



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

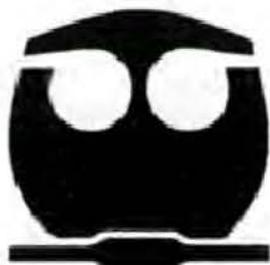
EFFECTO DE LOS DENGUE VIRUS EN LA
ACTIVIDAD PLAQUETARIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

ESTEBAN JORGE GALARZA



TUTOR: DRA. BLANCA H RUIZ ORDAZ.

MÉXICO, D. F.

Junio 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EFFECTO DE LOS DENGUE VIRUS EN LA ACTIVIDAD PLAQUETARIA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Blanca Haydee Ruiz Ordaz en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Blanca Ruiz Ordaz	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Ruy Pérez Montfort	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Yolanda López Vidal	Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Raúl Abdón Izaguirre Ávila, del Departamento de Hematología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de agregación plaquetaria.

Se reconoce la asesoría técnica de la Q.F.B. Evelyn Cortina De la Rosa en los experimentos de agerometría plaquetaria

Se reconoce la asesoría de la Dra. Verónica Monroy Martínez, por su ayuda técnica

El proyecto fue apoyado por PAPIIT-UNAM, Dengue Hemorrágico y Plaquetolisis (IN229405). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 28 de junio de 2006

El Jurado de Examen de maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Ruy Pérez Montfort	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Clara Inés Espitia Pinzón	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dra. Leticia Rocha Zavaleta	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dra. Marcela Lizano Soberón	Instituto Nacional de Cancerología
Suplente	Dr. Edgar Zenteno Galindo	Facultad de Medicina, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A Mi esposa Rosa Ángela por su amor y apoyo durante todo este tiempo...

A mi Madre Magdalena y a toda mi familia por su apoyo: mi padre Eusebio, mis hermanos: Andrés, Adela, Gloria, Juana, Jesús, Margarito y Reina.

A la Dra, Blanca Ruiz por sus enseñanzas y consejos.

A todos mis amigos y compañeros.

Para Fernando, Anizul, Jorge, Alfredo, Carlos, Giovas, Wendy Xolalpa, Gabriel, Ricardo Segundo, Karis Carlos Madrid, Carlos Castañeda, Paola Yurima, Wendy, Crystal, Carlos Lozano, Yani, Ivonne Alonso, Areli, Blanca, Pedro, Guillermo, Ajax, Beatriz Ramirez, Anabel, Evgueny, Ivonne Reyes, Lucia, Roberto Carlos, Rodrigo Tzunuzum, Enrique, Ana Cecilia, Emilio, Elba, Margarita, Erik, María, Hortensia, Fernando, Marco, Arturo Alcazar, Vanesa, Alfredo, Odeth. Ilse, Claudia (Garay y Hallal), José, Paula, Marta, Paola, Daniel, David, Linda, Fabiola, la Dra. Isabel Soto, Ivonne, Andrea, Tere, Sandro, Guiedani, José Antonio, Edgar, Giovanni, Luis, Gustavo, Brenda, Alejandra, Vero

Del trabajo: Rosy, Sandra, Ximena, Oscar, Jonathan, Omar, Chano, Samuel Shapiro, Jorge, Sergio,

A mis profesores: Isabel, Ernesto Alarcón y Jorge Meave.

También para: Eduardo Anzaldua, Javier, Veronica, Omar, Karina, John, Martha, Laura, Carolina, Claudia Lucia, Alba, Eduardo, Fany, Alex, Irina,

.....Y todos aquellos que de alguna forma han contribuido a forjar la esencia de los que hoy soy.

ÍNDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	
I Clasificación y Estructura del Virus del Dengue	7
II Transmisión del Virus del Dengue	11
III Cuadro Clínico	17
IV Diagnóstico	20
V Etiopatogenia	22
VI Sistema Hemostático	23
VII Estructura de la Plaqueta	28
VIII Interacción del Dengue Virus con las Plaquetas	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
RESULTADOS	
Estandarización de la Concentración de Trombina	39
Efecto de los Dengue Virus en la Agregación Plaquetaria.	40
Efecto de los Dengue Virus en la Agregación Mediada por Trombina	42
Inhibición de la Agregación Plaquetaria por el Virus del Dengue	43
Evaluación Funcional de las plaquetas	45
Unión del Plasminògeno a la superficie de la plaqueta	47
Activación del Plasminògeno en la Superficie de las Plaquetas	49
Activación del Plasminògeno en Presencia de Aislados Hemorràgicos en la superficie de las Plaquetas	51
Activación del Plasminògeno en Presencia de Aislados Clàgicos	

en la superficie de las Plaquetas	53
Activación Diferencial del PLG en Presencia de Aislados Clásicos y Hemorrágicos del VD en la superficie de las Plaquetas	53
Efecto de la Plasmina sobre las Plaquetas en Presencia de VD	55
Efecto de la Plasmina en la integridad de las Plaquetas	52
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	65
REFERENCIAS	66

RESUMEN

La infección por el virus del dengue presenta un espectro clínico muy amplio que comprende desde una fiebre aguda, hasta las formas severas de la enfermedad como el síndrome de choque (SCD) y la fiebre hemorrágica por Dengue (FHD). La plaquetopenia es un hallazgo constante en los casos de FHD/SCD y se ha propuesto como su origen la Inhibición de progenitores hematopoyéticos la destrucción mediada por el sistema inmune, y el secuestro de los trombocitos por las células endoteliales infectadas con el virus del dengue, sin embargo, se desconoce la participación directa de los factores virales en la actividad plaquetaria. Con base en lo anterior evaluamos si los dengue virus *per se* son capaces de modificar la actividad plaquetaria. Mediante ensayos de agregometría encontramos que los dengue virus tienen la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria siendo mas evidente en presencia de aislados virales provenientes de pacientes FHD/SCD, alcanzando un 46 % de inhibición. Esta inhibición no fue diferencial entre los distintos serotipos. Así mismo en nuestro grupo previamente reportamos que el virus del dengue son capaces de alterar la regulación hemostática mediante la activación del plasminógeno, por lo que también evaluamos si a nivel de la superficie plaquetaria la generación de plasmina pudiera estar participando en la inducción de la plaquetolisis. Encontramos que aunque el plasminógeno asociado a la superficie plaquetaria es activado a plasmina en presencia del virus del dengue esta proteasa serínica no induce lisis de las plaquetas, sin embargo, es capaz de favorecer la activación de mas plaquetas circulantes mediada por los receptores activados por proteasas en la superficie celular, lo cual puede inducir un mayor arresto al endotelio vascular.

INTRODUCCIÓN

I. Clasificación y Estructura del Virus del Dengue.

El virus causante de la enfermedad del dengue pertenece al género *Flavivirus* y está clasificado dentro de la familia *Flaviviridae*. Este género incluye entre otros al virus del oeste del nilo (WN), el virus de la fiebre amarilla (YF) y el virus de la encefalitis ocasionada por garrapatas (TBE) que son transmitidos a huéspedes vertebrados mediante vectores como mosquitos y garrapatas (Rice, 1996).

Se han identificados 4 serotipos del virus del dengue (VD) antigénicamente distintos entre sí (DEN1, DEN2, DEN3, DEN4). Los serotipos DEN1 y DEN2 fueron aislados y caracterizados en 1945 y los serotipos DEN3 y DEN4 en 1955 en Filipinas (Sabin and Schlesinger, 1945; Hammon *et al.*, 1960).

El VD presenta una forma esférica con un radio aproximado de 250 Å, cuyo genoma está constituido por un RNA de cadena sencilla de polaridad positiva de aproximadamente 11 kilobases de longitud, el cual funciona como RNA mensajero que presenta un marco abierto de lectura que codifica una sola poliproteína que se procesa postraduccionalmente tanto por proteasas virales como del huésped generando 10 proteínas virales de las cuales solo 3 estructuran al virión: La proteína de la cápside ó proteína C que junto con el RNA forma la nucleocápside, la cual es un complejo infeccioso. La proteína de membrana ó M, que se sintetiza como un precursor llamado pre-M (pM) y la proteína E ó de envoltura que presenta las principales funciones

biológicas del virión como son: neutralización, tropismo celular, neurovirulencia, epítopes de tipo, grupo, familia y unión al receptor entre otras. Dentro de las proteínas no estructurales (NS) se encuentran las enzimas necesarias para su replicación (Fig. 1), (Rice, 1986; Kuhn *et al.*, 2002).

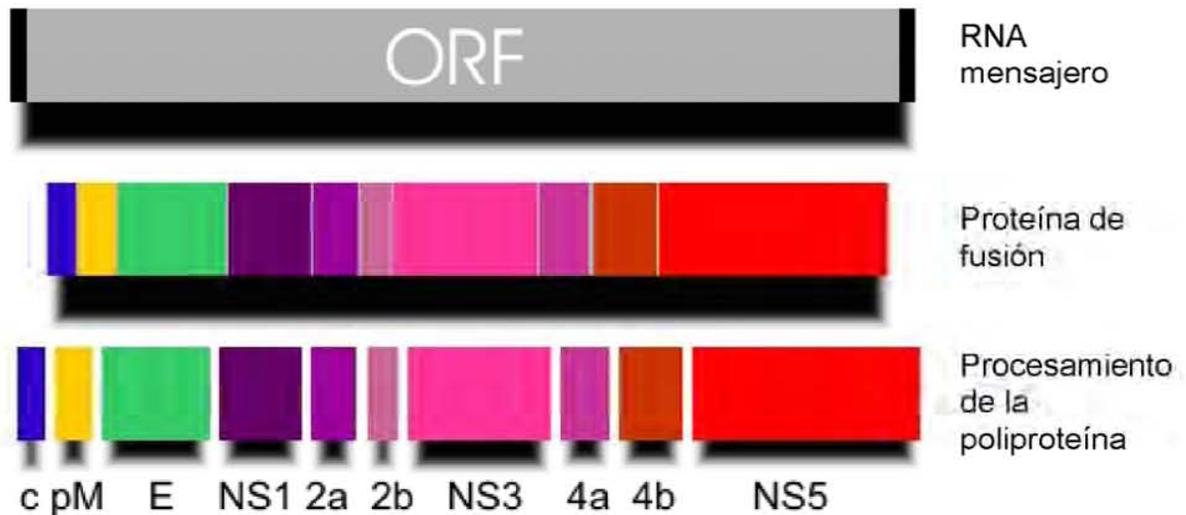


Figura 1. Organización del genoma de los flavivirus y sus proteínas resultantes. El RNA geonómico es una cadena de RNA de polaridad positiva con un marco abierto de lectura (ORF) que codifica una poliproteína, la cual es procesada postraduccionalmente tanto por proteasas virales como del huésped. Proteína de cápside (c), proteína de membrana (pM), Proteínas no estructurales, 1(NS1), 2 (2a y 2b), 3(NS3), 4 (4a y 4b), y 5 (NS5), (Rothman, 2004).

El ciclo replicativo de los flavivirus comparte características con los 2 géneros que comprenden la familia Flaviviridae; los hepacivirus y los pestivirus (Fig. 2). Para entrar a la célula huésped, el VD utiliza diferentes mecanismos, pero solo algunos son “virus específicos”. Los coreceptores para el virus del dengue mas conocidos son los

glicosaminglicanos que contienen heparan sulfato (Germi *et al.*, 2002), así mismo se ha identificado como posible receptor una lectina de unión a ICAM-3 específica de células dendríticas (DC-SING) (Navarro-Sánchez *et al.*, 2003; Tassaneetrithep *et al.*, 2003). Así mismo, se ha sugerido que los receptores para la fracción cristalizable de los anticuerpos (FcR) los cuales unen complejos virus-inmunoglobulinas puedan funcionar como receptores accesorios facilitando la entrada de los VD mediante opsonización. Los receptores virus específicos aún no han sido identificados, sin embargo se han descrito cuatro proteínas de un peso molecular aproximado de 27, 45, 67 y 87 KD que están involucradas en la unión del DEN2 a los macrófagos (Moreno-Altamirano *et al.*, 2002; Halstead *et al.*, 2005).

La replicación del virión inicia con el denudamiento del RNA viral, la traducción y el procesamiento de la poliproteína viral (Fig2). La morfogénesis del virión se lleva a cabo en vesículas intracelulares, las partículas virales inmaduras se ensamblan inicialmente en el lumen del retículo endoplásmico, las cuales se forman por las proteínas E, C y prM. Posteriormente, la segmentación de pM ocurre en el aparato de Golgi llevándose a cabo el empaquetamiento y maduración de las partículas virales haciéndolas infecciosas, para finalmente ser liberadas mediante exocitosis (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

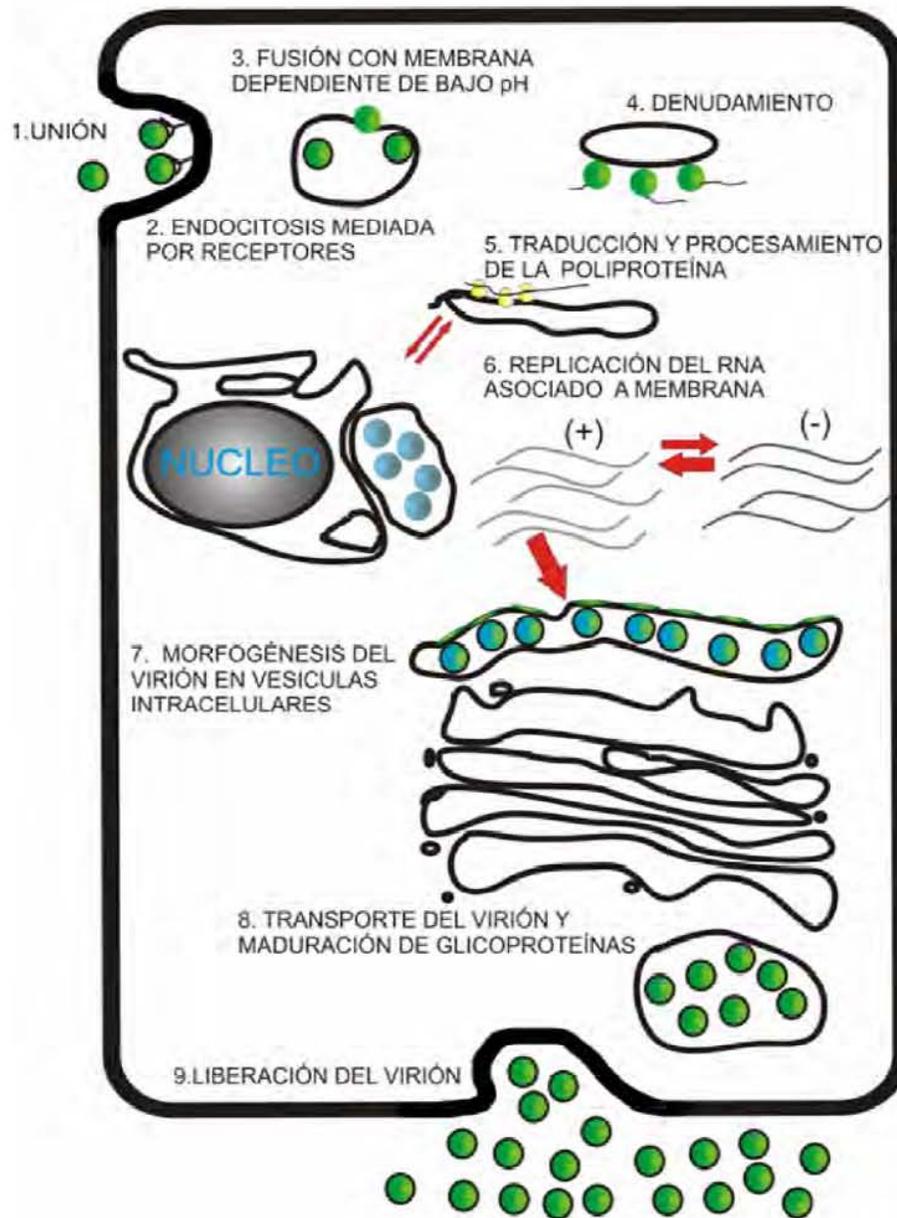


Figura 2. Ciclo replicativo del virus del dengue (VD). La unión del virus mediada por anticuerpos (1) permiten la endocitosis mediada a la célula blanco (2), en los endosomas, el ambiente ácido induce una trimerización irreversible de la proteína E, que resulta en la fusión de las membranas viral y celular (3), el denudamiento permite la disociación de la cápsida y del RNA (4) y se inicia la traducción utilizando al RNA de polaridad + como mensajero (5) y la replicación del RNA (6), posteriormente el la morfogénesis del virión se lleva a cabo en vesículas intracelulares (7) y la maduración ocurre en el aparato de Golgi (8) para finalmente transportarlo y liberarlo (9)

II. Transmisión del Virus del Dengue

Los 4 serotipos del VD se transmiten a los humanos a través de la picadura (de la hembra hematófaga) de los mosquitos del género *Aedes*, principalmente *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti* el cual es un mosquito tropical y subtropical que esta distribuido en todo el mundo, usualmente entre las latitudes 35° N y 35°S y aunque ocurren invasiones durante el verano al norte pasando los 45°N, los mosquitos no sobreviven a los inviernos. La distribución de *A. aegypti* también esta limitada por la altitud, normalmente no sobrepasa los 1000 m sobre el nivel del mar, aunque existen reportes de su presencia en India a 2121 m y Colombia a 2200 m. Este mosquito es uno de los vectores más eficientes en la trasmisión de los arbovirus, sin embargo también han sido atribuidos brotes de dengue a *A. albopictus*, *A. polynesiensis*, y muchas especies del complejo *A. scutellaris*. (WHO, 1997). Las hembras de *A. aegypti* adquieren al virus de una persona infectada al ingerir la sangre que necesitan para el desarrollo de sus huevecillos. Una vez infectadas, existe un periodo de incubación extrínseco de entre ocho y doce días (Fig. 3), durante los cuales el virus se replica dentro del mosquito llegando a las glándulas salivales por lo que la hembra puede transmitir el virus cada vez que explora o se alimenta de un humano susceptible. Entre cinco y ocho días después de haber sido transmitido al humano, este presenta un periodo prodrómico o intrínseca durante el cual el virus se replica desarrollando posteriormente una fase virémica que puede durar de uno a cinco días. (Clark, 1995).

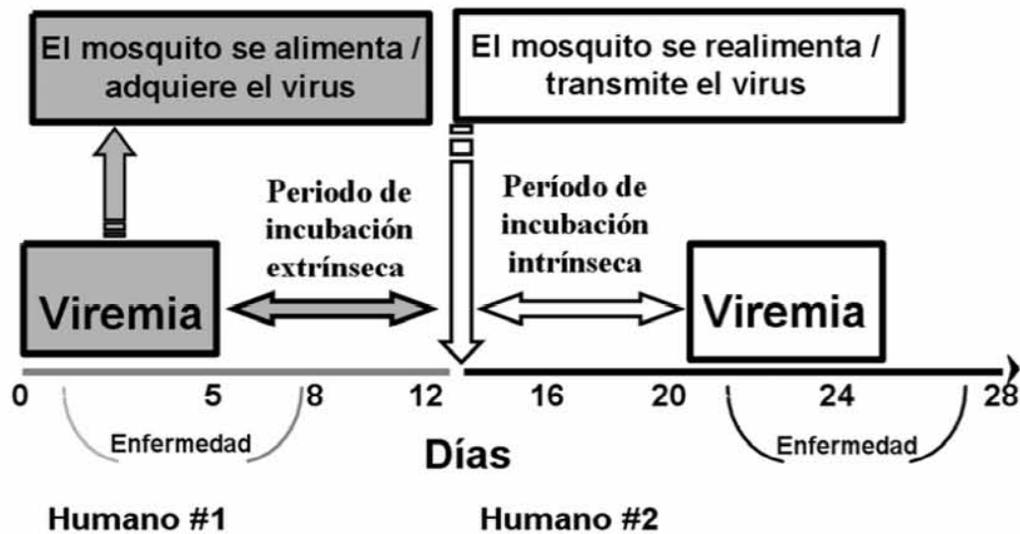


Figura 3. Transmisión del virus del dengue por los mosquitos vectores. Cuando el mosquito se alimenta, adquiere el virus y se inicia el periodo de incubación extrínseca (fuera del huésped), a los 12 días, el mosquito es capaz de transmitir el virus al humano iniciándose el periodo de incubación intrínseca (dentro del huésped) para dar paso a la viremia y la enfermedad.

Existen varios ciclos de transmisión del virus, el ciclo más primitivo o ciclo enzoótico involucra a varias especies de *Aedes* y primates inferiores en las selvas tropicales de África y Asia, los virus involucrados en este ciclo no se mueven regularmente de las áreas selváticas a las áreas urbanas (Fig. 4). Un ciclo de transmisión epidémica que puede ocurrir en regiones rurales o islas en donde la población humana es pequeña, siendo los vectores principales las especies *A. aegypti*, *A. albopictus* y *A. polynesiensis*. Finalmente el ciclo de transmisión más importante para la salud pública, es el ciclo endémico/epidémico/urbano en los grandes centros urbanos de los países tropicales. (Gubler, 1998). Los virus son mantenidos en ciclos de Mosquito-Humano-Mosquito con

epidemias periódicas. La transmisión vertical de los virus ha sido demostrada tanto en el laboratorio como en el campo, sin embargo la contribución de esta en el mantenimiento viral no ha sido establecida (WHO, 1997).

Las primeras epidemias parecidas al dengue fueron registradas en 1779-1780, en Batavia (Yakarta), Cairo y Filadelfia. Hasta la segunda guerra mundial, las epidemias ocurrieron en casi todos los continentes cada 10-30 años, debido principalmente al transporte marítimo en los trópicos que transportaba tanto al vector como al virus. Durante este tiempo, el dengue fue una enfermedad benigna y no fatal, que estuvo caracterizada por una fiebre elevada con dolor lumbar y huesos. (Mairuhu *et al.*, 2004).

Después de la segunda guerra mundial los casos de FHD y SCD se incrementaron en el sureste asiático, en gran medida por el movimiento de las tropas las cuales esparcieron al VD. El primer reporte de una epidemia de dengue hemorrágico se registró en las islas de Filipinas en 1935-1954, después de esta, la actividad epidemiológica se incremento en la región y aunque permaneció confinada al sureste asiático, se expandió hacia India, Pakistán, Sri Lanka, las Maldivas y el este de China (Gubler, 1998).

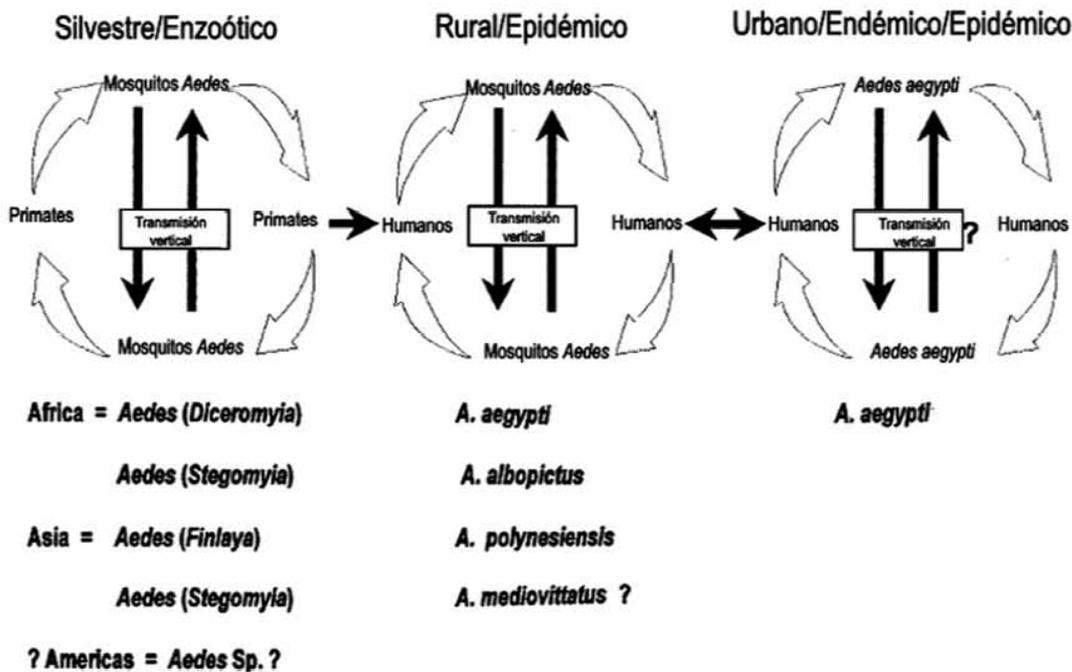


Figura 4. Ciclos de transmisión del virus del dengue. Los tres ciclos de transmisión y sus principales vectores. Ciclo silvestre en las selvas tropicales. Ciclo Rural epidémico en las zonas rurales y el Ciclo urbano el más importante con repercusión en salud pública.

Por otra parte, en América se han registrados los cambios epidemiológicos más dramáticos. En las décadas de los 50's, 60's y la mayoría de los 70's, las epidemias del dengue fueron esporádicas con base en la erradicación del vector *Aedes aegypti* a través de los programas de control de la fiebre amarilla urbana auspiciado por la Organización Panamericana de la Salud OPS (Fig. 5). Estos programas fueron suspendidos a finales de los 70's y las especies de vectores reinviadieron la región de las Américas en donde ya se había logrado su erradicación (Gubler, 2002).

Poco tiempo después, la situación del dengue en América se complicó con la aparición del primer brote de FHD/SCD en Cuba en 1981, en este brote se reportaron

344,203 casos de dengue de los cuales 10,312 fueron casos severos (FHD/SCD) con 158 casos fatales. Este evento fue seguido por otra epidemia de FHD/SCD en Venezuela en 1989 y 1990, desde entonces se han registrado pequeños brotes y un incremento considerable de casos severos anualmente. (Guzman and Kouri, 1996)

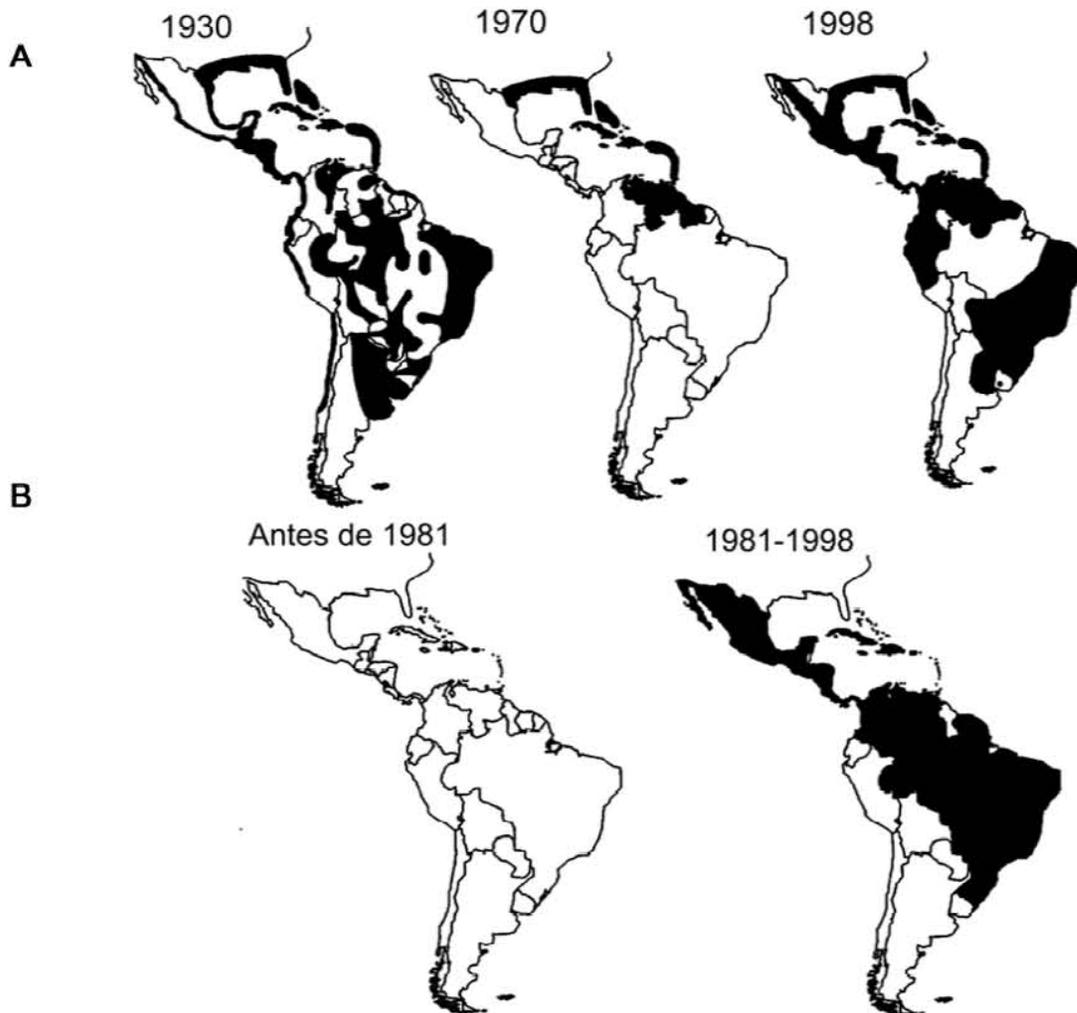


Figura 5. Epidemiología en América. Distribución del vector en 1930, la erradicación continental en los 50's y su reemergencia en los 70's (A). Incremento de la actividad del dengue hemorrágico a partir de 1981(B), Las áreas sombreadas indican presencia del vector (A) o del dengue hemorrágico(B).

Entre los factores que han favorecido la emergencia del dengue en América se encuentran: el incremento en la población primoinfectada, la elevada densidad del vector, la rápida distribución del *Aedes aegypti* en nuevas áreas, la introducción de otros vectores como *Aedes albopictus*, la hiperendemicidad regional (circulación simultánea de varios serotipos) y la reaparición del Dengue-3 a partir de 1994 en Centroamérica después de una ausencia de 16 años. Asimismo, se han asociados otros factores epidemiológicos con la elevada incidencia de la enfermedad como son: la rápida urbanización, la migración de poblaciones, una gran proliferación de artículos manufacturados no reciclables que funcionan como criaderos para el vector, el abastecimiento irregular de agua potable, la falta de drenaje, la insuficiencia en los servicios de recolección de basura y el desmantelamiento de los programas de control del vector (PAHO, 1996).

En la República Mexicana el dengue entró por Tapachula al final de los años setenta y se diseminó por todo el territorio en menos de 10 años, desde entonces el dengue hemorrágico ha ido en aumento. En la década de 1984-1993 se registraron 26 casos, mientras que en un año la cifra aumento a 30 casos y en 1995 fueron registraron ya 539 casos (De la Fuente JR y Sepulveda J, 1999). Actualmente la enfermedad empieza a tomar un giro importante en cuanto a la presentación de las formas graves, ya que las condiciones prevalentes favorecen el incremento de la transmisión. De esta forma México forma parte del grupo de países con un problema de salud pública emergente y prioritario (OPS, 1989; Narro, 1995).

Actualmente, el dengue es considerado la infección transmitida por vector más importante después de la malaria, reportándose anualmente a nivel mundial 100 millones de casos de fiebre de dengue, 500,000 casos de dengue hemorrágico y 25,000 defunciones (Gubler, 1998).

III Cuadro Clínico.

La infección por el VD presenta un espectro clínico muy amplio, que va desde una infección asintomática (Fig. 6), hasta los casos desafortunados como son el síndrome de choque (SCD) y/o la fiebre hemorrágica por Dengue (FHD) (Guzmán and Kouri, 2001).

Fiebre por dengue (FD) Las características clínicas de la FD son diferentes de acuerdo a la edad. La mayoría de las infecciones en niños pequeños son leves e indistinguibles de otras fiebres virales (Kabra, 1999). Los casos más severos de FD, se han registrado en niños mayores y adultos, caracterizándose por un incremento rápido de la temperatura ($\geq 39^{\circ}\text{C}$) que dura de 5-6 días acompañándose de cefalea, dolor retro-orbital, mialgias, artralgias, náusea y vómito, en general los síntomas desaparecen de 5-10 días (Lei *et al.*, 2001). Algunos pacientes pueden tener diversos grados de sangrados cutáneos o mucosos con algún grado de trombocitopenia, sin que reúnan todos los criterios de la OMS para establecer el diagnóstico de FHD/SCD, estos pacientes son clasificados como dengue clásico con sangrado inusual. (Kabra, 1999)

Fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y síndrome de choque por dengue (SCD).

La organización mundial de la salud (OMS) ha definido al dengue hemorrágico como una fiebre continua con duración de 2-7 días, con tendencias hemorrágicas, trombocitopenia ($\leq 100,000$ cel/mm³) y hemoconcentración (OMS, 1997). El dengue hemorrágico puede ocurrir en todos los grupos de edades incluyendo niños. La severidad de la FHD está clasificada en grados de acuerdo a criterios clínicos (Fig. 6). Grado I: Fiebre acompañada de síntomas no específicos y la prueba de torniquete positivo. Grado II: manifestaciones del grado I y sangrado espontáneo, usualmente en la piel, la nariz o la encía. Grado III: criterios del grado II y falla circulatoria, caracterizada por un pulso rápido y débil e hipotensión. Grado IV: pacientes moribundos con una presión y pulso indetectables (Mc Bride and Bielefeldt-Ohmann, 2000). Durante el curso de la enfermedad, los niños con FHD/SCD muestran un incremento en el hematocrito y leucocitosis. En la mayoría de los casos hay una disminución de fibrinógeno, protrombina, factor VIII, antitrombina III y niveles de C3. Solo en algunos casos hay una leve albuminuria y una reducción de α -2antiplasmina. En la enfermedad severa, con choque, puede existir además coagulación intravascular diseminada. (Kabra, 1999; WHO, 1997).

CLASIFICACION DE LAS MANIFESTACIONES DEL VIRUS DEL DENGUE POR LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.

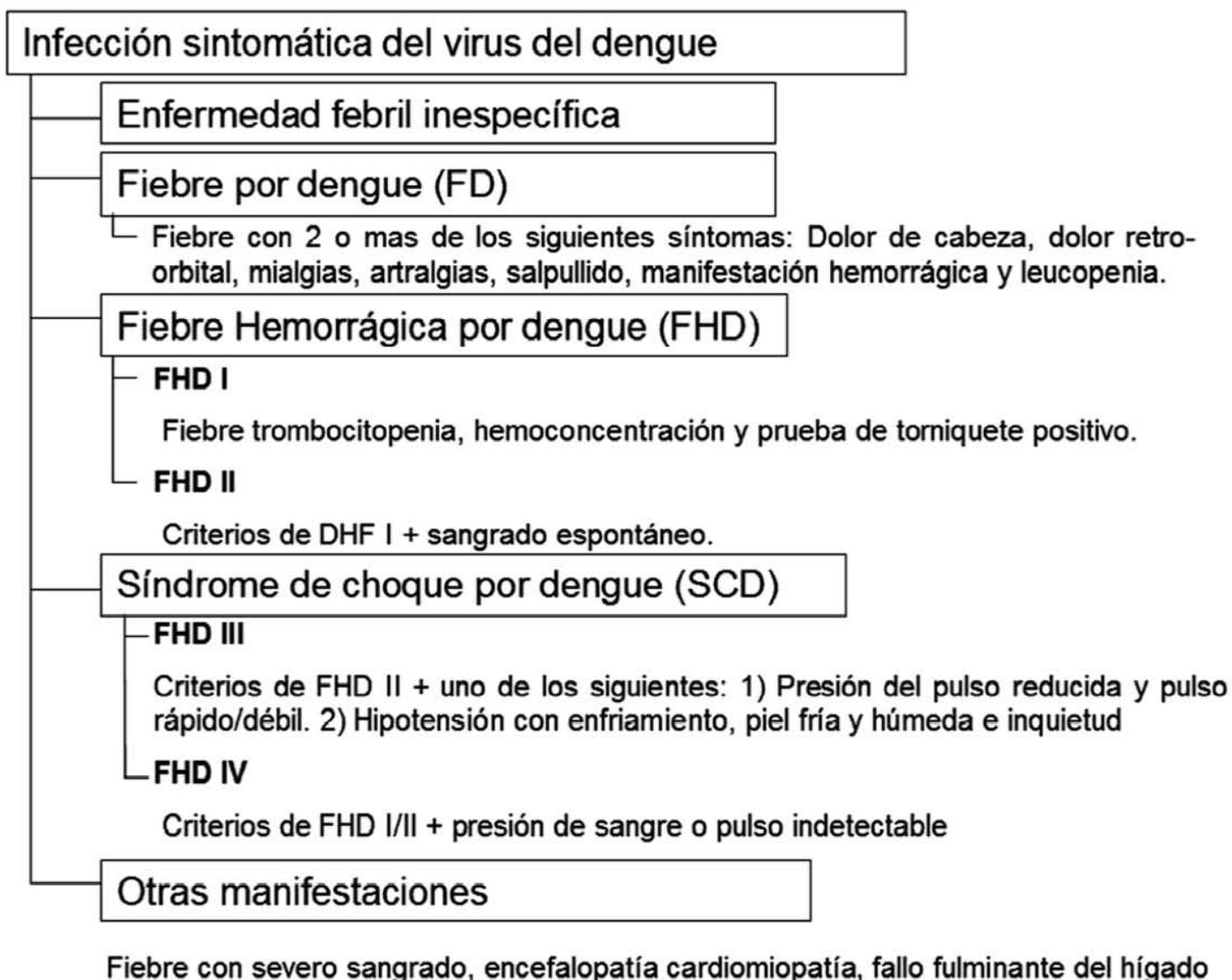


Figura 6. Clasificación de las manifestaciones clínicas del virus del dengue por la OMS. En el esquema se muestran las manifestaciones clínicas que definen la fiebre por dengue (FD), la fiebre hemorrágica por dengue (FHD), y el síndrome de choque por dengue (SCD).

IV. Diagnóstico.

El diagnóstico del dengue recientemente se ha facilitado por algunos factores importantes; el establecimiento de líneas celulares, la producción de anticuerpos monoclonales para el aislamiento e identificación del virus, el desarrollo de técnicas de ELISA para detección de anticuerpos específicos de la subclase IgM, y más recientemente la producción de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Guzmán and Kouri, 2001).

Aislamiento del DV. La sangre debe colectarse durante la fase aguda de la enfermedad (de 1-10 días), el aislamiento puede llevarse a cabo mediante 4 sistemas: 1) inoculación intracerebral de un ratón de 1-3 días de edad, este método es lento, poco sensible y costoso. 2) Cultivo en líneas celulares de mamíferos, tradicionalmente han sido empleadas 3 líneas celulares provenientes de hámster o de primate, BHK-21, LLC-MK2 y Vero, las cuales en general tienen mayor sensibilidad que la inoculación de ratón. 3) Inoculación de mosquito; este es el método más sensible por lo cual se elige para confirmación virológica en casos severos y fatales. 4) Cultivo en líneas celulares de mosquito siendo el más utilizado por su sensibilidad y costo, las líneas más usadas son: C6-36 de *A. albopictus*, AP61 de *A. pseudoscutellaris* y la TRA-284 de *Toxorhynchites amboinensis*. Una vez aislados los virus pueden detectarse mediante técnicas directas o indirectas ó con ayuda de anticuerpos marcados con fluorocromos (Isturiz *et al.*, 2000).

Detección de anticuerpos anti-dengue. La respuesta primaria, secundaria e incluso terciaria, pueden ser inducidas por los 4 diferentes serotipos. Durante una infección primaria, el paciente desarrolla anticuerpos del tipo IgM después de 5-6 días y anticuerpos del tipo IgG después de 7-10 días. Durante una infección secundaria se detectan niveles elevados de IgG, incluso durante la fase aguda, los cuales pueden aumentar considerablemente en las siguientes 2 semanas (Guzman and Kouri, 2001). Existen diferentes métodos para detectar los anticuerpos IgM e IgG. Entre los ensayos tradicionalmente empleados se encuentra la técnica de hemaglutinación. Un incremento de 4 veces o más en el título de anticuerpos es diagnóstico para una infección reciente de flavivirus, pero no para un aislado específico. Otra de las pruebas empleadas en el diagnóstico serológico es la neutralización de la reducción de placa lítica (NT). La NT es un ensayo sensible y específico para la detección de anticuerpos anti-dengue. Esta prueba ha sido una herramienta útil tanto en estudios epidemiológicos como en la identificación del VD (Guzman and Kouri, 1996).

La técnica de ELISA es la más utilizada en la práctica rutinaria, es simple ya que requiere poco equipo sofisticado. En los últimos años se han comercializado "Kits" a menor costo para el diagnóstico de laboratorio, además no requieren de entrenamiento especializado para la lectura del anticuerpo, estos incluyen La ELISA de microtítulo, el formato de tiras reactivas y una prueba rápida de hibridación en punto (Isturiz *et al.*, 2000).

Uno de los problemas en el diagnóstico, es el tiempo requerido. Los resultados con ELISA de IgM no son obtenidos en la fase temprana de la infección y el aislamiento viral

toma semanas. La técnica de PCR tiene la ventaja de que está basada en la replicación viral y no en el título del anticuerpo, así mismo los resultados se pueden obtener en 24 horas. Este procedimiento minimiza también problemas asociados con el aislamiento del virus, la pérdida de viabilidad por el almacenamiento, o la identificación de cepas no adaptadas para el crecimiento en cultivo. La principal desventaja de esta técnica, es la contaminación del amplicón y contar con personal capacitado en laboratorio (Vorndam and Kuno, 1997).

V. Etiopatogenia

Actualmente existen 2 hipótesis que intentan explicar el establecimiento del dengue hemorrágico. La primera fue propuesta por Halstead en 1977, en base a observaciones epidemiológicas en el sureste asiático, en donde el FHD/SCD es muy frecuente en niños mayores de 1 año con una infección previa (95 % de los casos). Sugiriendo una asociación de la infección secundaria con un elevado riesgo de dengue hemorrágico (Halstead, 1969). Poco tiempo después, el mismo autor demostró la facilitación de la infección dependiente de anticuerpos (FDA) (Halstead, 1977) proponiendo que la presencia de anticuerpos heterotípicos, no neutralizantes facilitan la penetración de virus al macrófago activándolo, el cual a su vez es capaz de activar otros sistemas como el del complemento en donde existe liberación de enzimas vasoactivas predisponiendo al establecimiento del choque hipovolémico.

Los estudios subsecuentes basados en esta hipótesis han correlacionado la FDA con la sobreproducción de citocinas proinflamatorias afectando a monocitos, células

endoteliales y hepatocitos, favoreciendo la inducción de la vasculopatía y coagulopatía presentes en la manifestación hemorrágica (Lei, 2001).

La segunda hipótesis fue propuesta por León Rosen en 1977, quien documentó una epidemia en una infección primaria con el serotipo 2 en las Islas Niue del pacífico en 1972. La epidemia afectó aproximadamente al 90 % de la población y los datos serológicos indicaron que era el primer brote de dengue en la región en 25 años, durante la epidemia se registraron casos hemorrágicos en niños mayores de 1 año. Debido a que la zona estuvo libre de dengue en 25 años, los niños mayores de 1 año no tenían anticuerpos de una infección previa con VD (Barnes and Rosen, 1974). Con base en lo anterior, Rosen sugirió que existen diferencias en la virulencia de las cepas circulantes en la naturaleza y que la mayor incidencia de las formas severas puede ser consecuencia de un aumento en la capacidad de replicación viral (Rosen, 1977).

VI. Sistema Hemostático.

La hemostasia bajo condiciones fisiológicas mantiene al organismo en un estado de anticoagulación. Ante la lesión vascular existe una respuesta hemostática rápida y potente limitada al lugar de la lesión. Este sistema está compuesto por tres elementos: el endotelio vascular, las proteínas plasmáticas de la coagulación-fibrinólisis y las plaquetas (Esmon, 2000).

Cuando existe daño al endotelio vascular, se genera una respuesta inmediata favoreciendo una vasoconstricción para evitar la pérdida de sangre (Fig. 7). La colágena

del subendotelio expuesta promueve la adhesión de las plaquetas, una vez adheridas se activan, degranulan ADP y tromboxano y exponen la glicoproteína IIb IIIa para unir factor de Von Willebran (VWF) y fibrinógeno. Estos cofactores favorecen el reclutamiento tanto de plaquetas como de cofactores de la coagulación como el factor V (FV), proveniente de las plaquetas o del plasma que sirven como sitio para el ensamblaje de complejos de iniciación de la coagulación en la superficie plaquetaria. De esta manera se acelera la activación del factor X (FX) y la protrombina en la generación de cantidades controladas de trombina la cual a su vez activa más plaquetas y cataliza la conversión del fibrinógeno a fibrina, contribuyendo a formar el tapón hemostático (Colman *et al.*, 2001).

La formación del tapón hemostático primario está temporal y espacialmente coordinado con el sistema de la coagulación. Tradicionalmente este sistema se ha dividido en la vía intrínseca y extrínseca e incluso una vía común (Fig. 8), sin embargo esta división no ocurre en vivo ya que el complejo del factor tisular (TF) con el factor VIIa, es un potente activador tanto del factor IX (FIX) como del FX y actualmente se conoce que la coagulación es dirigida principalmente por la vía primaria o vía del factor Tisular (Dahlbäck, 2005; Tapper and Herwald, 2000; Izaguirre, 20005).

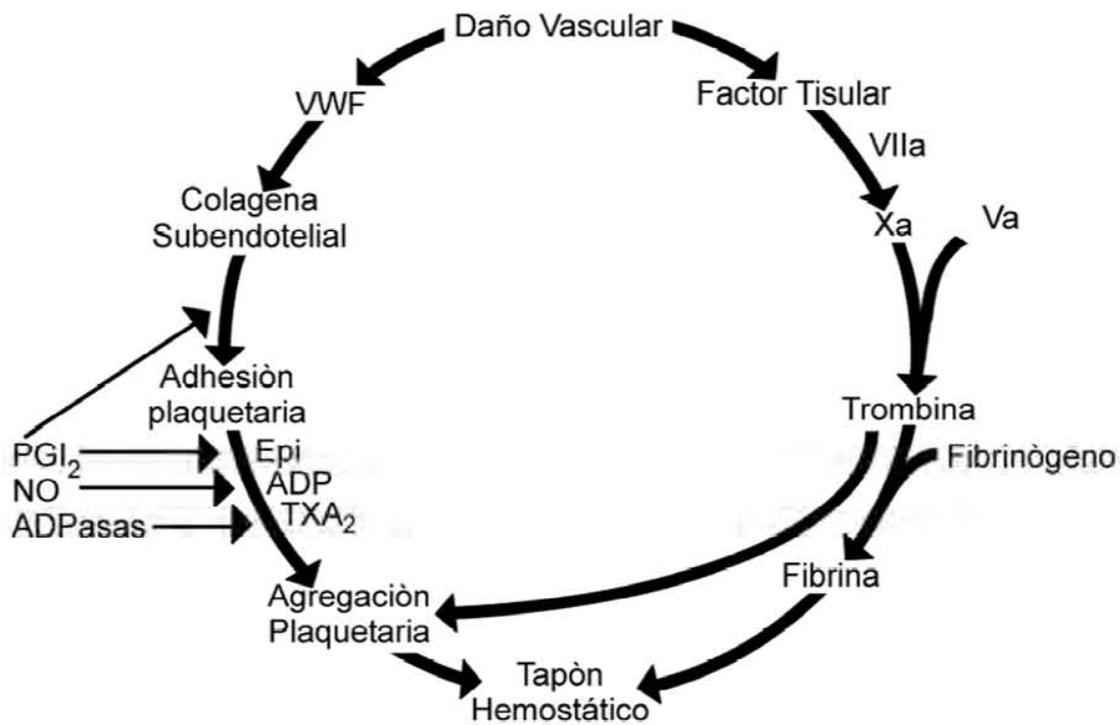


Fig. 7 Eventos participantes en la formación del tapón hemostático. El daño al endotelio vascular induce el reclutamiento de plaquetas a través del factor de Von Wilebran (VWF) o el factor tisular, la vía del factor tisular es capaz de iniciar con la cascada de coagulación al activar en presencia de Factor VIIa al Factor X, El factor X activado (Xa) junto con el factor Va generan trombina la cual polimeriza al fibrinògeno para formar el tapòn hemostático de fibrina. así mismo el VWF media la unión de las plaquetas a las colágena subendotelial, estas plaquetas pueden secretar epinefrina (Epi), Adenosin difosfato (ADP), o tromboxano que inducen la agregación, por otra parte el endotelio puede producir prostaglandina 2 (PGI₂), oxido nítrico (NO) o ADPasas. que influyan en la formación del tapòn hemostático .

La vía accesoria, conocida como vía intrínseca, inicia con la activación del factor XII cuando la sangre entra en contacto con el endotelio dañado o con una superficie cargada negativamente (Fig. 8). El factor XII activado (FXIIa) y el quinínogeno de alto

peso molecular (HK) en presencia de calcio se unen a la superficie celular y ejercen acción proteolítica sobre el factor XI activándolo a FXIa. El factor XIa, promueve la activación del FIX y este último se integra al complejo diez "asa", que incluye al cofactor VIIIa y los fosfolípidos. Finalmente el complejo diez "asa" activa al factor X a FXa que se incorpora al complejo protrombinasa (Colman *et a.*, 2001).

La vía del factor tisular, conocida como vía extrínseca, inicia con la formación del complejo TF/FXIIa en la superficie del endotelio activado. Este complejo escinde tanto al factor X como al factor IX. El factor Xa se integra al complejo protrombinasa, y el factor IXa al complejo diez "asa". La vía común recibe su nombre porque el complejo protrombinasa (FXa, Va y fosfolípidos), puede generarse a partir de cualquiera de las dos vías. Este complejo cataliza la activación de la protrombina a trombina. La trombina es una enzima clave en la coagulación ya que induce la formación de fibrina y activa el factor XIII. El factor XIIIa es el encargado de estabilizar las mallas de fibrinas mediante enlaces covalentes. (Tapper and Herwald, 2000).

Este sistema tiene una retroalimentación en varios niveles. La trombina activa los cofactores V y VIII y el factor XI. Los cofactores Va y VIIIa potencian la generación de mayores complejos diez "asa" y protrombinasa. Finalmente el factor XIIa, induce la formación de kalikreina proveniente de prekalicreina, la cual activa más factor XII (Dahlbäck, 2005).

formación de trombina al inactivar proteolíticamente los cofactores V y VIII de la coagulación. Así mismo, la trombina en el complejo trombina/trombomodulina pierde su capacidad de formación del coágulo. Segundo; Para evitar la expansión del coágulo, los factores son inhibidos por proteínas en circulación como el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), el inhibidor C1 (C1 INH) y la antitrombina III (AT III). Tercero: La fibrinólisis es inhibida por la proteína inhibidora de la fibrinólisis activada por trombina (TAFI) (Esmon, 2000). El sistema fibrinolítico es el encargado de retirar el coágulo de fibrina cuando el daño está reparado. El activador tisular del plasminógeno activa el zimógeno para convertirlo en enzima activa. La plasmina es la encargada de degradar la malla de fibrina.

VII. Estructura de la Plaqueta.

Las plaquetas son fragmentos celulares especializados que tienen forma discoide (Fig. 9). Cada plaqueta contiene una espiral periférica de microtúbulos, que junto con el esqueleto de actina posiblemente controla la forma discoidal característica. En esta región periférica el citoplasma es pobre en organelos, excepto por las regiones de la membrana plasmática que conectan con el sistema canalicular conectado a la superficie (SCCS). Ambas membranas son ricas en un glicocalix que contiene diferentes glicoproteínas de membrana como la GPIb/IX, GPIIb/IIIa y GPIIIB que participan tanto en agregación como en adhesión plaquetaria. La membrana plasmática también actúa como una superficie cargada negativamente para enriquecer la concentración local de factores como el FX, FV y protrombina. Así mismo, los gránulos

α contienen trazas de factor V. Además de los gránulos α , la plaqueta contiene gránulos densos, mitocondrias, peroxisomas y lisosomas, diferentes reservorios de glucógeno y dos sistemas membranales. El SCCS y el sistema tubular denso que funciona como almacén de calcio.

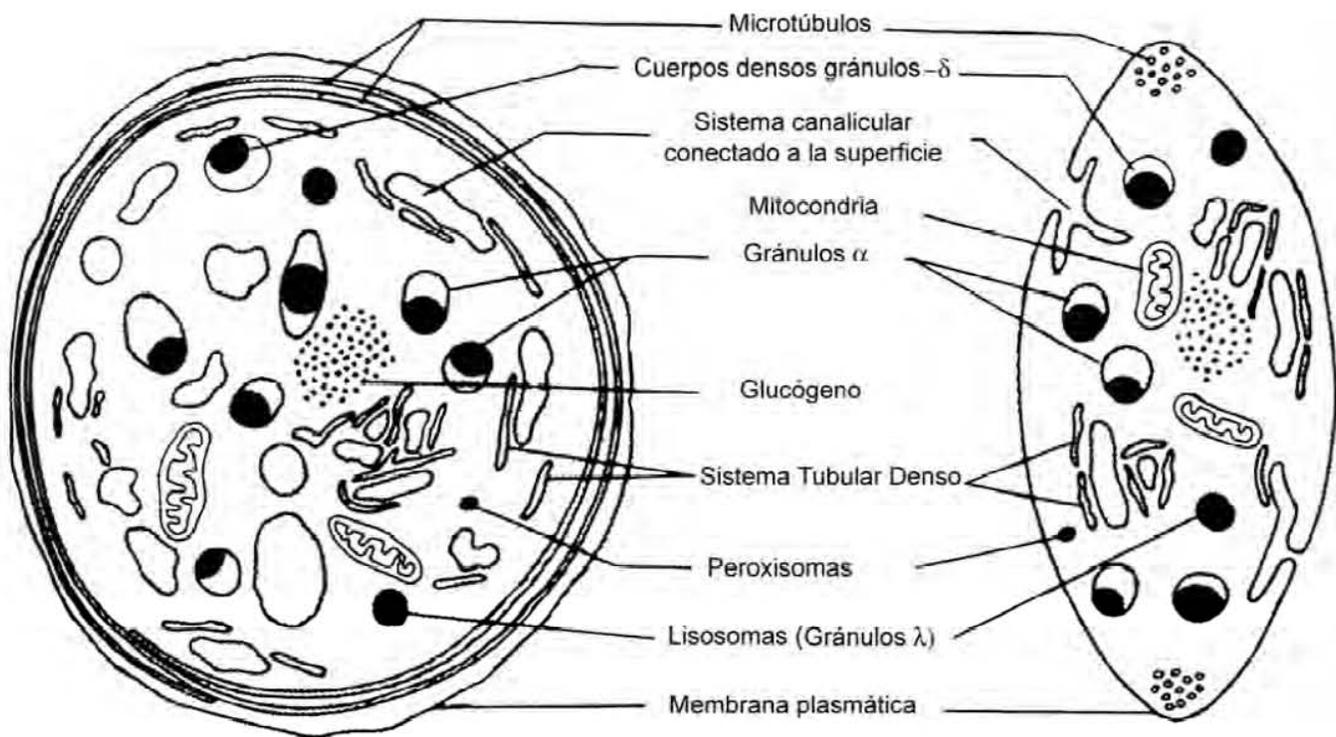


Figura 9. Estructura de las plaquetas. Las plaquetas presentan una serie de gránulos conocidos como gránulos alfa, delta y gamma, así como un sistema de membrana canalicular conectado a la superficie (SCCS), reservorios de glucógeno, peroxisomas, mitocondrias y microtúbulos en espiral.

VIII. Interacción del Virus del Dengue con las Plaquetas

La plaquetopenia es un dato patognomónico de la FHD, existen algunos reportes que intentan elucidar sus causas, sin embargo no explican totalmente el fenómeno. Se ha reportado que cepas virales aisladas de pacientes pediátricos con infección primaria de dengue 3 inhiben el crecimiento de células mononucleares del cordón umbilical humano (CBMNC) *In vitro*. Estas células son progenitores hematopoyéticos que al suprimir el crecimiento podrían estar contribuyendo a la plaquetopenia observada (Murge, 1997). Estos mismos autores observaron que la inhibición de las CBMNC fue mayor en los aislados provenientes de casos con DSS que los aislados de casos con DF. Por otra parte, este efecto inhibitorio podría estar mediado principalmente por la síntesis de la proteína 1 α inflamatoria de los macrófagos (MCP1- α), una quimiocina presente en los sobrenadantes de los cultivos infectados, ya que cuando fue bloqueada con anticuerpos monoclonales, el efecto de inhibición disminuyó (Murgue, 1998).

Otra causa de inducción de plaquetopenia puede ser el arresto de plaquetas mediado por el endotelio vascular. Krishnamurti y colaboradores demostraron que la adhesión de plaquetas en las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) estimuladas con LPS fue del 36 % con respecto al control, así mismo en las células infectadas con el virus del dengue se observó un incremento en la adhesión del 78 % con respecto al control (Krishnamurti, 2002).

Por otra parte, Wang y colaboradores demostraron en un sistema *in vitro* que el virus del dengue (marcado radiactivamente) es capaz de unirse débilmente a las plaquetas. Sin embargo, esta unión se incrementa drásticamente en presencia de anticuerpos específicos de pacientes convalecientes en comparación con sueros no inmunes a dengue. La unión del virus dependiente de anticuerpos específicos sugiere una posible lisis mediada por el complemento (Wang, 1995).

Lin describió la presencia de anticuerpos en el suero de pacientes infectados con el VD que presentan reacción cruzada con las plaquetas. Al comparar sueros de pacientes tanto en etapa aguda como en etapa convaleciente mediante citometría de flujo, Lin observó que los niveles de anticuerpos anti-plaquetas fueron mayores en los casos con FHD que en los casos con FD. Los anticuerpos autoreactivos fueron de la subclase IgM y se detectaron aún en la fase convaleciente. Así mismo, se evaluó la capacidad de lisis en presencia de complemento, la cual fue significativamente mayor en los casos de FHD que la inducida por los sueros de pacientes con FD (Lin, 2001).

Por otro lado, se reportó que existe una correlación entre los niveles de anticuerpos IgG anti-plaquetas con la presencia de trombocitopenia durante una infección secundaria con DV. En un estudio prospectivo con 53 pacientes, sin diagnóstico de DF/DSS pero con infección secundaria, se observó una correlación inversa entre la cuenta de plaquetas y los niveles de IgG anti-plaquetas durante la fase aguda, observando que a mayor incremento de anticuerpos existía una cuenta de plaquetas baja (Oishi, 2003). El mismo autor analizó la correlación de trombocitopenia y los niveles de IgM-anti plaquetas, observando que los niveles de ambas inmunoglobulinas

(IgM e IgG) fueron mayores en la fase aguda con respecto a la etapa convaleciente (Saito, 2004).

Hasta la fecha se conoce poco del efecto directo del virus del dengue en la actividad plaquetaria. Solo existe un reporte que demuestra un retardamiento en la agregación plaquetaria en presencia de ADP (Mitrakul, 1977) en pacientes con FHD, así mismo se desconoce el efecto de los diferentes serotipos del VD en la función plaquetaria.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los casos de FHD/SCD las manifestaciones clínicas severas más importantes están relacionadas con un cuadro hemorrágico asociado con alteraciones en la coagulación, daño al endotelio vascular y plaquetopenia (Gubler, 1998).

Las plaquetas son fragmentos celulares especializados que participan en la hemostasia debido a que poseen capacidad tanto pro-fibrinolítica como antifibrinolítica (Miles *et al.*, 1986) y cuya interacción con el sistema plasminógeno-plasmina es muy importante durante la regulación de la hemostasia (Miles and Plow, 1985; Fay, 1994). En nuestro grupo previamente hemos reportado la capacidad del virus del dengue para unirse al plasminógeno y activarlo a plasmina (enzima encargada de degradar los coágulos de fibrina) como un fenómeno importante en la instalación de la manifestación hemorrágica, además en este mismo estudio se observó un efecto diferencial en la inhibición por a2 antiplasmina, la cual solo actuó en la activación mediada por aislados clásicos. En este estudio nos proponemos evaluar la participación de diferentes serotipos, tanto de aislados clásicos como hemorrágicos del virus del dengue en la función plaquetaria y su relación con el sistema plasminógeno–plasmina.

HIPOTESIS

Independientemente del *status* inmunológico del individuo, el virus del dengue *per se* puede modificar la actividad plaquetaria.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si diferentes aislados clásicos y hemorrágicos del virus del dengue, son capaces de modificar la actividad plaquetaria de manera dependiente o independiente de la activación del plasminógeno

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar la unión y activación del plasminógeno en la superficie plaquetaria en presencia de los 4 serotipos, tanto de aislados clásicos (FD), como hemorrágicos del virus del dengue (FHD).
- 2). Evaluar el efecto en la actividad agregante de las plaquetas, en presencia de los dengue virus.
- 3.) Determinar el efecto de la plasmina activa en la integridad de las plaquetas.

MATERIALES Y METODOS

PROPAGACION Y TITULACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE (VD).

Los aislados provenientes de casos clásicos, D2C (Dengue 2 Nueva Guinea), D3C (Dengue 3), y D4C (Dengue 4), así como los aislados provenientes de casos hemorrágicos D2H (1013), D3H (1021), y D4H (1187) fueron donados por el centro para el control de las enfermedades (CDC) Atlanta, Estados Unidos de Norteamérica. Todos los aislados del VD fueron propagados en monocapas confluentes de células de riñón de mono verde (LLC-MK2). Las células se crecieron en botellas de 75cm² a una multiplicidad de infección de 0.1 (m.o.i= 0.1) y fueron incubadas a 37°C en medio mínimo esencial suplementado con 5% de suero fetal bovino, 0.05% de glutamina y antibióticos. Los cultivos se cosecharon cuando se presentó el máximo efecto citopático, pero antes del desprendimiento celular. Posteriormente se clarificó el sobrenadante de los cultivos mediante centrifugación a 200g durante 10 min. a partir de estas muestras se llevó a cabo la titulación de las diferentes muestras mediante ensayo de placa lítica en monocapas confluentes de células LLC-MK2. Las células fueron infectadas con diluciones seriadas en base diez e incubadas durante 2 h. a 37°C, posteriormente retiró el medio y fue sustituido por medio suplementado con 1% de metilcelulosa. Los cultivos se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂ hasta observar el efecto citopático. Finalmente las monocapas se tiñeron con Giemsa, contando directamente las unidades formadoras de placas líticas (UFP).

OBTENCIÓN Y LAVADO DE PLAQUETAS.

Las plaquetas se obtuvieron a partir de una muestra sanguínea de seis donadores sanos contenida en tubos vacutainer de 5 ml con citrato de sodio como anticoagulante en una proporción 2:9 (ya que esta cantidad de citrato evita la activación plaquetaria). Las muestras se centrifugaron a 2300 rpm por 5 min. para separar el plasma rico en plaquetas (PRP). El PRP de los seis donadores fue mezclado y centrifugado a 3,000 rpm durante 20 min. Posteriormente, se decantó el sobrenadante resuspendiendo el botón plaquetario en 3 ml de Buffer de Corash (Wise *et al.*, 1980) con movimientos suaves, con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico. La suspensión se centrifugó nuevamente a 3,000 rpm durante 20 min, descartando el sobrenadante. EL botón final de plaquetas fue resuspendido con 3 ml de Buffer de Corash. La muestra se mantuvo a 37 °C hasta su uso.

ENSAYOS DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA.

Las plaquetas obtenidas de acuerdo a la metodología previamente descrita fueron evaluadas funcionalmente mediante ensayos de agregación plaquetaria de acuerdo a Maugeri y col (Maugeri *et al.*, 1990). Brevemente: Inicialmente se ajustaron las muestras a una concentración de 250 mil plaquetas/ μ l con buffer de Corash, así mismo el fibrinógeno proveniente de plasma humano fue utilizado a concentración final de 0.5 g/L. La capacidad de respuesta de las plaquetas se evaluó con la ayuda de un agregómetro (Chrololog-lumi) usando el método turbidimétrico, el cual se basa en la diferencia de densidad óptica (transmitancia) que existe entre un plasma rico de plaquetas (PRP) y un plasma pobre de plaquetas (PPP), a medida que las plaquetas se

agregan y permiten un mayor paso de luz, La densidad óptica disminuye y es posible graficar una curva de agregación en función del tiempo.

ENSAYOS DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA.

La activación plaquetaria fue medida en un millón de plaquetas no estimuladas o estimuladas con cualquiera de los siguientes agonistas; trombina a una dosis de 0.3 UI/ml, plasmina activada por VD o plasmina activada por SK. Las plaquetas fueron fijadas con paraformaldehido 1% PBS (vol/vol) pH 7.4 por 20 min. a T°C ambiente. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas 8 min. a 6 000 rpm. eliminando el sobrenadante, fueron resuspendidas en PBS e incubadas con el anticuerpo anti-selectina P durante 20 min. a 4 °C. Las muestras fueron centrifugadas nuevamente 8 min. a 6000 rpm, eliminando el sobrenadante, resuspendidas en PBS e incubadas con el anticuerpo secundario IgG anti-mouse acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). La lectura se llevo a cabo en un citómetro de flujo (Becton Dickinson).

UNIÓN DEL PLASMINOGENO A LA PLAQUETA.

Las plaquetas lavadas fueron activadas con 4 mg/ml de colágena en una concentración de 3×10^6 PLT/ml, incubadas con 0.16 U/ml de PLG 2h a 4°C y fijadas con paraformaldehido-PBS 1%. Posteriormente se centrifugaron 8 min. a 6 000 rpm y se resuspendieron en PBS-BSA 3 % incubándose con un anticuerpo anti-PLG durante 15 min a 4 °C. La suspensión se volvió a centrifugar y se resuspendió con PBS-BSA 3% incubándose con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC. Las muestras fueron evaluadas con la ayuda de un citómetro de flujo Becton Dickinson.

EVALUACIÓN DE LA GENERACIÓN Y ACTIVIDAD DE PLASMINA.

Para los ensayos de activación en la superficie plaquetaria, las células se activaron con colágena y se incubaron con 0.16 U/ml de PLG 2h 37 °C, posteriormente fueron centrifugadas, resuspendidas y adicionadas a la placa de ELISA con el sustrato cromogénico (Tosyl-glycyl-prolyl-lysine-4-nitranilide-acetate, Chromozyn PL Roche), estreptocinasa en presencia de los diferentes aislados del virus del dengue (FHD/SCD).

Ensayos de activación del PLG en la superficie de las plaquetas: En una placa de ELISA (costar 3690) se fijaron 3×10^6 PLT/ml incubando 2h a 37°C, bloqueando con BSA 1%, 3% y 9%, toda la noche. Las plaquetas fijadas se activaron con 4 mg/ml de colágena, 10 min. 37°C. Se lavaron 3 veces durante 5 min. con PBS, posteriormente, se incubaron con 6 U/ml de PLG, 2h a 4°, nuevamente se lavaron 3 veces con PBS. Finalmente se incubaron con 0.3 mg de sustrato cromogénico agregando 7.5 SK UI/ml de estreptocinasa, o 50 µl de virus a diferentes concentraciones. La absorbancia a 405nm fue medida en un lector de ELISA (Ascent Multiskan) a diferentes tiempos durante 3 h a 37 °C.

DETERMINACION DE LA LISIS PLAQUETARIA.

Para el ensayo de lisis plaquetaria inicialmente fue necesario generar plasmina activa, la cual se obtuvo incubando 1.2 U/mL del zimógeno tanto con los aislados virales (DHF/DF) a una concentración de 1×10^5 como con la estreptocinasa. Posteriormente, la plasmina activa fue incubada por 60 min. con 8×10^6 plaquetas lavadas usando como control positivo de lisis la misma cantidad de plaquetas lavadas pero incubadas con SDS 01 %, Las concentración de plaquetas antes y después de la incubación con plasmina se determinó mediante un hemocitómetro Coulter.

RESULTADOS

Estandarización de la Concentración de Trombina.

Con el objeto de determinar la concentración adecuada para cada uno de los experimentos, llevamos a cabo ensayos de activación de plaquetas provenientes de donadores sanos con diferentes concentraciones de trombina previamente sugeridas en los manuales de agregometría plaquetaria, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 Unidades internacionales de trombina (Maugeri et al., 1990).

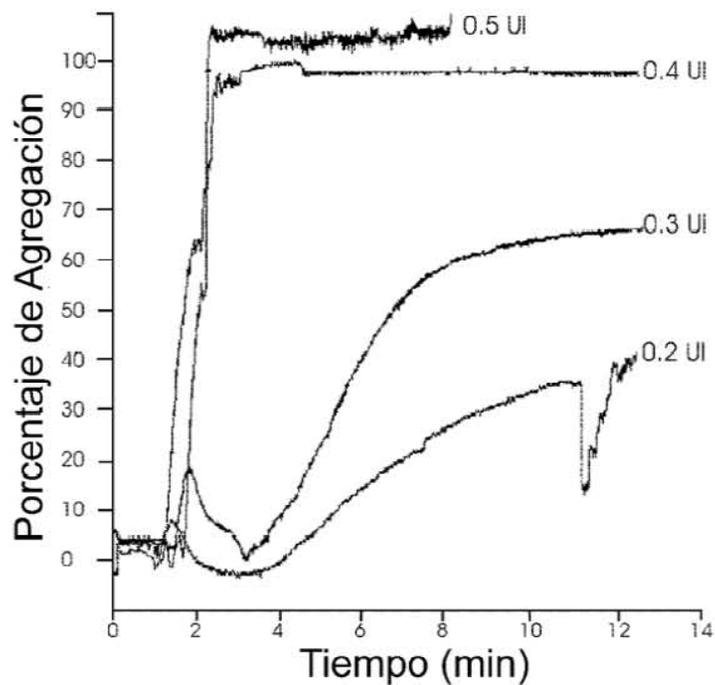


Figura 10. Determinación de la concentración óptima de trombina en la agregación plaquetaria. Plaquetas provenientes de donadores sanos estimuladas con trombina a concentraciones de 0.2, 0.3 0.4 y 0.5 UI durante 14 min.

En la Fig. 10, se observa que la concentración de 0.5 UI de trombina genera una agregación muy fuerte que sobrepasa el valor de 100 % en la escala del agregómetro. La concentración de 0.4 UI dio una agregación muy rápida pero sin ser mayor al 100 % en la escala, la concentración de 0.3 presenta una curva de agregación intermedia con un valor aproximado de 65% y por ultimo la concentración de 0.2 UI generó una agregación débil llegando a un valor aproximado del 40 %. Con base en lo anterior decidimos emplear utilizar valores de 0.3 UI y 0.4 UI en los experimentos subsecuentes.

Efecto de los Dengue virus en la Agregación Plaquetaria.

Hasta la fecha no existen estudios relacionados con la evaluación del efecto directo de VD en la agregación plaquetaria. Para determinar si existe una modificación en la función plaquetaria (agregación), llevamos acabo ensayos de agregometría utilizando plaquetas de donadores sanos en presencia de diferentes aislados del VD y de la trombina (activador). En la Fig. 11 se observa que ninguno de los dengue virus (aislados clásicos y hemorrágicos) estimula las plaquetas para inducir agregación. En contraste, las plaquetas que fueron estimuladas con 0.3 UI de trombina generaron una agregación normal.

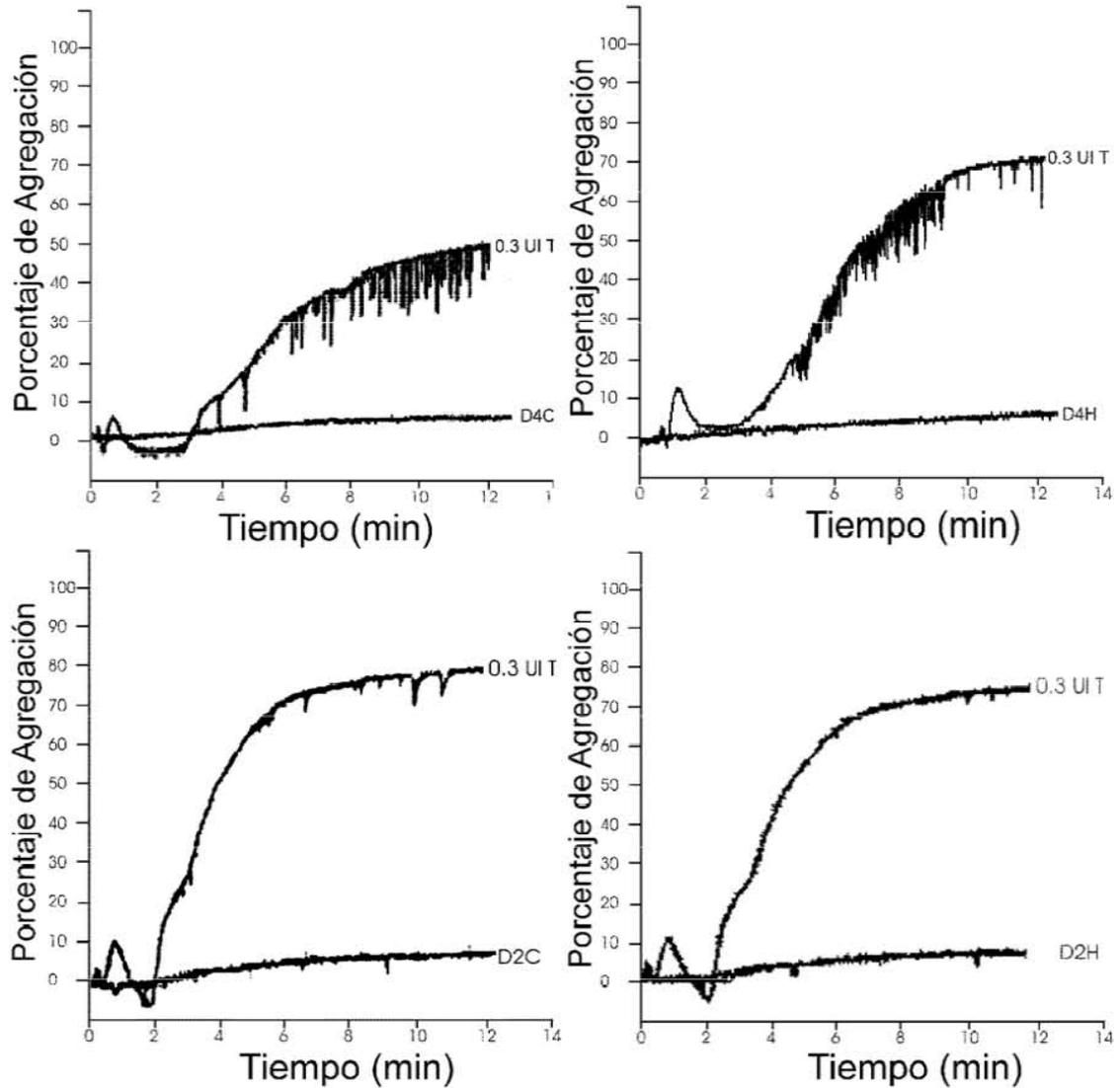


Figura 11. Efecto del virus del dengue en la agregación plaquetaria. Plaquetas provenientes de donadores sanos fueron estimuladas con trombina a una concentración de 0.3 UI ó con dengue virus; D4C (dengue 4), D4H (1187), D2C (D2 Nueva Guinea), y D2H (1013) durante 14 min.

Efecto del Virus del Dengue en la Agregación Plaquetaria Mediada por Trombina.

Para evaluar un posible efecto sinérgico en la activación plaquetaria, llevamos a cabo ensayos de agregación plaquetaria en presencia de plaquetas provenientes de donadores sanos las cuales fueron estimuladas con dosis por debajo del umbral de activación, 0.01 y 0.1 UI de trombina y con el aislado hemorrágico D2H ($10^{13} \times 10^5$). Las plaquetas estimuladas al mismo tiempo con el virus del dengue y la microdosis de trombina no indujeron agregación plaquetaria (Figura 12A).

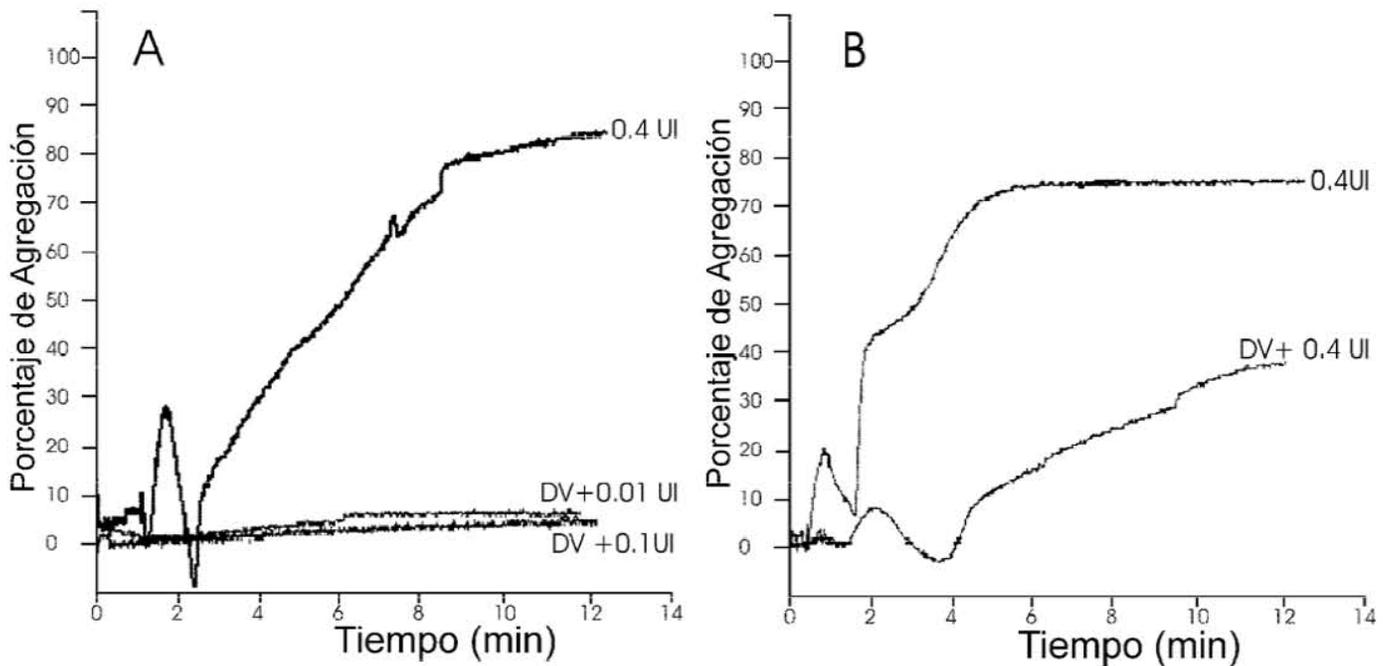


Figura 12. Efecto del virus del dengue en la agregación plaquetaria mediada por trombina. (A) Plaquetas provenientes de donadores sanos fueron estimuladas con dengue virus (DV) y microdosis de trombina a una concentración de 0.001 UI y 0.1UI. (B) Agregación de plaquetas estimuladas DV y 0.4 UI de trombina.. En ambos casos plaquetas con 0.4 UI de trombina fueron empeladas como control.

Observamos que el virus del dengue no activó las plaquetas, sin embargo existe la posibilidad de que el VD favorezca un efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria. Para evaluar esta posibilidad se incubaron plaquetas de donadores sanos en presencia del DV durante 5 min. y posteriormente fueron estimuladas con trombina a 0.4 UI. Encontramos que el aislado hemorrágico dengue D2H (10^{13} 1×10^5) fue capaz de inhibir la agregación de plaquetas estimuladas con 0.4UI de trombina (Fig. 12B).

Inhibición de la Agregación Plaquetaria por el Virus del Dengue

Con base a que observamos un efecto inhibitorio de la capacidad agregante de las plaquetas humanas por la cepa viral D2H (10^{13} 1×10^5) llevamos a cabo estos mismos ensayos en presencia de diferentes aislados clásicos y hemorrágicos utilizando diferentes concentraciones. Debido a la variabilidad de la técnica de agregometría plaquetaria, el valor de las plaquetas estimuladas con trombina pero sin virus del dengue fue tomado como el 100%. Encontramos que los aislados clásicos en concentraciones bajas no indujeron inhibición plaquetaria, sin embargo en títulos elevados (1×10^5) del serotipo D4C se presenta una inhibición del 35%. En contraste los serotipos D2C.y D3C no presentaron efecto inhibitorio en ninguna de las concentraciones ensayadas (Fig. 13)

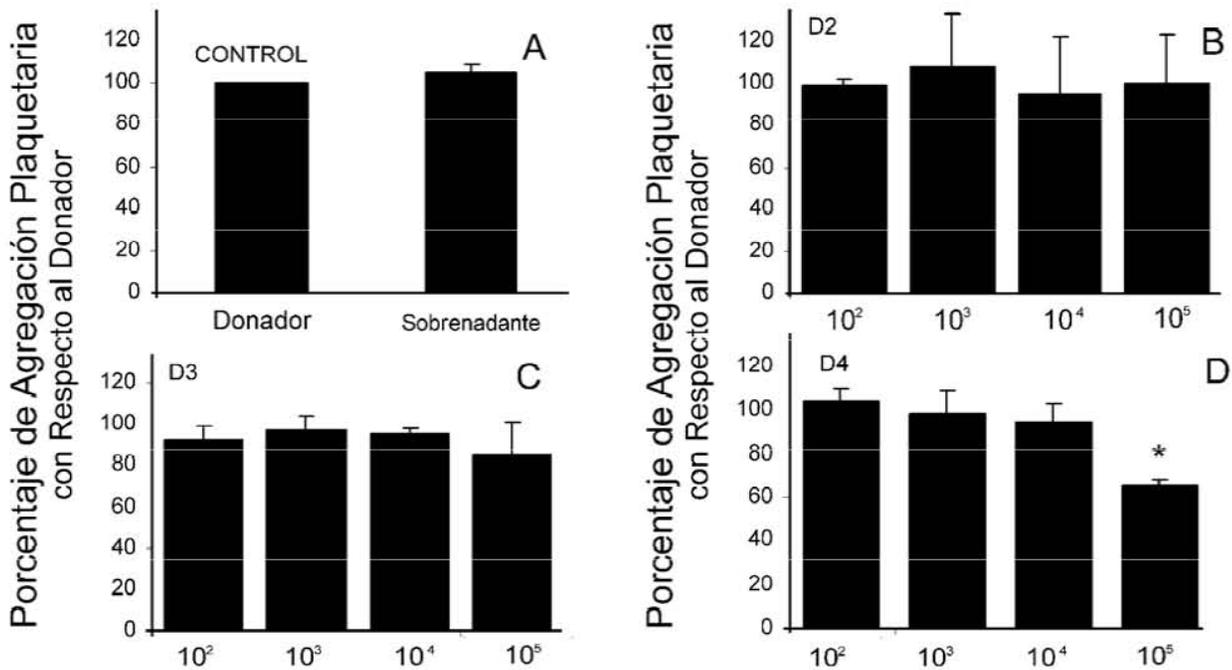


Figura 13. Inhibición de la agregación plaquetaria por los aislados clásicos del VD. Las plaquetas de donadores sanos fueron preincubadas con el sobrenadante de las células en LLC-MK2 (A), el aislado DEN2 (B), el aislado DEN3 (C) o el aislado DEN4 (D) y posteriormente estimuladas con 0.4 UI de trombina durante 14 min. Títulos virales de 10^2 a 10^5 . Se muestra la desviación estándar de 3 ensayos. * Diferencia significativa con respecto al sobrenadante usando el análisis de t -student.

En contraste los aislados hemorrágicos fueron capaces de inhibir la agregación plaquetaria aún en títulos bajos. El D3H fue el único que presentó efecto inhibitorio significativo con un título de 10^2 , en el títulos de 10^3 y 10^4 todos los aislados presentaron diferencia significativa con respecto al sobrenadante. La máxima inhibición observada fue del 42 % en el serotipo D3H a un título de 1×10^3 PFU. En comparación con los serotipos clásicos, en presencia de los aislados hemorrágicos no se incrementó la inhibición de la agregación plaquetaria aún en el título viral más alto (Fig. 14).

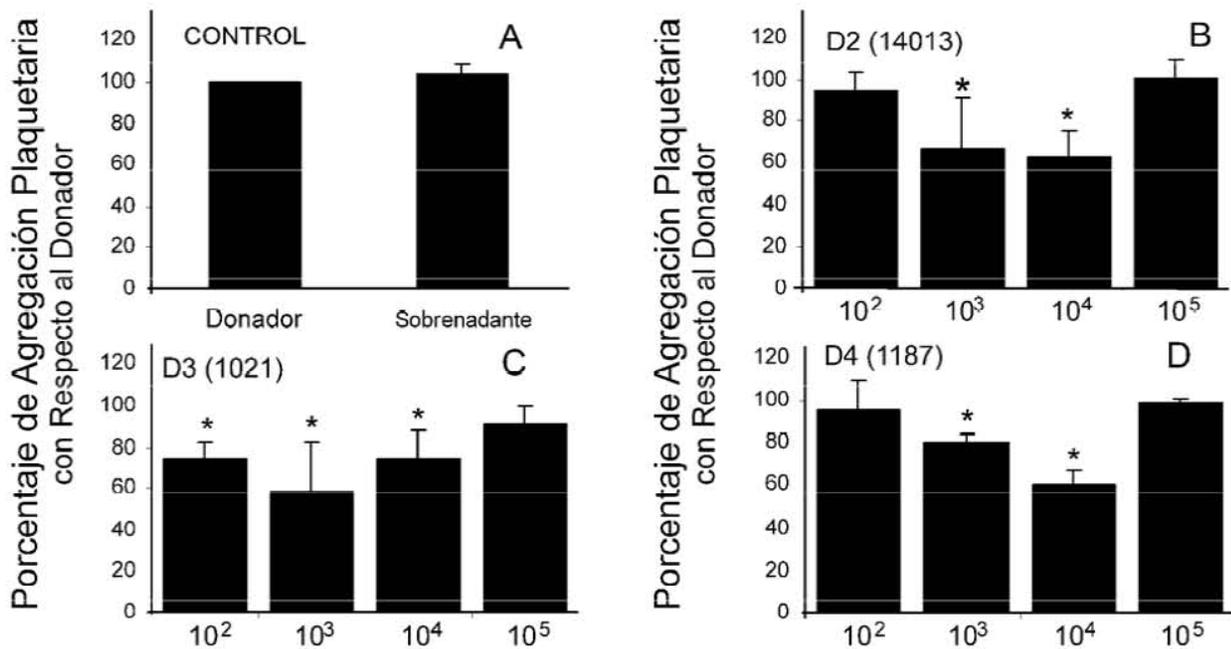


Figura 14. Inhibición de la agregación plaquetaria por los aislados hemorrágicos del VD. Plaquetas de donadores sanos preincubadas con el sobrenadante de células LLC-MK2 (A) o con el aislado D2 -1013 (B), el aislado D3-1021 (C) o el aislado D4-1187 (D) y posteriormente estimuladas con 0.4 UI de trombina durante 14 min. Títulos virales de 10² a 10⁵. Se muestra la desviación estándar de 3 ensayos. * Diferencia significativa con respecto al sobrenadante usando el análisis de t -student.

Evaluación funcional de las Plaquetas.

Para eliminar los componentes del plasma como el fibrinógeno y los factores de la cascada de coagulación, las plaquetas fueron lavadas con buffer de Corash (Wise *et al.*, 1980) y utilizadas en los ensayos posteriores de citometría de flujo y de activación del plasminógeno. Evaluamos diferentes protocolos de la extracción de las plaquetas para determinar la metodología óptima (Mustard *et al.*, 1972; Hendler 1990; Wise *et al.*, 1980). En la tabla 1, se muestran las condiciones de lavado, los problemas y el porcentaje de recuperación de plaquetas, la elección del método se basó en el porcentaje de recuperación.

Tabla 1 Métodos empleados para el lavado de plaquetas. Para determinar el método más eficiente se llevaron a cabo diferentes condiciones.

CONDICIONES	BUFFER	RECUPERACIÓN.	PROBLEMAS	REF.
2 centrifugaciones 1ª 2,300 rpm 10 min. 2ª 2,300 rpm 5 min.	Buffer Tyrode	15%	Problemas en la 1ª resuspensión. PLT's en el sobrenadante	Mustard <i>et al.</i> , 1972
Gradiente de albúmina 1ª 2,300 rpm 10 min.	Buffer Tyrode BSA	0%	Problemas en formación del gradiente y recuperación	Hendler, 1990
1 2,300 rpm 10 min. Dilución del PRP 1:2 con Buffer	Buffer Tyrode	25%	Problemas en la resuspensión.	Modificado de Mustard <i>et al.</i> , 1972
2 centrifugaciones 1ª 3000 rpm 20 min. 2ª 3000 rpm 20 min.	Buffer Tyrode	6.6 %	Problemas en la primera resuspensión.	Modificado de Mustard <i>et al.</i> , 1972 y Wise <i>et al.</i> , 1980
2 centrifugaciones 1ª 3000 rpm 20 min. 2ª 3000 rpm 20 min.	Buffer Corash	21.2 %	Problemas en la primera resuspensión.	Wise <i>et al.</i> , 1980
2 centrifugaciones 1ª 3000 rpm 20 min. 2ª 3000 rpm 20 min. Citrato de Sodio 2:9	Buffer Corash	68 %	Mejor resuspensión en la primera centrifugación	Modificado de Wise <i>et al.</i> , 1980

Para evaluar funcionalmente estas plaquetas se incubaron con 0.3 UI de trombina o sin trombina, ambas en presencia de fibrinógeno. Estas muestras respondieron al estímulo mostrando una agregación del 78%, en contraste a las plaquetas que no se incubaron con el activador (Fig. 15A), así mismo determinamos la expresión de la P-selectina, esta proteína se expresa en la membrana después que las plaquetas son estimuladas con un agonista y la usamos como marcador de activación, En la Fig. 15B puede observarse que las plaquetas estimuladas con trombina expresan más P-

selectina en comparación con las plaquetas no estimuladas, además utilizando el Índice de activación plaquetaria (IPA) que refleja la calidad (fluorescencia media, MCF+) y cantidad (numero de positivos, F+) de la activación plaquetaria ($IPA = (MCF+)(F+)/100$), se hace mas evidente las diferencias, Plaquetas estimuladas, $IPA=158.7$ con respecto a plaquetas no estimuladas, $IPA=7.8$ y el control de serotipo que fue incubado con un anticuerpo anti-IgG de ratón ajena al sistema, $IPA=0$. Juntos estos ensayos demostraron que el proceso de lavado no activó las plaquetas y que conservaron su capacidad de estímulo

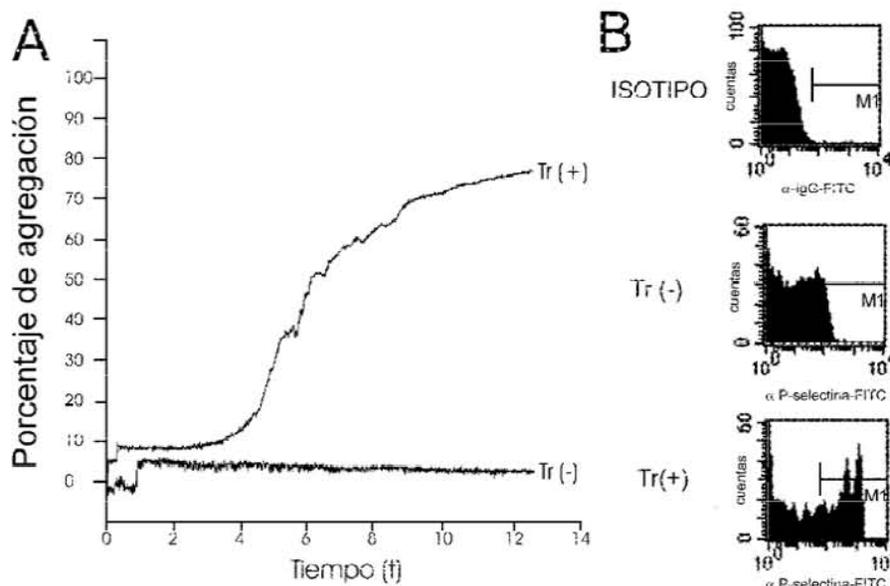


Figura 15. Evaluación funcional de las plaquetas lavadas. (A.) Agregación de las plaquetas lavadas estimuladas con trombina (Tr +) o sin estímulo (Tr-) durante 14 min. (B) Expresión de la P-selectina inducida por trombina (Tr+) sin trombina (Tr-). Control de inmunoglobulina (isotipo).

Unión del Plasminógeno a la Superficie de la Plaqueta.

Se ha reportado que la plaqueta activada tiene una elevada capacidad de unión del PLG (Miles and Plow, 195). Para monitorear la unión del PLG a las plaquetas lavadas

fueron empleadas varias condiciones de unión de PLG (Tabla 2). La Detección del PLG en la superficie celular se llevó a cabo mediante ensayos de citometría de flujo. Como se observa en la Fig. 16 la condición 2 favoreció la mejor detección del PLG (incubación del PLG de 2 h a 37 °C con la fijación de las plaquetas con paraformaldehido antes de la tinción), la cual se presentó en aproximadamente el 68% de la población de plaquetas en contraste con el 37% de en la condición 1, el 36% en la condición 3 y 48% la condición 4 (Fig. 16).

Tabla 2 condiciones probadas para la evaluación de la unión del PLG. La extracción, lavado y activación de plaquetas fue la misma en los cuatro métodos.

Condición 1	<u>Condición 2</u>	Condición 3	Condición 4
Obtención, lavado y activación de plaquetas			
Centrifugar, resuspender			
Incubar PLT con PLG 2 h a 37 °C		Incubar PLT con PLG 2 h a 4 °C	
Centrifugar y resuspender	Centrifugar y resuspender	Centrifugar y resuspender	Centrifugar y resuspender
Incubar el 1er anticuerpo	Fijar con 1 % paraformaldehido	Incubar el 1er anticuerpo	Fijar con 1 % paraformaldehido
Centrifugar y resuspender	Centrifugar y resuspender	Centrifugar y resuspender	Centrifugar y resuspender
Incubar 2do anticuerpo,	Incubar 1er anticuerpo	Incubar 2do anticuerpo,	Incubar 1er anticuerpo
Fijar con 1 % paraformaldehido	Incubar el 2do anticuerpo	Fijar con 1 % paraformaldehido	Incubar el 2do anticuerpo,
Centrifugar Y resuspender		Centrifugar Y resuspender	

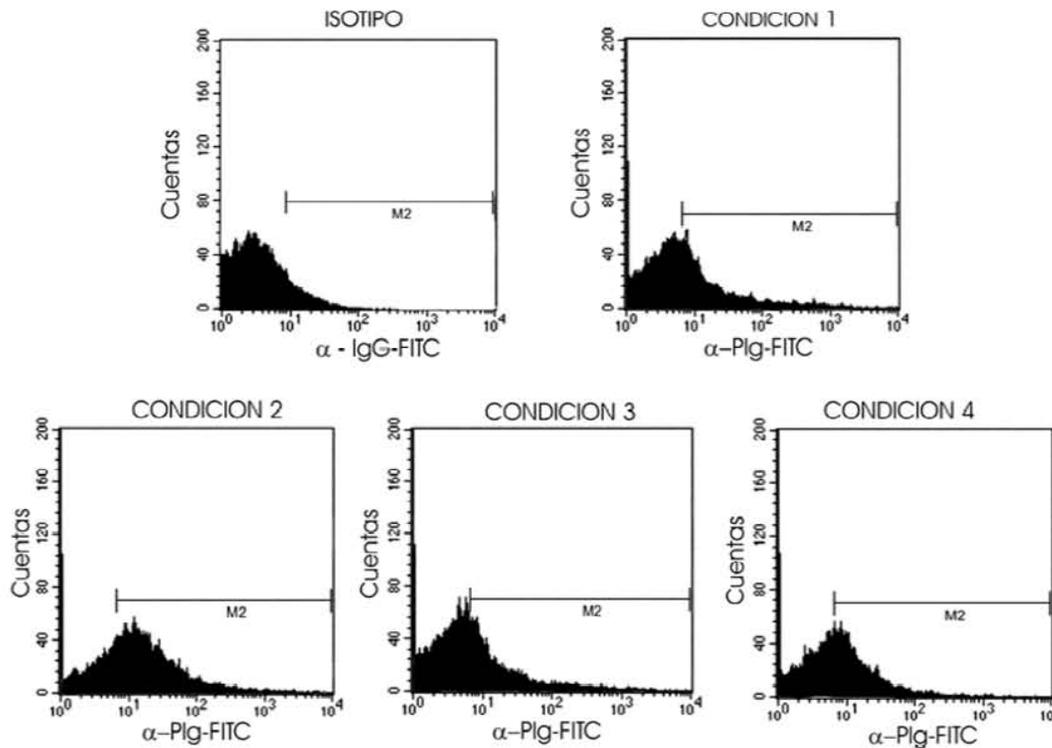


Figura 16. Unión del plasminógeno a las plaquetas activadas. Se evaluaron diferentes condiciones para detectar la mejor capacidad de unión del PLG a la superficie plaquetaria. Plaquetas de donadores sanos fueron lavadas e incubadas con PLG en diferentes condiciones Condición 1; 2 h 37 °C, fijado después de tinción, condición 2; 2h 37 °C fijado antes de tinción (abajo izquierda), Condición 3; 2h 4°C fijado después de tinción (abajo centro), Condición 4; 2h 4°C fijado antes de tinción (abajo derecha). Control de Isotipo (arriba izquierda).

Activación del Plasminógeno en la Superficie de las Plaquetas.

Una vez que confirmamos que el plasminógeno se unió a la superficie de la plaqueta, estandarizamos las condiciones de activación del PLG. Inicialmente determinamos la concentración de plaquetas empleadas en los diferentes ensayos agregando diferentes concentraciones en buffer PBS, tomando la lectura a 405 nm, elegimos la cantidad de 3 millones de plaquetas por ser el máximo número de plaquetas con menor absorbancia

(17A). Posteriormente colocamos los controles del ensayo de activación del PLG; plaquetas activadas y plaquetas no activadas en presencia de sustrato cromogénico, o plasminógeno con sustrato cromogénico y plaquetas con plasminógeno, sustrato cromogénico y estreptocinasa (SK) como activador. En la Fig. 17B se observa que solo en presencia de estreptocinasa hay un aumento importante de la absorbancia debido a la ruptura del sustrato cromogénico por la generación de plasmina. Además la activación del plasminógeno en presencia de plaquetas fue mayor que la que se generó en ausencia de plaquetas (17C).

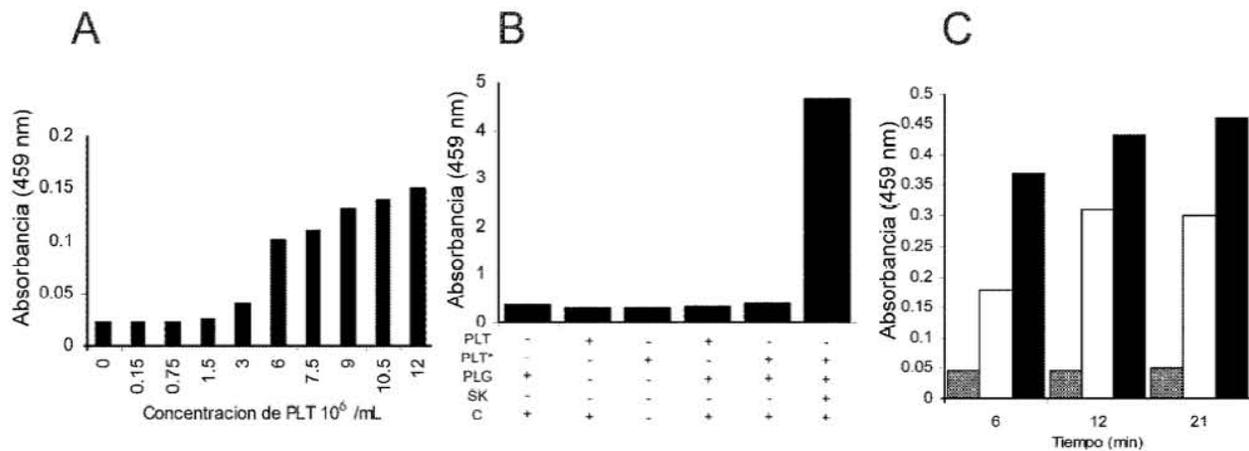


Figura 17. **Establecimiento de las condiciones óptimas de activación del plasminógeno.** (A) Señal basal de diferentes concentraciones de plaquetas, (B) combinación de los elementos de la reacción y (C) la activación del plasminógeno en presencia (barra negra) y en ausencia (barra blanca) o solo el sustrato cromogénico (barra gris). Plaquetas no activadas (PLT), plaquetas activadas (PLT*), plasminógeno (PLG), estreptocinasa (SK), sustrato cromogénico (C).

Finalmente, evaluamos diferentes concentraciones de sustrato cromogénico en presencia de plaquetas con plasminógeno unido a la superficie, empleando diferentes

cantidades del activador bacteriano estreptocinasa. Elegimos la concentración de 0.3 mg de sustrato ya que esta generó una señal clara dentro de un rango confiable en la escala de absorbancia (Fig. 18A). Así mismo, como control negativo evaluamos el sobrenadante de las dos líneas celulares utilizadas a lo largo del ensayo (células Vero y células de riñón de mono LLC-MK2). Los sobrenadantes celulares generaron una activación muy débil (inespecífica) en comparación con la activación por estreptocinasa (Fig. 18B).

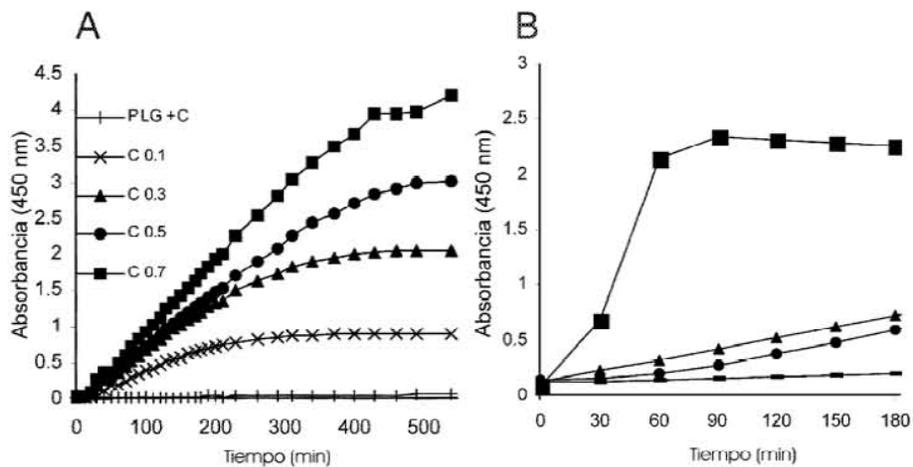


Figura 18. Activación del plasminógeno en la superficie de la plaqueta. En una placa de ELISA se colocaron 3×10^6 plaquetas con plasminógeno unido a su superficie en presencia de diferentes concentraciones de sustrato cromogénico(A) o con sobrenadantes de células VERO (círculos) o LLC-MK2 (triángulos), estreptocinasa (cuadros) (B). Plasminógeno con cromógeno (PLG+ C)

Activación del Plasminógeno en Presencia de Aislados Hemorrágicos del Virus del Dengue en la Superficie de las plaquetas.

En estos ensayos utilizamos las condiciones anteriores para evaluar la posible activación del PLG por los diferentes aislados virales hemorrágicos. En la Fig. 18 puede observarse que el activador bacteriano estreptocinasa (SK) induce la mayor generación

de plasmina. En contraste las plaquetas en presencia de sustrato y buffer no indujeron activación del plasminógeno. El sobrenadante de células LLC-MK2 fue utilizado como control.

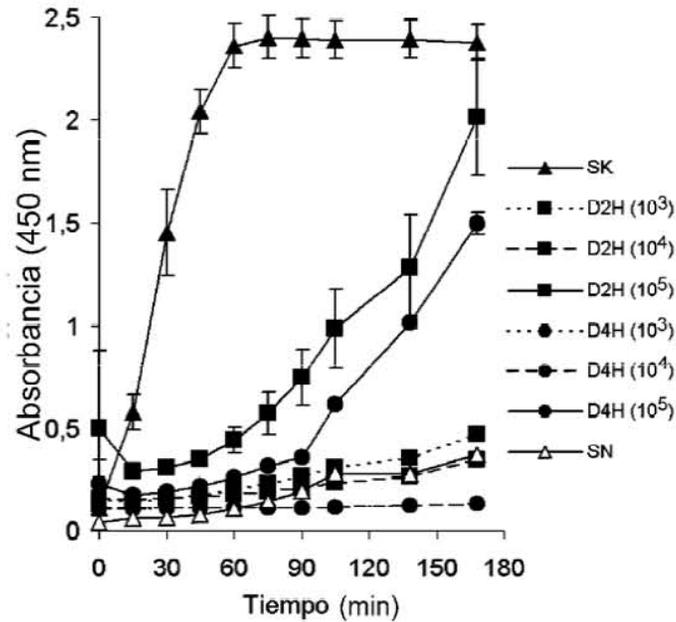


Figura 19. Activación del plasminógeno por los aislados hemorrágicos. En una placa de ELISA fueron colocadas 3 millones plaquetas con plasminógeno unido a su superficie en presencia de diferentes concentraciones de aislados hemorrágicos del VD (D2H yD4H), 7.5 SK UI y 0.3 mg de sustrato cromogénico.

Evaluamos los serotipos 2 y 4 hemorrágicos (aislado 1187 (D4H) y aislado 1013 (D2H)) a diferentes concentraciones. Observamos actividad de plasmina a la concentración de 1×10^5 en el serotipo 2. Las concentraciones más bajas (10^3 y 10^4) no generaron activación, su efecto fue similar al del sobrenadante de cultivo.

Activación del Plasminógeno en Presencia de Aislados Clásicos del VD en la Superficie de las Plaquetas.

Los serotipos Dengue 4 (D4C) y el aislado 2 México (D2C) provenientes de pacientes con dengue clásico fueron empleados en 3 concentraciones diferentes. En las concentraciones bajas, 10^3 y 10^4 , no indujeron actividad de plasmina. Sin embargo a la concentración de 10^5 el serotipo D4C fue capaz de inducir activación pero no así el aislado 2 México (Fig. 19).

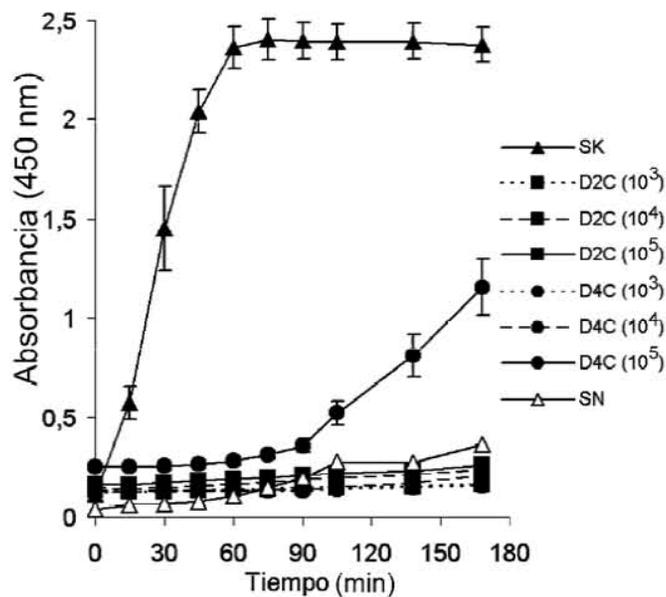


Figura 20. Activación del plasminógeno por los aislados Clásicos del dengue. En una placa de ELISA colocando 3 millones plaquetas con plasminógeno unido a su superficie en presencia de diferentes concentraciones de los aislados clásicos del VD (D2C y D4C), 7.5 SK UI y 0.3 mg de sustrato cromogénico.

Activación Diferencial del PLG en Presencia de Aislados Clásicos y hemorrágicos del VD. Con base a que en la concentración de 1×10^5 observamos actividad en tres de

los 4 serotipos empleados, esta fue la cantidad utilizada en los ensayos posteriores. El patrón de actividad en presencia de los aislados hemorrágicos del VD fue similar, sin embargo el de los aislados clásicos fue heterogéneo. Para conocer el comportamiento de los diferentes serotipos tanto clásicos como hemorrágicos realizamos ensayos de activación de plasminógeno con cada uno de los 4 serotipos. En la Fig. 20A se muestra la activación del PLG en presencia de los aislados clásicos serotipos D4C, D3C, D2CM aislado México, D2CNG aislado Nueva Guinea y el D1C aislado Hawai. En general la activación del plasminógeno por los 4 serotipos clásicos del VD fue baja.

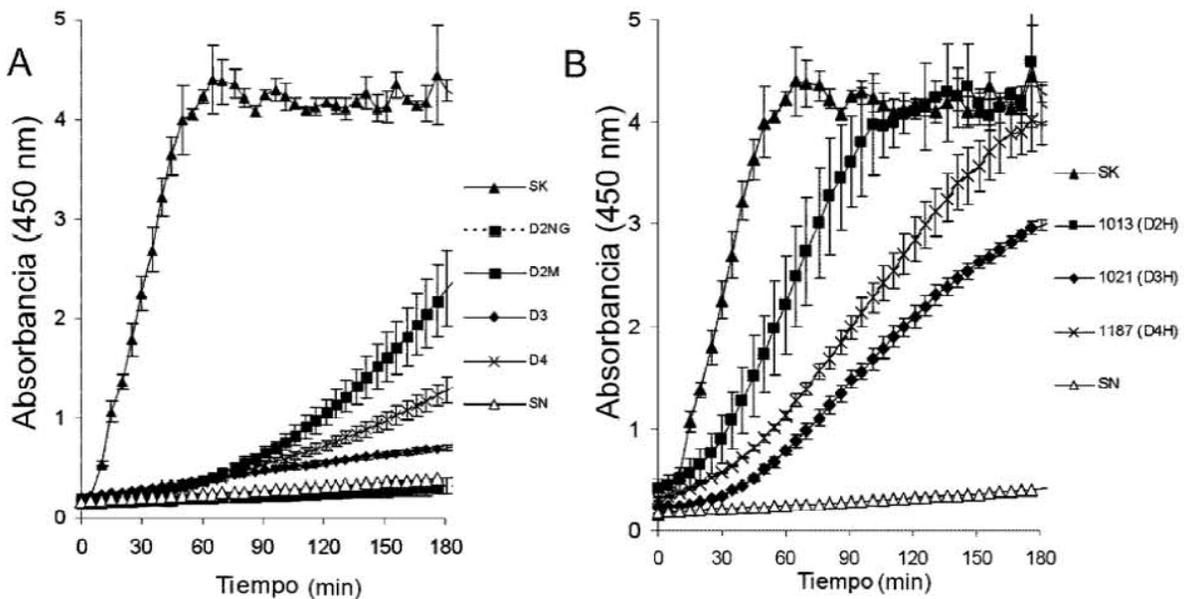


Figura 20. Activación diferencial del plasminógeno en la superficie de la plaqueta. 3 millones de plaquetas se activaron con 4 mg/mL de colágena 10 min 37°C, las plaquetas fueron centrifugadas eliminando el sobrenadante, posteriormente se incubaron con 0.16 UI/ml PLG 2h 37°C en una placa de ELISA revelándose con 7.5 SK UI o virus a diferentes concentraciones de aislados clásicos (A) o hemorrágicos (B) + 0.3 mg de sustrato cromogénico.

Sin embargo los aislados hemorrágicos generaron una elevada activación del PLG. El aislado D2H 1013 tuvo la mayor activación al llegar al mismo nivel de la SK únicamente 50 min. después de esta. El aislado D4H presentó una activación intermedia llegando al máximo nivel 130 min. después de la SK y por debajo de este nivel, el aislado D3H presentó un 65 % de la actividad de SK. El aislado D1H no generó actividad de plasmina (Fig. 20). Estos resultados en conjunto muestran que el virus del dengue es capaz de activar el plasminógeno en la superficie plaquetaria y siendo este efecto diferencial dependiendo del serotipo y origen del aislado.

Efecto de la Plasmina sobre las Plaquetas en Presencia de VD.

Una pregunta que surgió con base en los experimentos de la activación del PLG a plasmina fue la siguiente: ¿Qué efecto tendría la plasmina activa en la superficie plaquetaria? Existen dos posibilidades. Primero que la plasmina activa pueda activar mas plaquetas (Quinton *et al.*, 2004) y segundo que esta plasmina activa produzca la lisis de las plaquetas (Miles and Plow, 1995). Para evaluar la primera posibilidad el plasminógeno fue incubado con los aislados virales y posteriormente la plasmina generada en este ensayo fue incubada con las plaquetas, evaluando su efecto mediante citometría de flujo.

Tabla 1 .Activación palquetaria mediada por plasmina generada por VD.							
	IgG	Tr+	(-) Tr	PLG-SK	PLG-SN	PLG-D2C	PLG-D2H
F+ (%)	2.4	53.3	9.3	57.9	60.1	57.4	55.1
MCF+	295.6	107.2	85.2	108.4	17.0	80.5	182.2
IPA	7.2	57.1	7.9	62.8	10.2	46.2	100.5

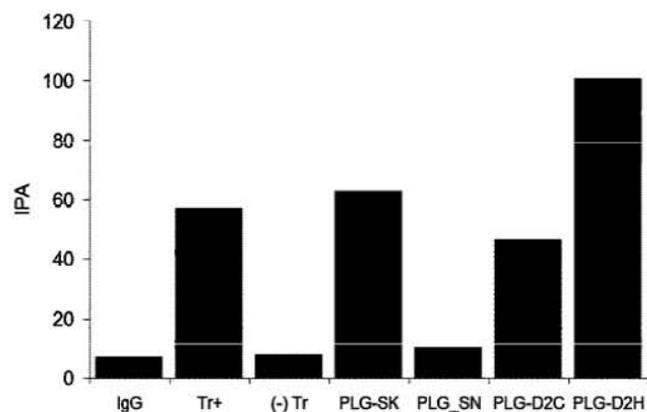


Figura 21. Activación plaquetaria mediada por plasmina generada por el VD. Plasmina generada de la incubación de 0.16 UI/ml de PLG con 7.5 SK UI o los virus del dengue a un título de 10^5 o sobrenadante de células LL-MK2 fue empleada para estimular plaquetas lavadas por 60 min. Por medio de citometría de flujo se determinó el índice de activación plaquetaria ($IPA = \frac{MCF+}{F+} \times 100$). Se muestra un ensayo representativo de tres. Control positivo con trombina (Tr+), control negativo sin trombina (Tr-), control de isotipo (IgG), PLG incubado con estreptocinasa (PLG-SK), PLG incubado con dengue serotipo 2 clásico (PLG-D2C), PLG incubado con Dengue serotipo 2 hemorrágico (PLG-D2H), PLG incubado con sobrenadante (PLG-SN)

Con el objetivo de disminuir la variación en los ensayos de activación plaquetaria, se calcularon los índices de activación plaquetaria ($IPA = \frac{MCF+}{F+} \times 100$) propuestos por Leytin (Leytin *et al.*, 2000) y que ayudan a normalizar los valores de Fluorescencia media (MCF+) con respecto al número de eventos positivos (F+) (Tabla1) De esta forma observamos que la plasmina activada tanto por el VD como por la estreptocinasa fue capaz de activar a las plaquetas, la estreptocinasa indujo un IPA similar al de la trombina con un valores de 62.7 y 57 respectivamente, en contraste el anticuerpo control (IgG) generó una débil activación con un IPA de 7.2 (Fig. 21) así como las plaquetas no activadas (Tr-), $IPA = 7.8$ y el plasminógeno incubado con sobrenadante (PLG-SN), $IPA = 10.2$ En congruencia con los ensayos anteriores de activación diferencial del plasminógeno en la superficie plaquetaria, la plasmina generada por el

aislado hemorrágico indujo un IPA de 100, el cual es mayor en comparación con el aislado clásico, IPA = 46.2.

Efecto de la Plasmina en la Integridad de las Plaquetas.

La posibilidad de que la plasmina activada pudiera causar la lisis de las plaquetas fue evaluada en el siguiente experimento, brevemente, las plaquetas fueron incubadas con plasmina derivada de la presencia del plasminógeno y los aislados virales. En la Fig. 22 Puede observarse que no existe un efecto de lisis por la plasmina generada en presencia de los aislados virales, de igual manera la plasmina generada por la estreptocinasa tampoco induce lisis. En contraste las plaquetas incubadas con el detergente SDS mostraron una lisis de más de 80 %.

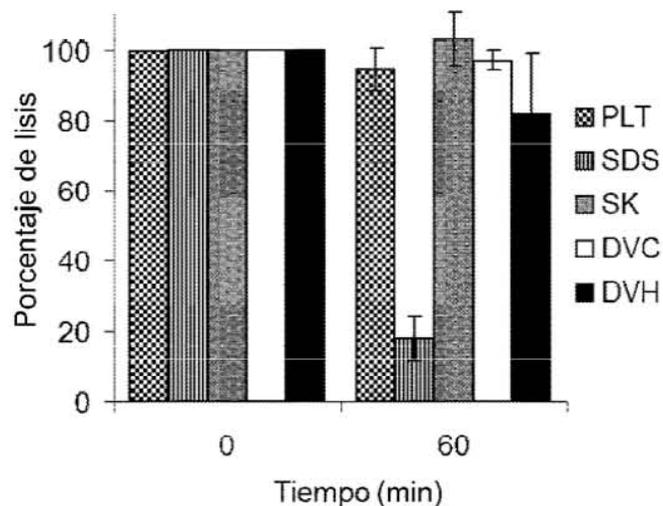


Figura 22. Efecto de la plasmina en la integridad de las plaquetas. 3 millones de plaquetas se activaron con colágena 4 mg/mL durante 10 min a 37 °C. las plaquetas fueron centrifugadas eliminando el sobrenadante, posteriormente el plasminógeno fue incubado con el activador estreptocinasa y los virus a diferentes concentraciones + 0.3 mg de sustrato cromogénico. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos.

DISCUSION

La patogénesis de la FHD no esta completamente entendida. Dos hipótesis han tratado de explicar el establecimiento de los casos desafortunados de la enfermedad: La facilitación de la infección dependiente de anticuerpos (Halsted, 1970) y la variación antigénica (virulencia) de los aislados virales (Barnes and Rosen, 1974). Sin embargo, ambas hipótesis son insuficientes para explicar la trombocitopenia y la hemoconcentración presentes en el dengue hemorrágico en el curso de una infección primaria.

La trombocitopenia es un fenómeno complejo y multifactorial. Los mecanismos por los cuales se establece aún no están definidos. Existen antecedentes que asocian la plaquetopenia y la participación de a) las vías procoagulante y fibrinolítica, b) el sistema hemostático, c) el complemento, d) las citocinas y e) las células endoteliales (Schexneider and Reedy, 2005). Sin embargo, a la fecha no hay un estudio que evalué el efecto directo del virus en la función plaquetaria. En el presente trabajo evaluamos la influencia del VD en la actividad plaquetaria tanto de manera directa, como indirecta a través de los efectos de la plasmina en la superficie plaquetaria.

Inicialmente, determinamos si el VD tiene la capacidad de modificar la actividad procoagulante a nivel plaquetario evaluando la agregación celular en presencia de diferentes aislados del VD. Observamos que ninguna de las cepas del VD utilizadas estimuló la agregación plaquetaria (Fig. 11). Así mismo, se evaluó un posible efecto sinérgico entre los dengue virus y agonistas plaquetarios como la trombina, observando

que el VD no generó agregación en dosis bajas de trombina (0.01 y 0.01 UI), sin embargo al utilizar una concentración de 0.4 UI de trombina e incubar con las diferentes cepas virales la agregación disminuyó con respecto al control (Fig. 12B).

En base al resultado anterior evaluamos el efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria utilizando tanto aislados clásicos (serotipos 2, 3 y 4) como aislados hemorrágicos (serotipos 2, 3 y 4) del VD observando que se presenta una mayor inhibición en presencia de las cepas hemorrágicas. Dentro de estas, la cepa D3H en el título de 10^3 mostró el mayor efecto, en contraste, únicamente el aislado clásico D4 favoreció una disminución de la agregación plaquetaria significativa a un título viral de 10^4 . Estudios previos reportan una inhibición de la agregación con ADP mediada por los dengue virus (Mitrakul *et al.*, 1977; Srichaikul *et al.*, 1989), sin embargo este es el primer reporte en el que se demuestra una inhibición de la agregación plaquetaria mediada por trombina (uno de los agonistas más fuertes de las plaquetas) en presencia de los dengue virus.

La actividad anti-agregante podría estar asociada con los factores de la coagulación, ya que se ha reportado que los tiempos de trombina parcial activada (APTT) que evalúa la vía accesoria de la coagulación están prolongados al doble en los pacientes con DHF en comparación con los pacientes con DF (Huang, 2001). Así mismo, el efecto diferencial entre los aislados provenientes de casos clásicos y casos hemorrágicos puede deberse a cambios estructurales de la proteína de envoltura viral como propone León Rosen en la hipótesis de la variación antigénica (Barnes and Rosen, 1974).

Además de evaluar la actividad procoagulante, determinamos la participación de los dengue virus en la actividad profibrinolítica relacionada tanto con las plaquetas como con el sistema plasminógeno/plasmina. Las plaquetas lavadas se activaron con colágena para evitar la formación de fibrina que pudiera interferir con la unión del PLG monitoreando la unión del mismo en la superficie plaquetaria. Así mismo, determinamos (control negativo) la degradación inespecífica del sustrato cromogénico añadiendo los diferentes componentes de la mezcla de reacción (Fig. 17 y Fig. 18), observando que solo aquella combinación que incluía a la estreptocinasa favoreció la catalización del sustrato cromogénico, lo cual nos confirmó la especificidad de nuestros resultados. Así mismo, se evaluó el efecto del sobrenadante de las células LLC-MK2, ya que podrían existir algunos componentes que degraden inespecíficamente el sustrato, considerando como señal positiva solo aquellas que fueron superiores al valor obtenido en el sobrenadante. A partir de las plaquetas con PLG unido en la superficie determinamos la activación del PLG en presencia de los VD mediante ensayos enzimáticos. Encontramos que los dengue virus son capaces de activar al PLG en la superficie plaquetaria de manera diferencial entre los serotipos y entre el origen del aislado (clásico/hemorrágico). Los virus hemorrágicos presentaron mayor capacidad de favorecer la generación de plasmina.

Estos resultados son congruentes con las manifestaciones clínicas observadas en cada una de las formas del dengue (FD/FHD) ya que los aislados provenientes de casos clásicos (FD) no modifican la agregación plaquetaria y los aislados provenientes de casos hemorrágicos (FHD) además de inhibir la agregación plaquetaria favorecen la fibrinólisis aún en los coágulos ricos en plaquetas.

La unión del PLG a la plaqueta y su interacción con el VD es importante ya que diferentes autores han sugerido la participación de las plaquetas en la regulación de la fibrinólisis a través de la interacción del PLG con los trombocitos durante la degradación de los coágulos (Miles and Plow, 1985; Fay *et al.*, 1994; Herren *et al.*, 2003). Por otra parte, no se conoce el efecto de la plasmina activa en las plaquetas durante un proceso infeccioso; Existen dos posibilidades; primero que la activación de las plaquetas favorecida por la plasmina sea mediada por el receptor activado por proteasas (PAR) (Quinton *et al.*, 2004) y la segunda posibilidad es que la plasmina activa sea capaz de favorecer la lisis de las plaquetas en una concentración elevada. (Miles and Plow, 1985).

Con base en los estudios anteriores evaluamos la posible activación plaquetaria por la plasmina superficial generada en presencia del virus del dengue, observamos que se presentó una activación mas elevada por el aislado hemorrágico en comparación con la generación de la activación plaquetaria inducida por la plasmina en presencia del aislado clásico. Lo anterior concuerda con los ensayos de activación del plasminógeno en la superficie plaquetaria en donde observamos diferencias en la activación entre los aislados clásicos y hemorrágicos. Esta activación podría estar mediada por los receptores activados por proteasas. Las plaquetas poseen tanto PAR1 como PAR4 siendo PAR1 el receptor de alta afinidad (Coughlin, 2000). Con base en lo anterior evaluamos la expresión del PAR1 en presencia de la plasmina activada por el VD mediante citometría de flujo, como control positivo de la activación del PAR realizamos ensayos de citometría de flujo en presencia de trombina, así mismo evaluamos la

posible activación plaquetaria por la plasmina generada en presencia del activador bacteriano(SK) y del VD (D2C y D2H), encontramos que los dengue virus indujeron una señal que podría estar relacionada con la activación de los PAR mediante una interacción directa del virus (Fig. S1).

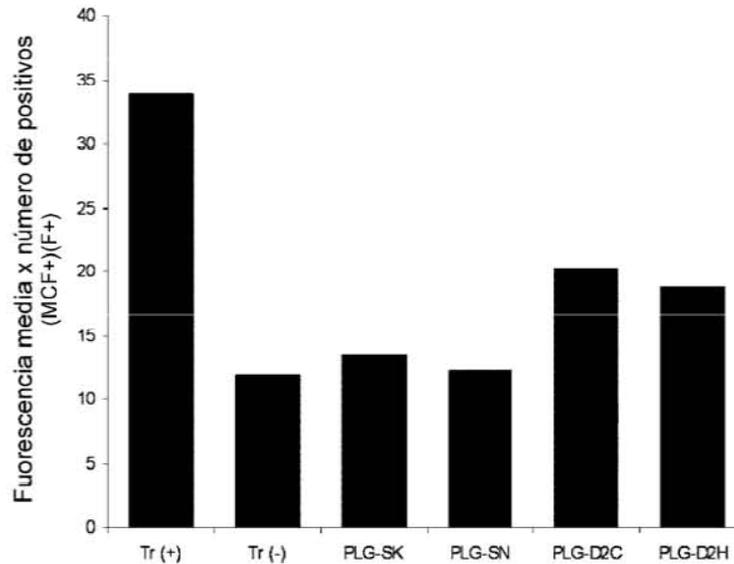


Figura S1. **Expresión de PAR1 en presencia de plasmina activada por VD.** Plasmina generada de la incubación de 0.16 UI/ml de PLG con 7.5 SK UI o los virus del dengue a un título de 10^5 o sobrenadante de células LL-MK2 (SN) fue empleada para estimular plaquetas lavadas por 60 min. Por medio de citometría de flujo se determinó la expresión de PAR1 ((MFC+) (F+)). Trombina (Tr), Dengue serotipo 2 clásico (D2C), Dengue serotipo 2 hemorrágico (D2H).

La posibilidad de que los virus pudieran activar los PAR directamente está sustentada en alineamientos de secuencia, con péptidos agonistas de estos receptores y la proteína E del VD que muestran similitud de la secuencia específica de activación con la posición diferentes posiciones del dominio III de la proteína E localizadas en una asa muy expuesta (Fig. S2, cerca del sitio de unión al receptor), abriendo la posibilidad de

que el virus sea capaz de activar otros blancos como células neurales (Noorbaks *et al.*, 2006) o células del endotelio vascular (Ruf, 2004) en las que están presentes estos receptores y contribuir al recientemente descrito entrecruce de la coagulación y la inflamación (Pawlinski *et al.*, 2004) en estos tejidos.

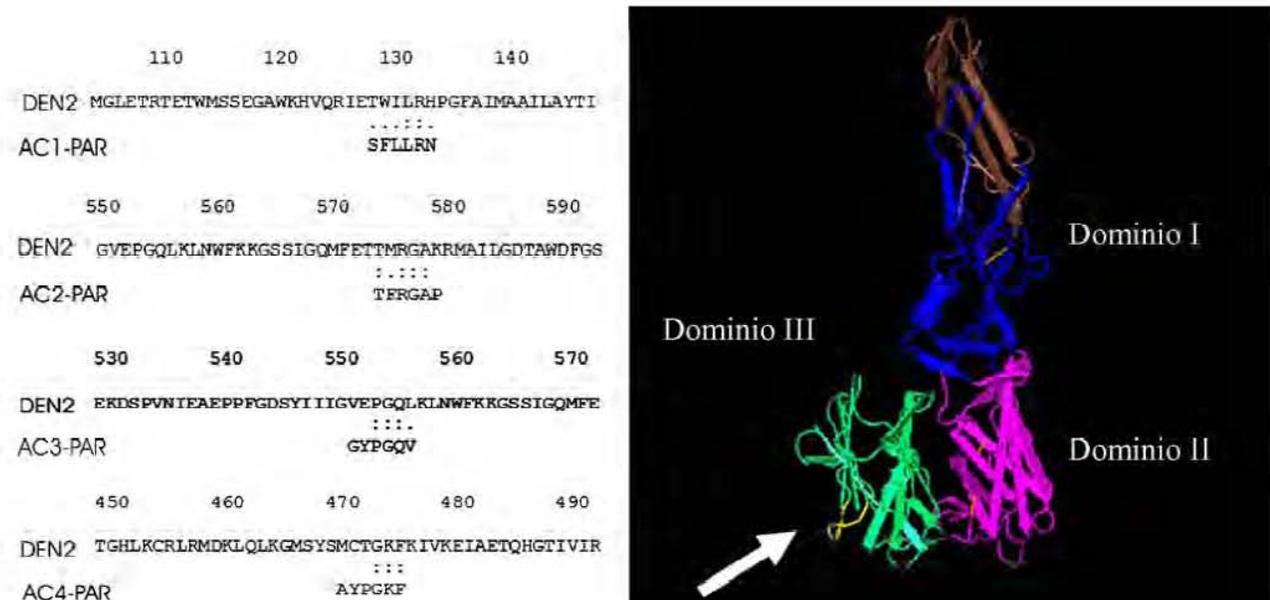


Figura S2. Similitud de péptidos agonistas de plaquetas con la proteína E del VD. Alineamiento que muestra la identidad de los activadores con el dominio III de la proteína de envoltura del DEN2 (A). Posición de la región de identidad en un asa expuesta (Flecha) en el dominio III (Verde) de la proteína E (B).

Por otra parte, evaluamos si la plasmina generada en presencia de los dengue virus era capaz de ocasionar un daño a las plaquetas y favorecer la plaquetolisis. La cantidad de plaquetas antes y después de incubar con la plasmina activa fue la misma incluso en aquellas que fueron incubadas con plasmina generada en presencia de estreptocinasa presentaron la misma integridad en la membrana que las plaquetas solas (Fig. 22),

demostrando que se presenta lisis plaquetaria debida a la generación de la plasmina.

En el presente estudio demostramos la interacción del virus del dengue con las plaquetas en las dos vías claves de la hemostasia; en la coagulación por medio de la inhibición de la agregación plaquetaria y en la fibrinólisis a través de la activación del plasminógeno en la superficie del trombocito. Adicionalmente evaluamos la participación de los dengue virus en la posible activación de los receptores activados por proteasas (PAR) como molécula central tanto en el proceso de coagulación como en el inicio del proceso inflamatorio.

CONCLUSIONES

- Los dengue virus hemorrágicos (DEN2, DEN3 y DEN4) son capaces de inhibir la agregación plaquetaria aun en títulos bajos.
- Los aislados provenientes de casos hemorrágicos activan al plasminógeno a nivel de la superficie de la plaqueta en mayor proporción que los aislados provenientes de casos clásicos.
- La activación del PLG en la plaqueta es diferencial entre los distintos serotipos virales.
- Existe congruencia entre el efecto inhibitorio de la agregación y la activación del plasminógeno, favorecida por los aislados hemorrágicos.
- La plasmina generada por el aislado hemorrágico es capaz de activar las plaquetas en mayor grado que la plasmina generada por el aislado clásico, esta activación podría estar mediada por los receptores activados por proteasas (PAR).
- Los dengue virus podrían activar diferentes tipos celulares directamente a través del PAR.
- La generación de plasmina por los dengue virus parece no contribuir a la lisis plaquetaria.

REFERENCIAS

- Barnes WS, and Rosen L. (1974) Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a pacific island. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 23:495-506
- Brogren H, Karisson L, Andersson L, Wang L, Erlinge D, and Jern S. (2004) Platelets synthesize large amounts of active plasminógeno activator inhibitor 1. *Blood*. 104:3943-3948.
- Butthep P, Bunyaratvej A, and Bhamarapravati N. (1993) Dengue virus and endothelial cell: a related phenomenon to thrombocytopenia and granulocytopenia in dengue hemorrhagic fever. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 1:246-249.
- Colman RW, Clowes AW, George JN, Hirsh J, and Marder V. (2001) Overview of hemostasis. *In Hemostasis and Thrombosis 4th ed.* (eds Colman RW, Hirsh J, Marder V, Clowes AW and George JN.) 3-16. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- Coughlin S. (2000) Thrombin signaling and protease activated receptors. *Nature* 407:258-264
- Clark GG. (1995) Situación epidemiológica del dengue en América. Desafíos para su vigilancia y control. *Salud Publica México* 37:S5-S11
- Dahlbäck B. (2005) Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *Journal of Internal Medicine*. 257:209-223.

- De la Fuente JR, y Sepulveda J. (1999) Diez problemas relevantes de salud publica en México. Instituto nacional de salud publica México. *Biblioteca de la salud*. Pgs 145-162.
- Esmon CT. (2000a) Regulatory mechanism in hemostasis: natural anticoagulants. In *Hematology basic principles and practice 2nd ed.* (eds Hoffman R, Benz EJ, Furie B, Cohen HJ and Silberstein LE.) 1597-1606. Churchill Livingstone New York, NY, USA.
- Esmon CT. (2000) Regulation of blood coagulation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1477:349-360.
- Fay WP, Eitzman DT, Shapiro AD, Madison EL, and Ginsburg D. (1994) Platelets inhibit fibrinolysis in vitro by both plasminogen activator inhibitor-1-dependent and -independent mechanisms. *Blood*. 15:351-356.
- FDA. (1999) Guidance for the industry. For platelet testing and evaluation of platelet substitute products. U.S. *Department of Health and Human Services*.
- Germi R, Crance J, Garin D, Guimet J, Lortat-Jaco H, Ruigrok R, Zarski J, and Douret E. (2002) Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology*. 292:162-168.
- Gubler DJ. (1998) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*. 11: 480-96.
- Gubler DJ. (2002) Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology*. 10:100-103.
- Guzman MG, and Kouri G. (1996) Advances in dengue diagnosis. *Clinical and*

Diagnostic Laboratory Immunology. 3:621-627.

- Guzman MG, and Kouri G. (2001) Dengue: an update. *Lancet Infectious Diseases*. 2:33-42.
- Halstead SB, and O'Rourke EJ. (1977) Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *Journal of Experimental Medicine*. 146:201-217.
- Halstead SB, Heinz FX, Barret ADT, and Roehrig JT. (2005). Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis. *Vaccine* 23:849-856.
- Halstead SB, Udomsakdi S, Shingharaj P, and Nisalak A. (1969) Dengue Chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. 3. Clinical, epidemiologic, and virologic observations on disease in non-indigenous white persons. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 18:984-996.
- Hammon W McD, Rudnick A, and Sather GE. (1960) Virus associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science*. 131:1102-1103.
- Hendler. (1990) Lavado de plaquetas en gradiente de albúmina. Capítulo 11. Plaquetas: Técnicas de estudio de la función plaquetaria y vascular. Dentro de: *Manual de hemostasia y trombosis*. Editores Kordich LC, Salchez JC y De Campos C. 2ª edición. Buenos Aires Argentina. Pags 475-476.
- Herren T, Swaisgood C, and Plow E. (2003) Regulation of plasminogen receptors. *Frontiers in Bioscience*. 8:1-8.
- Huang Y, Liu C, Wang S, Lei H, Liu H, Lin Y, Wu H, and Yeh T. (2001) Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. *Journal of Medical*

Virology. 63:247-251.

- Isturiz RE, Gubler DJ, and Del Castillo JB. (2000) Emerging and reemerging diseases in latin America. *Infectious Diseases Clinics of North America*. 14:1-15.
- Izaguirre A. (2005) Centenario de la doctrina de la coagulación sanguínea. *Archivos de Cardiología de México* 75:S3118-S3139.
- Kabra SK, Jain Y, shinghal T, and Ratageri VH. (1999) Dengue hemorrhagic fever: clinical manifestations and management. *Indian Journal of pediatrics*. 66:93-101.
- Krishnamurti C, Peat Ra, Cutting MA, and Rothwell SW. (2002) Platelet adhesion to dengue 2 virus infected endothelial cells. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 66:423-42.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossman MG, Pletnev SV, Corven J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, and Strauss JH. (2002). Structure of Dengue virus: implications for Flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 108:717-725.
- Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, Yang TI, Sheu FC, Kuo CF, and Lin YS. (2001) Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *Journal of Medical Virology*. 63:143-9.
- Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, and Liu CC. (2001) Immunopathogenesis of dengue virus infection. *Journal of Biomedical Science*. 8:377-388.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos de Chacon I, Ramos C, and Rico-Hesse R. (1999) Dengue virus structural differences that correlate

- with pathogenesis. *Journal of Virology*. 73:4738-4747.
- Leytin V, Mody M, Semple W, Garvey B, and Fredman J. (2000) Quantification of platelet activation status by analyzing P-selectin expression. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 273:565-570.
 - Mairuhu A, Wagenaar J, Brandjes D, and van Gorp. (2004). Dengue: An arthropod-borne of global importance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases*. 23:425-433.
 - Maugeri N, Lazzari A, and Vizcargüenaga MI. (1990) Agregación plaquetaria. Capítulo 11. Plaquetas: Técnicas de estudio de la función plaquetaria y vascular. Dentro de: *Manual de hemostasia y trombosis*. Editores Kordich LC, Sánchez JC y De Campos C. 2ª edición. Buenos Aires Argentina. Pags 462-469.
 - Mc Bride WJH, and Bielefeldt-Ohmann. (2000) Dengue viral infections: Pathogenesis and epidemiology. *Microbes and Infection*. 2:1041—1050.
 - Miles LA, and Plow E. (1985) Binding and Activation of Plasminogen on the Platelet Surface. *The Journal of Biological Chemistry*. 260: 4303-4311
 - Miles LA, Ginsberg MH, White JG, and Plow EF. (1986) Plasminogen interacts with human platelets through two distinct mechanisms. *Journal of Clinical Investigations*. 77:2001-2009.
 - Mittrakul C, Poshyachinda M, Futrakul P, Sangkawibha N, and Ahandrik S. (1977) Hemostatic and platelet kinetic studies in dengue hemorrhagic fever. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 26:S975-S984.
 - Monroy V, and Ruiz BH. (2000) Participation of the dengue virus in the fibrinolytic process. *Virus Genes* 21:197-208.

- Moreno-Altamirano F, Sanchez-Garcia FJ, and Muñoz L, (2002) Non Fc-receptor mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2. *Journal of General Virology*. 83:1123-1130.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, and Rossman MG. (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews*. 3:13-22.
- Murgue B, Cassar O, Guigon M, and Chungue E. (1997) Dengue virus inhibits human hematopoietic progenitor growth in vitro. *The Journal of Infectious Diseases*. 175: 1497-501.
- Murgue B, Cassar O, Deparis X, Guigon M, and Chungue E. (1998) Implication of macrophage inflammatory protein-1 in the inhibition of human haematopoietic progenitor growth by dengue virus. *Journal of General Virology*. 79: 1889-1893.
- Mustard JF, Perry DW, Ardile NG, and Packham MA. (1972) Preparation of suspensions of washed platelets from humans. *British Journal of Hematology*. 22:193-204.
- Narro-Robles J. (1995) El dengue en México: un problema prioritario de salud pública. *Salud pública México* 37: S12-S20.
- Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Schawrtz O, Fieschi F, Vireliezier J, Arenzana-Seisdedos F, and Després P. (2003) Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue virus. *European Molecular Biology Organization Reports*. 4:723-728.
- Noorbaks F, Tsutsui S, Vergnolle N, Boven LA, Sharita N, Vodjgani M, Warren KG, Andrade –Gordon P, Hollenberg MD, and Power C. (2006) Proteinase-

activated receptor 2 modulates neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*. 203:425-435.

- Oishi K, Inoue S, Cinco MT, Dimaano EM, Alera MT, Alfon JA, Abanes F, Cruz DJ, Matias RR, Matsuura H, Hasebe F, Tanimura S, Kumatori A, Morita K, Natividad FF, and Nagatake T. (2003) Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections. *Journal of Medicine Virology*. 71:259-64.
- Organización pan-Americana de la salud (1989). El dengue en las Américas. *Boletín epidemiológico* 10:1-7.
- Pan American health organization (1996) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Epidemiological bulletin* 17:12-14.
- Pawlinski R, Pedersen B, Schabbauer G, Tencati M, Holscher T, Boisvert W, Andrade –Gordon P, Dario Frank R, and Maman N. (2004) Role of tissue factor and Protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood*. 103: 1342-1347.
- Plow EF, Herren T, Redlitz A, Miles LA, and Hoover-Plow JL. (1995) The cell biology of the plasminogen system. *The FASEB Journal*. 9: 939-945.
- Preeyasombat C, Bunnag P, Sirinavin S, Mahachoklert-wattana P, Sriphrapadang A. (1990) Plasma prostacyclin (PGI₂) in dengue hemorrhagic fever. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 21: 383-387
- Quinton TM, Kim S, Derian CK, Jin J, and Kunapuli ST. (2004) Plasmin –

mediated activation of platelet occurs by cleavage of protease-activated receptor 4. *The Journal of Biological Chemistry*. 279:18434-18439.

- Rice CM. (1996) In *Fields Virology* 3rd ed. (eds Fields BN, Knipe DM, and Howley PM.), 931-959. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- Rosen L. (1977) The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 26:337-343.
- Rosen L. (1996) Dengue hemorrhagic fever. *Bulletin de la Societe de Pathology Exotique*. 89:91-93.
- Rothman AL. (2004) Dengue; Defining protective versus pathologic immunity. *The Journal of Clinical Investigation*. 113:946-951.
- Ruf W. (2004) Protease-activated receptor signaling in the regulation of inflammation. *Critical Care Medicine* 32: S287-S292.
- Ruiz BH, Sanchez I, Ortega G, Lopez I, Rosales L, and Medina P. (2000) Phylogenetic comparison of the DEN-2 Mexican isolate with other flavivirus. *Intervirology*. 43:48-54.
- Sabin AB, and Schlesinger RW. (1945) Production of immunity to dengue virus with virus modified by propagation in mice. *Science*. 101:640-642.
- Saito M, Oishi K, Inoue S, Dimaano EM, Alera MT, Robles AM, Estrella BD Jr, Kumatori A, Moji K, Alonzo MT, Buerano CC, Matias RR, Morita K, Natividad FF, and Nagatake T. (2004) Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clinical and Experimental Immunology*. 138:299-303.

- Schexneider KL, and Reedy EA. (2005) Thrombocytopenia in dengue fever. *Current Hematology Reports*. 4:145-148.
- Srichaikul T, Ninmmannitya S, Sripaisarn T, Kamolsilpa M, and Pulgate C. (1989) Platelet function during the acute phase of dengue hemorrhagic fever. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 20: 19-25
- Tapper H and Herwald H. (2000) Modulation of hemostatic mechanism in bacterial diseases. *Blood*. 96:2329-2337.
- Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, and Marcovich MA. (2003) DC-Sing (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *The journal of Experimental Medicine*. 197:823-829.
- Vorndam V, and Kuno G. (1999) Laboratory diagnostic of dengue infections. *In Dengue and dengue hemorrhagic fever* (eds Gubler DJ and Kuno G) 313-333. CAB international, New York, NY, USA.
- Wang S, He R, Patarapotikul J, Innis BL, and Anderson R. (1995). Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. *Virology*. 213: 254-257.
- World Health Organization. (1997) Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Chapter 1 and 2. Second edition. Geneva. (pages 1-22).
- Wise CD, Potkin SG, Bridge TP, Phelps BH, Cannon-Spoor H, and Wyatt RJ. (1980) Sources of error in the determination of platelet monoamine oxidase: a review of methods. *Schizophrenia Bulletin*. 6:245-53.