

La infección por virus dengue induce la disminución de marcadores de diferenciación en células de neuroblastoma

Verónica Rincón Forero¹, Diana Alvear Gómez¹, Oscar Solano Orjuela¹, Jeanette Prada-Arismendy¹, Jaime Eduardo Castellanos Parra²

RESUMEN

Introducción: cerca del 5% de los pacientes con dengue hemorrágico pueden presentar manifestaciones neurológicas; sin embargo, existe poca información sobre la infección directa por el virus dengue (DENV) en neuronas.

Objetivo: determinar el papel del fenotipo neuronal en la infección por DENV en células de neuroblastoma SH-SY5Y inducidas o no a la diferenciación con ácido retinoico (AR).

Materiales y métodos: células SH-SY5Y fueron inducidas con AR a diferenciarse e infectadas con DENV. Posteriormente se cuantificó la expresión de antígeno viral y de dos marcadores de diferenciación (GAP43 y sinaptofisina). También se evaluó la viabilidad postinfección por la técnica de MTT.

Resultados: se encontró que las células diferenciadas son más susceptibles a la infección por DENV, pues se detectó en ellas mayor cantidad de antígeno viral que en las indiferenciadas. A pesar de que el virus indujo muerte celular en ambos tipos de células, la proporción fue mayor en las indiferenciadas (40,3% frente a 21,5%). La infección por DENV en células SH-SY5Y diferenciadas indujo una disminución significativa en la expresión de GAP-43 y sinaptofisina.

Conclusiones: los resultados que se presentan permiten sugerir una relación entre la infección viral y la función neuronal, que podría ser importante para esclarecer la patogénesis de las manifestaciones neurológicas durante las formas graves de dengue.

PALABRAS CLAVE

Tretinoína; Proteína GAP-43; Neuroblastoma; Sinaptofisina; Virus del Dengue; Neuroblastoma

SUMMARY

Dengue virus infection down-regulates differentiation markers in neuroblastoma cells

¹ Grupo de Virología, Facultad de Medicina, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

² Grupo Patogénesis Viral, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Correspondencia: Jaime E. Castellanos; jecastellanos@unal.edu.co

Recibido: agosto 03 de 2010

Aceptado: septiembre 09 de 2010

Introduction: Approximately 5% of patients suffering from dengue hemorrhagic fever may have neurological manifestations. However, little information is available about direct infection of neurons by dengue virus.

Objective: To determine the role of neuronal phenotype during DENV infection in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, either induced or not to differentiate by treatment with retinoic acid (RA).

Materials and methods: Neuroblastoma cell line SH-SY5Y was induced to differentiate with RA and infected with DENV. The expression of viral antigen and of two differentiation markers of neurons, GAP-43 and synaptophysin, was evaluated quantitatively. Postinfection viability was also evaluated by the MTT technique.

Results: It was found that differentiated cells are more susceptible to infection by dengue virus since more viral antigen was found in them than in the undifferentiated ones. DENV infection caused death in both cell types, but the rate was higher in the undifferentiated ones (40.3% vs 21.5%). In addition, DENV infection in differentiated SH-SY5Y cells induced a significant decrease in GAP-43 and synaptophysin expression.

Conclusions: These results allow us to suggest a relationship between DENV infection and neuronal function, which could be important to elucidate the pathogenesis of neurological manifestations occurring in severe dengue disease.

KEY WORDS

Tretinoin; GAP-43 Protein; Neuroblastoma; Synaptophysin; Dengue Virus; Neuroblastoma

INTRODUCCIÓN

Se ha informado que el virus dengue (DENV, acrónimo oficial) puede infectar diferentes tipos celulares con una susceptibilidad muy variable. Dependiendo del tipo celular y de la cepa viral, la infección productiva puede consistir en acumulación de ARN viral, producción de antígenos virales o empaquetamiento y secreción de virus infecciosos (1). Aunque la evidencia acerca de la infección en neuronas humanas por DENV es escasa, está claro que la infección por este virus puede llegar a producir patología neurológica;

de hecho, cada vez más se reportan manifestaciones neurológicas, y existen trabajos según los cuales cerca de una cuarta parte de los pacientes con manifestaciones inusuales presentan sintomatología neurológica (2,3). Además, hay evidencia de que el virus cruza la barrera hematoencefálica e invade el tejido cerebral causando encefalitis. Sin embargo, aún hay controversia sobre si dichas manifestaciones neurológicas se deben a un efecto directo del virus sobre las neuronas o son el resultado de todo el fenómeno inmunológico y endotelial que caracteriza a esta enfermedad (4,5). En estudios *in vitro* se ha hallado que DENV es capaz de causar una infección productiva en líneas celulares de neuroblastoma murino y humano (6,7).

Infecciones experimentales *in vivo* han demostrado que el virus se replica en neuronas pero no en astrocitos y que se produce una gran mortalidad celular en los tejidos (8). En otros trabajos se encontró que el DENV logra infectar y replicarse eficientemente tanto en cultivos primarios de neuronas de ratón como en neuronas corticales *in vivo* (9,10). Recientemente nuestro grupo describió un modelo murino de infección sistémica y nerviosa, en el que se evidencia infección tanto en neuronas como en linfocitos y macrófagos del parénquima cerebral (11).

Se han propuesto diferentes moléculas como posibles receptores y correceptores para el DENV (12-15). Se ha sugerido que una proteína de la membrana celular de 65 kDa sensible a tripsina podría estar involucrada en la unión del virus a células de neuroblastoma (6). Recientemente, mediante cromatografía de afinidad usando la glicoproteína (E) recombinante de DENV, se aisló una molécula de 84 kDa en células de neuroblastoma (SH-SY5Y) y en macrófagos humanos U937, que fue identificada como la proteína de choque térmico 90 (HSP90, por la sigla en inglés de *heat shock protein*) que interactúa con HSP-70 (74 kDa). HSP-90 y HSP-70 participan en la entrada del virus como un complejo receptor en líneas celulares humanas y en monocitos/macrófagos, en asociación con microdominios lipídicos en respuesta a la infección (16).

El ácido retinoico (AR) induce un proceso de diferenciación neuronal de células de neuroblastoma SH-SY5Y, que incluye cambios de tipo bioquímico, electrofisiológico y ultraestructural. Entre estos cambios están la atenuación de la proliferación

celular, la extensión de los procesos neuríticos, el desarrollo de una población homogénea de células diferenciadas completamente neuronales y la expresión de marcadores neuronales típicos como neurofilamento, enolasa específica de neuronas, GAP-43 (por la sigla en inglés de *growth-associated protein*) y sinaptofisina, entre otros (17). La sinaptofisina es una glicoproteína integral de membrana involucrada en la exocitosis dependiente de calcio, y es el componente mayor de vesículas sinápticas pequeñas en neuronas (18,19). Por su lado, la proteína de 43 kDa asociada a crecimiento (GAP-43) es una fosfoproteína de unión a calmodulina que se concentra en conos de crecimiento y terminaciones presinápticas (20,21).

En este trabajo se encontró que aunque las células diferenciadas con AR son más susceptibles a la infección por DENV, se produce menos muerte celular y una disminución en los marcadores de diferenciación neuronal, lo que podría estar sugiriendo una disfunción neuronal durante la infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de células SH-SY5Y y diferenciación

Se utilizaron células de neuroblastoma SH-SY5Y obtenidas de la ATCC (por la sigla en inglés de *American Type Culture Collection*) (entre los pasajes 15-25), cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL). Para los ensayos de viabilidad celular y la técnica de Cell-ELISA fluorométrica se sembraron 15.000 células en cajas de 96 pozos tratadas con poli-L-lisina (10 µg/mL). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C con 5% de CO₂. Para el grupo de células diferenciadas, 48 horas después de la siembra se reemplazó el medio normal por medio de diferenciación (RPMI, AR 10 µM, SFB 1%), cambiándolo cada dos días, hasta los seis días de cultivo, de acuerdo con lo establecido previamente en la literatura (17).

Virus e infección de los cultivos

Para los ensayos de infección se utilizó el DENV serotipo 2, aislado COL-789 donado por el doctor Jairo Méndez, del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud y amplificado en células de mosquito C6/36.

Se obtuvo el título viral en un ensayo de plaqueo, según el protocolo previamente publicado (22). Las células indiferenciadas y las diferenciadas con AR se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI, por la sigla en inglés de *multiplicity of infection*) de 1. Dos horas después se retiró el inóculo viral y los cultivos se incubaron por 1, 2 y 3 días adicionales en medio de mantenimiento sin AR (RPMI-1640, SFB 10% y antibiótico). Posteriormente las células se fijaron con metanol y acetona (1:1) y se procesaron por la técnica de Cell-ELISA fluorométrica.

Ensayos de viabilidad por el método de MTT-formazán

Se adicionó el MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetil thiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium, 1 mg/mL) a las células SH-SY5Y indiferenciadas y diferenciadas después de 1, 2 y 3 días postinfección con el DENV. Después de 2 horas de incubación a 37 °C, se removió el medio y los cristales de formazán se solubilizaron en dimetilsulfóxido y se leyeron a 570 nm en un lector de ELISA Stat Fax-2100. Los valores se expresaron como porcentajes relativos a los valores de las células de neuroblastoma no infectadas (que fueron tomados como el 100%), provenientes de dos experimentos independientes con ocho réplicas por condición (n = 16). Luego se realizó una prueba de *t-Student*.

Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos para la técnica de Cell-ELISA fluorométrica e inmunocitoquímica: un anticuerpo monoclonal GAP-43 (Sigma, G-9264), en una dilución 1/200; un anticuerpo monoclonal contra sinaptofisina (Sigma, S-5768), en una dilución 1/100, y por último un anticuerpo monoclonal contra flavivirus 1/500 (St. Louis encephalitis, Chemicon, MAB8744).

Cell-ELISA fluorométrica

Se empleó una técnica de Cell-ELISA fluorométrica reportada previamente por nuestro grupo para la detección de antígenos virales (23). Brevemente descrita, los cultivos de las células SH-SY5Y indiferenciadas y diferenciadas con AR en condiciones normales y después de 1, 2 y 3 días postinfección con DENV se lavaron con TBS (por la sigla en inglés de *Tris-buffered saline*). Después de bloquear sitios inespecíficos con SFB al 10%, se inactivaron las fosfatasa endógenas

con levamisol (20 mM), se adicionaron los anticuerpos primarios en búfer de bloqueo (TBS 1X pH 8,0, albúmina sérica bovina 1%, leche descremada 1% y Tween-20 0,01%) durante una hora a 37 °C. Después de poner el anticuerpo secundario biotinilado, la detección de los complejos se hizo con estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina (SA5100 Vector Labs). Por último se agregó un sustrato fluorogénico, el 4-metilumbeliferilfosfato (MUP, Molecular Probes, M-6491) preparado en búfer de revelado (NaCl 0,1 M, Tris 100 mM y MgCl₂ 50 mM, pH 9,5) y se hizo la medición de fluorescencia a diferentes tiempos en un fluorómetro de PR-521 (TecnoSuma, Habana, Cuba) con filtros de excitación de 360 nm y emisión de 450 nm. Los datos se reportaron como una relación entre las unidades de fluorescencia sobre la concentración de proteína total en cada pozo (cuantificada mediante el método de ácido bicinonónico, BCA Pierce) provenientes de dos experimentos independientes con cuatro réplicas para cada condición (n = 8). Los datos se analizaron mediante una prueba de *t-Student* y pruebas de comparación de medias utilizando el programa SIMSTAT.

Inmunocitoquímica

Aproximadamente 10.000 células SH-SY5Y indiferenciadas y diferenciadas se sembraron en cajas de 24 pozos sobre cubreobjetos redondos pretratados con Matrigel (2 µg/cm², Promega G-5171) y después infectadas con DENV2. En cada tiempo postinfección las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%. Luego de permeabilizar las células con Tritón X-100 y de inactivar las peroxidasa endógenas con H₂O₂ al 0,5%, las células inmunorreactivas se detectaron usando los anticuerpos primarios descritos anteriormente. La detección se hizo con estreptavidina acoplada a peroxidasa (1 µg/µL, Vector Labs) y se reveló usando diaminobenzidina al 0,01%. Las células se contracoloraron con Haemalum de Mayer, se deshidrataron y montaron con Poly-mount.

RESULTADOS

El ácido retinoico induce diferenciación morfológica en células de neuroblastoma SH-SY5Y

De acuerdo con lo reportado previamente (17,24,25), se observó que el tratamiento de las células SH-SY5Y por seis días con ácido retinoico 10 µM (SH-SY5Y Dif)

produjo cambios característicos de diferenciación celular, incluyendo la reducción de la tasa de crecimiento y la adquisición de un fenotipo neuronal característico. A su vez, las células SH-SY5Y Dif mostraron una población más homogénea a lo largo del tiempo en cultivo con un marcado incremento en las extensiones neuríticas (figura n.º 1B) en contraste con las células SH-SY5Y indiferenciadas (SH-SY5Y Indif) (figura n.º 1A) que no mostraron cambios morfológicos aparentes.

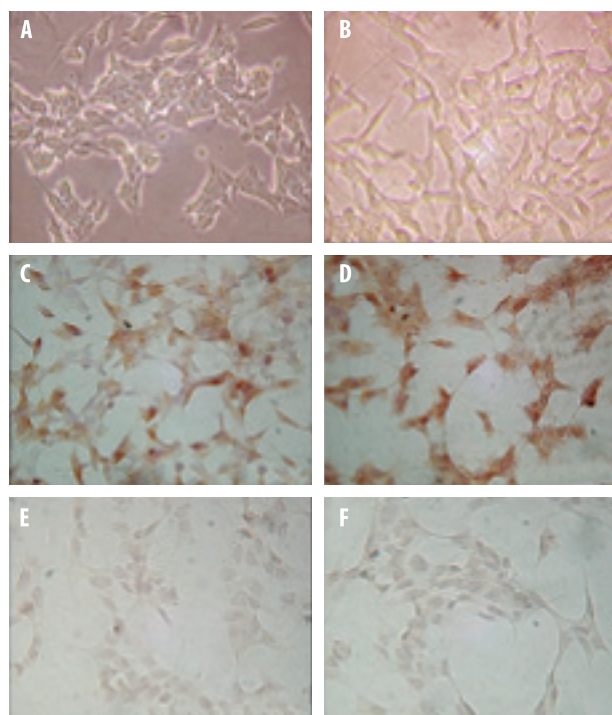


Figura n.º 1. El AR induce diferenciación morfológica en las neuronas SH-SY5Y y aumento en la susceptibilidad a la infección por DENV. A. Aspecto en contraste de fase de las células indiferenciadas. B. Imagen representativa de las neuronas SH-SY5Y Dif; se observa un fenotipo neuronal característico. C. Inmunodetección para antígeno de DENV en neuronas indiferenciadas. D. Detección del DENV en neuronas diferenciadas. E. Control de la inmunodetección, cultivos no infectados procesados con el anticuerpo antiviral. F. Control procesado en el que se omitió el anticuerpo primario contra el virus. Barra = 40 µm.

Las células SH-SY5Y inducidas a diferenciación con AR son más susceptibles a la infección con DENV

Después de efectuar una prueba inmunocitoquímica para detectar el DENV se encontró que las células de neuroblastoma en los dos estadios son susceptibles

a la infección (figura n.º 1C y 1D): se evidencia una marcación citoplasmática. No se encontró marcación en los cultivos no infectados procesados con el anticuerpo antilavivirus (figura n.º 1E y 1F). Por otro lado, la cuantificación del antígeno viral demostró que en todos los tiempos postinfección la señal fue dos veces mayor en las células diferenciadas ($p < 0,05$) con respecto a las indiferenciadas, lo que sugiere mayor susceptibilidad inducida por la diferenciación o mayor tasa de replicación viral en estas células (figura n.º 2).

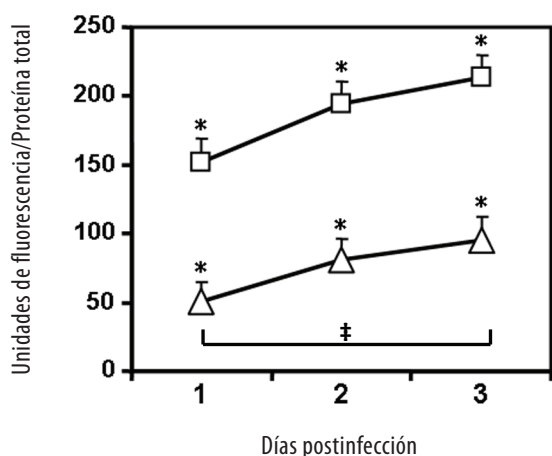


Figura n.º 2. Las células SH-SY5Y inducidas a diferenciación con AR son más susceptibles a la infección con DENV. En todos los tiempos evaluados (1, 2 y 3 días postinfección), se detectó tres veces más cantidad de antígeno viral en las células diferenciadas (cuadrados) que en las indiferenciadas (triángulos). El antígeno se cuantificó con una técnica de Cell-ELISA fluorométrica. Los valores corresponden al promedio (\pm error estándar de la media, EEM). Diferencias significativas ($p < 0,05$) para SH-SY5Y Indif y Dif (*). Diferencias significativas entre los días 1 y 3 postinfección para SH-SY5Y Indif (#) después de realizar una ANOVA de un factor y un test de DMS.

La diferenciación celular protege las células SH-SY5Y del efecto citopático inducido por el DENV

La prueba de viabilidad celular por MTT-formazán permitió detectar que durante las primeras 48 horas de infección no se produjo muerte celular en ningún grupo de células. Al tercer día de infección se evidenció una pérdida significativa de la viabilidad para ambos tipos celulares; fue significativamente mayor la muerte en las células indiferenciadas infectadas (40,3% frente a 21,5%) (figura n.º 3).

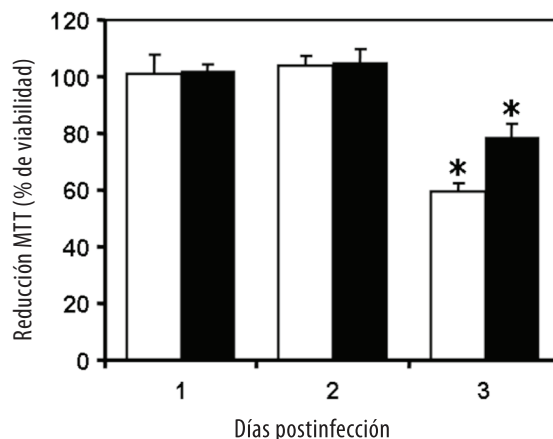


Figura n.º 3. La muerte celular inducida por el DENV es menor en las células SH-SY5Y diferenciadas. La supervivencia se cuantificó en células indiferenciadas (barras claras) y en las diferenciadas (barras oscuras) infectadas con DENV en un MOI de 1 a los 1, 2 y 3 días postinfección, mediante el ensayo de MTT-formazán. Los valores son la media \pm EEM y se expresan como porcentajes relativos a los valores de las células de neuroblastoma no infectadas (que fueron tomadas como el 100%). *Diferencias significativas ($p < 0,05$) usando la prueba de t-Student con respecto a células no infectadas.

La infección por DENV cambió la expresión de marcadores de diferenciación en ambos tipos celulares

La expresión de GAP-43 se evaluó mediante inmunocitoquímica en células SH-SY5Y Indif y Dif en condiciones normales y después de 48 horas de infección con DENV. El patrón de expresión se detectó principalmente en el citoplasma y en las extensiones neuríticas en ambos tipos celulares (datos no mostrados). Al cuantificar los niveles de GAP-43 se observó que la infección de las células indiferenciadas (figura n.º 4A) indujo un aumento significativo en la expresión de GAP-43 al tercer día, comparados con los niveles obtenidos en células no infectadas. Por otro lado, el tratamiento con AR en las células diferenciadas aumentó más de 10 veces la expresión del GAP-43 (figura n.º 4B); sin embargo, su expresión declinó paulatinamente al retirar el medio de diferenciación. La infección con DENV causó una disminución significativa ($p < 0,05$) de GAP-43 con respecto a los cultivos no infectados en los días 2 y 3 postinfección. Al detectar y cuantificar el marcador sinaptofisina, el comportamiento fue similar. La infección produjo un aumento significativo en la

expresión en las células indiferenciadas, mientras que en las diferenciadas la infección por DENV

causó una pérdida acelerada de la expresión de sinaptofisina ($p < 0,05$) (figura n.º 5).

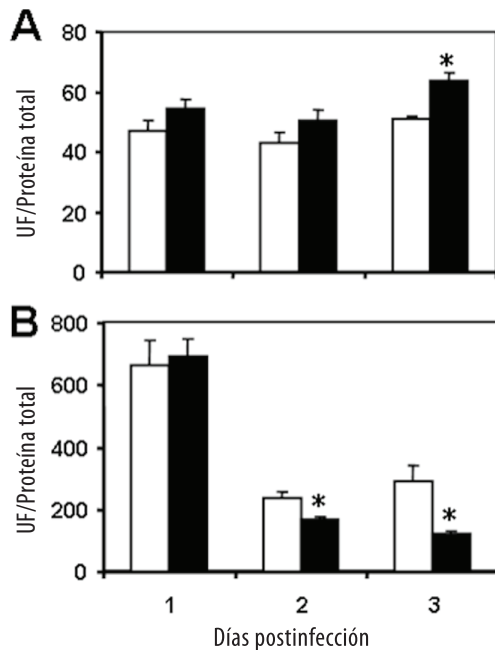


Figura n.º 4. Expresión de GAP-43 en células diferenciadas e indiferenciadas, infectadas o no. A. Cuantificación de GAP-43 en células indiferenciadas no infectadas (barras blancas) e infectadas (barras negras). La infección, al día tercero, indujo un aumento significativo en la cantidad de GAP-43. B. Cuantificación de GAP-43 en células diferenciadas. El tratamiento con AR aumentó más de 10 veces la expresión del marcador y la infección con DENV (barras negras) causó una disminución significativa de GAP-43 con respecto a los cultivos no infectados (barras blancas). Los valores corresponden a la media (\pm EEM) de dos experimentos independientes por cuadruplicado ($n = 8$). *Diferencias significativas ($p < 0,05$) usando la prueba de t-Student con respecto a células no infectadas.

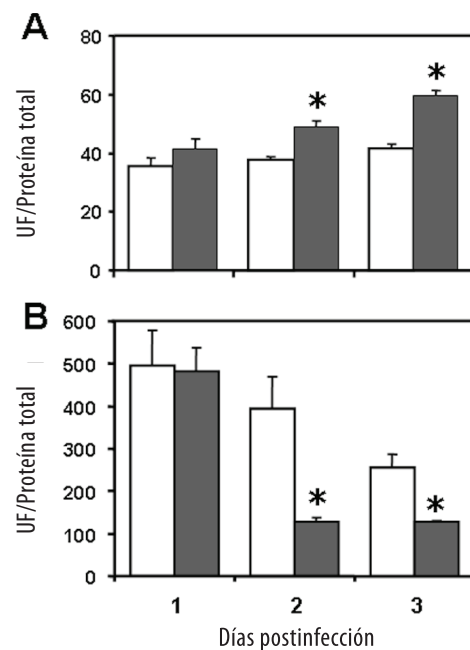


Figura n.º 5. Expresión de sinaptofisina en neuronas tratadas o no con AR e infectadas o no con DENV. Se cuantificó la expresión de sinaptofisina por medio de una Cell-ELISA fluorométrica. A. La expresión de sinaptofisina se incrementó en las células indiferenciadas infectadas (barras oscuras) con respecto a las no infectadas (barras blancas). B. Por otro lado, en las células diferenciadas con AR aumentó 12 veces la expresión de sinaptofisina. Se observó que la expresión del marcador se redujo en los cultivos infectados a una cuarta parte (2 día postinfección) o a la mitad (día 3 postinfección). Los valores son la media (\pm EEM) de dos experimentos independientes por cuadruplicado ($n = 8$). *Diferencias significativas ($p < 0,05$) usando la prueba de t-Student con respecto a células no infectadas.

DISCUSIÓN

El establecimiento de un modelo neuronal para caracterizar la infección por DENV es una herramienta que puede permitir el estudio y comprensión de las bases moleculares de los mecanismos neuropatológicos implicados en las manifestaciones neurológicas por dengue. Por tanto, en este estudio se quiso determinar el papel del fenotipo neuronal durante la infección con DENV2 de células SH-SY5Y Indif y Dif con AR.

Se sabe que las diferencias en el comportamiento neurotrópico asociadas con la infección por

flavivirus podrían explicarse por la presencia de receptores específicos expresados en la superficie de las diferentes subpoblaciones neuronales (4). Se ha reportado que HSP90 y HSP70 participan en la entrada de DENV como complejo receptor en líneas celulares de neuroblastoma humano (7,16).

Los dos tipos celulares empleados en este estudio fueron susceptibles a la infección, aunque las células diferenciadas con AR mostraron una mayor acumulación intracelular de antígenos virales, evidenciados por el ensayo de cell-ELISA fluorométrico (dos veces más que en las células

indiferenciadas). Las células SH-SY5Y diferenciadas con AR proveen un modelo de estudio similar al de neuronas adultas *in vivo* de acuerdo con sus características funcionales y morfológicas, mientras que las células indiferenciadas SH-SY5Y se comportan en cultivos como neuronas inmaduras. Por tanto, las diferencias en la susceptibilidad a la infección entre los dos tipos celulares se pueden deber en parte al estado de maduración y expresión de complejos de correceptores asociados en la superficie neuronal involucrados en la interacción con DENV. Esta línea celular de neuroblastoma humano ha sido anteriormente usada para determinar susceptibilidad viral; en un trabajo hecho por Gimenez-Cassina y colaboradores (26), se evidenció que la línea celular SH-SY5Y Dif por tratamiento con AR es más susceptible a la infección por diversas cepas del virus *Herpes simplex* tipo 1, al parecer por la expresión en superficie de receptores que facilitan la entrada del virus, lo que sustenta aún más la hipótesis que el grado de maduración neuronal es un factor crítico que modifica la susceptibilidad a la infección por diversos tipos de virus.

En este trabajo, durante las primeras 48 horas postinfección no ocurrió muerte celular; sin embargo, al tercer día se evidenció una disminución significativa en la viabilidad que fue menor en las SH-SY5Y diferenciadas. Se ha informado que el DENV y el AR activan la vía de supervivencia PI3-K/Akt (27,28) y se ha sugerido que la vía PI3-K/Akt tiene un papel antiapoptótico en las infecciones con DENV para proteger a las células infectadas de la muerte en etapas tempranas postinfección (27). Por tanto, se podría llegar a pensar que en el modelo empleado para las células diferenciadas se haría una doble inducción de la vía de PI3-K/Akt que llevaría a proteger las células infectadas de la muerte celular.

Se han documentado bien los efectos del AR para inducir diferenciación en células de neuroblastoma SH-SY5Y (17,24,25). Estos incluyen: atenuación de la proliferación celular, extensión de los procesos neuríticos, desarrollo de una población homogénea de células diferenciadas completamente neuronales y expresión de marcadores neuronales típicos (17). El protocolo reportado previamente (24) con AR 10 μM por seis días consecutivos permitió diferenciar morfológica y bioquímicamente las células de neuroblastoma SH-SY5Y, observando rasgos típicos de

diferenciación. Además, se observó que los dos tipos celulares expresaron constitutivamente sinaptofisina y GAP-43. El mayor pico de expresión para estos dos marcadores de sinaptogénesis se presentó durante los seis primeros días de diferenciación y durante las primeras 24 horas postinfección. Paulatinamente la expresión de GAP-43 fue disminuyendo hasta alcanzar niveles basales que se observaron a los siete y ocho días en las células en cultivo en condiciones normales y después de los dos y tres días postinfección en las células infectadas.

Se sabe que GAP-43 está involucrada en la fase inicial y activa del crecimiento neurítico (29). En células SH-SY5Y no tratadas se han encontrado niveles muy bajos de transcritos de GAP-43, que se incrementan durante la diferenciación inducida por AR y alcanzan su máxima expresión después de 24 horas de tratamiento (28). En este estudio se encontró que la expresión de GAP-43 fue diez veces mayor en las células SH-SY5Y diferenciadas, lo que está de acuerdo con hallazgos previos (28,29). A su vez, en las células indiferenciadas después de la infección se encontró una mayor expresión de GAP-43 con respecto a las células no infectadas lo cual indica que el DENV-2 podría activar señales intracelulares mediando los procesos de sinaptogénesis en el comienzo del crecimiento neurítico.

Las neuronas en el sistema nervioso central son un blanco para las infecciones persistentes por virus. Estas infecciones pueden resultar en la alteración de la función neuronal, aunque las células infectadas retengan su arquitectura anatómica; ello sugiere que las infecciones persistentes pueden llevar a trastornos neurológicos de etiología desconocida (30). Se ha encontrado que la infección persistente por el virus de la enfermedad de Borna en ratas recién nacidas provoca una disminución progresiva y marcada en la expresión de sinaptofisina y GAP-43, con una pérdida significativa de las neuronas corticales (31). De igual forma, la expresión de GAP-43 es subregulada en la infección persistente en neuronas tanto *in vivo* como *in vitro* por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV). La infección por LCMV en células PC12 diferenciadas a neuronas disminuye la tasa de transcripción de GAP-43 y aumenta la estabilidad del mRNA en respuesta al *factor de crecimiento neuronal* (NGF, por la sigla en inglés de *nerve growth factor*) (30).

En este estudio se encontró que en las células de neuroblastoma diferenciadas la infección por DENV-2 causó una disminución significativa en la expresión de GAP-43 y sinaptofisina. Nuestros resultados están de acuerdo con los hallazgos informados para infecciones persistentes por virus, y sugieren que la infección interfiere con procesos de neuroplasticidad. La merma en la expresión de estos dos marcadores de sinaptogénesis podría estar relacionada con las manifestaciones neurológicas inusuales que se presentan por la infección con DENV.

Por otro lado, la infección con DENV-2 en las células indiferenciadas provocó un aumento en la expresión de sinaptofisina en comparación con las células no infectadas. Se ha informado que la infección en neuronas inmaduras causa un aumento hasta de 25 veces en el nivel de sinaptofisina en el cerebro de ratones en estado embrionario, con una distribución en los somas y en los procesos neuronales (6). Estos resultados podrían sugerir una correlación entre la infección viral y la neuropatología de neuronas inmaduras *in vivo*.

Mientras que en las células diferenciadas con AR se encontró que la expresión de sinaptofisina aumentó 12 veces en relación con las células indiferenciadas, al retirar el AR se presentó una disminución que alcanzó la mitad del valor al tercer día, de manera similar a lo ocurrido con la expresión de GAP-43. Es importante aclarar que en este momento las células han estado en cultivo durante nueve días, en los cuales la sinaptogénesis va disminuyendo gradualmente a medida que las células envejecen y se da por último la muerte celular, aunque el descenso fue menos drástico comparado con la expresión de GAP-43. Este fenómeno puede estar relacionado con el hecho de que la sinaptofisina se expresa de preferencia en las etapas tempranas del desarrollo.

Este es el primer trabajo en el que se ha estudiado el papel de la diferenciación neuronal en la susceptibilidad a la infección por DENV-2 *in vitro*. Se requieren estudios adicionales para definir el porqué de la mayor susceptibilidad de las neuronas diferenciadas. Por otro lado, se encontró que la infección por DENV-2 induce disminución de la expresión de proteínas que son indispensables para la fisiología nerviosa, lo cual permite sugerir un posible papel directo del virus en

la fisiopatología de las manifestaciones neurológicas que se presentan ocasionalmente durante la infección por dengue. El modelo de neuronas empleado puede ser una herramienta importante para comprender estos fenómenos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo en el marco del Proyecto n.º 1308-05-17588 cofinanciado por Colciencias y la División de Investigaciones de la Universidad El Bosque.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol*. 2000 Sep;74(17):7814-23.
2. Brito CAA, Sobreira S, Cordeiro MT, Lucena-Silva N. Acute disseminated encephalomyelitis in classic dengue. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(2):236-8.
3. Méndez Á. Manifestaciones clínicas inusuales del dengue hemorrágico en niños. *Biomedica*. 2006;26(1):61-70.
4. Monath TP. Pathobiology of the flaviviruses. In: Schlesinger MJ, Schlesinger S, editor(s). *The Togaviridae and Flaviviridae*. New York: Plenum Press; 1986. p. 375-440.
5. Lum LC, Lam SK, Choy YS, George R, Harun F. Dengue encephalitis: a true entity? *Am J Trop Med Hyg*. 1996 Mar;54(3):256-9.
6. Ramos-Castañeda J, Imbert JL, Ortega A, Ramos C. Synaptophysin and neurofilament expression in neurons infected with dengue virus. *Arch Med Res*. 1994 Jan;25(2):215-7.
7. Desprès P, Flamand M, Ceccaldi PE, Deubel V. Human isolates of dengue type 1 virus induce apoptosis in mouse neuroblastoma cells. *J Virol*. 1996 Jun;70(6):4090-6.
8. Imbert JL, Guevara P, Ramos-Castañeda J, Ramos C, Sotelo J. Dengue virus infects mouse cultured neurons but not astrocytes. *J Med Virol*. 1994 Mar;42(3):228-33.
9. Bordignon J, Strottmann DM, Mosimann ALP, Probst CM, Stella V, Noronha L, et al. Dengue neurovirulence

- in mice: identification of molecular signatures in the E and NS3 helicase domains. *J Med Virol.* 2007 Oct;79(10):1506-17.
10. Bordignon J, Probst CM, Mosimann ALP, Pavoni DP, Stella V, Buck GA, et al. Expression profile of interferon stimulated genes in central nervous system of mice infected with dengue virus Type-1. *Virology.* 2008 Aug;377(2):319-29.
 11. Velandia ML, Recio-Pinto E, Castellanos JE. Descripción de la infección sistémica y nerviosa in vivo por una cepa neuroadaptada de virus dengue. *Infectio.* 2008;12(S1):50.
 12. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier J-L, et al. 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.* 2003 Jul;4(7):723-8.
 13. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med.* 2003 Apr;197(7):823-9.
 14. Hung J-J, Hsieh M-T, Young M-J, Kao C-L, King C-C, Chang W. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol.* 2004 Jan;78(1):378-88.
 15. Lozach P-Y, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier J-L, et al. 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.* 2005 Jun;280(25):23698-708.
 16. Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol.* 2005 Apr;79(8):4557-67.
 17. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem.* 2000 Sep;75(3):991-1003.
 18. Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P. A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Jun;82(12):4137-41.
 19. Fletcher TL, Cameron P, De Camilli P, Banker G. The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J Neurosci.* 1991 Jun;11(6):1617-26.
 20. Meiri KF, Pfenninger KH, Willard MB. Growth-associated protein, GAP-43, a polypeptide that is induced when neurons extend axons, is a component of growth cones and corresponds to pp46, a major polypeptide of a subcellular fraction enriched in growth cones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 May;83(10):3537-41.
 21. Spencer SA, Schuh SM, Liu WS, Willard MB. GAP-43, a protein associated with axon growth, is phosphorylated at three sites in cultured neurons and rat brain. *J Biol Chem.* 1992 May;267(13):9059-64.
 22. Houghton-Triviño N, Montaña D, Castellanos J. Dengue-yellow fever sera cross-reactivity: challenges for diagnosis. *Rev. salud pública.* 2008 May;10(2):299-307.
 23. Rincón V, Corredor A, Martínez-Gutiérrez M, Castellanos JE. Fluorometric cell-ELISA for quantifying rabies infection and heparin inhibition. *J Virol Methods.* 2005 Jul;127(1):33-9.
 24. Martin AK, Nahorski SR, Willars GB. Complex relationship between Ins(1,4,5)P₃ accumulation and Ca²⁺ -signalling in a human neuroblastoma revealed by cellular differentiation. *Br J Pharmacol.* 1999 Apr;126(7):1559-66.
 25. Encinas M, Iglesias M, Llecha N, Comella JX. Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor-mediated survival and neuritogenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Neurochem.* 1999 Oct;73(4):1409-21.
 26. Gimenez-Cassina A, Lim F, Diaz-Nido J. Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. *J Neurosci Res.* 2006 Sep;84(4):755-67.
 27. Lee C-J, Liao C-L, Lin Y-L. Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection. *J Virol.* 2005 Jul;79(13):8388-99.

28. López-Carballo G, Moreno L, Masiá S, Pérez P, Baretino D. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 2002 Jul;277(28):25297-304.
29. Shea TB, Perrone-Bizzozero NI, Beermann ML, Benowitz LI. Phospholipid-mediated delivery of anti-GAP-43 antibodies into neuroblastoma cells prevents neuritogenesis. *J Neurosci.* 1991 Jun;11(6):1685-90.
30. Cao W, Oldstone MB, De La Torre JC. Viral persistent infection affects both transcriptional and posttranscriptional regulation of neuron-specific molecule GAP43. *Virology.* 1997 Apr;230(2):147-54.
31. Gonzalez-Dunia D, Watanabe M, Syan S, Mallory M, Masliah E, De La Torre JC. Synaptic pathology in Borna disease virus persistent infection. *J Virol.* . 2000 Apr;74(8):3441-8.

