

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE
NEUROADAPTADO SOBRE LA INMUNORREACTIVIDAD DE
GLUTAMATO Y LA EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD GluN2A DEL
RECEPTOR DE NMDA**

**ANALYSIS OF THE EFFECT OF NEUROADAPTED DENGUE VIRUS
INFECTION ON GLUTAMATE IMMUNO-PERFORMANCE AND EXPRESSION
OF THE GluN2A SUBUNITY OF THE NMDA RECEPTOR**

Leidy Natalia Montaña Rojas

Trabajo de grado
Requisito parcial para optar al título de Bióloga

Directora: Aura Caterine Rengifo, MSc.

Co-directores: Ericsson David Coy Barrera, Ph.D.

Jorge Alonso Rivera Rivera, MSc.

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA

Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas

Programa de Biología Aplicada

Cajicá, Colombia

2019

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	4
Capítulo I	
1. Neurotropismo del virus del dengue y posible papel de los receptores NMDA en la replicación de virus neurotrópicos.....	6
1.1. Introducción	7
1.2. Biología del virus Dengue.....	8
1.3. Proteínas de fusión de membrana.....	9
1.4. Posibles formas de anclaje de la proteína E del DENV a la célula huésped.....	10
1.5. Epidemiología del virus Dengue (DENV).....	11
1.6. Patogénesis y neuropatogénia del DENV.....	12
1.6.1. La amplificación dependiente de anticuerpos ADE o hipótesis de Halstead.....	13
1.6.2. Respuesta inmune aberrante.....	13
1.6.3. Virulencia viral.....	13
1.7. Blancos celulares del DENV.....	14
1.8. Neuroinvasión y neurotropismo del DENV.....	16
1.8.1. Corteza cerebral	19
1.9. Principales sistemas de neurotransmisión del sistema nervioso	19
1.10. Receptores NMDA y virus neurotrópicos.....	22
1.10.1. Expresión, distribución, y función de los NMDAR	23
1.10.2. Expresión de la subunidad GluN1	24
1.10.3. Expresión de la subunidad GluN2	24
1.11. Referencias	26
Capítulo II	
2. Evaluación <i>in silico</i> de la interacción de la subunidad GluN2A del receptor NMDA con la proteína E de envoltura del virus dengue.....	34
2.1. Introducción.....	35
2.2. Materiales y métodos.....	37
2.2.1. Obtención archivos de trabajo de las proteínas.....	37
2.2.2. Acoplamiento molecular proteína-ligando.....	38
2.2.3. Acoplamiento molecular proteína – proteína.....	38
2.2.3.1. Selección de los residuos activos y pasivos.....	38
2.2.4. Simulación de dinámica molecular.....	39
2.3. Resultados y Discusión.....	40
2.3.1. Selección de los residuos activos y pasivos para acoplamiento.....	40
2.3.2. Acoplamiento molecular proteína-proteína, primera metodología.....	41
2.3.3. Acoplamiento molecular proteína-proteína, segunda y tercera metodología.....	42
2.3.4. Simulación de dinámica.....	46
2.4. Conclusión.....	50
2.5. Referencias.....	50
Capítulo III	

3. Análisis del efecto de la infección por virus dengue neuroadaptado sobre la inmunorreactividad de glutamato y la expresión de la subunidad GluN2A del receptor de NMDA	55
2.1. Introducción.....	56
2.2. Materiales y métodos.....	58
3.2.1. Manejo de animales.....	58
3.2.2. Inmunohistoquímica.....	58
3.2.2.1. Procedimiento para la obtención de tejido cerebral.....	58
3.2.2.2. Obtención de los cortes de tejido cerebral y definición del área de estudio.....	59
3.2.2.3. Protocolo de inmunohistoquímica en flotación.....	60
3.2.2.4. Análisis cuantitativo.....	60
3.2.3. Expresión de la subunidad GluN2A.NMDA por RT.PCR.....	60
3.2.3.1. Extracción del ARN de las cortezas cerebrales.....	60
3.2.3.2. Cuantificación de ARN.....	61
3.2.3.3. Determinación de la presencia o ausencia de virus DENV-4 en las muestras de tejido cerebral.....	61
3.2.4. Evaluación de la expresión diferencial de la subunidad GluN2A en la corteza cerebral.....	62
3.2.4.1. Evaluación de la eficiencia de la PCR.....	62
3.2.5. Expresión diferencial.....	64
3.3. Resultados y Discusión.....	64
3.3.1. Inmunohistoquímica.....	64
3.3.1.1. Ratones inoculados con DENV por dos vías distintas de infección	64
3.3.1.2. Inmunorreactividad del glutamato en la corteza motora de ratones infectados con DENV-4.....	65
3.3.1.3. Inmunorreactividad del glutamato en la corteza somatosensorial de ratones infectados con DENV-4.....	66
3.3.1.4. Relación de la distribución de glutamato en la corteza motora y somatosensorial por las dos vías de inoculación.....	67
3.3.2. Expresión diferencial de la subunidad GluN2A en la corteza cerebral.....	73
3.3.2.1. Presencia o ausencia de virus DENV-4 en las muestras de tejido cerebral.....	73
3.3.2.2. Eficiencia de la PCR-validación.....	73
3.3.2.3. Expresión diferencial.....	73
3.4. Conclusión.....	76
3.5. Referencias.....	77

RESUMEN

El virus del dengue presenta cuatro serotipos y provoca la enfermedad conocida con el mismo nombre del virus. Este virus pertenece al género *Flavivirus* y se transmite al hombre por medio de la picadura de los mosquitos del género *Aedes* (*albopictus* y *aegypti*). Esta enfermedad aún no tiene un cuadro clínico definido, debido a que las manifestaciones en la mayoría de los casos son asintomáticas. Las principales células diana de la infección por DENV son los monocitos, los macrófagos y los linfocitos CD4+ y CD8+. Además, *In vitro* se ha reportado la infección de células del endotelio, varias líneas celulares hepáticas, fibroblásticas y neuronales. Algunos reportes indican que el DENV puede presentar un carácter neurotrópico, posiblemente asociado al genotipo viral o a las condiciones del hospedero, sin embargo, aún no existe un consenso en la comunidad científica sobre aceptar esta condición a pesar del creciente número de casos en donde se ha evidenciado la presencia del virus en el SNC acompañado de manifestaciones neurológicas, tales como cefalea severa, vomito en niños, alteraciones en la conciencia, convulsiones, síndrome de Guillain-Barre y mielitis transversa. Distintos receptores han sido planteados como blancos de entrada viral tales como DC-SIGN, heparán sulfato, integrinas, entre otros, sin embargo, se desconoce en gran manera los receptores que podrían participar en el ingreso y replicación del virus dengue en el SNC.

Los receptores de glutamato tipo NMDA podrían contribuir en la neuroinfección por DENV, porque se ha demostrado que el uso de antagonistas del receptor tales como MK-801 y ketamina, inhiben la replicación viral por lo que resulta necesario plantear modelos de estudio para dar respuesta a la compresión del sistema glutamatérgico durante la forma encefálica del dengue asociada a la presencia viral. En este trabajo se evaluó el efecto de un virus DENV-IV neuroadaptado, sobre la expresión de la subunidad GLUN2A del receptor NMDA y la inmunorreactividad del neurotransmisor glutamato en la corteza de ratones BALB/c infectados por dos vías distintas. Además, se evaluó el acoplamiento molecular y la dinámica de interacción entre la subunidad GLUN2A-NMDA y la proteína de envoltura E del virus dengue mediante ensayos *in silico*.

Los resultados indicaron que durante la infección por DENV no se afecta la inmunorreactividad del neurotransmisor glutamato, pero ocurre una desregulación de la expresión subunidad GLUN2A y un alto acoplamiento entre esta subunidad GluN2A y la proteína E de envoltura que se puede mantener en el tiempo. Este es el primer reporte del papel de estos elementos del sistema glutamatérgico durante la neuroinfección por dengue y de aproximaciones a la dinámica de interacción molecular entre proteínas virales y los receptores NMDA.

Los resultados de este trabajo se presentan divididos de la siguiente manera: Marco teórico (artículo de revisión), objetivos, resultados de ensayos en forma de dos artículos científicos, uno de ensayos *in silico* y otro de ensayos *in vivo*. Al final del documento aparecerán las conclusiones, como respuesta a cada uno de los objetivos planteados. Lo anterior con el fin de cumplir con lo estipulado por la Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Militar Nueva Granada en pro de fomentar la generación de publicaciones científicas.

ABSTRACT

Dengue virus has four serotypes and causes the known disease with the same name as the virus. This virus belongs to the *Flavivirus* genus and is transmitted to man through the bite of *Aedes* mosquitoes (*albopictus* and *aegypti*). This disease does not yet have a defined clinical picture, because the manifestations in most cases are asymptomatic. The main target cells of DENV infection are monocytes, macrophages and CD4 + and CD8 + lymphocytes. In addition, in vitro infection of endothelial cells, several hepatic, fibroblastic and neuronal cell lines have been reported. Some reports indicate that DENV may have a neurotropic character, possibly associated with the viral genotype or host conditions, however, there is still no consensus in the scientific community about accepting this condition despite the growing number of cases where it has been evidenced the presence of the virus in the CNS accompanied by neurological manifestations, such as severe headache, vomiting in children, alterations in consciousness, seizures, Guillain-Barre syndrome and transverse myelitis. Different receptors have been postulated as viral entry targets such as DC-SIGN, heparan sulfate, integrins, among others, however, the receptors that could participate in the entry and replication of dengue virus in the CNS are largely unknown.

NMDA type glutamate receptors could contribute to DENV neuroinfection, because it has been shown that the use of receptor antagonists such as MK-801 and ketamine inhibit viral replication, so it is necessary to propose study models to respond to understanding of the glutamatergic system during the encephalic form of dengue associated with viral presence. In this work, the effect of a neuroadapted DENV-IV virus on the expression of the GLUN2A subunit of the NMDA receptor and the immunoreactivity of the glutamate neurotransmitter in the cortex of BALB / c mice infected by two different pathways was evaluated. In addition, the molecular coupling and interaction dynamics between the GluN2A-NMDA subunit and the envelope protein E of the dengue virus were evaluated by in silico assays.

The results indicated that during the DENV infection the immunoreactivity of the glutamate neurotransmitter is not affected, but there is a deregulation of the GLUN2A subunit expression and a high coupling between this GluN2A subunit and the envelope protein E that can be maintained over time. This is the first report of the role of these elements of the glutamatergic system during dengue neuroinfection and approaches to the dynamics of molecular interaction between viral proteins and NMDA receptors.

The results of this work are presented divided as follows: Theoretical framework (review article), objectives, assays result in the form of two scientific articles, one *in silico* assays and another *in vivo* assays. The conclusions will appear at the end of the document, in response to each of the objectives set. The foregoing in order to comply with the provisions of the Faculty of Basic and Applied Sciences of the University Militar Nueva Granada to promote the generation of scientific publications.

CAPITULO I: Artículo de Revisión

Neurotropismo del virus del dengue y posible papel de los receptores NMDA en la replicación de virus neurotrópicos

Dengue virus neurotropism and possible role of NMDA receptors in the replication of neurotropic viruses

RESUMEN

La presencia del dengue en Colombia se debe a que este país cuenta con zonas tropicales y subtropicales permitiendo que circule el virus y el mosquito, sumado al ciclo general de la enfermedad. Dentro de las manifestaciones neurológicas del DENV comúnmente se reporta dolor de cabeza, encefalitis, convulsiones, alteraciones en la conciencia y síndrome de Guillain-Barré. Algunos estudios sugieren que el virus del dengue puede producir una invasión directa del SNC causando daño asociado a la presencia viral en lugar de ser una consecuencia de la infección vinculada a la generación de efectos secundarios, como podría suceder con algunas hepatoencefalopatías teniendo en cuenta que el hígado es uno de los principales órganos afectados por este *Flavivirus*. La mayoría de los estudios están enfocados a conocer los mecanismos involucrados en la generación del daño neuronal y a entender cómo se desarrollan las diferentes formas clínicas, logrando contribuir a mejorar las estrategias de control y tratamiento. En esta revisión se pretende contribuir al esclarecimiento de los mecanismos neuropatológicos del dengue buscando con ello encontrar blancos de acción viral prevalentes durante la infección.

Palabras claves: Dengue, infección, neurotrópico, serotipos, patogénesis.

ABSTRACT

The presence of dengue in Colombia is due to this country has specific tropical and subtropical areas that circulate the virus and the mosquito, added to the general cycle of the disease. Among the neurological manifestations of DENV, reports of headache, encephalitis, seizures, alterations in consciousness and Guillain-Barré syndrome are detected. Some studies have detected that dengue virus can cause a direct invasion of the CNS causing damage associated with the viral presence instead of being a consequence of the infection related to the generation of side effects, as could happen with some hepatoencephalopathies considering that the liver is one of the main organs affected by this *Flavivirus*. Most of the studies are focused on knowing the mechanisms involved in the generation of neuronal damage and understanding how different clinical forms develop of infection, contributing to improve control and treatment strategies. This review seeks to contribute to the clarification of the neuropathological mechanisms of dengue, to find targets of viral action during infection.

Keywords: Dengue, infection, neurotropic, serotypes, pathogenesis.

1.1. INTRODUCCION

El dengue es una enfermedad viral causada por alguno de los cuatro serotipos (DENV1, 2, 3 y 4) y se transmite al hombre principalmente por la picadura del mosquito del género *Aedes* (*albopictus* y *aegypti*) (Gibbons y Vaughn, 2002; Velandia y Castellanos, 2011). La organización mundial de la salud (OMS) propuso dos nuevos criterios de clasificación conocidas como dengue con y sin signos de alarma y dengue grave. La circulación de los cuatro distintos serotipos del DENV en el país se debe a la capacidad de los artrópodos en adaptarse fácilmente a condiciones climáticas, de esta manera se favorece la reproducción del mosquito y la replicación del virus. Estas razones, además de que no se cuente con un modelo animal que presente el espectro de los signos de infección por DENV hacen que esta infección continúe siendo un problema de salud pública a nivel mundial.

Los reportes por parte del Instituto Nacional de Salud (INS) indican que las cifras de casos de infección por DENV van en aumento, se estima que actualmente se presentan un total de 210 casos diarios en Colombia. A pesar de estas alarmantes cifras y del alto impacto en la salud son pocos los estudios dirigidos a esclarecer los mecanismos involucrados en la generación del daño y a entender cómo se desarrollan las diferentes formas clínicas logrando con ello, contribuir a mejorar las estrategias de control y tratamiento. (Pérez *et al.*, 2010).

Algunos estudios indican que el DENV puede presentar un carácter neurotrópico, es decir que tiene la capacidad de replicarse en el sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, aún no se ha esclarecido los mecanismos de neuroinfección y su asociación con las manifestaciones, tales como cefalea severa, vomito en niños, alteraciones en la conciencia, convulsiones, síndrome de Guillain-Barre y mielitis transversa (Araujo *et al.*; 2012). Estudios *in vitro* han demostrado que las principales células diana de la infección por DENV son: líneas celulares hepáticas, fibroblásticas y neuronales, monocitos, los macrófagos y los linfocitos CD4+ y CD8+ y células del endotelio (Diamond y Edgil, 2000).

Las alteraciones histopatológicas encontradas del SNC de pacientes fallecidos por dengue y distintos reportes *in vitro* indican que el virus induce muerte neuronal (Araújo *et al.*, 2012). La muerte neuronal puede estar vinculada a cambios neurobioquímicos generados como respuesta a la infección, entre ellos, los asociados a la modificación del sistema glutamatérgico o GABAérgico. El sistema glutamatérgico es el principal sistema excitador del encéfalo y distintos estudios lo han asociado a procesos de neurogénesis, neurodesarrollo, aprendizaje y degeneración neuronal.

La sobreactivación del sistema glutamatérgico puede ser generada por la síntesis excesiva del neurotransmisor de glutamato o por la sobreexpresión de sus receptores, entre ellos el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). Distintos estudios indican que la sobreestimulación de este receptor se ha asociado a fenómenos de excitotoxicidad y degeneración neuronal. Por otro lado, se considera que los receptores NMDA podrían mediar la entrada o efectos de algunos virus neurotrópicos (Behar y Rothman, 2001). Entre ellos, la de *Flavivirus* (Costa *et al.*, 2017), al parecer por el papel en el metabolismo del calcio por ser este ión esencial para la acción de proteasas como la furina; enzima esencial para la maduración del virión (Hoffmann *et al.*, 2017).

Las alteraciones en los receptores de NMDA han sido asociadas a los fenotipos de distintas enfermedades neurodegenerativas tales como Huntington, Parkinson, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, accidentes vasculares cerebrales, la epilepsia y la demencia por VIH, así como en enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia, la depresión, los trastornos de ansiedad y la enfermedad por estrés postraumático (Javitt, 2004). Existen varios reportes que sugieren que cada etapa del desarrollo del SNC involucra la expresión y la función temporal y espacial adecuada de los neurotransmisores y de sus respectivos receptores (Lujan *et al.*, 2005).

En este trabajo se pretende realizar una revisión sobre la biología del virus dengue (DENV), su posible carácter neurotrópico, los receptores NMDA y el papel de los sistemas de neurotransmisión en los diferentes virus neurotrópicos.

1.2. Biología del virus del dengue (DENV)

El virus del dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus*. Este virus se considera un arbovirus debido a que requiere de artrópodos infectados específicamente del género *Aedes* (*aegypti* y *albopictus*) hematófagos para completar su ciclo de transmisión, causando enfermedad solamente en los humanos (Gibbons y Vaughn, 2002).

El genoma viral de DENV consiste en una sola cadena sencilla de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva con peso molecular de 11 Kb aproximadamente. Al ser una cadena de ARN positivo la célula huésped lo reconoce como un ARN mensajero, facilitando que los ribosomas lleven a cabo la traducción. Esta cadena de ARN presenta una estructura de “cap” en el extremo 5', pero carece de la cola poli A en el extremo 3' terminal (Gupta *et al.*, 2015).

La traducción del ARN viral sucede en el retículo endoplásmico rugoso y produce una poliproteína que por clivaje co-traduccional da origen a tres proteínas que corresponden a la proteína de Cápside (C), membrana (prM) y la glicoproteína de envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) fundamentales para la replicación del virus en sus hospederos. (Pérez, 2010; Velandia y Castellanos, 2011).

El virus del dengue presenta 4 serotipos (DENV 1, 2, 3 y 4), los cuales pueden causar enfermedades en los seres humanos, aunque recientemente se ha detectado un posible quinto serotipo, pero su importancia como agente de la enfermedad no está del todo clara (Gibbons y Vaughn, 2002; Vasilakis, 2013). Como sustento a la hipótesis de este quinto serotipo, se ha publicado el hallazgo del mismo en un paciente de Tailandia que presentó un cuadro clínico grave y al realizar los ensayos de secuenciación y análisis del genoma completo del virus, se ubicó el nuevo virus en el árbol filogenético de un clado diferente respecto a los otros serotipos existentes (Mamani, 2014). Por lo anterior, es importante seguir avanzando en estudios que permiten vigilar la circulación de los serotipos y poder contribuir a la prevención y control de esta enfermedad.

Los cuatro distintos serotipos confirmados del dengue se diferencian por la variación antigénica de su envoltura, pero presentan una similitud entre las secuencias de un 70% (Hurley, 1980). Se considera que el serotipo DENV 2 y 3 tienen un nivel más alto de severidad, seguidamente de DENV 1 y 4 (Cortes *et al.*, 2007). Cada uno de los serotipos

presenta diferentes genotipos que son cepas diferentes y algunos de estos genotipos comparten secuencias comunes con genotipos de otros serotipos.

Las variaciones entre genotipos de cada serotipo pueden deberse a adaptaciones del virus a diferentes entornos. Mamani (2013) aislaron los cuatro serotipos del DENV en distintas áreas geográficas de Perú durante los años 1998-2012 e identificaron para cada serotipo varios genotipos y linajes. En el caso del serotipo DENV-1 se encontró 5 genotipos con tres (3) linajes, para el serotipo DENV-2 dos (2) genotipos americano y asiático con cuatro (4) linajes, el serotipo DENV-3 presentó 3 genotipos con cinco (5) linajes y finalmente para el serotipo DENV-4 dos (2) linajes. Estos resultados demuestran que los serotipos presentan variabilidad genética a nivel de genotipos y linajes siendo el DENV-3 más divergente con cinco linajes y el DENV-4 menos divergente con dos linajes respecto a los otros serotipos. Por otro lado, Cortes y colaboradores (2007) compararon las secuencias completas de los genes que traducen para la proteína envoltura (E) del DENV y la proteína no estructural NS1, con el fin de detectar genotipos del virus de un mismo serotipo, aquí, el serotipo DENV-1 se agrupó en 3 genotipos (A-C), DENV-2 en 7 (A - G), DENV-3 en 3 (A - C) y DENV-4 en 2 (A y B) (Cortes *et al.*, 2007). Es importante aclarar, que los genotipos también tienen la capacidad de infectar y causar enfermedad, pero responden de manera diferente a cualquier vacuna o tratamiento (Cortes *et al.*, 2007).

1.3. Proteínas de fusión de membranas

Saber cuáles son las interacciones de fusión que existen entre los virus y las células huésped, serían de gran importancia para entender el mecanismo de entrada de los virus, principalmente de aquellos que contienen proteínas de envoltura, como ocurre en el caso del DENV. Estas proteínas de envoltura o de fusión, son aquellas que se encuentran en la superficie viral madura, de manera que son las que hacen contacto con las células huésped para poder internalizarse e iniciar su ciclo de replicación y causar enfermedad (Guardado y Rey, 2017).

Las tres clases de proteínas de fusión de membrana viral se reconocen por su modo de activación y además por contener diferentes tipos de péptidos involucrados en la fusión. La estructura general de las proteínas de fusión consta de tres dominios: dominio I (DI), el N-terminal (la parte central de la estructura), el cual forma un Barril Beta de 8 cadenas que contiene 2 bucles de inserción y dos hélices alfa que funcionan como una bisagra molecular para una reorganización de la proteína E a un pH bajo, el dominio II (DII) es el dominio de fusión, principalmente es un péptido de residuos hidrofóbicos y el dominio III (DIII), es un barril Beta tipo inmunoglobulina de 10 cadenas, con motivos de unión a receptores celulares (Allison *et al.*, 2001; Bhardwaj *et al.*, 2001). Las 3 clases de proteínas de fusión son: Clase I, Clase II y Clase III.

Clase I: dentro de las características estructurales se encuentra que son proteínas trimericas hasta su estado post-fusión, luego el estado final se caracteriza por tener una bobina en espiral alfa-helical trimerica N-terminal central, rodeada por tres hélices C-terminal, aunque su tamaño y posición pueden variar entre las proteínas de esta clase (Lamb y Jardetzky, 2007). Los péptidos de fusión se encuentran cerca del extremo N-terminal de la subunidad de fusión,

pero las ubicaciones pueden variar. El virus de la influenza hemaglutinina (HA) es el prototipo de las proteínas de fusión de clase I (Skehel y Wiley, 2000), que abarcan las de otros ortomixos y paramixovirus como el virus del sarampión, los retrovirus como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), los *Filovirus* como el virus del Ébola y los coronavirus.

Clase II: las características estructurales de estas proteínas es que forman trímeros a partir de monómeros en la superficie viral y presentan una lámina-Beta con péptidos de fusión internos formados como bucles en las puntas de las cadenas Beta. El bucle de fusión no se encuentra expuesto en su estructura de pre-fusión debido a que se encuentra enmascarado por residuos cercanos del dominio I y del dominio II. Este dominio contiene el péptido de fusión interno, que corresponde a los aminoácidos 98-111, esta secuencia de aminoácidos está altamente conservada entre los Flavivirus; Las proteínas de fusión de clase II son una clase de proteínas estructural y evolutivamente distintas que se encuentran en las proteínas de superficie del género Flavivirus, como el dengue, la fiebre amarilla y los virus del Nilo Occidental, y en los Alfavirus (Modis, 2013).

Clase III: estas proteínas presentan distintas características estructurales a las de la clase I y II. La arquitectura molecular de estas proteínas está compuesta por 5 dominios, donde comparten una misma organización estructural de estos dominios. El dominio I, quien es el sitio de unión o de fusión forma una estructura de hoja Beta extendida en la base de las puntas triméricas, y contienen en el extremo 2 bucles propuestos para formar el péptido de fusión bipartito de proteínas de clase III, sin embargo, debido a la complejidad de este dominio, la arquitectura puede variar. El dominio II contiene una o más hojas Beta anti-paralelas, los cuales pueden servir como sitios de unión para componentes específicos de fosfolípidos en las membranas celulares o de superficies de unión para ligandos de proteínas. El dominio III es la hélice alfa central, que forma una bobina en espiral trimérica con las hélices proporcionadas por los otros dos protómeros. El dominio IV está compuesto por hojas Beta y muestra una gran variabilidad en tamaño y posición estructural y el dominio V se compone de un segmento extendido, insertándose entre los otros dos protómeros dentro del trímero, formando una extensa interfaz de trimerización. Este grupo es el más reciente a lo que se refiere de proteínas de fusión virales (Backovic y Jardetzky, 2009).

1.4. Posible forma de anclaje de la proteína E del DENV a la célula huésped

La glicoproteína E es una proteína clave para la entrada y fusión de las membranas del virus y de las células huésped, ya que a estas proteínas de superficie se les atribuye que poseen determinantes antigénicos que provocan la neutralización de los anticuerpos celulares (Heinz y Allison, 2000). Esta proteína viral en estado inmaduro contiene 60 trímeros asimétricos de heterodímeros entre la prM y E, ya que la proteína precursora prM cubre a la glicoproteína E protegiéndola de la fusión prematura mientras atraviesa el ambiente ácido que se da en la red trans-Golgi (Guirakhoo et al., 1992). Una vez que ha pasado este ambiente, la prM se libera por escisión con furina, de manera que esto induce un reordenamiento de la proteína E para activarse el virus y provocar infección (Stadler et al., 1997).

La fusión del virus con la membrana de la célula huésped se da por endocitosis debido a un cambio conformacional de la proteína E que es provocado por un pH bajo inducido por el ambiente ácido de los endosomas (Heinz y Allison, 2000). Rey y colaboradores (1995) informaron que durante el estudio de la estructura de la proteína E del DENV, identificaron un bolsillo de unión que acomoda un ligando hidrofóbico. Se ha propuesto que este bolsillo se encuentra como una posible "bisagra" entre el dominio II y el dominio central I, que puede estar afectando a la virulencia y alterar el pH del cambio conformacional necesario para desencadenar la fusión de la membrana. Es probable que la flexibilidad en la región bisagra de la proteína de fusión sea un sello distintivo de los virus con la envoltura de clase II. En otro estudio se identificó diferentes conformaciones sobre esta misma área de bisagra en la glicoproteína E1 del virus Semliki Forest (SFV), es decir en un *Alfavirus* (Lescar et al., 2001).

Es posible que existan receptores celulares que permiten que la proteína E se ancle y pueda fusionarse, es por esto que algunos estudios se hayan enfocado en el análisis de esta proteína para comprender del por qué resulta ser un blanco importante para contrarrestar la infección. Se ha señalado que la presencia de residuos de manosa es importante para la entrada viral (Hung et al., 1999).

1.5. Epidemiología del dengue (DENV)

La incidencia del número de casos por dengue en el mundo está aumentando a medida que el virus se propaga en nuevas zonas con las condiciones ambientales óptimas para la circulación del vector y el virus (Kyle y Harris, 2008). En el año 2010 se dio una de las más importantes epidemias, seguidamente para el 2015 hubo un leve incremento en el número de casos graves, aunque estos datos se mantuvieron por debajo de los valores observados durante el año 2014, por lo cual, no se declaró una infección epidémica, debido a que no superó la cantidad estimada de casos afectados en ese año (OPS, 2016). Sin embargo, las regiones más gravemente afectadas son las Américas, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental.

Colombia presenta los cuatro serotipos, principalmente el DENV-1 y DENV- 2, siendo este último asociado a manifestaciones severas de la enfermedad (Cortes *et al.*, 2007). En los últimos 10 años los reportes de casos por dengue en Colombia han aumentado. El Instituto Nacional de Salud indicó para el año 2010 una epidemia con 150.000 casos por dengue de los cuales 94% fueron dengue con o sin signos de alarma y el 6% restante correspondió a dengue grave con una mortalidad de 2,24%, esta última cifra se ubica por encima de lo que se reporta normalmente según la OMS (máximo 2%) (Puccioni, 2015). A pesar de que el dengue es una enfermedad arboviral se ha reportado que la transmisión también puede darse de manera vertical, es decir, que la infección puede llevarse a cabo de humano a humano. Brites y colaboradores (2014) reportaron 10 casos de dengue por transmisión vertical en los años 2011 y 2013; encontrado que el 70% del sexo masculino nacieron con un peso adecuado, el 60% se tuvieron que internar al momento del diagnóstico y el 40% fue reingresado presentando fiebre y manifestaciones cutáneas.

En lo que se lleva de este año 2019, en la semana epidemiológica 21 se han notificado 6.310 casos de dengue de los cuales 3.606 presentaron signos de alarma, 78 fueron graves y la

población más vulnerable son los de sexo masculino con un 52.8%. Estos casos provienen de grandes ciudades, siendo Cúcuta el que tiene el mayor número: 526 (con 8,4%); Villavicencio, 274 (4,4%); Montería, 232 (3,7%); Santa Marta, 179 (2,9%); Barranquilla, 174 (2,8%), y Cartagena, 169 (2,7%); ciudades que se ubican bajo los 2.200 msnm donde se reporta que circula el mosquito. Sin embargo, estos casos por dengue se vienen presentando desde las últimas semanas del 2018 donde se confirmaron 173 casos por cada 100 mil habitantes, doblando la incidencia de 2017 (90 por cada 100 mil habitantes) (Ministerio de salud e Instituto Nacional de Salud, 2019).

Los antecedentes mencionados se soportan con lo dicho por el actual ministro de salud “*Teniendo en cuenta que este tipo de enfermedades cada tres años presentan un pico epidémico, este 2019 corresponde a este año de pico del ciclo interepidémico, sumándole, además, el fenómeno del niño, con altas temperaturas y lluvias ocasionales, que favorece la reproducción del mosquito Aedes aegypti, el transmisor del virus (Uribe, 2019).* Es por esto que las entidades de salud han prendido las alarmas para alertar a los ciudadanos con la campaña “Córtale las alas al Dengue” que se lanzó a principios de febrero de este año, ya que según proyecta el INS la epidemia de dengue de este año 2019 podría alcanzar 120 mil casos, logrando ser otra de las epidemias más grandes. En las últimas epidemias, el número de casos por dengue para el año 2016 se registró 101.016 casos; en el 2013, 125.554, y para el 2010, 156.977 siendo hasta el momento la epidemia más alta.

1.6. Patogénesis y neuropatogénesis del dengue (DENV)

La confirmación de un caso por dengue es todavía un desafío debido a que existen diferentes formas de gravedad como el dengue hemorrágico, el síndrome de choque por dengue y el dengue clásico llamados así anteriormente, donde hoy en día se denomina dengue grave y dengue sin signos de alarma (OMS, 2009). La comprensión de la patogénesis de esta enfermedad aún no está del todo clara debido a que la mayoría de los estudios se han basado en datos heterogéneos de pacientes y no se puede entender los fenómenos patológicos que ocurren en el transcurso de la infección. Con la introducción de modelos animales se ha podido realizar otro tipo de investigaciones, para abordar el tema de la comprensión de la infección por el virus, aunque su patología no es del todo clara, entre otros, porque no se cuenta con un modelo que presente el total del espectro clínico de las complicaciones de esta enfermedad.

Con base en la casuística y epidemiología se han propuesto tres hipótesis que tratan de descifrar la patogénesis de la enfermedad por dengue denominadas, como la hipótesis de amplificación dependiente de anticuerpos (ADE) o hipótesis de Halstead, respuesta inmune aberrante y virulencia viral.

1.6.1. La amplificación dependiente de anticuerpos ADE o hipótesis de Halstead

Cuando se da la primera infección con algún de los cuatro serotipos se desencadena inmunidad únicamente para ese serotipo, pero se sugiere que, si hay una segunda infección con un serotipo diferente, existe el riesgo de desarrollar una enfermedad más severa (Kouri *et al.*, 1989). Todos los cuatro serotipos pueden causar una enfermedad grave en una

infección secundaria, principalmente DENV-1 y DENV-4 a diferencia de DENV-2 y DENV-3, los cuales han sido asociados a una enfermedad grave en la infección primaria (Halstead, 2007). Los anticuerpos que se producen como respuesta a una primera infección pueden después en una segunda infección convertirse en anticuerpos no neutralizantes, de manera que el virus con un serotipo diferente y los anticuerpos igG forman un complejo virus-anticuerpo, que al unirse a los receptores Fc- γ de las células fagocíticas mononucleares (monocitos y macrófagos) potencian la entrada y replicación del virus (Burke y Kliks, 2006; Vaughn *et al.*, 2000).

1.6.2. Respuesta inmune aberrante

Una segunda hipótesis como explicación al desarrollo de la forma grave del dengue que no excluye la hipótesis de Rosen o Halstead es la propuesta por Lei Huan yao denominada “respuesta inmune aberrante”. En el 2001 Huan-Yao encontró que el desbalance de la producción de citoquinas inflamatorias y de aquellas que contrarrestan el efecto de las mismas contribuyen en exacerbar los síntomas durante la infección por dengue (Huan-Yao *et al.*, 2008). La complicación más grave de la infección, parece ser mediada inmunológicamente y podría ser desencadenada por los linfocitos T citotóxicos específicos para los virus del dengue, junto con las características genéticas del huésped humano (López y Mota, 2000), así como la generación de anticuerpos contra NS1 quienes tienen reacción cruzada con las plaquetas y las células endoteliales Martina *et al.*, 2009. El daño causado en las células endoteliales la permeabilización vascular y en las alteraciones de coagulación y fibrinólisis (Huan-Yao *et al.*, 2008; Rothman, 2011). Esta hipótesis ha sido fuertemente soportada por diversos autores (Rey, 2003; Ichiro, 2007).

1.6.3. Virulencia viral

Se piensa que la diversidad genética del DENV puede inducir la aparición de cepas que se replican más rápidamente, pudiendo obtener una mayor influencia en el desarrollo del dengue hemorrágico o del síndrome del choque por dengue. Esta hipótesis se formuló debido a los casos fatales que se presentaron por dengue tipo 2 de en la isla de Niue en 1972. Con ello se postuló que algunas cepas del dengue podrían presentar un potencial virulento capaz de originar los cuadros graves de la enfermedad (Barnes y Rosen, 2010).

Dentro de las manifestaciones por fiebre del dengue (FD) suelen presentarse fiebre temporal, malestar general, dolor de cabeza, mialgia y artralgia grave para el caso de los adultos, mientras que en los niños los síntomas son inespecíficos, los cuales generalmente comienzan 5-8 días después de la picadura con una duración de 2-7 días y por lo general son seguidos de una recuperación completa. Las manifestaciones que se presentan por fiebre hemorrágica del dengue (FHD) suelen ser alteraciones en la coagulación con fuga vascular. Los análisis de sangre muestran trombocitopenia y hematocrito elevado, la fiebre persiste durante 2-7 días. En casos más severos la enfermedad progresa a un estado crítico de fuga vascular y el colapso circulatorio conocido como “El síndrome de shock del dengue “(DSS). Este último puede producir la muerte entre 12 a 24 h desde el inicio del choque (Geneva, 1997).

Se ha reportado que la infección por DENV tiene la capacidad de causar numerosas manifestaciones neurológicas incluyendo mielitis transversa, síndrome de Guillain-Barré, encefalomielitis y miositis (Gulati y Maheshwari, 2007). Sin embargo, la mayor manifestación que se reporta es la encefalopatía, caracterizada por alteraciones en la conciencia y encefalitis. Actualmente, se reconoce que las manifestaciones por dengue pueden ocurrir en cualquier estadio de la enfermedad con cualquier nivel de gravedad y por la acción de cualquier serotipo, asociándose más frecuentemente con los serotipos 2 y 3 (Cam *et al.*; 2001). Ferreira y colaboradores en el 2010 aislaron el genotipo I y III del DENV-3 en Brasil y posteriormente inocularon ratones mediante la vía intracraneal (IC), demostrando que el genotipo I podría causar enfermedad neurológica en los ratones, mientras otros genotipos incluido el genotipo III, se asociaron con una infección asintomática en los mismos.

1.7. Blancos celulares del dengue (DENV)

Existe una fuerte evidencia de la participación de monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos CD4+ y CD8+, células del endotelio y varias líneas celulares hepáticas, fibroblásticas y neuronales por la infección del DENV (Diamond y Edgil, 2000). Otros estudios han demostrado que, durante la infección viral, las células del huésped expresan como primera línea de defensa el interferón (IFN) de tipo I (α y β) con el fin de inhibir la replicación viral. A continuación, se inicia el proceso de presentación de antígenos mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de tipo I y II de las células T, lo que conlleva a que las células asesinas naturales NK, ataquen a las células infectadas y liberen junto a las células T el IFN de tipo II tratando de evitar la replicación del virus en las células infectadas o la infección de nuevas células (Ferreira *et al.*, 2010). De acuerdo a lo anterior, se sugiere que la respuesta inmune del huésped puede jugar un papel importante en la patogénesis del DENV porque una vez que ocurre la infección el virus se replica dentro de las células del sistema inmune, especialmente en macrófagos y monocitos. (Malavige *et al.*, 2004).

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno y son las primeras células en responder ante un antígeno o una infección, debido a que se encuentran principalmente en la piel, sin embargo, su importancia de estudio de este tipo de células se asocia con la existencia de posibles receptores neuronales para el DENV. La unión por alguno de los distintos serotipos de DENV a estas células, se ha evidenciado a través de la proteína DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) como probable receptor viral. DC-SIGN es una lectina de membrana que contiene un dominio extracelular tipo C que une carbohidratos con alto contenido de manosas, como los presentes en la superficie del virus de DENV (Lozach *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2003).

Así, como DC-SIGN como probable receptor para DENV, también se ha demostrado la participación del heparán sulfato en la unión de DENV-2 a diversas células de mamífero (Chen *et al.*, 1997; Germi *et al.*, 2002; Hilgard y Stockert, 2000). El heparán sulfato es un abundante glicosaminoglicano (GAG) presente en los proteoglicanos de la superficie celular y en la matriz extracelular de varios tipos celulares. Se ha observado que la interacción de DENV con GAGs requiere de una forma altamente sulfatada de heparán sulfato (Chen *et al.*,

1997). Estos hallazgos indican que dependiendo del tipo celular los diferentes serotipos virales pueden utilizar distintas moléculas receptoras. Una posible estrategia del virus es primero unirse a un receptor muy abundante y de baja afinidad como el heparán sulfato, que sirve para concentrar el virus en la superficie de la célula y posterior a esto ocurre una segunda interacción específica y de alta afinidad con un receptor de naturaleza proteica que sirve para guiar la internalización del virus (Martínez y del Ángel, 2001). Se ha reportado que las proteínas de choque térmico (Hsp), específicamente las HSP90 y HSP70, al parecer forman un complejo receptor útil para la entrada DENV en monocitos humanos y células de neuroblastoma. Esto se logró evidenciar al notar que la incubación con anticuerpos contra ambas proteínas reducía considerablemente la infección y producción de virus (Ramos *et al.*, 1997).

El esclarecimiento del mecanismo del virus dengue para interactuar con el receptor (s) en los seres humanos es esencial en la comprensión de la patología y propagación del dengue (Kazuya y Takashi, 2011). Para identificar los posibles receptores que participan en la infección primaria del virus, se han empleado células de mamíferos. La tabla 1 muestra los diferentes receptores del virus dengue que se han podido identificar en estas células.

Los receptores se pueden clasificar como: a) Moléculas de hidratos de carbono, tales como glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) y glicoesfingolípidos (GSL) para actuar como moléculas co-receptor, que mejoran la eficiencia de la entrada del virus. B) Moléculas sulfatadas, siendo el sulfato de heparán indispensable para la adsorción del virus a las células huésped (kato *et al.*, 2010). En estas células de mamíferos, hay muchas moléculas candidatas que pueden actuar como receptores y proteínas con actividad chaperona, lectinas, de unión a laminina y otras proteínas no caracterizadas.

Tabla 1. Receptores de *Flavivirus* propuestos en estudios previos.

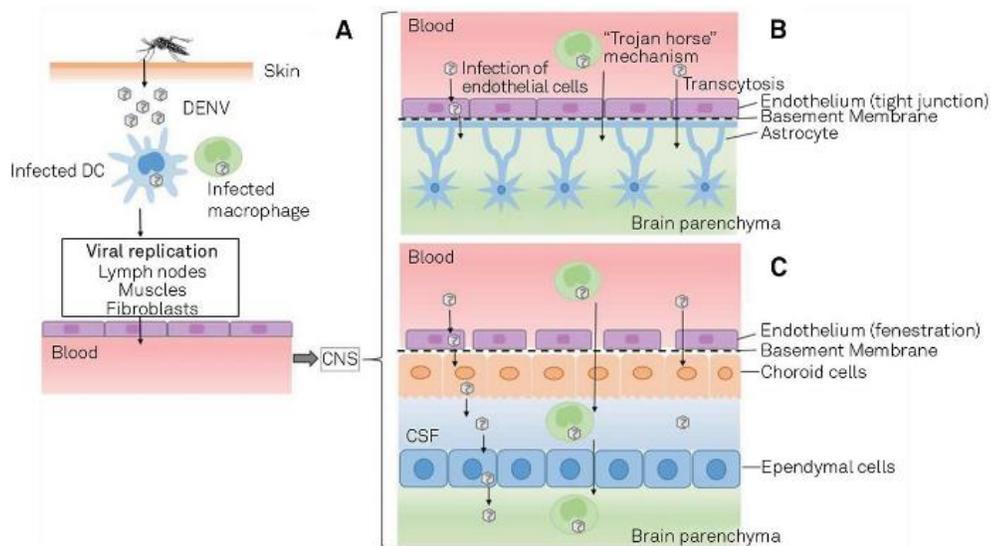
Receptor	Propiedades	Expresión tejido/célula	Virus
Heparán sulfato	Glicosaminoglicano sulfatado	Células Vero, Células BHK-21	JEV
Condroitín Sulfato E	Glicosaminoglicano sulfatado	Células Vero, Células BHK-21	JEV
Integrina $\alpha v \beta_3$	Proteínas de superficie celular. Proteasas sensitivas MW: 105KDa	Células Vero, Células BHK-21	WNV
Proteínas desconocidas	Proteínas asociadas a membrana MW; 50-150 KDa	Células C6/36 (<i>A. albopictus</i>)	JEV
CqOR7	Receptor de olor	Tejido olfatorio (<i>Culex quinquefasciatus</i>)	WNV
Glicoproteínas desconocidas	Proteína asociada a membrana plasmática MW: 70 y 95 KDa	Células C6/36 (<i>A. albopictus</i>)	WNV, JEV, DENV-2

(Tomada de Hidari y Suzuki, 2011).

1.8. Neuroinvasión y neurotropismo del dengue (DENV)

La capacidad de un microorganismo para invadir el sistema nervioso se conoce como neuroinvasión (Puccioni y Rosadas, 2015). Algunos estudios indican la presencia de virus dengue en el sistema nervioso central SNC. Puccioni y Rosadas (2015) identificaron el DENV en el tejido cerebral y líquido cefalorraquídeo, la presencia en el tejido cerebral puede deberse a la capacidad que se le ha otorgado al virus del dengue de unirse a diferentes proteínas presentes en la sustancia blanca y la sustancia gris del SNC (Salazar *et al.*, 2013). Por otra parte, Lima y colaboradores (2011) detectaron en personas infectadas con el virus la proteína no estructural NS1 del DENV, encontrando que las principales células diana del virus son las neuronas, los astrocitos, la microglia, el plexo coroideo, las células de purkinje y endoteliales (Velandía *et al.*, 2012). Estudios recientes *in vitro* han reconocido que este virus también puede causar alteraciones leves o graves en el sistema nervioso, como dolor de cabeza, trastornos de la conducta, rigidez del cuello, delirio, parálisis, parálisis del nervio craneal, coma amnesia y psicosis maniaca (Brito *et al.*, 2005). Con base en estos antecedentes, se desconoce el mecanismo que emplea el virus para llegar al SNC.

Se considera que la vía hematológica es una de las vías que principalmente emplea el DENV para entrar al sistema nervioso, donde el virus se difunde como una partícula libre en el interior de la célula infectada a través del mecanismo de entrada Trojan-horse (Neal, 2014). Chaturvedi y colaboradores (1991) realizaron un estudio con ratones demostrando que el DENV puede alterar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) e ingresar al SNC debido a un exceso de expresión de citocinas durante la infección (figura 1) (Chaturvedi *et al.*, 1991).



DENV: dengue virus; CNS: central nervous system; CSF: cerebrospinal fluid.

Figura 1: Neuroinvasión de DENV en el sistema nervioso central. **A.** invasión viral al cruzar la piel después de la picadura de un mosquito. Aquí, ocurre la replicación viral en los nódulos linfáticos, los músculos y los

fibroblastos. Las partículas libres o especialmente los monocitos infectados diseminan el virus de la sangre (viremia) al órgano visceral, incluido el sistema nervioso. B. Invasión e infección en las células endoteliales. C. Invasión de la barrera hematoencefálica. (Tomada de Chaturvedi *et al.*, 1991).

Otra de las vías posibles que el virus DENV puede emplear para lograr su entrada al sistema nervioso es a través de las células endoteliales por medio de la transcitosis; proceso que permite el paso de macromoléculas desde un espacio extracelular a otro. Esta capacidad del DENV para infectar las células endoteliales facilita la replicación viral y puede también producir la posterior entrada en el parénquima cerebral, similar a lo que ocurre con otras infecciones del género *Flavivirus* como el Virus del Nilo Occidental (VNO) (Avirutnan, 1998).

Se ha sugerido el transporte axonal retrógrado como otro posible mecanismo de infección alternativo al SNC. Los estudios de microscopía electrónica de transmisión con modelos murinos indican que el DENV es capaz de penetrar e infectar las neuronas del sistema nervioso central (SNC) como las neuronas motoras y las neuronas del sistema periférico (Liu *et al.*; 2008). Por otro lado, en este mismo estudio se confirmó la presencia de viriones que parecen estar fusionados con membranas pre-sinápticas, reforzando la hipótesis que considera la capacidad del DENV para utilizar el transporte axonal. El virus del Nilo Occidental hace parte también de la familia de los *Flavivirus* y emplea el transporte axonal retrógrado como mecanismo de entrada del virus, transportándose por las neuronas espinales y las neuronas del ganglio superior cervical (Silvia *et al.*, 2003).

Se ha señalado otra posible vía a parte de las tres anteriores y es el proceso de endocitosis mediada por clatrina. Sin embargo, se ha sugerido que la infección con alguno de los cuatro serotipos virales del DENV puede llevarse a cabo por diferentes vías de entrada en líneas celulares de distinto origen, y a su vez, distintos serotipos virales pueden utilizar vías de entrada alternativas en un mismo tipo celular. Acosta (2011) demostró que la entrada del serotipo DENV-1 en células Vero ocurre por endocitosis dependiente de clatrina, mientras que la entrada del serotipo DENV-2 tiene lugar por un mecanismo independiente de clatrina, caveolas y lipid-rafts, pero dependiente de dinamina, una proteína asociada al transporte axonal retrogrado. Sin embargo, al evaluar otros sistemas celulares (C6/36 HT y A549) se encontró que la endocitosis de DENV-1 y DENV-2 está mediada por clatrina. Por otro lado, se ha reportado que en las células donde ocurre la entrada de DENV se necesita la exposición de los viriones a pH ácido. Acosta (2011) evaluaron la dependencia del pH en la fusión del DENV-1 y DENV-2 en cultivos de células Vero, mediante ensayos se comprobó que el pH ácido intracelular se requiere efectivamente para la entrada del virus a la célula debido a que la presencia de los dos compuestos químicos que aumentan el pH (cloruro de amonio y a concanamicina A) redujeron la cantidad de partículas virales infectivas internalizadas con ambos serotipos.

A pesar del creciente número de casos con manifestaciones neurológicas reportados por distintos estudios de caso, aún la comunidad científica y médica se resiste en considerar el carácter neurotrópico que puede presentarse durante la forma grave del dengue. Esta situación sumada a la falta de modelos animales experimentales capaces de simular el espectro completo de la enfermedad (Charlier y Leyssen, 2004; Yauch y Shresta, 2008) y

menos aún que presenten manifestaciones neurológicas de manera natural aumenta la brecha del desconocimiento sobre la posible neuropatogenesis del DENV.

Una de las alternativas para abordar el estudio del papel del DENV en el SN, es a través del uso de modelos murinos lactantes inoculados con cepas adaptadas al cerebro o neuroadaptadas, donde se logra imitar una parte del espectro de la enfermedad, mientras que si se utilizan cepas no neuroadaptadas se suelen producir infecciones subclínicas y esporádicamente enfermedades que pueden conducir o no a la parálisis y la muerte del ratón (Meiklejohn *et al.*, 1952).

La incidencia de las infecciones por DENV con manifestaciones neurológicas se reportan como “encefalopatías asociadas a infecciones por dengue”. Además, se pensaba que los síntomas neurológicos en los casos de FD y FHD se explicaban por efectos secundarios una vez se presenta la infección viral, atribuyéndose a varios factores como la hipoperfusión y la hipotensión cerebral, las complicaciones electrolíticas y metabólicas tales como las generadas por hepatoencefalopatías. Recientemente se ha indicado que el virus del dengue puede producir una invasión directa del sistema nervioso central (SNC) causando daño primario y directo en lugar de ser una consecuencia de la infección (Sips *et al.*, 2012).

Salazar y colaboradores en el 2013, usaron un cultivo primario de células de SNC humano obtenido a partir de tejido cerebral y demostraron la replicación activa del DENV-2 en neuronas de la corteza motora mediante el marcaje por inmunofluorescencia indirecta de la proteína NS3 del DENV. Por otra parte, por medio de ensayos de unión del virus en fase sólida y co-inmunoprecipitación, se logró evidenciar que varias proteínas de membrana presentes en las células de tejido cerebral humano fueron capaces de unirse al DENV-2, las cuales podrían estar asociadas con los receptores que participan en la entrada del virus a las células del SNC, esto indica que el DENV-2 exhibe un tropismo directo por las células del SNC humano y que éstas, a su vez, presentan proteínas que favorecen la unión al virus (Pérez *et al.*, 2010).

Castellanos y colaboradores reportaron un modelo de neuroinfección y neuropatogenia por DENV en ratones de diferentes edades post-natales, inoculados por la vía intraperitoneal con una cepa de DENV-4 neuroadaptada denominada D4MB-6. En este estudio se evidenció que el virus se unía a los proteoglicanos de la membrana celular e infectaba diferentes poblaciones celulares como neuronas, microglia y oligodendrocitos, replicándose exitosamente e induciendo una alteración de la arquitectura cortical, hipocámpal y del tallo cerebral. Estos datos demuestran que podría existir un neurotropismo por parte del DENV hacia el encéfalo (Castellanos *et al.*, 2012).

1.8.1. Corteza cerebral y tipos neuronales

La corteza cerebral de mamíferos está representada por una lámina de sustancia gris de 2 a 4 mm de espesor (cuerpos de neuronas, interneuronas y glia) que cubre los hemisferios cerebrales (Valverde, 2002). Además, está compuesta por dos poblaciones neuronales: las neuronas piramidales y las interneuronas. Las neuronas piramidales representan el 70% del total de las neuronas corticales, sintetizan el neurotransmisor glutamato y sus axones pueden

emerger desde la sustancia gris cortical llegando a sitios distantes en el hemisferio contralateral, el tallo cerebral o, inclusive a la médula espinal (Niewenhuys, 2000). Las interneuronas alcanzan entre el 20 al 30% de las neuronas en la corteza, sintetizan el neurotransmisor GABA y se conocen también como células de axón corto, puesto que sus axones no salen de la sustancia gris y su blanco principal son las neuronas piramidales vecinas (Douglas y Martin, 2005). Sin embargo, existe un tipo neuronal ubicado en la capa IV de interneuronas conocidas como células espinosas estrelladas que, aunque no son neuronas de proyección sintetizan el glutamato en lugar de GABA (Carder y Hendry, 1994).

La corteza se divide en dos tipos fundamentales: el isocortex y el allocortex (Brodmann, 1909). El isocortex o neocórtex corresponde aquella parte de la corteza en la que siempre puede reconocerse la estratificación en seis capas, mientras que el allocortex, representado por el archicórtex (hipocampo y fascia dentata) y paleocórtex (corteza olfativa propiamente dicha), exhiben una estructura laminar simple compuesta por tres capas. Ambos tipos corticales están más o menos separados por cierto número de áreas paracorticales que han sido objeto de gran interés en el estudio de la evolución cortical (Sanides, 1970).

Aparte de las poblaciones neuronales que se organizan en diferentes capas dentro de una pequeña región que hace parte de un área específica del cerebro, también se encuentran cuatro poblaciones celulares no neuronales como la microglía, los oligodendrocitos, las células ependimales y los astrocitos, los cuales hacen parte del SNC y de la corteza cerebral, a todo este conjunto de células se les denomina neuroglia (Wang y Bordey, 2008).

1.9. Principales sistemas de neurotransmisión del Sistema Nervioso Central (SNC)

La neurotransmisión hace referencia a la comunicación entre las neuronas o células para enviar alguna información y poder obtener una respuesta. Dicha comunicación química se lleva a cabo mediante neurotransmisores, básicamente son distintas sustancias químicas liberadas por las neuronas y se diferencian por la función. Dentro de la clasificación se consideran 6 grupos (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de sustancias químicas liberadas por las neuronas en 6 grupos

Grupo	Descripción
Aminas	Son aquellos que derivan de distintos aminoácidos como el triptófano, (p Ej., Serotonina, dopamina, epinefrina, norepinefrina e histamina).
Aminoácidos	Este es el grupo base de los que derivan el grupo anterior (p Ej., Glutamato, GABA, aspartato o glicina).
Purinas	Estudios recientes han considerado al ATP y la adenosina que también pueden actuar como mensajeros químicos.
Gases y sustancias volátiles	Pueden ayudar a la comunicación y dentro de ellos se destaca el Óxido nítrico.
Péptidos	Este tipo de cadenas de aminoácidos se encuentran distribuidos en todo el encéfalo (p Ej., endorfinas, las dinorfinas y las taquininas).

Esteres	Se centra principalmente en las acciones de los sistemas de neurotransmisores GABA y glutamato en el cerebro en desarrollo.
---------	---

Tomada de (Humphries *et al.*, 2008).

El proceso básico que se lleva a cabo para la neurotransmisión independientemente del neurotransmisor, se basa en el empaquetamiento del neurotransmisor en vesículas una vez que se haya sintetizado. Estas vesículas se ubican generalmente en los axones y cuando se da la activación neuronal por un impulso nervioso, provoca la liberación de estos neurotransmisores desde los terminales axonales hacia las neuronas adyacentes a través de las dendritas. Las dendritas presentan unas pequeñas turgencias similares a espinas conocidas como espinas dendríticas, como sucede en los terminales axonales, que también presentan este tipo de estructuras, pero más cortas. Los terminales axonales y las espinas dendríticas se encuentran en puntos de contacto especializados llamados sinapsis, que median una parte significativa del intercambio y se determina si las sinapsis se mantienen o se elimina, siendo los neurotransmisores químicos quienes juegan un papel importante en cada uno de estos pasos de desarrollo neuronal e inclusive antes de que se formen las sinapsis. GABA y glutamato regulan la proliferación, migración y diferenciación de células progenitoras (Manent y Represa, 2007).

Los sistemas de neurotransmisión tienen diferentes propiedades durante el desarrollo y la madurez. Murrin y colaboradores han revisado el desarrollo de los sistemas de norepinefrina y serotonina, ya que estos dos sistemas de neurotransmisores son de particular interés porque se ha postulado que ambos son importantes para regular el desarrollo del sistema nervioso central y están implicados en la fisiopatología de la depresión (Murrin *et al.*, 2007). Realizando una comparación entre ellos, se encontró que el sistema de serotonina alcanza la madurez mucho antes que el sistema de norepinefrina y se sugiere que esto puede ayudar a explicar las diferencias en la respuesta a los antidepresivos en niños y adolescentes en comparación con los adultos.

Existen evidencias de que los sistemas de neurotransmisión GABA y glutamato contribuyen a la maduración de las dendritas, los axones y también participan directamente en la generación y el refinamiento de los contactos sinápticos (Cline y Haas, 2008). El Glutamato al actuar mediante diversos receptores de neuronas maduras desempeña un papel fundamental en los procesos que involucran la diferenciación neuronal, construcción de redes neuronales y el desarrollo del SNC al modificar la actividad eléctrica oscilatoria. Por otro lado, se sabe que la función de los neurotransmisores sobre sus receptores puede variar durante el estado de desarrollo, por ejemplo, el GABA actúa como excitador en neuronas de ratones y ratas hasta la segunda semana postnatal (Moreno y Zarain, 2006; Ben, 2008; Song *et al.*, 2011).

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC de los mamíferos y se distribuye ampliamente desempeñando un papel indispensable en la plasticidad sináptica, respiración celular, el neurodesarrollo y la formación de nuevas sinapsis (Orrego y Villanueva, 1993; Lujan, 2005). Este neurotransmisor es capaz de producir efectos excitatorios en la sinapsis debido a la interacción con receptores ionotrópicos denominados iGlu que a la vez se subdividen en receptores *N*-metil-*D*-aspartato tipo (NMDA y no NMDA)

(Jacob *et al.*, 2008). Otro grupo de receptores sobre los que actúa el glutamato son los receptores metabotrópicos denominados mGLU, compuestos por ocho subtipos denominados mGlu1-8, los cuales ayudan a mitigar los efectos producidos sobre los receptores ionotrópicos produciendo señales inhibitoras y excitadoras (Lujan, 2005). Se sabe que existe una expresión diferencial de la gran variedad de subunidades de iGluRs y mGluRs durante la diferenciación y el desarrollo del SNC, la cual depende tanto de su localización en el SNC como de la etapa del desarrollo neuronal.

El glutamato se sintetiza en las neuronas a partir de glutamina que se forma principalmente en los astrocitos y luego se transporta a las neuronas. Una estrecha cooperación entre las neuronas y astrocitos es esencial para la producción de glutamato y GABA (Medina *et al.*, 2007). Una vez se sintetiza el glutamato, este se libera hacia el citoplasma en donde se acumula en vesículas sinápticas por un proceso dependiente de Mg^{++}/ATP (Hassel y Dingleline, 2005). Luego, cuando el impulso nervioso se propaga hacia la terminal axónica, se libera el Glu en la sinapsis a través de un mecanismo dependiente de la concentración intracelular de Ca^{++} , mediante un proceso de exocitosis para interactuar con sus receptores específicos (Pigino *et al.*, 2005).

Otro de los neurotransmisores más importante es GABA, el cuál es el principal neurotransmisor inhibitor por los receptores a los que se une. El GABA realiza su acción inhibitoria por medio de la interacción con los receptores inotrópicos (GABAA y GABAC) y con el receptor metabotrópico GABAB. Este neurotransmisor se sintetiza a partir del glutamato y desempeña un papel esencial en la modulación de la excitación neuronal, facilitando que haya un equilibrio entre la inhibición y la excitación (Masahito *et al.*, 2002; Wang y Bordey, 2008).

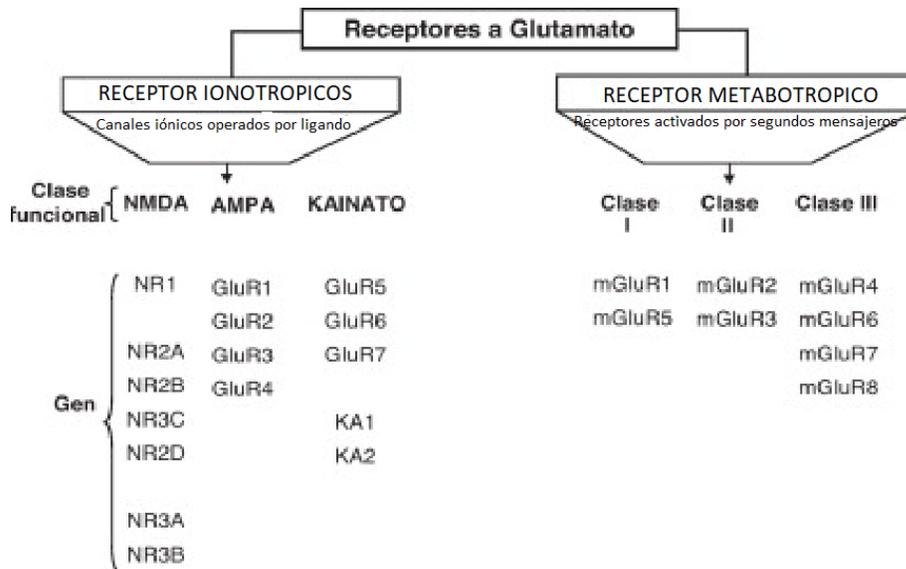
1.10. Receptores NMDA y virus neurotrópicos

Los receptores de Glu se clasifican en dos tipos: los receptores metabotrópicos (mGluRs) que promueven la activación de segundos mensajeros vía proteínas G y los receptores ionotrópicos que están acoplados a un canal iónico y su activación permite la entrada de diversos iones, principalmente Ca^{++} , Na^{+} , así como la salida de K^{+} (Tabla 3) (Rodríguez y López, 1995).

Los receptores ionotrópicos se dividen de acuerdo a la afinidad de sus agonistas específicos en: *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y ácido kaínico (KA) (Hassel y Dingleline, 2005). En este estudio nos centraremos específicamente en los receptores NMDA, los cuales se caracterizan por estar constituidos por diferentes subunidades, que le confieren al receptor diferentes propiedades fisiológicas y farmacológicas. (Hassel y Dingleline, 2005). Además, se ha reportado que estos receptores tienen una participación en el daño neuronal cuando hay infección. Costa y colaboradores han demostrado que la infección por el virus Zika (ZIKV) en animales experimentales causa daño neuronal y microgliosis, sin embargo, el tratamiento con medicamentos como la memantina que bloquean los receptores NMDA previno el daño neuronal tanto *in vitro* como *in vivo*. Lo cual sugiere que la sobreactivación de los receptores NMDA contribuye al daño neuronal inducido por la infección por ZIKV (Costa *et al.*, 2017). Por otro lado, se considera

que los receptores NMDA pueden mediar la entrada de algunos virus neurotrópicos al parecer por el papel del metabolismo del calcio por ser este ión esencial para la acción de proteasas como la furina; enzima esencial para la maduración del virión (Hoffmann *et al.*, 2017).

Tabla 3. Receptores de glutamato.



(Tomada de Flores *et al.*, 2011).

1.10.1 Expresión, distribución y función de los NMDAR

Los receptores ionotrópicos del glutamato, corresponden a receptores de *N*-metil-*D*-aspartato (NMDAR) la estructura de estos receptores en su mayoría forma tetrámeros de dos subunidades GluN1 y dos GluN2 (Paoletti, 2011). Sin embargo, pueden formar distintas combinaciones con el resto de subunidades y formar hasta pentámeros que permiten la formación de un canal iónico permeable a Ca^{++} (Michaelis, 1998). Para que estos receptores se activen, se requiere de la unión de dos agonistas diferentes, el glutamato y la glicina, siendo la Subunidad GluN1 quien posee el sitio de unión a glicina y la subunidad GluN2 el sitio de unión a glutamato (Schorge *et al.*, 2003).

Cada receptor se compone de 4 subunidades, las cuales están organizadas en dímeros de 2 subunidades (GluN1, GuN2, GluN3), la conformación de cada dímero debe corresponder a una subunidad diferente, ya que la combinación con una misma subunidad no genera receptores funcionales (Das, 1998). La combinación principal es el complejo GluN1-GluN2, sin embargo, esto depende según el estado de desarrollo. La organización funcional de cada receptor debe constar de 4 dominios: un dominio extracelular con el amino terminal (DNT), un dominio de unión a ligando (DBL), una región transmembranal, que forman 4 segmentos hidrofóbicos que se denominan M1, M2, M3 y M4, en donde el segmento M2 es quien conforma el canal iónico, ya que no está completamente en la membrana y el dominio carboxilo en la región terminal (DCT) (Figura 2) (Flores *et al.*, 2012). Este tipo de receptores son de gran importancia debido a los roles que pueden desempeñar en el SNC, como en la

participación de la plasticidad neuronal y simpática. Sin embargo, una sobreestimulación de alguna de las dos subunidades que conforman estos receptores puede desencadenar o favorecer la muerte neuronal que se presenta en los accidentes cerebrovasculares y otros daños agudos y crónicos del SNC, como los que ocurren en enfermedades neurodegenerativas (Reoyo, 2012), tales como la enfermedad de Alzheimer (Lau y Zukin, 2007) y la enfermedad de Parkinson (Lau *et al.*, 2009; Shipton y Paulson 2014).

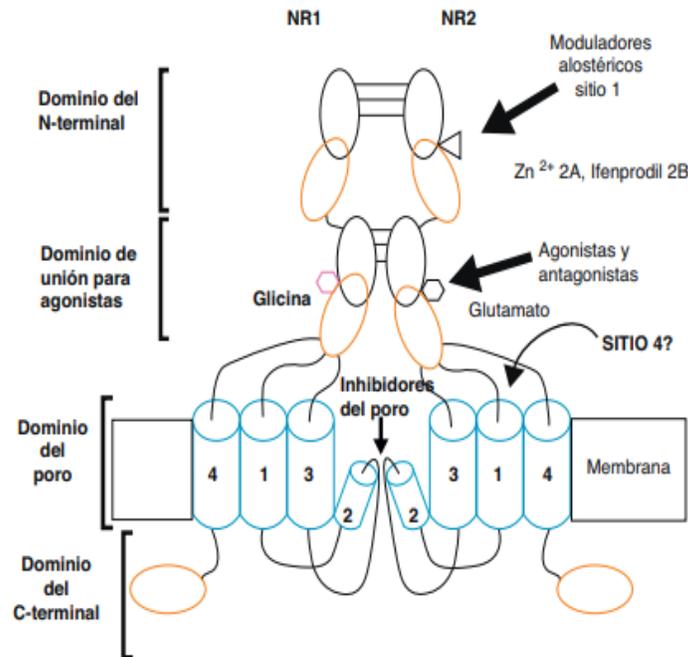


Figura 2. Representación esquemática de la estructura del receptor a glutamato tipo NMDA y sus sitios de regulación (Tomada de Flores-Soto, 2017).

1.10.2. Expresión de la subunidad GluN1

La subunidad GluN1 está codificada por un solo gen llamado Grin1, sin embargo, puede presentar ocho isoformas, que se denominan de la siguiente manera: GluN1a-4a y GluN1b-4b que surge por la presencia o ausencia de una secuencia de aproximadamente 21 aminoácidos en el exón 5 en la región N-terminal y en los exones 21 y 22 en la región C-terminal (Laurie y Seeburg, 1994; Sugihara *et al.*, 1992; Holmes *et al.*, 2002). Aquí, la subunidad GluN1 resulta obligatoria para el funcionamiento de estos receptores.

La presencia o ausencia de esta cadena de aminoácidos en los exones 5, 21 y 22 exhiben características independientes e importantes para la biología, tal es el caso del exón 21, que participa en el posicionamiento y transporte de los NMDARs a la membrana. Por otro lado, el exón 22 codifica para dos regiones C1 y C2 con los aminoácidos que se encuentran en la región C-terminal y constituyen un dominio de unión a proteínas PDZ (Postsynaptic Density-95/Discs Large/Zonula Occludens-1-binding Motif), que permiten la asociación de los NMDAR en grupos sobre la superficie celular (Okabe, 1999).

1.10.3. Expresión de la subunidad GluN2

La subunidad GluN2 esta codificada por 4 genes distintos (Grin2a, Grin2b, Grin2c y Grin2d) y cada uno de ellos codifica una variante diferente que puede ser GluN2A, GluN2B, GluN2C y GluN2D (Laube *et al.*, 1997). Se ha señalado que estas cuatro subunidades tienen un peso en la diversidad funcional, refiriéndose principalmente a propiedades biofísicas y farmacológicas del receptor NMDA. Esta función se le atribuye gracias al dominio amino-terminal extracelular (ADT), ya que con él puede controlar la sensibilidad, la potencia del agonista, la conductancia, el tiempo de duración de apertura y cierre del canal. (Vicini *et al.*, 1998; Hongjie *et al.*, 2009). Además, este dominio también es fundamental para la función y localización de estas subunidades en la membrana sináptica (Sprengel *et al.*, 1998).

La localización de receptores que contienen variantes de GluN2A, como GluN2A y GluN2B en el cerebro, según algunos estudios son de gran interés, debido al vínculo con la señalización de la supervivencia y muerte neuronal (Hardingham y Bading, 2010). En lo que se refiere a su expresión, cada subunidad es prominente según el estado del desarrollo embrionario o postnatal. Moreno y Zarain (2006) han reportado que la expresión de GluN2A y GluN2B se da alrededor de la segunda semana de desarrollo posnatal y son las subunidades prominentes en el cerebro anterior adulto., mientras que la expresión de las otras dos subunidades (GluN2C y GluN2D) es más limitada. En el caso de la subunidad GluN2C se expresa sobre todo en el cerebelo y la subunidad GluN2D se expresa principalmente en el desarrollo temprano en el diencefalo (talamos), el cerebelo y el tronco cerebral.

Lujan y colaboradores (2005) han reportado otras etapas del desarrollo de SNC que involucran una expresión de los neurotransmisores junto con sus receptores. En este caso, en cuanto a la expresión de los receptores de NMDA, se reporta que la expresión de GluN1 es constante durante todo el desarrollo posnatal del SNC. Los cambios más notables son los niveles relativamente mayores de las formas o variantes NMDAR1-A (GluN1A, nueva nomenclatura) y NMDAR1-D (GluN1D) en el prosencéfalo maduro de la rata comparado con el perinatal (Tabla 4) (Laurie y Seeburg, 1994).

Tabla 4. Expresión de las subunidades de los receptores de glutamato durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC).

Estadio del desarrollo		E12	E15	P0	P7	P21	A
Receptores ionotrópicos							
Receptores AMPA	Referencias						
GluR1	(43,60)	*	*	**	***	***	****
GluR2	(43,60)	*	*	*	**	**	***
GluR3	(43,60)	*	*	*	**	**	***
GluR4	(43,60)	*	*	*	**	**	**
Receptores KA							
GluR5	(43,60,62)	*	**	***	****	****	**
GluR6	(43,60,62)	*	**	***	****	***	**
GluR7	(43,60,62)	*	**	***	****	***	**
K1	(43,60,62)	*	**	***	**	**	*
K2	(43,60,62)	****	****	****	****	****	****
Receptores NMDA							
NR1	(33)	*	**	**	**	**	**
NR2A	(12,62,65)	*	*	**	***	***	****
NR2B	(12,62,65)	****	****	***	**	**	*
NR2C	(12,62,65)	*	**	**	**	**	***
NR2D	(12,62,65)	*	*	**	***	***	****
NR3A	(64)	**	**	**	**	**	*
NR3B	(64)	*	*	*	*	*	*
Receptores metabotrópicos							
Grupo I							
mGluR1	(7,41)	*	*	**	***	***	***
mGluR5	(7,41)	*	*	**	***	**	**
Grupo II							
mGluR2	(7)	*	*	*	*	*	*
mGluR3	(7)	***	**	**	*	*	*
Grupo III							
mGluR4	(2)	*	**	*	*	*	*
mGluR7	(2)	*	**	**	***	**	*

*muy baja expresión, **baja expresión, ***expresión moderada, ****alta expresión. E12, Día embrionario 12; E15, Día embrionario 15; P0, Nacimiento; P7, Día posnatal 7; P21, Día posnatal 21; A, Adulto.

(Tomada de Moreno y Zarain, 2006).

Las subunidades NR2A (GluN2A) y NR2C (GluN2C) se observan en el cerebro en la región temporal desde el día de desarrollo embrionario 18 (E18) en E20 en el hipocampo. En el neonato se expresan en la corteza cerebral, el hipocampo, las células de Purkinje, el mesencéfalo y el diencefalo. En estudios previos por Velandia y colaboradores (2012) se logró obtener un modelo de neuroinfección por dengue en ratones BAL/C lactantes hasta 7 días postnatales. Por lo que, estudiar el papel de la subunidad GluN2A en el modelo mencionado, resulta de alto interés teniendo en cuenta los tiempos de expresión y el rol determinante que juega la misma en la unión del neurotransmisor glutamato a los receptores tipo NMDA.

Otro aspecto interesante es el conocer la posible dinámica de interacción de la proteína E de fusión del DENV con la subunidad GluN2A, con el fin de aproximarse al papel de los receptores tipo NMDA durante la forma neurotrópica del DENV.

Diferentes receptores de sistemas de neurotransmisión podrían participar en la neuropatogenesis del DENV a través de un mecanismo sinérgico con las proteínas de fusión viral favoreciendo la neuroinfección. El mayor conocimiento de los mecanismos implicados en las formas neurológicas del DENV dependerá de la rigurosidad de los estudios del sistema nervioso de los casos fatales y del mayor interés en las biopsias cerebrales de pacientes fallecidos, además, del mayor número de estudios en ciencias básicas enfocados al esclarecimiento del neurotropismo de esta infección viral.

1.11. REFERENCIAS

1. Acosta EG. 2011. La entrada del virus dengue a la célula huésped. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires.

2. Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Heinz FX. 2001. Evidencia mutacional de un péptido de fusión interno en la proteína E de la envoltura de flavivirus. *J Virol.* 75 (9): 4268-75.
3. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S. 1998. Infección por el virus del dengue Husmann M. de las células endoteliales humanas conduce a la producción de quimioquinas, la activación del complemento, y la apoptosis. *J Immunol.* 161 (11): 6338-46.
4. Backovic M, Jardetzky TS. 2009. Proteínas de fusión de membrana viral de clase III. *Opinión actual en biología estructural.* 19 (2): 189-96.
5. Barnes W, Rosen L. 1974. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 23 495-506. Citado por Bernadette Murgue. 2010. Severe dengue: questioning the paradigm. *Microbes and Infection.* 12: 113- 118.
6. Barr M, Kiernan J. 1986. Histología de la corteza cerebral. En el sistema nervioso humano. *HARLA.* 106:173-260.
7. Behar K, Rothman D. 2001. In Vivo Nuclear Magnetic Resonance Studies of Glutamate-gAminobutyric Acid-Glutamine Cycling in Rodent and Human Cortex: The Central. Role of Glutamine. *J Nutr.*131: 2498S–2504S.
8. Bhardwaj S, Holbrook M, Shope RE, Barrett AD, Watowich SJ. 2001. Caracterización biofísica y actividad antagonista específica del vector del dominio III de la proteína envolvente de *Flavivirus* transmitida por garrapatas. *J Virol.* 75 (8): 4002-7.
9. Brítez S, Mir R, Lacarrubba J, Mendieta E, Céspedes E, Genes L. 2014. Dengue de transmisión vertical: revisión de una serie de casos. *Pediatría (Asunción).* 41(1): 25-31.
10. Brito ML, Gómez C, Alvarenga C, Dornelas S. 2005. Manifestaciones neurológicas de dengue. Estudio de 41 casos. *Arq Neuropsiquiatr.* 63(2-B):488-493.
11. Burke DS, Kliks S. 2006. Antibody-dependent enhancement in dengue virus infections. *J Infect Dis.* 193: 601-03.
12. Cam BV, Fonsmark L, Hue NB, Phuong NT, Poulsen A, Heegaard ED. 2001. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 65:848-5.
13. Carder R, Hendry S. 1994. Neuronal Characterization, Compartmental Distribution and Activity-dependent Regulation of Glutamate Immunoreactivity in Adult Monkey Striate Cortex. *The J of Neurosci;* 14: 242-62
14. Castellanos J, Bello J, Velandia M. 2014. Manifestaciones neurológicas durante la infección por el virus del dengue. *Infection.* 8:167-76.
15. Charlier N, Leyssen P, De Clercq E, Neyts J. 2004. Rodent models for the study of therapy against flavivirus infections. *Antiviral Res.* 63:67-77.
16. Chaturvedi U, Dhawan R, Khanna M, Mathur A. 1991. Breakdown the blood-brain barrier dg dengue virus infection of mice. *J Gen Virol.* 72(4):859-66.
17. Chen Y, Maguire T, Hileman R, Fromm J, Esko J, Linhardt R, Marks R, 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med.*3: 866-871.

18. Chu VC, McElroy LJ, Chu V, Bauman BE, Whittaker GR. 2006. El virus de la bronquitis infecciosa coronavirus aviar sufre una activación de fusión directa y dependiente del pH bajo durante la entrada en las células huésped. *J Virol.* 80 (7): 3180-8.
19. Cline H, Haas K. 2008. The regulation of dendritic arbor development and plasticity by glutamatergic synaptic input: A review of the synaptotrophic hypothesis. *Journal of Physiology.* 586:1509–1517.
20. Cortés FM, Gómez SY, Ocazone RE. 2007. Subtipos de virus dengue serotipos 2, 3 y 4 aislados en el Departamento de Santander, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical.* 59(3).
21. Costa VV, Del Sarto JL, Rocha RF, Silva FR, Doria JG, Olmo IG, Marqués RE, Queiroz-Junior CM, Foureaux G, Araújo JM, Cramer A, Real AL, Ribeiro, Lucas S, Sardi, Silvia I. Ferreira, Anderson J. Machado, Fabiana S. de Oliveira, Antônio C. Teixeira AL, Nakaya HI, Souza DG, Ribeiro FM, Teixeira MM. 2017. N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor Blockade Prevents Neuronal Death Induced by Zika Virus Infection. *mBio.* 8 (2):350-17.
22. Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE. 1998. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature.* 393: 377-81.
23. Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. 2000. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol.* 74:7814-23.
24. Douglas R, Martin K. 2005. Neuronal Circuits of the Neocortex. Annu. Rev. Neurosci. Embryogenesis. *The J of Neurosci.* 25: 10-18.
25. Eifart P, Ludwig K, Böttcher C, de Haan CA, Rottier PJ, Korte T, Herrmann A. 2007. Papel del endocitosis y bajo pH en la entrada de células de la cepa A59 del virus de la hepatitis murina. *J Virol.* 81 (19): 10758-68.
26. Ferreira GP, Figueiredo LB, Coelho LF, Policarpo AS, Cecilio AB, Ferreira PCP. 2010. Dengue virus 3 clinical isolates show different patterns of virulence in experimental mice infection. *Microbes Infect.* 12:546-554.
27. Flores ME, Chaparro V, Escoto M, Vazquez E, Gonzalez RE, Beas C. 2012. Estructura y función de las subunidades del receptor glutamato tipo NMDA. *Neurología.* 27(5): 301-310.
28. Flores ME, Chaparro V, Escoto M, Vázquez E, González R, Beas C. 2012. Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurologia.* 27: 301-310.
29. García L, Nacher J. 1998. Las células del tejido nervioso. Manual de neurociencia. España: *Síntesis.* 84-93.
30. Germi R, Crance J, Garin D, Guimet J, Lortat J, Ruigrok R, Zarski J, Drouet E. 2002. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology.* 292: 162-168.
31. Gibbons R, Vaughn D. 2002. Dengue: an escalating problema. *BMJ.* 324(7353): 1563-1566.
32. Guardado CP, Rey FA. 2017. The envelope proteins of the Bunyavirales. *Adv Virus Res.* 98: 83-110.

33. Guirakhoo F, Bolin RA, Roehrig JT. 1992. La proteína prM del virus de la encefalitis de Murray Valley confiere resistencia ácida a las partículas del virus y altera la expresión de los epítomos dentro del dominio R2 de la glicoproteína E. *Virología*. 191:921–93.
34. Gulati S, Maheshwari A. 2007. Atypical manifestations of dengue. *Tropical medicine & international health*. 12(9):1087–95.
35. Gupta BP, Singh S, Kurmi R, Malla R, Sreekumar E, Manandhar KD. 2015. Re-emergence of dengue virus serotype 2 strains in the 2013 outbreak in Nepal. *Indian J Med Res*. 142(Suppl 1): S1.
36. Halstead SB. 1970. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med*. 42:350-62.
37. Hardingham GE, Bading H. 2010. Synaptic versus señalización del receptor NMDA extrasináptico: implicaciones para los trastornos neurodegenerativos. *Nat. Rev. Neurosci*. 11: 682–696.
38. Hilgard P, Stockert R. 2000. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology*. 32: 1069-1077.
39. Holmes KD, Mattar PA, Marsh DR, Weaver LC, Dekaban GA. 2002. The N-Methyl-D-aspartate receptor splice variant NR1-4 C-terminal domain. Deletion analysis and role in subcellular distribution. *J Biol Chem*. 277: 1457-68.
40. Hongjie Y, Kasper B, Hansen K, Katie M, Vance K. 2009. Control de la función del receptor NMDA por el dominio amino-terminal de la subunidad NR2. *J of Neuroscience*. 29(39): 12045-12058.
41. Huan-Yao Lei, Huang JK, Lin YS, Yeh TM, Liu HS. 2008. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *American Journal of Infectious Diseases*. 4: 1-9.
42. Humphries P, Pretorius E, Naude H. 2008. Direct and indirect celular effects of aspartame on the brain. *European Jorunalof clinical Nutricion*. 62: 451-462.
43. Hung SL, Lee PL, Chen HW, Chen LK, Kao CL, King CC. 1999. Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. *Virology*. 257: 156-162.
44. Hurley JK, Greenslade T, Lewy PR, Ahmadian Y, Firlit C. 1980. Varicella-Zoster infections in pediatric renal transplant recipients. *Arch surg*. 115(6):751-2.
45. Institute of Medicine (US) Forum on Neuroscience and Nervous System Disorders. Glutamate-Related Biomarkers in Drug Development for Disorders of the Nervous System: Workshop Summary. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. 2, Overview of the Glutamatergic System.
46. Kato D, Era S, Watanabe I, Arihara M, Sugiura N, Kimata K, Suzuki Y, Morita K, Hidari KIPJ, Suzuki T. 2010. La actividad antiviral de sulfato de condroitina E focalización proteína de la envoltura del virus del dengue. *Antiviral Res*. 88: 236-243.
47. Koraka P, Benton S, Amerongen V, Stittelaar K, Osterhaus A. 2007. Characterization of humoral and cellular immune responses in cynomolgus macaques upon primary and subsequent heterologous infections with dengue viruses. *Microbes and Infection*. 9: 940-46
48. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. 1984. Dengue hemorrhagic fever/dengue shock síndrome: lessons from the Cuban epidemic. *Bulletin of the world Health Organization*. 67(4): 375-80.

49. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG. 2002. Estructura del virus del dengue: implicaciones para la organización, maduración y fusión de los flavivirus. *Célula*. 108: 717-725.
50. Kurane Ichiro. 2007. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 30: 329-40
51. Kyle J y Harris E. 2008. Global spread and persistence of dengue. *Annual Rev Microbiol*. 62:71-92.
52. Lamb RA y Jardetzky TS. 2007. Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. *Curr Opin Struct Biol*. 17: 427-436.
53. Lau CG y Zukin RS. 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*. 8(6):413-26.
54. Lau CG, Takeuchi K, Rodenas A, Takayasu Y, Murphy J, Bennett MV, Zukin RS. 2009. Regulation of NMDA receptor Ca²⁺ signalling and synaptic plasticity. *Biochem Soc Trans*. 37 (6):1369-74.
55. Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J. 1997. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron*. 18:493-503.
56. Laurie DJ y Seeburg PH. 1998. Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J Neurosci*. 14(5):3180-3194.
57. Lescar J, Roussel A, Wein MW, Navaza J, Fuller SD, Wengler G, Wengler G, Rey FA. 2001. La cubierta de glicoproteína de fusión del virus Semliki Forest: un conjunto icosaédrico preparado para la activación fusogénica a pH endosomal. *Célula*. 105: 137-148.
58. Liu, T, Llang L, Wang C, Liu H, Chen W. 2008. The blood-brain barrier in the cerebrum is the initial site for the Japanese Encephalitis Virus entering the central nervous system. *J NeuroVirol*. 14 (6): 514-21.
59. López F, Mota J. 2000. Desarrollo de agentes inmunizantes contra el dengue. *Pan Am J Public Health*. 7(5): 285-92.
60. Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro E, Harriague J, Virelizier JL, Rey FA, Desprès P, Arenzana F, Amara A. 2005. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem*. 280(25):23698-708.
61. Lujan R, Shigemoto R, Lopez G. 2005. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*. 130(3):567-580.
62. Mackenzie JM, Westaway EG. 2001. El ensamblaje y la maduración del flavivirus Kunjin virus parecen ocurrir en el retículo endoplásmico rugoso ya lo largo de la vía secretora, respectivamente. *J Virol*. 75: 10787-10799.
63. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. 2004. Dengue viral infections. *Postgrad Med J*. 80:588-601.

64. Mamani EW. 2014. Nuevo serotipo 5 del virus dengue: Necesidad de fortalecer la vigilancia molecular en Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 31(1): 169-180.
65. Mamani WE. 2013. Identificación de genotipos y linajes de los cuatro serotipos del virus dengue en el Perú durante los años 1998 -2012. Tesis Postgrado. Facultad De Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor De San Marcos.
66. Manent JB, Represa A. 2007. Neurotransmitters and brain maturation: Early paracrine actions of GABA and glutamate modulate neuronal migration. *Neuroscientist*. 13:268–279.
67. Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. 2009. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev*. 22: 564-81.
68. Martínez JJ, Del Angel RM. 2001. Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection. *J Virol*. 75: 7818-7827.
69. Masahito W, Maemura K, Kanabara K. 2002. GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol*. 213: 1-47.
70. Meiklejohn B, England B, Lennette E. 1952. Adaptation of dengue virus strains in unweaned mice. *Am. J. Trop. Med*. 51-58.
71. Michaelis EK. 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol*. 54:369-415.
72. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. 2019. *Asunción*: Dirección General de Vigilancia de la Salud. https://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/Hay-que-cortarle-las-alas-al-dengue.aspx?fbclid=IwAR2TELQh29W_D0nRp2_KA38pzpr23w7KIGcFQhT4OEWmC-ftzTZD2Q3RJUo.
73. Modis Y. 2013 Class II fusin proteins. *Adv Exp Med Biol*.790:150-66.
74. Moreno G, Zarain A. 2006. Papel de los receptores de glutamato durante la diferenciación neuronal. *Salud mental*. 29 (5).
75. Murrin, LC, Sanders, JD, Bylund, DB. 2007. Comparación de la maduración de los sistemas neurotransmisores adrenérgicos y serotoninérgicos en el cerebro: implicaciones para los efectos diferenciales de los fármacos en juveniles y adultos. *Farmacología bioquímica*. 73 (8), 1225-36.
76. Navarro E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana F, Desprès 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(7):723-8.
77. Neal JW. 2014. Flaviviruses are neurotropic, but how do they invade the CNS?. *J Infect*. 69(3):203-15.
78. Okabe S, Miwa A, Okado H. 1999. Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *J Neurosci*. 19:7781-92.
79. OMS - Organización Mundial de la Salud [Internet] Dengue y dengue grave. [actualizado 2016 abril; citado 2016 20 de julio]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>

80. Organización Mundial de la Salud, Programa Especial para Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales. 2009. Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. La Paz: OPS/OMS.
81. Organización Panamericana de la Salud. 2016. Dengue: guías para la atención de enfermos en la Región de las Américas. 2.ed. Washington, DC: OPS, 2016.
82. Orrego F, Villanueva S. 1993. The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. *Neuroscience*. 56:539-555.
83. Paoletti P. 2011. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur. J. Neurosci*. 33:1351-1365.
84. Pérez Marissa. 2010. Evaluación de la susceptibilidad de las células del sistema nervioso central a la infección por el virus del dengue. *Instituto Politécnico Nacional y Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. México.
85. Puccioni M, Rosadas C. 2015. Advances and new insights in the neurophogenesis of dengue infection. Versidad Federal de Rio de Janeiro. Facultad de Medicina. Brasil.
86. Ramos CJ, Imbert J, Barrón B, Ramos C. 1997. A 65-kDa trypsin-sensible membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells. *J Neurovirol*. 3:435-40.
87. Reoyo JR. 2012. Regulación de la expresión de la subunidad glun1 del receptor de glutamato tipo NMDA en excitotoxicidad e isquemia cerebral. Tesis. Universidad Autónoma de Madrid. España.
88. Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. 1995. La glucoproteína de la envoltura del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas a una resolución de 2 Å. *Naturaleza*. 375: 291–298.
89. Rey FA. 2003. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(12): 6899-901.
90. Rothman AL. 2001. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature reviews immunology*. Aug. 11(8): 532-43.
91. Salazar MI, Pérez GM, Terreros TM, Castro ME, Pérez DR, Ramírez AG. 2013. Dengue virus type 2: protein binding and active replication in human central nervous system cells. *Sci World J*.
92. Salazar MI, Pérez-García M, Terreros-Tinoc M, Castro-Mussot ME, Pérez-Ramírez J, Ramírez-Reyes AG, García-Flores MM. 2013. Dengue virus type 2: protein binding and active replication in human central nervous system cells. *The Scientific World Journal*. 90: 40-67.
93. Sanides F. 1970. Functional architecture of the motor and sensory cortices in primates in the light of a new concept of neocortex evolution. In Noback CR, Montagna W, eds. *The Primate Brain*. 137-208.
94. Schorge S, Colquhoun D. 2003. Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci*. 23:1151-8.
95. Shipton OA, Paulsen O. 2014. GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 369 (1633).

96. Silvia O, Pantelic L, Mackenzie J, Shellam G, Papadimitriou J, Urosevic N. 2004. Virus spread, tissue inflammation and antiviral response in brains of flavivirus susceptible and resistant mice acutely infected with Murray Valley Encephalitis Virus. *Arch Virol.* 149(3): 447-64.
97. Sips G, Wilschut J, Smit J. 2012. Neuroinvasive flavivirus infections. *Rev Med Virol.* 22:69-87.
98. Skehel JJ y Wiley DC. 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* 69: 531-569.
99. Song I, Savtchenko L, Semyanov A. 2011. La excitación o inhibición tónica se establece mediante la conductancia de GABA (A) en las interneuronas del hipocampo. *Nature communications.* 2: 376.
100. Spassky N, Merkle F, Flames N, Tramontin A, Verdugo J, Buylla A. 2005. Adult Ependymal Cells Are Postmitotic and Are Derived from Radial Glial Cells during Embryogenesis. *The J of Neurosci.* 25: 10-18.
101. Sprengel R, Suchanek B, Amico C, Brusa R, Burnashev N, Rozov A. 1998. Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell.* 92:279-89.
102. Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. 1997. Activación proteolítica del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas por furina. *J Virol.* 71: 8475-8481.
103. Sugihara H, Moriyoshi K, Ishii T, Masu M, Nakanishi S. 1992. Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem Biophys.* 185:826-832.
104. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli PA, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine.* 197(7): 823-9.
105. Valverde F. 1970. The Golgi method. A tool for comparative structural analysis. Contemporary research methods in neuroanatomy. New York: Springer-Verlag. 12-31.
106. Vasilakis N. 2013. The daemon in the forest-emergence of a new dengue serotype in South East Asia [Internet]. En: 3rd International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever; 21-23 October 2013, Bangkok, Thailand [citado el 1 de febrero de 2014].
107. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S. 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 181:2-9.
108. Velandia ML, Castellanos JE. 2011. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infection.* 15(1): 33-43.
109. Vicini S, Wang JF, Li JH, Zhu WJ, Wang YH, Luo JH. 1998. Functional and pharmacological differences between recombinant N-Methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol.* 79: 555-66.
110. Wang D, Bordey A. 2008. The astrocyte odyssey. *Progress in Neurobiology.* 86: 342-348.

111. Yauch LE, Shresta S. 2008. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Research*.80: 87–93.

CAPITULO II: Artículo científico

Evaluación *in silico* de la interacción de la subunidad GluN2A del receptor NMDA con la proteína E del virus dengue

In silico evaluation of the interaction of the GluN2A subunit of the NMDA receptor with the E protein of the dengue virus

RESUMEN

El dengue es una enfermedad viral causada por alguno de los cuatro serotipos (DENV 1, 2, 3 y 4) que se transmite al hombre por medio de la picadura del mosquito principalmente *Aedes aegypti*. Dentro de las manifestaciones de esta enfermedad se pueden presentar dos formas conocidas como dengue con y sin signos de alarma y dengue grave (Velandia *et al.*, 2012). Durante la forma grave del dengue puede existir compromiso del Sistema Nervioso Central (SNC) algunas veces asociado a la neuroinvasión viral. Sin embargo, el conocimiento sobre la neuropatogénesis del dengue aún es escaso, entre otros, por las controversias existentes sobre el carácter neurotrópico de este *Flavivirus*. Algunos estudios plantean que la neuroinvasión del *Flavivirus* puede ser mediada a través de canales de calcio (Hoffmann *et al.*, 2017), aquí los receptores de glutamato tipo NMDA podrían jugar un papel importante porque se ha evidenciado que sus antagonistas, inhiben la replicación de algunos virus neurotrópicos en cultivos celulares infectados (Tsiang *et al.*, 1999).

Este estudio se centró en evaluar las interacciones de la proteína E DENV y la Subunidad GluN2A- NMDA en el sitio de unión a glutamato mediante un enfoque *in silico*, con el fin de identificar los residuos que proporcionan la interacción intermolecular entre el complejo proteína E del dengue y la subunidad GluN2A-NMDA. Para ello, se realizaron los acoplamientos proteína-proteína empleando el algoritmo Haddock (**H**igh **A**mbiguity **D**riven **P**rotein-**p**rotein **D**ocking) para observar las mejores poses. Con la mejor interacción bajo los parámetros de Haddock *score* y *Z-score*, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular mediante el software GROMACS (5.0.5) para analizar la estabilidad del complejo a lo largo de un determinado tiempo. La presencia de varias interacciones electrostáticas fuertes como puentes de hidrogeno entre los residuos de la proteína E DENV y la subunidad GluN2A permitieron observar trayectorias que tendían a la estabilidad del complejo en el tiempo. Estos análisis permitieron por consiguiente definir que el sitio activo del glutamato podría ser un blanco para el anclaje de la proteína E del DENV a la célula huésped e inducir la infección, además, de postular para futuros estudios experimentales sobre la neuropatogénesis viral, al receptor NMDA como un sitio de unión o de entrada del virus dengue a las neuronas.

Palabras clave: Dengue, glutamato, complejo, interacciones, residuos.

ABSTRACT

Dengue is a viral disease caused by one of the four serotypes (DENV 1, 2, 3 and 4) that is transmitted to humans through the bite of the mosquito, mainly *Aedes aegypti*. Within the manifestations of this disease two forms known as dengue with and without signs of alarm and severe dengue can occur. During the severe form of dengue there may be compromise of the Central Nervous System (CNS) sometimes associated with viral neuroinvasion.

However, knowledge about the neuropathogenesis of dengue is still scarce, among others, due to controversies about the neurotropic character of this *Flavivirus*. Some studies suggest that *Flavivirus* neuroinvasion can be mediated through calcium channels (Hoffmann et al., 2017), here NMDA-type glutamate receptors could play an important role because NMDA antagonists inhibit its replication in cell cultures.

This study focused on evaluating the interactions of the DENV E protein and the GluN2A-NMDA Subunit at the glutamate binding site through an in silico, in order to identify residues that respond to the intermolecular interaction between the protein complex E of Dengue and the GluN2A-NMDA subunit. To do this, they have implemented the protein-protein couplings using the Haddock algorithm (protein-protein docking driven by high ambiguity) to observe the best poses. With the best interaction under the parameters of Haddock score and Z-score, we carry out molecular dynamic's simulations using the GROMACS (5.0.5) software for the maintenance of the complex over a given time. The presence of several strong electrostatic interactions such as hydrogen bonds between the residues of the DENV E protein and the GluN2A subunit allowed us to see the trajectories that tend to the stability of the complex over time. These analyzes were allowed to better define the active site and glutamate for anchoring the DENV E protein to the host cell and induce infection, in addition to publication for future experimental studies on viral neuropathogenesis, to the NMDA receptor as a site of binding or entry of dengue virus to neurons.

Keywords: Dengue, glutamate, complex, interactions, residues.

2.1. INTRODUCCION

El dengue es una enfermedad viral causada por alguno de los cuatro serotipos del virus dengue (DENV-1, 2, 3 y 4) y se transmite al hombre por medio de la picadura de mosquitos infectados del género *Aedes*, *A. aegypti* y *A. albopictus* (Gibbons y Vaughn, 2002). Según la OMS, la enfermedad puede manifestarse como dengue con y sin signos de alarma y dengue grave (World Health Organization, 2009 #923). El virus presenta envoltura y contiene un genoma de ARN sencillo de polaridad positiva con un tamaño aproximado de 11Kb que codifica a una poliproteína compuesta por tres proteínas estructurales que incluyen la proteína de la cápside (C), proteína precursora de membrana (prM) o proteína de membrana (M) y proteína de envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Bartenschlager & Miller, 2008). La proteína E se asocia como la proteína clave para facilitar la fusión de la membrana viral y la célula huésped, basado en las estructuras atómicas de las conformaciones pre y post fusión de la proteína (Stiasny et al., 2009).

Los mecanismos de la patogénesis de esta enfermedad aún no han sido completamente elucidados, entre otros, por la falta de un modelo experimental que presente la totalidad del espectro clínico de la enfermedad (Yauch & Shresta, 2008). Algunos estudios reportan que el DENV puede afectar el sistema nervioso central (SNC) y causar manifestaciones neurológicas, tales como cefalea severa, vomito no precedido de nauseas, alteraciones en la conciencia, convulsiones, síndrome de Guillain-Barre, mielitis transversa y encefalitis (Araujo et al., 2012; Kulkarni & Kumar, 2011). En un estudio realizado en 100 niños con IgM para dengue del estado de Kaernataka- India se encontró que la incidencia neurológica

fue del 40%, además, se observó papiledema y parálisis de algunos nervios craneales en el 30% de los casos y signos meníngeos en el 80%. Esto podría indicar que la fiebre del dengue abarca un espectro clínico en expansión más allá de los criterios y clasificaciones indicadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Kulkarni & Kumar, 2011). Por otro lado, Castellanos y colaboradores han evaluado los posibles mecanismos involucrados en la aparición de las manifestaciones neurológicas en una línea celular de neuronas humanas como modelo de infección con DENV-2, encontrando que la infección por dengue induce un efecto citopático en la línea celular de neuroblastoma caracterizado por un proceso de muerte por apoptosis, además, se observó una regulación positiva del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α); situación que sugiere que la regulación de este factor podría ser parte del proceso que induce daño y muerte celular durante la encefalitis por dengue (Castellanos, Bello, & Velandia-Romero, 2014).

Se han identificado varios receptores o proteínas de membrana celular implicados en la entrada del virus dengue a su huésped, dentro de ellos se incluyen moléculas de carbohidratos y sulfatadas como las proteínas de choque térmico Hsp 70 y Hsp 90 (Aoki et al., 2006); lectinas, como DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin (Hoving, Wilson, & Brown, 2014) y receptores de células claudin-1 (Che *et al.*, 2013). Existen estudios en los que se ha demostrado que la presencia del DENV en el SNC está asociada a manifestaciones neurológicas, sin embargo, no se ha establecido con certeza que este virus sea neurotrópico, es decir que el virus infecte y utilice algún tipo de neurona como medio de diseminación (Velandia-Romero, Acosta-Losada, & Castellanos, 2012). Se sugiere, que existen algunos receptores o moléculas implicadas que podrían mediar su entrada al SNC como las citoquinas TNF- α (Neal, 2014) e IFN- γ (Domingues et al., 2008) y otras sustancias bioquímicas o eventos citotóxicos, de manera tal que pueden alterar la barrera hematoencefálica y contribuir a facilitar la entrada del virus en el tejido cerebral (Hidari & Suzuki, 2011).

Algunos virus neurotrópicos como la encefalitis equina Venezolana y Semliki Forest pertenecientes a la familia de *Alfavirus* y *Flavivirus* como la encefalitis japonesa, el virus del Nilo occidental y encefalitis de San Louis pueden producir una grave enfermedad en el SNC causando encefalitis (Schmaljohn & McClain, 1996). Otros virus neurotrópicos tales como, el virus de la Rabia y el Virus de la coriomeningitis linfocítica, se les ha atribuido las distintas modificaciones en el funcionamiento del SNC a las alteraciones en los canales iónicos, receptores NMDA, modificaciones en el RNA celular, apoptosis y cambios en los sistemas de neurotransmisión (Bonilla, Ryder, & Ryder, 1980; Fu & Jackson, 2005; Pearce, Steffensen, Paoletti, Henriksen, & Buchmeier, 1996; Rengifo Castillo, 2012). Estos virus exhiben propiedades biológicas diversas a las del género *Flavivirus*, sin embargo, comparten algunas similitudes en el virión, ya que son virus de RNA envueltos; y tiene la misma estrategia de replicación del genoma viral, debido a que necesitan del huésped para llevar a cabo la replicación y causar infección; y por último, son similares a la organización genómica, ya que cumplen tres funciones distintas dentro del ciclo viral: el ARN mensajero (ARNm) para la traducción de todas las proteínas virales, una plantilla durante la replicación del ARN y material empaquetado dentro de nuevas partículas de virus (Lindenbach & Rice).

Los receptores asociados a los sistemas de neurotransmisión GABA y Glutamato pueden estar implicados en la neuropatogénesis del dengue y de otros virus neurotrópicos porque se ha postulado que la elevación de las concentraciones en los sistemas de neurotransmisión puede llevar a la apoptosis y a la sobrerregulación de citoquinas tal como se ha reportado con el glutamato (Yun et al., 2003). Costa y colaboradores (2017) indican que al bloquear los receptores NMDA por diferentes antagonistas se proporcionan efectos neuroprotectores contra el daño neuronal inducido por el virus del Zika (ZIKV) de esta manera se infiere que la neurodegeneración inducida por el ZIKV y otros *Flavivirus* neurotrópicos podría inhibirse bloqueando la sobreestimulación de NMDA.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el cerebro, actúa a través de distintos grupos de receptores iGlu (ionotrópicos) y mGlu (metabotrópicos) y su acumulación en el espacio extracelular puede producir estimulación excesiva de los iGlu específicamente del tipo NMDA. Los receptores ionotrópicos tipo NMDA están compuestos principalmente de las Subunidades GluN1 para glicina y GluN2 para glutamato, la sobreestimulación, por parte del glutamato o de sus agonistas activa canales de calcio que producen un incremento en la concentración del ión a nivel intracelular, produciendo la muerte neuronal a través del fenómeno conocido como "excitotoxicidad" (Williams et al., 2000). Esta situación ha sido ampliamente relacionada con estados patológicos como la isquemia, hipoxia y la epilepsia (Miras, 2005; Yun et al., 2003), así como con algunas enfermedades neurodegenerativas y del comportamiento como la enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer (EA), esquizofrenia, dependencia a psicoactivos y el trastorno obsesivo compulsivo (TOC) (Gropman, Summar, & Leonard, 2007; Rengifo, Tapiero, & Spinel, 2005).

Por otro lado, la proteína E del virus dengue está conformada por 3 dominios y se sugiere que juega un papel importante en la adhesión y entrada viral a la célula huésped. Rey y colaboradores (1995) informaron que durante el estudio de la estructura de la proteína E del DENV, identificaron un bolsillo de unión que acomoda un ligando hidrofóbico. Se ha propuesto que este bolsillo se encuentra como una posible "bisagra" entre el dominio II y el dominio central I, que puede estar afectando a la virulencia y alterar el pH del cambio conformacional necesario para desencadenar la fusión de la membrana. En el dominio I se ha postulado dos sitios de glicosilación en los residuos Asn153 y Asn67 los cuales podrían ser blancos claves para la unión al receptor celular (Rey, 2003).

Entender la interacción de la proteína E del DENV con los receptores neuronales entre ellos los receptores tipo NMDA podría proporcionar una mayor comprensión sobre los mecanismos asociados a la posible neuroinfección, todo esto encaminado al descubrimiento de estrategias y posibles tratamientos que mejoren el desenlace de la infección cuando se presenta compromiso del SNC (Pérez *et al*, 2010). En este estudio se evaluaron las interacciones de la proteína E del DENV y la Subunidad GluN2A en el sitio de unión a glutamato mediante un enfoque *in silico*, con el fin de identificar los residuos que se encuentran involucrados en esta interacción intermolecular.

2.2. MATERIALES Y METODOS

2.2.1. Obtención de archivos de trabajo de las proteínas

Para la obtención de los archivos de trabajo, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica sobre las proteínas en el Protein Data Bank (PDB), de aquellas que contaban con una estructura cristalográfica. La entrada para la proteína E del DENV fue aquella estructura con código 4UTC (Rouvinski *et al.*, 2015) y para la subunidad GluN2A- NMDA con código 4NF4 (Jespersen, Tajima, Fernandez-Cuervo, Garnier-Amblard, & Furukawa, 2014), cuyas estructuras tridimensionales se observan en la figura 1.

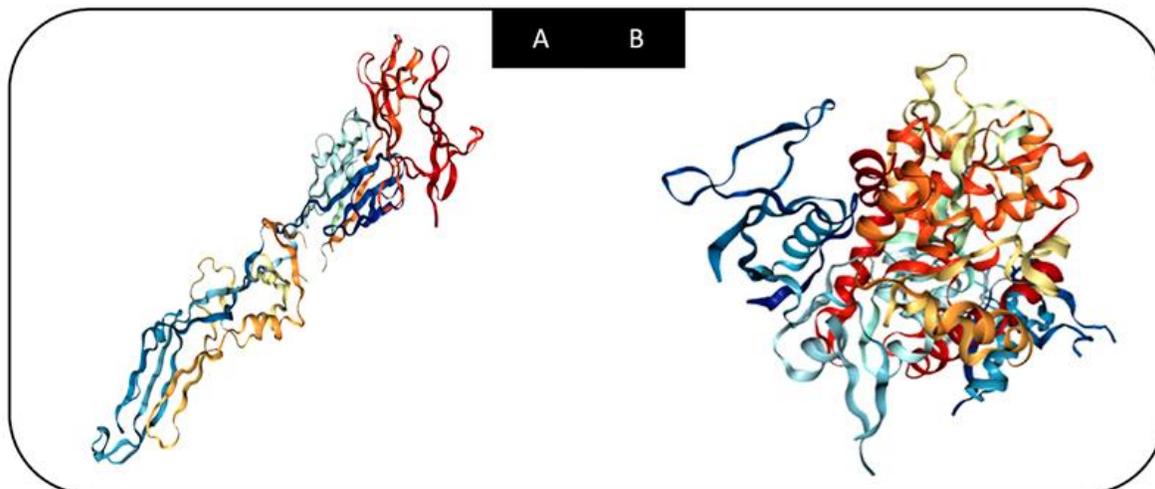


Figura 1. Estructura tridimensional de la glicoproteína E del virus dengue DENV (A) y de la subunidad GluN2A del receptor NMDA (B). (Tomada del PDB, www.rcsb.org, Código: ID 4UTC y 4NF4).

2.2.2 Acoplamiento molecular proteína – ligando

El acoplamiento molecular se realizó utilizando el software Autodock / Vina 4.2, que emplea el campo de fuerza AMBER y PyMol como sistema de visualización molecular. Para ello, se cargó la proteína del receptor NMDA (4NF4) y la proteína E-DENV (4UTC) en PyMol, para eliminar las moléculas de agua y cofactores con los cuales vienen acompañados las estructuras cristalinas. El sitio activo para glutamato en la subunidad GluN2A se ubicó en una cuadrícula y los residuos flexibles se seleccionaron de acuerdo con aquellos que interactúan con inhibidores o sustratos co-cristalizados a 4.0 Å. El acoplamiento se llevó a cabo en el centro de una malla con dimensiones 24 x 24 x 24 ar, entre la proteína E-DENV y el sitio activo presente en la estructura de PDB. Con la mejor puntuación de acoplamiento bajo el parámetro de afinidad en kcal / mol, se obtuvo un diagrama de interacciones residuales para aquel complejo, utilizando Discovery Studio (Accelrys software Inc.) de las salidas de Vina (archivos pdbqt). Todos los cálculos se realizaron en una CPU con procesador Intel Xeon® dual a 2.6 GHz de origen del sistema Intel, con 16 GB de RAM DDR3.

2.2.3. Acoplamiento molecular proteína -proteína

El software HADDOCK (**H**igh **A**mbiguity **D**riven **P**rotein-protein **D**ocking) webserver en línea <http://haddock.science.uu.nl/services/HADDOCK2.2/> se utilizó para realizar el acoplamiento proteína – proteína, con el fin de predecir y evaluar las interacciones de la glicoproteína de envoltura del virus dengue y la subunidad GluN2A del receptor de NMDA. Este programa clasifica las 200 predicciones más probables sobre la base de la

complementariedad electrostática, la hidrofobicidad, y la geometría de la superficie molecular entre miles de candidatos. Además, emplea un algoritmo de 3 pasos: docking para la minimización de la energía de moléculas rígidas, simulación de alineamiento semiflexible y refinamiento de solvatación (Dominguez, Boelens, & Bonvin, 2003). Los acoplamientos se llevaron a cabo mediante el protocolo denominado it0 de HADDOCK, el cual consiste en evaluar las interacciones proteína-proteína teniendo como base un cuerpo rígido en el cual se intenta alinear puntos en la superficie; este protocolo se encuentra en la interfaz de uso factible de haddock 2.2, pero en él se requiere previamente haber establecido los residuos Ambiguous Interaction Restraints (AIRs), dentro de la definición de estos residuos se distinguen los activos y pasivos. Los residuos activos son aquellos identificados experimentalmente como involucrados en la interacción entre las dos moléculas y los residuos pasivos hace referencia a los residuos vecinos aproximadamente a 4 Å.

2.2.3.1. Selección de los residuos activos y pasivos

Para determinar los residuos activos y pasivos de cada proteína se llevaron a cabo tres metodologías, denominadas ensayos por residuos reportados en la literatura, ensayos por residuos docking proteína ligando y ensayos por restricción de interacciones ambiguas. En la primera se establecieron estos sitios por lo reportado en artículos científicos o en el PDB. La segunda consistió en tomar como residuos activos aquellos residuos que interactuaron con el glutamato, obtenidos por los ensayos de docking proteína-ligando para la subunidad del receptor glutamato con el programa Autodock-vina y en la tercera se tomaron como residuos activos para cada proteína los obtenidos en la interfaz de CPORT de Haddock, el cual hace uso de la restricción de las interacciones ambiguas y establece con ello los residuos activos y pasivos de las moléculas a evaluar. Los residuos pasivos se generaron automáticamente por la interfaz CPORT de Haddock para cada uno de las metodologías. Cada simulación de acoplamiento duró 5 días y los archivos generados en estructura tridimensional se visualizaron mediante la interfaz de Discovery Studio Client (Biovia, San Diego CA, USA). Finalmente, a través de servidor PIC: Protein Interactions Calculator, el cual se encuentra en línea <http://pic.mbu.iisc.ernet.in/job.html>, se calculó el perfil de interacciones entre las dos proteínas del complejo simulado.

Tabla 1. Residuos activos para la proteína E del virus DENV y de la subunidad GluN2A-NMDA. Se exponen tres diferentes metodologías según la fuente de referencia.

	Proteína E del virus DENV Cadena A	Subunidad GluN2A – NMDA Cadena B
Metodología	Residuos Activos	Residuos Activos
Residuos Reportados en literatura	67 y 153	114, 116, 121,173, 174
Residuos Docking proteína - Ligando	67 y 153	16,88,114,115,116,121,172,173, 174,175,214,215,245
CPORT	11,2,13,15,20,71,72,73,74,76, 77,78,79,98,96,98,99,101,102,	40,42,45,47,48,50,51,52,53,54, 55,56,85,94,102,133,141,142,

103,104,106,107,108,109, 110,244,245,246,247,299, 301,334,337,350,351,370, 373,392,393,394.	143,146,147,150,151,153,201, 220,221,222,223,224,225,227, 228,229,230,232,233,234,235, 236,237,238,239,274,276,277, 278,279,280,281,282,2843,284, 285,286.
--	---

2.2.4. Simulación de Dinámica Molecular

Las simulaciones de dinámica molecular se ejecutaron en Gromacs (5.0.5) (Pronk et al., 2013; Van Der Spoel et al., 2005) en un servidor Ubuntu 14.04. Para ello se empleó la mejor postura de acoplamiento proteína-proteína como entrada para la simulación dinámica del complejo y proteínas solas, respectivamente. Posteriormente, las topologías de ambas proteínas (Proteína E DENV – Subunidad GluN2A) se generaron en Gromacs, utilizando los campos de fuerza Amber 99SB (Hornak et al., 2006), implementando el modelo de agua TIP3P. La disolución se realizó en una caja triclínica utilizando una distancia de margen de 1,0 nm. La adición de NaCl 0,10 M a los complejos y las proteínas se llevó a cabo reemplazando aleatoriamente las moléculas de agua hasta lograr la neutralidad. Los sistemas fueron minimizados en energía durante 2000 pasos, utilizando el método de descenso más pronunciado. El equilibrio de NVT a 310 K durante 100 ps, seguido de un equilibrio de NPT durante 1000 ps usando el método de Parrinello-Rahman a 1 bar como referencia, se realizó en los sistemas usando restricciones de posición. Finalmente, se liberaron las restricciones de posición del soluto y se realizó una ejecución de producción de 100 ns. La temperatura y la presión se mantuvieron constantes a 310 K y 1 bar, respectivamente. Las coordenadas se registraron en un paso de tiempo de 1 fs. Las fuerzas electrostáticas se calcularon usando el método Ewald (PME) de malla de partículas. Las condiciones de los límites periódicos se utilizaron en todas las simulaciones y las longitudes de los enlaces covalentes se vieron limitadas por el algoritmo LINCS.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSION

La glicoproteína E del virus del dengue es una proteína de superficie y se ha reportado como la principal proteína encargada de la entrada del virus a las células huésped. A estas proteínas de superficie se les atribuye distintos determinantes antigénicos que provocan la neutralización de los anticuerpos celulares (Heinz y Allison, 2000). La estructura de esta proteína se encuentra disponible en las bases de datos y ha sido determinado por cristalografía de rayos X. Sin embargo, la información de las interacciones moleculares de las proteínas de la envoltura viral con la unión del receptor y de fusión de membrana escasa. Los pocos estudios que se han realizado para encontrar las posibles interacciones intermoleculares de la glicoproteína E con receptores celulares se han identificado con el método de acoplamiento proteína-proteína con varios softwares. Haddock es el software más citado en su categoría (Moreira, Fernandes, & Ramos, 2010) y lo que es más importante, uno de los mejores puertos de rendimiento software basado en el concurso CAPRI (Evaluación crítica de la predicción de interacciones). En el presente estudio se empleó el software HADDOCK webserver, el cual adopta un enfoque un tanto único al estar basado principalmente en los datos (Dominguez et al., 2003; Moreira et al., 2010).

2.3.1. Selección de los residuos activos y pasivos para los acoplamientos

Para la metodología de ensayos con residuos teóricos se establecieron como residuos activos para la proteína E del virus dengue la Asn153 y Asn67. Esto se llevó a cabo debido a los recientes reportes que indican que tales aminoácidos se ubican en el dominio I en la región N-terminal, en donde se lleva a cabo la glicosilación de residuos de manosa que consecuentemente facilitan el anclaje a los receptores celulares para ingresar a la célula por endocitosis y causar la infección (Wu et al., 2003). Aquí, cabe resaltar que el sitio Asn153 de glicosilación se conserva entre muchos *Flavivirus* pero que la Asn67 es un aminoácido exclusivo para el dengue (Rey, 2003); una condición que le otorga a los ensayos realizados mayor especificidad. Por otro lado, estas cadenas laterales de oligosacáridos unidos a N-terminal en las proteínas E de los *Flavivirus* se han asociado con morfogénesis viral, infectividad y tropismo (Bressanelli et al., 2004)(Kulkarni y Saurabh, 2004). Los residuos activos por referencia bibliográfica para la subunidad GluN2A del receptor fueron Thr174, Ser173, Arg121, Thr116, Ser114, los cuales fueron seleccionados teniendo en cuenta la estructura cristalina de los heterodímeros del dominio de unión al ligando (LBD) del receptor NMDA GluN1 / GluN2A. Estos residuos hacen parte del sitio activo del ligando natural (glutamato) de la subunidad GuN2A, el cual se encuentra disponible en el PDB (código 4NF4).

Para la segunda metodología denominada ensayos de docking proteína-ligando se encontró que varios de los residuos de la subunidad GluN2A con los cuales interacciona la proteína E-DENV coincidieron con los residuos reportados de la metodología basada en artículos de referencia (tabla 1) con las posiciones 174,173,121,116,114 en donde se obtuvo con ello una mayor confiabilidad sobre la metodología definida y el establecimiento de la malla cuando se implementó el software de Autodock- vina. Por otro lado, con la tercera metodología del cálculo de restricciones ambiguas mediante el software CPORT no se encontraron coincidencias de residuos de la subunidad GluN2A respecto a los reportados por la literatura, sin embargo, cabe resaltar que el algoritmo para interacciones proteína-proteína CPORT implementa búsquedas sistemáticas en una rejilla y su clave está en que emplea los AIRs, es decir datos experimentales y si no es posible obtener información experimental, el acople (docking) es guiado por una selección aleatoria de posibles residuos activos y restringidos por un criterio de centro de masa (CPORT) (Dominguez et al., 2003), mientras que el algoritmo para acoplamiento entre proteína- ligando con el programa Autodock es el campo de fuerza AMBER basado en una ecuación que define la energía potencial del sistema a simular, en donde las fuerzas son derivadas del potencial con respecto a las posiciones relativas de los átomos (Pearlman et al., 1995).

2.3.2. Acoplamiento molecular proteína- proteína, primera metodología

Los acoplamientos de la subunidad GluN2A- NMDA con la proteína viral E del dengue se llevaron a cabo siguiendo las metodologías que se encuentran en la tabla 1.

El primer acoplamiento se llevó a cabo utilizando los residuos activos encontrados por referencia bibliográfica, según la tabla 1 los residuos seleccionados fueron los aminoácidos Asn67 y Asn153 para la proteína E del DENV y para el receptor GluN2A-NMDA los

aminoácidos Thr174, Ser173, Arg121, Thr116, Ser114 (Tabla 1). El archivo de HADDOCK agrupó 63 estructuras en 5 clúster (s), lo que representa el 31.5% del 100%, que corresponde a los 200 modelos considerados para la agrupación. En este caso, se tomó el clúster 1 al presentar la menor energía para el ensamble del complejo de las dos proteínas, correspondiente a un valor de Haddock *score* de -93.7 ± 2.2 Kcal/mol y un *Z-score* de -1.5 (tabla 2); este primer valor corresponde a una función empírica heurística, que se basa en una combinación lineal de varios términos de energía, como la energía electrostática, la energía de Van der Waals, la energía de solvatación y las restricciones de energía, mientras que el *Z-score* hace referencia a la cantidad de desviaciones estándar del promedio, dependiendo del valor anterior Haddock, así, en cuanto más negativo, quiere decir que el complejo es mucho más estable.

2.3.3. Acoplamiento molecular proteína-proteína, segunda y tercera metodología

El acoplamiento con el segundo método consistió en tomar como residuos activos aquellos obtenidos por el docking proteína-ligando (GluN2A y glutamato) con el programa Autodock Vina. Los residuos para la subunidad del receptor GluN2A-NMDA correspondieron a Glu16, His88, Ser114, Leu115, Thr116, Arg121, Gly172, Ser173, Thr174, Glu175, Tyr214, Asp215, Tyr245 y para la proteína E DENV los mismos del acoplamiento anterior, (tabla 1). Para este ensayo, Haddock agrupó 63 estructuras en 5 cluster (s), siendo el cluster 2, el grupo que presentó valores de energía más negativos, respectivamente un valor Haddock *score* -74.7 ± 5.8 Kcal/mol y un *Z-score* de -0.9 (tabla 2). El acoplamiento para la tercera metodología, basado en los residuos obtenidos en la interfaz de CPORT -Haddock (Tabla 1), agrupó 77 estructuras en 10 cluster obteniendo un Z-Haddock de -18.2 ± 9.8 y un *Z-score* -2.0 (tabla 2).

Tabla 2. Valores de Haddock *score* y *Z-score* del acoplamiento entre la glicoproteína E DENV y la Subunidad GluN2A- NMDA con las tres metodologías evaluadas.

Proteína	Cport	Literatura	Docking	z-score	Haddock-score (Kcal/mol)
Proteína E		x		-1.5	-93.7±/2.2
Subunidad GluN2A		x			
Proteína E		x		-0.9	-74.7±/5.8
Subunidad GluN2A			x		
Proteína E	x			-2.0	-18.2±/9.8
Subunidad GluN2A	x				

Al comparar las distintas estrategias o metodologías de acoplamiento indicadas en la tabla 1 se encontró que el mejor acoplamiento molecular para la subunidad GluN2A del receptor NMDA y la proteína E del dengue se presentó con los residuos activos que se seleccionaron o se determinaron por referencia bibliográfica para el caso de las dos proteínas. Este

acoplamiento observado entre este complejo pudo deberse a que los residuos activos de la subunidad GluN2A de la estructura tridimensional que se utilizó en el PBD (4NF4) corresponden a una forma detallada de los modos o sitios de unión al ligando natural (glutamato). Además, estudios previos, en busca de antagonistas sobre estos receptores, han encontrado que los antagonistas se unen a GluN2A principalmente a través de interacciones polares que involucran residuos similares a los que participan en la unión de L-glutamato (Ser114, Thr116, Arg121, Ser173 y Thr174 en la cadena B) y la mayoría de estas interacciones son enlaces de hidrogeno, puentes salinos e interacciones metálicas (Jespersen et al., 2014).

El papel que juega esta subunidad GluN2A es crucial en la conformación estructural de los receptores NMDA, los cuales, principalmente se componen de dos subunidades GluN1 y dos GluN2 (GluN2A-D) (Schorge & Colquhoun, 2003). La subunidad GluN1 es obligatoria para la activación del receptor, mientras que la segunda subunidad forma parte del poro del canal y contiene el importante dominio N-terminal (NTD), que controla el flujo iónico y es vital para la alta permeabilidad al Ca^{2+} ; esta subunidad puede variar por alguno de estos subtipos: GluN2A, GluN2B, GluN2C y GluN2D, pero sus propiedades fisiológicas pueden diferir según la subunidad secundaria (GluNA-D) que acompañe a GluN1 para conformar el receptor. Algunas propiedades tales como: la potencia del agonista, la probabilidad de apertura máxima del canal (P_{abierto}) y la cinética de desactivación (Traynelis et al., 2010). Los receptores que portan la subunidad GluN2A, como es el caso de este estudio, se ha señalado que aquel NTD es responsable de la mayor parte de las propiedades de enlace y ligando; donde la diferencia está dada en cambios residuales entre la subunidad GluN2 (A-D). La mayoría de las dependencias de las propiedades del canal se debe a un sitio denominado GluN2 S / L, donde se da el cambio residual de una serina (s) en GluN2A (S632) o en GluN2B (S633) y una Leucina (L) en GluN2C (L643) o en GluN2D (L657) (Clarke, Glasgow, & Johnson, 2013). Aquellos receptores que porten a GluN2A o GluN2B, como sucede en este estudio, los canales se activaran y desactivaran más rápido, y la potencia del agonista será más fuerte. Por lo tanto, se sugiere que la proteína E del virus del dengue entre en contacto con los receptores que porten estas subunidades, ya que se da una fuerte expresión en la segunda semana postnatal en el cerebro (Flores-Soto et al., 2012), además, de que la unión al agonista es mucho más fuerte, para poder fusionarse y luego entrar a la célula huésped, teniendo en cuenta que los receptores GluN1 / GluN2 pueden controlar la sensibilidad, la potencia del ligando, la conductancia, el tiempo de duración de apertura y cierre del canal. (Hongjie et al., 2009).

Las proteínas E del virus dengue son clave para unirse a los receptores celulares e interactuar con las membranas de las células hospedadoras para la fusión y la posterior entrada a las células, así como para dirigir el ensamblaje viral y la replicación. La proteína E presenta residuos de manosa, en dos sitios de glicosilación, el primer sitio corresponde al aminoácido asparagina (Asn) 153, el cual se conserva entre muchos *Flavivirus* y el segundo sitio a Asn 67 el cual es un aminoácido exclusivo para el dengue (Rey, 2003), los cuales se le podría atribuir su posible mejor acoplamiento con el receptor NMDA .

Una posible explicación biológica a este comportamiento del virus dengue de unirse a los receptores NMDA puede deberse a que los *Flavivirus* aprovechen la apertura de los canales

de calcio. Doñate-Macián y colaboradores demostraron que los canales catiónicos de potencial del receptor transitorio (TRP) responden a la infección viral, en especial el canal catiónico vanilloide 4 (TRPV4) no selectivo permeable al calcio que se une a la helicasa DDX3X; uno de los tipos de proteínas celulares que son "secuestradas" por los virus para replicarse en el interior celular y producir la infección, de manera que el canal TRPV4 al detectar la presencia de proteínas virales permite la entrada de calcio en la célula y el movimiento de DDX3X en el núcleo celular (Donate-Macian et al., 2018).

Los canales de tipo NMDA se activan por parte del glutamato o de sus agonistas como la glicina, quienes al unirse al receptor producen un incremento en la entrada de Ca^{++} y Na^+ así como la salida de K^+ a nivel intracelular (Chen *et al.*, 2005; (Nakamichi, Takarada, & Yoneda, 2009). El aumento exacerbado del calcio puede producir la muerte neuronal a través del fenómeno conocido como "excitotoxicidad" (Williams et al., 2000).

Las manifestaciones neurológicas observadas durante el DENV podrían asociarse a los receptores de glutamato tipo NMDA. Hoffmann y colaboradores en un estudio identificaron que la bomba de calcio SPCA1 que se ubica en la región trans-Golgi es requerida por los virus de las familias Paramyxodae, Flaviviridae y Togaviridae para promover la propagación del virus, de manera que las proteasas como la furina dependientes de calcio son críticas para la maduración de las glicoproteínas virales (Hoffmann et al., 2017). De acuerdo con estos hallazgos, se sugiere que los virus emplean este tipo de canales iónicos como vía de señalización necesaria para la infección viral porque requieren el calcio para salir como para mediar su entrada a la célula hospedera.

Como los virus no pueden replicarse por sí solos, depende del hospedero y de algunas de sus proteínas para su propagación, el virus del dengue a través de la proteína E podría anclarse al sitio activo de unión a glutamato de los receptores NMDA para fusionarse y consecuentemente abrir el canal del flujo de calcio; situación que podría llegar a modificar señales eléctricas en las células y desencadenar un exceso de calcio libre intracelular provocando la muerte neuronal, siendo este un posible mecanismo de neuroinfección (Doble, 1999; Medina & Escobar, 2004).

En este trabajo con base en el mejor acoplamiento se determinaron los diferentes enlaces que ayudan a la estabilidad del complejo de unión entre la subunidad GluN2A-NMDA y a proteína E del DENV. Estos enlaces fueron determinados por el servidor en línea PIC (Protein Interactions Calculator), bajo este análisis de interacción en la interfaz del complejo Proteína E DENV – GluN2A NMDA, se encontraron favorecidos veinte enlaces de hidrógeno (ver Tabla 3), cuyos residuos involucrados en la proteína E DENV son ASN67, ARG89, LYS118, LYS91, GLU119, ARG176, ARG179, ASN180; y para en la subunidad GluN2A NMDA los residuos correspondieron a GLU119, GLU123, ASP87, ASN67, GLU84, THR69. Así mismo se encontraron diez interacciones iónicas presentes en diferentes residuos de ambas proteínas participantes. Los enlaces predominantes en la interacción entre el complejo proteína E DENV – GluN2A NMDA, son enlaces de hidrogeno, seguido de las interacciones iónicas, por lo cual se puede establecer que gracias a los puentes de hidrogeno la estabilidad del complejo se ve reflejado en los resultados de acoplamiento molecular.

Dentro de los pares de residuos encontrados como puntos de interacción de las interfaces, la Asn67 de la proteína E DENV forma dos enlaces de hidrogeno con Glu119 de GluN2A-NMDA. Así mismo, Arg176 de GluN2A está unida mediante cuatro enlaces de hidrogeno con el mismo residuo de la proteína E GLU84; el residuo Lys118-Proteína E forma un enlace con Glu119 y dos con Glu123-GluN2A. Además, este último también forma dos enlaces con la ARG 89–proteína E DENV. Otros de los residuos importantes en la interacción de GluN2A NMDA son Lys91 y Asn180, que forman respectivamente dos enlaces con los residuos Asp87 y Thr69 de la proteína E DENV. Como se puede evidenciar, la mayoría de los residuos que forman este tipo de enlaces son aquellos que en su estructura química (específicamente, la cadena lateral) sirven como donadores o aceptores de hidrógenos. En el caso de la treonina (Thr), el aminoácido tiene un grupo hidroxilo con hibridación sp³ y puede actuar como un donante en un enlace de hidrogeno (EH) y como aceptor en dos enlaces. El Aspartato y el glutamato (Asp y Glu) tienen dos oxígenos carboxílicos los cuales pueden actuar como aceptores de H. La asparagina (Asn) tiene un grupo carbonilo, el cual puede actuar como un aceptor en dos H, mientras que el nitrógeno amida puede donar los dos hidrógenos para formar (EH) y la Lysina (Lys) puede donar tres protones en EH (Ippolito et al., 1990).

Shah y colaboradores (2013) estudiaron las diferentes interacciones intermoleculares de la proteína E- DENV con el receptor DC-SIGN, uno de los receptores diana mejor caracterizados que facilita la unión y entrada del virus a las células. DC-SIGN es una lectina tipo C y muestra una alta afinidad por los carbohidratos complejos con alto contenido en manosa (Mitchell, Fadden, & Drickamer, 2001). Esta lectina tetramérica (DC-SIGN) puede interactuar con más de un azúcar ayudando al mismo tiempo a la internalización eficiente del virus dengue, porque la proteína E DENV al poseer cadenas de azúcar hace mucho más fácil su anclaje y penetración (Miller et al., 2008). Dentro de los enlaces que ayudan a la estabilidad de la interacción DENV-E-DC-SIGN, se destacan los enlaces hidrógeno formados entre la lisina 247 y ASN67 de DENV-E con GLU 347, ASN 349 y ASP 366 de DC-SIGN. La ARG 345 de DC-SIGN está unida mediante cinco enlaces de hidrógeno diferentes a THR 70, ARG 73, CYS 74, GLN 77, GLY 104 y CYS 105 de DENV-E, además, de seis puentes salinos presentes en diferentes residuos de ambas moléculas de proteínas participantes y de esta manera se logra establecer la estabilidad del complejo. El residuo clave en este estudio como en el nuestro es la participación e interacción de la ASN 67 porque se ha reportado como un sitio de glicosilación exclusivo para el dengue (Rey, 2003), los demás residuos que median en la interacción cambian según convenga dependiendo de la estructura del receptor (Shah *et al.*, 2013).

Tabla 3. Residuos involucrados en la formación de puentes de Hidrogeno en el complejo Proteína E DENV – GluN2A NMDA.

Complejo Proteína - Receptor	Residuos de la interfaz
Proteína E dengue	ASN67,71, THR69, GLU84, ASP87,ARG89, LYS118, ASN153.
Subunidad GluN2A - NMDA	LYS91, 114, 116, GLU119,120, 121, GLU123, 173, 174, ARG176, ARG179, ASN180.

***Los residuos involucrados en la formación de puentes de H están en negrita, mientras que los residuos que están en negrita y cursiva están involucrados en interacciones iónicas.**

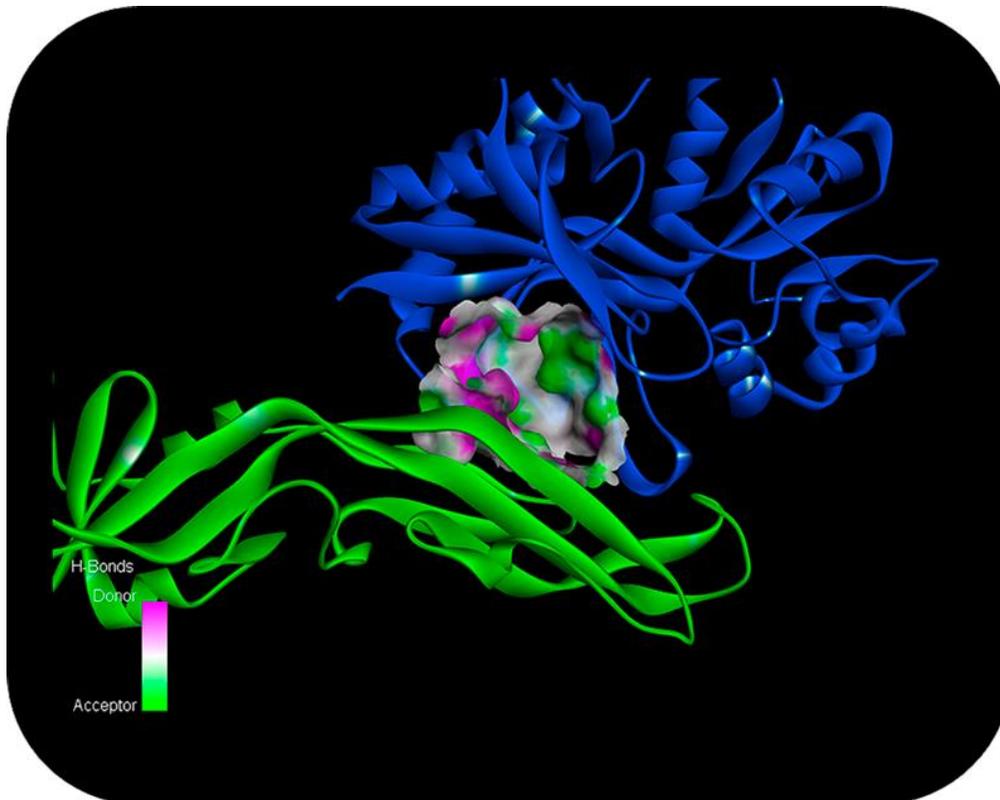


Figura 2. Complejo con la pose con mayor afinidad entre la proteína E virus dengue DENV (verde) y la subunidad GluN2A del receptor NMDA (Azul) con datos experimentales. Interacción 3D proteína – proteína y densidad de Aceptores/Donadores de protones (escala de colores verde a fucsia, respectivamente). Visualización realizada- BIOVIA Discovery Studio.

2.3.4. Simulación de dinámica molecular

Para evaluar la estabilidad estructural del complejo Proteína E DENV y Subunidad GluN2A se observaron las trayectorias en la interacción a lo largo del tiempo (100 ns). Para ello, se calculó la desviación de la media cuadrada de la raíz (RMSD) de las posiciones relativas ponderadas de tales trayectorias. Se propuso realizar una visualización general del comportamiento del mejor acoplamiento del complejo glicoproteína E DENV y la subunidad GluN2A-NMDA a lo largo de un determinado tiempo de simulación como una aproximación al estudio de los sistemas reales. Así, en primera instancia, se evaluó el cambio de la estructura de la subunidad GluN2A-NMDA en el tiempo cuando hace contacto con la proteína E DENV con respecto a la proteína original; estos resultados están dados bajo el término de RMSD en nm.

En la figura 3 se observan las fluctuaciones dentro de los 0.3 nm, cuando la subunidad GluN2A – NMDA está sola mientras que cuando la proteína está en contacto con la proteína E DENV, se observan altas fluctuaciones a los 10, 40 y 80 ns, lo que hace que la estructura del receptor tenga fluctuaciones. Seguido a cada fluctuación, hay una estabilización similar a aquella ocurrida cuando la simulación se hace solo con el receptor. De acuerdo a lo anterior, estas fluctuaciones se pueden explicar por los hallazgos obtenidos en condiciones experimentales sobre la adhesión y entrada del virus a la célula la cual es impulsada por los cambios conformacionales en la proteína E inducidos por la exposición a un pH bajo; uno de los cambios estructurales iniciales es un movimiento alrededor de una región tipo bisagra que separa los dominios I y II, lo cual expone el péptido de fusión interno (De Paula, Lima, de Oliveira Franca, Gomes-Ruiz, & da Fonseca, 2008). Los cambios conformacionales que se deben a la unión virus-receptor y al pH ácido en el endosoma inducen la exposición del péptido de fusión, permitiendo la fusión de la membrana del endosoma con la envoltura del virus.

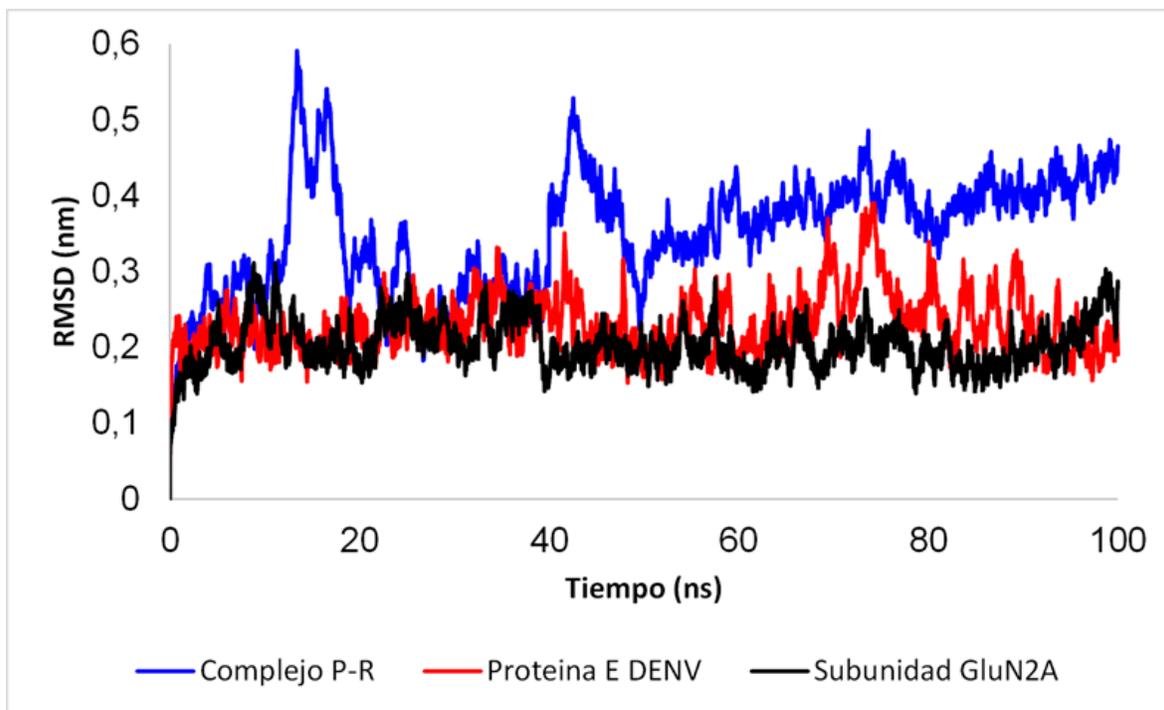


Figura 3. Desviaciones cuadradas medias (RMSD) a lo largo de las trayectorias para el complejo de la proteína E DENV y la subunidad GluN2A – NMDA,) que realiza el ajuste en el ligando con respecto al tiempo durante 100 ns.

La interacción proteína - proteína se analizó también mediante la desviación cuadrada media de las cadenas laterales de los aminoácidos. En la Figura 3 se muestran algunas fluctuaciones leves en las cadenas laterales de los aminoácidos, las cuales reflejan una interacción interrumpida entre el complejo de la proteína E DENV y la subunidad GluN2A- NMDA, mientras que se observan otras regiones altamente fluctuantes, que pueden indicar que son regiones flexibles en este complejo.

Los aminoácidos de la proteína E DENV tales como 353, 154, 108 y 16 tienen mayores fluctuaciones cuando la proteína se encuentra sola, estas fluctuaciones pueden atribuirse a su naturaleza (Rey, 2003). Se ha reportado que la proteína E DENV es lo suficientemente diferente de la del virus TBE y se presume que estas diferencias se deben a que los diferentes dominios adoptan ángulos de rotación diferentes entre sí, lo que revela una flexibilidad que se cree que es necesaria y específica para la función de la proteína E del DENV (Rey, 2003). Por otro lado, en cuanto a los aminoácidos que presentan altas fluctuaciones de la subunidad GluN2A se destacan el 257, 145, 94, 72 y 47; residuos que pueden participar como flexibles para exponer el sitio activo y poder interactuar con la proteína E DENV. Lo anterior es relevante si se tiene en cuenta que el esclarecimiento de posibles sitios de unión del receptor celular es importante para comprender el tropismo celular del virus del dengue.

Existe homología entre las proteínas E flavivirales, donde pueden compartir motivos de unión a receptores, principalmente aquellos *Flavivirus* transmitidos por mosquitos, los cuales contienen una secuencia RGD, es decir un tripéptido Arg-Gly-Asp que ayuda a la unión celular, respectivamente en los residuos 388 a 390, y además se han asociado con la virulencia (Lobigs et al., 1990). Precisamente en este análisis, estos residuos presentaron fluctuaciones altas de todo el complejo. Por otro lado, se han identificado posibles motivos de unión a glicosaminoglicanos en la proteína del virus del dengue E, uno de ellos parece estar compuesto por los aminoácidos 188, 284 a 295, y 305 a 310 y que también pueden desempeñar un papel en la unión virus – célula (Chen et al., 1997).

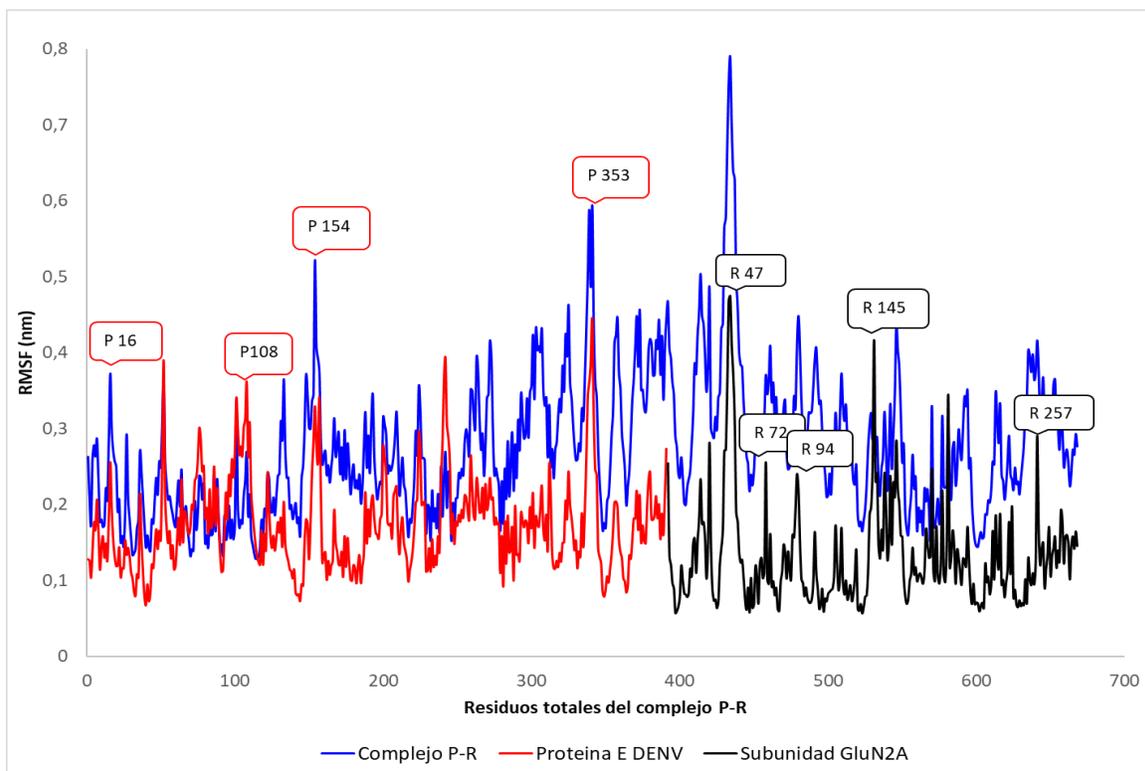


Figura 4. Fluctuación cuadrática media (RMSF) a lo largo de las trayectorias para la proteína E DENV y la subunidad GluN2A, en el complejo proteína E DENV y la subunidad GluN2A – NMDA) haciendo el ajuste en el ligando con respecto al tiempo durante 100 ns.

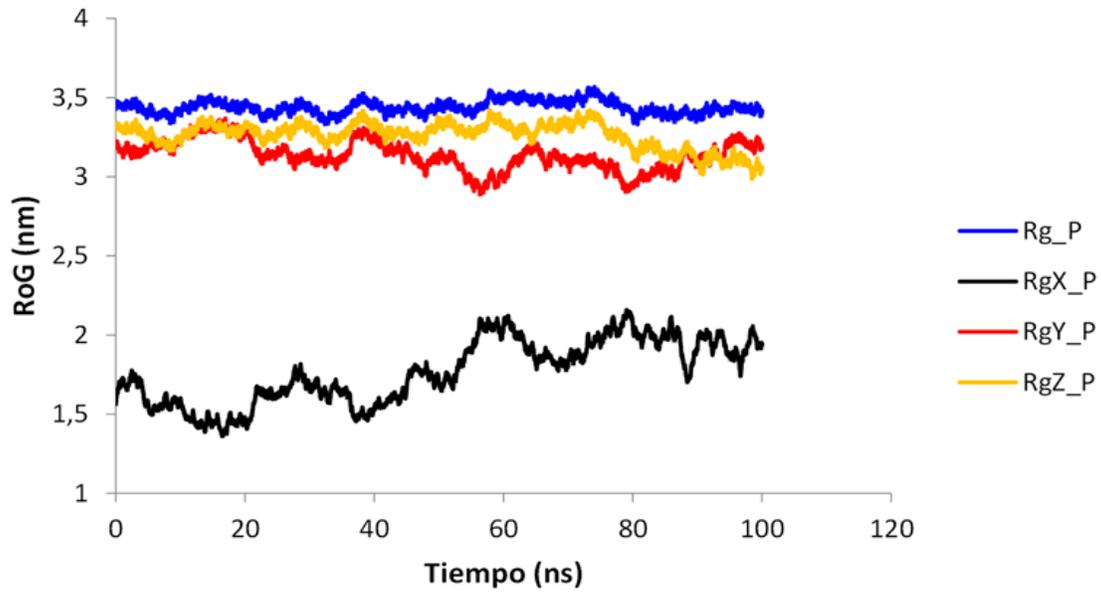


Figura 5. Radio de rotación (ROG) a lo largo de las trayectorias para la proteína E DENV que realiza el ajuste en la proteína con respecto al tiempo durante 100 ns.

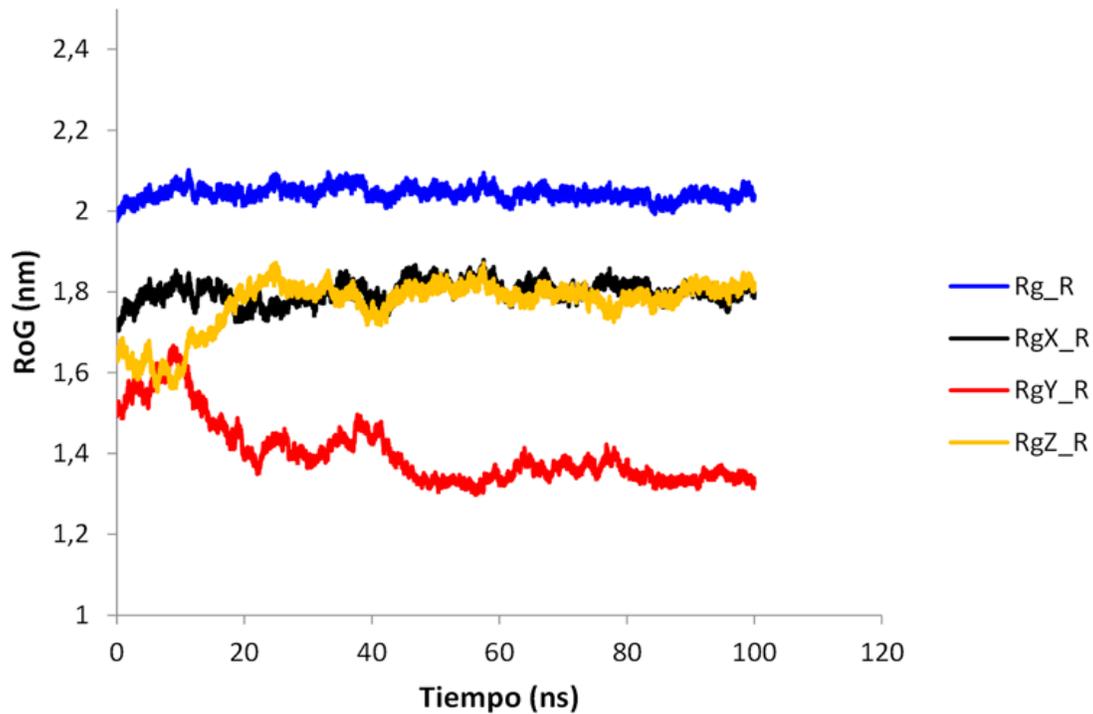


Figura 6. Radio de rotación (ROG) a lo largo de las trayectorias para la Subunidad GluN2A-NMDA que realiza el ajuste en la proteína con respecto al tiempo durante 100 ns.

Finalmente, se hizo el cálculo del radio de rotación para describir teóricamente la estructura del complejo, mediante el cálculo de la media cuadrática de las partículas del sistema con respecto a su centro de masas o un determinado eje (Lobanov et al., 2008). De acuerdo con los análisis, se observa cómo el radio de las proteínas cambia con el tiempo teniendo en cuenta el movimiento parametrizado en los ejes. En la Figura 6, es posible apreciar que el movimiento de la subunidad GluN2A fluctúa principalmente en el eje Y hasta alcanzar una estabilidad de 2 nm, mientras que para el caso de la proteína E del dengue (Figura 5) fluctúa en el eje X hasta alcanzar una estabilidad a los 3,5 nm. Este comportamiento se puede deber a la misma naturaleza de la proteína E para poder entrar en contacto con la subunidad GluN2A y estabilizar el complejo.

Una posible explicación de la estabilización de la subunidad GluN2A a lo largo de los otros ejes cuando está en presencia de la proteína E, es el bolsillo que se encuentra en una región que se ha propuesto previamente como una posible "bisagra" entre el dominio II en forma de dedo extendido y el dominio central I. En esta región se llevan a cabo mutaciones que afectan la virulencia y alteran el pH para que se produzca el cambio conformacional necesario para desencadenar la adhesión y posterior entrada celular (Rey, Heinz, Mandl, Kunz, & Harrison, 1995).

2.4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran que los residuos que proporcionaron una mejor interacción intermolecular entre el complejo de la proteína E del dengue y la subunidad GluN2A-NMDA fueron aquellos residuos activos obtenidos como los sitios de unión al glutamato previamente reportados en la literatura con valores de Haddock *score* de -93.7 ± 2.2 Kcal/mol y un *Z-score* de -1.5 , donde es posible considerar que la estabilidad del complejo pueda deberse a los enlaces de hidrogeno e interacciones iónicas. Adicionalmente, está mejor interacción intermolecular permite observar trayectorias que tienden a la estabilidad del complejo en el tiempo seguido a cada fluctuación tal y como se evidenció en los ensayos de dinámica molecular. Por otro lado, se indica que el sitio activo del glutamato ubicado en la subunidad GluN2A-NMDA por tener los mejores valores de acoplamiento molecular podría actuar como un sitio diana de anclaje para la proteína E del dengue y causar infección, de tal manera que estudios experimentales sobre neuropatogénesis del dengue, deberían intentar probar este hallazgo al ser dicha subunidad un posible blanco terapéutico.

2.5. BIBLIOGRAFIA

1. Aoki, C., Hidari, K. I., Itonori, S., Yamada, A., Takahashi, N., Kasama, T., . . . Suzuki, Y. (2006). Identification and characterization of carbohydrate molecules in mammalian cells recognized by dengue virus type 2. *J Biochem*, *139*(3), 607-614. doi:10.1093/jb/mvj067
2. Araujo, F. M., Araujo, M. S., Nogueira, R. M., Brillhante, R. S., Oliveira, D. N., Rocha, M. F., . . . Sidrim, J. J. (2012). Central nervous system involvement in dengue: a study in fatal cases from a dengue endemic area. *Neurology*, *78*(10), 736-742. doi:10.1212/WNL.0b013e31824b94e9

3. Bartenschlager, R., & Miller, S. (2008). Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol*, 3(2), 155-165. doi:10.2217/17460913.3.2.155
4. Bonilla, E., Ryder, E., & Ryder, S. (1980). GABA metabolism in Venezuelan equine encephalomyelitis virus infection. *Neurochem Res*, 5(2), 209-215. doi:10.1007/bf00964333
5. Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S. L., Stura, E. A., Duquerroy, S., Lescar, J., . . . Rey, F. A. (2004). Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J*, 23(4), 728-738. doi:10.1038/sj.emboj.7600064
6. Castellanos, J., Bello, J., & Velandia-Romero, M. (2014). Manifestaciones neurológicas durante la infección por el virus del dengue. *Infectio*, 18(4), 167-176. doi:10.1016/j.infect.2014.02.006
7. Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., & Marks, R. M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med*, 3(8), 866-871. doi:10.1038/nm0897-866
8. Clarke, R. J., Glasgow, N. G., & Johnson, J. W. (2013). Mechanistic and structural determinants of NMDA receptor voltage-dependent gating and slow Mg²⁺ unblock. *J Neurosci*, 33(9), 4140-4150. doi:10.1523/JNEUROSCI.3712-12.2013
9. De Paula, S. O., Lima, D. M., de Oliveira Franca, R. F., Gomes-Ruiz, A. C., & da Fonseca, B. A. (2008). A DNA vaccine candidate expressing dengue-3 virus prM and E proteins elicits neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. *Arch Virol*, 153(12), 2215-2223. doi:10.1007/s00705-008-0250-3
10. Doble, A. (1999). The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther*, 81(3), 163-221. doi:10.1016/s0163-7258(98)00042-4
11. Domingues, R. B., Kuster, G. W., Onuki-Castro, F. L., Souza, V. A., Levi, J. E., & Pannuti, C. S. (2008). Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci*, 267(1-2), 36-40. doi:10.1016/j.jns.2007.09.040
12. Dominguez, C., Boelens, R., & Bonvin, A. M. (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc*, 125(7), 1731-1737. doi:10.1021/ja026939x
13. Donate-Macian, P., Jungfleisch, J., Perez-Vilaro, G., Rubio-Moscardo, F., Peralvarez-Marin, A., Diez, J., & Valverde, M. A. (2018). The TRPV4 channel links calcium influx to DDX3X activity and viral infectivity. *Nat Commun*, 9(1), 2307. doi:10.1038/s41467-018-04776-7
14. Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., & Beas-Zarate, C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurologia*, 27(5), 301-310. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.10.014>
15. Fu, Z. F., & Jackson, A. C. (2005). Neuronal dysfunction and death in rabies virus infection. *J Neurovirol*, 11(1), 101-106. doi:10.1080/13550280590900445
16. Gropman, A. L., Summar, M., & Leonard, J. V. (2007). Neurological implications of urea cycle disorders. *J Inherit Metab Dis*, 30(6), 865-879. doi:10.1007/s10545-007-0709-5
17. Hoffmann, H. H., Schneider, W. M., Blomen, V. A., Scull, M. A., Hovnanian, A., Brummelkamp, T. R., & Rice, C. M. (2017). Diverse Viruses Require the Calcium

- Transporter SPCA1 for Maturation and Spread. *Cell Host Microbe*, 22(4), 460-470 e465. doi:10.1016/j.chom.2017.09.002
18. Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., & Simmerling, C. (2006). Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins*, 65(3), 712-725. doi:10.1002/prot.21123
 19. Hoving, J. C., Wilson, G. J., & Brown, G. D. (2014). Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell Microbiol*, 16(2), 185-194. doi:10.1111/cmi.12249
 20. Jespersen, A., Tajima, N., Fernandez-Cuervo, G., Garnier-Amblard, Ethel C., & Furukawa, H. (2014). Structural Insights into Competitive Antagonism in NMDA Receptors. *Neuron*, 81(2), 366-378. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.11.033>
 21. Kulkarni, M., & Kumar, S. (2011). Involvement of the central nervous system in dengue fever and its outcome.
 22. Lindenbach, B., & Rice, C. Flaviviridae: the viruses and their replication. Fields Virology. Edited by: Knipe DM, Howley PM. 2001. In: Philadelphia: Lippincott: Williams and Wilkins.
 23. Lobigs, M., Usha, R., Nestorowicz, A., Marshall, I. D., Weir, R. C., & Dalgarno, L. (1990). Host cell selection of Murray Valley encephalitis virus variants altered at an RGD sequence in the envelope protein and in mouse virulence. *Virology*, 176(2), 587-595. doi:10.1016/0042-6822(90)90029-q
 24. Medina, A., & Escobar, M. I. J. R. C. d. P. (2004). Plasticidad Neural y su relación con el sistema de transportadores de Glutámato. 33(1), 155S-164S.
 25. Miras, R. L. J. R. d. n. (2005). Receptores metabotrópicos de glutamato: nuevas dianas moleculares en la terapia de enfermedades neurológicas y psiquiátricas. 40(1), 43-53.
 26. Mitchell, D. A., Fadden, A. J., & Drickamer, K. (2001). A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem*, 276(31), 28939-28945. doi:10.1074/jbc.M104565200
 27. Moreira, I. S., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2010). Protein-protein docking dealing with the unknown. *J Comput Chem*, 31(2), 317-342. doi:10.1002/jcc.21276
 28. Nakamichi, N., Takarada, T., & Yoneda, Y. (2009). Neurogenesis mediated by gamma-aminobutyric acid and glutamate signaling. *J Pharmacol Sci*, 110(2), 133-149. doi:10.1254/jphs.08r03cr
 29. Neal, J. W. (2014). Flaviviruses are neurotropic, but how do they invade the CNS? *J Infect*, 69(3), 203-215. doi:10.1016/j.jinf.2014.05.010
 30. Pearce, B. D., Steffensen, S. C., Paoletti, A. D., Henriksen, S. J., & Buchmeier, M. J. (1996). Persistent dentate granule cell hyperexcitability after neonatal infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Neurosci*, 16(1), 220-228.
 31. Pearlman, D. A., Case, D. A., Caldwell, J. W., Ross, W. S., Cheatham, T. E., DeBolt, S., . . . Kollman, P. (1995). AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Computer Physics Communications*, 91(1), 1-41. doi:[https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00041-D](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00041-D)

32. Pronk, S., Pall, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., . . . Lindahl, E. (2013). GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, 29(7), 845-854. doi:10.1093/bioinformatics/btt055
33. Rengifo, A., Tapiero, C., & Spinel, C. J. I. y. c. (2005). Receptores GABAA (ácido-aminobutírico) y su relación con la dependencia al alcohol. *I*(1), 77-96.
34. Rengifo Castillo, A. C. (2012). Inmunorreactividad de neuronas gabaérgicas y glutamatergicas en la corteza y el cerebelo de ratones infectados con rabia. Universidad Nacional de Colombia.
35. 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(12), 6899-6901. doi:10.1073/pnas.1332695100
36. Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., & Harrison, S. C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, 375(6529), 291-298. doi:10.1038/375291a0
37. Schmaljohn, A. L., & McClain, D. (1996). Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae). In th & S. Baron (Eds.), *Medical Microbiology*. Galveston (TX).
38. Schorge, S., & Colquhoun, D. (2003). Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci*, 23(4), 1151-1158.
39. Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., & Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*, 62(3), 405-496. doi:10.1124/pr.109.002451
40. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem*, 26(16), 1701-1718. doi:10.1002/jcc.20291
41. Velandia-Romero, M. L., Acosta-Losada, O., & Castellanos, J. E. (2012). In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus. *J Neurovirol*, 18(5), 374-387. doi:10.1007/s13365-012-0117-y
42. Williams, A. J., Dave, J. R., Phillips, J. B., Lin, Y., McCabe, R. T., & Tortella, F. C. (2000). Neuroprotective efficacy and therapeutic window of the high-affinity N-methyl-D-aspartate antagonist conantokin-G: in vitro (primary cerebellar neurons) and in vivo (rat model of transient focal brain ischemia) studies. *J Pharmacol Exp Ther*, 294(1), 378-386.
43. Yauch, L. E., & Shresta, S. (2008). Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Res*, 80(2), 87-93. doi:10.1016/j.antiviral.2008.06.010
44. Yun, J., Gaivin, R. J., McCune, D. F., Boongird, A., Papay, R. S., Ying, Z., . . . Perez, D. M. (2003). Gene expression profile of neurodegeneration induced by alpha1B-adrenergic receptor overactivity: NMDA/GABAA dysregulation and apoptosis. *Brain*, 126(Pt 12), 2667-2681. doi:10.1093/brain/awg277
45. Rengifo, A.C. (2012). Inmunorreactividad de neuronas gabaérgicas y Glutamatergicas en la corteza y el cerebelo de ratones infectados con rabia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina. Maestría en Neurociencias.1-151.
46. Che, P; & Tang H Li Q. (2013). The interaction between claudin-1 and dengue viral prM/M protein for its entry. *Virology*. 446(1-2), 303-13.

47. Hidari, K.I; & Suzuki, T. (2011). Receptor del virus del dengue. *Medicina tropical y salud*, 39 (4 supl.), 37–43. doi: 10.2149 / tmh.2011-S03.
48. Rouvinski, Alexander; Guardado-Calvo, Pablo; Barba-Spaeth, Giovanna; Duquerroy, Stéphane Vaney, Marie-Christine; Kikuti, C, M; Navarro Sanchez, M; Dejnirattisai, Wanwisa; Wongwiwat, Wiyada; Haouz, Ahmed; Girard-Blanc, Christine; Petres, Stéphane; Shepard, W, E; Després, Philippe; Arenzana-Seisdedos, Fernando; Dussart, Philippe; Mongkolsapaya, Juthathip; Sreaton, Gavin R; Rey; &...Félix A. (2015). Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses. *Nature*. 520:109–113.
49. Heinz, FX; & Allison SL. (2000). Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Adv Virus Res*.55:231–269.
50. Kulkarni, ML; & Saurabh, Kumar. (2011). Involvement of the central nervous system in dengue fever and its outcome. Department of Paediatrics. *Jagadguru Jayadeva Muragharajendra (JJM) Medical*. Karnataka, India.
51. Wu K.P., Wu C.W., Tsao Y.P., Kuo T.W., Lou Y.C., Lin C.W., Wu S.C., & Cheng J.W. (2003). Structural basis of a Flavivirus recognized by its neutralizing antibody: Solution structure of the domain III of the Japanese Encephalitis virus envelope protein. *J. Biol. Chem*;278:46007–46013. doi: 10.1074/jbc.M307776200.
52. Hongjie, Y; Kasper, B; Hansen, K; Katie, M; &Vance, K. (2009). Control de la función del receptor NMDA por el dominio amino-terminal de la subunidad NR2. *J of Neuroscience*. 29(39): 12045-12058.
53. Ippolito, J. A., Alexander, R. S., & Christianson, D. W. (1990). *Hydrogen bond stereochemistry in protein structure and function*. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 457–471.
54. Miller, J.L; de Wet, B.J; Martinez-Pomares, L; Radcliffe, CM; Dwek, R.A; Rudd, P.M; & Gordon, S. (2008).The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog*. 4: e17.
55. Shah M, Wadood A, Rahman Z, Husnain T (2013) Interaction and Inhibition of Dengue Envelope Glycoprotein with Mammalian Receptor DC-Sign, an In-Silico Approach. *PLOS ONE* 8(3): e59211.
56. Lobanov, M. Y., Bogatyreva, N. S., & Galzitskaya, O. V. (2008). Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. *Molecular Biology*, 42(4), 623–628.
57. Araujo, F. M. C., Araujo, M. S., Nogueira, R. M. R., Brilhante, R. S. N., Oliveira, D. N., Rocha, M. F. G; & Sidrim, J. J. C. (2012). Central nervous system involvement in dengue: A study in fatal cases from a dengue endemic area. *Neurology*, 78(10), 736–742.
58. Perez, A. B., Sierra, B., Garcia, G., Aguirre, E., Babel, N., Alvarez, M; & Guzman, M. G. (2010). Tumor necrosis factor–alpha, transforming growth factor–β1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Human Immunology*, 71(11), 1135

CAPITULO III

Análisis del efecto de la infección por virus dengue neuroadaptado sobre la inmunorreactividad de glutamato y la expresión de la subunidad GluN2A del receptor de NMDA

Analysis of the effect of neuroadapted dengue virus infection on glutamate immunoreactivity and the expression of the GluN2A subunit of the NMDA receptor

RESUMEN

El dengue continúa siendo un problema de salud pública y a pesar del alto impacto en la salud son pocos los estudios dirigidos a esclarecer los mecanismos de su patogénesis, esto se debe entre otros factores a la falta de un modelo animal experimental capaz de imitar la totalidad del espectro completo de la enfermedad como se ha observado en los seres humanos. Una de las alternativas es utilizar como modelo animal lactantes inoculados con cepas adaptadas al cerebro donde se logra imitar parte del espectro de la enfermedad porque al emplear cepas no neuroadaptadas se suelen producir infecciones asintomáticas y esporádicamente enfermedades que conducen a la parálisis y la muerte del ratón. En este trabajo se evaluaron los efectos del virus dengue (DENV) sobre la inmunorreactividad del neurotransmisor glutamato y la expresión del ARNm de la subunidad GluN2A del receptor NMDA en ratones BALB/c lactantes. Para ello se inocularon los ratones mediante dos vías distintas de infección con una cepa de virus DENV IV neuroadaptado y se evaluaron las cortezas motoras y somatosensoriales mediante ensayos inmunohistoquímicos para glutamato y de qRT-PCR para el ARNm de GluN2A-NMDA. En las dos vías de inoculación no se encontraron cambios significativos para la inmunotinción de glutamato, pero se cuantificó subregulación en el ARNm de GluN2A. Este es el primer trabajo en donde se demuestra el efecto de una cepa de DENV en la inmunorreactividad de glutamato y en la expresión del receptor NMDA, lo cual contribuye al esclarecimiento del papel del sistema glutamatérgico en la neuropatogénesis de esta enfermedad.

Palabras clave: glutamato, GluN2A, modelo, neuroadaptado, qRT-PCR.

ABSTRACT

Dengue remains a public health problem and despite the high impact on health there are few studies aimed to clarify the mechanisms in this pathogenesis. This is due among other factors to the lack of an experimental animal model capable of mimicking the totality of full spectrum of the disease as observed in humans. One of the alternatives is the use of suckling mice inoculated with strains adapted to the brain where it is possible to mimic part of the spectrum of the disease because when using non-neuroadapted strains asymptomatic infections are produced and sporadically diseases that lead to paralysis and mouse death. In this work, the effects of dengue virus (DENV) on the immunoreactivity of the neurotransmitter glutamate and the expression of the mRNA of the GluN2A subunit of the NMDA receptor in suckling BALB/c mice were evaluated. To do this, the mice were inoculated by two different pathways of infection with a neuroadapted DENV IV virus strain and motor and somatosensory cortices were evaluated by immunohistochemical tests for glutamate and qRT-PCR for the GluN2A-NMDA mRNA. In the two inoculation pathways,

no significant changes were found for glutamate immunostaining but subregulation was quantified in the GluN2A mRNA. This is the first work where the effect of a strain of DENV on glutamate immunoreactivity and the expression of the NMDA receptor is demonstrated, which contributes to the clarification of the role of the glutamatergic system in the neuropathogenesis of this disease.

Keywords: expression, glutamate, GluN2A, neuroadapt, qRT-PCR

3.1. INTRODUCCION

El virus del dengue es un *Flavivirus* que se transmite al hombre por medio de la picadura del mosquito *Aedes aegypti* y produce las formas de la enfermedad conocidas como dengue con y sin signos de alarma y dengue grave, en este última puede presentarse extravasación severa del plasma, sangrado y afectación de múltiples órganos como el corazón, pulmón, riñón, el hígado y el sistema nervioso (OMS, 2010; Rivera, 2018). En algunos estudios se ha reportado que el DENV llega hasta el sistema nervioso central (SNC) y causa alteraciones neurológicas, tales como cefalea severa, vomito en niños, alteraciones en la conciencia, convulsiones, síndrome de Guillain-Barre, mielitis transversa y encefalitis (Araujo *et al.*; 2012; Kulkarni y Saurabh, 2011).

La mayoría de las manifestaciones neurológicas de la infección por el virus del dengue se han conocido por los estudios histopatológicos que se han realizado en pacientes fallecidos por esta infección en donde se considera una fuerte asociación de los serotipos DENV-2 y DENV-3 con estas complicaciones (Miagostovich *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2010) y en un menor grado los serotipos DENV-1 y DENV-4 (Ramos *et al.*, 1998). Peres y colaboradores de 710 casos sospechosos por dengue reclutados en el hospital principal de la ciudad de Goiânia, Brasil, confirmaron 498 casos diagnosticados con dengue y 28 de ellos con manifestaciones neurológicas incluyendo parestesia (3.8%), encefalitis (2%), encefalopatía (1%), convulsiones (0.8%), meningoencefalitis (0.4%) y paresia (0.4%), siendo el serotipo DENV-3 más predominante en los 28 casos neurológicos y en el total de 498 casos de dengue (Tassara *et al.*, 2017). Es importante seguir con los estudios que ayuden a entender el origen de las complicaciones neurológicas asociadas al DENV teniendo en cuenta que las mismas se están volviendo más comunes en el cuadro clínico de esta infección viral.

La manifestación neurológica más frecuente por dengue es la encefalitis por lo cual debería considerarse como parte del diagnóstico de esta enfermedad especialmente en países endémicos del virus. En un estudio de caso un hombre de 49 años del sur de la India con encefalitis presentó síntomas como fiebre, sensorios alterados y convulsiones, confirmando por diferentes técnicas como PCR el aumento de la concentración de IgM y prueba de antígeno para dengue NS-1 positiva (Madi *et al.*, 2014). Borawake y colaboradores presentaron otro caso de una niña de 17 años de edad con antecedentes de fiebre alta y rigurosidad durante tres días mostrando dos episodios de vómitos, dolor de cabeza generalizado y sensorium alterado que duraron entre 15 a 20 minutos, pocas horas antes del ingreso. Aquí, se realizaron varias pruebas de diagnóstico indirectas y se confirmó fuertemente la posibilidad de encefalitis viral debido al dengue (Borawake *et al.*, 2011). Solomon y colaboradores han sugerido que la encefalitis por dengue debe considerarse en

todos los pacientes que presenten un diagnóstico con sensorium alterado principalmente en lugares endémicos (Solomon *et al.*, 2000).

El neurotropismo del DENV no se ha considerado como una característica propiamente del virus (Ramos *et al.*, 1998). Diferentes estudios reportan la asociación del DENV con las complicaciones neurológicas, sumado al hecho de que su espectro es muy diverso y no se encuentran bien descritas por la falta de interés sobre el papel del virus en el sistema nervioso periférico y central. Velandia y colaboradores desarrollaron un modelo de neuroinfección a partir de un aislado del serotipo DENV-4 adaptado en células de neuroblastoma. Con éste aislado inocularon ratones de diferentes días postnatales por la vía intraperitoneal (IP) demostrando que los ratones entre 2 y 7 días postnatales presentaron parálisis, inestabilidad postural y encefalitis; esta última es una forma típica en que se manifiesta la enfermedad, mientras que los ratones de 14-21 días postnatales sobrevivieron a la infección. Por otra parte, con este modelo de ratones se logró encontrar que las células microgliales, neuronas, oligodendrocitos y células endoteliales se infectaron con el virus además se evidenció pérdida plasmática generalizada y local con daño severo de la barrera hematoencefálica (BBB) (Velandia-Romero *et al.*, 2012). En otro estudio por el mismo grupo se encontró que el DENV-2 indujo un efecto citopático en una línea celular de neuroblastoma caracterizado por un proceso de muerte apoptótica posiblemente asociada a la regulación positiva del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Castellanos *et al.*, 2016).

Los diferentes signos neurológicos en respuesta a la infección del virus dengue en el sistema nervioso central podrían estar asociados con la muerte celular y los cambios neurobioquímicos como sucede en los estados patológicos de enfermedades como la isquemia, hipoxia y la epilepsia, así como en algunas enfermedades neurodegenerativas y del comportamiento como la enfermedad de huntington, parkinson, alzheimer, esquizofrenia y el trastorno obsesivo compulsivo (Yun *et al.*, 2003; Lujan, 2005; Rengifo *et al.*, 2005; Gropman *et al.*, 2007).

Los receptores asociados a los sistemas de neurotransmisión GABA y glutamato también podrían estar implicados en la entrada de *Flavivirus* a la célula (Rengifo *et al.*, 2018, Costa *et al.*, 2017). Estos receptores están involucrados en el metabolismo del calcio; un ión esencial para la acción de proteasas como la furina, una enzima cuyo papel es importante para la maduración del virión (Hoffmann *et al.*, 2017). La disregulación o sobreactivación de estos sistemas de neurotransmisión puede ser generada por la síntesis excesiva del neurotransmisor o por la sobreexpresión de los receptores, entre ellos el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). Esto puede llevar a la apoptosis y a la subregulación de citoquinas tal como se ha reportado con el glutamato (Yun *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta la fecha el tropismo directo del DENV por las neuronas no se ha demostrado en modelos naturales de infección.

Las alteraciones en los receptores de NMDA han sido asociadas a los fenotipos de distintas enfermedades neurodegenerativas, así como en enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia, la depresión, los trastornos de ansiedad y la enfermedad por estrés postraumático (Javitt *et al.*, 2004). Existen varios reportes que sugieren que cada etapa del desarrollo del SNC involucra la expresión y la función temporal y espacial adecuada de los neurotransmisores y de sus respectivos receptores (Lujan *et al.*, 2005).

Para fortalecer las hipótesis encaminadas a probar el papel de los receptores NMDA en la entrada de *Flavivirus* y específicamente del DENV. En este trabajo se evaluó el efecto de la infección por un DENV neuroadaptado - serotipo IV sobre la inmunorreactividad de glutamato y la expresión de la subunidad GluN2A del receptor de NMDA.

3.2. MATERIALES Y METODOS

3.2.1. Manejo de animales

Se utilizaron 40 ratones de 7 días postnatales de la cepa BALB/c y se mantuvieron en el área de seguridad (ABSL-2) del biotério del Instituto Nacional de Salud (INS) bajo condiciones ambientales y nutricionales de acuerdo con las normas éticas exigidas para la investigación con animales de laboratorio en Colombia (ley 86 de 1989 la resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de salud). La manipulación de los animales se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos establecidos por el grupo de trabajo Rengifo y Torres (2007). Estos protocolos fueron previamente avalados por el Comité de Ética del INS como parte del trámite para el sometimiento y aprobación de dos proyectos avalados por el INS y Colciencias (CTIN-015 de 2011, Código Colciencias 210454531601) y CTIN 24 de 2015 contrato de Colciencias 757 de 2013.

Se utilizó una cepa de virus dengue IV neuroadaptado producido y donado por el grupo de Virología de la Universidad el Bosque, Bogotá- Colombia. La cepa que se utilizó se denomina D4MB-6, debido a los pases realizados por cerebros de ratón con un título de 3.6×10^{-6} PFU/ml (Velandia *et al.*, 2012). La experimentación se llevó a cabo mediante dos vías de inoculación, intracerebral (IC) e intraperitoneal (IP). Para ello se emplearon 20 ratones por cada vía de inoculación. Para cada vía se inocularon diez (10) ratones con 1.08×10^5 PFU de virus y diez (10) animales se inocularon con la solución diluyente desprovista de virus. Por cada grupo de 10 animales, 5 fueron empleados para los ensayos de inmunohistoquímica y 5 para ensayos de expresión.

Una vez inoculados los animales, se mantuvieron en observación hasta que presentaron signos de enfermedad tales como parálisis o postración, en este estado los animales fueron sacrificados bajo anestesia por perfusión intracardiaca para los ensayos de inmunohistoquímica (IHQ) o por CO₂ para la evaluación de la expresión de la subunidad GluN2A a través de PCR en tiempo real.

3.2.2. Inmunohistoquímica

3.2.2.1. Procedimiento para obtención de tejido cerebral

La obtención del tejido cerebral se realizó de acuerdo a la metodología previamente estandarizada por el grupo de Morfología Celular (Rengifo y Torres, 2007). Brevemente los ratones que se encontraban en estado avanzado de la enfermedad se anestesiaron con 200 µl de hidrato de cloral al 30% acuoso por vía intraperitoneal (IP). Cinco (5) ratones de cada grupo de trabajo se perfundieron con formaldehído (FA) acuoso al 4% y glutaraldehído (GA) al 0,5% (70 ml durante 10 min). Una vez realizada la perfusión se extrajeron los encéfalos evitando dañar el tejido cerebral. Posteriormente los encéfalos completos se colocaron en una solución fijadora de igual composición a la utilizada en la perfusión y se conservaron así de

6 a 24 horas a 4°C. Finalmente los cerebros se transfirieron a una solución de FA al 4% a 4°C, hasta el momento de realizar los cortes para el estudio inmunohistoquímico del neurotransmisor glutamato.

3.2.2.2. Obtención de los cortes de tejido cerebral y definición del área de estudio

Los cerebros fijados se procesaron en un tiempo máximo de dos semanas después de la perfusión. Con ayuda de una cuchilla se realizó un corte para separar los dos hemisferios y se tomó solo uno para construir el bloque de tejido, aproximadamente 0,5cm de espesor para la corteza motora y somatosensorial en sentido coronal, teniendo en cuenta que ésta es el área seleccionada para el estudio.

La orientación y delimitación anatómica se realizó con ayuda de los atlas de ratón de Paxinos (2001) y de Valverde (1970). En sentido rostro-caudal los límites de la corteza motora serán desde el inicio de la formación de la rodilla del cuerpo calloso hasta la fusión del fórnix dorsal con el tracto tectoespinal (Figura 1).

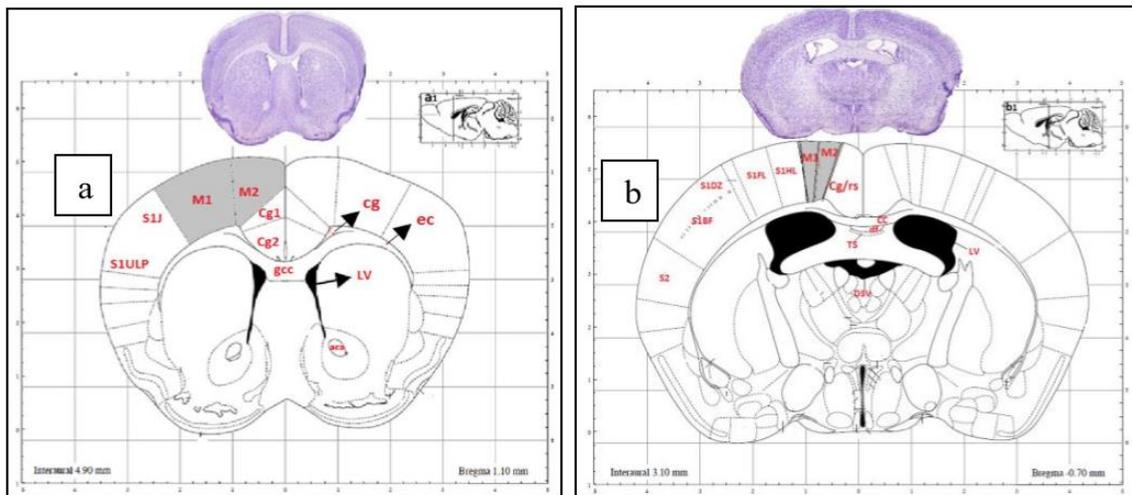


Figura 1. Límite rostral (a) y caudal (b) de la corteza motora del ratón.

Diagrama del área de estudio en plano coronal y orientación rostrocaudal. En color morado (tinción H&E) se ilustran cortes reales equivalentes a los diagramas (a) y (b), los niveles del corte se ilustran en (a1) y (b1). Los diagramas ilustran las diferentes áreas de la corteza cerebral y las zonas en gris delimitan la corteza motora a nivel anterior y posterior (área de estudio), las otras zonas son áreas cercanas a ésta. Abreviaturas: M1, corteza motora primaria; M2, corteza motora secundaria; cg cíngulo; cg1 y cg2, áreas 1 y 2 de la corteza del cíngulo; pc, rodilla del cuerpo calloso; ec, cápsula externa; aca, parte anterior de la comisura anterior; LV, ventrículo lateral; S1J, región de la mandíbula en la corteza somatosensorial; S1ULP, región del labio superior en la corteza somatosensorial. Cg/rs, corteza retrosplenial del cíngulo; S1FL y S1HL región de las extremidades anterior y posterior de la corteza somatosensorial; S1BF, área de barril, corteza somatosensorial primaria, S2, corteza somatosensorial secundaria; df, fornix dorsal; Ts, tracto tectoespinal; CC, cuerpo calloso

Se realizaron cortes de 50 µm en un vibrátomo (Vibratome® 1000 Plus) en plano coronal para la corteza cerebral. Los cortes se dejaron en solución de lavado PBS-azida (tampón de fosfato salino) para evitar contaminación bacteriana y a temperatura ambiente en agitación constante.

3.2.2.3. Protocolo de inmunohistoquímica en flotación

La concentración del anticuerpo primario anti-glutamato se utilizó de acuerdo a la metodología previamente estandarizada por el grupo de Morfología Celular (Rengifo y Torres, 2007). Brevemente los cortes se procesaron en cajas de vidrio (mini-Petri) de 1,25 ml de volumen, bajo las siguientes condiciones: temperatura ambiente, agitación constante y lavados en tampón fosfato salino (PBS) con un pH 7.3 después de cada una de las reacciones. Para la técnica de inmunodetección inicialmente se hicieron tres lavados con PBS, luego los cortes se trataron con cloruro de amonio (NH_4Cl) para el bloqueo de aldehídos y se realizaron incubaciones en peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 3% para la inactivación de la peroxidasa endógena, luego se incubaron en solución de bloqueo (suero normal, albúmina sérica bovina (BSA) y tritón) y por último en el anticuerpo primario anti-Glutamato (Sigma-policonal, Ref: G6642) por separado utilizando la dilución [1:2500]. Posterior a la incubación con el anticuerpo primario se realizaron incubaciones con el anticuerpo secundario biotinilado (Anti-conejo) con dilución [1:400] y con el kit ABC avidina-biotina, finalmente se trataron los cortes con revelador DAB-Ni para observar la marcación específica.

3.2.2.4. Análisis cuantitativo

Cuatro (4) casos por cada vía de inoculación IC e IP (unidades experimentales) mostraron condiciones óptimas para los análisis cuantitativos. En cada unidad experimental se escogieron 4 cortes (repeticiones) para realizar los conteos de células inmunorreactivas a glutamato en la corteza cerebral. Los conteos fueron realizados en las capas de la corteza motora con una malla Netzmier de 1.3 mm^2 adaptada a un microscopio Zeiss. Para delimitar estas capas se utilizó como guía el atlas de Valverde (Valverde, 1970). Estos conteos se realizaron con el objetivo 10X.

3.2.3. Expresión de la subunidad GluN2A-NMDA por RT- PCR

Para la evaluación de la expresión de la subunidad GluN2A-NMDA se utilizaron 20 ratones sacrificados con CO_2 , a continuación, se extrajeron los encéfalos separando las cortezas del hipocampo y el cerebelo, finalmente se almacenaron en ARN later por 3 días a temperatura ambiente y luego a -70°C retirando el ARN later hasta su procesamiento en los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para subunidad GluN2A del receptor NMDA.

3.2.3.1. Extracción del ARN de las cortezas cerebrales

La extracción del ARN de las muestras de corteza cerebral se llevó a cabo con el kit RNeasy®. Siguiendo el protocolo del fabricante. Se homogenizó <50 mg de tejido (corteza) en 700 μl de Trizol a temperatura ambiente durante 5 minutos. A partir de este se agregaron 200 μl de cloroformo agitando por 15s y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min, posteriormente se centrifugó a 12.000g por 15 min a 4°C . Luego se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo evitando tocar la interfase.

A continuación, se añadieron 400 μl de etanol al 70% y se agitó en vortex, de esta muestra se transfirió 700 μl a una columna de 2ml del mini Kit RNeasy y se centrifugó a 8000g por

15s, descartando el flujo del tubo colector. En la columna se realizó la digestión del DNA con “RNase-Free DNase Set”, posteriormente se agregaron 700 µl de tampón RW1 a la columna y se centrifugó durante 15s a 8000g descartando lo del tubo recolector. Se agregaron 500 µl de tampón RPE a la columna centrifugando por 15s a 8000g descartando el tubo colector. Para secar más la membrana, se colocó la columna en un tubo nuevo de 2 ml y se centrifugó a 15.000 rpm por 1 min. Posteriormente, se colocó la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml y se eluyó el ARN con 30–50 µl de agua libre de RNasa centrifugando durante 1 minuto a 8000g.

3.2.3.2. Cuantificación de ARN

Después de extraer el ARN de las muestras se cuantificó el ARN en el equipo Nano Drop, para ello, se procedió a blanquear el equipo con 2 µl de H₂O libre de RNasa y Ácido nucleico. Se procedió a la lectura de cada muestra tomando un volumen de 2 µl. Se registraron los datos arrojados por el equipo dados en [ng/ml] para el ARN y haciendo lecturas en 280 y 230λ para verificar la calidad de la extracción.

3.2.3.3. Determinación de la presencia o ausencia de virus DENV-4 en las muestras de tejido cerebral

Se utilizó la técnica de RT-PCR en tiempo real en un sistema “fourplex” de acuerdo con la metodología descrita previamente (Jhonson, 2005). La transcripción reversa (RT) y PCR se realizaron en un solo paso por medio del sistema SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen). Las condiciones de reacción se relacionan en la tabla 1 y los cebadores y sondas utilizados para las reacciones de amplificación y detección se relacionan en la tabla 3.

Tabla 1. Concentración de los componentes de la master Mix para el ensayo de presencia o ausencia del virus DENV-4, el volumen de la reacción fue de 10 µl. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado.

Componentes	Concentración/muestra
Random Hexamers	1µM
Buffer (MgSO ₄)	3mM
RoXTM	0,083µM
RNaseOutTM (enzimas)	0.05U/µl
dNTPs	0.2 mM
ARN	66.7ng/µl

Tabla 2: Perfil térmico de la síntesis de cDNA y amplificación en un solo paso.

Paso	Tiempo (minutos)	°C
Síntesis de cDNA	15	50
Inactivación de la RTasa	2	95
Denaturación	0.15	95
Anillamiento	0.30	60

Tabla 3. Cebadores de oligonucleotídicos y sondas fluorogénicas utilizadas en el ensayo de RT-PCR en tiempo real para establecer el serotipo DENV.

Serotipo de virus detectado	Secuencia Nucleótidos	Posición en el genoma viral	Fluoróforo
DEN-1 F	CAAAAGGAAGTCGTGCAATA	8973	
DEN-1 C	CTGAGTGAATTCTCTCTACTGAACC	9084	FAM/BHQ-1
DEN-1 Probe	CATGTGGTTGGGAGCACGC	8998	
DEN-2 F	CAGGTTATGGCACTGTCACGAT	1605	
DEN-2 C	CCATCTGCAGCAACACCATCTC	1583	HEX/BHQ-1
DEN-2 Probe	CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA	1008	
DEN-3 F	GGACTGGACACACGCACTCA	740	
DEN-3 C	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT	813	TR/BHQ-2
DEN-3 Probe	ACCTGGATGTTCGGCTGAAGGAGCTTG	762	
DEN-4 F	TTGTCCTAATGATGCTGGTTCG	904	
DEN-4 C	TCCACCTGAGACTCCTTCCA	992	Cy5/BHQ-3
DEN-4 Probe	TTCTACTCTACGCATCGCATCCG	960	

Solo las muestras que fueron positivas para la infección viral fueron incluidas en los ensayos de expresión diferencial.

3.2.4. Evaluación de la expresión diferencial de la subunidad GluN2A en corteza cerebral

Previo a realizar los ensayos de expresión diferencial se estableció la eficiencia de la PCR para la subunidad GluN2A y genes constitutivos β -actina y GAPDH a través de curvas de validación.

3.2.4.1. Evaluación de la eficiencia de la PCR-validación

Se elaboró una curva de validación para el gen de la subunidad GluN2A y para los “House keeping”. La curva estándar fue generada a partir del ARN de las muestras de las cortezas cerebrales previamente cuantificadas. La muestra utilizada tuvo una concentración total de 379,2 ng/ μ l, la curva estándar se estableció mediante 6 diluciones seriadas con factor de 10, donde el primer punto de la curva partió de 100 ng de ARN.

La transcripción reversa (RT) y PCR se realizaron en dos pasos. Para la síntesis de cDNA se empleo el protocolo de transcripción Go-script de promega y se siguió todas las especificaciones indicadas en este kit. La síntesis de cDNA se realizó mediante los reactivos que se detallan en la tabla 4 y el perfil térmico para la síntesis del cDNA se indica en la tabla 5.

Tabla 4. Concentración de los componentes de la master Mix para la síntesis de cDNA, el volumen de la reacción fue de 35 μ l.

Componentes	Concentración/muestra
Random Hexamers	10ng/μl
Buffer	1X
MgCl ₂	2,67mM
RT Go Script (enzimas)	0.03U/μl
dNTPs	1 mM
ARN	66.7ng/μl

Tabla 5: Perfil térmico de la síntesis de cDNA con Random Hexamers y amplificación “dos pasos”.

Paso	Tiempo (minutos)	°C
Anillamiento	5	25
Transcripción reversa	60	37
Inactivación de la RTasa	15	70

Posterior a la síntesis del cDNA se llevó a cabo la amplificación del gen de interés y de los “house keeping” mediante el sistema de SYBR Green. Las condiciones de reacción para la amplificación de estos genes se describen en la tabla 6.

Tabla 6: Concentración de los componentes de la master Mix para la reacción de amplificación.

Componentes	Concentración/muestra
Buffer	1X
Primer mix*	1μM
cDNA	100ng

* Se prepararon mezclas por separado de primer Forward-Reverse por cada gen evaluado.

Las secuencias de los cebadores utilizados para las reacciones de amplificación y detección se relacionan en la tabla 7.

Tabla 7. Cebadores de oligonucleotídicos utilizados en el ensayo de RT-PCR en tiempo real para la subunidad GluN2A y los genes de referencia (Shayan *et al.*, 2016).

Gen	Cebador	Secuencia de nucleótidos (5'→3')
GluN2A	Reverse	TCAGTGCGGTTTCATCAATAACG
	Forward	ACGTGACAGAACGCGAACTT
GAPDH	Reverse	GGGGTCGTTGATGGCAACA
	Forward	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
β-Actina	Reverse	CCAGTTGGTAACAATGCCATG
	Forward	GGCTGTATTCCCCTCCATCG

3.2.5 Expresión diferencial

De acuerdo con las curvas de validación se determinó que la concentración de ARN a utilizar para cada muestra fue de 5ng por tubo de reacción. Las condiciones de reacción para la evaluación de la expresión diferencial fueron las indicadas en la evaluación de la eficiencia de la PCR.

Tabla 8: Perfil térmico de la síntesis de cDNA y amplificación en “dos pasos”.

Paso	Tiempo (minutos)	°C
Síntesis de cDNA	10	95
Inactivación de la RTasa	0.15	95
Denaturación	0.30	55
Anillamiento	0.35	60

3.3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.3.1. Inmunohistoquímica

3.3.1.1. Ratones inoculados con DENV por dos vías distintas de infección.

En este estudio se emplearon ratones BALB/c, los cuales han sido reportados como modelos claves para ensayos experimentales sobre histopatogénesis por DENV (Paes *et al.*, 2009). Por otro lado, los ratones son fácilmente accesibles y muestran una cercanía al humano en cuanto al genoma y son de gran utilidad para evaluar la respuesta a vacunas y antivirales (Bente y Rico-Hesse, 2006). Velandia-Romero y colaboradores desarrollaron un modelo de infección con una cepa de virus DENV-neuroadaptada denominada DAMB-6 mostrando infección en ratones lactantes (Velandia-Romero *et al.*, 2012).

Los ratones utilizados en este estudio se inocularon con DENV por dos vías distintas de infección, intraperitoneal (IP) e intracerebral (IC). Los animales infectados por la vía IC presentaron postración entre los 7-8 días de postinoculación y los animales infectados por la vía IP mostraron estos signos entre los 9-10 días postinoculación. En los dos tiempos mencionados se llevó a cabo el sacrificio con el fin de aumentar la probabilidad de evidenciar cambios significativos asociados a la infección.

La inoculación por la vía intracerebral (IC) es el método más utilizado en el laboratorio para estudios sobre los efectos de agentes patógenos sobre el encéfalo debido a que en pocos días los ratones desarrollan síntomas de la enfermedad como encefalitis y parálisis; por lo tanto, ésta se utiliza como modelo para evaluar la eficacia de los antivirales y las vacunas contra la neurovirulencia de DENV (Velandia-Romero *et al.*, 2016). Sin embargo, la inoculación por vía intraperitoneal (IP) corresponde a una ruta de entrada más natural del virus y menos traumática porque se evita el daño adicional al tejido cerebral provocado por la acción mecánica de la inyección a través del cráneo (Un J *et al.*, 1999).

3.3.1.2. Inmunorreactividad del glutamato en la corteza motora de ratones infectados con DENV-4

El glutamato se encuentra de manera vesicular y puede tener tres roles, como neurotransmisor, glial y como precursor del GABA (metabólico). Distintos estudios han demostrado que la marcación inmunohistoquímica corresponde principalmente a su papel

como neurotransmisor (Hamori *et al.*, 1990). En el presente trabajo con la técnica de inmunohistoquímica se empleó el anticuerpo contra glutamato que marcan las células piramidales (Carder y Hendry, 1994); se encontró que por las dos vías distintas de inoculación hubo marcación positiva para el glutamato en los somas y núcleos de diferentes capas neuronales a nivel de la corteza motora y somatosensorial (figura 2). Ottersen y colaboradores emplearon marcadores neuronales de GABA y glutamato confirmando la inmunorreactividad de estos neurotransmisores, sugiriéndose que la marcación positiva en el núcleo puede ser reflejo del rol metabólico de los dos aminoácidos o el producto del efecto de la fijación con aldehídos debido a que estos aminoácidos se unen a grupos de $-NH_2$ y las histonas son ricas en estos grupos (Ottersen *et al.*, 1984).

Al realizar los conteos neuronales con el objetivo 10X se observó que el porcentaje de neuronas glutamatérgicas en las capas V y VI tanto en controles como en los infectados por las dos vías de inoculación fue mayor, mientras que la distribución en las otras capas fue uniforme. Por otra parte, el porcentaje por capa de neuronas positivas a glutamato en la corteza motora de ratones control IC (inoculados por vía intracerebral) fue de 29,31% en la capa VI, 38,41% en la capa V, 12,49% en la capa III, 10,96% en la capa II y 8,83% en la capa I. Estos porcentajes se mantuvieron en la mayoría de capas en los infectados presentándose un 27,66% en la capa VI, 38,76% en la V, 12,93% en la capa III, 12,18% en la capa II y 8,46% en la capa I. Los animales infectados mostraron un promedio mayor en el número de neuronas respecto a los controles, por cada 1,3 mm² de corteza (área que cubre las seis capas corticales) se contaron 1169 ± 77 neuronas en los infectados y de 1113 ± 53 neuronas en los controles. Sin embargo, las diferencias no fueron significativas $p > 0.05$ (tabla 9).

Los animales inoculados por la vía intraperitoneal (IP) presentaron una distribución de neuronas glutamatérgicas positivas similar a la observada en los inoculados por la vía intracerebral (IC). Aquí también las capas V y VI mostraron un mayor número neuronal. El porcentaje fue de 28,84% en la capa VI, 40,42% en la capa V, 12,31% en la capa III, 12,26% en la capa II y 6,16% en la capa I. Estos porcentajes se mantuvieron en la mayoría de capas en los infectados presentándose un 27,05% en la capa VI, 38,32% en la V, 13,39% en la capa III, 13,03% en la capa II y 7,60% en la capa I. El número total de neuronas por 1,3 mm² de área cortical fue de 1096 ± 117 en los controles y de 1247 ± 195 en los infectados, con un $p > 0.05$ (tabla 11).

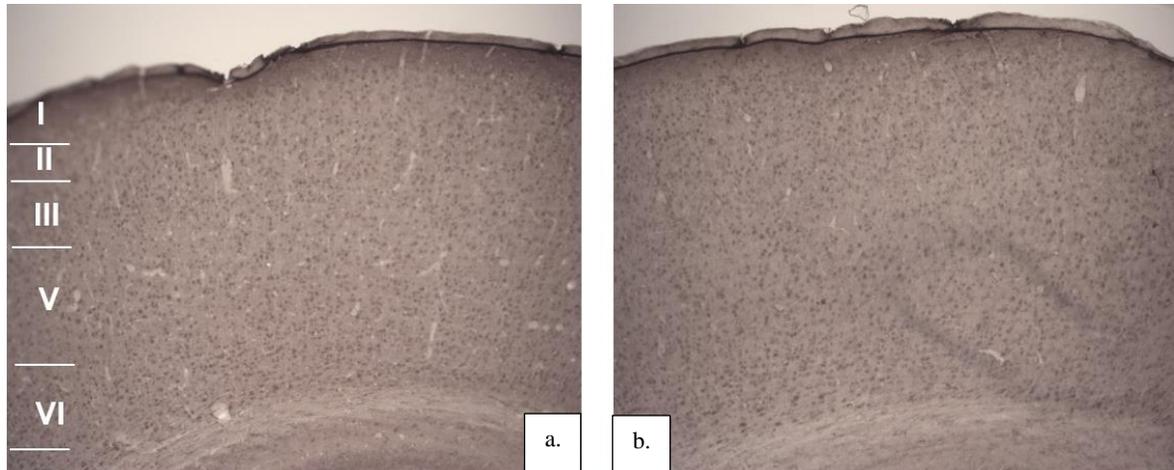


Figura 2. Células inmunorreactivas a glutamato en la corteza motora de ratón 10X (a) ratón control inoculado sin virus (b) ratón infectado inoculado con virus DENV-4 por vía intraperitoneal IP.

3.3.1.3. Inmunorreactividad del glutamato en la corteza somatosensorial de ratones infectados con DENV-4

El porcentaje por capa de neuronas positivas a glutamato en corteza somatosensorial de ratones control IC (inoculados por vía intracerebral) fue 29,31% para la capa VI, 27% en la capa V, 12,42% en la capa IV, 12,66% en la capa III, 11,36% en la capa II y 7,27% en la capa I. Estos porcentajes se mantuvieron en la mayoría de capas en los infectados presentándose un 27,61% en la capa VI, 26,06% en la V, 13,21% en la capa IV, 12,92% en la capa III, 12,38% en la capa II y 7,83% en la capa I. Los animales infectados mostraron un mayor promedio en el número de neuronas respecto a los controles 1111 ± 77 neuronas en los infectados y de 1034 ± 53 neuronas en los infectados. Sin embargo, no hubo diferencias significativas $p > 0.05$ (tabla 10).

Los animales inoculados por la vía intraperitoneal (IP) presentaron una distribución de neuronas glutamatergicas positivas similar a la observada en los inoculados por la vía intracerebral (IC). Aquí también las capas V y VI mostraron un mayor número neuronal. El porcentaje por capa para la corteza motora fueron 30,03% para la capa VI, 26,85% capa V, 14,89% capa IV, 11,48% capa III, 11,57% capa II y 5,18% capa I en los animales control. Al igual que para la vía IC los porcentajes de neuronas entre controles e infectados si variaron, presentándose un porcentaje de neuronas del 29,36% para la capa VI, 27,04% en la capa V, 13,58% en la capa IV, 12,30% en la capa III, 10,97% en la capa II, 6,76% en la capa I. El número total de neuronas por $1,3 \text{ mm}^2$ de área cortical fue de 1096 ± 117 en los controles y de 1247 ± 195 en los infectados, con un $p < 0.05$ (tabla 11). Por otra parte, entre las capas I y V de los controles con los infectados hubo diferencias significativas $p < 0.05$.

3.3.1.4. Relación de la distribución de glutamato en la corteza motora y somatosensorial por las dos vías de inoculación

La distribución del glutamato en la corteza motora y somatosensorial fue uniforme en todas las capas corticales por ambas vías de inoculación, pero se presentó una mayor concentración hacia las capas infragranulares (capas V y VI) y luego en la capa III. Esta distribución es similar a la observada en la corteza motora y somatosensorial de rata y ratón (Giuffrida y Rustioni, 1989) y en otras especies (Conti *et al.*, 1988).

El DENV solo mostró efectos sobre la inmunoreactividad del glutamato en la corteza somatosensorial de los ratones inoculados por vía intraperitoneal IP, en las otras vías y áreas no se cuantificaron cambios significativos a pesar de observarse algunas diferencias en los conteos con una tendencia al aumento en el número de neuronas inmunoreactivas para glutamato (figura 3). Este aumento fue más notorio a nivel de la corteza somatosensorial y en los animales inoculados por la vía intraperitoneal con un incremento de 77 neuronas por $1,3 \text{ mm}^2$ en los ratones infectados por la vía IC y 180 neuronas $1,3 \text{ mm}^2$ para la vía IP.

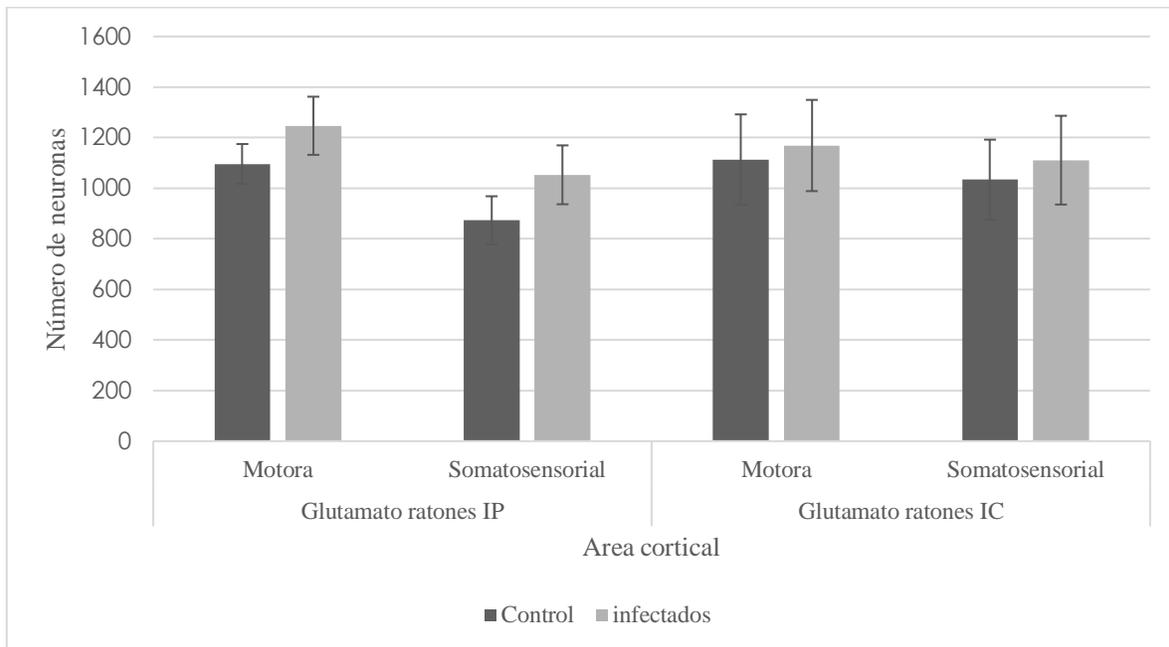


Figura 3. Relación de la distribución de glutamato en las diferentes áreas corticales. Gráfico que ilustra el comportamiento del glutamato en las áreas corticales de estudio en los animales control e infectados con el DENV, mediante las dos vías de inoculación (IP e IC). Cada barra relaciona el número total de neuronas Glu+ y su respectiva desviación estándar.

Se ha reportado que la inoculación intracerebral (IC) de DENV en ratones silvestres (WT) se presentan síntomas neurológicos y posteriormente se produce la muerte (Van der Most *et al.*, 2000), sin embargo, esta vía de inoculación es más alejada de la vía de infección natural que se produce cuando los mosquitos DENV infectados se alimentan de un ser humano. Por otro lado, la vía de inoculación intraperitoneal de la infección por DENV se acerca más a la vía de la infección natural pero no produce gran parte de las anomalías neurológicas presentes en el humano (Paes *et al.*, 2005).

En otros estudios se han obtenido resultados alentadores al utilizar la vía intraperitoneal (IP) para la infección. Jhonson y Roehrig administraron a los ratones AG129 (que carecen de genes de los receptores alfa / beta y gamma del IFN) el virus del DENV-2 por la vía intraperitoneal en donde hallaron total letalidad y aquellos ratones inmunizados se protegieron del desafío del virus y los tiempos de supervivencia aumentaron después de la transferencia pasiva de anticuerpo policlonal anti-DENV (Jhonson y Roehrig, 1999). Por otro lado, Velandia y colaboradores también desarrollaron un modelo de neuroinfección con un aislado del serotipo DENV-4 adaptado en células de neuroblastoma. Con éste aislado inocularon ratones de diferentes días postnatales por la vía intraperitoneal (IP) demostrando que los ratones más jóvenes presentaron síntomas y replicación del virus en el encéfalo; si bien la inoculación por vía IP puede no imitar con precisión la ruta natural de infección, es posible que en ésta ruta de inoculación ocurra una mayor dispersión viral del antígeno hacia el encéfalo que logre producir de manera más notable los efectos observados en la inmunorreactividad de glutamato.

En las dos áreas corticales evaluadas (corteza motora y somatosensorial) por ambas vías de inoculación, se logró evidenciar una ligera diferencia, aunque hubo un mayor número de neuronas positivas a glutamato en la corteza somatosensorial por la vía IP comparado con sus respectivos controles y con la corteza motora de cada vía de infección. Este aumento del glutamato a nivel de la corteza somatosensorial durante la infección con DENV puede estar asociado con la mayor tasa de liberación del neurotransmisor debido a la sobreexpresión de algunos de los receptores para el aminoácido porque la liberación de glutamato está fuertemente influenciada por señales de la célula post-sináptica a la pre-sináptica (Yun *et al.*, 2003; Bogdanik *et al.*, 2004).

Otra posible consideración del aumento de glutamato en la corteza somatosensorial durante la infección con el DENV, puede deberse a la capacidad de absorción de glutamato en esta área. Romanos y colaboradores demostraron que en la corteza somatosensorial la captación de glutamato por los astrocitos es más lenta durante la estimulación sináptica en comparación con las frecuencias de estimulación más bajas. Por el contrario, la capacidad de absorción de glutamato aumenta en la corteza frontal durante la estimulación sináptica de mayor frecuencia, lo que limita la acumulación extracelular de glutamato y la sobreactivación del receptor NMDA en las neuronas piramidales de la capa V (Romanos *et al.*, 2019). De acuerdo a lo anterior se sugiere que el virus puede aprovechar este ambiente de baja absorción del glutamato por parte de los transportadores GLUT- y no GLUT-1 que capturan el glutamato en el espacio pre-sináptico hacia los astrocitos para alterar este sistema de neurotransmisión y provocar una excitación neuronal excesiva. Consecuentemente los resultados de este estudio podrían ayudar a explicar por qué las enfermedades asociadas con la hiperexcitabilidad afectan de manera diferencial las áreas cerebrales individuales.

Los mecanismos por los que durante la infección del dengue se produce un ligero aumento de la inmunorreactividad del glutamato son desconocidos y a partir de este estudio no es posible elucidarlos. Los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo (Rengifo y

Torres, 2010) y lo reportado en este estudio hacen parte de las pocas evidencias que plantean posibles asociaciones entre la presencia de un virus y las alteraciones del sistema glutamatérgico. Nuestros resultados de este estudio indican que la liberación del glutamato se puede afectar en las dos cortezas evaluadas, pero con efecto significativo a nivel de la corteza somatosensorial.

Tabla 9. Distribución de células glutamatérgicas en la corteza motora de ratones control e infectados por la vía intracerebral (IC). Cuadro que ilustra el número de células inmunorreactivas para glutamato en las diferentes capas de la corteza motora de ratones infectados con virus DENV_4 neuroadaptado por vía intracerebral (IC) y sus respectivos controles.

Capa	Muestras de controles				Promedio N° células por capa	% células por capa	Muestras de infectados				Promedio N° células por capa	% células por capa	p valor dos colas Wilconxon Mann W-U	p valor dos colas T-student	
	1	2	3	4			1	2	3	4					
I	115,00	83,00	104,00	91,00	98,25	8,83	I	114,00	89,00	88,00	105,00	99,00	8,47	1,00	0,94
II	127,00	91,00	131,00	139,00	122,00	10,96	II	159,00	125,00	121,00	165,00	142,50	12,18	0,69	0,24
III	121,00	92,00	152,00	191,00	139,00	12,49	III	140,00	140,00	120,00	205,00	151,25	12,93	0,86	0,68
V	447,00	335,00	401,00	527,00	427,50	38,41	V	477,00	381,00	402,00	553,00	453,25	38,76	0,69	0,66
VI	388,00	274,00	300,00	343,00	326,25	29,31	VI	358,00	310,00	268,00	358,00	323,50	27,66	1,00	0,94
Total	1198,00	875,00	1088,00	1291,00	1113,00		Total	1248,00	1045,00	999,00	1386,00	1169,50		0,89	0,67

Tabla 10. Distribución de células glutamatérgicas en la corteza somatosensorial de ratones control e infectados por la vía intracerebral (IC). Cuadro que ilustra el número de células inmunorreactivas para glutamato en las diferentes capas de la corteza somatosensorial de ratones infectados con virus DENV_4 neuroadaptado por vía intracerebral (IC) y sus respectivos controles.

Capa	Muestras de controles				Promedio N° células por capa	% células por capa	Muestras de infectados				Promedio N° células por capa	% células por capa	p valor dos colas Wilconxon Mann W-U	p valor dos colas T-student	
	1	2	3	4			1	2	3	4					
I	95,00	66,00	75,00	65,00	75,25	7,27	I	93,00	84,00	78,00	93,00	87,00	7,83	0,29	0,19
II	124,00	80,00	112,00	154,00	117,50	11,36	II	148,00	125,00	105,00	172,00	137,50	12,38	0,49	0,38
III	120,00	98,00	128,00	178,00	131,00	12,66	III	135,00	131,00	110,00	198,00	143,50	12,92	0,49	0,64

IV	118,00	94,00	123,00	179,00	128,50	12,42	IV	128,00	148,00	118,00	193,00	146,75	13,21	0,40	0,48
V	308,00	244,00	254,00	311,00	279,25	26,99	V	314,00	252,00	255,00	337,00	289,50	26,06	0,49	0,72
VI	346,00	266,00	279,00	322,00	303,25	29,31	VI	326,00	296,00	260,00	345,00	306,75	27,61	0,99	0,90
Total	1111,00	848,00	971,00	1209,00	1034,75		Total	1144,00	1036,00	926,00	1338,00	1111,00		0,69	0,54

Tabla 11. Distribución de células glutamatérgicas en la corteza motora de ratones control e infectados por la vía intraperitoneal (IP). Cuadro que ilustra el número de células inmunorreactivas para glutamato en las diferentes capas de la corteza motora de ratones infectados con virus DENV_4 neuroadaptado por vía intraperitoneal (IP) y sus respectivos controles.

Capa	Muestras de controles				Promedio N° células por capa	% células por capa	Muestras de infectados				Promedio N° células por capa	% células por capa	p valor dos colas Wilconxon Mann W-U	p valor dos colas T-student	
	1	2	3	4			1	2	3	4					
I	79,00	59,00	62,00	70,00	67,50	6,16	I	155,00	69,00	74,00	81,00	94,75	7,60	0,20	0,28
II	146,00	142,00	138,00	112,00	134,50	12,27	II	195,00	176,00	139,00	140,00	162,50	13,03	0,34	0,13
III	163,00	149,00	119,00	109,00	135,00	12,31	III	213,00	183,00	172,00	130,00	174,50	13,99	0,11	0,11
V	444,00	491,00	413,00	425,00	443,25	40,42	V	435,00	567,00	444,00	466,00	478,00	38,32	0,40	0,36
VI	339,00	317,00	300,00	309,00	316,25	28,84	VI	357,00	343,00	312,00	338,00	337,50	27,06	0,20	0,14
Total	1171,00	1158,00	1032,00	1025,00	1096,50		Total	1355,00	1338,00	1141,00	1155,00	1247,25		0,34	0,07

Tabla 12. Distribución de células glutamatérgicas en la corteza somatosensorial de ratones control e infectados por la vía intraperitoneal (IP). Cuadro que ilustra el número de células inmunorreactivas para glutamato en las diferentes capas de la corteza somatosensorial de ratones infectados con virus DENV_4 neuroadaptado por vía intraperitoneal (IP) y sus respectivos controles.

Capa	Muestras de controles				Promedio N° células por capa	% células por capa	Muestras de infectados				Promedio N° células por capa	% células por capa	p valor dos colas Wilconxon Mann W-U	p valor dos colas T-student	
	1	2	3	4			1	2	3	4					
I	60,00	49,00	32,00	40,00	45,25	5,18	I	80,00	79,00	67,00	59,00	71,25	6,76	0,06	*0,02
II	96,00	122,00	91,00	95,00	101,00	11,57	II	109,00	139,00	99,00	115,00	115,50	10,97	0,20	0,24
III	91,00	120,00	91,00	99,00	100,25	11,48	III	119,00	174,00	105,00	120,00	129,50	12,30	0,14	0,13
IV	108,00	181,00	104,00	127,00	130,00	14,89	IV	133,00	168,00	127,00	144,00	143,00	13,58	0,37	0,54
V	197,00	247,00	238,00	256,00	234,50	26,85	V	288,00	306,00	261,00	284,00	284,75	27,04	0,03	*0,02
VI	227,00	270,00	258,00	294,00	262,25	30,03	VI	288,00	349,00	280,00	320,00	309,25	29,36	0,11	0,07
Total	779,00	989,00	814,00	911,00	873,25		Total	1017,00	1215,00	939,00	1042,00	1053,25		0,06	**0,05

3.3.2 Expresión diferencial de la subunidad GluN2A en la corteza cerebral

3.3.2.1. Presencia o ausencia de virus DENV-4 en las muestras de tejido cerebral

Los cuatro serotipos del dengue están relacionados serológicamente; sin embargo, son antigénicamente distintos (Gluber, 1998). Jhonson (2005) desarrollo un ensayo por RT-PCR para detectar el ARN viral de cada serotipo utilizando sistemas singleplex y fourplex; donde evaluó un total de 40 muestras de suero virémico correspondientes a 10 muestras por serotipo, que contenían 0.4 a 1.2×10^6 PFU/ml; detectando ARN viral en todas las muestras por estos sistemas. Sin embargo, el sistema fourplex presentó mejores condiciones de reacción (Jhonson, 2005). Este mismo ensayo multiplexado para la detección de los cuatro serotipos se empleó en nuestro trabajo, en donde se detectó solo la señal fluorogénica del DENV-4 para las muestras de la corteza de ratones inoculados con el virus DENV-4 neuroadaptado, de esta manera se corroboró que las muestras no presentaron un serotipo diferente al inoculado (resultados no mostrados).

3.3.2.2. Eficiencia de la PCR-validación

La eficiencia de la PCR fue de 104,8% ubicándose dentro de los porcentajes recomendados (93% al 105%) y valores de pendiente ($C_q = -3.2$ y -3.5), estas condiciones se consideran favorables para una buena amplificación para cada gen (Pfaffl, 2001). Gracias a estos datos se estableció como cantidad optima de cDNA 5ng para los genes de referencia y el gen objetivo, es decir GluN2A. De esta manera las condiciones de reacción fueron similares, permitiendo hacer una comparación confiable de la expresión génica.

3.3.2.3. Expresión diferencial

Los únicos receptores hasta ahora identificados involucrados en la entrada de *Flavivirus* son lectinas como DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin), también se ha demostrado la participación de moléculas de hidratos de carbono, tales como glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) y glicoesfingolípidos (GSL) para actuar como moléculas co-receptor que mejoran la eficiencia de la entrada del virus; y finalmente moléculas sulfatadas, siendo el sulfato de heparán indispensable para la adsorción del virus a las células huésped (kato *et al.*, 2010). Otro posible receptor que se ha considerado en la participación de la entrada de *Flavivirus* en especial el dengue son los receptores NMDA, receptores asociados con la modulación de la excitación neuronal cuya alteración podría elevar las concentraciones de glutamato provocando la apoptosis y a la sobreexpresión de citoquinas (Yun *et al.*, 2003).

La conformación estructural de los receptores NMDA da origen a un canal iónico que está compuesto por la presencia de dos subunidades GluN1 y dos GluN2 (GluN2A-D) (Schorge *et al.*, 2003), siendo la subunidad GluN1 obligatoria para la activación del receptor y la segunda subunidad puede ser alguno de estos subtipos: GluN2A, GluN2B, GluN2C y GluN2D que forman parte del poro del canal. La expresión diferencial de esta segunda depende tanto de la localización en el SNC como de la etapa del desarrollo neuronal.

Stegenga y Kalb han señalado que la expresión de GluN2A va aumentando en el cerebro de ratón en la región temporal (corteza cerebral, hipocampo, las células de Purkinje, el mesencéfalo y el diencefalo) desde el día de desarrollo embrionario 18 hasta adulto (Stegenga y Kalb, 2001), mientras que las subunidades GluN2B y GluN2D se expresan predominantemente prenatalmente (Bar-Shira *et al.*, 2015).

Los receptores NMDA se caracterizan porque sus canales iónicos están bloqueados por Mg^{2+} , lo cual impide la entrada corriente de Ca^{2+} . Sin embargo, esto sucede cuando el potencial de membrana está en reposo, pero el Mg^{2+} pierde su afinidad por el receptor cuando hay un potencial de membrana permitiendo la despolarización, condición que permite que sus ligandos naturales puedan unirse (Hassel y Dingledine, 2005). La mayoría de las sinapsis de estos receptores están asociados a los receptores AMPA o Kainato en la neurona postsináptica, encargados de producir potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) (Michaelis, 1998). La entrada de Ca^{2+} a través de estos receptores activa a las proteínas quinasas asociadas al sistema Ca^{2+} /calmodulina disparando una serie de respuestas secundarias que conducen a una fosforilación oxidativa o defosforilación de los receptores AMPA, esenciales en procesos de plasticidad sináptica. Sin embargo, existen casos donde se pueden activar otros mecanismos que inducen hiperexcitabilidad, neurotoxicidad, degeneración y muerte neuronal, debido a una liberación excesiva de glutamato que con lleva a una sobreexpresión y activación de los receptores NMDA alcanzando altas concentraciones en el interior de la neurona (Coyle y Puttfarcken, 1995). Por tanto, se sugiere que los virus pueden aprovechar esta disponibilidad de receptores como mecanismo de infección. En este trabajo contribuimos a esclarecer el papel de esta subunidad GluN2A de los receptores NMDA durante la infección con el DENV.

Al evaluar la expresión diferencial de la subunidad GluN2A-NMDA en la corteza de ratones lactantes infectados con virus dengue por medio de la técnica de qRT-PCR se obtuvo que el nivel relativo de expresión del ARNm de la subunidad GluN2A-NMDA normalizado con la expresión de GAPDH (GluN2A/GAPDH) y β -actina (GluN2A/ β -actina) resultó en unos niveles relativos de expresión de 0.53 en la corteza de ratones inoculados con DENV-4 por la vía IP y un nivel de expresión relativo de 0.47 para aquellos inoculados por la vía IC (Figura 4). Estos niveles relativos de expresión se realizaron cuantificando los niveles de expresión de la subunidad GluN2A con respecto a los niveles de expresión de los genes “house keeping” utilizados (GAPDH y β -actina), la β -actina que codifica componentes del citoesqueleto y GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) codifica enzimas de la vía glucolítica; estos son genes de mantenimiento celular que regulan las funciones básicas y ubicuas de la célula y su característica más importante es que se expresan de manera uniforme en todas las condiciones experimentales o ambientales de un sistema dado para ser seleccionados como candidatos de genes control (Bar *et al.*, 2009).

En cuanto a expresión diferencial de GluN2A de las muestras infectadas con DENV-4 y sus respectivos controles por ambas vías de infección (IC y IP), se evidenció una regulación negativa o desregulación de la expresión de la subunidad GluN2A por ambas vías de infección IC (-2.1) e IP (-1.89), nuestros resultados indican que la expresión normal de

GluN2A en el desarrollo neuronal es alterada probablemente por la infección del virus dengue DENV-4, disminuyendo su expresión.

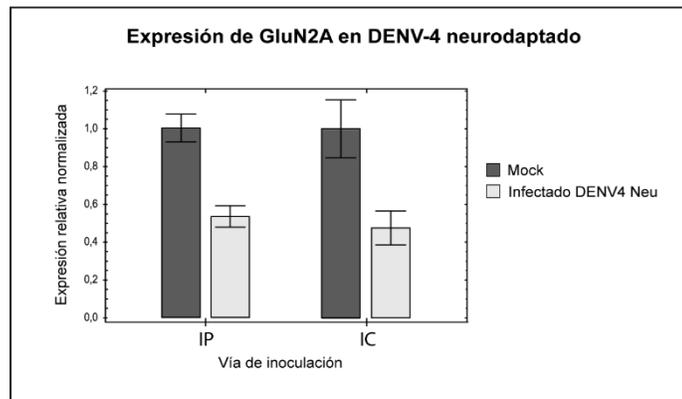


Figura 4. Expresión relativa normalizada de la subunidad GluN2A –NMDA en la corteza de ratones inoculados por dos vías de infección con virus DENV-4 neuroadaptado.

Hasta el momento, algunos genes que codifican las subunidades del receptor NMDA (GRIN1, GRIN2A, GRIN2B Y GRIN2D) se han relacionado con enfermedades humanas; GRIN2A parece estar asociado a una variedad de trastornos del espectro de afasia de epilepsia y encefalopatía epiléptica y de desarrollo, como el síndrome de Landau-Kleffner y la encefalopatía epiléptica con puntas y ondas continuas durante la onda lenta sueño (CSWS) (Lesca *et al.*, 2013; Carvill *et al.*, 2013). Los procesos neurodegenerativos en muchas enfermedades virales principalmente los *Flavivirus* pueden verse favorecidos por la excitotoxicidad neuronal dependiente de los receptores NMDA. Costa y colaboradores han demostrado que la neurodegeneración inducida por ZIKV puede controlarse bloqueando la sobrestimulación de NMDA con memantina u otros bloqueadores, que incluyen dizocilpina (MK-801), ifenprodil que previene la muerte neuronal sin interferir con la capacidad del ZIKV de replicarse en neuronas primarias (Costa *et al.*, 2017).

Otros hallazgos respecto al papel de los receptores NMDA y los *Flavivirus* son los reportados por Velandia-Romero y colaboradores (2012) quienes descubrieron que la infección por el DENV inducía una pérdida masiva de neuronas, debido a una fuerte respuesta inmune y excitotoxicidad asociada a la actividad de los receptores NMDA dado que al tratar ratones infectados con DENV-neuroadaptado con ácido valproico (VPA) o el antagonista de NMDA MK-801 estos no desarrollaron encefalitis letal. Por otro lado, en estudios previos de nuestro grupo de trabajo se encontró interacción probable de la subunidad GluN2A-NMDA con la proteína E del ZIKV mediante ensayos *in silico* con un ΔG de -193 ± 21.8 (Rengifo *et al.*, 2018). Por lo tanto, estos receptores tienen una alta probabilidad de jugar un papel importante en la neuroinfección del DENV en condiciones naturales.

Nosotros postulamos que la disminución de la expresión o desregulación de la subunidad GluN2A del receptor NMDA reportados en este estudio podría ser debido a la hipofunción antagonica de las subunidades del receptor NMDA como mecanismo de acción viral para favorecer su fitness. Teniendo en cuenta que los receptores NMDA que tienen la

combinación GluN1-GluN2A presentan diferencias en sus propiedades fisiológicas con aquellos que presentan una combinación GluN1-GluNAB, se sugiere que al ocurrir una baja expresión de la subunidad GluN2A, puede haber un aumento en la expresión de la subunidad GluN2B, debido a que esta combinación de los receptores producen un tiempo más lento de la apertura y cierre del canal, lo cual, podría favorecer la entrada excesiva de calcio extracelular y provocar excitotoxicidad como una señal que induzca la muerte neuronal. Como soporte a esta hipótesis en muchas enfermedades humanas como la epilepsia y la esquizofrenia se ha reportado alteración en los receptores NMDA que presentan hipofunción de GluN2A y la regulación positiva de GluN2B, lo cual a su vez altera la expresión espacio temporal en el desarrollo y función normal del cerebro (Balu y Coyle, 2011).

La modificación en la expresión de los receptores puede deberse, entre otros, a la alteración de los microARN (miRNAs) del huésped por la infección viral, aquí, el virus podría utilizar los miRNAs para realizar cambios transcripcionales en las subunidades de los receptores NMDA y así favorecer la expresión de proteínas celulares favorables para su replicación. Las 3'-UTR de los ARNm que codifican para las subunidades GluN2A y GluN2B contienen numerosos sitios de unión a miRNA pronosticados computacionalmente. Corbel y colaboradores han validado y confirmado la influencia de los miRNA en la regulación de las expresiones de GluN2A y GluN2B, encontrando dos miARN (miR-19a y miR-539) que pueden influir en los niveles de las subunidades de los receptores NMDA, dirigiéndose a los ARNm que codifican GluN2A y GluN2B. Además, en el mismo estudio se identificó otro miARN (MiR-539) que modifica la expresión del factor de transcripción REST; un regulador conocido de la expresión de la subunidad de los receptores NMDA (Corbel *et al.*, 2015).

Castro y colaboradores seleccionaron 754 miARN celulares humanos modulados por la infección por ZIKV (cepa brasileña) en una línea celular de neuroblastoma. Siete miRNAs (miR-99a, miR-126, miR-190b, miR-361-3p, miR-522-3p, miR-299-5p y miR-1267) se desregularon durante la infección por ZIKV, Además, 11 miRNA se expresaron exclusivamente en células infectadas por ZIKV (miR-148a, miR-342-5p, miR-598 y miR-708-3p, miR-208, miR-329, miR-432-5p, miR-488, miR-518b, miR-520g y miR-767-5p), probablemente para realizar cambios postranscripcionales (Castro *et al.*, 2019). Estas consideraciones sirven para entender los niveles de expresión de las subunidades del receptor NMDA durante la infección viral, además de ofrecer un punto de entrada para contrarrestar y tratar las manifestaciones neurológicas desencadenadas por *Flavivirus* neurotrópicos.

Existen escasos estudios de la participación de las subunidades del receptor NMDA en *Flavivirus*. Olmo y colaboradores demostraron en cultivos neuronales primarios de la región corticoestriatal de cerebros embrionarios de ratón infectados con ZIKV que exhiben niveles aumentados de factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) y glutamato. Además, estos cultivos neuronales infectados exhibieron una mayor expresión de la subunidad GluN2B, seguida de GluN2A y GluN3A del receptor NMDA a las 24 h después de la infección y una concentración aumentada de Ca²⁺ intracelular. Al bloquear el receptor NMDA que contiene GluN2B con ifenprodil se normalizaron los niveles de Ca²⁺ y se evitó la muerte celular neuronal (Olmo *et al.*, 2017). Estos hallazgos fortalecen la posible hipótesis

de la preferencia del DENV por disminuir la expresión de GluN2A y favorecer la expresión de GluN2B postulada por nuestro grupo de trabajo.

3.4. CONCLUSIONES

Los hallazgos aquí reportados indican que el DENV afecta el sistema glutamatérgico produciendo al parecer aumento de la síntesis de glutamato especialmente en la corteza somatosensorial y disminución en la expresión del ARNm de la subunidad GluN2A del receptor NMDA. Estos dos fenómenos pueden contribuir a la muerte neuronal por excitotoxicidad dado que la inhibición de GluN2A genera un efecto antagónico sobre otras subunidades GluN del receptor NMDA que fomentan mayor tiempo de apertura del canal iónico y con ello una mayor entrada de calcio a la célula.

El virus del dengue puede modificar el ambiente celular facilitando la entrada de calcio con el fin de activar proteasas esenciales para su replicación viral y al parecer los receptores NMDA juegan un papel esencial en el cambio del metabolismo del calcio producido por el *Flavivirus*.

3.5. REFERENCIAS

1. Araújo FM, Araújo MS, Nogueira RM, Brillhante RS, Oliveira DN, Rocha MF, Cordeiro RA, Araújo RM, Sidrim JJ. 2012. Central nervous system involvement in dengue: a study in fatal cases from a dengue endemic area. *Neurology*. 6;78(10):736-42.
2. Balu DT, Coyle JT. 2011. Glutamate receptor composition of the post-synaptic density is altered in genetic mouse models of NMDA receptor hypo- and hyperfunction. *Brain Res*. 1392: 1-7.
3. Balu DT, Coyle JT. Neuroplasticity signaling pathways linked to the pathophysiology of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(3):848-870.
4. Bär M, Bär D, Lehmann B. 2009. Selection and validation of candidate cleaning genes for human keratinocyte studies. Review and recommendations. *J Invest Dermatol*. 129: 535-7.
5. Bar-Shira O, Maor R, Chechik G. 2015. Gene Expression Switching of Receptor Subunits in Human Brain Development. *PLoS computational biology*. 11(12): e1004559.
6. Bente DA, Rico-Hesse R. 2006. Models of dengue virus infection. *Drug Discov today Dis models*. 3: 97-103.
7. Bogdanik L, Mohrmann R, Ramaekers A, Bockaert J, Yves Grau, Broadie K. 2004. The Drosophila Metabotropic Glutamate Receptor DmGluRA. Regulates Activity-Dependent Synaptic Facilitation and Fine Synaptic Morphology. *The Journal of Neuroscience*. 24:9105-16.
8. Borawake K, Prayag P, Wagh A, Dole S. 2011. Encefalitis por dengue. *Revista india de medicina de cuidados críticos: publicación oficial revisada por pares de la Sociedad India de Medicina de Cuidados Críticos*. 15 (3): 190-193.
9. Carder R, Hendry S. 1994. Neuronal Characterization, Compartmental Distribution and Activity-dependent Regulation of Glutamate Immunoreactivity in Adult Monkey Striate Cortex. *The J of Neurosci*, 14: 242-62.

10. Carvill GL, Regan BM, Yendle SC, O’Roak BJ, Lozovaya N, Bruneau N. 2013. GRIN2A mutations cause epilepsy-aphasia spectrum disorders. *Nat. Genet.* 45: 1073–1076.
11. Castellanos JE, Neissa JI, Camacho SJ. 2016. La infección con el virus del dengue induce apoptosis en células del neuroblastoma humano SH-SY5Y. *Biomédica.* 36(2):156-168.
12. Castro FL, Geddes VEV, Monteiro FLL, Gonçalves RMDT, Campanati L, Pezzuto P, Aguiar RS. 2019. MicroRNAs 145 and 148a Are Upregulated During Congenital Zika Virus Infection. *ASN Neuro.*
13. Conti F, Fabri M, Manzoni T. 1988. Glutamate-Positive Corticocortical Neurons in the Somatic Sensory Areas I and II of Cats. *The J of Neurosci.* 8: 2948-60.
14. Corbel C, Hernandez I, Wu B, Kosik KS. 2015. Developmental attenuation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression by microRNAs. *Neural Dev.* 10: 20.
15. Costa VV, Del Sarto JL, Rocha RF, Silva FR, Doria JG, Olmo IG, Teixeira MM. 2017. El bloqueo del receptor de N -metil-d-aspartato (NMDA) previene la muerte neuronal inducida por la infección por el virus del Zika. *mBio.* 8 (2): e00350-17.
16. Coyle, J., & Puttfarcken, P. (1993). *Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders.* *Science*, 262(5134), 689–695.
17. Giuffrida R, Rustioni A. 1989. Glutamate and aspartate immunoreactivity in corticocortical neurons of the sensorimotor cortex of rats. *Exp Brain Res.* 74:41-6.
18. Gropman, A. L., Summar, M., & Leonard, J. V. (2007). Neurological implications of urea cycle disorders. *J Inher Metab Dis*, 30(6), 865-879. doi:10.1007/s10545-007-0709-5.
19. Gubler DJ. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:480–496.
20. Hámori J, Takács J, Petrusz P. 1990. Immunogold electron microscopic demonstration of glutamate and GABA in normal and deafferented cerebellar cortex: correlation between transmitter content and synaptic vesicle size. *J Histochem Cytochem.* 38:1767-77.
21. Hassel B, Dingledine G.J, Siegel, S, Brady, D.L, Price (Eds.), Basic neurochemistry. molecular, cellular and medical aspects, Academic Press, Albers RW (2005), pp. 267-290.
22. Hoffmann HH, Schneider WM, Blomen VA, Hovnanian BTR, Hovnanian A. 2017. Diverse Viruses Require the Calcium Transporter SPCA1 for Maturation and Spread. *Cell Host Microbe.* 11;22(4):460-470.
23. Hongjie Javitt DC, Balla A, Burch S, Suckow R, Xie S, Sershen H. 2004. Reversal of phencyclidine-induced dopaminergic dysregulation by N-methyl-D-aspartate receptor/glycine-site agonists.
24. Jhonson AJ, Roehrig JT. 1999. New mouse model for dengue virus vaccine testing. *J virol.* 73: 783-6.
25. Kato D, Era S, Watanabe I, Arihara M, Sugiura N, Kimata K, Suzuki Y, Morita K, Hidari KIPJ, Suzuki T. 2010. La actividad antiviral de sulfato de condroitina E focalización proteína de la envoltura del virus del dengue. *Antiviral Res.* 88: 236-243.
26. Kulkarni ML, Saurabh Kumar. 2011. Involvement of the central nervous system in dengue fever and its outcome. Department of Paediatrics. Jagadguru Jayadeva Muragharajendra (JJM) Medical. Karnataka, India.

27. Lambert AJ, Martin DA, Lanciotti RS. 2003. Detection of North American eastern and western equine encephalitis viruses by nucleic acid amplification assays. *J. Clin. Microbiol.* 41:379–385.
28. Lesca G, Rudolf G, Bruneau N, Lozovaya N, Labalme A, Boutry-Kryza N. 2013. GRIN2A mutations in acquired epileptic aphasia and related childhood focal epilepsies and encephalopathies with speech and language dysfunction. *Nat. Genet.* 45: 1061–1066.
29. Lujan R, Shigemoto R, Lopez G. 2005. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience.* 130(3):567-580.
30. Madi D, Achappa B, Ramapuram JT, Chowta N, Laxman M, Mahalingam S. 2014. Encefalitis por dengue: una manifestación rara del dengue. *Revista de medicina tropical del pacifico asiático*, 4(Supl. 1):70-72.
31. Miagostovich MP, Santos FB, Furnian TM, Guimarães FR, Costa EV, Tavares FN. 2006. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101(3):307-313.
32. Michaelis, E. K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology*, 54(4), 369–415.
33. Olmo IG, Carvalho TG, Costa VV, Alves-Silva J, Ferrari CZ, Izidoro-Toledo TC, Ribeiro FM. 2017. Zika Virus Promotes Neuronal Cell Death in a Non-Cell Autonomous Manner by Triggering the Release of Neurotoxic Factors. *Frontiers in immunology.* 8:1016.
34. Organización Mundial de la Salud, Programa Especial para Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales. 2010. Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, revención y control. La Paz: OPS/OMS.
35. Ottersen O, Storm-Mathisen J. 1984. Glutamate- and GABA-Containing Neurons in the Mouse and Rat Brain, as Demonstrated With a New. *J Of Comparative Neurology.* 229: 374-92.
36. Paes MV, Lenzi HL, Nogueira AC, Nuovo GJ, Pinhao AT, Mota E M, de Barcelos Alves AM. 2009. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Laboratory investigation.* 89(10):1140.
37. Paes MV, Pinhao AT, Barreto DF, Costa SM, Oliveira MP, Nogueira AC. 2005. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology.* 338:236-246.
38. Paxinos G, Keith B. 2001. The mouse brain in stereotaxic coordinates [CD-ROM]. San Diego: Academic Press.
39. Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):45.
40. Ramos C, Sánchez G, Pando RH, Baquera J, Hernández D, Mota J. 1998. Virus del dengue en el cerebro de un caso fatal de dengue hemorrágico. *J Neurovirol.* 4 (4): 465-8.
41. Rengifo A, Tapiero C, Spinel C. 2005. Receptores GABA-A ácido γ aminobutírico y su relación con la dependencia al alcohol. *Ing y ciencia EAFIT.* (1): 77-96.
42. Rengifo A, Torres Fernández O. Inmunorreactividad diferencial de glutamato en dos áreas corticales de ratones infectados con rabia [CD-ROM]. VII congreso nacional y VIII seminario internacional de Neurociencias; 2010 abril 22-24; Ibagué, Colombia: TUMBAGA; 2010.

43. Rengifo A, Torres-Fernández O. 2007. Disminución del número de neuronas que expresan GABA en la corteza cerebral de ratones infectados con rabia. *Biomédica*. 27:548-58.
44. Rengifo AC, Niño EJ, Dueñas ZJ, Forero ME, Castro CE, Torres-Fernández O. 2018. *In silico* evaluation of the molecular interaction of the viral protein e of the Zika virus and the alpha 1 and GluN2a subunits of the GABA-a and NMDA receptors. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*. 30:286-288.
45. Rengifo, AC, Torres-Fernández O. 2007. Disminución del número de neuronas que expresan GABA en la corteza cerebral de ratones infectados con rabia. *Biomédica*, 27(4), 548-58.
46. Rivera JA. 2018. Estudio histopatológico y molecular de casos fatales por dengue en la epidemia de 2010 en Colombia. Maestría tesis, Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá.
47. Romanos J, Benke D, Saab AS, Zeilhofer HU, Santello M. 2019. Differences in glutamate uptake between cortical regions impact neuronal NMDA receptor activation. *Communications biology*. 2(1): 127.
48. Dopman AL, Summar M, Leonard JV. 2007. Neurological implications of urea cycle disorders. *J Inherit Metab Dis*. 30(6):865-79.
49. Schorge S, Colquhoun D. 2003. Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci*. 23:1151-8.
50. Soares CN, Cabral-Castro MJ, Peralta JM, Freitas MRG, Puccioni-Sohler M. 2010. Meningitis determined by oligosymptomatic dengue virus type 3 infection: Report of a case. *International Journal of Infectious Diseases*. 14: 150-152.
51. Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, Kneen R, Thao LT, Raengsakulrach B. 2000. Neurological manifestations of dengue infection. *Lanceta*. 355: 1053-10.
52. Stegenga SL, Kalb RG. 2001. Developmental regulation of N-methyl-D-aspartate- and kainate-type glutamate receptor expression in the rat spinal cord. *Neuroscience*. 105(2):499- 507.
53. Tassara M, Oliveira-Guilarde A, Moraes-da-Rocha BA, de-Rezende-Féres VC, Turchi Martelli CM. 2017. Neurological manifestations of dengue in Central Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 50(3):379-382.
54. Un J, Kimura-Kuroda J, Hirabayashi Y, Yasui K. 1999. Development of a novel mouse model for dengue virus infection. *Virology*. 10;263(1):70-7.
55. Valverde F. 1970. The Golgi method. A tool for comparative structural analysis. En: Nauta W, Ebbesson S, editores. *Contemporary research methods in neuroanatomy*. New York: Springer-Verlag. 12-31.
56. Van Der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R, Strauss JH. 2000. Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *J Virol*. 74:8094-10110.
57. Velandia-Romero ML, Acosta-Losada O, Castellanos J. 2012. In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus. *JEJ Neurovirol*. Universidad del bosque Bogotá Colombia 18: 374.
58. Velandia-Romero ML, Calderón-Pelaez MA, Castellanos JE. 2013. La infección *in vitro* con el virus del dengue induce cambios en la estructura y función del endotelio cerebral del ratón. 11: e0157786.

59. Yun J, Gaivin R, McCune D, Boongird A, Papay R, Ying Z. 2003. Gene expression profile of neurodegeneration induced by $\alpha 1B$ -adrenergic receptor overactivity: NMDA/GABAA dysregulation and apoptosis. *Brain*. (126):1-15.