

60562
2
3



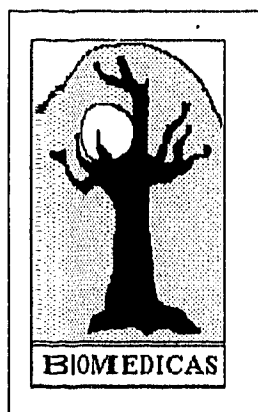
**Universidad Nacional
Autónoma de México**

Facultad de Química



**“ESTUDIO DE LA PARTICIPACION DEL
VIRUS DEL DENGUE EN EL PROCESO
FIBRINOLITICO”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA
EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)**



**PRESENTA
Q. F. B. VERONICA MONROY MARTINEZ**

México, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

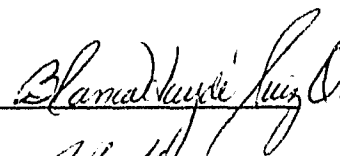
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Integrantes del Jurado:

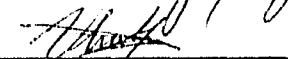
Presidente: Dra. Carmen Gómez Eichelmann
Primer vocal: Dr. Jorge Vázquez Ramos
Secretario: Dr. Alejandro García Carrancá
Primer suplente: Dra. Irma Bernal Lugo
Segundo suplente: Dra. Marina Gavilanes Ruíz

El presente trabajo fué realizado en el:
Instituto de Investigaciones Biomédicas
de la U.N.A.M., en el **Departamento de**
Biología Molecular.

Asesor de Tesis: Dra. Blanca Haydé Ruíz Ordaz



Sustentante: Q.F.B. Verónica Monroy Martínez



A mi asesor:

La Dra. Blanca Haydé Ruíz Ordaz

por darme la oportunidad de
realizar el presente trabajo,
brindándome su apoyo y amistad.

A Irma:

porque además de compañera
y amiga, me brindó su apoyo.

A Luis, Gustavo, Martha,

Georgina y Daphne:

por ser mis compañeros y amigos.

A mis hijos Nayelli y Enrique:

Porque mis logros son para ellos.

A Juanita, Ivonne y Heriberto:

Porque sin su ayuda no
habría cursado la maestría.

A mi esposo Francisco:

Por el amor, comprensión
y paciencia mostrada.

ABREVIATURAS.

FHD/SCD : fiebre hemorrágica por dengue/síndrome de choque por dengue

LLC-MK2: línea celular - riñón de mono macaca mulatta

CDC: centers for disease control

CID: coagulación intravascular diseminada

D2M: dengue 2 mexicano

D2I: dengue 2 indonesia

U.F.P: unidades formadoras de placa

BSA: albúmina sérica bovina

SK: estreptocinasa

PLG: plasminógeno

A.E.A.C.: ácido ϵ -aminocaproico

GP60: glicoproteína de 60 KDa

CHAPS: 3-[(3-cloramidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato

n-OG: n-octyl-beta-D-glucopiranosido

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assays

F: fibrina

Fg: fibrinógeno

PDF: productos de degradación de la fibrina(ógeno).

RESUMEN

La enfermedad del dengue es causada por el virus del mismo nombre, del cual se conocen cuatro serotipos (1,2,3 y 4). Las manifestaciones clínicas van desde un cuadro febril, hasta las formas graves como el Síndrome de choque por dengue (SCD) y la Fiebre hemorrágica por dengue (FHD). Para intentar explicar los casos desafortunados de la enfermedad se han propuesto 2 hipótesis basadas en datos epidemiológicos: la primera, propuesta por Halstead, postula la facilitación de la infección mediada por anticuerpos heterotípicos no neutralizantes en el curso de una segunda infección, y relaciona las manifestaciones hemorrágicas con la activación del macrófago, el cual a su vez activa otros sistemas tales como: el del complemento, la coagulación y/o fibrinólisis. La segunda hipótesis fué planteada por León Rosen, en base a la presencia de casos hemorrágicos ocurridos en el curso de una infección primaria (no existen anticuerpos anti-dengue preformados), postulando que la variación antigénica que sufren las cepas mientras circulan en la naturaleza, es un factor de virulencia.

Actualmente no existen reportes que demuestren que el virus *per se* (ya que la patogenia ha sido asociada a los anticuerpos), tenga participación directa en el establecimiento del proceso hemorrágico. Con base en lo anterior, nos propusimos analizar la posible participación del virus del dengue, en la activación del plasminógeno (PLG), como condición previa al desarrollo del proceso fibrinolítico, el cual es un mecanismo importante en la instalación del fenómeno hemorrágico. Asimismo, evaluamos la activación del PLG en presencia de α -2-antiplasmina (α -2AP), cuya función es regular el proceso de fibrinólisis por medio de la inhibición de la plasmina.

La activación de plasminógeno *in vitro*, fué evaluada utilizando dos cepas virales diferentes, una procedente de un brote de dengue clásico (dengue 2 mexicano) y otra procedente de un caso fatal de dengue hemorrágico (dengue 2 indonesia). Al analizar la activación de PLG encontramos que las dos cepas fueron capaces de activar al zimógeno, independientemente de la presencia de fibrina/fibrinógeno; la plasmina generada fué capaz de degradar tanto a la fibrina como al fibrinógeno en diferentes péptidos de bajo peso molecular (menores de 50 KDa), los cuales se identificaron mediante SDS-PAGE al 10%. El patrón electroforético presentado en los ensayos de activación en presencia de los virus, fué similar al control positivo, el cual contenía estreptocinasa como agente activador del PLG. Al evaluar la activación de PLG, en presencia de α -2-AP y el virus de dengue clásico, la generación de plasmina se inhibió (de 79% a 21% a una hora de iniciado el ensayo); sin embargo, con el virus hemorrágico, se observó un incremento en la activación del mismo (de 89% a 99% al mismo tiempo). Los resultados obtenidos en el presente estudio, sugieren que el virus *per se*, puede activar al PLG, transformándolo a plasmina, enzima que es capaz de degradar fibrina y/o fibrinógeno. En los ensayos de activación del PLG en presencia de α -2AP, encontramos que el aislado hemorrágico compite con el inhibidor de la plasmina, favoreciendo así la exacerbación de la activación de PLG, lo cual posiblemente favorezca la alteración del mecanismo de regulación de la fibrinólisis, desequilibrio que podría favorecer la instalación de la hemorragia. Estos hallazgos podrían dar una explicación alternativa al establecimiento del proceso hemorrágico en aquellos casos ocurridos en el curso de una infección primaria en donde no existe la presencia de anticuerpos heterotípicos no neutralizantes.

Entre las proteínas estructurales del virus se encuentran: la proteína de la cápside ó C con un peso molecular aproximado de 14 KDa, la cual se encuentra asociada al RNA formando la nucleocápside (protegiéndolo de una posible degradación) . La proteína de la membrana ó M que pesa 8 KDa aproximadamente y se sintetiza como un precursor glicosilado (pre-M), que posteriormente mediante una desglicosilación da lugar a la proteína funcional.

La glicoproteína de envoltura ó E tiene un peso molecular aproximado de 60 KDa, es muy importante desde el punto de vista biológico, ya que en ella se encuentran los epítopes de familia, de grupo, tipo (1,2,3 y 4), subtipo (Jamaica, Nueva Guinea, etc.), de neutralización, unión a receptor, hemaglutinación, fijación de complemento y neurotropismo (2, 4). Mediante anticuerpos monoclonales, se han identificado en esta proteína tres dominios no superlapables diferentes denominados: A, B y C, los cuales estructuralmente empiezan a ser caracterizados. Los sitios potenciales de glicosilación en la proteína E no están conservados [dengue 2 presenta un sitio y el serotipo 4 presenta dos sitios potenciales, localizados en la asparagina 67 y asparagina 153, siendo la Asn67 el único conservado entre los diferentes flavivirus (5)] y los monosacáridos asociados a la misma no están bien establecidos; sin embargo, por análisis con diferentes aglutininas biotiniladas se ha observado mayor sensibilidad a la concanavalina A que a otras aglutininas, lo que indica un alto contenido de manosas (6, 7).

Entre las proteínas no estructurales del virus se encuentran: la proteína NS1 con un peso molecular aproximado de 48 KDa, la cual es sintetizada en el retículo endoplásmico como una proteína hidrofílica monomérica, que cuenta con dos sitios señales para la adición de carbohidratos, esta es transferida a la membrana plasmática y su función aún no está determinada; sin embargo, se ha sugerido que pueda funcionar como una chaperona que ayuda a la maduración del virión, además de actuar como modulador inmune. Asimismo, se ha propuesto que juegue un papel importante en el capping del mensajero y forme parte del complejo de replicación (8). NS1 puede ser liberada al medio por células infectadas con el virus, siendo el antígeno soluble responsable de la fijación del complemento, por lo cual juega un papel importante en la respuesta inmune a la infección (9).

La proteína NS2a (20 KDa), es un péptido hidrofóbico que se requiere para el adecuado procesamiento proteolítico del extremo carboxilo terminal de NS1 y la proteína NS2b que pesa 14.5KDa, cuya función aún se desconoce (10). NS3 es un péptido hidrofílico de 70KDa, el cual se ha sugerido, que pueda ser la proteasa viral activa en el procesamiento postraducciona l de la poliproteína (9). Las proteínas NS4A y NS4B con peso molecular de

16 y 27 KDa respectivamente, han sido relacionadas como cofactores del complejo de replicación. A la proteína NS5, recientemente se le han asignado las funciones de RNA polimerasa y de metil-transferasa (11).

El virus infecta principalmente a gentes jóvenes (menores de 15 años). La enfermedad se presenta principalmente en zonas tropicales y subtropicales en América; sin embargo, exhibe un carácter endémico en el sureste asiático. En nuestro país las principales áreas endémicas son: Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Yucatán, la zona baja de Veracruz y más recientemente Monterrey (12).

ESPECTRO CLINICO DE LA ENFERMEDAD:

El espectro clínico varía desde las formas febriles conocidas como Dengue Clásico (95% de los casos), hasta las formas graves de la enfermedad como son: la Fiebre Hemorrágica por Dengue y/o Síndrome de Choque por Dengue (FHD/SCD).

El Dengue clásico se caracteriza por presentar fiebre, cefalea, mialgias y artralgias; los datos de laboratorio son normales a excepción de una leucopenia moderada (Fig. 2). En las formas graves generalmente presentes en una infección secundaria, se presenta además del cuadro anterior: taquicardia, déficit de la perfusión tisular periférica, hipotensión y/o manifestaciones hemorrágicas, los datos de laboratorio muestran un incremento del hematocrito, así como una disminución de algunas proteínas plasmáticas tales como: fibrinógeno y el factor C3 del complemento, además de una severa plaquetopenia por plaquetolisis, al parecer responsable de la tendencia hemorrágica [Fig. 3 (13)].

A la fecha se conocen dos hipótesis que intentan explicar las manifestaciones hemorrágicas: la primera postulada por Halstead en 1980 (14), proponiendo que en el curso de una infección secundaria la presencia de anticuerpos heterotípicos no neutralizantes circulantes, incrementa la formación de complejos antígeno-anticuerpo, facilitando la eficacia de entrada del virus a las células blanco y desencadenando con ello la activación de macrófagos y que a su vez los macrófagos activen diferentes sistemas como el del complemento, fibrinólisis y/o coagulación. Con base en lo anterior, se propuso que los anticuerpos heterotípicos no neutralizantes previamente formados, fueran un factor de predisposición en la presentación de FHD/SCD en el curso de una infección secundaria.

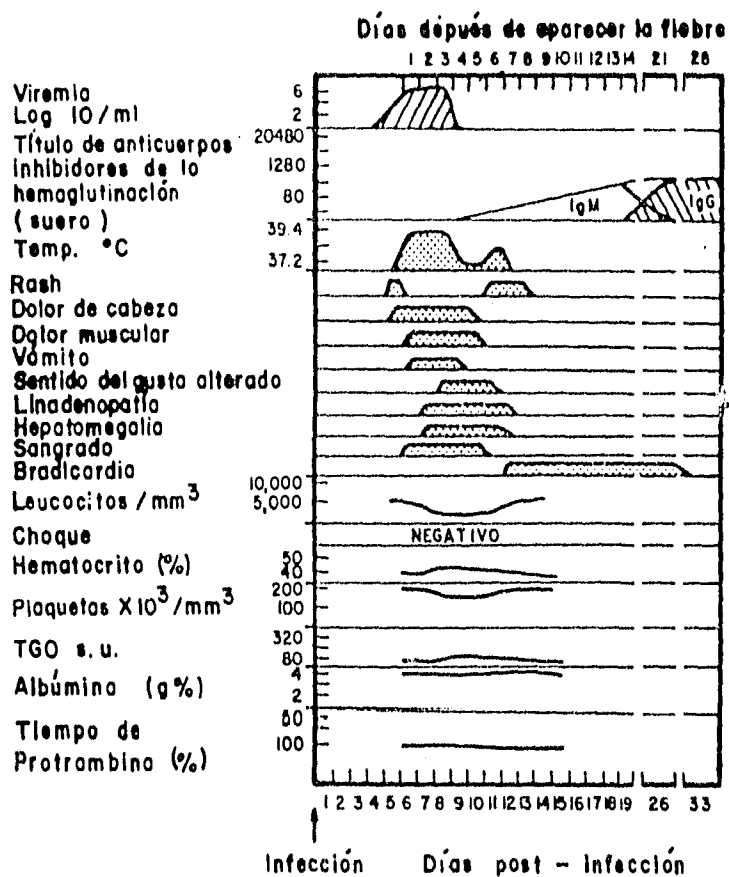


Figura 2. Hallazgos clínicos y de laboratorio de un caso típico de fiebre por Dengue.

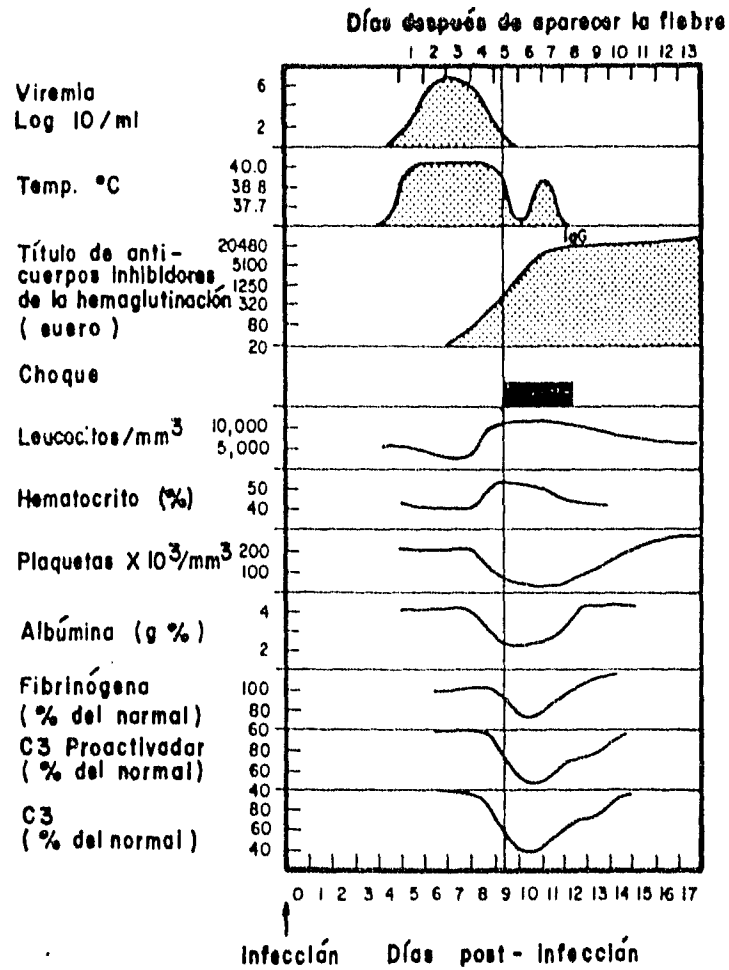


Figura 3. Hallazgos clínicos y de laboratorio de un caso típico de Síndrome de Choque por Dengue y/o Fiebre Hemorrágica por Dengue.

Bhamarapravati en 1967 (15), sugirió que probablemente en la FHD/SCD estén involucrados mediadores químicos de acción corta como la histamina y la bradiquinina: sin embargo, existen otras sustancias como el leucotrieno C (el cual es 1000 veces más potente que la histamina), los metabolitos del ácido araquidónico, prostacielinas y prostaglandinas, que son liberados por los macrófagos estimulados durante la infección (14) ocasionando un aumento en la permeabilidad del endotelio vascular y salida del líquido intravascular al espacio intersticial, con ello la instalación del choque hipovolémico.

Sin embargo, se han reportado casos de Dengue hemorrágico en el curso de una infección de tipo primario, en la que el estado inmunológico del huésped no juega un papel importante, en las cuales se ha demostrado que no han estado expuestos a una primoinfección por dengue u otro flavivirus (16). Para tratar de explicar estos casos, León Rosen en 1977 (17) propuso una segunda hipótesis, postulando que la variabilidad antigénica que sufren las cepas mientras circulan en la naturaleza (y la virulencia de la cepa) es importante en la predisposición a la manifestación hemorrágica.

Ambas hipótesis están basadas en datos epidemiológicos, sin que a la fecha existan reportes a nivel de estructura que apoyen a las mismas.

POSIBLE RELACION DE LA PROTEINA DE ENVOLTURA VIRAL CON LA FIBRINOLISIS:

Como se mencionó anteriormente, la glicoproteína de envoltura viral (E) es muy importante desde el punto de vista fisiológico, ya que en ella residen las principales funciones biológicas tales como: penetración a la célula, es decir unión a receptor, hemaglutinación, neutralización, etc (4). A diferencia de la mayor parte de los virus el dengue presenta una sola proteína de superficie (proteína E), la cual interacciona inicialmente con el huésped, por lo que se le ha dado un papel central en la resolución de la infección en la relación huésped-parásito. Nosotros planteamos la posibilidad de que la proteína E, pudiera estar involucrada en la alteración de los procesos de coagulación y/o fibrinólisis, desencadenados por el virus en infecciones de tipo hemorrágico en el curso de una primoinfección (en las cuales no hay anticuerpos preexistentes), con base en los antecedentes siguientes:

Markoff y col. en 1991 (18) llevaron a cabo estudios en niños hospitalizados con Dengue clásico y FHD/SCD, encontrando que los anticuerpos contra la proteína E del virus presentaban reacción cruzada con proteínas plasmáticas que actúan en los sistemas de coagulación y/o fibrinólisis, principalmente con el plasminógeno. Mediante análisis de

similitud entre el plasminógeno y la proteína de envoltura viral (E), se observó que existía una región de 20 aminoácidos que presenta una elevada homología y que comprende del aminoácido 100 al 119, la cual corresponde a la región más conservada en los flavivirus (19).

Por otro lado, en un estudio realizado en Cuba en pacientes con Dengue Hemorrágico, se encontró que existía una elevada correlación entre la disminución de fibrinógeno, plasminógeno, el aumento de los productos de degradación de fibrinógeno y la severidad de la enfermedad (20). Con base en estos antecedentes, Ruíz y col (datos no publicados), llevaron a cabo un análisis de estructura primaria y secundaria de la proteína E de dengue, observando que existen diferentes dominios compartidos entre la misma y las proteínas plasmáticas que actúan en la coagulación y/o fibrinólisis, entre los que se encuentran un dominio tipo finger, otro de unión a calcio y un dominio tipo kringle (figura 4), de este último se sabe que una de sus funciones importantes, es la de asegurar la especificidad de unión proteína-proteína en los sistemas enzimáticos que involucren proteasas serínicas (21,22). Los dominios kringle se encuentran formados por tres asas unidas por 3 puentes disulfuro que son característicos de este tipo de estructura (fig. 4), siendo esenciales para asegurar la especificidad y control biológico de la acción de algunas proteínas que actúan en la coagulación y/o fibrinólisis, tales como: el factor XII de la coagulación, la protrombina, urocinasa, activador tisular del plasminógeno y plasminógeno, por estar involucrados en interacciones que regulan la conversión ó control de la activación de protrombina y plasmina. Estos dominios participan en la asociación del factor Va con la protrombina (23) y la unión de la plasmina a fibrina y α -2-antiplasmina(24).

El grupo de Heinz y col. en 1994 (25), reportaron la cristalización del fragmento soluble (aa 1-403) de la proteína de envoltura del virus de encefalitis transmitida por garrapata (TBE), el cual pertenece a los flavivirus. Asimismo, Stuart y Gouet en 1995 (26) llevaron a cabo un análisis estructural de la proteína E de TBE, encontrando que en el dominio I existía una estructura tipo kringle, el cual aunque tridimensionalmente presentaba una forma muy extendida, el patrón de puentes disulfuro mantenía la topología de un dominio kringle. Con base en estos antecedentes, nosotros planteamos que la presencia de los dominios kringle en el virus de dengue, juegue un papel importante en la fibrinólisis, así como en el desarrollo de la hemorragia.

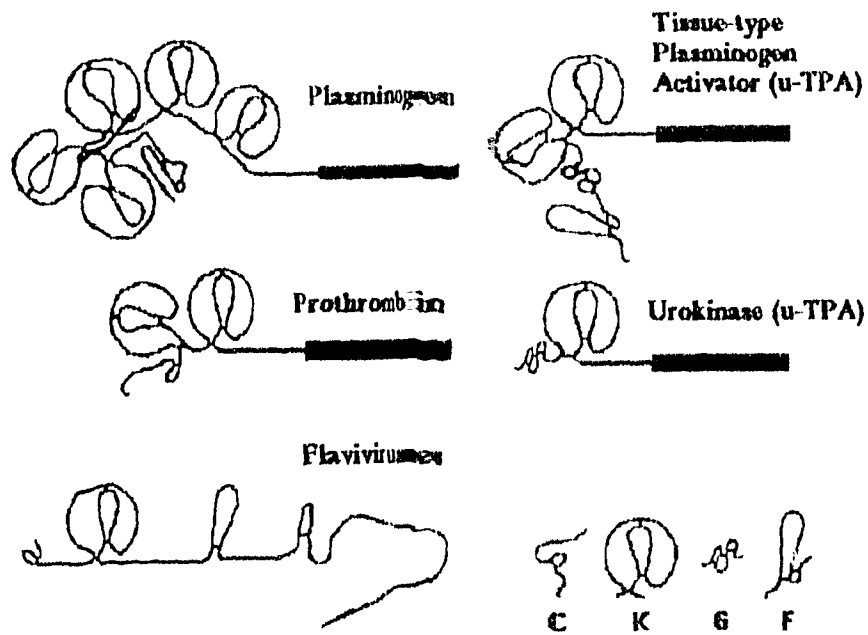


Figura 4. Representación esquemática de los dominios compartidos entre los flavivirus y algunas proteínas plasmáticas que actúan en la coagulación y/o fibrinólisis: C dominio de unión a calcio, K dominio kringle, G dominio de factor de cremamiento epidérmico, F dominio tipo finger.

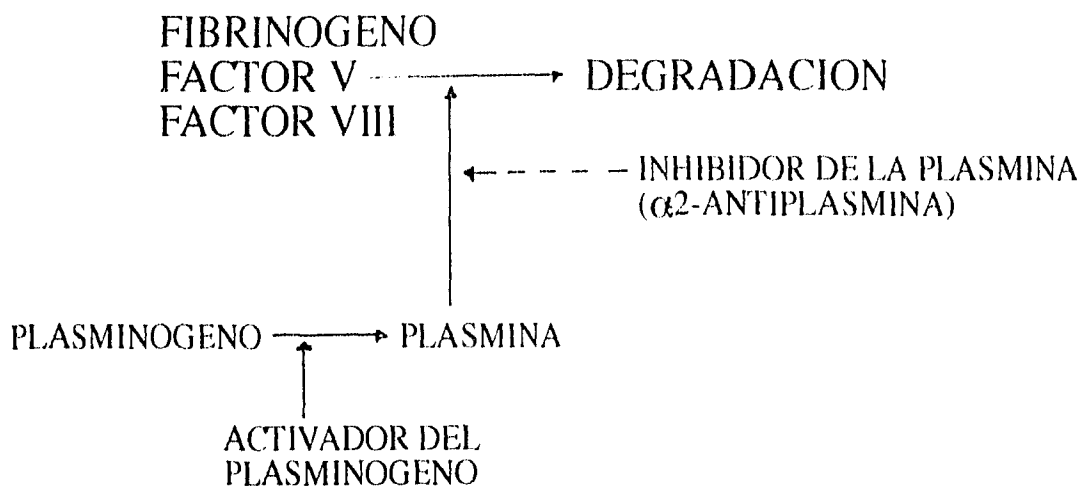
FIBRINOLISIS.

La fibrinólisis es un proceso fundamental que da como resultado la lisis del coágulo. Este fenómeno está controlado y regulado por la actividad de un sistema de enzimas proteolíticas llamado sistema plasminógeno-plasmina. Mientras que la trombina es la enzima que activa la formación de la fibrina, la plasmina es la encargada de degradar los coágulos de fibrina, ésta última se encuentra en el torrente sanguíneo bajo la forma de una

proteína precursora llamada plasminógeno: su conversión es llevada a cabo por otra proteína denominada activador tisular del plasminógeno de manera natural y en condiciones patológicas por enzimas proteolíticas cinasas, tales como: uroquinasa y estreptocinasa . La activación del plasminógeno, involucra el rompimiento de una unión lisina-arginina en el zimógeno y no genera la liberación de péptidos (28).

La plasmina en su forma activa es capaz de actuar sobre varias proteínas, digiriendo el fibrinógeno de manera similar a su acción sobre la fibrina, además de poder degradar otras proteínas plasmáticas particularmente los factores de coagulación V y VIII (Diagrama 1). La plasmina formada provoca entonces una degradación no sólo de la fibrina, sino también del fibrinógeno circulante (fibrinólisis sistémica). Además de los factores antes mencionados, dichas sustancias ocasionan un estado de no-coagulación de la sangre.

FASE FLUIDA



SUPERFICIE DE FIBRINA

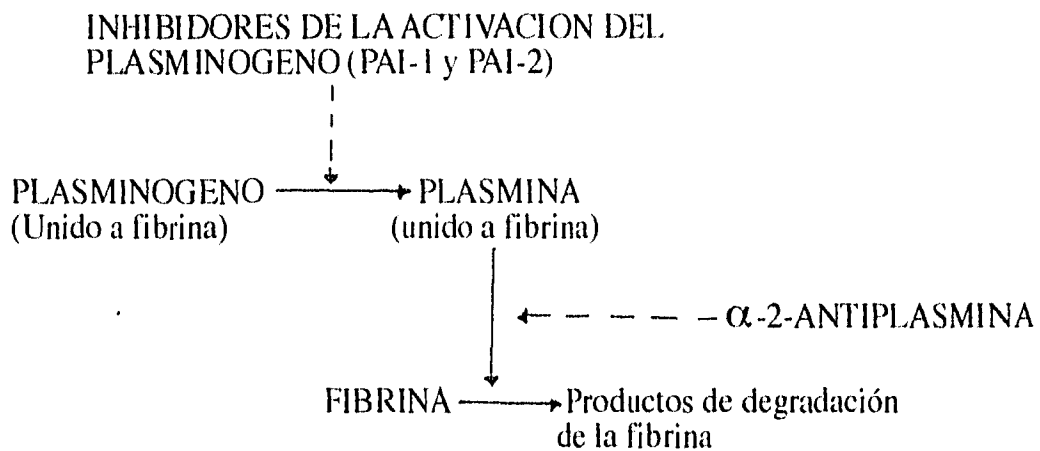


Diagrama 1. Esquema de actividad específica de la plasmina sobre diferentes proteínas involucradas en los procesos de coagulación y/o fibrinolisis.

El proceso de fibrinolisis es lento, la plasmina requiere de varias horas para llegar a la digestión de la fibrina/ógeno hasta péptidos de bajo peso molecular, por lo que la mayoría de los métodos que existen para medirlo requieren de varias horas (los productos de desintegración resultantes son diferentes). Inicialmente la enzima se une a la fibrina y/o fibrinógeno (340KDa) y corta la cadena α , así como la unión de la cadena beta para producir el fragmento X (240-265kDa), en el siguiente corte se produce un fragmento X tardío el cual genera posteriormente los fragmentos Y (155 KDa) y D (70-100 KDa). Finalmente de la degradación del fragmento Y, se generan el fragmento E (50KDa) y un segundo fragmento denominado D (Diagrama 2). Ambos fragmentos pueden proseguir en su degradación hasta obtener péptidos de menor peso molecular. Durante la proteólisis de la fibrina y/o fibrinógeno por la plasmina, se pueden cortar alrededor de 30 sitios en orden específico los cuales generan sitios de unión adicionales a lisina (29, 30).

Se sabe que el desencadenamiento del sistema fibrinolítico se dá tanto por la activación de proteínas endógenas (factor activador del plasminógeno y urocinasa), así como de otras proteínas exógenas como es el caso de la estreptocinasa.

La estreptocinasa (SK) no presenta una actividad catalítica como tal, sino que se propone que se une a la molécula de plasminógeno, la cual a su vez se encuentre unida a fibrina o fibrinógeno, actuando como un proactivador que provoca un cambio conformacional en la molécula de plasminógeno, resultando en la exposición de un sitio sensible a hidrólisis por otra molécula del mismo, dando lugar así a la generación de plasmina [la proteína E en el virus del dengue podría presentar un comportamiento similar a la molécula de SK. (Fig.5)].

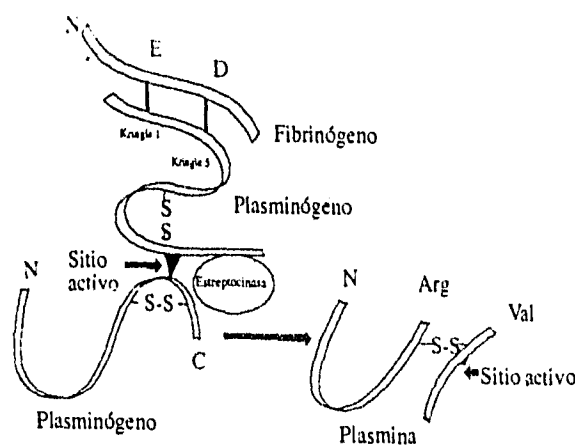


Fig. 5. Modelo esquemático de la activación de plasminógeno por estreptocinasa

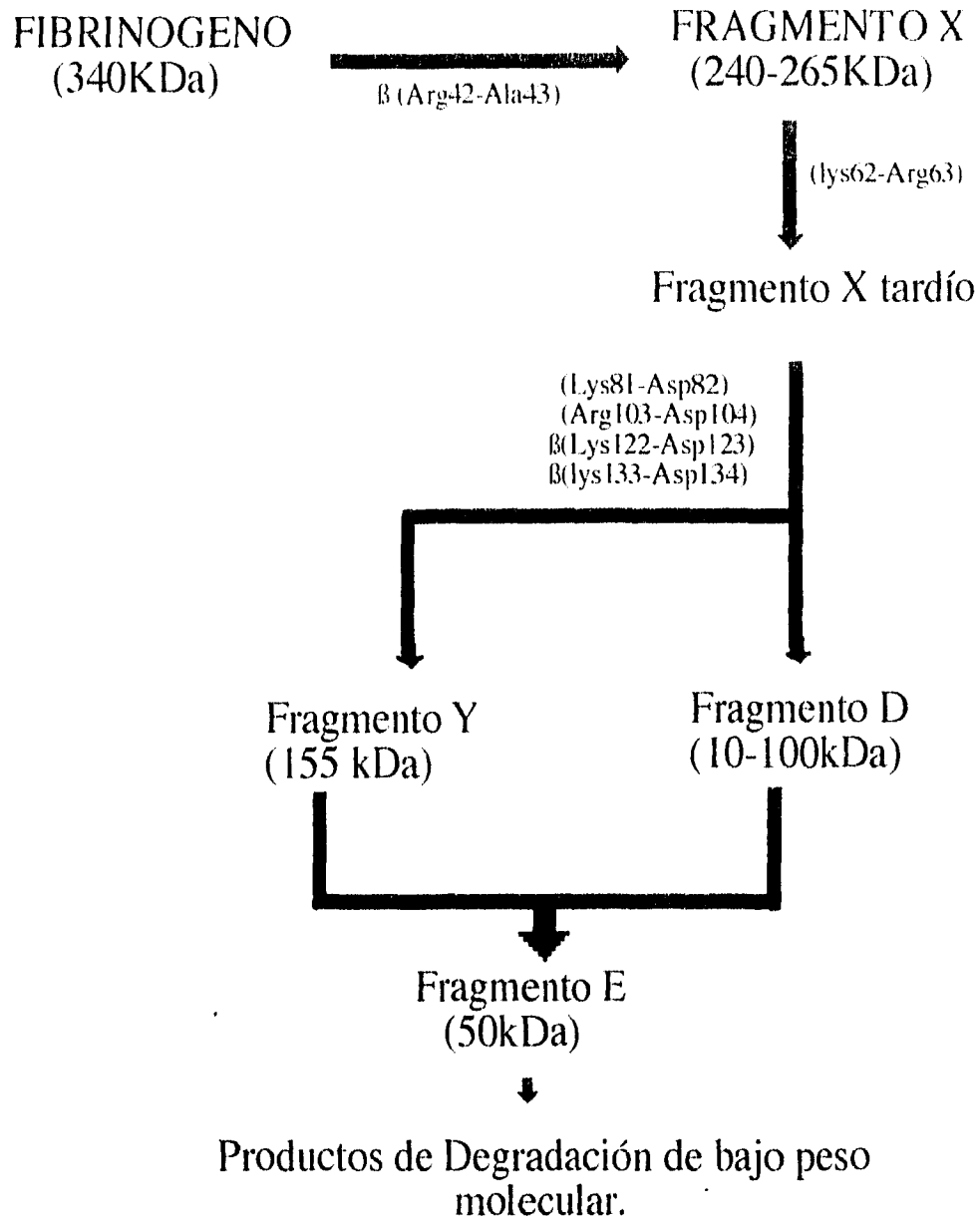


Diagrama 2. Representación de la Degradación del Fibrinógeno.

Además de la estreptocinasa se sabe de la existencia de otras proteínas que actúan de la misma manera, las cuales provienen de diferentes bacterias tales como el *Streptococcus* y *Streptomyces* (31).

INHIBICION DE LA FIBRINOLISIS:

La fibrinólisis puede inhibirse de forma natural o de forma no natural utilizando sustancias sintéticas, tal es el caso del ácido ϵ -aminocapróico (AEAC), que es un aminoácido sintético cuya acción fue estudiada por Mc Nicol en 1964 (32) (es un potente inhibidor con potencial uso en la terapéutica antitrombótica como en trastornos del sistema fibrinolítico). Se ha propuesto que AEAC actúe uniéndose en la parte no catalítica de la molécula de plasminógeno, específicamente en los sitios de unión a lisina de los kringles 1, 2 y 3, inhibiendo así la unión del plasminógeno a fibrina(ógeno), impidiendo que el plasminógeno pueda exponer el sitio sensible a hidrólisis y por lo tanto de origen a la generación de plasmina (33); el AEAC ha sido muy utilizado para inhibir la fibrinólisis en pruebas de laboratorio clínico.

Por otro lado, en forma natural existen en el plasma proteínas que neutralizan la actividad producida por la plasmina denominadas antiplasminas, entre las que se encuentran: los inhibidores de la activación del plasminógeno (PAI-1 y PAI-2) y la alfa-2-antiplasmina (α -2AP); los primeros actúan inhibiendo la activación del zimógeno de la plasmina, mediante la unión de PAI-1 y PAI-2 a las moléculas activadoras del plasminógeno (factor activador de plasminógeno y urocinasa); la segunda (α -2AP), pertenece a la familia de las serpinas y es el inhibidor primario de la plasmina, ya que inhibe específicamente a la molécula activa del plasminógeno mediante un mecanismo que comprende 2 uniones: la primera interacción es de tipo iónico, en la cual se lleva a cabo la unión de la molécula de α -2AP al kringle 1 de la plasmina (reacción reversible) y la segunda es donde ocurre la unión covalente de la α -2AP a la serina 740 de la cadena beta de la plasmina (región catalítica), esta última es una reacción irreversible (Fig. 6). Se han reportado diferentes tipos de anticuerpos que son capaces de inhibir la actividad de α -2AP, entre los cuales se encuentran anticuerpos monoclonales anti-dengue(34) y anti-urocinasa (35) que son capaces de bloquear la unión de la α -2AP a la plasmina. Los anticuerpos anti-dengue como se mencionó anteriormente, fueron reportados por Markoff y cruzan con el zimógeno específicamente en los aa 759-779, esta región se encuentra en la parte catalítica de la plasmina y/o plasminógeno 19 aa

cerca de la serina 740. Nosotros, no descartamos la posibilidad de que tal vez al igual que el anticuerpo, el virus del dengue pueda actuar de manera similar, afectando la actividad del inhibidor por medio de la competencia del inhibidor con la partícula viral, ya sea en la misma región o en sitios muy cercanos a la serina 740, que permitiesen bloquear la unión de la α -2AP y por lo tanto su actividad (alterando el proceso de inhibición se exagera la fibrinolisis).

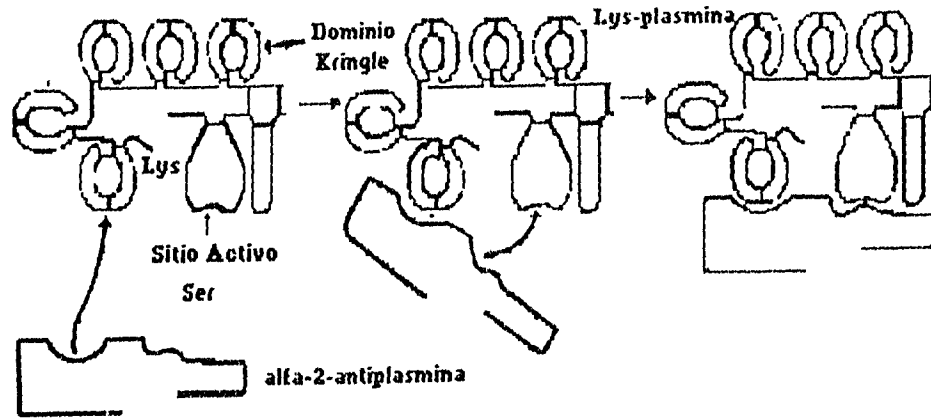


Fig.6. Modelo de inhibición de la plasmina por α -2-antiplasmina.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En base a estos antecedentes, nos propusimos analizar la posible participación del virus del dengue y de la proteína de envoltura viral en la patogenia del Dengue hemorrágico; así como su relación con los procesos de coagulación y/o fibrinolisis (asimismo su regulación) como un elemento importante en el establecimiento de la hemorragia.

El plasminógeno actúa en el proceso de fibrinolisis, dando su activación lugar a la generación de plasmina (proteína encargada de degradar fibrina(ógeno). En la molécula tanto del zimógeno como de la enzima, se encuentran cinco dominios kringle de los cuales sólo uno es indispensable en la formación del complejo ternario [plasminógeno-activador tisular del plasminógeno-fibrina y/o fibrinógeno], encargado de acelerar la generación de plasmina y en consecuencia en la degradación de fibrina(ógeno) (36, 37). Al estar presente este tipo de estructuras (dominios K) en el virus existe la posibilidad de que el mismo

este tipo de estructuras (dominios K) en el virus existe la posibilidad de que el mismo presente una función análoga a estas moléculas. Los niveles séricos tanto de plasminógeno como de fibrinógeno se han encontrado notablemente disminuidos en pacientes con dengue hemorrágico (20), por lo que se propone que se estén degradando, posiblemente como resultado de la activación del plasminógeno. Nosotros proponemos que el virus posiblemente se una al zimógeno y sea capaz de activarlo. Por otro lado, el nivel de activación de plasmina generada es regulado por otra proteína denominada α -2-antiplasmina (α -2AP) y su mecanismo de acción se lleva a cabo en dos pasos: el primero es reversible y consiste en la unión de la molécula al primer kringle de la enzima; mientras en el segundo se une a la región catalítica inhibiendo a la plasmina de manera irreversible. Asimismo el virus del dengue podría competir en ambos pasos en el proceso de inhibición de la fibrinólisis producido por α -2AP, ya que la región de cruce de los anticuerpos en la proteína E, se encuentran 19 aa cerca del sitio de unión de la α -2AP y la plasmina (34).

Con base en lo anterior nosotros proponemos que independientemente del status inmunológico del individuo (es decir la presencia de anticuerpos heterotípicos no neutralizantes), el virus *per se* podría desencadenar la activación del plasminógeno como un fenómeno importante en el establecimiento del proceso fibrinolítico y/o hemorrágico.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Las 2 hipótesis que intentan explicar el establecimiento de los casos hemorrágicos ocasionados por el virus del dengue, están basadas en datos epidemiológicos, asociándose la fiebre hemorrágica por dengue (DHF) con la presencia de anticuerpos heterotípicos no neutralizantes (en el curso de una infección secundaria); sin embargo, se han descrito casos de dengue clásico en el curso de una infección de tipo primario (en la que no existen anticuerpos anti-dengue circulantes), donde las manifestaciones son severas y se presenta el fenómeno hemorrágico y/o choque desconociéndose sus causas. Nosotros proponemos que, independientemente del *status* inmunológico del individuo, es decir la presencia de anticuerpos heterotípicos no neutralizantes, el virus podría ser capaz de desencadenar la activación del plasminógeno como un fenómeno importante en el establecimiento del proceso fibrinolítico y/o hemorrágico.

OBJETIVO GENERAL.

Con base en el planteamiento anterior, nos propusimos como objetivo general llevar a cabo:

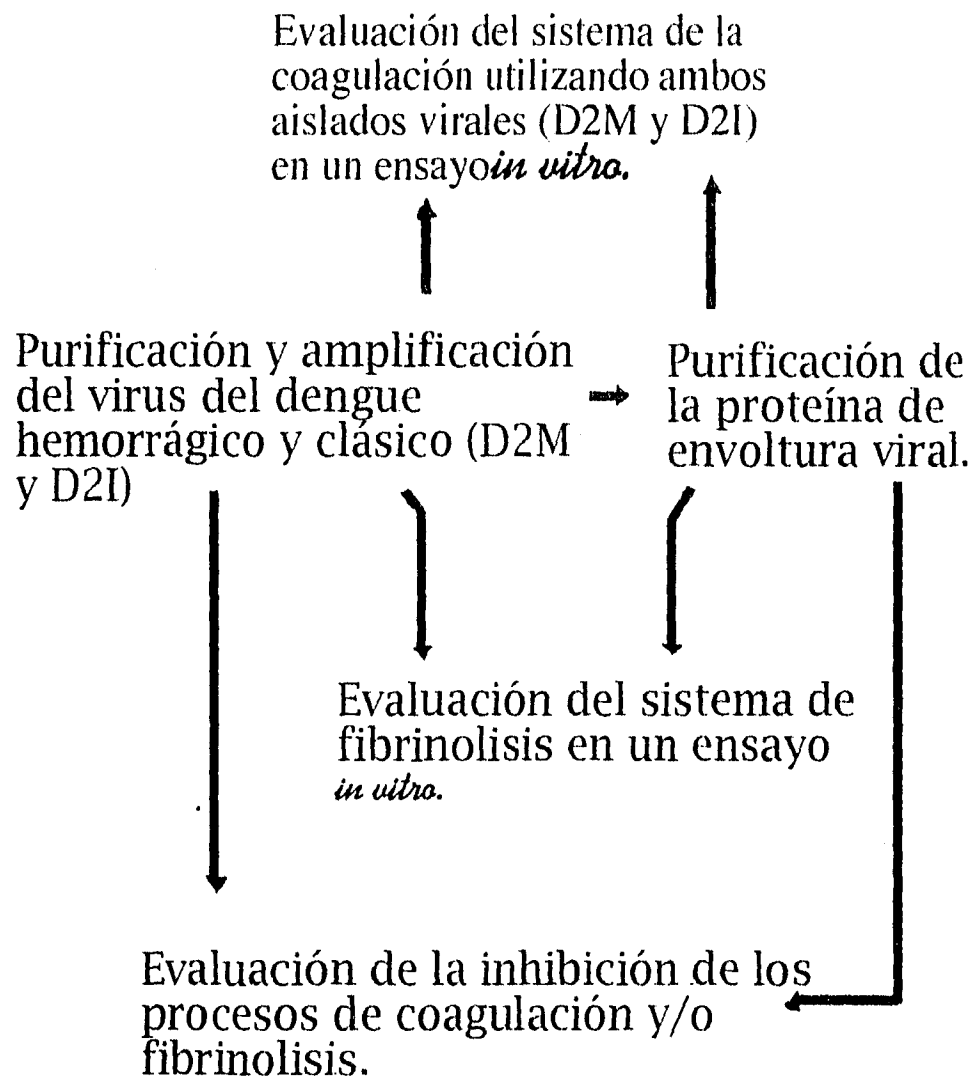
la evaluación de la participación del virus del dengue en el proceso de fibrinólisis como un mecanismo contribuyente en la instalación del fenómeno hemorrágico.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Con base en este objetivo general nos propusimos llevar a cabo los siguientes objetivos particulares:

- 1) Purificar y amplificar tanto una cepa viral procedente de un caso de dengue hemorrágico, como una cepa aislada de un brote de dengue clásico.
- 2) Evaluar *in vitro* la capacidad de generación de plasmina, utilizando ambos aislados virales.
- 3) Analizar la capacidad fibrinolítica mediante ensayos *in vitro* en cada uno de los aislados virales.
- 4) Estudiar la inhibición de la fibrinólisis en presencia de α -2-antiplasmina utilizando ambos aislados virales.
- 5) Purificar la glicoproteína de envoltura viral.
- 6) Evaluar *in vitro* la capacidad de la proteína de envoltura viral de ambos aislados, para activar al plasminógeno.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIALES Y METODOS:

PURIFICACION Y PROPAGACION DE LOS VIRUS:

El virus del dengue serotipo 2, aislado mexicano (D2M), se obtuvo a partir de moscos infectados (donados por el Dr. Duane Gubler de los laboratorios de San Juan, CDC de San Juan, Puerto Rico). Esta cepa (200787) fué aislada de un caso de dengue clásico durante un brote epidémico en el estado de Guerrero en 1983. El dengue 2 Indonesia (D2I), cepa I169, fué aislado a partir de un caso fatal de dengue hemorrágico en 1986. Ambas cepas se propagaron en monocapas confluentes de células de riñón de mono (LLC-MK2), en botellas de 150 cm², las cuales se inocularon a una multiplicidad de infección de 0.1 UFP(unidades formadoras de placa)/Cel. y se incubaron a 37°C en medio mínimo esencial, suplementado con 5% de suero fetal bovino, 0.05% de glutamina y antibiótico. Los cultivos fueron cosechados cuando se observó el máximo efecto citopático, pero antes de que se desprendiera el cultivo celular (generalmente 6-8 días) y posteriormente se clarificaron mediante centrifugación a 200g durante 10 min. con el fin de eliminar detritos celulares. Posteriormente, los virus se concentraron por precipitación utilizando 1/5 del volumen de polietilenglicol al 20% en NaCl al 15% e incubados 12 hrs. a 4°C. Este precipitado fué colectado mediante centrifugación a 2500g durante 45min., el cual posteriormente se disolvió en un amortiguador de fosfatos 10mM pH 7.4 (PBS), formando un stock que se alicuotó en tubos Eppendorf de 1ml, guardándose a -70°C hasta su uso.

TITULACION DEL VIRUS POR ENSAYO DE PLACA LITICA:

Con el objeto de utilizar igual concentración del virus en cada ensayo, inicialmente se tituló el dengue 2 mexicano (D2M) y dengue 2 indonesia (D2I) mediante ensayo de placa lítica (38), para lo cual se inocularon diferentes diluciones del virus (10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} a 10^{-7}) en monocapas de células LLC-MK2 provenientes de riñón de mono, las cuales se mantuvieron en cultivo a 37°C en medio mínimo esencial con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Los cultivos se cubrieron con una capa de agar suplementado con SFB, medio mínimo esencial, DEAE-Dextran, vitaminas, aminoácidos no esenciales y antibióticos. Posteriormente se incubaron durante 7 días a 37°C, al octavo día postinfección, se añadió una solución de (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-bromuro de difeniltetrazolium; azul tiazol) a una concentración de 30mg/ml en NaCl 0.85%, con el objeto de hacer visibles las placas y contar el número de unidades formadoras de placas líticas (UFP).

ENSAYO DE FIBRINOLISIS POR EUGLOBULINAS:

Con el objeto de evaluar si el virus de dengue era capaz de alterar los procesos de coagulación y/o fibrinólisis, se llevó a cabo el ensayo de "fibrinólisis por euglobulinas" utilizando plasma humano, el cual brevemente consiste en lo siguiente:

5ml de sangre completa citratada 0.11M (dil. 1:8), se centrifugaron a 2500 rpm/10 min, separando el plasma del paquete celular. Por cada 0.4ml de plasma obtenido, se adicionaron 7.6ml de agua destilada y 8µl de ácido acético (0.1%), con el objeto de precipitar las proteínas de la fracción beta (dentro de las cuales están comprendidos todos los factores de coagulación y/o fibrinólisis, excepto la protrombina), centrifugándose de nuevo a 3000 rpm/10min; el sobrenadante (que contenía las proteínas de la fracción alfa y gama) se desechó, resuspendiendo el precipitado con 10ml de amortiguador de fosfatos 10mM, pH 7.2. La muestra anterior fué dividida en dos grupos: el primero, fué alícuotado en muestras de 1 ml añadiéndoles 10µl de un stock (1×10^4 U.F.P./ml) del aislado viral (dengue 2 mexicano o dengue 2 Indonesia), incubado a 37°C/30 min, agregando posteriormente 1.5 U.I. de trombina (Sigma, Co.) por muestra con el objeto de inducir la coagulación; al segundo grupo, se le adicionó la trombina antes de la suspensión viral, de igual manera todas las muestras se incubaron a 37°C hasta observar la lisis del coágulo (tiempo normal de 4 a 6hrs). Los controles negativos (sin el virus) contenían además 50µl de ácido aminocapróico [EACA (inhibidor de la fibrinólisis)] 9mg/ml. El control positivo se llevó a cabo de manera similar al control negativo con la adición de 200µl de estreptocinasa 5,000 U.I./ml. Ver diagrama 3.

PREPARACION DE LAS MATRICES DE FIBRINA:

Las matrices de fibrina se prepararon en placas de polipropileno para ELISA de 24 pozos de acuerdo al método de Pannekoek y Col., (36) con algunas modificaciones que brevemente consisten en lo siguiente: Inicialmente para prevenir uniones inespecíficas, los pozos se bloquearon con solución de albúmina (BSA) a una concentración de 20mg/ml en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.4 durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se retiró la solución anterior y se lavaron los pozos dos veces con PBS 10mM pH 7.4 y Tween 20 al 0.05% (v/v) en BSA (1mg/ml) a temperatura ambiente. Finalmente, a cada pozo se le añadieron 100µl de fibrinógeno (Sigma) a una concentración de 10mg/ml más 25µl de trombina humana (Sigma) a una concentración de 3 unidades/ml para dar lugar a la formación de la malla de fibrina. Las matrices de fibrina se dejaron formar durante 16 hrs. a 37°C. Ver diagrama 4.

Diagrama 3. Ensayo de fibrinólisis por euglobulinas.

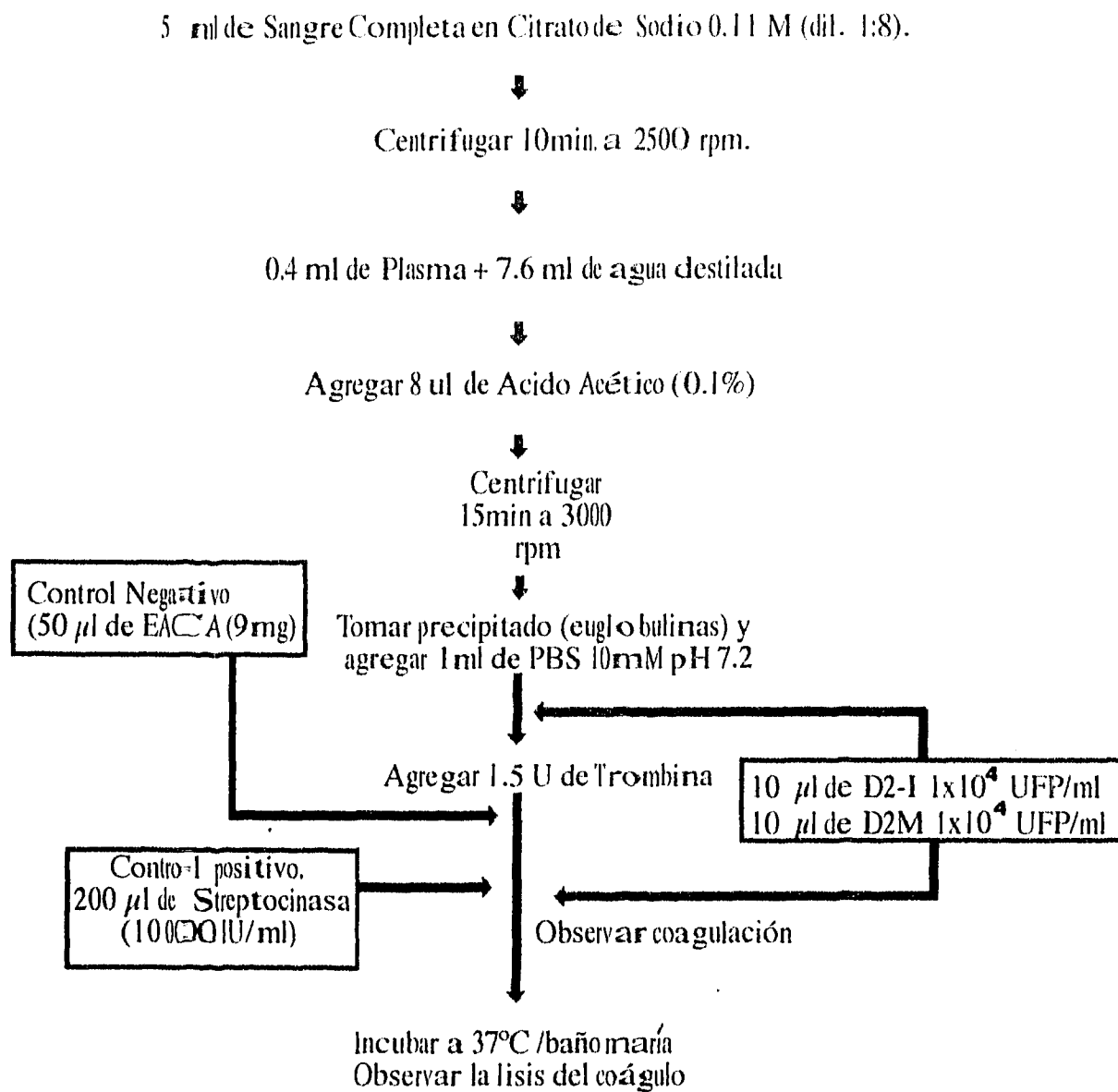


Diagrama 4. Protocolo de fibrinolisis en placa.

SOL. 1: Albúmina Sérica Bovina (BSA) 20 mg/ml
 SOL. 2: Amortiguador de carbonatos 50mM, pH 9.4
 SOL. 3: Amortiguador de fosfatos 10mM, con 0.05% de Tween 20 (v/v), y 1 mg/ml de BSA.
 SOL.4: Tris HCl 0.05M, NaCl 0.11M, pH 7.4 y 0.01% de azida de sodio como conservador.

BLOQUEO DE LA PLACA:

SOL. 1 + 2 (DIL. 1:1) $\xrightarrow{4^{\circ}\text{C, o.n.}}$ Retirar sol. y lavar 2 veces, 3 min. con la sol. 3.

MALLA DE FIBRINA:

100 μl Fibrinógeno (10 mg/ml) + 25 μl Trombina (3 U/ml).
 \downarrow 16 hrs. 37°C
 Malla de fibrina

ACTIVACION DE PLASMINOGENO:

MALLA DE FIBRINA (200 μl Sol. 4) 2-4min/37°C	Streptocinasa 500 μl (5000 U.I./ml)	Plasminógeno cromogénico 100 μl (0.3 μM)	← Control positivo
	D2I 100 μl (1×10^4 U.F.P.)	Plasminógeno cromogénico 100 μl (0.3 μM)	
	D2M 100 μl (1×10^4 U.F.P.)	Plasminógeno cromogénico 100 μl (0.3 μM)	

Controles negativos: fibrina, fibrina + SK, fibrina + plasminógeno, fibrina+D2M y fibrina + D2I.

LEER ABS. A 405 nm Y CORRER PAGE AL 10% EN UN GEL CON SDS EN CONDICIONES NO REDUCTORAS.

ENSAYO DE FIBRINOLISIS A PARTIR DE FIBRINA:

Las matrices de fibrina se lavaron dos veces durante 2 minutos con solución amortiguadora veronal pH 7.4 a 37°C. Al retirar la solución anterior a cada matriz se le agregaron 100 µl de plasminógeno (PLG) cromogénico (el cual, al ser convertido en plasmina, genera una sustancia llamada p-nitroanilina de color amarillo, que absorbe a 405nm), de una concentración de 3µM, 100 µl de estreptocinasa (SK) a 5.000 I.U./ml y 100 µl de virus (1×10^4 PFU/ml) y se incubaron a 37°C en cámara húmeda durante 1, 3, 6, 12 y 24 horas. En cada uno de estos tiempos se midió la absorbancia a 405nm en un lector de ELISA (Awareness Technology Inc.). Los controles negativos contenían únicamente la fibrina o fibrina más 100 µl de SK. Los controles positivos contenían la malla de fibrina más 100 µl de PLG y 100µl de SK. Estos ensayos se realizaron por triplicado. Después de 24 horas las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (PAGE-SDS) en condiciones no reductoras, para identificar los productos de degradación de la fibrina (PDF). Posteriormente los geles se tiñeron con colorante de Coomassie.

ENSAYOS DE FIBRINOLISIS A PARTIR DE FIBRINOGENO:

Estos ensayos fueron realizados utilizando 100 µl de fibrinógeno (10mg/ml) procesándose de manera similar a los anteriores. Se leyó la absorbancia a 405nm y los productos de degradación del fibrinógeno fueron analizados en SDS-PAGE al 10% bajo condiciones no reductoras después de 24 hrs de iniciada la cinética. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

ENSAYO DE ACTIVACION DE PLASMINOGENO EN AUSENCIA DE FIBRINA Y/O FIBRINOGENO:

A cada pozo de la placa de ELISA previamente bloqueado se le adicionaron 100 µl de PLG (3µM). Los controles negativos consistieron en: PLG y PLG más 100 µl de SK (5000 U/ml). Los ensayos muestra contenían: PLG más D2M (1×10^4 U.F.P/ml) y PLG más D2I (1×10^4 U.F.P/ml). Las muestras fueron incubadas a 1, 3, 6, 12 y 24 horas a 37°C en cámara húmeda. En cada uno de estos tiempos se midió la absorbancia a 405nm. Los ensayos anteriores se realizaron por triplicado.

ENSAYO DE INHIBICION DE LA FIBRINOLISIS CON α -2-ANTIPLASMINA:

Estos ensayos fueron realizados utilizando las matrices de fibrina, procesadas de manera similar a las descritas anteriormente. A cada una de las matrices se les agregaron 40 μ l de plasminógeno a una concentración de 0.75 μ M, más 80 μ l de α -2-antiplasmina 0.75 μ M, incubándose 30 seg. a 37°C, después de lo cual se les adicionaron 10 μ l de D2M ó D2I (1×10^4 PFU/ml); los controles positivos contenían además del plasminógeno y α -2-antiplasmina, 10 μ l de estreptocinasa (25U/ml). Los controles negativos se llevaron a cabo de manera similar a los ensayos de fibrinólisis a partir de fibrina (metodología antes descrita); pero con las concentraciones de reactivos óptimas para este ensayo. Finalmente, se leyó la absorbancia a 405nm. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

PURIFICACION DE LA GLICOPROTEINA DE ENVOLTURA VIRAL (GP60):

Con el objeto de evaluar la posibilidad de que la GP60, participara en la activación del plasminógeno, se llevó a cabo la purificación de la misma. Con base en lo anterior, inicialmente se solubilizaron las proteínas virales en diferentes detergentes, para lo cual se establecieron las condiciones óptimas en la recuperación de GP60 con cada uno de estos, de la manera siguiente:

Los virus purificados a partir del sobrenadante de células (LLC-MK2) infectadas (ver purificación del virus), fueron resuspendidos en solución amortiguadora de fosfatos 10mM pH 7.4 y sonicados durante 30seg/3 veces. Una vez sonicadas las muestras se solubilizaron en los siguientes detergentes: SDS al 0.05% (disuelto en amortiguador de muestra para electroforesis), CHAPS 3-[(3-cloramidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato 10mM al 0.6% (disuelto en Tris-HCl 50mM pH 7.4) y n-octil-beta-D-glucopiranosido (n-OG) 20mM al 1% (disuelto en Tris-HCl 10mM/KCl 100mM pH 7.0). Las proteínas solubilizadas con SDS, se analizaron mediante PAGE al 10% con SDS al 0.05%, en condiciones no reductoras. Los sonicados virales que fueron solubilizados con CHAPS y n-OG, se analizaron mediante PAGE al 10% con SDS. La electroforesis se llevó a cabo a corriente constante a 60mA. Al término de la corrida, los geles se tiñeron con colorante de coomassie para identificar la proteína GP60 (60 kDa). Una vez identificada, se determinó el Rf, por medio de la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida de la proteína}}{\text{longitud total del gel}}$$

Posteriormente se cortó la banda correspondiente a la proteína GP60, utilizando como referencia los marcadores de peso molecular. Una vez recuperada la banda se electroeluyó

durante 1.25hrs/20mA, en un amortiguador de glicina y tris-base 12.5mM, con SDS al 0.02% pH 8.0 (utilizando una cámara de electroelución ISCO). Para purificar las proteínas en condiciones nativas, el amortiguador con SDS se adicionó únicamente en el exterior de las celdas; una vez obtenida la muestra, se procedió a su análisis de nuevo mediante PAGE al 10% por duplicado, un gel se tiñó con colorante de coomassie para corroborar que la proteína no estuviera degradada, y el otro se transfirió a papel de nitrocelulosa para verificar su especificidad mediante western-blot, utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra esta proteína (ver adelante).

ANALISIS DE LA GP60 POR WESTERN-BLOT:

La verificación de la especificidad de la glicoproteína de 60 KDa, se llevó a cabo mediante western-blot, de la manera siguiente:

- 1) Tanto el papel de nitrocelulosa como el gel de poliacrilamida (sin teñir), se equilibraron durante 1hr/4°C en solución amortiguadora [tris-base 0.025M, glicina 0.192M, diluido 1:8 en una mezcla agua/metanol 2:1 (v/v)].
- 2) La proteína se transfirió al papel de nitrocelulosa durante 45 min/24 volts, utilizando una fuente de poder Multi-cell-Schauer modelo DX5.
- 3) El papel de nitrocelulosa con la proteína transferida se bloqueó con solución de albúmina sérica bovina al 3%, tween 80 al 0.3% en sol. amortiguadora de fosfatos 10mM pH 7.4 y se incubó durante 16hrs/4°C.
- 4) La solución anterior se retiró, y se agregó el primer anticuerpo monoclonal (anti-GP60) proveniente de ratón, diluido 1:1000 en solución amortiguadora de fosfatos 10mM pH 7.4, incubándose durante 16hrs/4°C. Posteriormente, se retiró el anticuerpo y se lavó 6 veces con sol. amortiguadora de fosfatos, tween 0.3% (sol. de lavado).
- 5) Una vez retirada la sol. de lavado se le adicionó el segundo anticuerpo (anti-ratón peroxidado), diluido 1:2000 en solución amortiguadora de fosfatos 10mM pH 7.4 y se incubó un tiempo mínimo de 3 hrs a temperatura ambiente, cubierto de la luz; posterior a lo cual, se lavó 3 veces con la sol. de lavado.
- 6) Finalmente, las tiras de papel de nitrocelulosa que contenían la proteína se revelaron con una sol. de 2,4-cloronaftol al 0.3% en metanol, hasta observar la aparición de la banda.

ANÁLISIS DE GP60 POR DICROISMO CIRCULAR:

El dicroísmo circular es un método útil que aporta información estructural global de las proteínas [principalmente estructura secundaria], utiliza radiación electromagnética en el intervalo de longitudes de onda de 180-700nm. El análisis de las muestras se lleva a cabo en un espectropolarímetro, el cual utiliza una fuente de luz muy estable de gran intensidad y cuenta con un sistema electrónico que calcula la diferencia entre la absorción de radiación circularmente polarizada en ambos sentidos, convirtiéndola en un valor numérico de elipticidad, graficándola contra la longitud de onda en un registrador. La elipticidad de la luz es una medida de la actividad óptica y se define como el arco tangente del radio menor al eje mayor de la elipse, en la cual es desviada la luz al pasar por la muestra. Su orientación es una segunda indicación de la actividad óptica. A partir de los datos de elipticidad se puede calcular el índice de elipticidad por residuo medio ($[\theta]$), el cual es una medida de actividad óptica que depende de la concentración de la muestra y se estima utilizando una masa molecular de 110g/mol^{-1} por residuo, de acuerdo a la siguiente relación:

$$[\theta] = 100.\theta/C.l.$$

donde: $[\theta]$ = índice de elipticidad molar ($\text{grados.cm}^2/\text{decimol}^{-1}$)

θ = elipticidad

C = concentración

l = longitud del recorrido óptico (celda)

Basados en el índice de elipticidad por residuo medio, se puede determinar el contenido de estructura secundaria mediante un ajuste de mínimos cuadrados a los espectros de Hennessey y Johnson (39).

Los espectros de dicroísmo circular combinados con la predicción de estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos, reflejan la conformación molecular de una proteína ayudando a elucidar la estructura de proteínas que no han sido cristalizadas.

Paralelamente a los ensayos anteriores, se llevó a cabo el análisis de la proteína de envoltura del virus del dengue purificada mediante dicroísmo circular, con el objeto de evaluar la posible pérdida en la estructura secundaria y probablemente en su funcionalidad, durante la purificación. Este análisis fue llevado a cabo por la Dra. Adela Rodríguez Romero del Instituto de Química, utilizando un espectropolarímetro Jasco-A-500.

ENSAYO DE FIBRINOLISIS A PARTIR DE FIBRINA CON GP60:

Este ensayo se llevó a cabo con el objeto de evaluar, la participación de la GP60 en la activación del plasminógeno y brevemente consistió en lo siguiente:

A cada matriz de fibrina (metodología antes descrita), se agregaron 100µl de PLG 3µM, 100µl de SK 50,000 U.I/ml y 50µl de GP60 purificada a una concentración de 100mg/ml. Las muestras se incubaron a 37°C en cámara húmeda durante 1,3,6,12 y 24 hrs. En cada uno de estos tiempos, se midió la absorbancia a 405nm en un lector de ELISA. Los controles negativos, contenían únicamente fibrina o fibrina más 100µl de SK; a los controles positivos, además de la malla de fibrina, se adicionaron 100µl de PLG y 100µl de SK. Estos ensayos se realizaron por triplicado. Después de 24hrs, las muestras fueron analizadas mediante PAGE al 10% con SDS en condiciones no reductoras, con el objeto de identificar los productos de degradación de la fibrina, ya una vez teñidos los geles con colorante de comassie.

ENSAYO DE ACTIVACION DE PLASMINOGENO UTILIZANDO GP60:

Con el objeto de evaluar si la GP60 purificada era capaz de activar al PLG al igual que el virus completo, se llevaron a cabo los siguientes ensayos:

A cada pozo de la placa de ELISA previamente bloqueada, con solución de albúmina 20mg/ml en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.4 durante toda la noche a 4°C, se adicionaron 100µl de PLG 3µM y 50µl de GP60 100mg/ml. Los controles negativos consistieron en 100µl de PLG 3µM y PLG más 100µl de SK 5,000 U.I/ml. Las muestras fueron incubadas 1,3,6 y 12 hrs/37°C en cámara húmeda. En cada uno de estos tiempos se midió la absorbancia a 405nm. Los ensayos se realizaron por triplicado.

ANALISIS ESTADISTICO:

Los resultados de los ensayos realizados se analizaron estadísticamente calculando el porcentaje de activación a partir de las medias, el error estándar y un análisis de significancia (T-student) de las muestras procesadas por triplicado, tomando como base la absorbancia máxima, generada por el control positivo y los virus [medida a las 24 hrs, en el caso de los ensayos realizados con el virus completo].

Los resultados obtenidos con la GP60 purificada se analizaron estadísticamente calculando la media y el error estándar de cada evento procesado por triplicado.

RESULTADOS.

EFFECTO DEL VIRUS DEL DENGUE EN EL PROCESO DE COAGULACION Y/O FIBRINOLISIS.

En ausencia de un modelo de ensayo que nos permitiera evaluar la posible alteración de los procesos de coagulación y/o fibrinólisis, provocados por el virus de dengue, se llevó a cabo el ensayo de "fibrinólisis por euglobulinas", utilizando plasma humano. Este ensayo se basó en la precipitación de las proteínas que están comprendidas en la fracción beta (denominadas "euglobulinas"), en la cual están presentes todas las proteínas plasmáticas que participan en los procesos de activación de complemento, coagulación y/o fibrinólisis, con excepción de la protrombina (zimógeno de la trombina). La función de la trombina es generar el coágulo de fibrina, mediante la hidrólisis específica del fibrinógeno (40). Este ensayo nos permitió evaluar al mismo tiempo, el proceso de coagulación y el de fibrinólisis. Con base en lo anterior, se agregó el virus a dos niveles: en el primero, se adicionó el mismo antes de la trombina, es decir, antes de inducir la coagulación, con lo cual pretendíamos valorar si el virus era capaz de inhibir dicho proceso, sin embargo, no se logró inhibir (ver tabla 1, presencia de coágulo a las 0 hrs); en el segundo, el virus se añadió después de agregar la trombina. En estos ensayos observamos que el virus de la cepa proveniente de un caso fatal de dengue hemorrágico (dengue 2 Indonesia) fué capaz de acelerar la fibrinólisis, ya que el coágulo se degradó totalmente a las 6 hrs de iniciado el proceso; en comparación con la cepa de dengue clásico (dengue 2 mexicano), en la cual, aún después de 6hrs el coágulo estaba presente, así como en el control negativo. Estos resultados nos sugirieron que el proceso de la coagulación no estaba afectado y sí, el de fibrinólisis; sin embargo, el nivel de los mismos fué cualitativo, por lo que se decidió llevar a cabo la evaluación utilizando un método cuantitativo.

Tabla 1. Activación de la fibrinólisis por el virus del dengue.

Ensayo	Presencia de coágulo (0 hrs.)	Presencia de coágulo (2 hrs.)	Presencia de coágulo (4 hrs.)	Presencia de coágulo (6 hrs.)
Control negativo (sin estreptocinasa)	+	+	+	+
Control positivo (con estreptocinasa)	+	+	-	-
Dengue 2 Indonesia	+	+	+/-	-
Dengue 2 mexicano	+	+	+	+/-

NOTA: +/- indica que el coágulo no se había degradado totalmente.

ACTIVACION DEL PLASMINOGENO Y DE LA FIBRINOLISIS POR EL VIRUS DEL DENGUE EN PRESENCIA DE FIBRINA.

Mediante el ensayo de "fibrinólisis por euglobulinas", sabíamos que el virus del dengue tenía la capacidad de acelerar el proceso fibrinolítico; mecanismo que depende de la activación del plasminógeno, por lo que nos propusimos realizar ensayos de fibrinólisis a partir de fibrina, los cuales se llevaron a cabo con dos objetivos: primero, determinar si el virus del dengue presentaba la capacidad de activar al plasminógeno y segundo, evaluar la posible diferencia de comportamiento entre el aislado de dengue clásico (D2M) y el de dengue hemorrágico (D2I). Con base en lo anterior utilizamos un compuesto cromogénico (acuacolor plasminogen), el cual presenta la característica de que al ser convertido el plasminógeno en plasmina, genera una sustancia llamada p-nitroanilina (amarilla) que absorbe a 405nm, permitiéndonos por una lado cuantificar el fenómeno y por otro contar con un control positivo (Fibrina + estreptocinasa + plasminógeno), en el cual la estreptocinasa activa al plasminógeno, mediante un mecanismo no catalítico (37). Previamente se establecieron las condiciones óptimas para llevar a cabo los ensayos (tabla 2).

Tabla 2. Condiciones óptimas para los ensayos de fibrinólisis.

REACTIVOS	CONDICIONES ENSAYADAS	CONDICIONES OPTIMAS
Estreptocinasa (5000 U.I/ml)	500, 1000 y 1,500 U.I.	500 U.I.
Plasminógeno (3μM)	0,3,0.45 y 0.6 μ mol	0.3 μ mol.
Dengue 2 mexicano	1×10^3 - 1×10^5 U.F.P.	1×10^4 U.F.P.
Dengue 2 Indonesia	1×10^3 - 1×10^5 U.F.P.	1×10^4 U.F.P.

Bajo las condiciones óptimas de nuestro ensayo, se encontraron diferencias significativas a una hora de iniciada la cinética, entre los controles negativos (F y F+SK) y las muestras que contenían ambos aislados virales (F+PLG+D2M y F+PLG+D2I), que presentaban una actividad del 23%, la cual fué similar a la presentada por el control positivo (F+PLG+SK) con una activación del 20%. Lo anterior nos dió la pauta para efectuar la cinética a tiempos largos y determinar el comportamiento a seguir, en las muestras que contenían el virus comparadas con el control. La actividad máxima se presentó en los 3 casos a las 24 horas de iniciada la cinética, tiempo en el cual se observó el 100% de activación de plasminógeno (ver tabla 3). El comportamiento observado fué similar al control positivo (como se puede apreciar en la fig. 7), los controles negativos permanecieron sin cambio (con rangos de absorbancia de 0.32 ± 0.05). La cinética que presentaron las muestras que contenían ambos aislados virales, fué similar a la del control positivo, demostrando con ésto que el virus (al igual que la estreptocinasa) fué capaz de unirse al plasminógeno y activarlo, dando lugar a la generación de plasmina (enzima encargada de degradar a la fibrina). La cinética de generación de plasmina en el curso del tiempo, presentada por el control positivo, es comparable a la reportada por Lotternberg (41).

Tabla 3. Cinética de activación de plasminógeno en presencia de fibrina.

Tiempo (hrs.)	F+SK+PLG (%± E.S*)	F+PLG+D2M (%±E.S)	F+PLG+D2I (%±E.S)
1	20.7±0.1	23.8±2.9	23.4±1.7
2	36.2±4.2	41.2±4.8	40.7±3.7
6	64.2±1.4	79.6±2.5	77.2±2.8
12	96.6±0.1	98.3±0.4	98.9±0.4
24	100±0.9	100±0.5	100±0.5

NOTA. Los resultados muestran el porcentaje del promedio de tres muestras independientes ± 1 error estándar (E.S.*), n=3. F=fibrina; SK=estreptocinasa; PLG=plasminógeno; D2M=dengue 2 mexicano; D2I=dengue 2 Indonesia.

Al correr las muestras anteriores en un SDS-PAGE al 10% en condiciones no reductoras, 24 hrs. después de iniciados los ensayos, se observaron tres bandas compartidas de un peso molecular aproximado de 15, 25 y 30 KDa entre el control positivo y las muestras que contenían los virus [(D2M y D2I). Fig. 8]. Estas bandas podrían corresponder a productos de degradación de la fibrina(ógeno) (42).

Activación de plasminógeno en presencia de fibrina

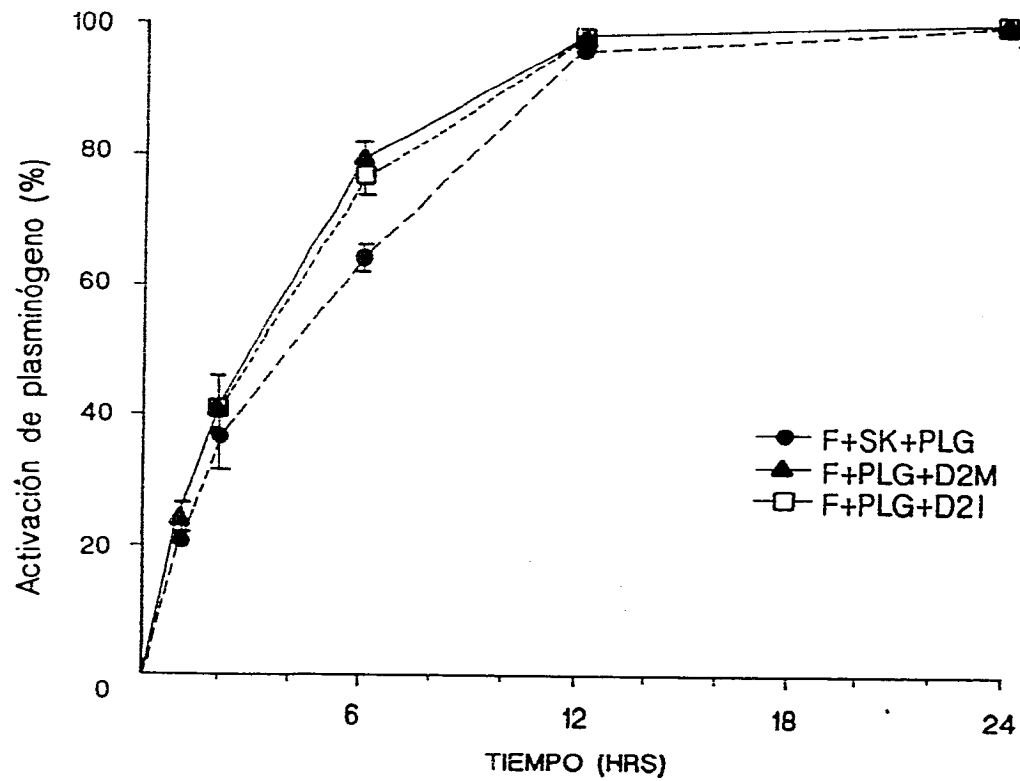


Fig. 7. Cinética de activación de plasminógeno en presencia de fibrina. F=fibrina; SK=estreptocinasa PLG=plasminógeno; D2M=dengue 2 mexicano; D2I=dengue 2 indonesia.

Ensayos de fibrinolisis a partir de fibrina.

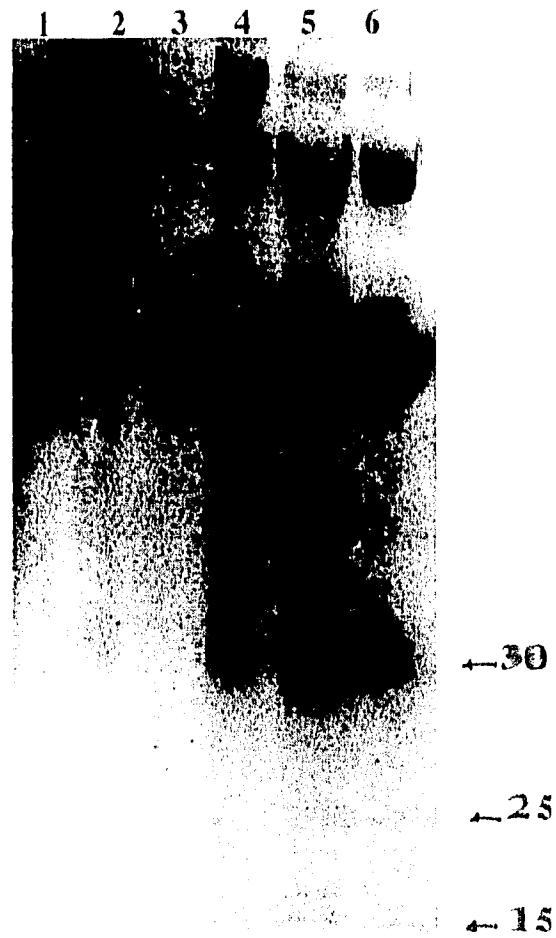


Fig. 8. Análisis de los productos de degradación de la fibrina por SDS-PAGE en condiciones no reductoras.

- 1) Fibrina (F)**
- 2) F + Estreptocinasa (SK)**
- 3) F + Plasminógeno (PLG)**
- 4) F+SK+PLG**
- 5) F+PLG+Dengue 2 Mexicano**
- 6) F+PLG+Dengue 2 Indonesia**

ACTIVACION DEL PLASMINOGENO Y DE LA FIBRINOLISIS POR EL VIRUS DEL DENGUE EN PRESENCIA DE FIBRINOGENO.

Tomando en cuenta, que no en todos los casos de dengue existe coagulación intravascular diseminada como establecimiento previo a la hemorragia (32) y los reportes, en donde se ha observado que el fibrinógeno le confiere a la estreptocinasa una actividad óptima, potencializando su acción sobre el plasminógeno, se llevaron a cabo los mismos ensayos de fibrinólisis en presencia del fibrinógeno soluble, con el objeto de evaluar si ambos aislados virales, podrían incrementar la activación del plasminógeno de manera similar a la estreptocinasa. La actividad del control positivo (Fg+SK+PLG) con fibrinógeno, resultó mayor que en presencia de fibrina (fig. 9), lo anterior nos confirmó que la estreptocinasa presenta su actividad óptima en presencia de fibrinógeno. Por otro lado, la activación de plasminógeno con los virus, no cambió al estar presente el fibrinógeno, estos resultados fueron similares a los obtenidos en los experimentos realizados con fibrina. El virus procedente de un aislado clásico, presentó mayor actividad que la cepa de dengue hemorrágico (de aproximadamente 10%), esta diferencia se mantuvo a lo largo de toda la cinética (fig. 9), de lo cual podríamos proponer que la unión de D2M con el plasminógeno en presencia de fibrinógeno, se llevó a cabo más rápidamente que la unión de D2I, sin embargo, tomando en cuenta que el proceso de fibrinólisis es muy complejo y en este actúan tanto activadores, como inhibidores, no podemos evaluar biológicamente (aunque tenga significancia estadística), esta diferencia (ver valores presentados en la tabla 4), ya que fué un cambio muy sutil con respecto al control positivo. Los controles negativos (FG y FG +SK) permanecieron sin modificación.

Para comprobar que la hidrólisis del fibrinógeno se llevó a cabo en forma específica por la plasmina generada, se realizó una SDS-PAGE al 10% en condiciones no reductoras con las muestras anteriores. En la fig. 10 se pueden apreciar tres bandas compartidas entre el control positivo (Fg+PLG+SK) y los ensayos que contenían los virus (Fg+PLG+D2M y Fg+PLG+D2I), de un peso molecular aproximado de 50, 30 y 25 KDa, la primera podría corresponder al fragmento E de los productos de degradación de fibrinógeno (PDF), ya que presenta exactamente el mismo peso molecular y las siguientes podrían ser PDFs de bajo peso molecular, tomando en cuenta que el fragmento de 50 KDa puede continuar hidrolizándose a productos de menor peso.

En base al comportamiento de las cinéticas realizadas en presencia de fibrina y de fibrinógeno y a los resultados obtenidos a partir de los geles de poliacrilamida, donde se pueden apreciar claramente la presencia de bandas compartidas (25, 30 y 50 KDa.) entre el

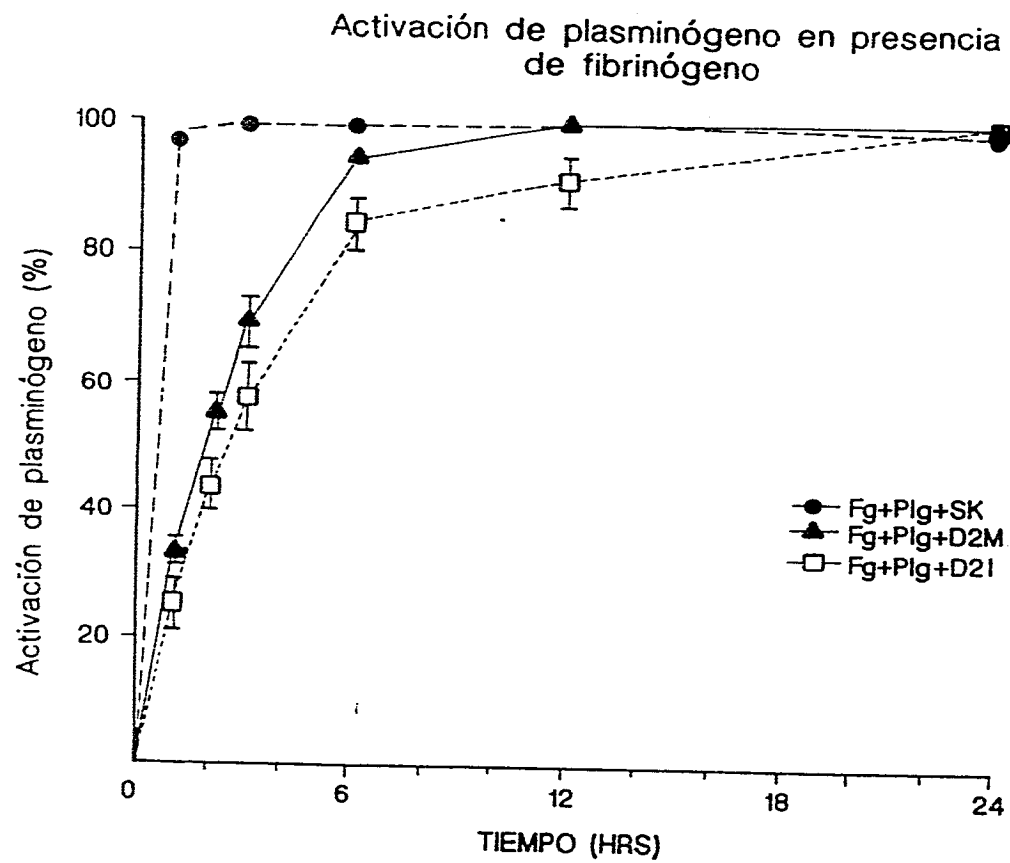


Fig. 9. Cinética de activación de plasminógeno en presencia de fibrinógeno Fg=fibrinógeno; PLG=plasminógeno; SK=estreptocinasa; D2M=dengue 2 mexicano; D2I=dengue 2 indonesia

Ensayos de Fibrinólisis a partir de Fibrinógeno.

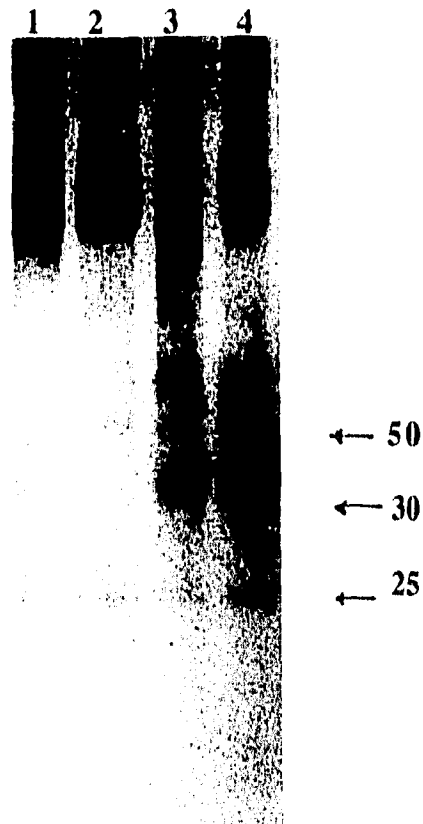


Fig.10. Análisis de los productos de degradación del Fibrinógeno por SDS-PAGE (10%) en condiciones no reductoras.

- 1) F + SK + PLG**
- 2) Fg + SK + PLG**
- 3) Fg + PLG + D2M**
- 4) Fg + PLG + D2I**

control positivo y los aislados virales, podemos proponer la participación directa del virus en la activación del plasminógeno y por consiguiente en el fenómeno de fibrinólisis.

Tabla 4. Cinética de activación de plasminógeno en presencia de fibrinógeno.

Tiempo (HRS.)	Fg+SK+PLG (%±1 E.S*)	Fg+PLG+D2M (%±1 E.S)	Fg+PLG+D2I (%±1 E.S)
1	96.9±0.3	33.0±1.2	25.1±3.7
2	97.0±0.3	55.7±3.0	43.5±3.5
3	99.4±0.3	69.7±3.9	57.5±6.5
6	98.5±0.1	94.9±0.8	83.9±3.2
12	100±0.2	100±0.3	91.7±3.2
24	98.1±0.2	99.8±0.4	100±0.7

NOTA. Los resultados muestran el porcentaje del promedio de tres muestras independientes ±1 error estándar (E.S.*), n=3 Fg=fibrinógeno; SK=estreptocinasa; PLG=plasminógeno; D2M=dengue 2 mexicano y D2I=dengue 2 Indonesia.

ACTIVACION DE PLASMINOGENO POR EL VIRUS DEL DENGUE EN AUSENCIA DE FIBRINA(ÓGENO):

Aunque el fenómeno descrito anteriormente fué similar al comportamiento observado con la estreptocinasa (mecanismo que depende de la presencia de fibrina y/o fibrinógeno), no sabíamos si la activación del plasminógeno en el caso de los aislados virales también era dependiente de fibrina(ógeno) y por lo tanto pudiese actuar mediante un mecanismo similar a la SK. Con base en lo anterior, procedimos a realizar las cinéticas de activación de plasminógeno, en ausencia de fibrina(ógeno). Como se puede observar (fig. 11), en presencia de ambos aislados virales, se llevó a cabo la activación de plasminógeno, la cual fué de 90.6% para D2M y 84.5% para D2I, a las 24 hrs de iniciada la cinética, con una diferencia estadísticamente significativa comparada con el control (SK + PLG), el cual a este tiempo presentaba una actividad de 19.6% (ver tabla 5). En este caso los controles negativos (PLG, D2M y D2I) permanecieron sin cambio.

Tabla 5. Cinética de activación de plasminógeno en ausencia de fibrina y/o fibrinógeno.

Tiempo (HRS)	PLG+SK (%±E.S.*)	PLG+D2M (%±1 E.S.)	PLG+D2I (%±1 E.S)
1	-	15.7±0.2	16.8±0.7
2	-	20.4±0.6	20.0±0.5
3	-	24.5±0.6	24.6±0.7
6	9.7±0.6	43.5±1.3	42.6±0.4
24	19.6±1.0	90.6±0.8	84.5±1.9

NOTA. Los resultados muestran el porcentaje del promedio de tres muestras independientes ±1 error estándar (E.S.*), n=3. PLG=plasminógeno; SK=estreptocinasa; D2M=dengue 2 mexicano y D2I=dengue 2 Indonesia.

La activación de plasminógeno en los dos aislados virales fué similar a la presentada con SK en presencia de fibrina y/o fibrinógeno (F/Fg); sin embargo, en el caso de los virus, la activación de plasminógeno se presentó de manera independiente a la presencia de F/Fg, lo que nos sugirió un mecanismo de activación diferente, reflejando que el virus *per se* presenta la capacidad de unirse al plasminógeno y activarlo, participando en la instalación del fenómeno hemorrágico; no obstante, no encontramos diferencias (o fueron muy sutiles con respecto al control), entre las dos cepas virales que nos ayudara a disecar el fenómeno.

Durante la generación de plasmina, el plasminógeno pierde un péptido de 77 a.a. [transformándose de glu-plasminógeno a lys-plasminógeno, ambos zimógenos inactivos de la plasmina (23)], por lo cual baja el peso molecular de 92 a 85 KDa (43). Sin embargo, el plasminógeno cromogénico que nosotros utilizamos, carece ya de esos 77 KDa, por lo que no se llevaron a cabo los análisis de estas muestras mediante SDS-PAGE.

INHIBICION DE LA FIBRINOLISIS.

La activación del plasminógeno en forma natural depende de la presencia de un complejo ternario compuesto por fibrina(ógeno)- plasminógeno-activador tisular del plasminógeno o bajo condiciones patológicas fibrina(ógeno)-plasminógeno-estreptocinasa (44). La plasmina generada permanece unida al polímero de fibrina hasta la disolución del coágulo. Su

inhibidor natural denominado α -2-antiplasmina, se encuentra en el torrente sanguíneo e inactiva a la plasmina, previniendo la degradación de fibrina(ógeno).

La α -2-antiplasmina inhibe a la enzima en dos pasos: el primero, depende de la unión del Kringle 1 del plasminógeno y la molécula inhibidora, siendo esta una reacción que requiere de la presencia de sitios libres de unión a lisina (región funcional de los kringles), el cual es un paso reversible, y el segundo (irreversible), consiste en la unión del inhibidor a la cadena beta de la plasmina, específicamente en la serina 740, que se encuentra 19 aa hacia el amino terminal del sitio activo. Esta región corresponde al sitio donde los anticuerpos anti-dengue circulantes cruzan con el plasminógeno (aa 759-779) (34). La inhibición en el caso de la estreptocinasa, también depende de que se encuentre libre la serina antes mencionada, ya que se ha reportado que el inhibidor compite con la SK por la misma región (aa.562-791 del plasminógeno) (45).

Con el propósito de analizar la posibilidad de que el virus compitiese con el inhibidor y que por lo tanto la actividad de la α -2-antiplasmina fuera inhibida por el mismo, se llevaron a cabo los ensayos de competencia con el inhibidor y asimismo, poder analizar el mecanismo probable de inhibición en presencia del virus, evaluando las diferencias de comportamiento biológico, entre ambas cepas virales (que nos mostrara por qué una presentaba la capacidad de causar hemorragia y la otra no). Inicialmente se establecieron las condiciones óptimas para llevar a cabo los experimentos de inhibición con α -2-antiplasmina, probando tanto diferentes concentraciones de los reactivos (estreptocinasa y plasminógeno), como de los virus (Tabla 6).

Tabla 6. Condiciones óptimas para los ensayos de inhibición de la fibrinólisis.

Reactivos	Condiciones ensayadas	Condiciones óptimas
Estreptocinasa (5000 U.I/ml)	0.125-0.5 U.I.	0.125 U.I.
Plasminógeno (3μM)	0.0003-0.3 μ M	0.003 μ M
Dengue 2 mexicano	1x10 ³ -1x10 ⁵ U.F.P.	1X10 ⁴ U.F.P.
Dengue 2 Indonesia	1x10 ³ -1x10 ⁵ U.F.P.	1X10 ⁴ U.F.P.
Alfa-2-antiplasmina (0.075μM)	0.0006-0.03 μ M	0.006 μ M

Como se puede observar (tabla 7), al evaluar el fenómeno de inhibición en presencia de α -2-antiplasmina, en el control positivo (F+SK+PLG), disminuyó la generación de plasmina a lo largo de la cinética, presentando una actividad de 18.9% a 1 hora de iniciado el ensayo, comparado con un 90% en ausencia del inhibidor. Por otro lado, el aislado de dengue clásico (D2M), se comportó de manera similar al control positivo, con una activación del 22.3% a la hora de iniciada la cinética, en comparación con un 79% de actividad en ausencia del inhibidor. Sin embargo, la cepa de dengue hemorrágico (D2I), presentó el efecto totalmente contrario, ya que en presencia de α -2-antiplasmina (antiPLM) en lugar de abatirse la conversión de plasmina, se incrementó notablemente la generación de la misma de un 89.3% a 99.4% a la hora, la cual continúa incrementándose con respecto al tiempo de la cinética, obteniendo un valor máximo del 100% a las 3 hrs. de iniciado el ensayo. Nosotros proponemos que posiblemente la accesibilidad de los dos aislados virales por el plasminógeno no fuese la misma, dado que para que se una el inhibidor, es condición previa que la enzima se encuentre en forma de plasmina y bajo nuestras condiciones, al tiempo que se generaba la enzima activa se encontraban compitiendo el virus y el inhibidor. Como se puede comparar (tabla 7), en el caso de D2I la capacidad del virus para activar al plasminógeno, fué mayor en presencia del inhibidor, por lo cual en lugar de bajar la conversión del plasminógeno se exacerbó la generación de la enzima.

Tabla 7. Cinética de activación de plasminógeno en presencia de α -2-antiplasmina.

TIEMPO (HRS.)	SK		D2M		D2I	
	F+PLG+SK	F+PLG+SK + α -2-antiPLM	F+PLG+D2M	F+PLG+D2M + α -2-antiPLM	F+PLG+D2I	F+PLG+D2I + α -2-antiPLM
	(% activación +/- 1 E.S.)*		(% activación +/- 1 E.S.)*		(% activación +/- 1 E.S.)*	
0.05	83.1 +/- 0.57	23.6 +/- 0.38	76.9 +/- 0.71	26.3 +/- 2.13	81.4 +/- 1.12	87.9 +/- 2.24
1	90.2 +/- 2.51	18.9 +/- 0.07	79.0 +/- 2.12	21.3 +/- 1.18	89.3 +/- 3.93	99.4 +/- 1.40
3	94.2 +/- 2.76	11.9 +/- 0.15	90.0 +/- 1.18	16.3 +/- 2.15	94.6 +/- 1.61	107.0 +/- 1.96
6	97.2 +/- 1.27	8.5 +/- 1.78	98.8 +/- 0.61	13.0 +/- 1.85	96.3 +/- 0.86	112.9 +/- 1.28
24	100 +/- 2.26	1.5 +/- 0.77	100 +/- 3.56	7.3 +/- 1.47	100 +/- 2.08	117.0 +/- 1.40

Los datos muestran el promedio del porcentaje de activación de plasminógeno de 3 muestras independientes +/- 1 error estándar (E.S.).

F=fibrina; SK=estreptocinasa; PLG=plasminógeno; D2M=dengue 2 mexicano
D2I=dengue 2 Indonesia; α -2-antiPLM= α -2-antiplasmina. (0.001 < p < 0.005).

PURIFICACION DE LA GP60:

Los virus purificados (ver material y métodos), se sonicaron y solubilizaron utilizando diferentes detergentes, con el objeto de establecer las condiciones óptimas en la purificación de la proteína de envoltura viral, las cuales se muestran a continuación:

Tabla 8. Condiciones ensayadas para la solubilización de la GP60.

DETERGENTE	SDS	CHAPS	n-OG
Concentración (%)	1, 0.1, <u>0.05</u>	1, 0.8 y <u>0.6</u>	2.0, <u>1.0</u> y 0.5
Temperatura (°C)	25, <u>65</u> y 99	25 y <u>4</u>	24 y <u>4</u>
Tiempo (min.)	10, <u>20</u> y 30	<u>30</u> y 60	30 y <u>60</u>
Rendimiento (%)	16, <u>20</u> , 15	16, 16, <u>16</u>	16, <u>18</u> , 14

NOTA: Las condiciones óptimas se representan subrayadas. n-OG= n-octil-beta-D-glucopiranosido.

Inicialmente se solubilizó la proteína E en SDS al 0.05% y su purificación se llevó a cabo utilizando el mismo detergente (fig. 12); sin embargo, al ser analizada mediante dicroísmo circular, se obtuvieron bajas intensidades en las señales en el espectro de 260-195nm, así como un bajo índice de elipticidad (% de α hélices y hojas β), lo que nos indicaba que la estructura secundaria de la proteína se estaba perdiendo y con esto tal vez, también su funcionalidad, en base a lo cual decidimos substituir al SDS por CHAPS, el cual es un derivado del taurocolato de sodio, que se utiliza específicamente en la purificación de proteínas de membrana, además de presentar una concentración micelar crítica elevada (46), lo que implica que puede ser eliminado más fácilmente. Aunque se obtuvo un rendimiento menor de la GP60, con respecto a la solubilización con SDS (ver tabla 8), nosotros esperábamos que las proteínas obtenidas, presentaran menor pérdida de estructura secundaria, con base en las características del CHAPS antes mencionadas. Al analizar esta muestra, mediante PAGE al 10% en condiciones nativas, se observaron 2 bandas de peso molecular muy cercano a los 60 KDa (probablemente isoformas de la proteína), que podrían corresponder a GP60; no obstante, al realizar el análisis de dicroísmo circular de la misma,

Solubilización del extracto viral de dengue con SDS.

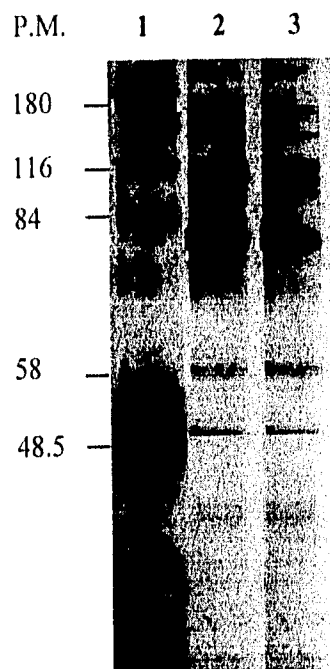


Fig. 12 PAGE al 10% con SDS
en condiciones no reductoras.
1) Marcadores de peso molecular (KDa).
2) Extracto viral de dengue 2 mexicano.
3) Extracto de dengue 2 indonesia.

se observó una baja intensidad en las señales del espectro de 260-195nm, así como en el índice de elipticidad, indicándonos nuevamente una posible desnaturalización de la proteína, por lo que nos propusimos realizar de nuevo su purificación. Finalmente, seleccionamos un detergente no iónico, llamado n-oetil-beta-D-glucopiranosido (n-OG), el cual presenta las siguientes características: no desnaturaliza proteínas, es uno de los detergentes de elección en la solubilización de proteínas de membrana, presenta una concentración micelar mayor que el CHAPS, lo que indica que la interacción proteína-detergente, no es fuerte y puede ser liberado más fácilmente. La proteína obtenida con n-OG [47 (ver fig. 13)], fué analizada mediante western-blot, utilizando anticuerpos monoclonales específicos para GP60 y como se puede observar (fig. 14), el anticuerpo utilizado fué capaz de reconocer específicamente las 2 bandas que correspondieron a la GP60. Paralelamente la muestra se analizó mediante dicroísmo circular (48), en el espectro de 260-195nm (fig. 15) se observaron 2 picos negativos que corresponden a 220 y 207nm; se realizó el cálculo del índice de elipticidad correspondiendo a un 11.2% de hélices alfa, 28% de estructura no peptídica y 18% de estructuras beta-antiparalelas (lo cual estaba en concordancia con los análisis teóricos de predicción de estructura supersecundaria), sugiriéndonos que la GP60 purificada se encontraba estructuralmente similar a la nativa.

ACTIVACION DE PLASMINOGENO POR GP60 EN PRESENCIA DE FIBRINA.

Una vez purificada la proteína (metodología antes descrita), procedimos a realizar los ensayos de fibrinólisis en presencia de fibrina, con el objeto de evaluar la actividad de GP60 en la activación de PLG y en consecuencia de la plasmina generada sobre la fibrina. Nosotros planteábamos la posibilidad de que la GP60 pudiese ser la responsable de la interacción con el PLG y por lo cual esperábamos que la generación de plasmina se viera incrementada, sin embargo, la actividad de la proteína purificada a partir de ambas cepas virales, no presentó este fenómeno (fig. 16), obteniéndose valores de absorbancia disminuidos, aproximadamente a la mitad del valor del control positivo (ver tabla 9); no obstante, con estos resultados nosotros no pudimos descartar la posibilidad de que la actividad presentada con GP60, se debiera a interacciones inespecíficas de la proteína E con el PLG, que provocaran el cambio de color independientemente de la generación de plasmina, por lo cual decidimos analizar las muestras obtenidas mediante PAGE al 10% con SDS. En estos análisis, no observamos bandas específicas que correspondieran a productos de degradación de la fibrina, como las observadas utilizando el virus completo (dato no presentado), por lo que inferimos que la proteína purificada, aunque

Proteína de envoltura del virus del dengue

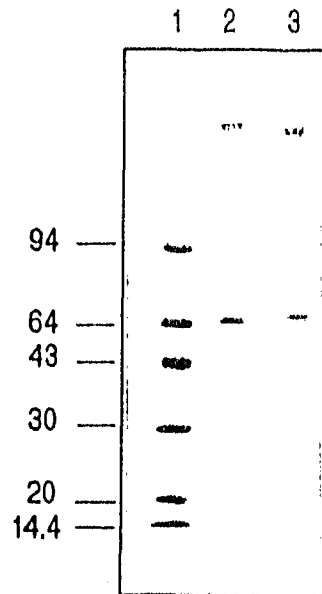


Fig.13. PAGE al 12.5% con SDS en condiciones no reductoras.

- 1) Marcadores de Peso Molecular (Kda.)
- 2) Proteína de envoltura de dengue 2 mexicano, purificada con n-octyl- β -D-glucopiranosido.
- 3) Proteína de envoltura de dengue 2 indonesia, purificada con n-octyl- β -D-glucopiranosido.

Wester-blot de la proteína de envoltura
del virus del dengue.

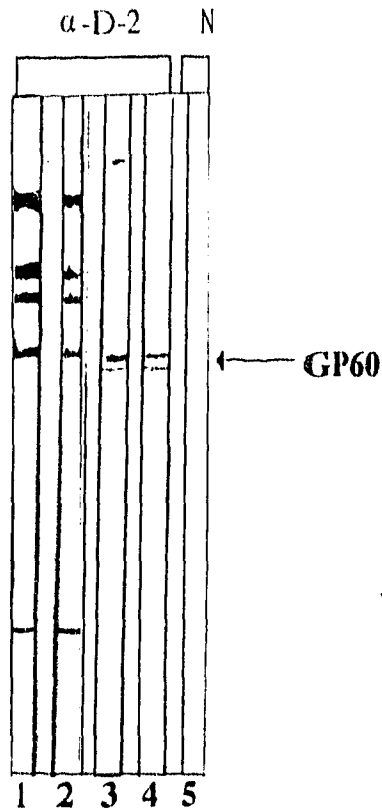


Fig. 14. Western-blot obtenido a partir de proteína E purificada con n-octyl-β-D-glucopiranosido, utilizando un anticuerpo policlonal anti-dengue (suero de paciente).

- 1) Extracto viral de dengue 2 mexicano + suero anti-dengue.
- 2) Extracto viral de dengue 2 Indonesia + suero anti-dengue.
- 3) Glicoproteína E de dengue 2 mexicano + suero anti-dengue.
- 4) Glicoproteína E de dengue 2 Indonesia + suero anti-dengue.
- 5) Control negativo. Extracto viral + suero normal.

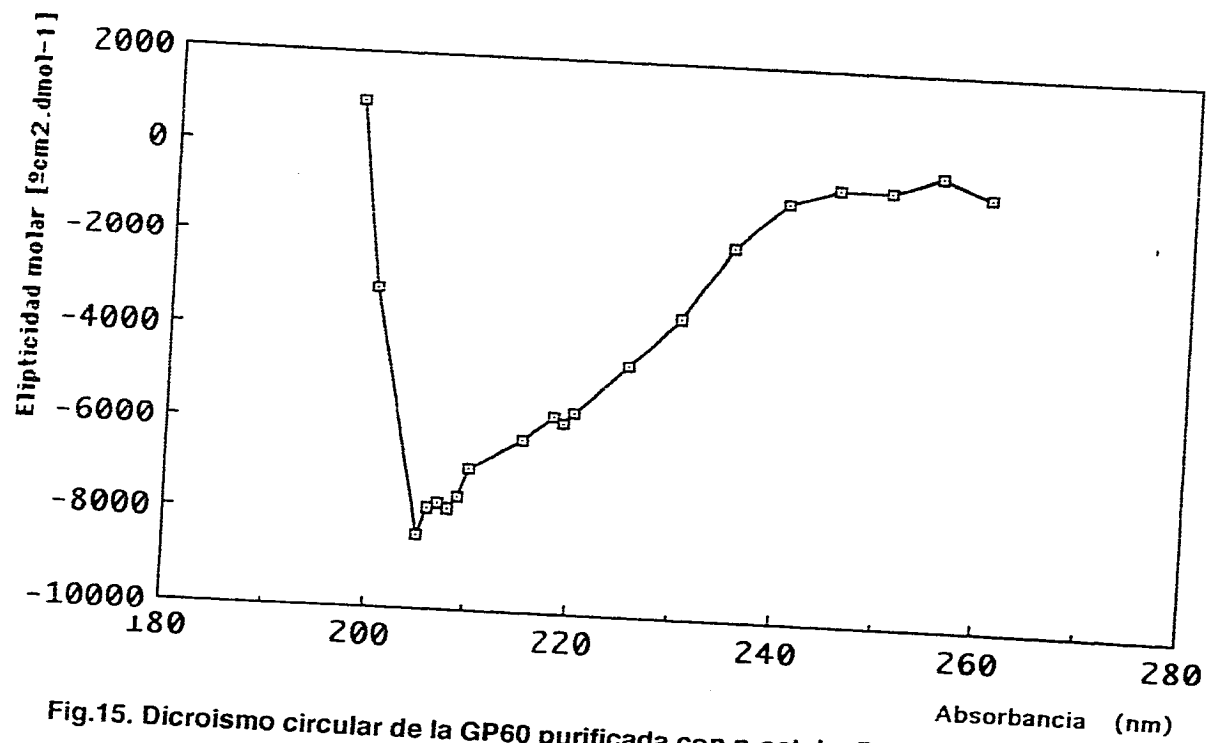


Fig.15. Dicroísmo circular de la GP60 purificada con n-octyl-β-D-glucopiranosido.

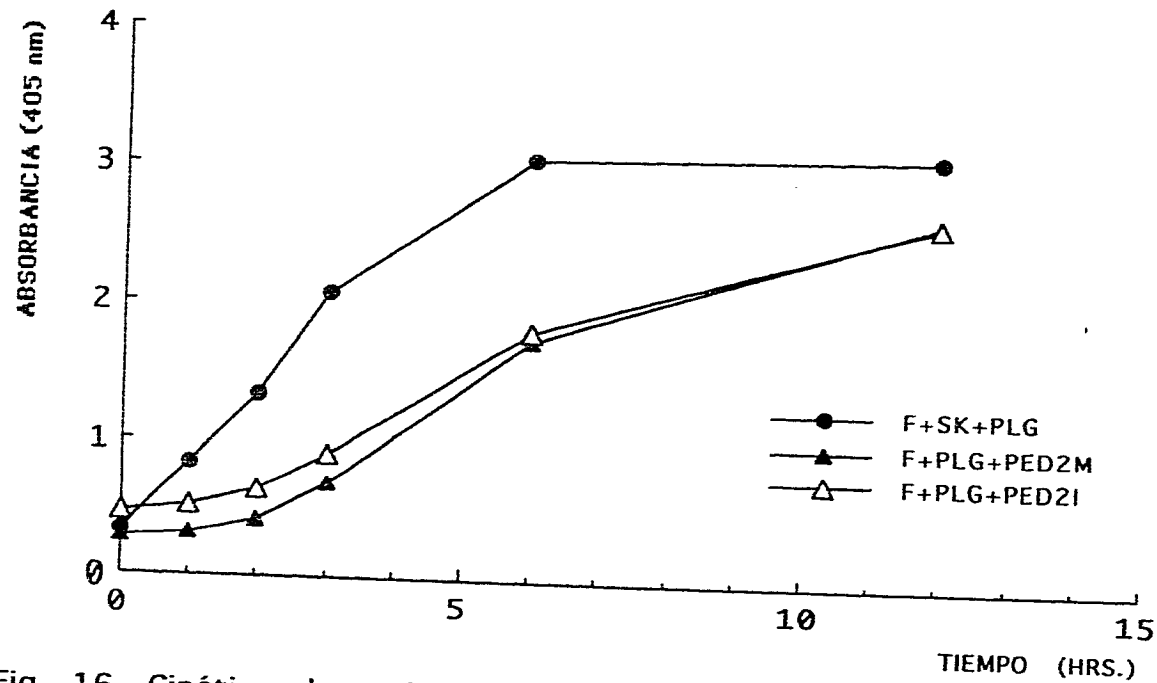


Fig. 16. Cinética de activación de plasminógeno con la proteína E del virus del dengue en presencia de fibrina. F=fibrina; PLG=plasminógeno; SK=estreptocinasa; PED2M=prot.E de dengue 2 mexicano; PED2I=prot.E de dengue 2 Indonesia.

estructuralmente estuviese conservada, biológicamente no se comportase de la misma manera en forma aislada que cuando se encuentra en el virión completo. Sin embargo, se llevaron a cabo los ensayos de activación de plasminógeno en ausencia de fibrina y/o fibrinógeno.

Tabla 9. Cinética de activación de plasminógeno en presencia de fibrina con GP60:

Tiempo (HRS.)	F+PLG+SK (± 1 E.S.*)	F+PLG+PED2M (± 1 E.S.)	F+PLG+PED2I (± 1 E.S.)
0	0.381±0.005	0.923±0.10	1.228±0.45
1	0.730±0.006	1.154±0.25	1.380±0.52
2	1.278±0.150	1.290±0.50	1.404±0.08
6	2.266±0.050	1.376±0.65	1.434±0.40
12	3.407±0.004	1.699±0.80	1.596±0.68
24	3.526±0.020	1.785±0.12	1.642±0.95

Los datos muestran el promedio de la absorbancia medida a 405nm de 3 muestras independientes ±1 E.S*.

F=fibrina; SK=estreptocinasa; PLG=plasminógeno; PED2M=proteína de envoltura purificada a partir de dengue 2 mexicano; PED2I= proteína de envoltura, purificada a partir de dengue 2 Indonesia; *E.S.=error estándar.

ACTIVACION DE PLASMINOGENO POR GP60 SIN FIBRINA Y/O FIBRINOGENO.

Con el objeto de evaluar la posibilidad de que la proteína pudiera de alguna manera agregarse al encontrarse presente la fibrina [en base a que GP60 presenta en su estructura diferentes dominios de unión a proteínas plasmáticas] (26), se llevó a cabo el ensayo de activación utilizando únicamente plasminógeno, con el objeto de establecer la participación de la proteína en la generación de plasmina. Como se puede observar en la fig. 17, no se encontró actividad en comparación con los virus completos.

Aunque no observamos actividad en los ensayos con la proteína E, no descartamos la posibilidad de que la proteína purificada, se encuentre jugando un papel participativo en la activación de plasminógeno, ya que probablemente GP60 en el virus completo, presenta una conformación específica, que le permita interactuar con el zimógeno de manera diferente a la presentada cuando se encuentra en forma aislada, fuera del entorno viral.

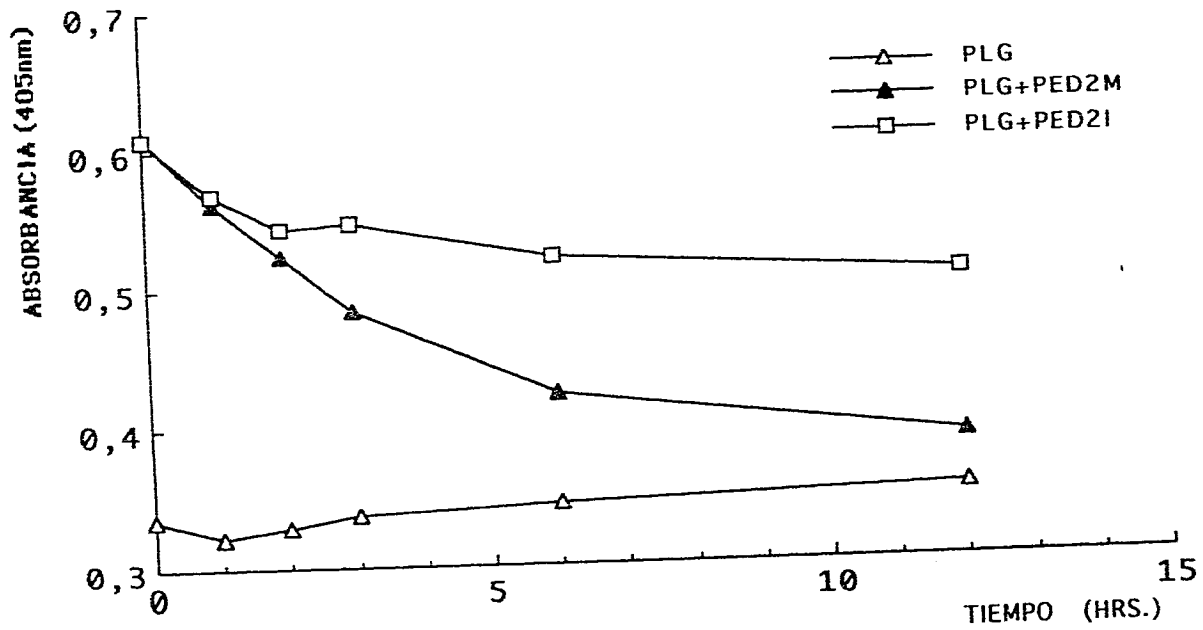


Fig.17. Cinética de activación de plasminógeno con la proteína E del virus del dengue en ausencia de fibrina(ógeno).
 PLG=plasminógeno; PED2M=prot.E de dengue 2 mexicano;
 PED2I=prot. E de dengue 2 Indonesia.

DISCUSION.

Las dos hipótesis que intentan explicar el establecimiento de los casos de dengue hemorrágico, están basadas en datos epidemiológicos y a la fecha no existen reportes a nivel estructural y/o funcional que apoyen la participación directa del virus del dengue en el establecimiento del síndrome hemorrágico. Con base en lo anterior, analizamos el proceso de fibrinólisis ocasionado por el virus, en un modelo *in vitro*, como es el de la degradación de fibrinógeno y/o fibrina, ocasionado por la estreptocinasa. Aunque los experimentos reportados con estreptocinasa (45) sólo se han llevado a cabo utilizando fibrinógeno soluble, el hecho de que la plasmina actúe hidrolizando la fibrina en los mismos sitios que el fibrinógeno (20), nos proporcionó la base para llevar a cabo nuestros ensayos, utilizando mallas de fibrina. Al establecer las condiciones experimentales del control positivo (F+PLG+SK), pudimos comprobar nuestra hipótesis, ya que la cinética presentada por la SK en presencia de fibrina, fué similar a las previamente reportadas con fibrinógeno soluble (45, 49). Aunque el porcentaje de activación de plasminógeno en presencia de fibrina, fué menor (29%) con respecto al presentado por el fibrinógeno (99%), la generación de plasmina a lo largo de la cinética no se modificó, con base en lo cual, proponemos que probablemente la presencia de fibrinógeno (Fg) soluble, incrementa la interacción entre plasminógeno y estreptocinasa, a diferencia de los ensayos en los cuales se utilizó la malla de fibrina (la cual al encontrarse en forma sólida, le confiere una estructura rígida), observándose una disminución en la generación de plasmina.

Los resultados obtenidos en los ensayos de degradación de fibrina y/o fibrinógeno, muestran que los dos aislados virales *per se*, fueron capaces de activar al plasminógeno en forma específica, puesto que generaron plasmina activa, la cual fué capaz de hidrolizar a la fibrina y/o fibrinógeno liberando los productos de degradación de las mismas, para lo cual fué condición previa la unión del virus a la molécula del zimógeno. Esta unión probablemente se lleve a cabo mediante la glicoproteína de envoltura viral (E), ya que es la única proteína de superficie en el virión. Por otro lado, se ha reportado que la proteína E esta formada por diferentes dominios compartidos con el plasminógeno, entre los cuales se encuentra el dominio kringle (26), que es una estructura importante en la especificidad de unión de las proteínas que actúan en la fibrinólisis (plasminógeno, factor tisular activador del plasminógeno y urocinasa)(50). Con base en lo anterior, proponemos que el virus puede unirse a la molécula de plasminógeno y/o activarlo mediante un mecanismo no catalítico, probablemente análogo al que se lleva a cabo por algunas proteínas bacterianas, tales como la estreptocinasa, staphylocinasa y la proteína de *Yersinia enterocolitica*, las cuales tampoco presentan

actividad catalítica y sin embargo, activan al plasminógeno de manera indirecta mediante la unión específica de las mismas a la molécula del zimógeno (31). Nosotros proponemos que probablemente el virus pueda unirse en el sitio que corresponde a la región catalítica de la plasmina (residuos 562-791) (49), tomando en cuenta los reportes de Markoff y col.(18), en donde se encontró correlación directa de la severidad de la hemorragia y la presencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína E (aa 100-119), que presentan reacción cruzada con el plasminógeno (aa 759-779), en la región que corresponde al dominio kringle, los cuales poseen la capacidad de bloquear la unión de α -2-antiplasmina (molécula inhibidora) (34). Por otra parte, la α -2-antiplasmina presenta 2 sitios de unión [kringle 1 y serina 740, localizada en la cadena beta de la plasmina (50)], que se encuentran lejanos de acuerdo a la secuencia primaria de la proteína; sin embargo, conformacionalmente son sitios muy cercanos. Estas regiones, son claves tanto para la unión de proteínas activadoras como inhibidoras de la actividad de la plasmina (como es el caso de la activación de plasminógeno e hidrólisis de fibrina y/o fibrinógeno, así como la inhibición de estos procesos) (44). Los resultados que obtuvimos al inhibir la fibrinólisis en presencia del virus completo, utilizando el inhibidor natural (α -2-antiplasmina), muestran que se presenta una disminución en la capacidad de generar plasmina con el aislado de dengue clásico (D2M), pero no con el aislado hemorrágico (D2I), por lo que inferimos que tal vez pueda llevarse a cabo una competencia entre el D2I y el inhibidor por el sitio de unión en la molécula de plasmina.

Por otro lado, se ha reportado que utilizando una proteína sintética llamada miniplasmina (que corresponde a la molécula de plasmina a la cual se le han removido los dominios kringle 1, 2 y 3), el fenómeno de inhibición de la fibrinólisis no se abate en presencia de α -2-antiplasmina (51), lo cual nos hace descartar al kringle 1 de la molécula del plasminógeno como un sitio clave para bloquear el proceso de inhibición. De igual manera, como se mencionó anteriormente, es conocida la existencia de anticuerpos anti-dengue (34) y anti-prourocinasa (31), los cuales están dirigidos contra la región catalítica de la molécula de plasmina, que son capaces de activar al plasminógeno y/o inhibir la actividad de la α -2-antiplasmina. Con base en estas observaciones, proponemos que el virus, pudiera unirse también en esta región, ocasionando tanto un impedimento estérico que le permitiera competir con el inhibidor, como la adopción de una conformación determinada, que le confiera accesibilidad a la molécula del plasminógeno para activarlo, propiciando que el zimógeno cambie su conformación de la forma cerrada a la forma relajada, lo cual es requisito para su activación (52).

Los resultados aquí mostrados de activación del plasminógeno y degradación de fibrina(ógeno) son novedosos, puesto que no existen reportes sobre la participación directa del virus en los procesos de coagulación y/o fibrinólisis. Por otro lado, podrían sentar las bases en la interpretación de algunas manifestaciones del síndrome hemorrágico, como son: la disminución de algunas proteínas plasmáticas entre ellas plasminógeno, fibrinógeno y algunos factores de la coagulación, probablemente causados por la exacerbación en la generación de plasmina, la cual es capaz de hidrolizar los factores de coagulación V y VIII, la laminina, la fibronectina, así como disparar la activación de enzimas involucradas en la cascada del complemento, además de degradar la fibrina y/o fibrinógeno (31). Lo anterior, puede ocasionar por un lado, alteraciones en la coagulación sanguínea y por otro, la exacerbación de la fibrinólisis lo que en conjunto podría desencadenar la hemorragia.

Por otro lado, también es posible que la exacerbación en la generación de plasmina ocasionada por el virus, en consecuencia genere el incremento de algunos inhibidores, tales como: el inhibidor del activador del plasminógeno 1 y 2 (PAI-1 y PAI-2) [de los cuales se han reportado niveles elevados en el plasma de pacientes infectados con el virus del dengue (53)]. Estos últimos se encuentran en el torrente sanguíneo y son los encargados de inhibir la activación del plasminógeno (PLG), mediante la unión de PAI-1 y 2 a las moléculas activadoras del zimógeno (factor tisular activador del PLG y urocinasa) (27). Nosotros proponemos que al no existir actividad de tPA y/o urocinasa, con niveles elevados de PAI-1 y 2, probablemente el PLG se esté activando mediante un mecanismo diferente, que involucre al virus como responsable del desequilibrio fibrinolítico y posiblemente sea la razón de que no en todos los casos se desarrolle la hemorragia, puesto que la cepa de dengue clásico, por un lado activa al plasminógeno, pero por otro, induce la generación de PAI-1 y 2, siendo incapaz de bloquear la función de la α -2-antiplasmina, con lo cual es posible que se regule el proceso antes generado.

Tomando en cuenta que no en todos los casos hemorrágicos se presenta una coagulación intravascular diseminada, que favorezca el incremento de factores de la coagulación y/o fibrinólisis, nosotros logramos diseccionar en parte el fenómeno, determinando que el virus por sí mismo es capaz de activar al plasminógeno y desencadenar la degradación del fibrinógeno, en ausencia de fibrina con la generación de diferentes péptidos específicos, los cuales de acuerdo a referencias (36), son capaces de activar la coagulación sanguínea, la quimiotaxis de neutrófilos, activar a monocitos para la liberación de interleucina 1 (involucrada en el recambio de fibrinógeno), quimiotaxis de monocitos, así como un

incremento de la permeabilidad vascular (50). Lo anterior, clínicamente es importante, ya que forman parte de la patogenia en FHD/SCD.

De acuerdo a nuestros resultados de inhibición de la fibrinólisis utilizando la cepa hemorrágica, proponemos que dicho aislado pueda presentar alguna característica diferente (probablemente a nivel molecular), que le permita competir por el sitio de unión de la α -2-antiplasmina (55), impidiendo de esta manera que se lleve a cabo el fenómeno de regulación de la degradación de fibrina y/o fibrinógeno, llevado a cabo por la plasmina, exacerbando así el fenómeno de fibrinólisis por un lado y la degradación de factores de coagulación (factor V y VIII) por otro, como mecanismo importante en el establecimiento del cuadro hemorrágico.

Aunque observamos la activación de plasminógeno en presencia del virus completo, al purificar la proteína de envoltura (la cual podría unirse a la molécula del zimógeno) y llevar a cabo los mismos ensayos que con el virus completo, no logramos observar la activación del PLG. Sin embargo, no podemos descartar la participación directa de la proteína E, ya que posiblemente al sacarla de la membrana, cambie su conformación (y/o actividad biológica); se sabe que la estabilidad de la conformación de una proteína, depende de sus cargas de las cadenas laterales, pH, solvente en el que se encuentra, así como las diferentes interacciones electrostáticas (puentes salinos), entre las cadenas laterales y las cadenas hidrofóbicas, además del estado de desdoblamiento en que se encuentre (56); si consideramos que la GP60 además de ser una proteína de envoltura que se encuentra embebida en la membrana viral, está glicosilada (lo cual incrementa el grado de dificultad para purificarla en su estado nativo), posiblemente al ser solubilizada en detergente (n-OG), esto le confiera un estado de desdoblamiento diferente al que presentaba en el virus completo, nosotros pensamos que pueda estar modificando su conformación y/o función, por dos razones principales: la primera, por su disociación con la membrana y la segunda, por la pérdida de interacciones entre la misma proteína, ya que en la superficie viral se encuentra en forma de homodímero, los cuales a su vez se polimerizan. En la purificación, nosotros obtuvimos la forma monomérica de la misma. Por otro lado, comparando con otras proteínas de envoltura viral similares, como lo es la proteína de TBE (proteína de envoltura de un flavivirus similar, la cual fué purificada y cristalizada) (57), se ha demostrado que el patrón de epitopes expuestos por la proteína cambia al encontrarse disociada de la membrana (en diferentes dominios), modificándose también la conformación de la misma.

Finalmente, cabe mencionar que con base en los resultados mostrados en el presente trabajo, nosotros proponemos que en aquellos casos de dengue hemorrágico en el curso de una infección de tipo primario (donde NO existen anticuerpos anti-dengue preformados), el virus *per se* es capaz de activar al plasminógeno y en consecuencia al proceso fibrinolítico, como paso importante previo al establecimiento del síndrome hemorrágico y aunque logramos dar una explicación alternativa a los datos epidemiológicos ya existentes, en particular para los casos de dengue primario (a los cuales no se encontraba explicación), aún nos quedan varias preguntas por contestar, como: ¿En qué parte de la molécula de plasminógeno se une exactamente el virus? ¿Cuáles son las regiones de la proteína de envoltura viral involucradas en la unión y activación del plasminógeno? ¿Es posible que actúen en conjunto el virus y los anticuerpos en el desencadenamiento del fenómeno hemorrágico? Para intentar responder a estas preguntas, actualmente, en el laboratorio se están desarrollando otras líneas de trabajo tanto a nivel estructural como funcional.

CONCLUSIONES.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Con base en nuestros hallazgos, proponemos que:

- 1) El virus es capaz de activar la molécula de plasminógeno a plasmina.
- 2) El mecanismo de activación de plasminógeno por el virus, no depende de la presencia de fibrina y/o fibrinógeno.
- 3) Existe la posibilidad de que el virus tenga la capacidad de competir con la α -2-antiplasmina (dependiendo de la cepa viral) y exacerbar así, el proceso de fibrinólisis.

CON BASE EN LA INTERPRETACION DE NUESTROS DATOS, PROPONEMOS QUE:

- 4) Las manifestaciones hemorrágicas graves (FHD/SCD), presentadas en el curso de una infección primaria en la enfermedad, pudiesen explicarse con base en la capacidad del virus para activar al plasminógeno y competir con la α -2-antiplasmina [y no a la existencia previa de anticuerpos heterotípicos no neutralizantes (infección secundaria)], exacerbando la fibrinólisis, rompiéndose la homeostasis como fenómeno previo al establecimiento del proceso hemorrágico.
- 5) Es probable que la proteína de envoltura del virus del dengue, pueda participar de manera directa en la activación del plasminógeno, siempre y cuando mantenga la conformación que presenta en el virus.

BIBLIOGRAFIA

- 1) **Trent, D.W., Manske C.L., Fox G.E., Chu M. C., Kliks S.C. & Monath T.P.** The Molecular epidemiology of Dengue viruses. . CDC (Centers for Disease Control). 1990: 2: 293-315.
- 2) **Schlesinger S. & Schlesinger Milton J.** Replication of Togaviridae and Flaviviridae. In: Fields BN, Knipe DM, Chacook RM. et. al. Fields Virology. 2nd. ed. Vol. 1. New York: Raven Press, 1990: 763-778.
- 3) **Ramos Celso.** Biología de la infección causada por el virus del dengue. Salud Pública de México, 1989 31: 54-71.
- 4) **Henchal E. & Putnak R.** The Dengue viruses. Clinical Microbiology Reviews. 1990: 3:376-396.
- 5) **Hahn Y.S., Galler R., Hunkapiller T.I., Dalrymple J.M., Strauss J.H. & Straus E.G.** Nucleotide Sequence of Dengue 2 RNA and Comparison of the encoded Proteins with Those of Other Flaviviruses. Virology 1988: 162: 167-180.
- 6) **Shapiro, D., KOS, k. & Russell, P.K.** Japanese encephalitis virus glycoproteins. Virology. 1973: 56: 95-109.
- 7) **Johnson, A.J., Guirakhoo, F. & Roehrig J.T.** The envelope glycoproteins of Dengue 1 and Dengue 2 viruses grown in mosquito cells differ in their utilization of potencial glycosylation sites. Virology 1994: 203: 241-249.
- 8) **Crooks, A.J., Lee J.M., Easterbrook L.M., Timofeev A.V. & Stephenson J.R.** The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell. Journal of General Virology, 1994: 75: 3453-3460.
- 9) **Gould, E.A., Buckley, A., Barrett, A.D.T. & Cammack, N.** Neutralizing (54K) and non-neutralizing (54K and 48K) monoclonal antibodies against structural and non-structural yellow fever virus proteins confer immunity in mice. Journal of General Virology. 1986: 67:591-595.
- 10) **Falgout B. & Lai C.J.** Synthesis of Dengue virus nonstructural protein NS1 requires the N-terminal signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2A. In: Brinton M. A., Heinz F. X. New aspects of positive-strand RNA viruses. 1st. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology . 1990: 192-195.
- 11) **Bazan, J. F. & Fletterick R.J.** Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. Virology 1989:171 : 637-639.
- 12) **Rigau-Pérez J.G., Gubler D.J., Vorndam A.V. & Clark G.G.** Dengue Surveillance- United States, 1986-1992. MMWR 1994: 43: 7-19.

- 13) **Pang Tikki.** Pathogenesis of Dengue Haemorrhagic fever: current perspectives. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1990; 257: 155-168.
- 14) **Halstead S.B.** Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. *Science*. 1988;239: 476-481.
- 15) **Bramarapravati, N.** Pathology and pathogenesis of DHF, in "Dengue Haemorrhagic Fever 1981" In: Hotta S. ICMR, Kobe 1981: 207-214.
- 16) **Winton J., Barnes S., & Rosen L.** Fatal hemorrhagic disease and Shock associated with primary dengue infection on a Pacific Island. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1974; 23: 495-506.
- 17) **Rosen L.** Disease exacerbation caused by sequential Dengue Infections: Myth or Reality? *Reviews of Infectious Diseases*. 1989; 11: Sup.4: S840-S842.
- 18) **Markoff L.J., Innis B.L., Houghton R. & Henchal L.S.** Development of Cross-reactive antibodies to Plasminogen during the Immune Response to Dengue Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 1991; 164: 294-301.
- 19) **Mandl C.W., Heinz F.X. & Kunz C.** Sequence of the structural proteins of tick-borne encephalitis virus (western subtype) and comparative analysis with other flaviviruses. *Virology* 1988; 166: 197-205.
- 20) **Almagro D., González I., Cruz Y. & Castañeda M.** Estudio hemostático en el dengue hemorrágico. *Rev. Cub. Med. Trop.* 1984; 36: 352-359.
- 21) **Baron M., Norman D.G. & Campbell L.D.** Protein modules. *TIBS*. 1991; 16: 13-17.
- 22) **Pattley L.** Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell*. 1985; 41: 657-663.
- 23) **Esmon, C.T. and Jackson, C.M.** The conversion of Prothrombin to Thrombin. *Journal Biol. Chem.* 1974; 249: 7791-7797.
- 24) **Wiman, B., Lijnen, H.R. and Collen D.** On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in alpha-2-antiplasmin and in fibrinogen. *Biochim. Biophys. Acta*. 1979; 579: 142-154.
- 25) **Rey A. F., Heinz F. X., Mandl C., Kunz C & Harrison S.C.** The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*. 1995; 375: 291-298.
- 26) **Stuart D. & Gouet P.** Viral envelope glycoproteins swing into action. *Structure*. 1995; 3: 645-648.
- 27) **Lawn Richard M.** Lipoproteína(a) en la enfermedad cardíaca. *Investigación y Ciencia*. 1992; 1: 14-21.

- 28) **Collen D. & Lijnen H.R.** Fibrin-Specific Fibrinolysis. *Annals of the New York Academic of Sciences.* 1993; 667: 259-271.
- 29) **Doolittle R. F.** Fibrinogen and fibrin. *Ann Rev.Biochem.* 1994; 33:195-229.
- 30) **Wu J. & Diamond S.L.** A fluorescence quench and dequench assay of fibrinogen polymerization, fibrinogenolysis, or fibrinolysis. *Analytical Biochemistry* 1995; 224: 83-91.
- 31) **Lottenberg R., Minning-Wenz D. & Boyle M.** Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens?. *Trends in Microbiology.* 1994; 2: 20-24 .
- 32) **Mc Nicol G. P. & Douglas A. S.** E-Aminocaproic acid and other inhibitors of fibrinolysis. *Brit. Med. Bull.* 1964; 20: 233-238.
- 33) **Collen D. & Lijnen H.R.** Fibrinolysis & Thrombolysis. In: Zwaal R.F.A., Hemker H.C. *Blood Coagulation.* 1st. ed. Vol. 13. Elsevier Science Publishers B. V. 1986: 243-250.
- 34) **Markoff L.J., Chungue E., Poli L., Roche C., Gestas P. & Glaqiu P.** Correlation between Detection of Plasminogen Cross-Reactive antibodies and hemorrhage in Dengue Virus Infection. *Journal Infectious Diseases.* 1994; 170: 1304-1307.
- 35) **Ellis V. & Danø K.** Potentiation of plasminogen activation by an Anti-urokinase monoclonal antibody due to ternary complex formation. *The Journal of Biology Chemistry.* 1993; 268: 4806-4813.
- 36) **Pannekoek H., Vries C. & Veerman H.** Identification of the Domains of Tissue-type Plasminogen activator involved in the augmented binding to Fibrin alter Limited digestion with Plasmin. *The Journal of Biological Chemistry.* 1989; 264: 12604-12610.
- 37) **Liu, C.Yuan., & Chien Shu.** Fibrinogen, Thrombosis, coagulation, and fibrinolysis. *Advances in experimental medicine and Biology.* 1990; 281: 401-408
- 38) **Heinz, F.X., Berger, R., Toma, W. and Kunz, C.** A topological and fuctional model of epitopes on the structural glycoprotein of TBE virus defined by monoclonal antibodies. *Virology.* 1983; 126: 525-537.
- 39) **Foss G. John.** Absorption, Dispersion, Circular Dichroism, and Rotary Dispersion. *Journal of Chemical Education.* 1963; 40: 592-597.
- 40) **Davidshon I. & Henry J.B.** *Diagnóstico clínico por el laboratorio.* Ed. Salvat Editores S.A., 6a ed. Todd-Sanford, Inc. 1981;6: 425-460.
- 41) **Lotternberg R.** A role for fibrinogen in the Streptokinase-dependent acquisition of plasmin(ogen) by Group A Streptococci. *Journal of Infectious Diseases* 1995; 171: 85-92.

- 42) **Sueishi K., Nanno S. & Tanaka K.** Permeability enhancing and chemotactic activities of lower molecular weight degradation product of human fibrinogen. *Thrombos Haemost.* 1981: 45: 90-94.
- 43) **Collen D.** On the regulation and control of fibrinolysis. *Thromb. Haemost.* 1980: 43: 77-87.
- 44) **Castellino F., Urano T., Serrano V. & Beals J.** The structure and activation of Human Plasminogen. In: Scanu AM. *Lipoprotein(a)*. 1st. ed. Academic Press, Inc. 1990: 87-101.
- 45) **Chibber B. A., Morris J. & Castellino F.** Effects of human fibrinogen and its cleavage products on activation of human plasminogen by Streptokinase. *Biochemistry.* 1985: 24: 3429-3434.
- 46) **Lichtenberg D., Robert J. R. & Dennis E.A.** Solubilization of phospholipids by detergents structural and kinetic aspects. *Biochimica et Biophysical Acta.* 1983: 737: 285-292.
- 47) **Gould R. J., Ginsberg B. H. & Spector A.** Effects of octyl b-glucoside on insulin binding to solubilized membrane receptors. *Biochemistry.* 1981: 20: 6776-6781.
- 48) **Compton L.A. & Johnson C.** Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Analytical Biochemistry.* 1986: 155: 155-167.
- 49) **Jaffe A.S., Eisenber P. L. & Wilner G. D.** In vivo assessment of thrombosis and fibrinolysis during acute myocardial infarction. In: Brown E.B. *Progress in Hematology*. 1st.ed.Vol.15. Grune & Stratton, Inc. 1986 : 15: 71-77.
- 50) **Padmanabhan K., Wu T.P. Ravichandram K.G. & Tulinsky A.** Kringle-kringle interactions in multimer kringle structures. *Protein Science.* 1994: 3: 898-910
- 51) **Christensen S., Sottrup-Jensen L. & Christensen U.** Stopped-flow fluorescence kinetics of bovine α -antiplasmin inhibition of bovine midiplasmin. *Biochemistry Journal.* 1995: 305: 97-102.
- 52) **Ramakrishnan V., Mangel W.F. & Lin B.** Characterization of an Extremely Large, Ligand-Induced change in Plasminogen. *Journal Biological Chemistry.* 1990:264: 69-73.
- 53) **Vassalli, J. D., Wohlwend A.& Belin D.** Urokinase-Catalyzed Plasminogen Activation at the Monocyte/Macrophage Cell Surface: A Localized and Regulated Proteolytic System. In: Rusell SW, Gordon S. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1st. Vol.181. Springer-Verleg. 1992: 65-86.

- 54) **Crabtree G. R.** The Molecular Biology of Fibrinogen. In: Stamatoyannopoulos G., Nienhuis A.W., Leder P., Majerus P: W. The Molecular Basis of Blood Diseases. 1st. ed. Saunders Company W.B. 1987: 17: 631-661.
- 55) **Kruithof E.K.** Changes in conformation of globular proteins induced by a non-ionic surface active agent. - A review. Enzyme. 1988: 40: 113-121.
- 56) **Pradipasena P., Israeli O. Lu M., Chen S. & Rha C.** Plasminogen Activator Inhibitors. In: Hans Visser. Protein Interactions. 1st. ed. VCH. 1992: 15: 293-298.
- 57) **Rey F. A., Heinz F. X., Mandl C., Kunz C. & Harrison S. C.** The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 A resolution. Nature. 1995: 375: 291-298.

- 54) **Crabtree G. R.** The Molecular Biology of Fibrinogen. In: Stamatoyannopoulos G., Nienhuis A.W., Leder P., Majerus P: W. The Molecular Basis of Blood Diseases. 1st. ed. Scunders Company W.B. 1987: 17: 631-661.
- 55) **Kruithof E.K.** Changes in conformation of globular proteins induced by a non-ionic surface active agent. - A review. *Enzyme*. 1988: 40: 113-121.
- 56) **Pradipasena P., Israeli O. Lu M., Chen S. & Rha C.** Plasminogen Activator Inhibitors. In: Hans Visser. Protein Interactions. 1st. ed. VCH. 1992: 15: 293-298.
- 57) **Rey F. A., Heinz F. X., Mandl C., Kunz C. & Harrison S. C.** The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 A resolution. *Nature*. 1995: 375: 291-298.