipo de enzima de prueba como se describe en Materiales y Metodos, después de lo cual se llevo a cabo un ensayo de VOPBA. Los carriles 1 y 2 son controles sin tratamiento e incubados con VD y el ectodominio de la proteína E recombinante respectivamente. Los carriles 3 y 4 fueron tratados con Tripsina y Neuraminidasa respectivamente.

El segundo experimento consistió en realizar un ensayo de competencia entre la proteína recombinante y el virus; para ello nos asistió el hecho de que la proteína recombinante tiene una etiqueta de 6xHis en el extremo amino terminal, así que la unión de ésta a la proteína de 65 kDa puede ser diferenciada de la del virus usando un anticuerpo anti-6xHis. Un experimento típico se muestra en la figura 16. El resulta no fue enteramente sorprendente ya que era de esperarse que el virus desplazara a la proteína recombinante simplemente porque el virus tiene múltiples copias del ligando en su superficie, no obstante, el hecho de que a ninguna dosis la proteína recombinante mantuviera su unión a la proteína de 65 kDa, parece indicar que la afinidad es realmente pobre. En la discusión

se ampliara este concepto y de allí la razón por la que consideramos que no era posible utilizar esta proteína recombinante como ligando para una cromatografía de afinidad.

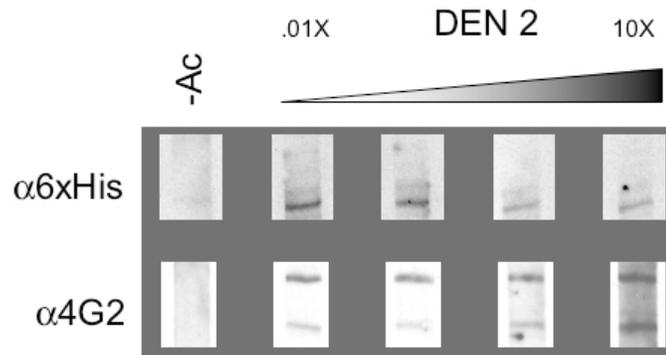


Figura 16. Ensayo de competencia Virus/Proteína recombinante por VOPBA. Los ensayos VOPBA se realizaron de manera similar a los anteriores, excepto que después de una incubación inicial con 10 ug/ml de proteína recombinante, se realizó una segunda incubación con una suspensión de VD a una dosis de 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 PFU/mm² de membrana (.01X a 10X); la unión de la proteína recombinante se determinó con el uso de un anticuerpo contra la etiqueta de Histidinas ($\alpha 6xHis$) y la correspondiente al virus con un anticuerpo específico de flavivirus (4G2)

El tercer experimento intentó demostrar que en el tejido cerebral del ratón lactante, el receptor se encuentra presente y que las proteínas recombinantes o el virus pueden reconocerlo. El racional de este experimento es que el VOPBA es un ensayo desnaturizante (SDS, 2-Mercaptoetanol y calor), mientras que esta variación en tejido fijado con etanol y embebido en parafina, mantiene la estructura nativa del receptor; este hecho podría ayudar a la proteína recombinante en la unión. Como se muestra en la figura 16, este no fue el caso, bajo ninguna condición se logró unión de las proteínas recombinantes; pero quizás mas importante, solo en algunas células se demostró algún tipo de unión con el virus; esto fue sorprendente pues la región escogida para realizar el ensayo es de las mas sensibles a la infección como ha sido probado en trabajos previos

(Sanchez-Burgos et al., 2004) como lo demuestra el panel Tinción en Figura 16C. Una posibilidad es que este ensayo no sea el idóneo para demostrar la actividad de unión y lo que se observe como unión sea un artefacto.

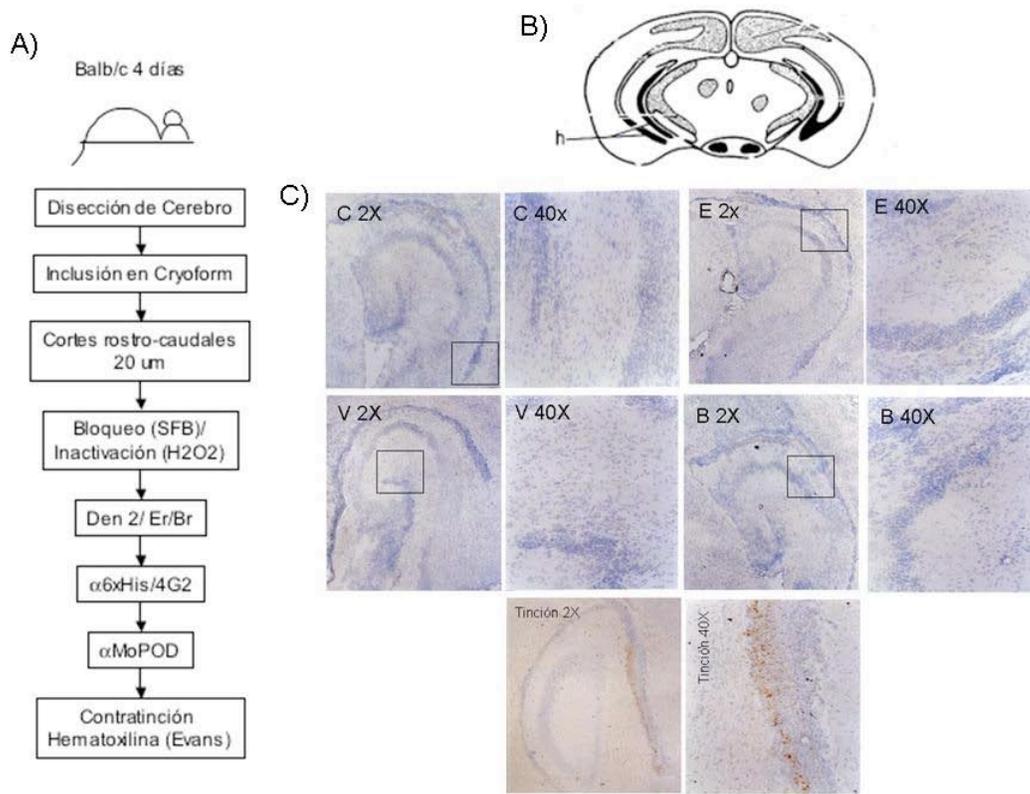


Figura 16. Ensayo de unión en tejido cerebral. Se realizó un ensayo de unión en fase sólida (VOPBA like) usando como sustrato cortes de cerebro de ratón lactante incluidos en parafina siguiendo el protocolo descrito en A. La región seleccionada para visualizar la unión fue el hipocampo, un esquema de su localización anatomica se muestra en B. En el panel C se muestran las micrografías de los ensayos usando como ligandos, PBS (paneles C); proteína recombinante E (paneles E); dominio III recombinante (paneles B) y suspensión virál (paneles V); se muestran dos imágenes tomadas a diferente aumento (2X y 40X), el recuadro muestra la región fotografiada a mayor aumento, Como control de tinción se incluyó muestras obtenidas de ratones infectados por vía intraperitoneal con VD de la misma región anatómica (Tinción).

Activación de mensajeros intracelulares por la unión del virus. En un esfuerzo por caracterizar al receptor, aun sin el aislamiento y purificación, se pensó que si el virus tiene un receptor celular en las células neurogénicas o, para el caso, en cualquier otra célula, es posible que la unión a este receptor active mensajeros celulares. Para empezar se escogieron mensajeros secundarios o terciarios para aprovechar el hecho de que son las primeras moléculas que son activadas. La figura 17 muestra los resultados de un experimento típico de activación de la cinasa dependiente de calcio y diacil-glicerol (PKC); cuando esta enzima está activa, se transloca del citoplasma a la membrana plasmática y es accesible a la unión por una análogo del diacil glicerol, de allí que se haya medido la unión a este análogo por un ensayo de unión. A pesar de que la activación no es masiva como cuando se despolariza la membrana en presencia de altas concentraciones de potasio (56 mM K⁺), la unión del virus activa la translocación de PKC (DEN 2) por lo menos en el doble de que lo hace el medio (Medio) en el que se resuspendió el virus después de la purificación en gradiente de sacarosa, aún más, la unión reportada por el medio es prácticamente indistinguible del control sin estimulación (Control).

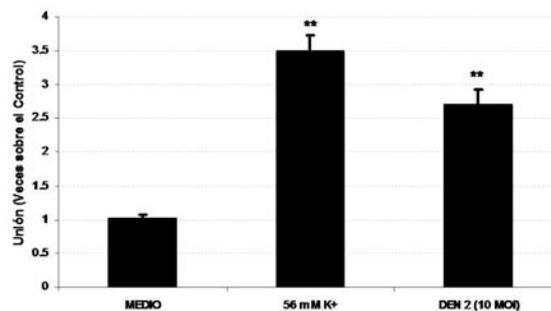


Figura 17. Unión de ³HP(BTO)₂ a la membrana de células N1E-115 durante la unión del VD. Células N1E-115 fueron incubadas por 30 min con D-MEM/10%SFB pH7.4 (MEDIO); D-MEM/10% SFB suplementado con 56 mM KCl (56 mM K⁺) o VD a una multiplicidad de infección de 10 pfu/célula (DEN2 10 MOI). Los resultados se muestran como el cociente de la cantidad de trazador radioactivo unido a la membrana en cada condición entre la cantidad de trazador unido cuando se incubaba con solución fisiológica de Ringer. Las barras de error representan la desviación estandar de tres experimentos independientes y los asteriscos representan p<0.001 (Prueba T) con respecto al Medio.

Otra enzima activada bajo estimulación es la Fosfolipasa A2 (PLA2), esta enzima cuando es fosforilada, convierte los fosfolípidos de membrana en sus derivados y libera ácido araquidónico (AA). El ensayo que se presenta en la figura 18 muestra que la unión del virus activa a PLA2 liberándose AA (Fig 18B); aunque, en magnitud, parece poca la cantidad de AA liberada (alrededor del 5%), esta cantidad es comparable con la que se obtiene con estimuladores potentes de la actividad de PLA2 como el A23187 (Fig. 18A). En la discusión se ampliará las perspectivas de este resultado en particular.

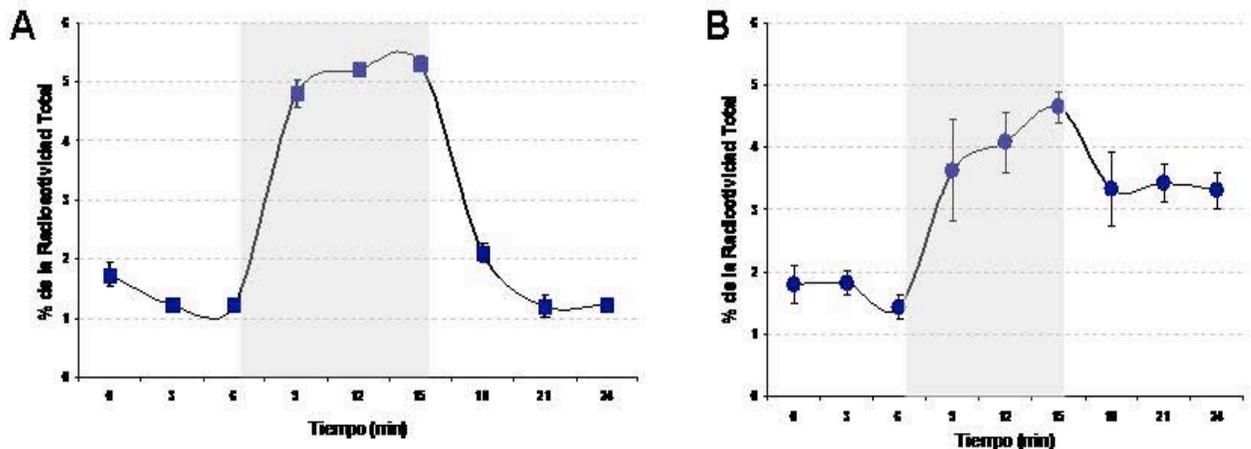


Figura 18.- Liberación de Acido Araquidónico durante la unión del VD a células N1E-115. Células N1-115 fueron cargadas con [3H]AA como se detalla en Materiales y Métodos. El día del experimento, las células se lavaron con solución de Hank's pH 7.4 suplementada con 1% Gelatina y HEPES 20 mM; se empezó a contar el tiempo después el último lavado (tiempo 0), cada 3 minutos se tomó toda la solución y se reemplazó con nueva (Tiempos 0,3, 6 y 18,21 y 24) o con 1 μM A23187 (A) o VD 10 MOI (B) en la solución antes descrita (Tiempos 9,12 y 15, zona sombreada). Las barras representan la desviación estandar de tres replicas.

Debido al llamado entrecruzamiento de señales (crosstalk) siempre es posible observar activación específica de cinasas de tirosina, estas son sensores primarios de las

señales extracelulares y frente a estímulos mitogénicos se activan en cascada (Huang and Reichardt, 2003); así pues una forma de definir la activación mitogénica, es la de observar el perfil de fosforilación en tirosina con un anticuerpo específico; por supuesto no es de esperarse un cambio global, pero es posible que algunas cinasas sean activadas. Los experimentos iniciales para determinar si proteínas de membrana experimentaban fosforilación de tirosinas por la unión del DV a la membrana de células N1E-115 arrojaron resultados inconsistentes (no mostrado) debido, probablemente, a que la magnitud de la fosforilación en tirosinas es relativamente pequeña y la sensibilidad del ensayo es baja (por ejemplo, en algún experimento, para obtener señales en el western blot, se tuvieron que cargar 50 µg de proteína y dejar exponiendo por alrededor de 30 minutos); ya que como control positivo en esos western, usamos un lisado de células U937 estimuladas con PMA y con ese control obtuvimos señales fuertes y consistentes y de que estas células son susceptibles a la infección por el DV (Kontny et al., 1988), los siguientes experimentos se desarrollaron en esta línea celular. La figura 19 muestra una banda específica de alrededor de 56 kDa (la señal del anticuerpo anti-fosfo tirosina es eficientemente competida por fosfotirosina (O-P-Tyr+), la fosforilación depende del tiempo y responde a dosis del ligando, en este caso el virus purificado), lo cual sugiere fuertemente que la estimulación es específica.

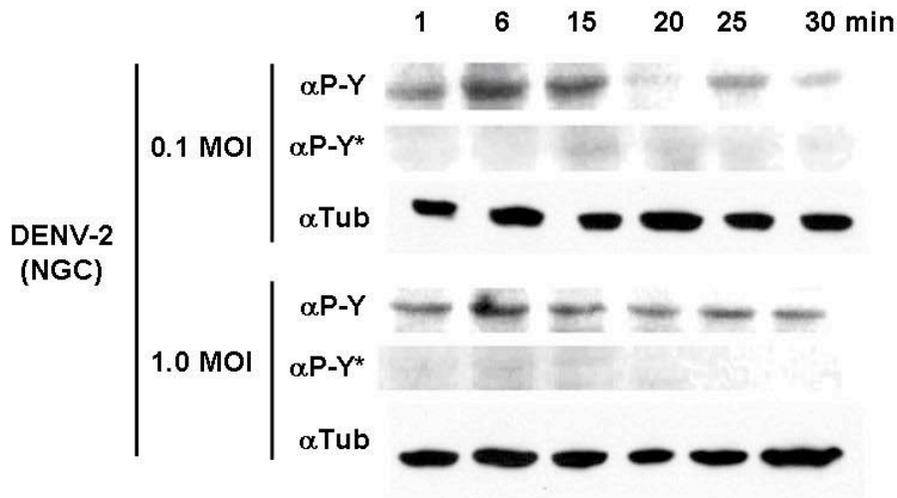


Figura 19. Fosforilación en tirosinas durante la unión del VD a la membrana de células U937. Células U937-115 incubadas con 0.1 y 10 MOI de VD por 1, 6, 15, 20, 25 y 30 min. Las células fueron lisadas como se describe en Materiales y Métodos y los extractos proteínicos fueron separados por SDS-PAGE y las proteínas fosforiladas en Tirosina fueron detectadas con un cocktail de anticuerpos monoclonales específicos (α P-Y, ZYMED). Para probar la especificidad de la reacción, las membranas fueron lavadas para eliminar el anticuerpo anti-fosfo-Tirosina y vueltas a incubar con el anticuerpo, en presencia de O-P-Tyr (α P-Y*). Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti β -Tubulina (α Tub, Santa Cruz)

No todas las vías o mensajeros probados fueron susceptibles de activación, por ejemplo la unión del virus a las células no activa la adenilato ciclasa, ni el influjo de Ca (no mostrados). Esto hace suponer que la activación de las señales intracelulares por la unión del virus sigue una vía específica.

DISCUSION

El estudio de los receptores virales parte del supuesto que estos tienen cierto grado de especificidad y, por lo tanto, una distribución discreta que refleja los hallazgos patológicos en los tejidos blancos de la infección. Se ha sostenido por cierto tiempo que el aislamiento y caracterización de los receptores específicos tiene un impacto relevante en el diseño de estrategias terapéuticas (Baranowski et al., 2003); sin embargo, con la

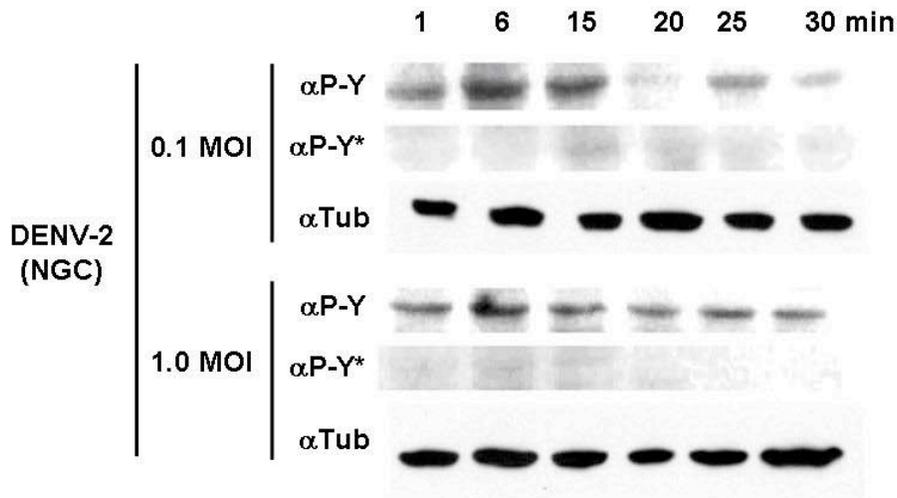


Figura 19. Fosforilación en tirosinas durante la unión del VD a la membrana de células U937. Células U937-115 incubadas con 0.1 y 10 MOI de VD por 1, 6, 15, 20, 25 y 30 min. Las células fueron lisadas como se describe en Materiales y Métodos y los extractos proteínicos fueron separados por SDS-PAGE y las proteínas fosforiladas en Tirosina fueron detectadas con un cocktail de anticuerpos monoclonales específicos (α P-Y, ZYMED). Para probar la especificidad de la reacción, las membranas fueron lavadas para eliminar el anticuerpo anti-fosfo-Tirosina y vueltas a incubar con el anticuerpo, en presencia de O-P-Tyr (α P-Y*). Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti β -Tubulina (α Tub, Santa Cruz)

No todas las vías o mensajeros probados fueron susceptibles de activación, por ejemplo la unión del virus a las células no activa la adenilato ciclasa, ni el influjo de Ca (no mostrados). Esto hace suponer que la activación de las señales intracelulares por la unión del virus sigue una vía específica.

DISCUSION

El estudio de los receptores virales parte del supuesto que estos tienen cierto grado de especificidad y, por lo tanto, una distribución discreta que refleja los hallazgos patológicos en los tejidos blancos de la infección. Se ha sostenido por cierto tiempo que el aislamiento y caracterización de los receptores específicos tiene un impacto relevante en el diseño de estrategias terapéuticas (Baranowski et al., 2003); sin embargo, con la

sola excepción de la serie de moléculas que intervienen en la unión e internalización de HIV, no hay evidencia que sostenga esta forma de pensar (Vermeire and Schols, 2005). El problema es que, aparentemente, los virus usan mas de una molécula en la interacción inicial con la membrana de la célula blanco; así pues, se han propuesto diversas nomenclaturas a estas moléculas de unión, receptores fisiológicos, co-receptores, moleculas de entrada, etc., (Goff, 2007; Marsh and Helenius, 2006; Spear, 2004). Si la sola interacción inicial del virus con la membrana de la célula es compleja porque involucra múltiples moléculas, ¿es posible aislar y caracterizar un receptor específico? Durante el desarrollo de esta tesis, algunos de los problemas derivados de la respuesta a esta pregunta se hicieron evidentes.

El comportamiento de los flavivirus en el ratón infectado experimentalmente y en los casos de los flavivirus que alcanzan el sistema nervioso central del humano es peculiar; aunque todos tienen tropismo neuronal, las regiones del cerebro que son afectadas son casi características de la especie de flavivirus, aunque al final todos producirán encefalitis o daño de medula espinal y parálisis de miembros posteriores dependiendo del hospedero (Maximova et al., 2008; Yasui, 2002); Thomas Monath quizá fue el primero en sugerir que los diversos patrones de neuroinfección observados en las infecciones por flavivirus podrían ser explicados en función de la diferencia en conjuntos de receptores expresados en la membrana de las neuronas blanco (Monath, 1989). En el caso de la infección del ratón lactante por DV, las áreas afectadas incluyen la corteza y el hipocampo cuando el virus es inoculado por vía intraperitoneal y los estudios histopatológicos demuestran antígeno viral en neuronas, endotelio vascular y microglia (Sanchez-Burgos et al., 2004); así mismo, el estudio del cerebro de un caso fatal de FHD/SCD con complicaciones

neurológicas arrojo básicamente la misma información (Ramos et al., 1998). Por otro lado, el estudio de la infección de cultivos primarios de células de sistema nervioso central de embrión de ratón en los que las neuronas son la estirpe celular predominante demostró que únicamente las neuronas son blanco de la infección viral, aun mas, que principalmente las neuronas de tipo bipolar o piramidales, eran susceptibles a la infección por DV (Imbert et al., 1994); ese estudio fue extendido durante el desarrollo de mi tesis de maestría con dos objetivos, calcular la proporción de neuronas infectadas e intentar una caracterización de las neuronas susceptibles por inmunohistoquímica con base en el contenido de neurotransmisor: así, se determinó que independientemente de la dosis viral y aun a tiempos largos de infección, la proporción de neuronas infectadas siempre fue menor a 10 %; la caracterización inmunohistoquímica resulto inconsistente, aunque con cierta tendencia a encontrar colocalización de antígeno viral en células que expresan la enzima Dopamina-b-Hidroxilasa (Jose Ramos Castañeda Jose Ramos-Castaneda. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias UNAM, 1995). El hecho de que solo una subpoblación neuronal fuera blanco de la infección reforzó la idea del receptor específico, no obstante, debido a la heterogeneidad del cultivo primario, los ensayos preliminares de VOPBA resultaron poco claros, por ello se decidió buscar una línea celular neurogénica que fuera sensible a DV.

Cinco líneas de ratón fueron probadas para la infección por DV, tres neurogenicas, N1E-115, Neuro 2a y NS21, un glioblastoma, NG108 y un gliosarcoma, C6; solo la línea N1E-115 mostró niveles consistentemente altos de antígeno viral por inmunofluorescencia. Obviamente una explicación simple es que algunas de estas células son naturalmente resistentes a la infección por su estirpe, por ejemplo los gliomas que se desarrollan a

partir de células gliales y hemos demostrado que la glia es refractaria a la infección (Imbert et al., 1994); en el caso de las células Neuro 2a y NS21, se podría especular que siendo estas células diferentes en su comportamiento fisiológico en comparación con las N1E-115 (Amano et al., 1972; LePage et al., 2005), la composición de moléculas de membrana plasmática debe ser diferente y por lo tanto los receptores que puede utilizar DV.

El trabajo previo en la caracterización de la infección por DV en N1E-115 se realizó por analogía a lo que se sabía de la infección en monocitos en cultivo (Daughaday et al., 1981); así, se determinó que la unión del virus a estas células está mediada por una proteína, pues la unión es sensible a tripsina pero no a neuraminidasa. A partir de aquí comenzó la búsqueda del receptor viral en estas células. Los ensayos de VOPBA realizados en fracciones enriquecidas en membranas mostraron que una molécula de 65 Kda podía unir al virus en solución, este receptor es sensible a tripsina e insensible a neuraminidasa (figura 4), lo cual está en concordancia con lo observado en la infección de células en cultivo (José Ramos Castañeda, Tesis de maestría, Facultad de Ciencias UNAM, 1995), además, también se expresa en células neurogénicas de humano como la línea SK-NH. Ahora bien, el grupo de Rory Marks demostró que los GGA son las moléculas que unen al virus en células epiteliales de riñón (Chen et al., 1997), éstas moléculas son constituyentes de la matriz extracelular y se expresan en prácticamente todos los epitelios, pero no hay información disponible sobre la expresión de éstas moléculas en células neuronales, es posible que la mayor concentración de GGA's en células del sistema nervioso central, se encuentre en asociación con las células gliales, aunque este hecho no explica la selectividad que se ha observado tanto *in vivo* como *in*

vitro en la neuroinfección por DV, ahora bien, es poco probable que la preparación membranal utilizada para el ensayo de VOPBA contenga una cantidad apreciable de GGA's , en parte por el método de aislamiento de las membranas y el proceso de SDS-PAGE/Electrotransferencia, pero además porque estas células producen muy poca matriz extracelular (para el subcultivo no es necesario agregar tripsina); más importante que eso, resulta difícil creer que los GGA tengan una afinidad por una proteína membranal y solo por una. Un fenómeno observado, pero no estudiado en este trabajo fue que estas células resisten la infección cuando el cultivo es inducido a diferenciación (Jose Luis Imbert Palafox, Tesis de Doctorado en Ciencias, ENCB/IPN, 1999); aunque es probable que la concentración de GGA varíe con el estado de diferenciación, parece mas probable que la expresión de una proteína membranal este regulada por ésta. Otra molécula relacionada a la unión del DV es el receptor para lipopolosacárido bacteriano CD14 (Chen et al., 1999); independientemente de que la expresión de este receptor parece estar restringida a células de la serie retículo-endotelial, el peso molecular de CD14 no corresponde con el aquí reportado, pero además, en un estudio en el que se separaron subpoblaciones de células mononucleares por sus marcadores de superficie obtenidas de pacientes con FD o FHD/SCD ningún virus fue detectado en las células CD14+ (Pichyangkul et al., 2003), así que muy probablemente este receptor no sea fisiológico. Luego de la publicación de los resultados presentados en esta tesis junto con los del grupo de Rosa Maria del Angel (Ramos-Castaneda et al., 1997; Salas-Benito and del Angel, 1997), varios mas han sido publicados usando variaciones del VOPBA que aquí se utilizo (Bielefeldt-Ohmann et al., 2001; Jindadamrongwech et al., 2004; Tio et al., 2005); la variedad de moléculas reportada es proporcional a la cantidad de células estudiadas lo que hace suponer que la

estructura que reconoce la PVU de DV es más un motivo estructural que una estructura específica de una proteína. Un aspecto que parece claro, es que esta metodología no es compatible con la micro secuenciación, el intento realizado en este estudio, no arroja información discernible; pero aparentemente ningún esfuerzo ha sido exitoso ya que de los aproximadamente 6 artículos que utilizan VOPBA para la caracterización del receptor, ninguno menciona o propone alguna proteína en particular. Finalmente, recientemente se ha involucrado a la lectina DC-SIGN como receptor para el virus en células dendríticas (Tassaneetrithep et al., 2003), el dato relevante es que al transfectar esta lectina en células THP-1 (células dendríticas humanas) estas células adquieren sensibilidad a la infección por los cuatro serotipos de DV y el uso de anticuerpos contra esta molécula (o su homólogo L-SIGN) inhiben la infección; resulta interesante este resultado porque esta familia de lectinas está conservada en la escala evolutiva y parece que el uso diferencial de las subpoblaciones de DV en el mosquito y el humano determina el balance de subpoblaciones virales (Navarro-Sanchez et al., 2003); no obstante, la evidencia no muestra cuál es el nivel de participación de esta molécula en la interacción entre la PVU y la membrana celular. Existe un reporte singular en la literatura reciente que muestra la capacidad de la proteína BiP/GRP 78 como receptor para DV (Jindadamrongwech et al., 2004), la singularidad radica en el hecho de que BiP/GRP 78 es una proteína residente de RE en donde ejerce su papel de chaperona de los polipéptidos recién sintetizados y translocados al lumen del RE; en condiciones al equilibrio, prácticamente la totalidad de esta proteína se encuentra retenida intracelularmente y solo como resultado de la natural ineficiencia del proceso de retención, BiP/GRP 78 puede seguir la vía secretoria (Buchner, 1996); otro aspecto

relevante de la química de esta proteína es que es soluble y, que no sea por su actividad como chaperona, no se conoce asociación estable con proteínas de membrana excepto cuando en raras ocasiones se asocia con proteínas ancladas por GPI (Philippova et al., 2008); lo mismo puede argumentarse para la chaperona de citoplasma HSP70/90 que ha sido reportada como receptor para DV aunque también se ha reportado evidencia en contra (Cabrera-Hernandez et al., 2007; Reyes-Del Valle et al., 2005); así pues, resulta sorprendente que una molécula de estas características pueda tener una actividad significativa en el enlace del virus a la membrana celular.

Ya que la interacción entre la partícula viral y el receptor celular de 65 Kda (p65vr) se da en solución, nuestros primeros esfuerzos se enfocaron en el aislamiento de este receptor por medio de intercambio iónico (fig.5). A pesar de que se puede encontrar cierta actividad de unión en la fracción eluida, ésta resulta insignificante en términos preparativos; este problema pudo tener una solución relativamente sencilla si hubiera la posibilidad de escalar el cultivo celular, no obstante, en la escala práctica y realista de este proyecto no fue posible realizar dicho escalamiento. La explicación más plausible de la extremadamente baja recuperación de p65vr es que esta molécula estuviera en un número relativamente pequeño en la membrana celular; después de todo, el ensayo de VOPBA es un ensayo que amplifica la señal. Así pues, se decidió usar una variación del VOPBA para aislar el receptor por afinidad. Lo que se decidió hacer fue preparar un método preparativo de afinidad para aislar p65vr usando como ligando proteína E recombinante purificada. Este enfoque metodológico supone que la proteína E monomérica y soluble, une a p65vr en las mismas condiciones que la partícula viral completa. En ese momento, no había ninguna razón a priori para sospechar que ese no

fuera el caso, la estructura del virión y las transiciones estructurales de los oligómeros fueron descritas solo hasta recientemente (Mukhopadhyay et al., 2005; Pokidysheva et al., 2006; Rey, 2003). Así pues se decidió producir el ectodominio de la proteína E del serotipo 2 (NGC); el primer vector utilizado para la producción fue el pTT115 , la expresión de la proteína esta bajo el control de un promotor inducible por choque térmico (Terwilliger et al., 1988), la idea en este caso, era producir la proteína viral recombinante y purificarla por alguna técnica preparativa. Como ya ha sido mostrado en la sección de resultados este enfoque no fue exitoso y entonces se decidió cambiar de sistema de expresión y célula hospedera para intentar la purificación homogénea del ectodominio. Para ello se decidió en esta ocasión, subclonar el ectodominio fusionado a una etiqueta de 6xHis en el extremo amino terminal en un plásmido cuyo promotor fuera inducible por IPTG y en una cepa de E.coli mutada en un par de sistemas de proteasas (BL21DE); a pesar de estos cambios, la calidad y cantidad de proteína E recombinante expresada no mejoro sustancialmente (fig.9). Se pensó que el problema era que siendo la proteína E una proteína “eucariota” las propiedades fisicoquímicas y estructurales de la proteína E impiden obtenerla de manera homogénea. Hay muchos ejemplos de lo anterior, así que decidimos intentar la expresión en un sistema eucariota; por ello usamos el sistema de baculovirus; los baculovirus representaban un sistema atractivo por dos razones: son sistemas altamente eficientes en la expresión de proteína heterólogas y son virus de artrópodo como los flavivirus (Kost et al., 2005), así que se pensó que los problemas derivados de la relación proteína-contexto celular en la expresión serian mínimos. Aunque se logró la expresión más o menos homogénea de la proteína E (fig 12) y esta proteína recombinante se une a p65vr (fig 13); se presentaron dos problemas separados

difíciles de abordar. El primero tiene que ver con la eficiencia con la que la proteína recombinante es recuperada; aun después de probar diferentes métodos de purificación y aislamiento la cantidad de proteína recombinante siempre fue muy pequeña y aunque se podía demostrar por western blot la presencia de la proteína recombinante, en ningún caso se pudo observar la proteína en geles teñidos con plata; existen varios reportes en la literatura que confirman este comportamiento de la proteína E producida de manera recombinante (Feighny et al., 1994; Putnak et al., 1991), los estudios de la estructura de los oligómeros de proteína E en el virión y el efecto del pH en sus estados de agregación muestran que variaciones relativamente pequeñas de pH en la solución en la que se encuentra la proteína, afectan la estructura y posiblemente el estado de agregación; aunque en todo momento se intento mantener las condiciones de las soluciones amortiguadoras a pH neutro, la lisis de las células se llevo a cabo en un amortiguador relativamente alcalino; es bien conocida la protección que la proteína preM le confiere a la proteína E en el transito del virión hacia la membrana celular, esto es, de un pH ácido a uno neutro (Seligman and Bucher, 2003), así que es posible que aun condiciones suaves de lisis celular pudieran afectar la solubilidad de la proteína o su estado de agregación; un dato que favorece esta explicación es que la cantidad de proteína recombinante que se mantiene en la fracción particulada del lisado celular es ostensiblemente mayor que la que se puede obtener en solución (fig 9). El segundo problema era que aun suponiendo que tuviéramos una solución homogénea de proteína E recombinante, la cantidad necesaria para intentar la purificación de p65vr tendría que ser muchísimo mayor que la que nuestro sistema de expresión podría proveernos; como se muestra en la figura 16, el desplazamiento de la unión de la proteína recombinante a p65vr es prácticamente

insensible a la dosis, esto se puede interpretar como que la proteína recombinante es un ligando extremadamente débil cuando compite con la partícula viral; así mismo la proteína viral recombinante no desplaza la unión de la partícula viral a p65vr como era de esperarse. Si la proteína recombinante tiene una baja afinidad por p65vr, ¿es posible estandarizar un proceso de aislamiento por afinidad? La respuesta tendría que ser que depende de la cantidad o número de proteína recombinante que se una a la matriz. Ya se describió en la introducción de este trabajo que el enlace monovalente entre la PVU y el RC es de baja afinidad en términos generales y que solo el hecho de que hay múltiples copias de la PVU en la superficie del virión que pueden interactuar de manera multivalente con el RC modifican la avidéz de tal forma que hacen este enlace prácticamente irreversible (Wickham et al., 1990); en el caso específico de DV, hay por lo menos un reporte que dan cierta información sobre este punto; en el se determinó la capacidad de saturación de células en cultivo a la unión de DV marcado radiocativamente (Suksanpaisan and Smith, 2003); el ensayo de unión mostró que la unión de estos virus a las células es no saturable; lo anterior puede interpretarse como si los sitios receptores se encontraran en un número infinitamente mayor a la cantidad de virus que compite por la unión al receptor con el virus marcado o como si la unión del virus fuera un fenómeno irreversible; en la primera interpretación, la limitante es la capacidad de la resina que contiene la proteína recombinante, si la capacidad es baja en la sobrecarga por ligando disminuiría la eficiencia (Biosystems, 1996); si el fenómeno es irreversible, no habría manera de purificar a homogeneidad el receptor; como ya se discutió en la sección de antecedentes, las moléculas que sirven de receptores virales que se encuentran en mayor abundancia son moléculas sencillas (ácido sialico o GGAs, por ejemplo) lo cual es

incompatible con el hecho de que la molécula detectada por el VOPBA es una proteína que se encuentra en un número unitario pequeño; la unión irreversible podría estar relacionada tanto al enlace multivalente, como el hecho de que, en adición al enlace específico, en la interacción inicial están involucrados otros elementos que participan tanto en la unión (por ejemplo coreceptores o los así llamados sitios de enlace) y que contribuyen a la unión específica del virus (Wickham et al., 1990); recientemente Carlos Arias y cols., han discutido este fenómeno (Lopez and Arias, 2004); en cualquier caso, la participación de estos elementos en las condiciones de una cromatografía, modificarían las condiciones de unión específica por competencia o al contaminar la fracción eluida. Otro estudio demostró que variaciones relativamente pequeñas en el ambiente iónico o pH de las suspensiones virales (sobretudo a altas concentraciones de virus) modifican sustancialmente la infectividad (Sithisarn et al., 2003), de tal forma que después de 24 hrs en una solución amortiguadora fisiológica los virus se agregan casi cuantitativamente, en ausencia de proteína en el medio; el trabajo al que se hace mención no prueba que la unión de los agregados virales a la membrana celular sea la causa de la inactivación viral, pero probablemente, la vía de entrada de un agregado microscópico sea diferente al de una partícula viral, si este es el caso, la unión específica carece de significado y, por tanto, cualquier otra molécula presente en la mezcla puede interactuar inespecíficamente con el agregado; aunque es poco probable que en términos relativos se alcanzara la densidad de unidades de proteína recombinante viral en la matriz de cromatografía comparada con la que hay en la partícula viral, la posibilidad de agregación sigue estando presente ya que, como se dijo arriba, la tendencia de la proteína recombinante producida en este trabajo es a agregarse (fig 9). En un intento de limpiar el sistema y contribuir con

una prueba definitiva de que el sitio de interacción entre la proteína E y el receptor celular se encuentra en el dominio III de la proteína, se subclonó y produjo el baculovirus respectivo que expresara este dominio; desafortunadamente, los ensayos de VOPBA mostraron que en las condiciones evaluadas, el dominio III producido de manera recombinante no se une a proteínas de membrana de células N1E-115; un estudio publicado por Helle Bielefeld-Ohman y colaboradores (Bielefeldt-Ohmann et al., 2001), siguiendo un enfoque prácticamente idéntico al usado en este estudio corroboran nuestras observaciones; sin embargo, ni en el trabajo citado, ni en este, se puede excluir la posibilidad de que factores estructurales de la propia molécula (por ejemplo, el doblaje de la proteína en el plano de la membrana viral) o de la pareja en el homodímero contribuyan a la unión. En un análisis general, la pretensión de aislar al receptor por una simple cromatografía de afinidad parece, en retrospectiva, un método con pocas posibilidades de éxito, si acaso tenía alguna; no obstante, el grupo de Rosa Maria del Angel, reporto el aislamiento exitoso de los receptores definidos por VOPBA por cromatografía de afinidad usando como ligando proteína E recombinante (Reyes-del Valle and del Angel, 2004); en ese trabajo, se usaron como fuente de proteínas membranales, las aisladas de células de mosquito en cultivo; es muy probable que las obvias diferencias entre las células de mosquito y las de mamífero, permitieran de alguna forma el aislamiento ya que las condiciones de la cromatografía en si misma no son muy diferentes a las que el mismo grupo reportó para el ensayo de VOPBA; además, llama la atención que en el reporte de esa purificación solo se señale que se está trabajando en la secuenciación de las proteínas eluidas, pues resulta relativamente sencillo en este momento tener datos rápidos de la secuencia (por espectrometría de masas) con la que

alimentar una búsqueda en las bases de datos que se tienen disponibles para mosquito (el genoma de *Aedes* está totalmente secuenciado). La pregunta inmediata es: ¿hay alguna forma de conocer la identidad del receptor celular para DV? La búsqueda continúa, desde luego, pero, excluyendo el trabajo reportado por del Angel y colaboradores, el consenso es que la aproximación tradicional bioquímica no dará resultado (R. Marks Universidad de Michigan-Ann Arbor, 2004, comunicación personal); así pues, es posible que una aproximación genética pudiera dar un mejor resultado, por ejemplo, la clonación por expresión (Teitler and Herrick-Davis, 1994), en esta metodología una biblioteca de expresión de cDNA de una célula que posea el receptor (por ejemplo la N1E-115) es transfectada en una línea celular que muestre un VOPBA negativo y, de preferencia, que sea refractaria a la infección por dengue (por ejemplo el Glioma C6); lo que sigue es retar a estas células con la proteína viral recombinante o a la partícula viral y tamizar por VOPBA o inmunofluorescencia, al final se requeriría rescatar el plásmido que contiene el transgene y secuenciarlo.

A pesar de no haber podido aislar al receptor viral (p65vr) se consideró que ya que las células N1E-115 tienen una membrana excitable cuando son inducidas a diferenciación y que aun en estados indiferenciados son capaces de transducir señales cuando son tratadas con neurotransmisores como la serotonina, la acetilcolina y la bradikinina (Reagan et al., 1996), la unión del virus a una molécula de membrana pudiera evocar alguna cascada de transducción de señales. Este fenómeno se da cuando el receptor viral es específico y fisiológico como se ha demostrado en algunos casos (Favoreel et al., 2007; Munter et al., 2006). No hay una razón a priori para sospechar que la unión de DV a cualquier célula dispare vías de transducción de señal, no obstante está razonablemente documentado que

algunos intermediarios clave de diversas vías de señalización se encuentran sobre expresados o en sus formas activas (Hibberd et al., 2006). Por supuesto la infección en si misma debe producir estrés y por tanto, estos mediadores podrían ser resultado de la replicación viral mas que de la unión; no obstante, si p65vr es una molécula acoplada a una cascada de señalización, es probable que al menos tengamos un marco fisiológico donde ubicar al esta molécula. Decidimos detectar moléculas cuya activación fuera el punto de confluencia de varias cascadas, es evidente que una aproximación de este tipo no tendría porque revelar la identidad del receptor, pero proveería la información suficiente para demostrar que la unión del virus dispara alguna señal; un problema potencial consiste en que, como ha sido reportado para otros virus, la unión de la membranas viral y plasmática, desestabiliza el equilibrio de esta ultima cambiando las propiedades de permeabilidad iónica y por lo tanto, activando inespecíficamente receptores acoplados al flujo iónico (en particular de Ca^{2+}); esta mas o menos bien caracterizado que DV y todos los demás flavivirus entran por endocitosis mediada por receptor a la célula y que solo cuando el pH del endosoma alcanza alrededor de 5.5 la membrana viral y la de endosoma se fusionan y el genoma es liberado (Mukhopadhyay et al., 2005); así pues, aunque existe la posibilidad de que DV altere las características de permeabilidad de la membrana celular al internalizarse, esta podría no ser significativa, los resultados muestran que el influjo de Ca^{2+} no se ve influido por la presencia del virus, al menos durante la ventana de tiempo en el que se realizaron los experimentos. Así pues, resulta muy interesante que solo la vía que depende de diacilglicerol sea significativamente activada por la unión de DV a la membrana; se realizaron dos intentos de corroborar esta observación detectando moléculas que se encuentran corriente debajo

de la señal de PKC, la activación de PLA2 y la generación del factor de transcripción AP-1; es de particular interés la activación de PLA2 pues el producto de esta activación es ácido araquidónico, el cual es el intermediario clave en la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos (Scott et al., 1999; Sun et al., 2004); ambas moléculas están estrechamente relacionadas a la fisiología normal y patológica de las plaquetas, que, como se comentó en la introducción, durante la FHD/SCD disminuyen a niveles que pueden ser extremadamente bajos; se piensa que esta disminución es por uso ya que no hay una deficiencia primaria de megacariocitos y el número de plaquetas se recupera tan pronto el episodio de FHD/SCD remite (Bhamarapravati, 1989); también se ha asociado un cierto grado de coagulación intravascular diseminada (Funahara et al., 1987). Aunque no hay alteraciones de la coagulación que estén asociadas a la infección por dengue, el hecho de que en este estudio se haya podido detectar la activación de PLA2 permite especular que este fenómeno asociado a la unión del virus, pudiera estar involucrado en la patogénesis de los cuadros graves de la infección por DV en humanos; en este contexto es significativo que se encuentre antígeno viral asociado a las membranas de las plaquetas y que en pacientes con FHD/SCD la forma soluble de PLA2 este significativamente incrementada (Boonpucknavig et al., 1979; Juffrie et al., 2001) La activación de cascadas de transducción de señales podría ser solo un epifenómeno de la interacción entre el virus y la célula, pero también es probable que dicha activación provea de un ambiente óptimo para la replicación celular, por ejemplo, DV tiene por sitio de replicación el Retículo Endoplásmico de la célula y se sabe que un fenómeno que acompaña a la replicación es la expansión del RE (Mukhopadhyay et al., 2005; Stohlman et al., 1975); ahora bien, la expansión de membranas es un fenómeno asociado a la sobrecarga del RE (Rutkowski

and Kaufman, 2004); de hecho, células secretorias profesionales como las células plasmáticas o las células beta del páncreas, de alguna manera requieren activar de manera fisiológica, los mecanismos que permiten mantener el volumen efectivo del RE para evitar la agregación de proteínas, en conjunto, estos fenómenos forman parte de el llamado Respuesta a las Proteínas Mal Plegadas [UPR, por sus siglas en ingles,(Rutkowski and Kaufman, 2004)]; el virus al replicarse, sobrecargaría el RE de la misma forma o probablemente en un volumen mayor que lo que lo haría la sobre expresión de una proteína en una célula no secretoria, así pues resultaría lógico que la infección por DV y en general por cualquier Flavivirus, activara el UPR, de hecho hay un reporte en la literatura que demuestra la activación del UPR en la infección por Dengue (Yu et al., 2006); ahora bien, el UPR tiene un componente (la activación de la cinasa del factor de traducción eucariota eIF2 α , PERK) que suprime la traducción de proteínas, no obstante, es un hecho conocido que en las infecciones por Flavivirus no hay supresión de la síntesis de proteínas, así pues, la activación de mensajeros intracelulares previo a la replicación en sí, podría estar vinculada con la modulación de la respuesta celular a la replicación viral o, quizás mas importante, a la respuesta antiviral; en un reporte reciente, el grupo de Eva Harris demostró que la acción antiviral de Interferón de tipo I solo es eficiente cuando las células son tratadas previamente al contacto con el virus (Diamond et al., 2000), una de las vías de activadas por IFN, es la de la cinasa dependiente de IFN, PRK, que tiene como sustrato al mismo eIF2 α , así que resulta sumamente atractivo, especular sobre la posibilidad que esta vías convergentes UPR/IFN en eIF2 α podrían ser moduladas de alguna forma por la infección viral.

Como parece evidente de lo hasta aquí presentado, la búsqueda de un receptor específico para DV es mucho más compleja de lo que inicialmente suponíamos, solo el número de moléculas que interactúan con el DV en diversos ensayos de unión, da una idea de lo complejo del panorama (Cabrera-Hernandez, 2005); en principio partimos de la idea de que solo una molécula era capaz de unir al virus en la membrana celular: como se ha comentado hay por lo menos dos moléculas que podrían estar participando en la unión, los GGA's y un receptor de naturaleza proteínica ya sea este una lectina (DC-SIGN) o alguna de las proteínas caracterizadas por el ensayo de VOPBA (PCUV); adicionalmente podría participar alguna proteína como CD14 o BiP/GRP78 que sin ser receptores fisiológicos, podrían ser moléculas accesorias y necesarias en algunas estirpes celulares. El modelo de interacción entre la partícula viral y la membrana celular podría involucrar las GGA's como sitios de entrada, seguidos por la interacción con DC-SIGN o PCUV y en ciertos casos y condiciones específicas con CD14 o BiP/GRP78 (fig 20); ninguna interacción es excluyente de la otra, así que lo que en un principio definimos como receptor celular para DV podría convertirse en una especie de complejo macromolecular que podríamos llamar el Complejo del Receptor Celular (CRC) en el que diferentes moléculas, reconocen diferentes dominios en los dímeros de la proteína E y que en conjunto permiten la unión específica y fisiológica del virus a su célula blanco, solo baste decir a manera de ejemplo que el receptor para antígeno de células T (TcR) es uno de los mejor caracterizados y que en su comportamiento fisicoquímico y biológico es muy semejante, hasta en lo que se refiere a la activación de mensajeros intracelulares, al que aquí se propone para el CRC de DV (Choudhuri and van der Merwe, 2007). Este modelo difiere en términos cinéticos del propuesto por Arias y cols. (Lopez and Arias, 2004), ya

que la unión fisiológica solo se podría establecer una vez que todos los componentes del CRC estuvieran interactuando con la partícula viral; no obstante, dado que las interacciones pueden ser instantáneas en términos cinéticos, la diferencia con el modelo de enlace sucesivo podría ser solo instrumental; en todo caso, la noción de receptor específico para DV se ve modificada sustancialmente ya que en ningún caso se ha podido demostrar que la ausencia de cualquiera de estas moléculas evite la unión del virus a la célula. Hasta aquí no se ha discutido la comprobada participación de los receptores para Fc de Inmunoglobulinas (FcγR) en la infección de macrófagos por DV opsonizados con anticuerpos no neutralizantes (Halstead, 2003); aunque esta interacción no es estrictamente una del tipo virus-célula como se ha definido aquí por el hecho de que no es una interacción directa, si demuestra que DV utiliza diversas estrategias para infectar a una célula y que en términos de una infección natural, la presencia de un receptor específico y fisiológico puede ser dispensable. En conclusión, ¿es posible aislar y caracterizar un receptor específico para DV? bueno, la respuesta sería simplemente no, aunque sí es posible caracterizar moléculas celulares que unan al virus. La propuesta a futuro debería ser, en caso de que algún método genético pudiera definir con claridad la identidad de las moléculas involucradas en la unión, ¿cómo se forma la interacción estable entre la membrana celular y la partícula de DV?, ¿cuántas interacciones y en que curso temporal son necesarias y suficientes para lograr la interacción estable (unión específica) entre el virus y la membrana celular?, ¿cómo es la arquitectura y estequiometría de esta interacción?. Tal vez estas preguntas no lleven al diseño de terapias preventivas de la infección como se ha demostrado ya para otros virus con receptores completamente caracterizados, pero definitivamente permitirán conocer las

bases mismas de la fisiopatología de las infecciones por DV y ampliaran el conocimiento de los factores que determinan la dinámica de poblaciones virales cuando estas se mueven entre hospederos distanciados en la escala evolutiva como son el humano y el mosquito.

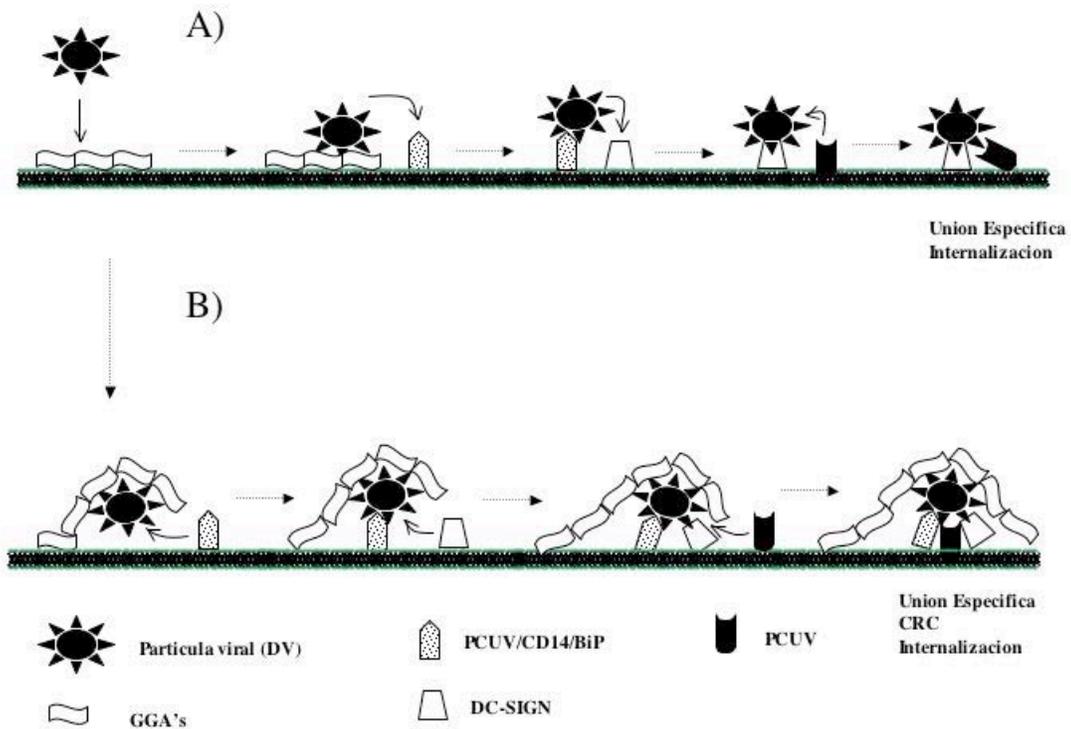


Figura 20. Modelo de la interacción del DV con moléculas de la membrana celular.

De acuerdo a la información disponible, la unión de DV a la membrana celular podría ocurrir en cualquiera de los siguientes mecanismos: A) Unión Secuencial; en este modelo, la unión a las diferentes moléculas se puede llevar a cabo por la interacción secuencial de la partícula viral con las diferentes moléculas involucradas; el virus podría mantenerse enlazado a moléculas abundantes como las GGA's mientras “rastrea” la

superficie en busca de un receptor de mayor afinidad (PCUV/CD14/BiP), después de encontrarlo, dejaría de interactuar con la molécula “puerto”; en este estado intermediario se mantendría hasta encontrar el receptor específico (DC-SIGN); para mantener la congruencia con los datos disponibles, se propone que solo entonces se podría establecer la interacción final con el co-receptor (PCUV) estableciéndose de esta forma la unión estable y dando paso al proceso de internalización. B) El segundo modelo consiste en la formación de un Complejo Receptor Celular; en este modelo todas las interacciones son necesarias, pero no suficientes individualmente para la unión estable de la partícula viral; las moléculas de “entrada”, el receptor específico y los co-receptores mantendrían la estabilidad de la unión mientras se alcanza la estructuración final del complejo receptor, solo hasta entonces, se establecerían las condiciones necesarias y suficientes para iniciar el proceso de internalización.

REFERENCIAS

Albrecht, T., Boldogh, I., Fons, M., AbuBakar, S., and Deng, C. Z. (1990). Cell activation signals and the pathogenesis of human cytomegalovirus. *Intervirolgy* 31, 68-75.

Amano, T., Richelson, E., and Nirenberg, M. (1972). Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites). *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 258-263.

Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Pariente, N., Verdaguer, N., and Domingo, E. (2003). Evolution of cell recognition by viruses: a source of biological novelty with medical implications. *Adv Virus Res* 62, 19-111.

Bella, J., Kolatkar, P. R., Marlor, C. W., Greve, J. M., and Rossmann, M. G. (1998). The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4140-4145.

Berk, A. J. (2005). Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene* 24, 7673-7685.

Bhamarapavati, N. (1989). Hemostatic defects in dengue hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis* 11 *Suppl* 4, S826-829.

Bielefeldt-Ohmann, H. (1997). Pathogenesis of dengue virus diseases: missing pieces in the jigsaw. *Trends Microbiol* 5, 409-413.

Bielefeldt-Ohmann, H., Beasley, D. W., Fitzpatrick, D. R., and Aaskov, J. G. (1997). Analysis of a recombinant dengue-2 virus-dengue-3 virus hybrid envelope protein expressed in a secretory baculovirus system. *J Gen Virol* 78 (*Pt* 11), 2723-2733.

Bielefeldt-Ohmann, H., Meyer, M., Fitzpatrick, D. R., and Mackenzie, J. S. (2001). Dengue virus binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains. *Virus Res* 73, 81-89.

Biosystems, P. (1996). *The Busy Researcher's Guide to Biomolecule Chromatography* (Farmingham MA: Perseptive Biosystems, Inc).

Boonpucknavig, S., Vuttiviroj, O., Bunnag, C., Bhamarapavati, N., and Nimmanitya, S. (1979). Demonstration of dengue antibody complexes on the surface of platelets from patients with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 28, 881-884.

Boyle, J. F., Weismiller, D. G., and Holmes, K. V. (1987). Genetic resistance to mouse hepatitis virus correlates with absence of virus-binding activity on target tissues. *J Virol* 61, 185-189.

Brinkmann, M. M., and Schulz, T. F. (2006). Regulation of intracellular signalling by the terminal membrane proteins of members of the Gammaherpesvirinae. *J Gen Virol* 87, 1047-1074.

Buchner, J. (1996). Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *Faseb J* 10, 10-19.

Cabrera-Hernandez, A. S. D. (2005). Mammalian Dengue Virus Receptors. *Dengue Bulletin* 29, 119-135.

Cabrera-Hernandez, A., Thepparit, C., Suksanpaisan, L., and Smith, D. R. (2007). Dengue virus entry into liver (HepG2) cells is independent of hsp90 and hsp70. *J Med Virol* 79, 386-392.

Campbell, A. E. (2000). Cell biology of virus entry, replication, and pathogenesis. *Viral Immunol* 13, 269-272.

Carrasco, L., Otero, M. J., and Castrillo, J. L. (1989). Modification of membrane permeability by animal viruses. *Pharmacol Ther* 40, 171-212.

- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., and Marks, R. M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 3, 866-871.
- Chen, Y. C., Wang, S. Y., and King, C. C. (1999). Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol* 73, 2650-2657.
- Chevillon, C., and Failloux, A. B. (2003). Questions on viral population biology to complete dengue puzzle. *Trends Microbiol* 11, 415-421.
- Choudhuri, K., and van der Merwe, P. A. (2007). Molecular mechanisms involved in T cell receptor triggering. *Semin Immunol* 19, 255-261.
- Cid, M. E., and Ortega, A. (1993). Glutamate stimulates [3H]phorbol 12,13-dibutyrate binding in cultured Bergmann glia cells. *Eur J Pharmacol* 245, 51-54.
- Clemens, M. J. (2001). Initiation factor eIF2 alpha phosphorylation in stress responses and apoptosis. *Prog Mol Subcell Biol* 27, 57-89.
- Clemens, M. J. (2005). Translational control in virus-infected cells: models for cellular stress responses. *Semin Cell Dev Biol* 16, 13-20.
- Compans, R. W., and Roberts, P. C. (1994). Viruses as model systems in cell biology. *Methods Cell Biol* 43 Pt A, 3-42.
- Compton, S. R., Stephensen, C. B., Snyder, S. W., Weismiller, D. G., and Holmes, K. V. (1992). Coronavirus species specificity: murine coronavirus binds to a mouse-specific epitope on its carcinoembryonic antigen-related receptor glycoprotein. *J Virol* 66, 7420-7428.
- Conboy, J. C., McReynolds, K. D., Gervay-Hague, J., and Saavedra, S. S. (2002). Quantitative measurements of recombinant HIV surface glycoprotein 120 binding to several glycosphingolipids expressed in planar supported lipid bilayers. *J Am Chem Soc* 124, 968-977.
- Crill, W. D., and Roehrig, J. T. (2001). Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol* 75, 7769-7773.
- Crise, B., Buonocore, L., and Rose, J. K. (1990). CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. *J Virol* 64, 5585-5593.
- Dalziel, R. G., Hopkins, J., Watt, N. J., Dutia, B. M., Clarke, H. A., and McConnell, I. (1991). Identification of a putative cellular receptor for the lentivirus visna virus. *J Gen Virol* 72 (Pt 8), 1905-1911.

Damm, E. M., and Pelkmans, L. (2006). Systems biology of virus entry in mammalian cells. *Cell Microbiol* 8, 1219-1227.

Daughaday, C. C., Brandt, W. E., McCown, J. M., and Russell, P. K. (1981). Evidence for two mechanisms of dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. *Infect Immun* 32, 469-473.

Deubel, V., Bordier, M., Megret, F., Gentry, M. K., Schlesinger, J. J., and Girard, M. (1991). Processing, secretion, and immunoreactivity of carboxy terminally truncated dengue-2 virus envelope proteins expressed in insect cells by recombinant baculoviruses. *Virology* 180, 442-447.

Diamond, M. S. (2003). Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. *Immunol Cell Biol* 81, 196-206.

Diamond, M. S., Roberts, T. G., Edgil, D., Lu, B., Ernst, J., and Harris, E. (2000). Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol* 74, 4957-4966.

Dickinson, L. A., Gulizia, R. J., Trauger, J. W., Baird, E. E., Mosier, D. E., Gottesfeld, J. M., and Dervan, P. B. (1998). Inhibition of RNA polymerase II transcription in human cells by synthetic DNA-binding ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12890-12895.

Dimitrov, D. S. (2004). Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* 2, 109-122.

Dorig, R. E., Marcil, A., Chopra, A., and Richardson, C. D. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75, 295-305.

Dropulic, B., and Masters, C. L. (1990). Entry of neurotropic arboviruses into the central nervous system: an in vitro study using mouse brain endothelium. *J Infect Dis* 161, 685-691.

Dveksler, G. S., Pensiero, M. N., Cardellichio, C. B., Williams, R. K., Jiang, G. S., Holmes, K. V., and Dieffenbach, C. W. (1991). Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *J Virol* 65, 6881-6891.

Favoreel, H. W., Enquist, L. W., and Feierbach, B. (2007). Actin and Rho GTPases in herpesvirus biology. *Trends Microbiol* 15, 426-433.

Feighny, R., Burrous, J., and Putnak, R. (1994). Dengue type-2 virus envelope protein made using recombinant baculovirus protects mice against virus challenge. *Am J Trop Med Hyg* 50, 322-328.

Fleury, S., Lamarre, D., Meloche, S., Ryu, S. E., Cantin, C., Hendrickson, W. A., and Sekaly, R. P. (1991). Mutational analysis of the interaction between CD4 and class II

- MHC: class II antigens contact CD4 on a surface opposite the gp120-binding site. *Cell* 66, 1037-1049.
- Frodsham, A. J., and Hill, A. V. (2004). Genetics of infectious diseases. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 2, R187-194.
- Funahara, Y., Sumarmo, Shirahata, A., and Setiabudy-Dharma, R. (1987). DHF characterized by acute type DIC with increased vascular permeability. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 18, 346-350.
- Gebauer, F., and Hentze, M. W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 827-835.
- Gershoni, J. M., Lapidot, M., Zakai, N., and Loyter, A. (1986). Protein blot analysis of virus receptors: identification and characterization of the Sendai virus receptor. *Biochim Biophys Acta* 856, 19-26.
- Ghosh, A. K., Bachmann, M. H., Hoover, E. A., and Mullins, J. I. (1992). Identification of a putative receptor for subgroup A feline leukemia virus on feline T cells. *J Virol* 66, 3707-3714.
- Glaser, L., Stevens, J., Zamarin, D., Wilson, I. A., Garcia-Sastre, A., Tumpey, T. M., Basler, C. F., Taubenberger, J. K., and Palese, P. (2005). A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity. *J Virol* 79, 11533-11536.
- Goff, S. P. (2007). Host factors exploited by retroviruses. *Nat Rev Microbiol* 5, 253-263.
- Guirakhoo, F., Hunt, A. R., Lewis, J. G., and Roehrig, J. T. (1993). Selection and partial characterization of dengue 2 virus mutants that induce fusion at elevated pH. *Virology* 194, 219-223.
- Halstead, S. B. (2003). Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res* 60, 421-467.
- Halstead, S. B., Heinz, F. X., Barrett, A. D., and Roehrig, J. T. (2005). Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. *Vaccine* 23, 849-856.
- Halstead, S. B., and Simasthien, P. (1970). Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. II. Antigenic and biologic properties of dengue viruses and their association with disease response in the host. *Yale J Biol Med* 42, 276-292.
- Harouse, J. M., Bhat, S., Spitalnik, S. L., Laughlin, M., Stefano, K., Silberberg, D. H., and Gonzalez-Scarano, F. (1991). Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* 253, 320-323.

- Harrison, S. C. (1993). Common cold virus and its receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 783.
- Hase, T., Summers, P. L., and Eckels, K. H. (1989). Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. *Arch Virol* *104*, 129-143.
- Hase, T., Summers, P. L., and Ray, P. (1990). Entry and replication of Japanese encephalitis virus in cultured neurogenic cells. *J Virol Methods* *30*, 205-214.
- Heinz, F. X., and Allison, S. L. (2003). Flavivirus structure and membrane fusion. *Adv Virus Res* *59*, 63-97.
- Hennache, B., and Boulanger, P. (1977). Biochemical study of KB-cell receptor for adenovirus. *Biochem J* *166*, 237-247.
- Hibberd, M. L., Ling, L., Tolfvenstam, T., Mitchell, W., Wong, C., Kuznetsov, V. A., George, J., Ong, S. H., Ruan, Y., Wei, C. L., *et al.* (2006). A genomics approach to understanding host response during dengue infection. *Novartis Found Symp* *277*, 206-214; discussion 214-207, 251-203.
- Ho, L. J., Hung, L. F., Weng, C. Y., Wu, W. L., Chou, P., Lin, Y. L., Chang, D. M., Tai, T. Y., and Lai, J. H. (2005). Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J Immunol* *174*, 8163-8172.
- Hoffman, T. L., Canziani, G., Jia, L., Rucker, J., and Doms, R. W. (2000). A biosensor assay for studying ligand-membrane receptor interactions: binding of antibodies and HIV-1 Env to chemokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 11215-11220.
- Hogle, J. M. (2002). Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu Rev Microbiol* *56*, 677-702.
- Holcik, M., Sonenberg, N., and Korneluk, R. G. (2000). Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. *Trends Genet* *16*, 469-473.
- Holmes, E. C., and Twiddy, S. S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* *3*, 19-28.
- Holmes, K. V. (1981). The biology and biochemistry of cellular receptors for enveloped virus, part 2; animal viruses. edn (London U.K.: Chapman and Hall.).
- Holmes, K. V., Boyle, J. F., Weismiller, D. G., Compton, S. R., Williams, R. K., Stephensen, C. B., and Frana, M. F. (1987). Identification of a receptor for mouse hepatitis virus. *Adv Exp Med Biol* *218*, 197-202.
- Holmes, K. V., Zelus, B. D., Schickli, J. H., and Weiss, S. R. (2001). Receptor specificity and receptor-induced conformational changes in mouse hepatitis virus spike glycoprotein. *Adv Exp Med Biol* *494*, 173-181.

- Hotta, H., Murakami, I., Miyasaki, K., Takeda, Y., Shirane, H., and Hotta, S. (1981). Localization of dengue virus in nude mice. *Microbiol Immunol* 25, 89-93.
- Hotta, S. (1967). Recent knowledge on dengue viruses--laboratory aspects. *Jpn J Med Sci Biol* 20, 62-67.
- Huang, E. J., and Reichardt, L. F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72, 609-642.
- Huang, Y. H., Lei, H. Y., Liu, H. S., Lin, Y. S., Liu, C. C., and Yeh, T. M. (2000). Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg* 63, 71-75.
- Hung, J. J., Hsieh, M. T., Young, M. J., Kao, C. L., King, C. C., and Chang, W. (2004). An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol* 78, 378-388.
- Imbert, J. L., Guevara, P., Ramos-Castaneda, J., Ramos, C., and Sotelo, J. (1994). Dengue virus infects mouse cultured neurons but not astrocytes. *J Med Virol* 42, 228-233.
- Incardona, N. L. (1981). The chemical nature of virus-receptor interaction, part 2; animal viruses. edn (London U.K.: Chapman and Hall.).
- Jindadamrongwech, S., Thepparit, C., and Smith, D. R. (2004). Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol* 149, 915-927.
- Jindrak, L., and Grubhoffer, L. (1999). Animal virus receptors. *Folia Microbiol (Praha)* 44, 467-486.
- Jones, M., Davidson, A., Hibbert, L., Gruenwald, P., Schlaak, J., Ball, S., Foster, G. R., and Jacobs, M. (2005). Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J Virol* 79, 5414-5420.
- Juffrie, M., Meer, G. M., Hack, C. E., Haasnoot, K., Sutaryo, Veerman, A. J., and Thijs, L. G. (2001). Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *Am J Trop Med Hyg* 65, 70-75.
- Kawano, H., Rostapshov, V., Rosen, L., and Lai, C. J. (1993). Genetic determinants of dengue type 4 virus neurovirulence for mice. *J Virol* 67, 6567-6575.
- Kim, J. W., Closs, E. I., Albritton, L. M., and Cunningham, J. M. (1991). Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 352, 725-728.
- Knipe, D. M. (1990). Virus-Host cell interactions, 2nd edn (New York USA.: Raven Press Ltd.).

- Kontny, U., Kurane, I., and Ennis, F. A. (1988). Gamma interferon augments Fc gamma receptor-mediated dengue virus infection of human monocytic cells. *J Virol* *62*, 3928-3933.
- Kopecky, J., Grubhoffer, L., Kovar, V., Jindrak, L., and Vokurkova, D. (1999). A putative host cell receptor for tick-borne encephalitis virus identified by anti-idiotypic antibodies and virus affino blotting. *Intervirology* *42*, 9-16.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., and Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* *23*, 567-575.
- Kowalchuk, K., and Plagemann, P. G. (1985). Cell surface receptors for lactate dehydrogenase-elevating virus on subpopulation of macrophages. *Virus Res* *2*, 211-229.
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., *et al.* (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* *108*, 717-725.
- LePage, K. T., Dickey, R. W., Gerwick, W. H., Jester, E. L., and Murray, T. F. (2005). On the use of neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies. *Crit Rev Neurobiol* *17*, 27-50.
- Li, J. P., D'Andrea, A. D., Lodish, H. F., and Baltimore, D. (1990). Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor. *Nature* *343*, 762-764.
- Lindenbach, B. D., and Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* *59*, 23-61.
- Lomberg-Holm, K. (1981). Attachment of animal virus to cells: an introduction, part 2; animal viruses. edn (London U.K.: Chapman and Hall.).
- Lopez, S., and Arias, C. F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol* *12*, 271-278.
- Lundstrom, K. (2002). Semliki forest virus-based expression for versatile use in receptor research. *J Recept Signal Transduct Res* *22*, 229-240.
- Maddon, P. J., Dalgleish, A. G., McDougal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A., and Axel, R. (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* *47*, 333-348.
- Marsh, M., and Helenius, A. (2006). Virus entry: open sesame. *Cell* *124*, 729-740.
- Martinez-Torres, E. (1995). [Dengue and hemorrhagic dengue: the clinical aspects]. *Salud Publica Mex* *37 Suppl*, S29-44.

Marvaldi, J., Sekellick, M. J., Marcus, P. I., and Lucas-Lenard, J. (1978). Inhibition of mouse L cell protein synthesis by ultraviolet-irradiated vesicular stomatitis virus requires viral transcription. *Virology* 84, 127-133.

Marvaldi, J. L., Lucas-Lenard, J., Sekellick, M. J., and Marcus, P. I. (1977). Cell killing by viruses. IV. Cell killing and protein synthesis inhibition by vesicular stomatitis virus require the same gene functions. *Virology* 79, 267-280.

Mathews, J. H., and Roehrig, J. T. (1984). Elucidation of the topography and determination of the protective epitopes on the E glycoprotein of Saint Louis encephalitis virus by passive transfer with monoclonal antibodies. *J Immunol* 132, 1533-1537.

Maximova, O. A., Ward, J. M., Asher, D. M., St Claire, M., Finneyfrock, B. W., Speicher, J. M., Murphy, B. R., and Pletnev, A. G. (2008). Comparative neuropathogenesis and neurovirulence of attenuated flaviviruses in non-human primates. *J Virol*.

McClintock, P. R., and Notkins, A. L. (1984). *Virus receptors. Expression, regulation and relationship to infectivity* (New York USA.: Springer-Verlag.).

Medin, C. L., Fitzgerald, K. A., and Rothman, A. L. (2005). Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J Virol* 79, 11053-11061.

Meyer, S., Temme, C., and Wahle, E. (2004). Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39, 197-216.

Monath, T. P. (1989). *Pathobiology of the Flaviviruses* (New York USA.: Plenum Press.).

Monath, T. P. (1990). *Flaviviruses*, 2nd edn (New York USA.: Raven Press Ltd.).

Monath, T. P. (1994). Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2395-2400.

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., and Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3, 13-22.

Munoz-Jordan, J. L., Sanchez-Burgos, G. G., Laurent-Rolle, M., and Garcia-Sastre, A. (2003). Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14333-14338.

Munter, S., Way, M., and Frischknecht, F. (2006). Signaling during pathogen infection. *Sci STKE* 2006, re5.

Nathanson, N. A., R. [et al.] (1997). *Viral pathogenesis*, 2nd edn (Philadelphia: Lippincott-Raven).

Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., and Despres, P. (2003). Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep* 4, 723-728.

Neda, H., Wu, C. H., and Wu, G. Y. (1991). Chemical modification of an ecotropic murine leukemia virus results in redirection of its target cell specificity. *J Biol Chem* 266, 14143-14146.

Newbury, S. F. (2006). Control of mRNA stability in eukaryotes. *Biochem Soc Trans* 34, 30-34.

Nguyen-Huynh, A. T., and Schaffer, P. A. (1998). Cellular transcription factors enhance herpes simplex virus type 1 oriS-dependent DNA replication. *J Virol* 72, 3635-3645.

Ogata, A., Nagashima, K., Hall, W. W., Ichikawa, M., Kimura-Kuroda, J., and Yasui, K. (1991). Japanese encephalitis virus neurotropism is dependent on the degree of neuronal maturity. *J Virol* 65, 880-886.

Ohka, S., and Nomoto, A. (2001). Recent insights into poliovirus pathogenesis. *Trends Microbiol* 9, 501-506.

Olofsson, S., and Bergstrom, T. (2005). Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Ann Med* 37, 154-172.

Ortega, A., Eshhar, N., and Teichberg, V. I. (1991). Properties of kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia. *Neuroscience* 41, 335-349.

Pan, Y., Yuhasz, S. C., and Amzel, L. M. (1995). Anti-idiotypic antibodies: biological function and structural studies. *Faseb J* 9, 43-49.

Peters, B. P., Brooks, M., Hartle, R. J., Krzesicki, R. F., Perini, F., and Ruddon, R. W. (1983). The use of drugs to dissect the pathway for secretion of the glycoprotein hormone chorionic gonadotropin by cultured human trophoblastic cells. *J Biol Chem* 258, 14505-14515.

Philippova, M., Ivanov, D., Joshi, M. B., Kyriakakis, E., Rupp, K., Afonyushkin, T., Bochkov, V., Erne, P., and Resink, T. J. (2008). Identification of proteins associating with GPI-anchored T-cadherin on the surface of vascular endothelial cells: the role for Grp78/BiP in T-cadherin-dependent cell survival. *Mol Cell Biol*.

Pichyangkul, S., Endy, T. P., Kalayanarooj, S., Nisalak, A., Yongvanitchit, K., Green, S., Rothman, A. L., Ennis, F. A., and Libraty, D. H. (2003). A blunted blood plasmacytoid dendritic cell response to an acute systemic viral infection is associated with increased disease severity. *J Immunol* 171, 5571-5578.

Pohlmann, S., and Reeves, J. D. (2006). Cellular entry of HIV: Evaluation of therapeutic targets. *Curr Pharm Des* 12, 1963-1973.

- Pokidysheva, E., Zhang, Y., Battisti, A. J., Bator-Kelly, C. M., Chipman, P. R., Xiao, C., Gregorio, G. G., Hendrickson, W. A., Kuhn, R. J., and Rossmann, M. G. (2006). Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell* *124*, 485-493.
- Ponzoni, M., Montaldo, P. G., and Cornaglia-Ferraris, P. (1992). Stimulation of receptor-coupled phospholipase A2 by interferon-gamma. *FEBS Lett* *310*, 17-21.
- Poranen, M. M., Daugelavicius, R., and Bamford, D. H. (2002). Common principles in viral entry. *Annu Rev Microbiol* *56*, 521-538.
- Putnak, R., Feighny, R., Burrous, J., Cochran, M., Hackett, C., Smith, G., and Hoke, C. (1991). Dengue-1 virus envelope glycoprotein gene expressed in recombinant baculovirus elicits virus-neutralizing antibody in mice and protects them from virus challenge. *Am J Trop Med Hyg* *45*, 159-167.
- Racaniello, V. R. (1996). Early events in poliovirus infection: virus-receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 11378-11381.
- Ramos-Castaneda, J., Imbert, J. L., Barron, B. L., and Ramos, C. (1997). A 65-kDa trypsin-sensible membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells. *J Neurovirol* *3*, 435-440.
- Ramos, C., Sanchez, G., Pando, R. H., Baquera, J., Hernandez, D., Mota, J., Ramos, J., Flores, A., and Llausas, E. (1998). Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol* *4*, 465-468.
- Reagan, L. P., Yee, D. K., He, P. F., and Fluharty, S. J. (1996). Heterogeneity of angiotensin type 2 (AT2) receptors. *Adv Exp Med Biol* *396*, 199-208.
- Rey, F. A. (2003). Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 6899-6901.
- Reyes-Del Valle, J., Chavez-Salinas, S., Medina, F., and Del Angel, R. M. (2005). Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol* *79*, 4557-4567.
- Reyes-del Valle, J., and del Angel, R. M. (2004). Isolation of putative dengue virus receptor molecules by affinity chromatography using a recombinant E protein ligand. *J Virol Methods* *116*, 95-102.
- Rico-Hesse, R. (2003). Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* *59*, 315-341.
- Roehrig, J. T. (2003). Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv Virus Res* *59*, 141-175.

Ruscetti, S. K. (1999). Deregulation of erythropoiesis by the Friend spleen focus-forming virus. *Int J Biochem Cell Biol* *31*, 1089-1109.

Rutkowski, D. T., and Kaufman, R. J. (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* *14*, 20-28.

Salas-Benito, J. S., and del Angel, R. M. (1997). Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus. *J Virol* *71*, 7246-7252.

Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* *14*, 778-809, table of contents.

Sanchez-Burgos, G., Hernandez-Pando, R., Campbell, I. L., Ramos-Castaneda, J., and Ramos, C. (2004). Cytokine production in brain of mice experimentally infected with dengue virus. *Neuroreport* *15*, 37-42.

Saterbak, A., Kuo, S. C., and Lauffenburger, D. A. (1993). Heterogeneity and probabilistic binding contributions to receptor-mediated cell detachment kinetics. *Biophys J* *65*, 243-252.

Schlesinger, R. W. (1977). *Dengue viruses*, Vol. 16. S. edn (New York USA.: Springer-Verlag.).

Scott, K. F., Bryant, K. J., and Bidgood, M. J. (1999). Functional coupling and differential regulation of the phospholipase A2-cyclooxygenase pathways in inflammation. *J Leukoc Biol* *66*, 535-541.

Seligman, S. J., and Bucher, D. J. (2003). The importance of being outer: consequences of the distinction between the outer and inner surfaces of flavivirus glycoprotein E. *Trends Microbiol* *11*, 108-110.

Shresta, S., Kyle, J. L., Snider, H. M., Basavapatna, M., Beatty, P. R., and Harris, E. (2004). Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol* *78*, 2701-2710.

Sithisarn, P., Suksanpaisan, L., Thepparit, C., and Smith, D. R. (2003). Behavior of the dengue virus in solution. *J Med Virol* *71*, 532-539.

Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* *69*, 531-569.

Sollner, T. H. (2004). Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. *Curr Opin Cell Biol* *16*, 429-435.

Somerfelt, M. A., and Weiss, R. A. (1990). *Retrovirus receptors and cell tropism* (New York USA.: Springer-Verlag.).

- Spear, P. G. (2004). Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* 6, 401-410.
- Sriurairatna, S., Bhamarapavati, N., and Phalavadhana, O. (1973). Dengue virus infection of mice: morphology and morphogenesis of dengue type-2 virus in suckling mouse neurones. *Infect Immun* 8, 1017-1028.
- Stohlman, S. A., Wisseman, C. L., Jr., Eylar, O. R., and Silverman, D. J. (1975). Dengue virus-induced modifications of host cell membranes. *J Virol* 16, 1017-1026.
- Suksanpaisan, L., and Smith, D. R. (2003). Analysis of saturation binding and saturation infection for dengue serotypes 1 and 2 in liver cells. *Intervirology* 46, 50-55.
- Sun, G. Y., Xu, J., Jensen, M. D., and Simonyi, A. (2004). Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res* 45, 205-213.
- Takács, B. J., and Staehelin, T. (1981). *Biochemical Characterization of cell surface antigens using monoclonal antibodies, Vol II.* edn: Academic Press.).
- Tang, Q., and Maul, G. G. (2003). Mouse cytomegalovirus immediate-early protein 1 binds with host cell repressors to relieve suppressive effects on viral transcription and replication during lytic infection. *J Virol* 77, 1357-1367.
- Tassaneetrithep, B., Burgess, T. H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M. A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Bix, D. L., *et al.* (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 197, 823-829.
- Teitler, M., and Herrick-Davis, K. (1994). Multiple serotonin receptor subtypes: molecular cloning and functional expression. *Crit Rev Neurobiol* 8, 175-188.
- Terwilliger, T. C., Fulford, W. D., and Zabin, H. B. (1988). A genetic selection for temperature-sensitive variants of the gene V protein of bacteriophage ϕ 1. *Nucleic Acids Res* 16, 9027-9039.
- Thomas, S. J., Strickman, D., and Vaughn, D. W. (2003). Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. *Adv Virus Res* 61, 235-289.
- Tignor G.H, S. A. L., and Shope, R. E. (1984). *Utilization of host proteins as virus receptors* (New York USA.: Springer-Verlag.).
- Tio, P. H., Jong, W. W., and Cardoso, M. J. (2005). Two dimensional VOPBA reveals laminin receptor (LAMR1) interaction with dengue virus serotypes 1, 2 and 3. *Virol J* 2, 25.

- Trirawatanapong, T., Chandran, B., Putnak, R., and Padmanabhan, R. (1992). Mapping of a region of dengue virus type-2 glycoprotein required for binding by a neutralizing monoclonal antibody. *Gene* *116*, 139-150.
- Tyler, K. L., and Fields, B. N. (1990). *Pathogenesis of viral infections*, 2nd edn (New York USA.: Raven Press Ltd.).
- Vermeire, K., and Schols, D. (2005). Cyclotriazadisulfonamides: promising new CD4-targeted anti-HIV drugs. *J Antimicrob Chemother* *56*, 270-272.
- Wang, J. (2002). Protein recognition by cell surface receptors: physiological receptors versus virus interactions. *Trends Biochem Sci* *27*, 122-126.
- Wang, S., He, R., and Anderson, R. (1999). PrM- and cell-binding domains of the dengue virus E protein. *J Virol* *73*, 2547-2551.
- Wickham, T. J., Granados, R. R., Wood, H. A., Hammer, D. A., and Shuler, M. L. (1990). General analysis of receptor-mediated viral attachment to cell surfaces. *Biophys J* *58*, 1501-1516.
- Wickham, T. J., Shuler, M. L., and Hammer, D. A. (1995). A simple model to predict the effectiveness of molecules that block attachment of human rhinoviruses and other viruses. *Biotechnol Prog* *11*, 164-170.
- Wiley, D. C., and Skehel, J. J. (1977). Crystallization and x-ray diffraction studies on the haemagglutinin glycoprotein from the membrane of influenza virus. *J Mol Biol* *112*, 343-347.
- Yasui, K. (2002). Neuropathogenesis of Japanese encephalitis virus. *J Neurovirol* *8 Suppl* *2*, 112-114.
- Yokomori, K., and Lai, M. M. (1992a). Mouse hepatitis virus utilizes two carcinoembryonic antigens as alternative receptors. *J Virol* *66*, 6194-6199.
- Yokomori, K., and Lai, M. M. (1992b). The receptor for mouse hepatitis virus in the resistant mouse strain SJL is functional: implications for the requirement of a second factor for viral infection. *J Virol* *66*, 6931-6938.
- Yokomori, K., and Lai, M. M. (1993). Mouse hepatitis virus infection utilizes more than one receptor and requires an additional cellular factor. *Adv Exp Med Biol* *342*, 273-277.
- Yu, C. Y., Hsu, Y. W., Liao, C. L., and Lin, Y. L. (2006). Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. *J Virol* *80*, 11868-11880.
- Zhang, W., Chipman, P. R., Corver, J., Johnson, P. R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., Baker, T. S., Strauss, J. H., Rossmann, M. G., and Kuhn, R. J. (2003). Visualization of

membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol* *10*, 907-912.