

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

**MODIFICACION DE LA VÍA CITOPROTECTORA DE LA
PROTEINA C DURANTE LA INFECCIÓN DE CÉLULAS
ENDOTELIALES HUMANAS CON EL VIRUS DENGUE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

Biólogo: Carlos Cabello Gutiérrez



Directora de Tesis: Dra. Blanca H. Ruiz Ordaz

México, D.F. Noviembre de 2009



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.

CONTENIDO	Pagina
AGRADECIMIENTOS.....	1
LISTA DE ABREVIACIONES	3
PREFACIO.....	4
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Origen del virus del dengue (VD)	10
1.2 Agente Etiológico.....	11
1.3 Estructura del VD y Ciclo de Replicación Viral.....	12
1.4 Receptores celulares putativos para el virus del dengue.....	16
1.5 Aspectos epidemiológicos del Dengue.....	18
1.6 Cuadro clínico de la enfermedad.....	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
3. HIPÓTESIS.....	31
4. OBJETIVOS.....	31
5. METODOS.....	32
5.1 Aislados Virales.....	32
5.2 Línea Celular.....	32
5.3 Propagación del virus del dengue.....	32
5.4 Titulación viral mediante ensayo de placa lítica.....	33
5.5 Establecimiento del cultivo primario de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC).....	34
5.6 Detección de Trombomodulina (TM) en la membrana de HUVEC mediante citometría de flujo.....	35

5.7 Colocalización de los receptores celulares EPCR Y PAR-1.....	36
5.8 Ensayo de actividad de PCA en la superficie de HUVEC.....	37
5.9 Ensayo de Western- blot.....	38
5.10 Determinación de IL-8 mediante ELISA.....	40
6. RESULTADOS.....	42
6.1 Ensayos de titulación en placa lítica.....	42
6.2 Establecimiento del cultivo primario de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC).....	43
6.3 Disminución de TM en la membrana de HUVEC infectadas con los diferentes aislados del virus del dengue.....	44
6.4 Evaluación de la liberación de TM y colocalización de EPCR y PAR-1.....	46
6.5 Actividad de PCA en HUVEC infectadas con el VD.....	49
6.6 Efecto anti-inflamatorio de PCA en HUVEC infectadas con FHD-VD y FD-VD.....	50
6.7 Participación de PCA y MAPK's (ERK 1/2 y p38) en la permeabilidad del endotelio vascular infectado con el virus del dengue.....	57
6.8 Ensayos de citoprotección de PCA durante la infección de HUVEC con el virus del dengue.....	59
6.9 Replicación del virus del dengue (FHD-VD y FD-VD) en HUVEC y su relación con la colocalización de EPCR y PAR-1.....	60
7 Discusión de Resultados.....	62
8 Publicación	
9 Bibliografía.....	72

A:

Rosa María, Tajín y Tonatliuh

Por estar siempre conmigo

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutora, la Dra. Blanca H. Ruiz Ordaz, por todo lo que significa para mí el haber logrado obtener este grado académico. De ella aprendí y conocí lo que significa el trabajo científico, el cual implica ser muy riguroso y sobretodo autocrítico entre muchas cosas más. Aprendí que en investigación necesariamente debemos caminar de la mano de preguntas básicas que nos acompañaran por el resto de nuestras vidas. Usted me presentó a el **porqué?**, al **para qué?** y al **cómo?** y después mi percepción de la ciencia, cambio por completo. También aprendí a establecer límites y alcances en torno a una pregunta científica, agradezco también el hecho de que me haya aceptado como su alumno justo en el momento en el cual yo no tenía muy claro hacia donde dirigirme, eso siempre estará presente durante toda mi vida. Sus enseñanzas académicas y personales estarán por siempre en mi vida, con el propósito de que día con día sea un mejor individuo.

- A Verónica por ser siempre amable, sencilla y dispuesta a hacerme la vida académica más amable, gracias por aguantarme todo este tiempo.
- A Jorge Cime (el ¡Cha!) con quien compartí durante todo este tiempo momentos muy especiales que hicieron más llevadero el tiempo que "viví" en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, gracias amigo chakespiere por tus críticas rudas pero muy valiosas, fue un verdadero placer haber trabajado contigo aún y con todas tus alucinaciones y tus moscos chupa sangre.

- A Anylu por ser una muy buena amiga y vecina (de laboratorio) que siempre estuvo dispuesta a escucharme y compartir e intercambiar experiencias académicas muy importantes. siempre estaré agradecido contigo.

A la Dra. Maru Manjarrez, que siempre estuvo dispuesta a escucharme dándome su apoyo, consejos y comentarios críticos e incondicionales; gracias por todo, siempre te estaré agradecido.

A todos los amigos del Departamento de virología y Micología del INER: Bertha, César, Cecilia, Dora, Fidencio, Gabriel, Leticia, Miguel Ángel y Manuel por su amistad siempre incondicional.

A mis padres Manuel y Anastasia, quienes siempre me apoyaron y creyeron en mí, también enseñaron lo que significa el trabajo y el valor de las personas, gracias por ser como son conmigo.

I. LISTA DE ABREVIACIONES

VD	<i>Virus Dengue</i>
FHD	<i>Fiebre Hemorrágica por Dengue</i>
FD	<i>Fiebre por Dengue</i>
SCD	<i>Síndrome de Choque por Dengue</i>
DC.	<i>Dengue Clásico</i>
TF	<i>Factor Tisular</i>
TB	<i>Trombina</i>
TM	<i>Trombomodulina</i>
PCA	<i>Proteína C Activada</i>
NF- κ B	<i>Factor Nuclear Kappa de Linfocitos B</i>
PAR	<i>Receptor Activado por Proteasas</i>
EPCR	<i>Receptor de la Proteína C Endotelial</i>
CID	<i>Coagulación Intravascular Diseminada</i>
HUVEC	<i>Células Endoteliales de la Vena de Cordón Umbilical Humano</i>
EV	<i>Endotelio Vascular</i>
MAPK	<i>Proteína Cinasa Activada por Mitógenos</i>
ERK	<i>Cinasa Regulada por la Señal Extracelular</i>
TNF- α	<i>Factor de Necrosis Tumoral alfa</i>

II. PREFACIO

El presente trabajo aporta datos nuevos referentes a la patogénesis del dengue durante la infección del endotelio vascular, dichas aportaciones giran en torno a diferentes aspectos aún poco conocidos de la patogenia de esta enfermedad que a continuación se mencionan:

1.- Actualmente no existen vacunas eficaces y seguras contra el Dengue, tampoco hay modelos animales experimentales que reproduzcan la enfermedad de forma similar al humano y no existen tratamientos antivirales para la infección del virus del dengue. Durante las manifestaciones severas de la enfermedad como el síndrome de choque por dengue (SCD) o la fiebre hemorrágica por dengue (FHD), en los cuales el daño al endotelio vascular es considerado como un signo patognomónico pero los mecanismos patogénicos permanecen sin ser entendidos.

2.- La vasculopatía observada durante la FHD/SCD es el resultado de la disfunción endotelial causada tanto por mecanismos directos (factores virales) como indirectos (factores del hospedero), que interactúan en el endotelio vascular, llevando a las formas severas de la enfermedad, pero hasta la fecha las investigaciones realizadas sobre la patogénesis del dengue (casi cuarenta años) han girado exclusivamente en torno a factores del hospedero; aunque existen pocos reportes que describan factores virales involucrados en este fenómeno.

3.- Recientemente, nosotros reportamos resultados novedosos en los que encontramos que existe un diálogo cruzado en los procesos de coagulación e inflamación durante la infección de las células del endotelio vascular y sus vías regulatorias de señalización. Encontramos que durante el daño al endotelio vascular causados por un aislado agresivo del VD, el Factor Tisular (FT), es sobre-expresado y esto favorece la generación de trombina y la activación del receptor activado por proteasas tipo 1 (PAR-1) el cual, desempeña una importante función durante las activación de las vías de señalización que involucran la fosforilación de p38 y ERK1/2 en la activación de NF- κ B. Demostramos también que la expresión los receptores PAR-1 (inflamación) y el FT (coagulación) pueden ser inhibidos en presencia de los inhibidores de p38 y ERK1/2, sugiriendo con esto la existencia de un puente entre la coagulación y la inflamación.

Las nuevas aportaciones del trabajo:

- 1.- En el presente trabajo reportamos por primera vez, que la infección de las células del endotelio vascular por el virus del dengue puede inducir la modificación de la vía citoprotectora de la proteína C (inflamación- coagulación y apoptosis).
- 2.- Mostramos datos novedosos que indican que durante la activación (daño) del endotelio vascular por el virus del dengue, se induce la liberación de la Trombomodulina (TM), la cual afecta la formación del complejo Trombomodulina-Trombina- proteína C. Esto favorece que el endotelio vascular cambie su estado fisiológico normal (anti-trombótico/anti-inflamatorio) a un estado alterado (pro-coagulante/pro-inflamatorio) que ayudará a entender el daño vascular observado durante la FHD/SCD.
- 3.- Reportamos por primera vez que la infección del endotelio vascular por el virus del dengue modifica la vía citoprotectora de la Proteína C Activada, en la cual a su vez están involucradas p-38 y ERK1/2, así como también los receptores PAR-1 y EPCR.
- 4.- Este estudio proporciona nuevas perspectivas y puede tener implicaciones en el diseño de terapias apropiadas (por ejemplo: administración farmacológica de PCA) a blancos trombóticos e inflamatorios que se presentan durante la FHD/SCD.

RESUMEN

Después de la malaria, la Fiebre por Dengue es la enfermedad viral más prevalente de humanos transmitida por artrópodos. No hay vacunas disponibles, tampoco existe un modelo experimental animal y no existe un tratamiento específico (antiviral) contra la infección por el virus del dengue (VD). Los mecanismos patogénicos de las formas severas de la enfermedad, tales como el síndrome de choque por dengue (SCD) y fiebre hemorrágica por dengue (FHD), en la cual el daño al endotelio es el signo patognomónico, no es totalmente entendido. Observaciones clínicas revelan anomalías significativas en el sistema de la coagulación e inflamación, con niveles incrementados de trombosudulina soluble (TMs) en el plasma de pacientes con FHD/SCD (grados III y IV). La TMs en sangre ha sido considerada como un marcador temprano de SCD durante la fase febril de la enfermedad. Sin embargo, el papel del VD en el daño al endotelio durante el SCD no es claro. En este trabajo presentamos datos nuevos de la participación del VD en la modificación de la formación del complejo Trombosudulina-Trombina-Proteína C en la superficie endotelial, con una reducción en la proteína C activada (PCA). La PCA es la proteína vasoprotectiva más importante ya que regula la generación de trombina (inactiva a los factores procoagulantes Va y VIIIa) y tiene también propiedades anti-inflamatorias, anti-apoptóticas y protección de barrera. Estas funciones biológicas de PCA están asociadas con el receptor de la proteína C endotelial (EPCR) y con la vía de señalización del receptor activado por proteasas 1 (PAR-1), la cual responde a la inflamación-coagulación. Nosotros demostramos alteraciones en las vías

citoprotectiva de la proteína C y anti-trombótica durante la infección de células del endotelio vascular humano por el VD, las cuales pueden explicar los cuadros de vasculopatía observados durante la FHD/SCD. El esclarecimiento de los principios básicos que regulan estos procesos tienen importantes implicaciones para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de FHD/SCD.

Summary

After of malaria, Dengue fever (DF) is the most prevalent arthropod-borne viral disease of humans. No safe vaccine is available, there is no experimental animal model and not exist a specific treatment (antiviral) for dengue virus (DV) infection. The pathogenic mechanisms of the severe forms of the disease, such as dengue shock syndrome (DSS) and dengue hemorrhagic fever (DHF), in which endothelial damage is the pathognomonic sign, are not fully understood. Clinical observations have revealed significant abnormalities in the coagulation and inflammation systems, with increased levels of soluble thrombomodulin (sTM) in the plasma of patients with DHF/DSS (grade III or IV). Blood sTM was proposed as an early predictor of DSS during the febrile stage. However, the role of the DV in endothelial injury during DSS is unclear. Here, we present novel insights into the participation of DV in the downregulation of the thrombomodulin–thrombin–protein C complex formation at the endothelial surface, with a reduction in activated protein C (APC). APC is the most important vasoprotective protein because it downregulates thrombin generation (by the inactivation of procoagulant factors Va and VIIIa) and has anti-inflammatory, antiapoptotic, and barrier protection properties. These

biological functions of APC are associated with the endothelial protein C receptor (EPCR) and protease-activated receptor 1 (PAR-1) signaling pathways, which link the coagulation–inflammation responses. We found alterations in the antithrombotic and cytoprotective protein C pathways during DV infection of human endothelial vascular cells, which may explain the vasculopathy observed during DHF/DSS. Clarification of the basic principles that underlie these processes has important implications for the design of new therapeutic strategies for DHF/DSS.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Origen del Virus del Dengue

La primera gran epidemia de una enfermedad parecida al dengue fue descrita entre 1779 y 1780 en tres continentes: Asia, África y América del Norte (1). Sin embargo, se han reportado cuadros clínicos similares a los de dengue en la Enciclopedia China de la Dinastía Chin (265-420 d. C.); los antiguos chinos ya pensaban que la enfermedad estaba relacionada a insectos voladores asociados al agua. El término "dengue" se originó en América en 1827-1828, a raíz de una epidemia en el Caribe en la que se presentaba con fiebre, artralgias y exantema. Los esclavos provenientes de África identificaron a esta entidad nosológica como *dinga* o *dyenga*, homónimo castellano del dialecto swahili "Ki *denga pepo*" que significa ataque repentino (calambre o estremecimiento) provocado por un "espíritu malo" (1).

En el siglo XX la primera epidemia de Dengue Clásico en América, comprobada por laboratorio, ocurrió en la región del Caribe y en Venezuela entre 1963 y 1964, el virus dengue 3 fue el serotipo circulante. En 1953-54 en Trinidad se aisló por primera vez el agente causal de tipo 2 a partir de casos no epidémicos. En 1977 el serotipo 1 fue introducido en América por Jamaica el cual se diseminó a la mayoría de las islas del Caribe causando diferentes epidemias. El serotipo 4 fue

introducido en 1981 y desde entonces los tipos 1,2 y 4 han sido transmitidos simultáneamente en muchos países en donde el *Aedes aegypti* está presente. El serotipo 3 reapareció en 1994 en Nicaragua, constituyendo un factor de riesgo importante ya que epidemiológicamente se han asociado prototipos a la forma hemorrágica de la enfermedad (2).

1.2 Agente Etiológico

En 1906, Ashburh y Craig identificaron por primera vez al virus del Dengue como el agente etiológico de la Fiebre por Dengue (FD). En 1943 y 1944, Kimura y Hotta aislaron por primera vez al VD en el laboratorio, adaptando dos cepas de este virus a tejido neuronal de ratón. En 1954, Casal y Brown separaron los Arbovirus (“arbo” acrónimo del inglés *arthropod-borne*, transportado por artrópodos) en grupo “A” para alfavirus y grupo “B” para flavivirus, basándose tanto en sus diferencias antigénicas como en la respuesta humoral de reactividad cruzada durante ensayos de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA). En 1984, el Comité Internacional para Taxonomía de Virus (ICTV) estableció al VD como un flavivirus perteneciente a la Familia Flaviviridae, ubicado en el grupo “B” de los Arbovirus. (3).

Actualmente se han descrito cuatro serotipos diferentes pero denominados: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 circulando en el mundo (4). Estos virus son transmitidos al humano mediante la picadura de la hembra hematófaga de los mosquitos *Aedes (Ae) aegypti* y *Ae albopictus* (5).

1.3 Estructura y ciclo de vida del Virus del Dengue

Los virus del dengue tienen una estructura similar a otros flavivirus es decir, son esféricos de 40-50 nm de diámetro, con una envoltura lipídica la cual se deriva de la célula infectada, la envoltura cubre a la nucleocápside de 30-35 nm de diámetro.

El virus está constituido por tres proteínas estructurales designadas como proteína C (capside), M (proteína de membrana) y E (proteína de envoltura). La morfología de estos virus se ha observado por microscopía crioelectrónica tomando en cuenta la organización de la bicapa lipídica y la glicoproteína de envoltura. Esta técnica ha permitido construir imágenes tridimensionales del virus del dengue y establecer un modelo estructural, el cual ha permitido proponer que tiene una estructura que el VD muestra un arreglo icosaédrico de 90 dímeros de la proteína E (Figura 1) (6,7).

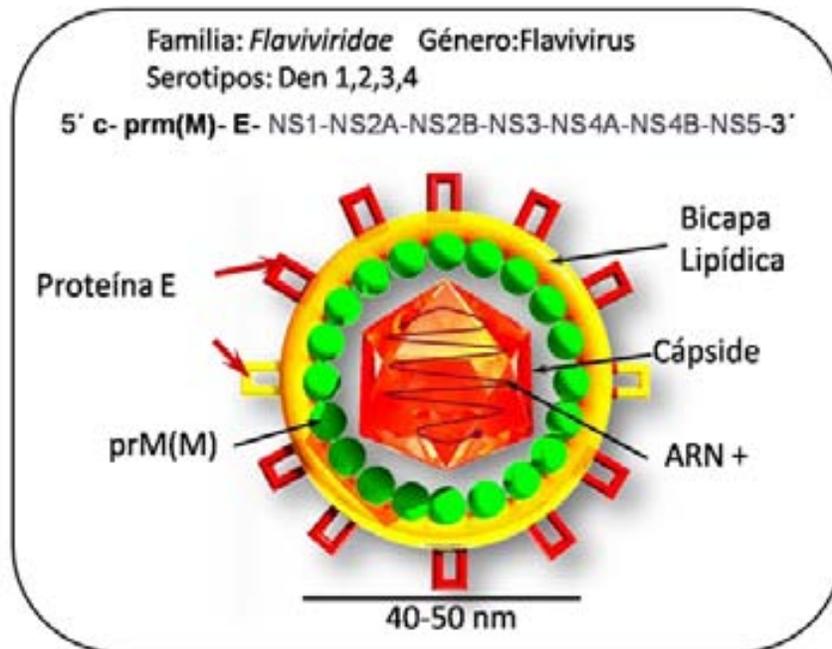


Figura 1. Estructura del virus del Dengue. Constituido por tres proteínas estructurales (E, C y M), y siete proteínas no estructurales (NS1-NS2-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5, genoma de una sola cadena en sentido positivo).

La glicoproteína E está expuesta en la superficie del virión y es la que presenta las funciones biológicas del virus del dengue que incluyen la adhesión del virus al receptor celular así como la fusión de la membrana en endosomas a pH ácido. Así mismo, la glicoproteína E, es también la principal proteína antigénica que activa la producción de anticuerpos neutralizantes (8, 9,10).

El genoma viral es de ARN de una sola cadena en sentido positivo de aproximadamente 11000 nucleótidos que al ser traducido da origen a una poliproteína de aproximadamente 3400 amino ácidos, la cual es procesada co-traduccionalmente por la acción de proteasas virales y del hospedero para producir proteínas virales individuales tales como: tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5. Las proteínas no estructurales están relacionadas en la replicación del

ARN viral como una parte del complejo de replicación (11,12). La glicoproteína NS1 es muy importante ya que el antígeno de fijación del complemento, induce una respuesta protectora (13). La NS3, por otra parte se caracteriza por tener actividades variadas como proteasa, nucleósido trifosfato, helicasa y de ARN trifosfato (14). En general, la proteína NS5, en todos los Flavivirus tiene actividad de ARN polimerasa dependiente ARN. Las proteína NS2a, es un cofactor de NS3 y las proteínas 4a y 4b funcionan como cofactores de NS5 (15). (Figura 2)

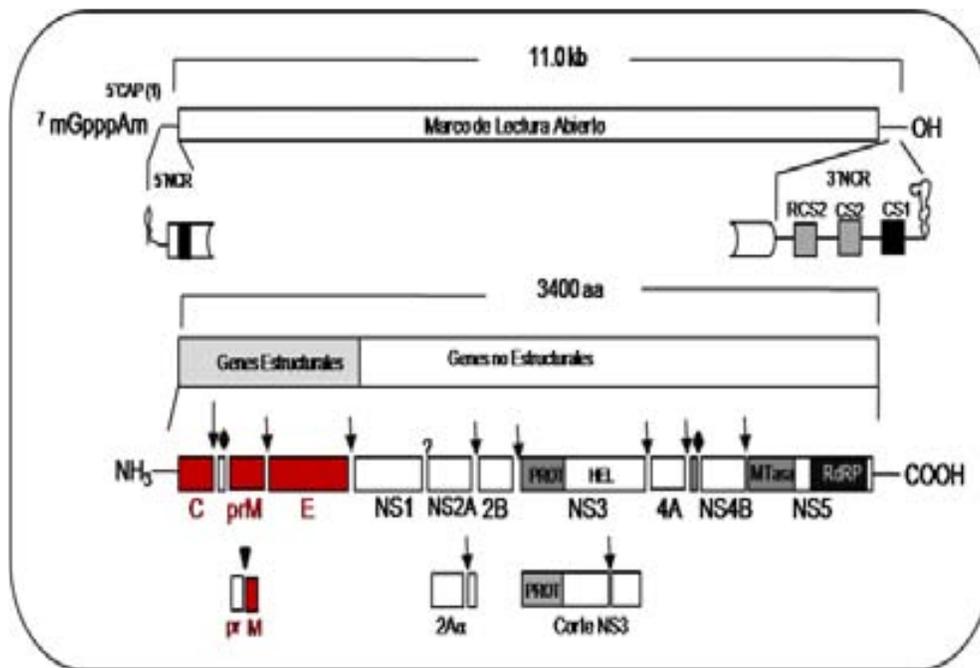


Figura 2. Diagrama del genoma del virus del Dengue. Está constituido por regiones que codifican proteínas estructurales y no estructurales. Hay una región cap (1) 5' y la regiones no codificantes (NCR) 5' y 3'. La poliproteína y los productos generados son cortados en los sitios marcados con flechas, las cajas indican a los precursores de las proteínas maduras son designadas por las letras. Las proteínas estructurales están representadas en color rojo mientras que las no estructurales están en color negro y blanco. Existen sitios de corte para proteasas del hospedero (rombos) y sitios de corte de proteasas virales denotadas por las flechas negras. Además existen otros sitios que son cortados por furinas (triángulo) o por proteasas desconocidas celulares.

La infección de las células hospederas por el virus del dengue se da por la unión a factores de adhesión y receptores celulares. El virus entra mediante endocitosis mediada por receptor, en la que la glicoproteína E promueve la fusión de las membranas del endosoma y de la membrana del virus. La replicación del virus está asociada con cambios de las estructuras de membrana inducidas por el virus dentro del citoplasma de las células infectadas. El ensamble de las partículas virales está asociado con las membranas del retículo endoplásmico.

En un inicio las partículas virales son ensambladas como partículas inmaduras que contienen proteínas prM no covalentemente unidas con la proteína E en un complejo heterodimérico. Los viriones son transportados hacia la membrana plasmática en vesículas y son liberados por exocitosis (Figura 3). Durante la morfogénesis tardía de los virus del dengue, la glicoproteína prM es procesada proteolíticamente por proteasas parecidas a subtilisina en la vía exocítica de la red del trans-Golgi, originando a la proteína M (16,17, 18).

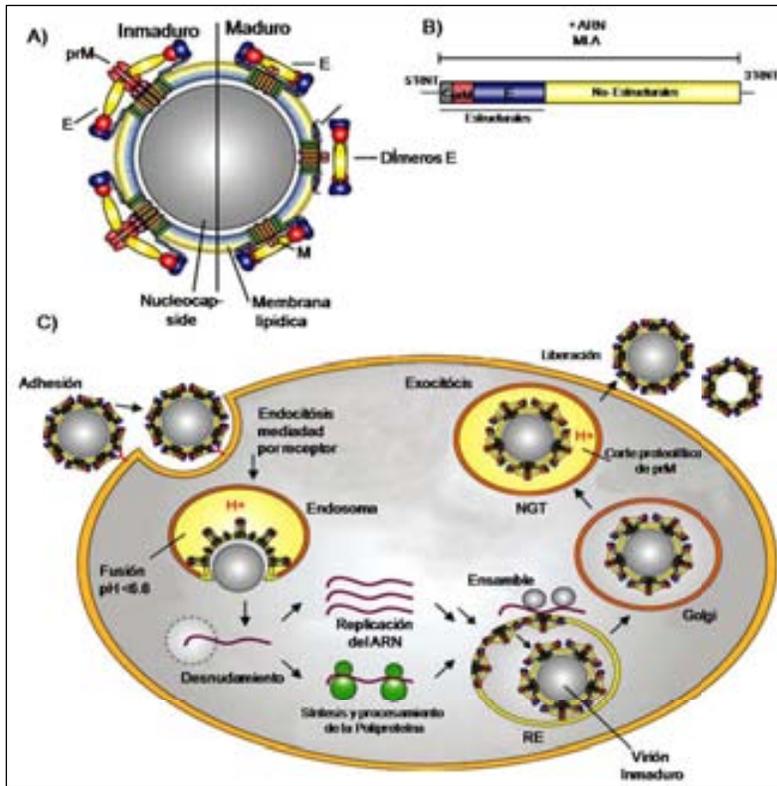


Figura 3. A). Estructura del virus, los viriones inmaduros contienen dos proteínas asociadas a la membrana (prM y E) formando un complejo heterodimérico, en el curso de la maduración del virus, la prM es cortada y da origen al rearrreglo de la proteína E en homodímeros (viriones maduros). El producto del corte de la región carboxilo-terminal de prM (la proteína M) permanece asociada a la membrana viral. Posteriormente las proteínas de superficie son empaquetadas en las partículas virales. B) El genoma es de ARN de una sola cadena en sentido positivo de aproximadamente 11000 nucleótidos y contiene un solo marco de lectura abierto que codifica para las proteínas estructurales C, prM/M y E. También codifica para siete proteínas no estructurales. El

marco de lectura abierto está flanqueado por regiones no codificantes en ambos lados. C) La entrada del virus es por endocitosis mediado por receptor y el pH en el endosoma induce modificaciones estructurales en la proteína E que inducen la fusión de membranas de la nucleocápside en el citoplasma. Posteriormente el genoma de ARN es traducido para iniciar la replicación del virus. El ensamblaje de las partículas virales ocurre en el retículo endoplásmico (RE) y lleva a la formación de partículas inmaduras que son transportadas a través de la vía exocítica. Hay evidencias de que el pH ácido en el trans-Golgi produce cambios conformacionales irreversibles en el complejo prM-E que es requerido para el corte y maduración por furinas celulares o por proteasas liberadas por la célula. Finalmente las partículas infecciosas son liberadas por exocitosis.

1.4 Receptores celulares putativos para el Virus del Dengue

La entrada del VD se inicia con la adsorción y la penetración a la célula hospedera. Durante la *adsorción* la proteína E se une a receptores celulares específicos (Figura 3).

Se han realizado diversos trabajos para caracterizar los probables receptores celulares para el VD en la infección primaria, que incluyen tanto proteínas como glicosaminoglicanos (GAGs), sugiriendo una dependencia en el tipo de célula huésped y el serotipo viral para la interacción inicial entre el VD y la célula blanco. Entre las proteínas descritas como posibles receptores virales en células de mamífero, se encuentran proteínas susceptibles a tripsina (19), proteínas no identificadas de pesos moleculares diversos que oscilan entre 27 y 182 kDa (20-26), el receptor de 37 kDa/67 kDa de alta afinidad por laminina (27), el receptor de manosa (28), proteínas de choque térmico HSP90 y HSP70 (del inglés heat shock protein) (29), la proteína asociada al antígeno de diferenciación mielóide CD14 (30) y la proteína regulada por glucosa GRP 78 (BiP) (31).

Asimismo, se ha descrito que la unión del VD a células dendríticas se produce a través de proteínas DC-SIGN (del inglés dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin). Estas proteínas de membrana contienen un dominio extracelular de lectina tipo C que une carbohidratos con alto contenido de manosas, presentes en la superficie del virión del VD (32,33). Para las células de mosquito C6/36, se identificaron proteínas de pesos moleculares entre 40 y 80 kDa (34,35) así como también una proteína que une laminina (36) como posibles receptores del VD.

Además de los informes de proteínas como probables receptores para el VD, se ha demostrado la participación de heparan sulfato (HS) en la unión del VD tipo-2 a diversas células de mamífero (37-41).

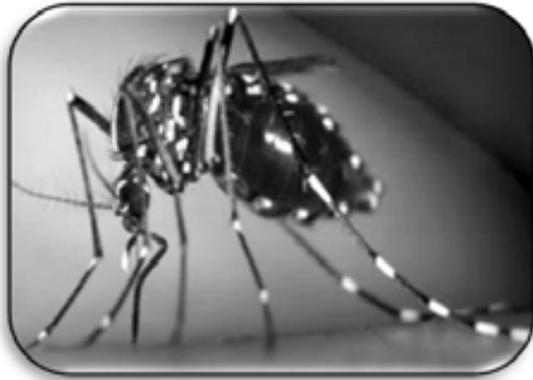
1.5 Aspectos Epidemiológicos del virus del dengue

Se estima que cerca de 2.5 billones de personas (un tercio de la población mundial) procedentes de zonas urbanas, peri urbanas y rurales están en riesgo de contraer la infección, con una incidencia anual de 50-100 millones de casos de FD y de 25-500 mil casos de FHD (42).

La OMS considera al Dengue como la segunda infección re-emergente más importante entre las enfermedades tropicales y como una de las principales enfermedades virales transmitidas al hombre por artrópodos (43, 44, 45). La FHD es la principal causa de hospitalización y muerte de niños en países del Sudeste Asiático (46). Los vectores del VD son los mosquitos del género *Aedes*, y la especie más importante en la transmisión es *Aedes aegypti*. Otro vector de importancia epidemiológica es *Aedes albopictus*, el cual tiene gran distribución en Brasil.

El vector que mantiene eficientemente la enfermedad en Asia introduciéndose posteriormente tanto en América como en varios países del mundo. Ambos vectores pertenecen al subgénero *Stegomyia*. *Aedes aegypti* es un artrópodo perteneciente a la clase *Insecta*, orden *Diptera*, familia *Culicidae* y subfamilia *Culicinae*, que incluye los géneros *Aedes* y *Culex*. El adulto de *Aedes aegypti*, transmisor de Dengue y Fiebre Amarilla, tiene un dorso

con bandas de color plateado o amarillo blanquecino sobre fondo oscuro, y un dibujo característico en forma de lira en el dorso del tórax. Las patas están conspicuamente



bandeadas y el último artejo de las patas posteriores es blanco.

Este género está extensamente distribuido dentro de los límites de las latitudes 40°N y 40°S (Figura 4) y es altamente susceptible a temperaturas extremas y climas cálidos secos.

Figura 4. El principal vector transmisor del virus del dengue es el *Aedes aegypti* y su distribución a nivel mundial.

1.6 Características Clínicas de la Enfermedad

El dengue presenta un amplio espectro clínico que puede ir desde la forma leve de la enfermedad conocida como Dengue Clásico (DC; 95% de los casos), hasta las formas severas como la Fiebre hemorrágica por Dengue y/o el Síndrome de Choque por Dengue (FHD/SCD; 5% de los casos) (47).

La fiebre por dengue (FD) se caracteriza por una aparición repentina de fiebre así como la presencia de signos y síntomas no específicos, incluyendo dolor retro-orbital, cefalea, mialgias, artralgias, náuseas, vómitos y debilidad generalizada.

El dengue hemorrágico, durante la fase aguda es difícil de diferenciar con la FD, sin embargo, durante la defervescencia (cuando cede la temperatura y la viremia) abruptamente se manifiestan síntomas de falla circulatoria (4-6 horas) y/o se pueden

presentar manifestaciones hemorrágicas. Los signos y síntomas incluyen: hemorragias epiteliales tales como petequias, púrpura, equimosis, epistaxis, sangrado de encías, hemorragias gastrointestinales y un aumento en la permeabilidad del endotelio vascular favoreciendo alteraciones hemostáticas que pueden favorecer la presencia de choque hipovolémico.

Los cambios hemostáticos involucran principalmente tres factores; alteraciones vasculares, trombocitopenia y múltiples defectos en el sistema de la coagulación–fibrinólisis (48). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la FHD puede clasificarse en cuatro grados de severidad que dependen de las características clínicas que se presenten (Figura 5).

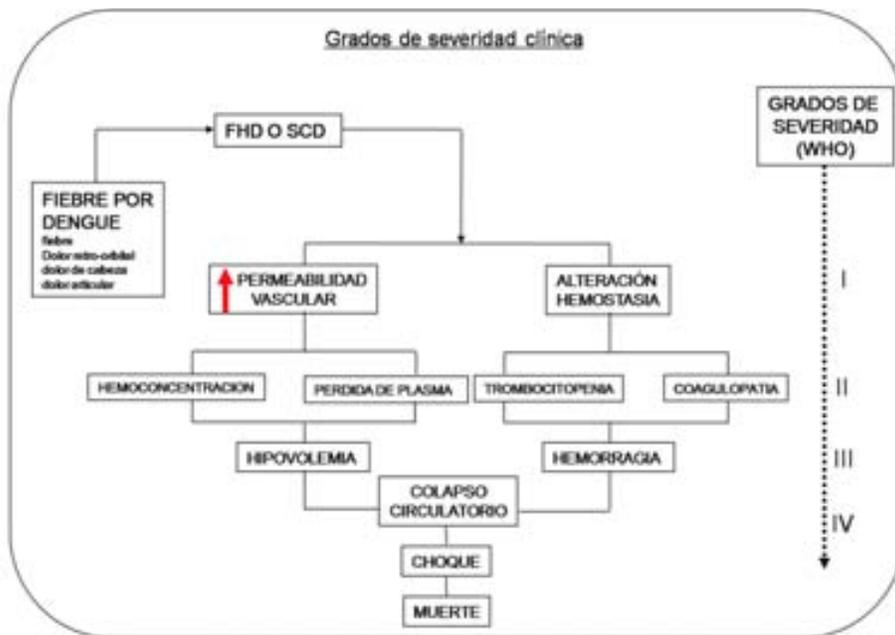


Figura5.
Clasificación de los grados de

severidad de la FHD de acuerdo a la OMS.

El espectro clínico de la enfermedad del Dengue va desde una enfermedad febril conocida como fiebre por dengue caracterizada por fiebre alta, dolor de articulaciones en general, particularmente artralgias y mialgias. Este cuadro clínico puede evolucionar, generalmente en la etapa de defervescencia y presentarse falla circulatoria y aumento de permeabilidad de membranas del endotelio vascular y con esto establecerse la Fiebre Hemorrágica por Dengue o Síndrome de Choque por Dengue. Una de las características más importantes de la FHD/SCD es el aumento de la permeabilidad de la membrana del endotelio vascular que trae como consecuencia la pérdida del plasma y un aumento en la hemoconcentración, que finalmente pueden generar el choque hipovolémico que junto con la hemorragia puede converger en el colapso circulatorio y finalmente en la muerte.

Se desconocen cuáles son los mecanismos involucrados en la aparición de las formas severas de la enfermedad (FHD/SCD). Sin embargo, en un principio se propusieron dos hipótesis que intentan explicar los mecanismos patogénicos del FHD/SCD: a) La facilitación inmunológica y b) La variación antigénica de los aislados virales con incremento en la virulencia de las cepas. La primera fue postulada por Halsted en 1974, quien propone que en el curso de una infección secundaria la presencia de anticuerpos heterotípicos no neutralizantes, incrementa la formación de complejos antígeno-anticuerpo, facilitando la entrada del virus a las células blanco (macrófagos), favoreciendo la activación de los macrófagos, los cuales a su vez activan diferentes sistemas como el del complemento, fibrinolisis y coagulación (Figura 6) (48).

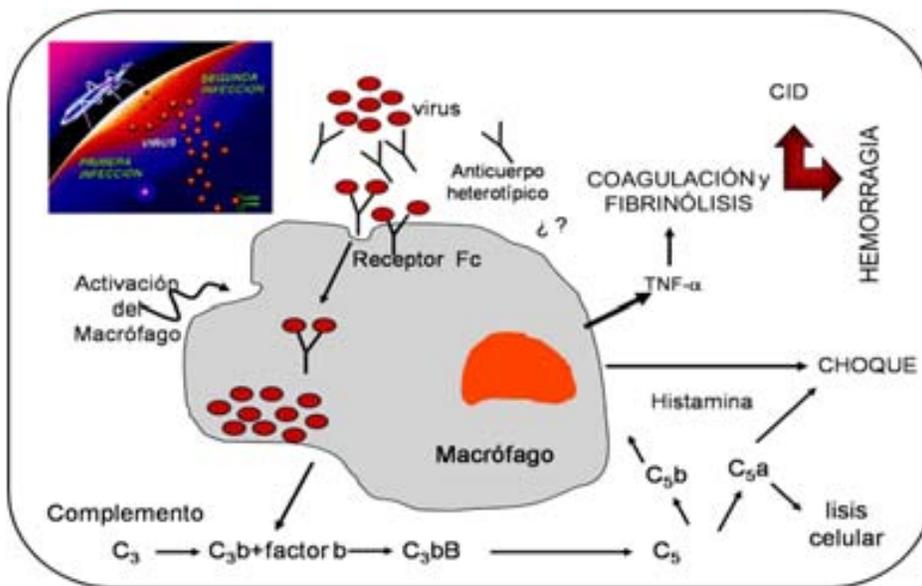


Figura 6. A la fecha se conocen dos hipótesis que intentan explicar las manifestaciones hemorrágicas severas: La primera es conocida como la facilitación inmunológica, fue propuesta por Halstead, quien propone que en el curso de una infección secundaria, la presencia de

anticuerpos heterotípicos no neutralizantes circulantes incrementa la formación de complejos antígeno-anticuerpo, facilitando la entrada del virus a las células blanco, desencadenando con ello la activación de los macrófagos, los cuales a su vez activan diferentes sistemas como en la vía del complemento, fibrinolisis y/o coagulación predisponiendo a la hemorragia.

La segunda hipótesis fue propuesta por León Rosen (49), con base en la existencia de casos de Dengue hemorrágico en el curso de una epidemia de Dengue Hemorrágico de tipo

primario, en los cuales se demostró que las personas afectadas no habían estado expuestas a una primo-infección por dengue u otro Flavivirus por lo que independientemente del *status* inmunológico del huésped, los factores virales podrían estar jugando un papel importante (50).

Para tratar de explicar estos casos, León Rosen propuso que la variabilidad antigénica que sufren las cepas mientras circulan en la naturaleza (como un incremento en la virulencia de las cepas) es un factor de riesgo importante en la aparición de la manifestación hemorrágica (Figura 7).

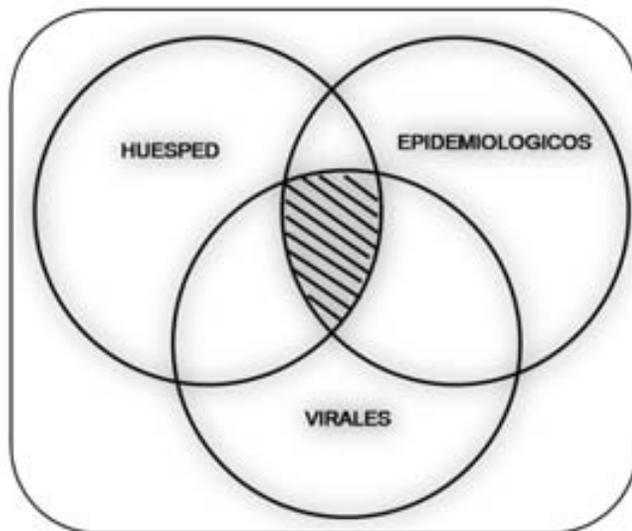


Figura 7. L. Rosen,

Interacción de diferentes factores que puede intervenir en la generación de FHD/SCD durante una primo-infección. La combinación de factores puede influir en la patogenia de virus del dengue.

Sin embargo, actualmente se han se han descrito varias hipótesis sobre el desarrollo de la FHD/SCD en individuos infectados con el virus del dengue. Estas hipótesis se derivan principalmente de información obtenida de estudios realizados en regiones donde la enfermedad se manifiesta de forma pandémica y de experimentos in vitro. Se han descrito varias hipótesis sobre el desarrollo de la FHD/SCD, en individuos infectados con el virus del dengue. Estas hipótesis se derivan principalmente de información obtenida de estudios

realizados en regiones donde la enfermedad se manifiesta de forma pandémica y de experimentos in vitro. Estas hipótesis incluyen a la patogénesis mediada por anticuerpos, la patogénesis mediada por células (51), el fenómeno de la tormenta de citocinas (52), el fondo genético de los individuos (53), las diferencias entre las cepas virales (54,55), el nivel de virus circulando en los individuos durante la fase aguda de la enfermedad (56) y el estatus nutricional de los individuos infectados (57).

En general para todas estas hipótesis han sido difíciles discernir los mecanismos patogénicos de la infección por el virus del dengue ya que no hay modelos animales que permitan reproducir estas teorías y por consiguiente el mecanismo patogénico preciso que lleva al desarrollo de la FHD/SCD permanece como un enigma.

Existen otros factores que no se han estudiado con detalle y que están estrechamente relacionados con la infección por el virus del dengue, como los factores denominados como hipertérmicos, en los que la fiebre, como un marcador de la infección por el virus del dengue, genera la producción y liberación de diferentes citocinas tales como TNF- α , IL-1 e IL-6 como las principales activadores de la fiebre; así como también inhibidores de la fiebre como TGF-beta e IL-10 (58). La cantidad y/o calidad de estos factores circulando en la sangre pueden alterar o aumentar los parámetros observados en pacientes infectados con el virus del dengue y pueden ser críticos en la definición de la infección.

El estatus físico del virus durante la viremia se refiere concretamente a la forma en que pueden estar asociadas las partículas virales en la circulación sanguínea; pueden estar asociadas a plaquetas, linfocitos o monocitos por lo que su eliminación es más difícil que cuando estas partículas virales se encuentran libres en el plasma (59).

La patogénesis de la FHD/SCD involucra fenómenos biológicos que afectan la hemostasia

(60), la cual es uno de los mecanismos de defensa más importante del organismo ya que mantiene un balance entre la actividad del sistema de coagulación y el sistema fibrinolítico. La coagulación sanguínea se inicia por la activación de dos vías: la vía extrínseca también conocida como vía del factor tisular (FT) y la vía intrínseca o de contacto. La vía extrínseca es activada cuando los factores del plasma entran en contacto con el FT el cual se expresa en la membrana de la célula endotelial cuando estas últimas son estimuladas o existe alguna lesión en el endotelio vascular. Ambas vías (intrínseca y extrínseca) favorecen la generación de trombina (TB) (61).

La TB es una proteasa sérica multifuncional que actúa sobre diferentes vías tanto en el sistema de la coagulación como con el sistema plaquetario. En la coagulación, la TB actúa sobre el fibrinógeno generando monómeros de fibrina para formar la matriz del coágulo. Así mismo activa al factor XIII de la coagulación, el cual estabiliza la polimerización de la fibrina (Figura 8).

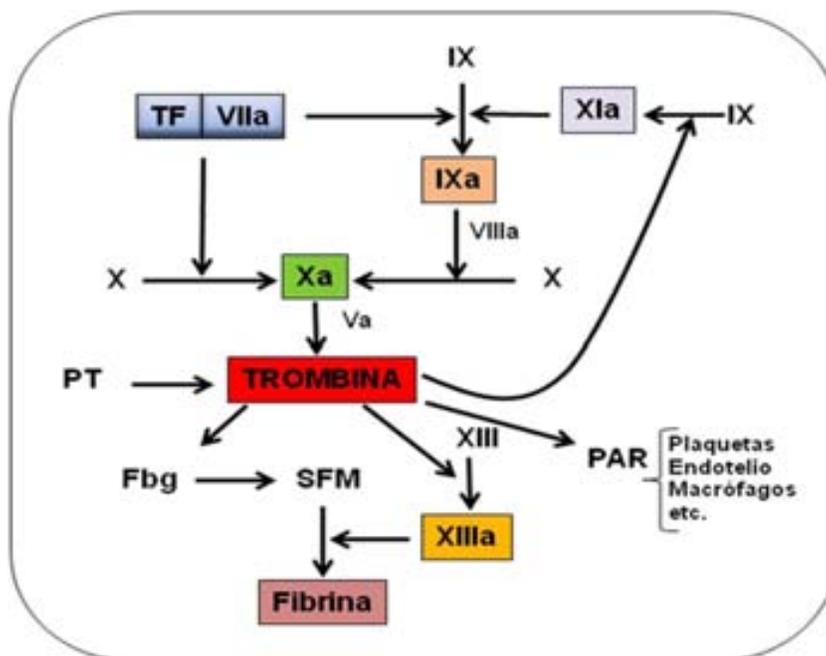


Figura 8. El sistema hemostático es muy complejo y se activa cuando el endotelio es estimulado. El Factor tisular se expresa e interacciona con el Factor VIIa y activan al Factor Xa. Este complejo a su vez activa al factor V y lo activa para que finalmente este complejo genere trombina a partir de protrombina.

La unión de TB con la trombomodulina (TM) forman un complejo (TB-TM) el cual modula el encendido de otra vía que determina la regulación de la cascada de coagulación, esta se conoce como vía de la anticoagulación de la proteína C Activada (PCA) (62).

La TM es una glicoproteína transmembranal de superficie de la membrana del endotelio vascular de 557 aminoácidos sin actividad enzimática intrínseca. Aproximadamente la mitad de su dominio extracelular N-terminal consiste de un subdominio globular con una secuencia similar a la de lectinas tipo C de animales (63). Este dominio participa en la regulación del crecimiento de tumores (64), también regula la función endotelial en la inflamación (65). El resto de la porción extracelular de la TM está integrada de seis subdominios similares al factor de crecimiento epidermal (66). Existen regiones ricas en serina/treonina entre los subdominios parecidos al factor de crecimiento epidermal y la región transmembranal, también contiene algunos sitios blanco para N y O-glicosilación post- traduccional, en particular la adición de motivos de condroitin sulfato y cuenta también con una pequeña región citoplasmática (67). La función anticoagulante de la TM esta mediada por su interacción con la trombina y con la proteína C.

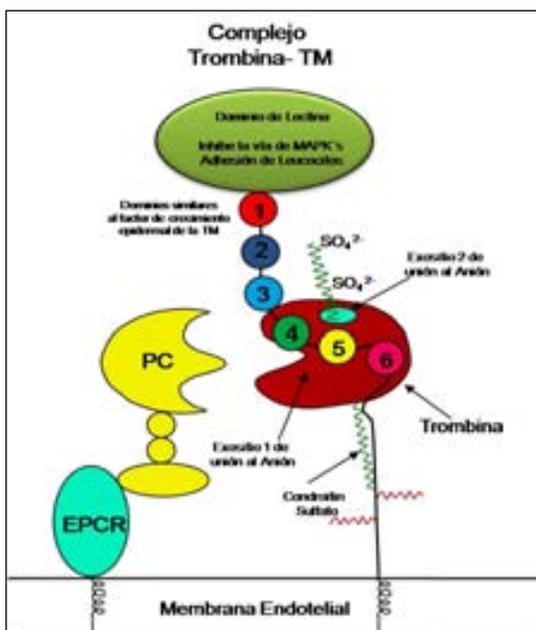


Figura 9. Complejo TB-TM, la interacción de este complejo favorece la activación de la PC a nivel de la membrana del endotelio vascular; así mismo la participación del EPCR propicia que la activación de PC sea más contundente. Los subdominios 4-6 de la TM son requeridos para la activación de PC a través de la TB.

Por otra parte la TM unida a la membrana del endotelio vascular forma complejos de alta afinidad con la trombina y esto inhibe la interacción de la trombina con el fibrinógeno y con el receptor activado por proteasas (PAR-1) a través del excitio-1. Este mismo complejo también es un potente activador de la proteína C que aumenta más dos órdenes de magnitud la activación de la proteína C dependiente de trombina (68).

La trombina se une a la TM vía, excitio-1, a los subdominios 5 y 6 (69). Para la unión de la proteína C se requiere la participación del subdominio 4 y del dominio rico en serina/ treonina. La región rica en condroitin sulfato junto con la región rica en serina/treonina de la TM proporciona un segundo sitio de unión a la trombina, el cual participa en la activación de la proteína C (figura 9) (70).

El complejo TB-TM inactiva a los factores Va y VIIIa de la coagulación, los cuales son determinantes en la generación de la TB (Figura 10). Esta función determina la producción de TB, de ahí el nombre de vía anticoagulante de la proteína C.

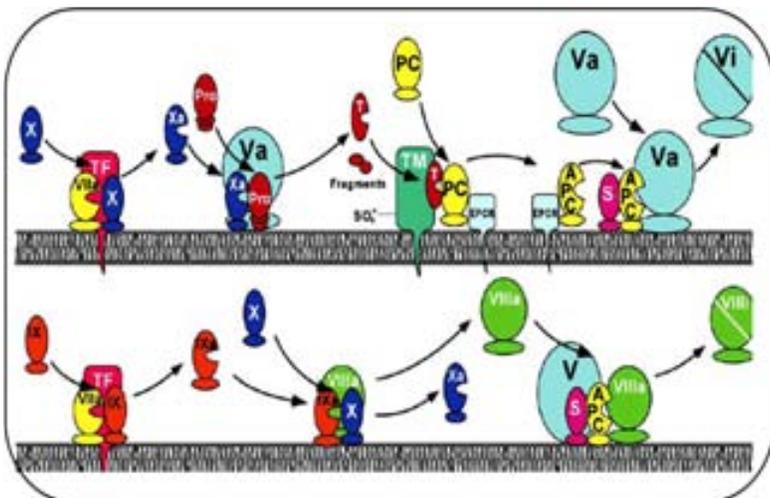


Figura 10. Vía anticoagulante de la proteína C. La vía anticoagulante de la proteína C se activa cuando la TB interacciona con la TM y juntas llevan a cabo la activación del zimógeno de la proteína C. cuando esta proteína es activada actúa directamente sobre el factor Va y VIIIa interrumpiendo así la generación de TB.

Independientemente de la participación de la PCA en la vía anticoagulante, (regulando la producción de trombina) la PCA también desempeña funciones fundamentales en la regulación del proceso inflamatorio, suprimiendo la síntesis de citocinas proinflamatorias mediante la inhibición de la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B (71), el cual controla la expresión de diversos genes de quimiocinas proinflamatorias y de moléculas de adhesión como ICAM, VCAM y E-Selectina, previniendo así la acumulación y la extravasación de leucocitos (Figura 10). Así mismo Cheng y col, han reportado que la PCA protege al endotelio vascular de la apoptosis mediada por p53 (72).

Se ha determinado que estas funciones citoprotectoras de PCA están determinadas por la participación directa de Receptores Activados por Proteasas (PAR), principalmente por PAR-1. Estos receptores pueden ser activados bajo el contexto fisiológico normal o durante la activación leve del endotelio vascular por PCA unida a su receptor denominado como Receptor de la Proteína C Endotelial (EPCR) y activar diferentes vías de señalización que promuevan la expresión de genes de supervivencia celular (Figura 11), los cuales regulan la inflamación, apoptosis y estabilidad de la barrera endotelial por lo que se denomina vía citoprotectora de PCA.

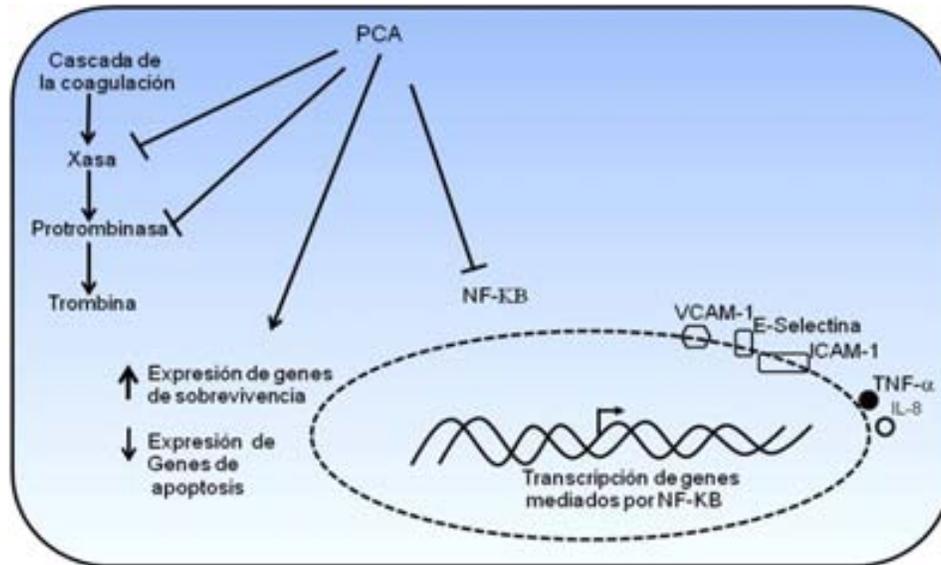


Figura 11. La Proteína C Activa, además de su función como una proteína reguladora de la producción de Trombina durante la cascada de la coagulación; suprime los efectos mediados por TNF- α al bloquear la translocación al núcleo de NF- κ B, bloquea la expresión de genes inflamatorios y moléculas de adhesión celular, así como la modulación de genes anti-apoptóticos.

Similarmente, la TM además de jugar un papel importante en la regulación de la hemostasia como un cofactor en la activación de la vía anticoagulante de la PCA, también participa de manera indirecta en la regulación del proceso inflamatorio mediante la participación de la Trombina, la cual modifica la actividad plaquetaria por un lado y por otro inhibe la expresión de moléculas de adhesión y disminuye la síntesis de la sintetasa del óxido nítrico, la cual actúa como un potente quimiotáctico de monocitos y neutrófilos (73).

I. PREFACIO

El presente trabajo aporta datos nuevos referentes a la patogénesis del dengue durante la infección del endotelio vascular, dichas aportaciones giran en torno a diferentes aspectos aún poco conocidos de la patogenia de esta enfermedad que a continuación se mencionan:

1.- Actualmente no existen vacunas eficaces y seguras contra el Dengue, tampoco hay modelos animales experimentales que reproduzcan la enfermedad de forma similar al humano y no existen tratamientos antivirales para la infección del virus del dengue. Durante las manifestaciones severas de la enfermedad como el síndrome de choque por dengue (SCD) o la fiebre hemorrágica por dengue (FHD), en los cuales el daño al endotelio vascular es considerado como un signo patognomónico pero los mecanismos patogénicos permanecen sin ser entendidos.

2.- La vasculopatía observada durante la FHD/SCD es el resultado de la disfunción endotelial causada tanto por mecanismos directos (factores virales) como indirectos (factores del hospedero), que interactúan en el endotelio vascular, llevando a las formas severas de la enfermedad, pero hasta la fecha las investigaciones realizadas sobre la patogénesis del dengue (casi cuarenta años) han girado exclusivamente en torno a factores del hospedero; aunque existen pocos reportes que describan factores virales involucrados en este fenómeno.

3.- Recientemente, nosotros reportamos resultados novedosos en los que encontramos que existe un diálogo cruzado en los procesos de coagulación e inflamación durante la infección de las células del endotelio vascular y sus vías regulatorias de señalización. Encontramos que durante el daño al endotelio vascular causados por un aislado agresivo del VD, el Factor Tisular (FT), es sobre-expresado y esto favorece la generación de trombina y la activación del receptor activado por proteasas tipo 1 (PAR-1) el cual, desempeña una importante función durante la activación de las vías de señalización que involucran la fosforilación de p38 y ERK1/2 en la activación de NF- κ B. Demostramos también que la expresión los receptores PAR-1 (inflamación) y el FT (coagulación) pueden ser inhibidos en presencia de los inhibidores de p38 y ERK1/2, sugiriendo con esto la existencia de un puente entre la coagulación y la inflamación.

Las nuevas aportaciones del trabajo:

1.- En el presente trabajo reportamos por primera vez, que la infección de las células del endotelio vascular por el virus del dengue puede inducir la modificación de la vía citoprotectora de la proteína C (inflamación- coagulación y apoptosis).

2.- Mostramos datos novedosos que indican que durante la activación (daño) del endotelio vascular por el virus del dengue, se induce la liberación de la Trombomodulina (TM), la cual afecta la formación del complejo

Trombomodulina–Trombina- proteína C. Esto favorece que el endotelio vascular cambie su estado fisiológico normal (anti-trombótico/anti-inflamatorio) a un estado alterado (pro-coagulante/pro-inflamatorio) que ayude a entender el daño vascular observado durante la FHD/SCD.

3.- Reportamos por primera vez que la infección del endotelio vascular por el virus del dengue modifica la vía citoprotectora de la Proteína C Activada, en la cual a su vez están involucradas p-38 y ERK1/2, así como también los receptores PAR-1 y EPCR.

4.- Este estudio proporciona nuevas perspectivas y puede tener implicaciones en el diseño de terapias apropiadas (por ejemplo: administración farmacológica de PCA) a blancos trombóticos e inflamatorios que se presentan durante la FHD/SCD.

RESUMEN

Después de la malaria, la Fiebre por Dengue es la enfermedad viral más prevalente de humanos transmitida por artrópodos. No hay vacunas disponibles, tampoco existe un modelo experimental animal y no existe un tratamiento específico (antiviral) contra la infección por el virus del dengue (VD). Los mecanismos patogénicos de las formas severas de la enfermedad, tales como el síndrome de choque por dengue (SCD) y fiebre hemorrágica por dengue (FHD), en la cual el daño al endotelio es el signo patognomónico, no es totalmente entendido. Observaciones clínicas revelan anomalías significativas en el sistema de la coagulación e inflamación, con niveles incrementados de trombomodulina soluble (TMs) en el plasma de pacientes con FHD/SCD (grados III y IV). La TMs en sangre ha sido considerada como un marcador temprano de SCD durante la fase febril de la enfermedad. Sin embargo, el papel del VD en el daño al endotelio durante el SCD no es claro. En este trabajo presentamos datos nuevos de la participación del VD en la modificación de la formación del complejo Trombomodulina-Trombina-Proteína C en la superficie endotelial, con una reducción en la

proteína C activada (PCA). La PCA es la proteína vasoprotectiva mas importante ya que regula la generación de trombina (inactiva a los factores procoagulantes Va y VIIIa) y tiene también propiedades anti- inflamatorias, anti-apoptóticas y protección de barrera. Estas funciones biológicas de PCA están asociadas con el receptor de la proteína C endotelial (EPCR) y con la vía de señalización del receptor activado por proteasas 1 (PAR-1), la cual responde a la inflamación- coagulación. Nosotros demostramos alteraciones en las vías citoprotectiva de la proteína C y anti-trombótica durante la infección de células del endotelio vascular humano por el VD, las cuales pueden explicar los cuadros de vasculopatía observados durante la FHD/SCD. El esclarecimiento de los principios básicos que regulan estos procesos tienen importantes implicaciones para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de FHD/SCD.

Summary

After of malaria, Dengue fever (DF) is the most prevalent arthropod-borne viral disease of humans. No safe vaccine is available, there is no experimental animal model and not exist a specific treatment (antiviral) for dengue virus (DV) infection. The pathogenic mechanisms of the severe forms of the disease, such as dengue shock syndrome (DSS) and dengue hemorrhagic fever (DHF), in which endothelial damage is the pathognomonic sign, are not fully understood. Clinical observations have revealed significant abnormalities in the coagulation and inflammation systems, with increased levels of soluble thrombomodulin (sTM) in the plasma of patients with DHF/DSS (grade III or IV). Blood sTM was proposed as an early predictor of DSS during the febrile stage. However, the role of the DV in endothelial injury

during DSS is unclear. Here, we present novel insights into the participation of DV in the downregulation of the thrombomodulin–thrombin–protein C complex formation at the endothelial surface, with a reduction in activated protein C (APC). APC is the most important vasoprotective protein because it downregulates thrombin generation (by the inactivation of procoagulant factors Va and VIIIa) and has anti-inflammatory, antiapoptotic, and barrier protection properties. These biological functions of APC are associated with the endothelial protein C receptor (EPCR) and protease-activated receptor 1 (PAR-1) signaling pathways, which link the coagulation–inflammation responses. We found alterations in the antithrombotic and cytoprotective protein C pathways during DV infection of human endothelial vascular cells, which may explain the vasculopathy observed during DHF/DSS. Clarification of the basic principles that underlie these processes has important implications for the design of new therapeutic strategies for DHF/DSS.

2. Planteamiento del Problema

Las principales manifestaciones patológicas en FHD/SCD producidas por el virus del dengue se caracterizan por el aumento de la permeabilidad vascular y la alteración de la hemostasia, [Hemorragia y/o coagulopatía (CID)] (74). En éste proceso patológico el endotelio vascular juega un papel determinante ya que este tejido regula tanto a la hemostasia (coagulación y fibrinólisis), como a la permeabilidad vascular (75). La TM, expresada por las células endoteliales desempeña un papel clave en la regulación anticoagulante ya que forma el complejo TB-TM que activa a la proteína C, cuya forma activa (PCA) es capaz de regular la producción de Trombina (76).

Independiente a la participación de PCA en la regulación de la coagulación, esta misma proteína interacciona con PAR-1 y favorece un aumento en la expresión de moléculas anti-apoptóticas, como Bcl2-A1, eNOS, IAP, entre otras. Además de reducir la producción de moléculas proinflamatorias como la interleucina IL-8 y moléculas de adhesión como ICAM y VCAM a través de la inhibición de la traslocación al núcleo de NF-KB (77).

En pacientes con FHD se ha reportado la presencia de niveles elevados de TM libre en el plasma como resultado del daño endotelial (78, 79,80). Por otro lado, Raghupathy y col. en 1998 (81), establecieron que en el plasma de pacientes con FHD existe IL-8 libre, sugiriendo que el virus del dengue además de favorecer el proceso inflamatorio, puedan estar afectando el sistema de la anticoagulación dependiente de la vía citoprotectiva de la Proteína C Activada (la cual es regulada por la participación de la TM y EPCR) (61).

3. HIPOTESIS

El virus del Dengue es capaz de modificar la vía citoprotectora de la PCA en el endotelio vascular humano.

4. Objetivo general

Evaluar si durante la infección del endotelio vascular por diferentes aislados del VD se modifica la función citoprotectora de PCA

Objetivos particulares

- Establecimiento del cultivo primario de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC)
- Determinar si la infección por el virus del dengue (clásico y hemorrágico) modifica la expresión de TM en la membrana de células endoteliales provenientes de cordón umbilical humano (HUVEC)
- Evaluar si existen alteraciones en la activación de la Proteína C en cultivos primarios de HUVEC, en presencia de diferentes aislados del virus dengue (clásico y hemorrágico), mediante ensayo cromogénico
- Determinar si la infección de HUVEC con el VD induce la producción de IL-8
- Determinar la posible vía de señalización involucrada en la producción de IL-8 de HUVEC infectadas con los diferentes aislados virales
- Evaluar el efecto citoprotector de PCA (producción de IL-8, permeabilidad vascular y apoptosis) durante la infección del endotelio vascular por el virus del dengue

- Establecer si el efecto citoprotector de PCA está relacionado con la participación de PAR-1 en HUVEC infectadas con el virus dengue

5. METODOS

5.1 Aislados Virales. Se emplearon dos aislados diferentes del serotipo 2 del virus dengue. Uno proveniente de un caso fatal, de Dengue Hemorrágico (D2) y otro proveniente de un caso de Dengue Clásico, ambas cepas fueron donadas por el Center for Disease Control (CDC) Fort Collins, Colorado. U.S.A.

5.2 Línea Celular. Para la propagación y purificación de los diferentes aislados virales, se utilizaron cultivos de células LLC-MK2 derivadas de riñón de mono verde africano (ATCC)

5.3 Propagación del virus Dengue. Se sembraron células LLC-MK2 en botellas de 25 cm² a una densidad aproximada de 2×10^6 células, una vez confluentes las monocapas celulares, fue retirado el medio de cultivo por succión y se lavaron dos veces con PBS pH 7.4 estéril. Se inocularon los diferentes aislados virales (FD y/o FHD) con 6×10^4 unidades formadoras de placa (ufp), para tener una multiplicidad de infección de 0.01 ufp en 1.0 ml de D'MEM. Se incubaron durante 2 horas en atmósfera de 5 % de CO₂ a 37°C. Se eliminó el inoculo por succión, y se lavaron las monocapas dos veces con PBS estéril y agregamos 5 ml de D'MEM sin suero. Incubamos en las mismas condiciones hasta que se observó el efecto citopático (redondeamiento celular en forma de racimos). Cuando el efecto citopático fue mayor del 80% de la monocapa, cosechamos el virus transfiriéndolo a criotubos de 1.5 ml con albúmina al 0.5% más D'MEM y se almacenaron a -70°C.

5.4 Titulación del virus dengue mediante ensayo de placa lítica.

Se tripsinizó una botella de 25cm² con células LLC-MK2 y se resuspendieron en 11ml de medio D'MEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Se agregó 0.5 ml de esta suspensión por pozo en una caja múltiple de veinticuatro pozos (CM24) (Nunclon, E.U.). Una vez confluentes las monocapas se lavaron con PBS y se llevaron a cabo diluciones del VD en

medio sin suero de 10^0 hasta 10^8 y se depositaron 0.1 ml de cada dilución en cada pozo por duplicado, las muestras se incubaron durante 2 horas a 37°C con 5% de CO_2 para permitir su adsorción. Posteriormente, eliminamos el inóculo y lavamos las monocapas; adicionamos 1.5 ml de medio incompleto (MI) con metil celulosa al 2.3 % estéril por cada pozo y se incubaron en cámara húmeda en presencia de CO_2 (5%) a 37°C hasta observar el efecto citopático característico (6-8 días).

Después de este tiempo se determinó el título viral contando directamente el número de placas líticas observadas en la mayor dilución, tomando en cuenta el factor de dilución ($\text{UFP/ml} = \# \text{ placas} \times 10 \times \text{FD}$) en donde, FD es el factor de dilución; y 10 es el factor de corrección que corresponde a 0.1 ml de inóculo.

5.5 Establecimiento del cultivo primario de células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC)

Las HUVEC se aislaron a partir de cordones umbilicales frescos utilizando la metodología descrita por Olsen en 1994 (82). Brevemente, se canuló la vena del cordón umbilical y se lavó este conducto con solución salina y HEPES [Na Cl 0.75 M, K Cl 5 mM, HEPES 5 mM, Glucosa 6 mM, PH 7.5 (SIGMA E.U.)]; se agregó un volumen de 5 ml de solución de tripsina-verseno al 0.075% (Gibco BRL Gaithersburg MD USA) y se incubó en baño María durante 20 minutos a 37°C . Después de la incubación, la suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm, resuspendiendo las células en medio de cultivo M 199 (Gibco BRL, Gaithersburg MD USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, Gaithersburg MD USA), 100 mg/ml de heparina porcina (Gibco BRL, Gaithersburg MD USA), 50 U/ml de penicilina/ estreptomycin (Gibco BRL, Gaithersburg MD USA) y 25 mg/ml de factor de crecimiento endotelial vascular (SIGMA, USA).

Las células obtenidas fueron sembradas en cajas de cultivo de 25cm² (Corning Incorporated, USA) cambiando el medio de cultivo cada dos días. Las células utilizadas en todos los experimentos fueron las correspondientes al tercer pase. Verificamos los cultivos tanto por su típica morfología de empedrado (cobblestone) como por la presencia del factor de von-Willebrand mediante inmunofluorescencia indirecta.

5.6 Detección de Trombomodulina en la membrana de HUVEC mediante citometría de flujo

Para determinar la expresión de trombomodulina (TM) en la membrana de las células endoteliales, se llevaron a cabo diferentes ensayos de citometría de flujo. Se infectaron monocapas confluentes de células HUVEC, utilizando diferentes multiplicidades de infección (0.01, 0.1 y 1.0) de ambos aislados del VD (clásico y hemorrágico) y se analizaron 24 y 48 horas post-infección. Por otro lado, se utilizaron monocapas confluentes de HUVEC y se estimularon durante 48 horas con 10 ng/ml de TNF- α para disminuir la expresión de TM (control positivo) de acuerdo a Hirokawa y col (83). Posteriormente, lavamos las células dos veces con PBS y se desprendieron de la caja de cultivo con una solución de PBS-EDTA 0.5 M.

Las células se resuspendieron en 1ml de PBS con el anticuerpo monoclonal anti-trombomodulina a una dilución de 1:100. Después de incubar durante una hora a 4⁰C, las muestras se centrifugaron a 1300 rpm por 3 minutos y se lavaron dos veces con buffer A (150mM de NaCl, 2.5 mM de CaCl₂, 5mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), 20mM de Tris-HCL, pH 7.4), después se agregó un anticuerpo secundario anti- IgG de humano conjugado con FITC y se incubó durante una hora a temperatura ambiente (Santa cruz Biotechnology, Inc. EU.) Se lavaron las células tres veces con el mismo buffer y la pastilla celular la resuspendimos en amortiguador A (150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 5 mg/ml bovine serum

albumin [BSA] 20 mM Tris-HCl [pH 7.4]) y analizamos la intensidad de la fluorescencia mediante citometría de flujo.

5.7 Colocalización de los receptores EPCR Y PAR-1

Se utilizaron monocapas de HUVEC confluentes en portaobjetos multipozos, a los cuales se infectaron con DF-DV y DHF-DV a una M.O.I.=1 y se analizaron por separado 48 horas post-infección. Las monocapas se fijaron con paraformaldehído al 2% y posteriormente se incubaron con anticuerpos monoclonales específicos contra los receptores EPCR y PAR-1 (SANTA CRUZ) a una dilución de 1:100 durante 1.5 horas a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con PBS-BSA (1%) tres veces y se incubaron con dos anticuerpos secundarios acoplados con fluorocromos distintos, para EPCR se empleó un IgG monoclonal de ratón acoplado a TxR (VECTOR, CA) a una dilución de 1:100 y para PAR-1, se utilizó un anti-IgG monoclonal de ratón acoplado a FITC (ZYMED, CA.) a una dilución de 1:100 y se incubaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente.

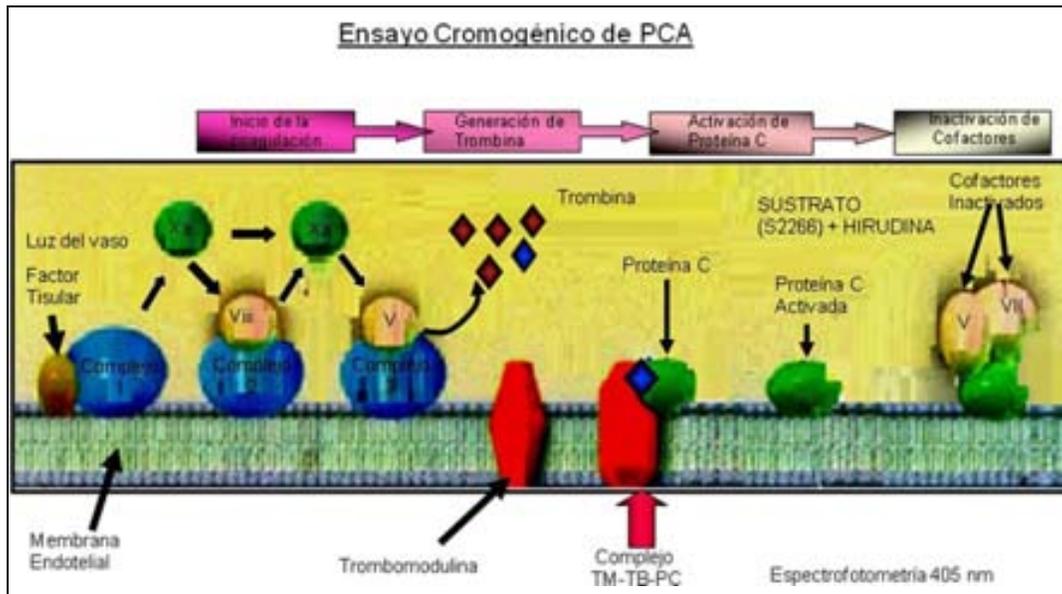
Los portaobjetos inmunoteñidos fueron cubiertos con medio de montaje fluorescente (Vectashield, Vector, Burlingame, CA) y evaluados con ayuda de un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse) equipado con filtros para los fluorocromos empleados. Los campos seleccionados fueron analizados con un microscopio confocal LSM 5 PASCAL Zeiss equipado con un láser de argón/kriptón. Las imágenes fueron adquiridas con una apertura numérica de 1.30 con aceite de inmersión y objetivo 40X. Para evitar falsos positivos, el FITC fue excitado con la longitud de onda de 488 nm y la luz emitida fue captada con los filtros de 520-550 nm, el TXR 594 fue procesado a 543 nm y la luz emitida con los filtros de 650nm. Las imágenes fueron adquiridas por separado empleando monitores a color, mostrando el color verde, para FITC, rojo para TxR y amarillo para la colocalización. La colocalización fue analizada empleando los sistemas de análisis IMARIS 6.0 BITPLANE e IMAGE PRO Media

cybernetics y la colocalización de EPCR y PAR-1 se determinó como la intensidad relativa de fluorescencia de ambos fluorocromos.

5.8 Ensayos de actividad de PCA en la superficie de HUVEC

La actividad de la PC se evaluó utilizando monocapas confluentes de HUVEC (1×10^5 células/pozo) en cajas de cultivo de 24 pozos. Los cultivos fueron incubados con distintas dosis (0.01, 0.1 y 1.0 ufp) de los aislados virales (clásico y hemorrágico) durante 48 horas, paralelamente se utilizaron monocapas confluentes de HUVEC tratadas con 10 ng/ml de TNF- α a 37 °C, y 5% de CO₂, ya que es conocido que el TNF- α favorece la disminución de la TM en la superficie de las células endoteliales (83). Posteriormente, las células fueron lavadas tres veces con amortiguador A y después se agregaron 100 μ l del mismo amortiguador que contenía 1.5U/ml de trombina humana, 150 nmol/l de la proteína C humana (Sigma, EU) y 5 mM de CaCl₂ (Sigma, EU) se incubaron los cultivos durante 2 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se tomaron 50 μ l del sobrenadante al cual añadimos 450 μ l del sustrato cromogénico de proteína C activada (S2266, 2 mmol/L, Chromogenix) y 2.5 U/ml de hirudina, Sigma,EU).

Finalmente, la reacción se detuvo después de 30 minutos añadiendo 200 μ l de ácido acético al 50% (vol/vol) y la actividad amidolítica de la proteína C generada fue leída a 405 nm con ayuda de un espectrofotómetro. La actividad de Proteína C Activada se midió en unidades arbitrarias. Este ensayo se esquematiza en la siguiente figura



Modelo empleado para medir la actividad de PC. El endotelio vascular participa de forma determinante a través de la TM, la cual forma el complejo TM-TB que activa a zimógeno de la proteína C a proteína C Activa. Finalmente actividad amidolítica de PCA es medida empleando el sustrato específico para PCA.

5.9 Ensayos de Western- blot

Tanto las células control (sin infectar) como las monocapas infectadas con el virus del dengue fueron lisadas por adición de buffer de lisis frío durante 10 minutos (50mM de Tris-HCL, pH 7.4, 150 mM de NaCl, 1mM de EGTA, 0.25% de deoxicolato de sodio, 1 mM de Na_3VO_4 , 1 mM de NaF, 1% de Tritón X-100 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de aprotinina, leupeptina y pepstatina) (Sigma EU). Posteriormente las muestras se colectaron y centrifugaron a 4 °C a 14000 g por 3 minutos, se resuspendieron las muestras en buffer de muestra 2X; estas muestras se hirvieron durante 10 minutos a 100 °C y se analizaron mediante electroforesis en un gel SDS-PAGE al 10%. Las proteínas se transfirieron (durante 3.5 horas) a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm (BIO-RAD, EU) y se bloquearon los sitios inespecíficos con solución de bloqueo [Tris-buffer salino-Tween 20 (TBST): 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05% de Tween 20 (vol/vol)] que contiene 5% de leche en polvo sin grasa o 5% de albúmina sérica bovina durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las membranas con TBST (cuatro veces por 10 minutos), se incubaron en una solución 1:1000 del anticuerpo primario durante

toda la noche a 4 °C o por 2 horas a temperatura ambiente (anti-TM) (Santa Cruz, Biotechnology, EU). El anticuerpo unido lo detectamos con ayuda de un anticuerpo policlonal secundario conjugado con peroxidasa y (ZYMED, Laboratories, EU) diluido 1:2000 en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron lavadas y las proteínas se detectaron usando ECL (Amersham Pharmacia Biotech, EU).

Para determinar si la infección por el VD puede favorecer la inducción de la fosforilación de MAPK's (ERK 1/2); se infectaron monocapas confluentes de HUVEC con una dosis infecciosa (MOI) de 1.0 ufp del virus durante diferentes tiempos. Empleamos extractos totales de las proteínas celulares, las cuales fueron resueltas en geles al 10% de SDS-PAGE, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa siguiendo el procedimiento antes mencionado. Las membranas se incubaron con un anticuerpo monoclonal (SANTA CRUZ) anti-p-ERK empleando una dilución de 1:1000. Posteriormente a estos experimentos, llevamos a cabo ensayos de inhibición de la fosforilación de ERK, para lo cual antes de infectar con los diferentes aislados virales, se incubaron las monocapas celulares con el inhibidor específico de la fosforilación de ERK (PD09859 10 mM) durante diferentes tiempos (1, 4 y 6 horas).

5.10 Determinación de IL-8 mediante ELISA

Determinamos los niveles de IL-8 a partir del sobrenadante de cultivos de HUVEC infectadas con los diferentes aislados del VD a diferentes dosis infecciosas (1.0, 0.1 y 0.01) mediante ELISA. Las condiciones del ensayo fueron optimizadas mediante la titulación del anticuerpo recombinante humano para IL-8 (rh IL-8). El método de ELISA fue modificado del procedimiento descrito por Kittigul y col (84). Brevemente, una placa de microtitulación (Nunc Inter Med, Roskilde, Demark) fue cubierta con 100 µl del anticuerpo monoclonal anti-IL-8 (R&D Systems, Inc. EU) a una concentración de 10 µg/ml en buffer de bicarbonatos a pH de 9.6 incubando a 4⁰C durante toda la noche. Posteriormente lavamos la placa con PBS-Tween

(PBST) al 0.05%, pH 7.4. Los sitios de unión no específicos de la placa fueron bloqueados añadiendo 200 μ l de una solución de BSA-PBS al 1% por 2 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, lavamos la placa cuatro veces con PBST. Después de estos lavados se añadieron 100 μ l de la proteína rh-IL-8 (R&D Systems, Inc. EU) y los sobrenadantes de cultivo de células infectadas con los denguevirus (clásico y hemorrágico), los sobrenadantes de los cultivos estimulados con 10 ng/ml de TNF- α y los sobrenadantes de las células preincubadas con el inhibidor de ERK (PD98059). Incubamos las placas durante 1.5 horas a 37 $^{\circ}$ C, realizando cuatro lavados, añadiendo posteriormente 100 μ l/pozo de anticuerpo anti-IL-8 biotinilado (R&D Systems, Inc. EU) a una concentración de 5 μ g/ml e incubamos la placa durante 1.5 horas a 37 $^{\circ}$ C lavando nuevamente la placa. Después añadimos 100 μ l/pozo de streptavidina-peroxidasa (Sigma, EU) diluida 1:5000 a cada pozo e incubamos 1 hora a 37 $^{\circ}$ C. Finalmente, lavamos la placa y adicionamos 100 μ l del sustrato tetrametil benzidina (Sigma, EU) para permitir el desarrollo del color durante 15 minutos; la reacción fue detenida por la adición de 50 μ l/pozo de ácido sulfúrico 0.05 M. La densidad óptica se determinó con ayuda de un lector de ELISA (Thermolab system, EU) a 490 nm.

6. RESULTADOS

6.1 Ensayos de titulación mediante placa lítica

El título viral se determinó por el ensayo en placa lítica en células LLC-MK2. Utilizamos diferentes concentraciones de metil celulosa (MC), iniciamos con 1% pero no fue posible observar placas líticas ya que la fluidez del medio de cultivo a esta concentración, no lo permitió. Después de evaluar concentraciones crecientes de metil celulosa, se lograron obtener placas líticas utilizando 2%, de MC observando placas claramente formadas hasta la dilución de 10^{-7} . Así mismo, esta técnica nos permitió observar diferencias en el tamaño de la placa que forma cada aislado viral, siendo más grandes las producidas por el aislado hemorrágico (Figura12).

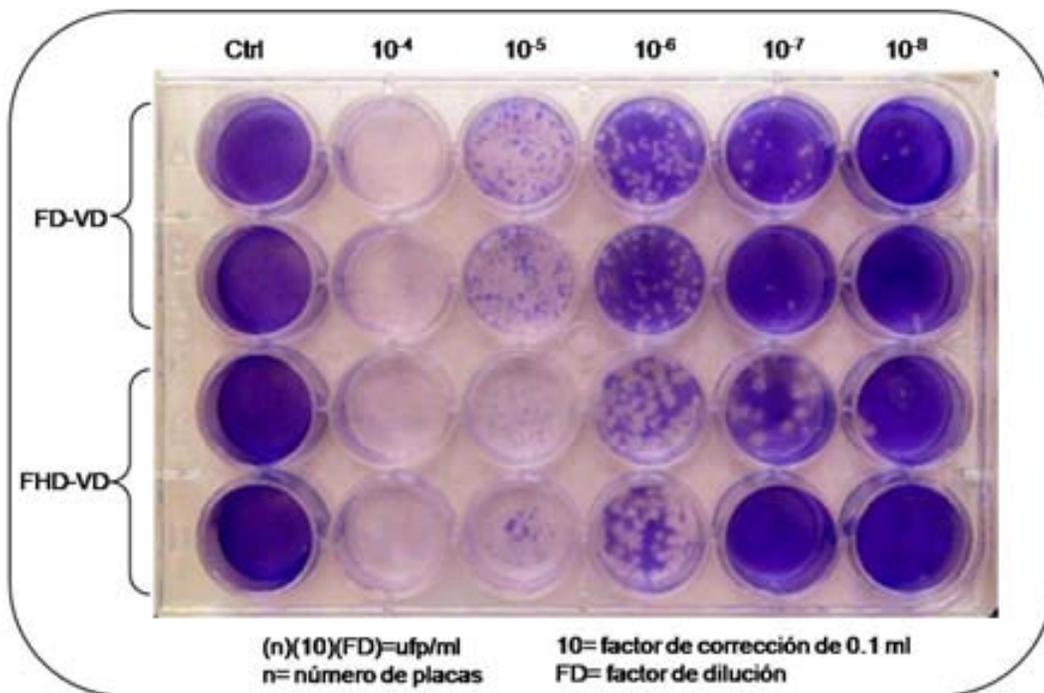


Figura 12. Ensayo en placa lítica de FHD-VD y FD-VD en LLC-MK2. La generación de placas líticas en diferentes diluciones del virus del dengue permite calcular el número de partículas virales activas y determinar la dosis infecciosa correspondiente a un determinado volumen de inoculo viral.

6.2 Establecimiento del cultivo primario de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC)

Para poder realizar todos los experimentos del presente trabajo establecimos el cultivo primario de HUVEC a partir de cordones umbilicales humanos. Las monocapas utilizadas en

nuestros experimentos fueron las correspondientes al tercer pase para asegurarnos de tener un monocultivo de células endoteliales. Después del tercer pase observamos una monocapa con la morfología característica del endotelio vascular. Cada experimento requirió de estas células ya que por ser cultivo primario se aislaron y propagaron continuamente células nuevas. La figura 13 muestra imágenes a diferentes aumentos de las HUVEC aisladas y propagadas hasta el tercer pase y se observan monocapas celulares homogéneas.

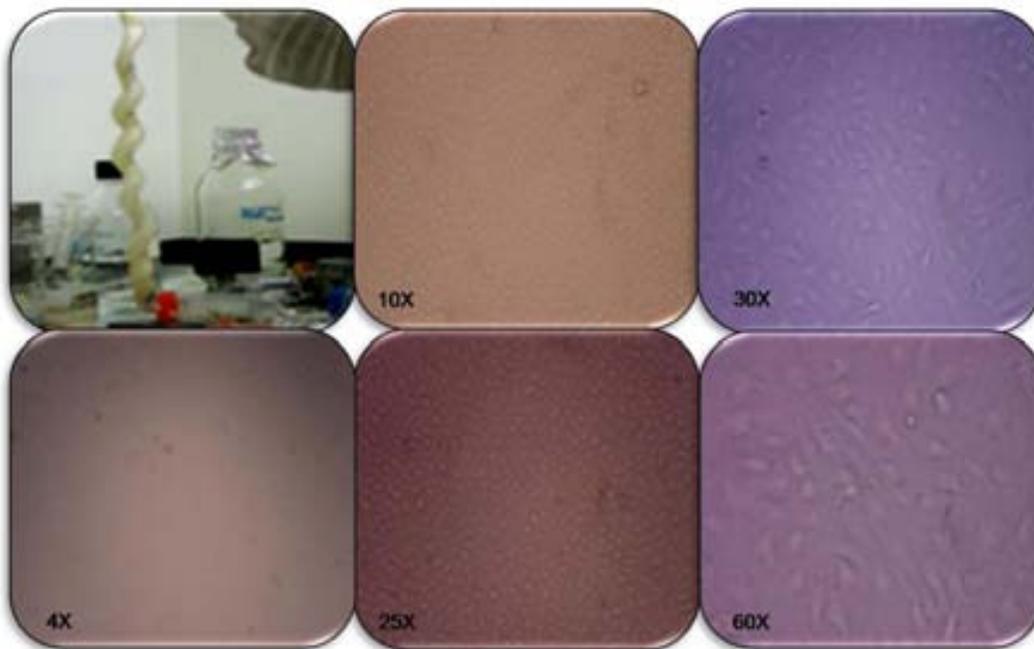


Figura 13. HUVEC del tercer pase, aisladas a partir de cordones umbilicales humanos morfología típica de endotelio vascular. Se considera que después del tercer pase el cultivo puede estar homogéneo.

6.3 Disminución de TM en la membrana de HUVEC infectadas con los diferentes aislados del virus del Dengue

Para determinar si la infección de las HUVEC por el virus del dengue puede modificar la expresión de TM en la superficie de la membrana del endotelio vascular, llevamos a cabo la detección de esta molécula mediante citometría de flujo en cultivos de HUVEC infectados durante 48 horas empleando distintas dosis infecciosas (0.01, 0.1 y 1.0 ufp) tanto del aislado clásico como del aislado hemorrágico. Para cada condición se cuantificaron cien mil eventos y la presencia de TM fue asociada con la intensidad de fluorescencia media (IFM). Como control

positivo de la disminución de TM, se utilizaron cultivos celulares estimulados con TNF- α (10 ng/ml) ya que esta citocina induce la liberación de la TM.

En la figura 14 se observa la disminución en la expresión de la TM en la superficie celular en un 85% cuando las HUVEC fueron infectadas con el aislado hemorrágico a una MOI=1.0 y que esta disminución fue aún más grande que el obtenido en presencia del TNF- α (35%; Figura 14 B y 14 D, barra verde). En los cultivos infectados con el aislado clásico, (Figura 14 C y 14 D, barra rosa) se observó una reducción de la TM en un 28% a la dosis infecciosa más alta (MOI=1.0). Así mismo, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en HUVEC infectadas durante 48 horas con ambas cepas virales a una MOI=1.0 y se observó que la TM disminuyó de forma más evidente en las células infectadas con el aislado hemorrágico (Figura 14 E, panel 3) comparadas con las células no infectadas; (control negativo) (Figura 14 E, panel 1). El aislado clásico mostró un efecto similar a las células no infectadas (Figura 14 E, panel 4). Estos resultados fueron congruentes con los ensayos de citometría y nos puede indicar que los ensayos de inmunohistoquímica pueden ser muy sensibles para detectar a la TM.

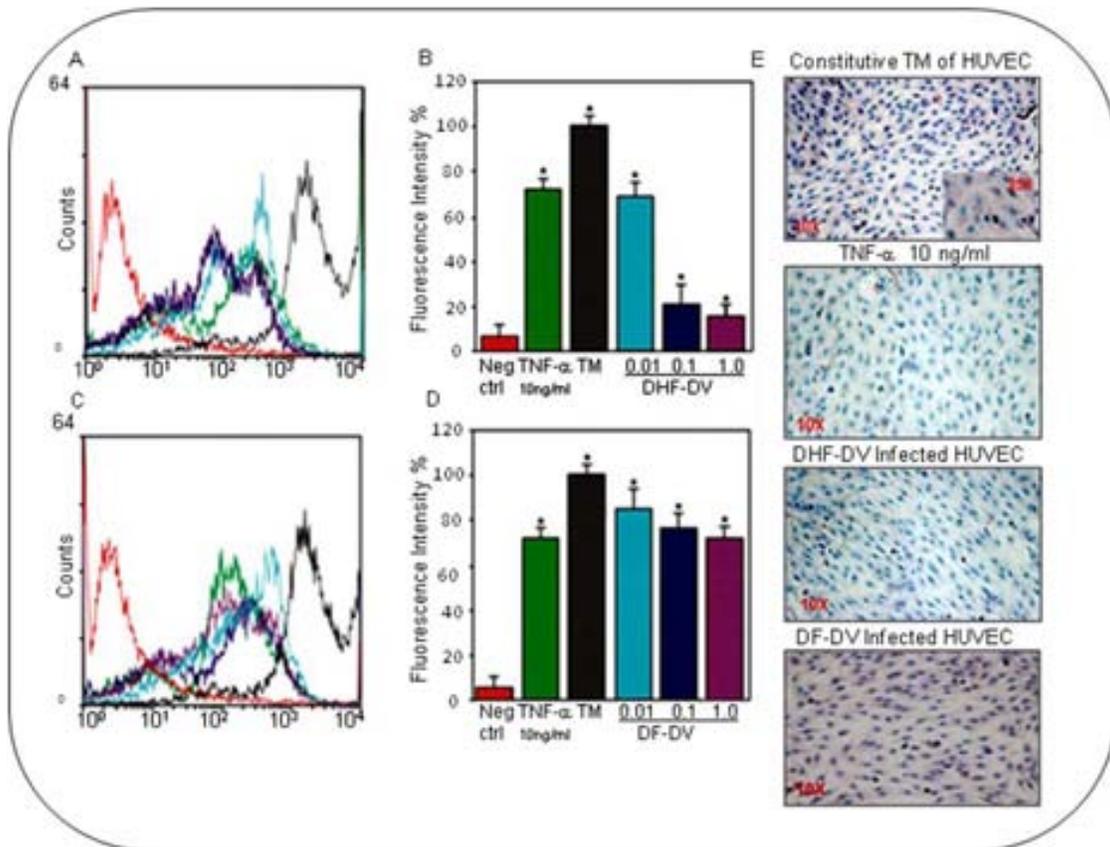


Figura 14. Detección la Trombomodulina durante la infección de HUVEC por el virus del dengue. A-D Determinación de la TM constitutiva en HUVEC mediante citometría de flujo. Los histogramas (A) y las barras (B) corresponden a los siguientes tratamientos: control negativo (rojo); control positivo (verde); HUVEC estimulados con 10 ng/ml TNF- α ; células no infectadas (negro); HUVEC infectadas con FHD-VD a una MOI=0.01 (azul), a una MOI=0.1 (morado) y a una MOI= 1.0 (rosa). Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes, * indica el valor de p cuando las muestras en presencia del virus del dengue fueron comparadas con células no infectadas ($p < 0.05$)

Para demostrar que la disminución de TM no es resultado de la muerte celular, realizamos ensayos de viabilidad celular mediante la tinción de HUVEC con azul de tripan a las 48 h de infección en presencia de ambos aislados virales (MOI= 1.0, 0.1 y 0.01). Estos ensayos demostraron que la viabilidad celular se mantuvo alrededor de 90-96% en todas las muestras (Figura 15), demostrando que el efecto de la disminución de TM no se debe a algún efecto citotóxico inducido por la infección de los DV.

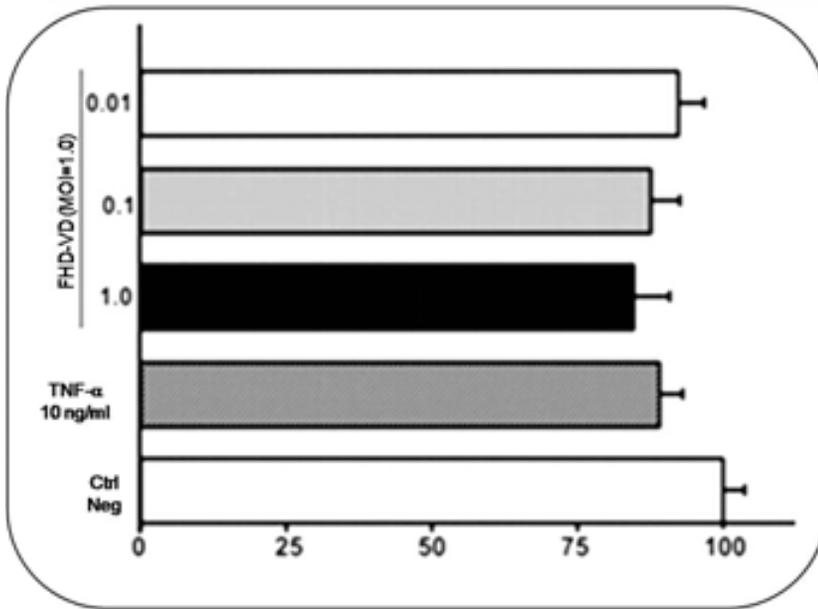


Figura 15. Ensayos de viabilidad con azul de tripan en células HUVEC. Las células endoteliales fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α (barra gris) y células infectadas con FHD-VD empleando una MOI= 0.01, 0.1 y 1.0. la barra abierta muestran la viabilidad de las células HUVC no infectadas.

6.4 Evaluación de la liberación de TM y colocación de EPCR y PAR-1

Los resultados anteriores nos permitieron demostrar que la infección de células endoteliales por los DV favorece una disminución de la TM en la membrana celular pero no permiten saber que sucede con esta proteína. Por esta razón nos propusimos evaluar la posible liberación de TM de sobrenadante de células infectadas (MOI=1.0) durante diferentes tiempos (6, 12, 24 y 48 h p.i.). Por lo que se evaluó las proteínas presentes tanto en los sobrenadantes como en extractos de proteínas de membrana de las mismas células mediante ensayos de Western blot. La forma constitutiva de la TM fue detectada en la membrana células no infectadas (Figura 16 A, carril 1), observamos que la presencia de esta proteína fue decreciendo gradualmente de forma proporcional al tiempo de infección (Figura 16 A, carriles 2-5). No logramos detectar TM libre en el sobrenadante de HUVEC no infectadas (Figura 16 A, carril 6). Sin embargo cuando se analizaron los sobrenadantes de HUVEC infectadas durante 36 y 48 h, se detectó la presencia de TM en los sobrenadantes (Figura 16 B, carril 2 y 3). No se detectó TM en los sobrenadantes de las células no infectadas (Figura 16 B, carril 1).

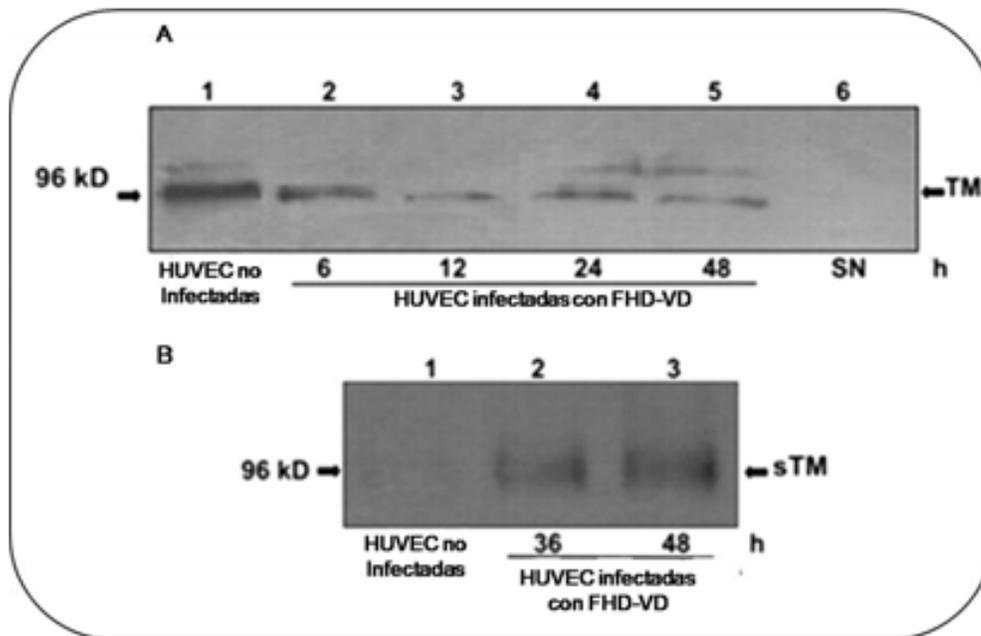


Figura 16. Identificación de Trombomodulina en cultivos de HUVEC por ensayos de Western blot. **A)** carril 1, TM de células no infectadas. Carriles 2-5, HUVEC infectadas con FHD-VD a una MOI=1.0 durante 6, 12, 24 y 48 horas respectivamente. El carril 6 muestra la ausencia de TM en el sobrenadante (SN) de HUVEC sin infectar. **B)** Presencia de TM en los SN de HUVEC infectadas durante 36 y 48 horas (carriles 2 y 3). El carril 1 muestra la ausencia de TM en SN de HUVEC no infectadas.

Así mismo, se evaluó la presencia de PAR-1 y EPCR en células HUVEC infectadas con cada aislado viral. Observamos mediante ensayos de inmunolocalización (empleando doble marcaje y microscopía confocal) que EPCR y PAR-1 colocalizan durante la infección viral como lo muestra la intensidad de fluorescencia (Figura 17, I-J, L.M) a nivel de la superficie de las células endoteliales (Figura 17, H-P). La intensidad de fluorescencia relativa más alta se observó en presencia del FHD-VD.

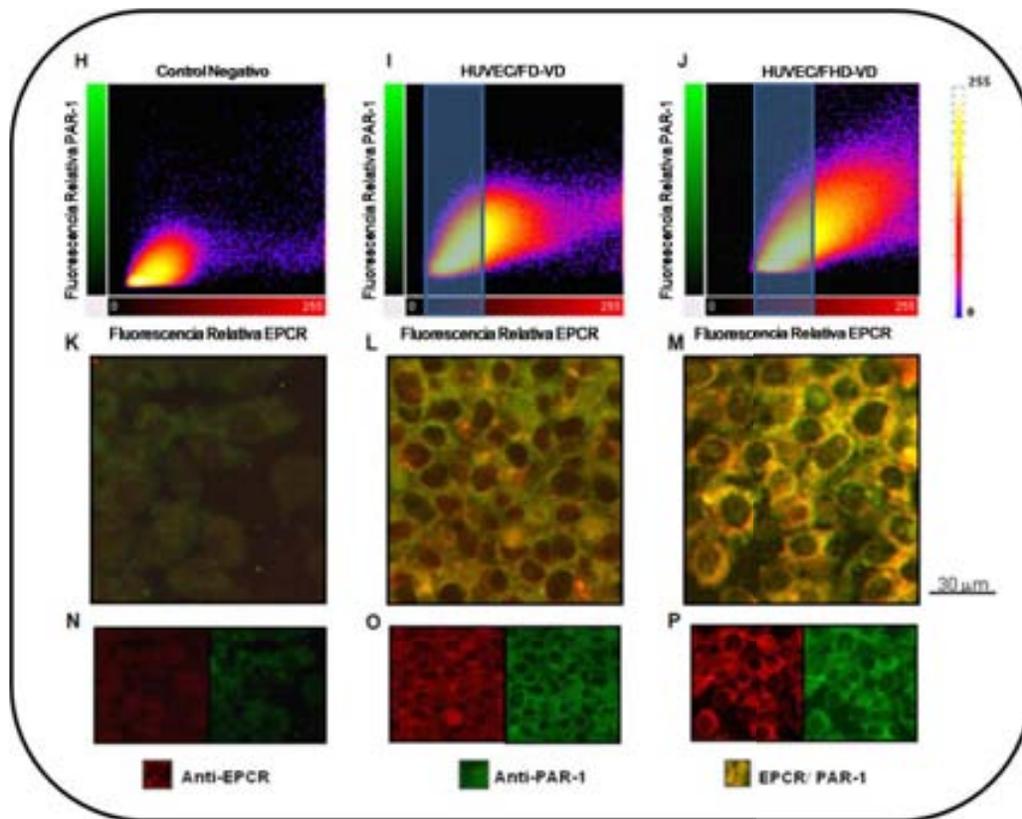


Figura 17. Colocalización de EPCR y PAR-1 por microscopia confocal. La colocalización de EPCR y PAR-1 es representada por la zona amarilla de los histogramas. El panel H muestra las células no infectadas. El panel I muestra la colocalización en HUVEC infectadas con FHD-VD. El panel J indica la colocalización de EPCR y PAR-1 de células infectadas con FD-VD. Los paneles K-P muestran la colocalización de PAR-1 y EPCR por inmunotinción. El panel K, HUVEC no infectadas. Panel L, indica la inmunolocalización de PAR-1/EPCR en células infectadas con FD-VD. Panel M, indica la inmunolocalización de PAR-1/EPCR en células infectadas con FHD-VD. Los paneles N-P, indican las inmunotinciones por separado de PAR-1 y EPCR. Los valores de intensidad de fluorescencia son arbitrarias ($p < 0.005$).

6.5 Actividad de PCA en HUVEC infectadas con VD

Con el propósito de evaluar el efecto de la disminución de TM en la activación de la proteína C, se realizaron ensayos de actividad de PCA utilizando monocapas de HUVEC infectadas con los diferentes VD así como en presencia de $\text{TNF-}\alpha$ (control positivo). Después de 48 h de infección, la actividad amidolítica de la PC en presencia del aislado hemorrágico, fue la más evidente ya que disminuyó en un 70% (Figura 18, barra E) con respecto a las células HUVEC no infectadas (control positivo), las cuales fueron consideradas como el 100% de actividad de PCA (Figura 18, barra A).

La actividad amidolítica de la PCA en las células infectadas con el FD-VD a la misma dosis infecciosa (MOI=1.0) produjo una reducción de aproximadamente del 40% con respecto al control positivo (Figura 18, barra H). En las células que fueron tratadas con TNF- α (control negativo) observamos una disminución de la actividad amidolítica del 30% aproximadamente (Figura 18, barra B). Los cultivos infectados con el FHD-VD a una MOI= 0.1 y 0.01 presentaron una disminución en la actividad de PCA aun mayor que en los cultivos tratados con TNF- α (Figura 18 barras C y D) mientras que las células infectadas con FD-VD no mostraron este efecto (Figura 18, barras F y G). Estos resultados nos sugirieron que la infección por los dengue virus posiblemente afecte la formación del complejo TM-TB-PC generando una menor activación de PC, principalmente en HUVEC infectadas con el aislado

hemorrágico

resultado de de

disminución de

como
la
TM.

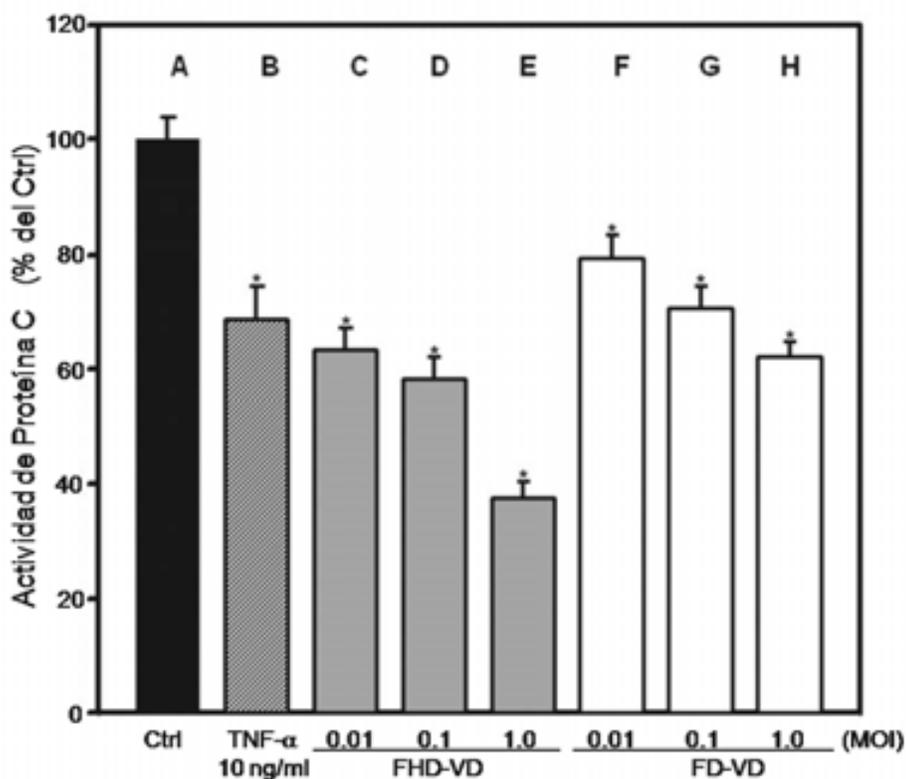


Figura 18. Ensayos de actividad amidolítica durante la infección de HUVEC por el virus del dengue. A) Células endoteliales sin infectar (control positivo). B) HUVEC estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α . C, D y E; HUVEC infectadas con diferentes MOI (0.01, 0.1 y 1.0) de FHD-VD. Las barras F, G y H indican la actividad de PCA de HUVEC infectadas con FD-VD a una MOI de 0.01, 0.1 y 1.0 respectivamente. Los valores mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes. * indican el valor de p ($p < 0.05$) cuando las muestras en presencia del virus del dengue fueron comparadas con cultivos sin infectar.

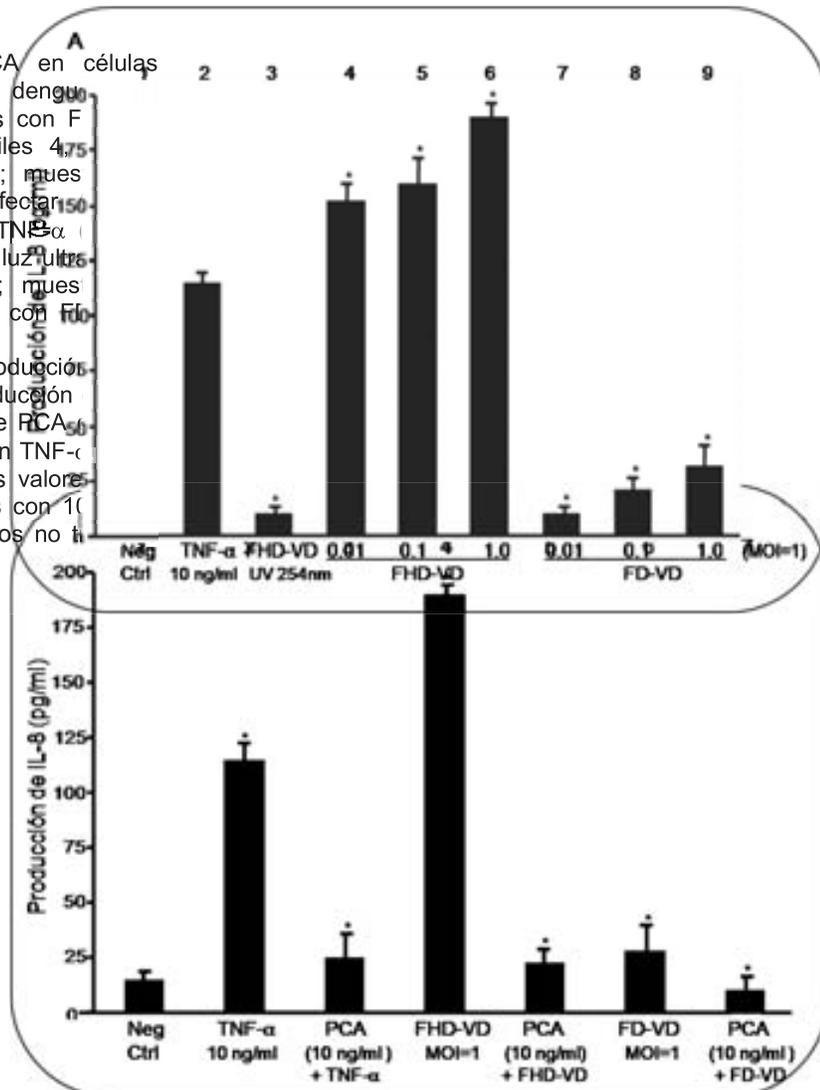
6.6 Efecto anti-inflamatorio de PCA en HUVEC infectadas con FHD-VD y FD-VD

Se ha establecido que independientemente de su función en la cascada de coagulación, la PCA tiene efectos citoprotectores mediante el bloqueo de la traslación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B y con esto favorecer la inhibición de la producción de quimiocinas proinflamatorias como IL-8 (71). Con base en lo anterior, evaluamos la producción de esta quimiocina, por lo que determinamos la producción de IL-8 por ensayos de ELISA en los sobrenadantes de HUVEC infectadas con ambos aislados virales, observando que después de 48 h de infección, el FHD-VD favoreció la producción de IL-8 en concentraciones altas para todas las dosis infecciosas utilizadas; siendo la más significativa la MOI=1.0, la cual fue de 190 pg/ml; mientras que para la MOI=0.1 y 0.01 fueron de 160 y 150 pg/ml respectivamente (Figura 19 A, barra 6, 5 y 4) con respecto al control de células no infectadas (Figura 19 A, barra 1).

El FD-VD también favoreció la producción de IL-8 pero en concentraciones más bajas que la obtenida con 10 ng/ml de TNF- α (control positivo), la cual fue de 115.61 pg/ml mientras que para la MOI= 1.0 solo fue de 28.33 pg/ml (Figura 19 A, barras 2 y 9). Una vez establecido el ensayo de la producción de IL-8 en nuestro modelo, nos preguntamos si la presencia de la PCA se podría modificar la producción de esta quimiocina, por lo que llevamos a cabo ensayos de ELISA (para IL-8) en células preincubadas con PCA recombinante (10 ng/ml) durante 48 h y después infectadas con FHD-VD y FD-VD a una MOI=1.0.

El efecto citoprotector de PCA que observamos para ambos aislados se muestran en la figura 19. La producción de IL-8 de HUVEC infectadas con FHD-VD se redujo hasta en un 90% con respecto a las HUVEC infectadas con este aislado pero en ausencia de PCA (Figura 19 B, barra 6 y 5). Este mismo efecto se observó tanto en las células tratadas con 10 ng/ml de TNF- α (Figura 19 B, barra 3 y 2) como en las HUVEC infectadas con el FD-VD (Figura 19 B, barra 7 y 6).

Figura 19. Efecto citoprotectivo de PCA en células endoteliales infectadas con el virus del dengue. **A)** Producción de IL-8 en HUVEC infectadas con FHD-VD con una MOI de 0.01, 0.1 y 1.0 (carriles 4, 5 y 6 respectivamente). Los carriles 1, 2 y 3; muestran producción de IL-8 en HUVEC sin infectar (negativo), estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α (positivo) y tratadas con VD inactivado por luz ultravioleta respectivamente. Los carriles 7, 8 y 9; muestran producción de IL-8 de HUVEC infectadas con FHD-VD con una MOI= 0.01, 0.1 y 1.0 respectivamente. **B)** Efecto citoprotectivo de PCA sobre la producción de IL-8. Los carriles 3, 5, 6 y 7, muestran la producción de HUVEC pre-incubadas con 10 ng/ml de PCA dos horas y posteriormente estimuladas con TNF- α y VD y FD-VD respectivamente. * indica los valores (p<0.05) cuando las células pre-incubadas con PCA de PCA fueron comparadas con los cultivos no tratados con PCA.



El mecanismo molecular asociado a la inducción de la producción de IL-8 durante la infección del virus dengue aún no se conoce, sin embargo, para otros virus hemorrágicos como Ebola y Bluetongue, así como durante el choque séptico, se ha sugerido la participación de MAPK's (ERK 1/2) en la producción de IL-8 (85). Nosotros evaluamos la participación del

virus dengue también en la activación de esta vía, durante la producción de IL-8, por lo que llevamos a cabo ensayos de Western-blot y ELISA. Los resultados obtenidos muestran que la infección de HUVEC por el FHD-VD a una MOI=1.0 indujo la fosforilación de ERK 1/2 desde los primeros 5 minutos de interacción, continuando de forma gradual hasta los 90 minutos; después de 180 minutos la fosforilación de ERK 1/2 comenzó a disminuir (Figura 20 A). También se determinó la presencia de la forma constitutiva de ERK (Figura 20 B).

Para determinar si la fosforilación de esta cinasa está involucrada en la producción de IL-8, se realizaron ensayos de ELISA en sobrenadantes de HUVEC infectados con FHD-VD preincubadas con PD98059 (inhibidor de la fosforilación de ERK) durante 1, 4 y 6 h y posteriormente a la infección con el VD durante 48 h y observamos que la producción de IL-8 fue solo de 39 pg/ml en los sobrenadantes preincubadas por 6 h comparadas con los sobrenadantes de HUVEC sin PD98059 las cuales produjeron 190 pg/ml (Figura 20 C).

El efecto de PD98059 también lo observamos en la fosforilación de ERK 1/2 como se muestra en el recuadro de la Figura 19, en la que se observa que cuando preincubamos con

PD98059 la fosforilación de ERK 1/2 fue menor que este I y II cuando no se utilizó inhibidor (recuadro respectivamente)

fosforilación menor que este I y II

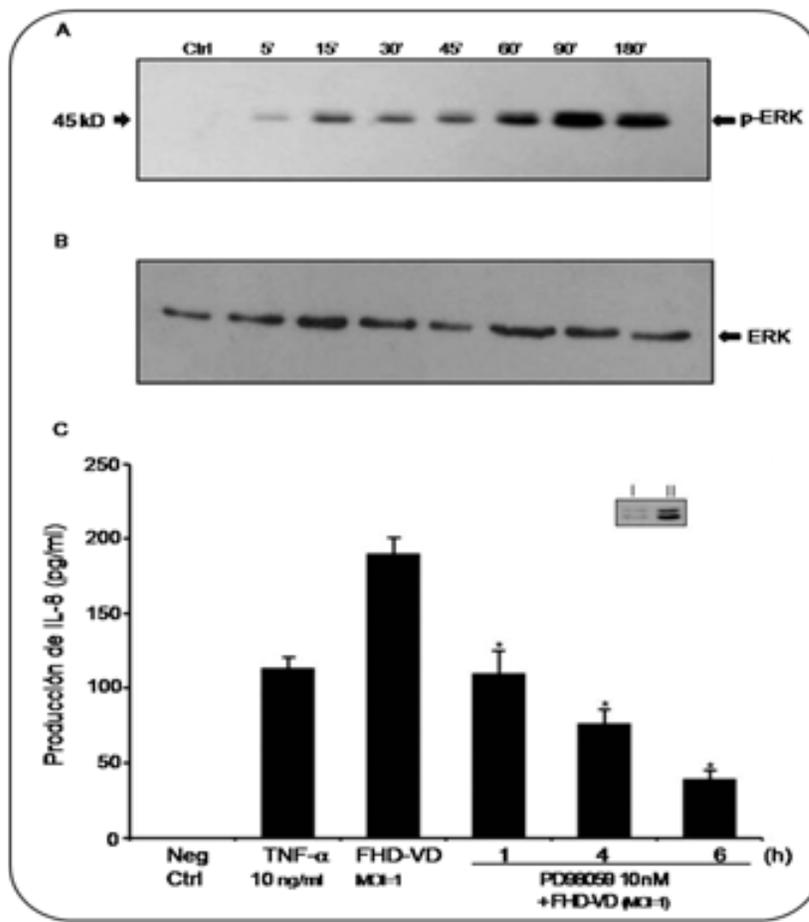


Figura 20. Fosforilación de MAPK (ERK 1/2) en HUVEC infectadas con el virus del dengue. **A)** Fosforilación de ERK 1/2 fue detectada mediante ensayos de Western blot en presencia de FHD-VD durante los primeros 5 minutos y gradualmente la fosforilación se incrementa con respecto al tiempo de interacción con el virus del dengue. La máxima fosforilación de ERK fue obtenida a los 90 minutos y a los 180 minutos disminuye. **B)** ERK constitutiva **C)** Efecto del inhibidor de ERK (PD98059) sobre la producción de IL-8 en HUVEC pre-incubadas durante 1, 4 y 6 horas con PD98059 y posteriormente infectadas con FHD-VD a una MOI= 1.0, se observa en estas células la disminución de IL-8; mientras que las HUVEC no tratadas con el inhibidor de ERK, mantiene la producción de IL-8. El recuadro muestra el efecto de PD98059 en la fosforilación de ERK (I) y ERK sin inhibidor (II). * indica el valor de p cuando las muestras en presencia de PD98059 fueron comparadas con células infectadas con FHD-VD en ausencia del inhibidor de ERK.

Además de la cinasa ERK, también evaluamos la posible participación de p38 durante la infección del VD ya que la activación de esta cinasa se ha asociado con la producción de quimiocinas inflamatorias como IL-8 por lo que llevamos a cabo ensayos de Western-blot de proteínas de cultivos celulares endoteliales infectadas con FHD-VD (MOI=1.0) y estimuladas con IL-8 (10ng/ml) recombinante. Observamos que el control positivo estimulado con TNF- α , induce la fosforilación de p38 de forma similar al observado por la estimulación de FHD-VD e IL-8 recombinante después de 30 minutos (Figura 21 A, carriles 2, 3 y 4). Para evaluar de forma específica estos hallazgos, empleamos 10 μ M del inhibidor de la fosforilación de p38 (SB203580) y observamos una clara disminución en la fosforilación de p38 para ambos tratamientos claramente (Figura 21 A, carriles 5 y 6).

Previamente se ha reportado que PCA ejerce su función anti-inflamatoria a través de la activación de los receptores activados por proteasas (PAR), los cuales a su vez activan diferentes genes citoprotectores involucrando la fosforilación de ERK 1/2. Para establecer una posible vía de señalización que nos permitiera relacionar la producción de IL-8 con el papel citoprotector (anti-inflamatorio) de PCA, realizamos ensayos de Western-blot primero para

establecer la participación de ERK por PCA a través de PAR-1 y posteriormente mediante ensayos de ELISA para IL-8 asociando la participación de PAR-1.

Encontramos que ERK 1/2 es fosforilada por PCA recombinante (Figura 21 B, carril 2) y al parecer involucra la participación de PAR-1 ya que cuando pre-incubamos las células con un anticuerpo anti-PAR-1 la fosforilación disminuye considerablemente (Figura 21 B, carril 6). Este mismo efecto lo observamos cuando infectamos con FHD-DV lo que nos indica que el VD pueda favorecer la activación de PAR-1 por algún mecanismo similar al de PCA (Figura 21 B, carril 5). La producción de IL-8 disminuyó considerablemente en los sobrenadantes de HUVEC pre-incubadas con el anticuerpo anti-PAR-1 y después infectado con ambos aislados (Figura 21 C, barra 4 y 6) comparados con los que no fueron tratados con el anticuerpo anti-PAR-1 (Figura 21 C, barras 3 y 5) los cuales mantuvieron los niveles de IL-8 producidos en los experimentos anteriores.

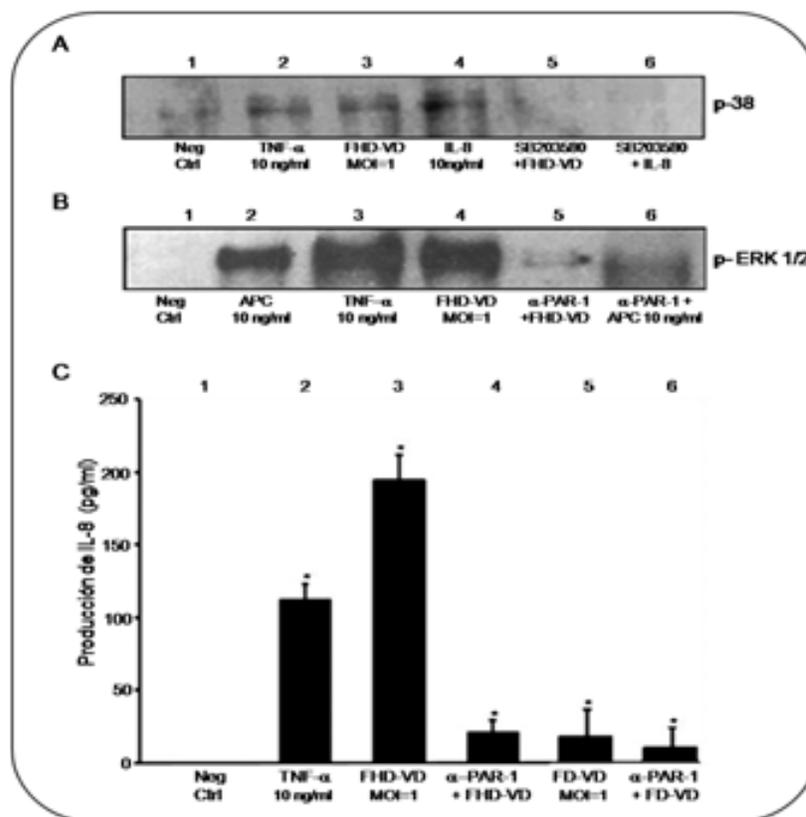


Figure 21. Efecto de MAPKs (p38 y ERK 1/2) inflamatoria de células presencia de virus del Activación de p38 durante células del endotelio 3), en presencia de TNF-IL-8 (carril 4). Evaluamos de estos resultados en paralelo empleando el específico de p-38 (carriles 5 y 6). **B)** Activación de MAPK's ERK 1/2 en HUVEC pre-tratadas con 10 ng/ml de PCA (carril 2), ERK 1/2 en células infectadas con FHD-VI (carril 4) y en presencia de TNF-α. La fosforilación de ERK 1/2 disminuyó cuando las

PCA, PAR-1 y en la respuesta endoteliales en dengue. **A)** la infección de vascular (carril α (carril 2) y con la especificidad ensayos en inhibidor (SB203580)

HUVEC fueron pre-incubadas con el anticuerpo específico para PAR-1 (carriles 5 y 6). Estos resultados son representativos de una serie de tres experimentos independientes. **C)** Producción de IL-8 en cultivos infectados con FHD-VD pre-incubados con anti-PAR-1. La figura 5C muestran el promedio de experimentos independientes realizados por triplicado. El anti-PAR-1 inhibe la producción de IL-8 en HUVEC infectadas con FHD-VD y FD-VD (carriles 4 y 6) comparados con cultivos sin anti-PAR-1. *, indica el valor de p ($p < 0.05$) de las células infectadas con VD pero en ausencia de anti-PAR-1.

6.7 Participación de PCA, MAPK's (ERK 1/2 y p38) en la permeabilidad del endotelio vascular infectado por el virus del dengue

La principal característica clínica durante el FHD/SCD es el aumento de la permeabilidad del endotelio vascular, sin embargo los mecanismos que participan en la instalación de ésta no están descritos. Se ha propuesto que durante el aumento de la permeabilidad vascular inducida por la infección del virus de Ebola en macacos, la participación de p38 es determinante ya que favorecen el rearrreglo del citoesqueleto de actina (85, 86).

Tomando en cuenta estos datos, nosotros evaluamos la participación de PCA, ERK 1/2 y p38 MAPK's en la función de barrera del endotelio vascular durante la infección del endotelio vascular con ambos aislados virales (MOI=1.0), empleando un kit de permeabilidad vascular (Chemicon), como lo indicamos en la metodología. Las células no infectadas fueron consideradas como control positivo de integridad celular, (Figura 22, barra B). Se predeterminaron algunos pozos en los cuales no sembramos células de modo que se consideró como el 100% de permeabilidad vascular ya que no existe barrera celular, permitiendo el paso de la molécula permeable (FITC-dextran) como se muestra en la figura 22, barra A.

Las células infectadas con FHD-VD mostraron un incremento notable en la permeabilidad vascular (Figura 22, barra F) de manera similar a las HUVEC estimuladas con $TNF-\alpha$, control

positivo de permeabilidad, o en presencia de IL-8 (Figura 22, barras C y D). Cuando infectamos las células con FD-VD, observamos que la permeabilidad vascular fue similar al control de integridad celular (Figura 22, barra H). Los cultivos celulares pre-incubados tanto con 10 ng/mL de PCA como con los inhibidores de MAPK's p38 y ERK 1/2 (SB203885 y PD98059 respectivamente) y que posteriormente fueron infectados con FHD-VD y FD-VD mostraron un efecto de disminución en la permeabilidad vascular (Figura 22, barras I, J y K) con respecto a las células no tratadas con estos inhibidores (F,G y H).

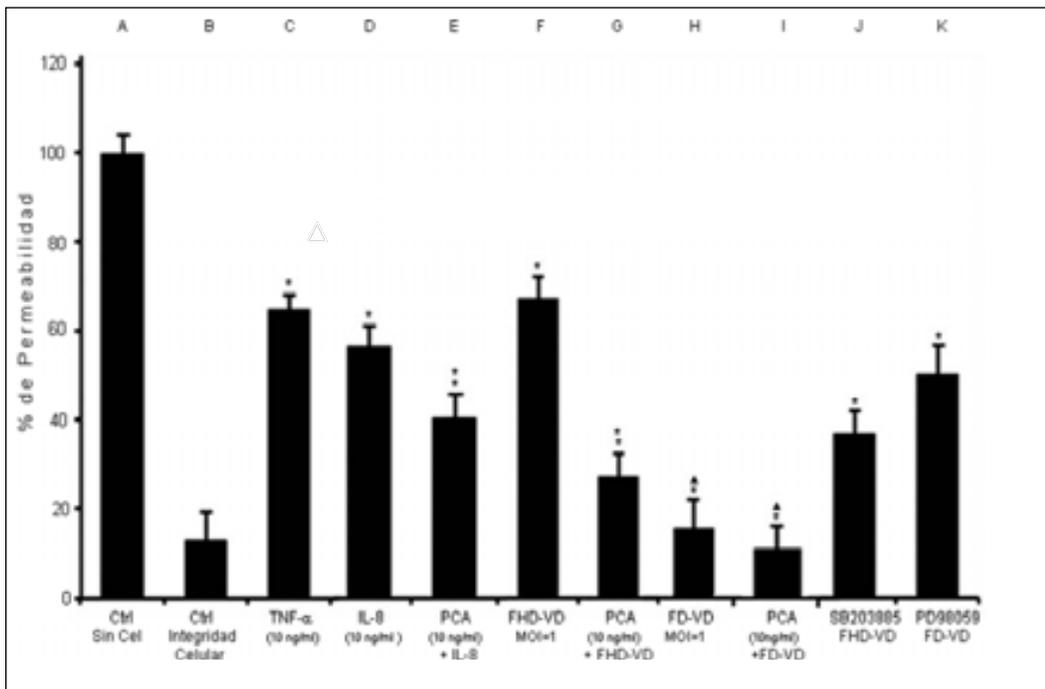


Figura 22. Ensayos de permeabilidad vascular. Participación PCA y de MAPK's (ERK 1/2 y p38) en la función de barrera endotelial durante la infección de HUVEC con VD. **B)** muestra las HUVEC en presencia de medio de cultivo y representa la integridad de la monocapa celular. **A)** insertos de la caja de cultivo sin células y representa el 100% de permeabilidad vascular. Permeabilidad vascular de HUVEC en presencia de: TNF- α (C), IL-8 (D), PCA+IL-8 (barra E), FHD-VD MOI=1.0 (barra F), PCA+FHD-VD (barra G), FD-VD (barra H), PCA+FD-VDB (barra I), SB203885+FHD-VD (barra J) y PD09859+FHD-VD (barra K). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. *, indica el valor de p ($p < 0.05$) cuando todas las muestras fueron comparadas con HUVEC infectadas con VD. Δ , indica el valor de p ($p < 0.05$) cuando las células infectadas con FD-VD fueron comparadas con las células tratadas con PCA+FD-VD.

6.8 Ensayos de citoprotección de PCA durante la infección de HUVEC con el virus del dengue

Se ha descrito ampliamente el papel citoprotector de PCA durante la lesión en diferentes tejidos (87,88,89). En nuestro modelo, evaluamos la posible participación de PCA en células endoteliales infectadas con ambos aislados del virus dengue (MOI=1.0), mediante ensayos de tinción de núcleos pro-apoptóticos con yoduro de propidio. Las células infectadas con FHD-VD durante 48 horas mostraron gran acumulación de yoduro de propidio en los núcleos celulares (Figura 23 C), similar a las células estimuladas con TNF- α 10 ng/ml (control positiva) (Figura 23 B).

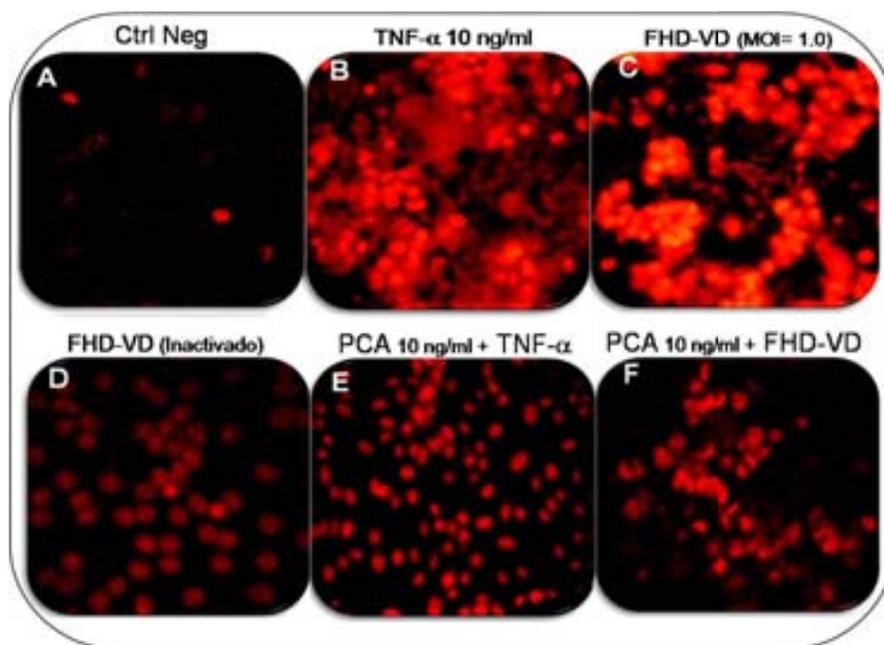


Figura 23. Actividad anti-apoptótica de PCA en HUVEC infectadas con el virus del dengue. Tinción con yoduro de propidio de núcleos pro-apoptóticos. Panel A, HUVEC no infectadas (control negativo), B) células endoteliales estimuladas con TNF- α , C)

HUVEC infectadas con FHD-VD a una MOI=1.0, D) HUVEC tratadas con FHD-VD inactivado con UV, E) Células endoteliales pre-incubadas con 10 ng/ml de PCA y estimuladas TNF- α , F) HUVEC infectadas con FHD-VD pre-incubadas con PCA. Los resultados son representativos de tres series de experimentos con resultados similares.

Por otra parte, en HUVEC pre-incubadas durante 72 horas con PCA (10 ng/ml) y posteriormente infectadas con FHD-VD, la acumulación de yoduro de propidio disminuyó notablemente comparadas con aquellas que no fueron tratadas con PCA (Figura 23 F); así mismo las células tratadas con TNF- α y pre-incubadas con PCA, mostraron una disminución considerable de yoduro de propidio en los núcleos celulares (Figura 23 E). Las células no

infectadas (control negativo) mostraron acumulación mínima de yoduro de propidio mientras que las células tratadas con virus inactivados, mostraron presencia de núcleos pro-apoptóticos en un menor número que aquellas HUVEC infectadas con FHD-VD (Figura 23 A y D).

6.9 Replicación del virus del dengue (FHD-VD y FD-VD) en HUVEC y su relación con la colocación de EPCR y PAR-1

Con el propósito de establecer si existen diferencias en la expresión de ag virales en la superficie celular entre ambos aislados virales, llevamos a cabo ensayos de cartometría de flujo. Las células endoteliales fueron infectadas utilizando la misma dosis infecciosa (MIO=1.0) durante 48 horas. La presencia del antígeno viral para la proteína E de los VD, referida como intensidad de fluorescencia (FITC), fue mayor para el FHD-VD que para el FD-VD en prácticamente una orden de magnitud logarítmica (Figura 24, C) comparada con las HUVEC no infectadas (Figura 24 A)

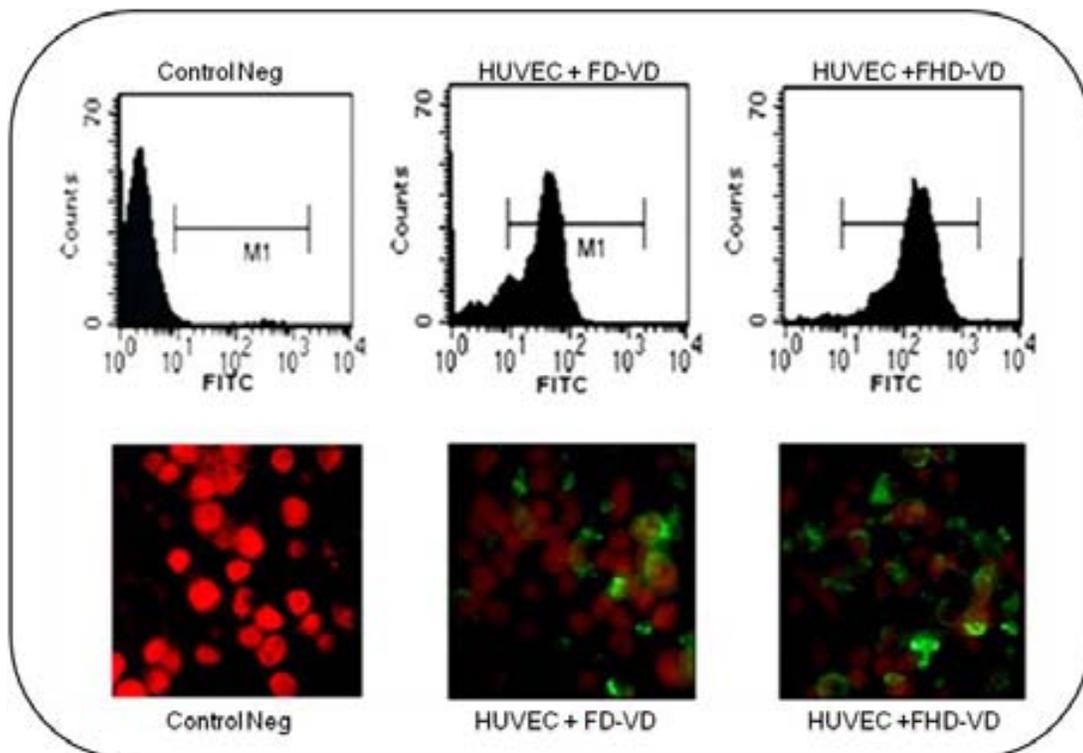


Figura 24. Presencia de antígenos virales en HUVEC infectadas con FHD-VD y FD-VD

Para confirmar estos resultados, paralelamente llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta y observamos que las células infectadas con el FHD-VD expresan en mayor proporción el antígeno viral (proteína E) que las infectadas con FD-VD (Figura 24 D y E) y que los cultivos no infectados.

6.10 Discusión de Resultados

El problema más importante que en la actualidad se presenta para entender la patogénesis del FHD/SCD, es la inexistencia de un modelo animal que permita reproducir la enfermedad del dengue como se presenta en el humano.

L. Rosen y S. Halstead (48, 49) han propuesto dos hipótesis que tratan de explicar los casos severos de la enfermedad como son la fiebre hemorrágica por dengue y el síndrome de choque por dengue. Ambas teorías están basadas tanto en datos epidemiológicos como experimentales.

La teoría de Rosen postula la virulencia de los aislados virales (49) mientras que la hipótesis de Halstead se basa en aspectos inmunopatogénicos en el curso de una infección secundaria (49). Ambas hipótesis no son excluyentes una de la otra, sin embargo de manera individual no explican claramente los mecanismos patogénicos de la enfermedad. Es importante mencionar que durante la FHD/SCF, factores epidemiológicos tales como; el status inmunológico del paciente, la edad, sus características genéticas, la recurrencia a la infección y la virulencia de las cepas virales entre otras; son factores de riesgo para generar las formas graves de la enfermedad. Ambas hipótesis, no explican claramente la presencia de algunas manifestaciones clínicas tales como trombocitopenia y hemoconcentración como resultado de la activación y daño al endotelio vascular (EV).

El daño endotelial puede ser reflejo de la disfunción del tejido vascular, el cual puede ser activado de forma directa por los VD, o bien de forma indirecta, por la respuesta del huésped. De esta manera el EV puede hacer las veces de “campo de batalla” y así determinar la severidad de la enfermedad (90). El endotelio vascular se ha utilizado como modelo infeccioso para evaluar posibles mecanismos patogénicos que se generan durante la infección del virus

del dengue (92, 93). Estos modelos de estudio han permitido incursionar en los mecanismos celulares básicos de activación celular como consecuencia de la presencia de los virus del dengue. De esta manera, diferentes grupos de investigación han proporcionado datos ex vivo (94,95, 96, 97), in vitro Rosen L (49), Bonner S y O'Sullivan MA, (91), Peyrefitte ChN (92), Basu A y Chaturvedi UC (90) e in vivo Limonta D y col (96), Jessie K y col (97), Barth OM y col (98) han demostrado claramente activación del endotelio vascular durante la infección del virus del dengue. De este modo, Bonner S y O'Sullivan MA, han propuesto que el endotelio vascular es un modelo celular apropiado para el estudio del síndrome de choque por dengue. Con base en estos antecedentes, se utilizaron cultivos primarios de HUVEC como modelo experimental en donde se encontraron datos novedosos referentes a la participación del VD en la modificación de la vía citoprotectora de la proteína C.

Se ha demostrado que durante diferentes procesos como la inflamación-coagulación, apoptosis, y protección de barrera endotelial se activan mecanismos citoprotectores de la célula endotelial en respuesta al daño al tejido. Bajo este contexto, la participación de los receptores activados por proteasas (PARs) durante estos procesos, es determinante ya que varios de estos eventos interaccionan en algún punto (crosstalk) vía PARs. Estos receptores son proteínas acopladas a proteínas G, las cuales están involucradas en diferentes vías regulatorias de señalización (99,100). El inicio de los eventos citoprotectores están estrechamente asociados al endotelio vascular (101), ya que este tejido localiza y promueve diversos procesos bioquímicos involucrados en la vía citoprotectora de la proteína C de manera independiente de su función regulatoria en la cascada de coagulación. Estas propiedades pleiotropicas de PCA, han permitido emplear a la PCA en el tratamiento de trastornos complejos como la sépsis, la trombosis y la isquemia entre otros (102, 103).

En éste trabajo se evaluaron los mecanismos básicos que pueden estar involucrados en la regulación de estos procesos durante la infección de células del endotelio vascular por el VD. Así mismo evaluamos si durante la infección del EV por los VD se modifica el complejo TM-TB-PC a nivel de la superficie del endotelial, el cual es determinante en la generación de PCA. Recientemente, Buttep P y Sosotikul D (79,80) han reportado la presencia de niveles elevados de TM soluble (TMs) en el plasma de pacientes con FHD-VD durante la fase aguda de la enfermedad, sugiriendo daño o activación específica del endotelio vascular. Estos autores demostraron que los pacientes con SCD (FHD grado III o IV) muestran niveles de TMs en plasma más elevados que los pacientes con FHD-VD grado I y II.

En ambos estudios los niveles de esta proteína correlacionaron con la severidad de la enfermedad. Se ha propuesto que la TMs libre en el plasma puede ser un marcador temprano de daño al endotelio durante el SCD durante la fase febril, sin embargo, el papel del virus del dengue en el desarrollo de las alteraciones vasculares presentes durante el SCD no ha sido descrito. Nosotros observamos mediante ensayos de citometría de flujo que en presencia del FHD-VD (MOI=1), la cantidad de TM en la superficie de la membrana endotelial se reduce hasta en un 85% comparados con las células no infectadas (Figura 14 A y B). Este efecto fue más evidente que en los cultivos celulares estimulados con TNF- α (control positivo).

En las células endoteliales infectadas con el FD-VD a la misma dosis infectiva (MOI=1.0), encontramos que la TM disminuye en un 28%. El cual es un valor similar al del control positivo (Figura 14 D). Así mismo, demostramos que la TM a nivel de la membrana endotelial disminuyó de forma gradual dependiendo del tiempo de infección (Figura 16 A), este dato correlacionó con el aumento gradual de la TMs en los sobrenadantes de estos cultivos siendo más evidente a las 36 y 48 horas post- infección (Figura 16 B). Estos datos sugieren la

participación del VD en la alteración endotelial vascular. Este hallazgo ayuda a explicar la presencia de TM soluble presente en el plasma de los pacientes con FHD durante la fase febril de la enfermedad con riesgo de desarrollar SCD, de acuerdo con Buttep y colaboradores (79).

La TM es un receptor celular que juega una función determinante en la actividad anticoagulante del endotelio vascular, gracias a su actividad como cofactor en la activación de la proteína C (la molécula vaso protectora más importante). Es bien conocido que la disminución de TM en la membrana endotelial se correlaciona con bajos niveles de PCA favoreciendo la instalación de fenómenos procoagulantes y proinflamatorios por parte del endotelio vascular (101,104).

Nosotros evaluamos la actividad de PCA en cultivos de HUVEC infectados con ambos aislados y observamos que la formación del complejo TM-TB-PC se modifica y que la actividad de PCA disminuye de forma proporcional a la dosis infecciosa empleada para cada aislado del virus dengue (Figura 17), modificando el estado anti-trombótico de la membrana del endotelio vascular. La transformación de un fenotipo anticoagulante/anti-inflamatorio a un fenotipo pro-coagulante/ pro-inflamatorio es determinante durante el daño tisular.

Por otra parte, al analizar la acción pro-inflamatoria del VD encontramos altos niveles de IL-8 en los cultivos infectados con FHD-VD (Figura 18 A) que concuerdan con las observaciones clínicas reportadas por Ragupathy y colaboradores (81), quienes reportan una correlación entre los niveles de IL-8 en pacientes con FHD/SCD con grado de severidad III y IV y pacientes con FD.

Los presentes hallazgos nos permitieron confirmar la participación de PCA en la respuesta anti-inflamatoria del endotelio vascular durante la infección del virus dengue (Figura 18 B), ya

que al pre-incubar las células con 10 ng/ml de PCA y posteriormente infectarlas, observamos una disminución en la producción de IL-8 (efecto citoprotector). Nuestro modelo celular también nos permitió demostrar la participación de MAPK's (ERK 1/2 y p38) en la producción de IL-8 durante la infección de HUVEC por el VD. La especificidad de estos resultados fue comprobada mediante de inhibición de la fosforilación de estas cinasas asociadas con la disminución en la producción de IL-8 (Figura 19 C y 20 A). Se ha descrito también que la PCA activa rutas de señalización intracelular a través de la activación de los receptores PAR y EPCR (90,91). Nuestros resultados mostraron que en ausencia de TM, PAR-1 y EPCR están presentes (Figura 17 H-M) lo cual sugiere su participación en este proceso.

Estudios recientes de Bae JS y colaboradores, sugieren que los mecanismos de señalización dependientes de PAR-1, están asociados a EPCR y a caveolina-1 en balsas lipídicas de células HUVEC, en las que la asociación de EPCR con APC puede llevar a la disociación de EPCR de caveolina-1 y reclutar a PAR-1 para activar una vía de señalización citoprotectora (99). Los resultados de la figura 20 C indican que los cultivos de HUVEC pre-incubados con anti-PAR-1 y posteriormente infectados con FHD-VD, muestran una disminución en la producción de IL-8. Similarmente, cuando las células fueron pre-tratadas con PCA, o con anti-PAR-1, la fosforilación de ERK1/2 disminuyó (Figura 21 B).

Talavera y colaboradores (105); así como también Lee y colaboradores, (106); reportaron que la producción de IL-8 está estrechamente relacionada con un aumento en la permeabilidad del endotelio vascular, durante la infección del virus del dengue a nivel del endotelio vascular.

En nuestro modelo mostramos datos novedosos que sugieren la función citoprotectora de PCA en la estabilización de la barrera endotelial durante la infección del endotelio vascular por

el virus dengue. En los ensayos de permeabilidad (Figura 22, barras E y G) mostramos que las HUVEC pre-incubadas con PCA y posteriormente infectadas con VD, son menos permeables que las células no tratadas con PCA. También mostramos la posible participación de ERK1/2 y p38 en la función de barrera endotelial. Finalmente, mostramos la participación de PCA en la disminución de la apoptosis inducida por la infección del virus del dengue en células HUVEC. Matsuda y colaboradores, así como también, Espina y colaboradores (106,107), han propuesto que la apoptosis es una característica importante durante la inducción de la patogénesis del huésped por virus el virus del dengue.

El efecto citoprotector de PCA en la prevención del daño al tejido ha sido demostrado en modelos de sépsis en animales de laboratorio reduciendo la apoptosis en el endotelio cerebral humano (109). Existen evidencias de que la función anti-apoptótica de PCA se lleva a cabo de manera independiente de sus propiedades anticoagulantes, como lo indican los experimentos en los que mutantes de la PCA que presenta una función anticoagulante sustancialmente reducida, mantienen su función anti-apoptótica (88).

Estudios clínicos e investigaciones básicas con PCA, sustentan las propiedades citoprotectoras de PCA (110, 111,). Nuestros resultados apoyan estos hallazgos. La figura 25 es una representación esquemática de los datos que obtuvimos en nuestro modelo experimental, en el cual mostramos los posibles eventos del endotelio vascular durante la infección del virus del dengue (FHD-VD).

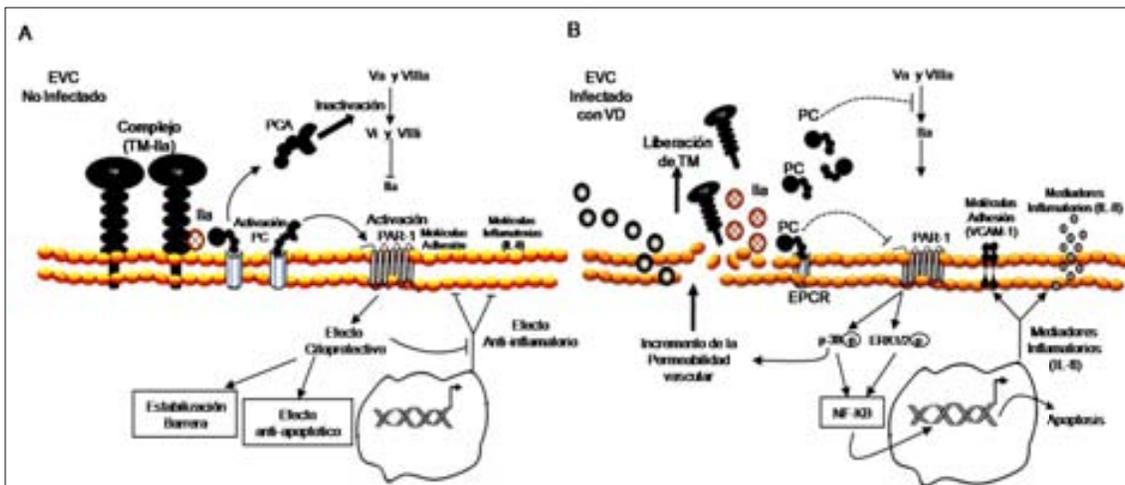


Figura 25. Participación del complejo TM-TB-PC durante la infección de células endoteliales por el virus del dengue. El presente modelo resume la posible vía de señalización involucrada en la activación de las células del

endotelio vascular. Esta propuesta podría explicar diferentes aspectos de la patogénesis de la FHD-VD. **A)** homeostasis fisiológica del endotelio vascular en términos de los efectos citoprotectores y anti-trombóticos en células no infectadas. Sin embargo, durante la infección de HUVEC con FHD-VD (**panel B**), observamos que la superficie de la membrana endotelial experimenta un cambio de un estado anti-inflamatorio/anti-coagulante a un fenotipo pro-inflamatorio/pro-coagulante. El virus del dengue induce la liberación de TM (TMs), afectando la formación del complejo TM-TB, modificando las vías anticoagulantes y citoprotectora de la proteína C modificando así la función de barrera del endotelio vascular y aumento en la permeabilidad vascular. Durante todo este proceso quedó establecido la participación de MAPK's (p38 y ERK 1/2) y PAR-1.

La Figura 25 A muestra tanto las condiciones fisiológicas (homeostasis) del endotelio vascular vía anti-trombosis, como las funciones citoprotectoras del endotelio no infectado.

Mientras que durante la infección virus del dengue (FHD-VD, principalmente) del EV observamos una serie de cambios en la superficie endotelial que se pueden interpretar como cambios del estado anti- inflamatorio y anti-coagulante celular a un fenotipo pro-coagulante y pro-inflamatorio. Observamos que el virus dengue favorece la liberación de TM (TMs), la cual afecta la formación del complejo TM-TB, promoviendo la alteración de la función anticoagulante y citoprotectora de la vía de la PC. Es importante destacar que en el presente trabajo logramos determinar la participación de las MAPK's (ERK 1/2 y p38) en estos procesos. Finalmente consideramos que estos hallazgos abren la posibilidad para utilizar nuevas estrategias que impliquen el desarrollo de nuevas medidas terapéuticas relacionadas a la inhibición del proceso trombótico e inflamatorio presentes durante la FHD/SCD. Es plenamente conocido que el uso farmacológico de PCA reduce la mortalidad asociada con sepsis severa tanto en humanos (Recombinant Human Protein C Worldwide Evolution in Severe Sepsis [PROWESS]) como en modelos animales (110,111).

Bibliografía

1. Halstead SB. 1988. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. *Science*; 239: 476 – 481.
2. Uzcategui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, *et al.* 2003. Molecular epidemiology of dengue virus 3 in Venezuela. *J Gen Virol*; 84: 1569-1575.
3. Monath TP, Heinz FX. 1996. Flavivirus. En *Fields Virology*. Fields BN, Kinipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, *et al*, Editors. 3ra ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; pp 961-1034.
4. Guzman MG, Kouri G. Dengue and update. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:33–42.
5. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 2002; 10:100–103.
6. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol*. Nov. Epub 2003 Oct 5. 2003; 10(11):907–912.
7. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 2002; 108:717–725.
8. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 2004; 427:313–319.
9. Megret F, Hugnot JP, Falconar A, Gentry MK, Morens DM, Murray JM, Schlesinger JJ, Wright PJ, Young P, Van Regenmortel MH. Use of recombinant fusion proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on the dengue virus envelope glycoprotein. *Virology* 1992; 187:480–491.
10. Innis BL, Thirawuth V, Hemachudha C. Identification of continuous epitopes of the envelope glycoprotein of dengue type 2 virus. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40:676–687.

11. Kapoor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusukawa J, Ebner KE, Padmanabhan R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J Biol Chem* 1995; 270:19100–19106.
12. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 1990; 44:649–688.
13. Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol* 1991; 65:2467–2475.
14. Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol* 1999; 73:6104–6110.
15. Burke DS, Monath TP. Flaviviruses. In Knipe DM, Howley DE, Griffin SR, Lamb A, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. *Field's Virology*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. pp. 1043–1125.
16. Randolph VB, Stollar V. Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. *J Gen Virol* 1990; 71:1845–1850.
17. Despres P, Frenkiel MP, Deubel V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology* 1993; 196:209.
18. Stiasny K and Heinz FX. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol*, 2006; 87: 2755-2766.
19. Bielefeldt-Ohmann H, 1998. Analysis of antibody-independent binding of dengue viruses and dengue virus envelope protein to human myelomonocytic cells and B lymphocytes. *Virus Res* 57: 63-79.
20. Bielefeldt-Ohmann H, Meyer M, Fitzpatrick DR, Mackenzie JS, 2001. Dengue virus binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains. *Virus Res* 73: 81-89.

21. Jindadamrongwech S, Smith DR, 2004. Virus Overlay Protein Binding Assay (VOPBA) reveals serotype specific heterogeneity of dengue virus binding proteins on HepG2 human liver cells. *Intervirology* 47: 370-373.
22. Martínez-Barragán JJ, del Angel RM, 2001. Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection. *J Virol* 75: 7818-7827.
23. Moreno-Altamirano MM, Sánchez-García FJ, Muñoz ML, 2002. Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2. *J Gen Virol* 83: 1123-1130.
24. Ramos-Castañeda J, Imbert JL, Barrón BL, Ramos C, 1997. A 65-kDa trypsin-sensitive membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells. *J Neurovirol* 3: 435-440.
25. Rothwell SW, Putnak R, La Russa VF, 1996. Dengue-2 virus infection of human bone marrow: characterization of dengue-2 antigen-positive stromal cells. *Am J Trop Med Hyg* 54: 503-510.
26. Wei HY, Jiang LF, Fang DY, Guo HY, 2003. Dengue virus type 2 infects human endothelial cells through binding of the viral envelope glycoprotein to cell surface polypeptides. *J Gen Virol* 84:3095-3098.
27. Thepparit C, Smith DR, 2004. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol* 78: 12647-12656.
28. Miller JL, Dewet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S, 2008. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog* 4: e17.
29. Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM, 2005. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol* 79: 4557-4567.
30. Chen YC, Wang SY, King CC, 1999. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol* 73: 2650-2657.

31. Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR, 2004. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol* 149: 915-927.
32. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Desprès P, 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep* 4: 723-728.
33. 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, Marovich MA, 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 197: 823- 829.
34. Muñoz ML, Cisneros A, Cruz J, Das P, Tovar R, Ortega A, 1998. Putative dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS Microbiol Lett* 168: 251-258.
35. Salas-Benito J, Reyes-Del Valle J, Salas-Benito M, Ceballos-Olvera I, Mosso C, del Angel RM, 2007. Evidence that the 45-kD glycoprotein, part of a putative dengue virus receptor complex in the mosquito cell line C6/36, is a heat-shock related protein. *Am J Trop Med Hyg* 77: 283-290.
36. Sakoonwatanyoo P, Boonsanay V, Smith DR, 2006. Growth and production of the dengue virus in C6/36 cells and identification of a laminin-binding protein as a candidate serotype 3 and 4 receptor protein. *Intervirology* 49, 161-172.
37. Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM, 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 3: 866-871.
38. Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW, Zarski JP, Drouet E, 2002. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* 292: 162-168.
39. Hilgard P, Stockert R, 2000. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 32: 1069-1077.
40. Hung SL, Lee PL, Chen HW, Chen LK, Kao CL, King CC, 1999. Analysis of the steps involved in dengue virus entry into host cells. *Virology* 257: 156-167.

41. Thaisomboonsuk BK, Clayson ET, Pantuwatana S, Vaughn DW, Endy TP, 2005. Characterization of dengue-2 virus binding to surfaces of mammalian and insect cells. *Am J Trop Med Hyg* 72: 375-383
42. PAHO - Pan American Health Organization. 1997. Re-emergence of Dengue in the Americas. *Epidemiological Bulletin*; 18(2).
43. Rodhain F. 1996. The situation of dengue in the world. *Bull Soc Pathol Exot*; 89 (2): 87-90.
44. Gibbons RV, Vaughn DW. 2002. Dengue: an escalating problem. *Clinical review. BMJ*; 321: 1563-1566.
45. Gubler DJ. 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*; 11 (3): 480-496.
46. World Health Organization. www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs117/en/
47. Bhamarapavati N. 1989. Hemostatic defects in dengue hemorrhagic fever. *Rev of Infect Dis*. 11(suppl.4) S826-S829.
48. Halsted SB. 1974. Etiologies of the experimental Dengue of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg*; 23(5): 974-982.
49. Rosen L. 1977. The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*; 26: 337- 343.
50. Barnes WJS, Rosen L. 1974. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a pacific island. *Am J Trop Med Hyg*; 23: 495-505.
51. Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol* 85:43-45, 2007.
52. Sierra Bde L, Kouri G, Guzman MG. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol* 152:533-542, 2007.
53. Zulkarnain E, Hotta S, Takegami T. Molecular comparison of dengue type 1 Mochizuki strain virus and other selected viruses concerning nucleotide and

amino acid sequences of genomic RNA: a consideration of viral epidemiology and variation. *Microbiol Immunol* 38: 581–585, 1994.

54. Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol* 74:7814–7823, 2000.
55. Gubler DJ, Suharyono W, Tan R, Abidin M, Sie A. Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bull World Health Organ* 59:623–630, 1981.
56. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 181:2–9, 2000.
57. Thisyakorn U, Nimmannitya S. Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* 16:295–297, 1993.
58. Leon LR. Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. *J Appl Physiol* 92:2648–2655, 2002.
59. Mandel B. Neutralization of animal viruses. *Adv Virus Res* 23:205–268, 1978
60. Almagro D, González I, Cruz Y. & Castañeda M. 1984. Estudio hemostático en el dengue hemorrágico. *Rev Cub Med Trop.* 36:352-359.
61. Esmon C T. 2000. The anticoagulant and anti-inflammatory roles of the Protein C anticoagulant pathway. *J Aut.* 15: 113-121.
62. Esmon CT. 2001. Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular Thrombosis and inflammation. *Crit Care Med.* (7 Suppl):S48-S51.
63. Christian S, Ahorn H, Koehler A, Eisenhaber F, Rodi HP, Garin-Chesa P, Park JE, Rettig WJ, Lenter MC. 2001. Molecular cloning and characterization of endosialin, a C-type lectin-like cell surface receptor of tumor endothelium. *J Biol Chem*; 276: 7408–14.
64. Zhang Y, Weiler-Guettler H, Chen J, Wilhelm O, Deng Y, Qiu F, Nakagawa K, Klevesath M, Wilhelm S, Bohrer H, Nakagawa M, Graeff H, Martin E, Stern DM,

- Rosenberg RD, Ziegler R, Nawroth PP. 1998. Thrombomodulin modulates growth of tumor cells independent of its anticoagulant activity. *J Clin Invest*; 101: 1301–9.
65. Conway EM, Van deWouwer M, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, De Vriese A, Weitz JI, Weiler H, Hellings PW, Schaeffer P, Herbert JM, Collen D, Theilmeier G. 2002. The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Exp Med*; 196: 565–77.
66. Weisel JW, Nagaswami C, Young TA, Light DR. 1996. The shape of thrombomodulin and interactions with thrombin as determined by electron microscopy. *J Biol Chem*; 271: 31485–90
67. Bourin MC, Boffa MC, Bjork I, Lindahl U. 1986. Functional domains of rabbit Thrombomodulin. *Proc Natl Acad Sci USA*; 83: 5924-28.
68. Esmon CT. 2001. The normal role of Activated Protein C in maintaining homeostasis and its relevance to critical illness. *Crit Care* ; 5:S7-S12.
69. Sadler JE. 1997. Thrombomodulin structure and function. *Thromb Haemost*; 256: 392-5.
70. Tsiang M, Lentz SR, Sadler JE. 1992. Functional domains of membrane bound human thrombomodulin. EGF-like domains four to six and the serine/ threonine-rich domain are required for cofactor activity. *J Biol Chem*; 267: 6164-70.
71. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A 2001. Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem*; 276:11199–11203.
72. Cheng T, Liu D, Griffin JH 2000. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med*; 9:338–342.
73. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A 2002. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science*; 296:1880–1882.

74. Huan-Yao L, Trai-Ming Y, Hsiao-Sheng L, Yee-Shin L, Shun-Hua C, and Ching-Chuan L. 2001. Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *J Biomed Sci.* 8: 377-388.
75. Suharti C, Van Gorp E, Setiati T and Dolmans W. 2002. The Role of Activation of Cagulation and Fibrinolysis in Dengue Shock Syndrome. *Thromb Haemost.* 87: 42-46.
76. Esmon C T. 1989. The Roles of Protein C and Thrombomodulin in the Regulation of Blood Coagulation. *J Biol Chem.* 264: 4743- 4746.
77. Joyce DE, Grinnell BW. 2002. Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor-kappa B. *Crit Care Med*; 30(5suppl):s288-s293.
78. Willis B A, Oragui E E, Stephens A C, Daramola O A, Minh Dung N, Thi Loan H, Vinh Chau N, Chambers M, Stepniewska K, Farra J J and Levin M. 2002. Coagulation Anomalities in Dengue Hemorrhagic Fever: Serial Investigations in 167 Vietnamese Children with Dengue Shock Syndrome. *Clinical Infectious Diseases.* 35: 277-85.
79. Butthep P, Chunhakan S, Tangnararatchakit K 2006. Elevated soluble thrombomodulin in the febrile stage related to patients at risk for dengue shock syndrome. *Pediatr Infect Dis J*; 25: 894-897.
80. Sosothikul D, Seksarn P, Pongsewalak S 2007. Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection. *Tromb Haemost*; 97: 627-634.
81. Raghupathy R, Chatuvuerdi UC, Al-Sayer H, et al. 1998. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol*; 56: 280-285.

82. Olsen E. Culturing of human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells. In *Cell Biology* 1994; 1: 142-147.
83. Hirokawa K, Aoki N. Regulatory mechanisms for thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells in vitro. *J Cell Physiol.* 1991;147:157-165.
84. Kittigul L, Temprom W, Sujirarat D 2000. Determination of tumor necrosis factor-alpha levels in dengue virus infected patients by sensitive biotin streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods*; 90: 51-57.
85. Nold M, Nold-Petry C, Fischer D, et al. 2007 Activated protein C downregulates p38 mitogen-activated protein kinase and improves clinical parameters in an in-vivo model of septic shock. *Thromb Haemost*; 98:1118-26
86. Chiang E, Persaud-Sawin D A, Kulkarni S, Garcia JN and Imani F. 2006. Bluetongue Virus and Double-Stranded RNA Increase Human Vascular Permeability: Role of p38 MAPK. *Journal of Clinical Immunology*; 26(4):406-416.
87. Griffin JH, Fernández JA, Gale AJ .2007. Activated protein C. *J Thromb Haemost*; 1: 73-80.
88. Mosnier LO, Gale AJ, Yegneswaran S. 2004. Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity. *Blood*; 104: 1740-1744.

89. Feistritzer C, Schuepbach RA, Mosnier LO. 2006. Protective signaling by activated protein C is mechanistically linked to protein C activation on endothelial cells. *J Biol Chem*; 281: 20077-20084.
90. Basu A, Chaturvedi UC 2008. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 53:287-299.
91. Bonner S, O'Sullivan MA 1998. Endothelial cell monolayers as a model system to investigate dengue shock syndrome. *J Virol Methods*; 71: 159-167.
92. Peyrefitte ChN, Pastorino B, Grau GE 2006. Dengue virus infection of human microvascular endothelial cells from different vascular beds promotes both common and specific functional changes. *J Med Virol*; 78: 229-242.
93. Sahaphong S, Riengrojpitak S, Bhamarapavati N 1980. Electron microscopic study of the vascular endothelial cell in dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*; 11: 194-204.
94. Ramos C, Sánchez G, Pando RH 1998. Dengue virus in the brain microvascular endothelial cells of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol*; 4: 465-468.
95. Bhamarapavati N, Tuchinda P, Boonyapaknavik V 1967. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: A study of 100 autopsy cases. *Ann Trop Med Parasitol*; 61: 500-510.
96. Limonta D, Capó V, Torres G 2007. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J Clin Virol*; 40: 50-54.

97. Jessie K, Fong MY, Devi S 2004. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis*; 189: 1411-1418.
98. Barth OM, Barreto DF, Paes MV 2006. Morphological studies in a model for dengue-2 virus infection in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 101: 905-915.
99. Bae JS, Rezaie AR 2008. Protease activated receptor 1 (PAR-1) activation by thrombin is protective in human pulmonary artery endothelial cells if endothelial protein C receptor is occupied by its natural ligand. *Thromb Haemost*; 100; 101-109.
100. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A 2003. Activated protein C signals through the thrombin receptor PAR1 in endothelial cells. *J Endotoxin Res*; 9: 317- 321.
101. Strukova S 2006. Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis. *Front Biosci*; 11: 59-80.
102. Okajima K 2004. Regulation of inflammatory responses by activated protein C: the molecular mechanism(s) and therapeutic implications. *Clin Chem Lab Med*; 42: 132-141.
103. Macias WL, Yan SB, Williams MD, 2005. New insights into the protein C pathway: potential implications for the biological activities of drotrecogin alfa (activated). *Crit Care*; 9: S38-S45.
104. Schouten M, Wiersinga WJ, Levin M 2008. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*; 83: 1-10.
105. Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC 2004. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are

induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol*; 85: 1801-1813.

106.Lee YR, Liu MT, Lei HY 2006. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol*; 87: 3623-3630.

107.Matsuda T, Almasan A, Tomita M 2005. Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Gen Virol*; 86: 1055-1065.

108.Espina LM, Valero NJ, Hernandez JM 2003. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor- α caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*; 68: 48-53.

109.Domotor E, Benzakour O, Griffin JH 2003. Activated protein C alters cytosolic calcium flux in human brain endothelium via binding to endothelial protein C receptor and activation of protease activated receptor-1. *Blood*; 101: 4797-801.

110.Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF 2001. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*; 344: 699-709.

111.Bernard GR, Macias WL, Joyce DE 2003. Safety assessment of drotrecogin alfa (activated) in the treatment of adult patients with severe sepsis. *Crit Care*; 7: 155-163.

Wound Healing and Inflammation/Infection

Modification of the cytoprotective protein C pathway during Dengue virus infection of human endothelial vascular cells

Carlos Cabello-Gutiérrez¹; María Eugenia Manjarez-Zavala²; Alejandra Huerta-Zepeda¹; Jorge Cline-Castillo¹; Verónica Manroy-Martínez¹; Benjamín Birueta-Correa²; Blanca H. Ruiz-Ordaz¹¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, México; ²Departamento de Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México, DF, México; ³División de Obstetricia UMAE, Hospital de Ginecología y Obstetricia del IMSS "Luis Castelazo Ayala", México, DF, México

Summary

Dengue fever (DF) is the most prevalent arthropod-borne viral disease of humans. No safe vaccine is available, there is no experimental animal model and no specific treatment (antiviral) for Dengue virus (DV) infection exists. The pathogenic mechanisms of the severe forms of the disease, such as Dengue shock syndrome (DSS) and Dengue haemorrhagic fever (DHF), in which endothelial damage is the pathognomonic sign, are not fully understood. Clinical observations have revealed significant abnormalities in the coagulation and inflammation systems, with increased levels of soluble thrombomodulin (sTM) in the plasma of patients with DHF/DSS (grade III or IV). Blood sTM was proposed as an early predictor of DSS during the febrile stage. However, the role of the DV in endothelial injury during DSS is unclear. Here, we present novel insights into the participation of DV in the downregulation of the thrombomodulin-thrombin-

protein C complex formation at the endothelial surface, with a reduction in activated protein C (APC). APC is the most important vasoprotective protein because it downregulates thrombin generation (by the inactivation of procoagulant factors Va and VIIIa) and has anti-inflammatory, antiapoptotic, and barrier protection properties. These biological functions of APC are associated with the endothelial protein C receptor (EPCR) and protease-activated receptor 1 (PAR-1) signalling pathways, which link the coagulation-inflammation responses. We found alterations in the antithrombotic and cytoprotective protein C pathways during DV infection of human endothelial vascular cells, which may explain the vasculopathy observed during DHF/DSS. Clarification of the basic principles that underlie these processes has important implications for the design of new therapeutic strategies for DHF/DSS.

Keywords

Dengue virus, endothelial cells, APC, thrombomodulin, PAR-1, EPCR, inflammation, coagulation, cytoprotection

Thromb Haemost 2009; 101: 916–928

Introduction

Dengue fever (DF) is the most important mosquito-borne viral disease in tropical areas. The World Health Organization currently estimates that there may be 50 million dengue infections worldwide every year (1). In 2007 alone, there were more than 890,000 reported cases of DF in the Americas, of which 26,000 cases were Dengue haemorrhagic fever (DHF) (1). Dengue virus (DV) infection is caused by any of the four DV serotypes (DV 1–4), which can be transmitted to the human by the bite of the female bloodsucking mosquitoes *Aedes aegypti* and *A. albopictus* (2). The clinical spectrum of the disease varies from a mild fe-

brile illness to more severe forms, such as DHF and Dengue shock syndrome (DSS). DF is characterised by sudden fever, rash, headache, and non-specific signs and symptoms, such as myalgias, arthralgias, and general weakness (2). DHF/DSS are difficult to differentiate from DF in the acute phase. However, during defervescence, symptoms of circulatory failure appear abruptly and shock or leakage manifestations may occur (2, 3). No effective strategies exist to prevent the progression of DHF because its pathogenic mechanisms are not fully understood. The haemostatic changes involve three main factors: thrombocytopenia, multiple defects in the coagulation-fibrinolysis system, and vascular damage (increased permeability) (2–4). The vascular en-

Correspondence to:
Carlos Cabello-Gutiérrez
Biomol Dept. Unit Center
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
Apdo. Postal 04510, México, D.F., México
Tel: +52 55 56 77 89 31; Fax: +52 55 56 77 97 11
E-mail: ccabello@iib.unam.mx

Financial support:
This study was supported in part by the IMBIT and CONACyT programs.

Received April 10, 2008
Accepted after major revision January 25, 2009

Published online April 1, 2009
doi:10.11607/103-04-071

endothelium plays a determining role in the response to injury because it functions as a regulatory interface during haemostasis (coagulation-fibrinolysis) and inflammation, and at the vascular endothelium barrier (5). Under normal conditions, endothelial vascular cells (EVC) promote anticoagulant properties by different mechanisms (6). The protein C (PC) anticoagulant pathway provides the main control for the coagulation system (7). The thrombomodulin-thrombin complex (TM-TB) plays a determining role during the PC activation (APC) process (8, 9). TM is a constitutively expressed glycoprotein present in high concentrations in EVC, and is the thrombin-specific receptor (10, 11). APC is a multidomain plasma serine protease, which downregulates the generation of thrombin by the inactivation (proteolysis) of procoagulant factors Va and VIIIa (7). APC also has anti-inflammatory, antiapoptotic, and cytoprotective properties, maintaining the endothelial barrier (12, 13). These biological functions of APC are associated with the endothelial protein C receptor (EPCR) and the activation of the protease-activated receptor (PAR-1) signalling pathways, which link the blood coagulation and inflammation responses (5, 14).

Under normal conditions or in response to minor injury, the vascular endothelium remains protected because TM sequesters thrombin, which generates adequate local levels of APC, conferring a cytoprotective effect (12). However, during profound endothelial injury (viral infection or inflammatory stimulus), thrombomodulin is released (soluble TM, sTM) and decreases at the cell surface level, causing reduced APC generation and tissue damage (15). Downregulation of the APC anticoagulant pathway promotes thrombosis and amplifies the inflammatory and apoptotic processes and EVC dysfunction (15). Recently, Buttepi et al. (16) and Sawitriku et al. (4), have reported elevated levels of sTM in the plasma of DHF patients as result of endothelial injury. However, the role played by DV in the vasculopathy is unknown. In the present study, we evaluated the participation of the TM-TB complex in APC generation in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC or hVC) infected with DV. We also assessed the APC cytoprotective regulatory pathways that involved PAR-1 and EPCR receptors on endothelial vascular cells in the presence of DV.

Materials and methods

Viral isolates

Two different DV isolates of serotype 2 were used, one from a patient with a fatal case of DIII⁺ (DIII⁺-DV/D79) isolated in 1979 in Thailand, Asian genotype) and the other from classical DF (DI⁻-DV/D2M is a Mexican strain, American genotype). Both samples were evaluated in terms of their virulence in mice (17), and were designated DHF-DV (elevated virulence) and DF-DV (low to medium virulence), respectively. Both samples were kindly donated by Dr. Duane Cubber from the Center for Disease Control in Fort Collins, CO, USA.

Cell line

LLC-MK2 cells of the African green monkey kidney (American Type Culture Collection) were used for DV amplification, titration, and purification. For propagation, cells were infected with DHF-DV or DF-DV at a multiplicity of infection (MOI)

0.1. They were incubated at 37 °C with 5% CO₂ until their cytopathic effect (CPE) was above 90%, then harvested in cryotubes containing 0.5% albumin in minimum essential medium, and stored at -70 °C.

DV titration by lytic plaque assay

LLC-MK2 monolayers were inoculated with 100 µl of serial log dilutions of DI⁻-DV or DIII⁺-DV in serum-free medium (10^7 to 10^9) in duplicate, and incubated for 2 hours (h) at 37 °C with 5% CO₂. The viral inoculum was removed with washing and the cells were overlaid with 1.5 ml of incomplete medium plus 2.5% methylcellulose. Cultures were incubated until the CPE was above 90% (6–8 days), and then stained with 1% crystal violet.

Establishment of EVC cultures

HUVEC were isolated as described previously by Olsen (18). Briefly, the umbilical cord vein was cannulated, washed with saline solution plus HEPES and 5 ml of 0.075% trypsin-versene solution, and incubated for 10 minutes (min) at 37 °C. The cells were centrifuged and resuspended in M199 medium containing 10% fetal bovine serum, 100 mg/ml porcine heparin, 50 U/ml penicillin/streptomycin, and 25 µg/ml vascular endothelial growth factor. The cells used in all experiments corresponded to the third consecutive passage and were verified by their cobblestone morphology and the presence of the von Willebrand antigen (by immunofluorescence assay). Cell viability was determined with trypan blue stain.

Detection of TM in DV-infected EVC by flow cytometric assay

TM at the membrane surface was determined by flow cytometric assay (fluorescence-activated cell sorting [FACS]). HUVEC were infected at different MOI (0.01, 0.1, or 1.0) with DI⁻-DV or DHF-DV for 24 or 48 h or stimulated with 10 ng/ml tumour necrosis factor- α (TNF- α , positive control for reduced TM), which induces the downregulation of TM at endothelial cell surface level (19). Cultures were washed in phosphate-buffered saline (PBS), detached with 0.5 M EDTA-PBS, and resuspended in PBS (1 ml) with anti-TM antibody diluted 1:100. After 1 h incubation (4 °C), the samples were centrifuged (3 min, 1,300 rpm) and washed three times with buffer A (150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 5 mg/ml bovine serum albumin [BSA], 20 mM Tris-HCl [pH 7.4]). Secondary fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was added, incubated for 1 h at room temperature (RT), and washed with the same buffer. The pellet was resuspended in cytometry fluid and analysed by FACS.

TM determination by Western blot assay

HUVEC membrane proteins were extracted as follows. Briefly, DI⁻-DV (MOI = 1.0)-infected HUVEC were concentrated by centrifugation at 3,000 rpm (10 min) and washed with PBS. The cells were resuspended in RSB-NP-40 (1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 1% Nonidet P-40) in the presence of protease inhibitors. Nuclei and debris were removed by centrifugation. The amount of protein was determined with the Bradford method (20). Samples were separated by 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

transferred to nitrocellulose membranes, and incubated with a primary antibody (1:1,000) overnight at 4°C (anti-TM; Santa Cruz Biotechnology). Horseradish peroxidase detected using a peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2,000) in 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20 in Tris-buffered saline (TBS1) for 1 h at RT. The membranes were washed and the proteins were detected with a western blot luminal reagent.

Identification of sTM in the supernatants of DV-infected EVC

The presence of free thrombomodulin in the supernatants (SN) of TITVTC cultures infected with DHF-TM (MOI = 1.0) was determined after 36 and 48 h by Western blot assay, as previously described. The samples were centrifuged and concentrated in YM-3 Microcon tubes (Millipore, Billerica, MA, USA).

Colocalisation of PAR-1 and EPCR by confocal microscopy

We evaluated the colocalisation of EPCR and PAR-1 at cell surface level in DV-infected TITVTC. Confocal micrographs were cultured on slide one multichannel slides and processed for double immunofluorescence. Briefly, DV-infected cells with DHF-DV or DF-DV (MOI = 1, 48 h) or negative controls, were fixed (2% paraformaldehyde), washed (3 times PBS BSA 1%) and incubated 1.5 h at room temperature (separately) with specific anti-PAR-1 and EPCR antibodies (1:100; Santa Cruz). Slides were washed (3 times PBS BSA1%) and incubated with secondary antibodies to avoid immunostaining. For EPCR a monoclonal IgG1 coupled to TdR was used (1:100; Vector, Burlingame, CA, USA) and a fluorescein-conjugated monoclonal anti-IgG (1:1,000) was employed for PAR-1. Cross-reactivity was excluded by negative control that showed no immunostaining (non-infected cultures in presence of the same solutions). Samples were washed and covered with fluorescent mounting medium (Vectashield, Vector) and examined with an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse) equipped with filters for FITC and TR imaging optics. The samples were further analysed with a confocal LSM 5 UASICAL Zeiss microscope equipped with argon-krypton laser. Images were collected with 1.30 numerical aperture (NA) oil-immersion (100 X) objective, to avoid bleed-through. FITC labels were excited with the 488 line and emitted light was band-passed with 520–590-nm filter and TR labels were excited with the 503 line and emitted light was long-passed with 630-nm filter. Confocal images were obtained using two separate photomultiplier channels, either concurrently or in separate runs. Images were separately projected and merged using a pseudocolor display showing green for FITC, red for TR and yellow for colocalisation. Confocal images were analysed with the help of the assistant software programs IMAGEJ 6.0 BITPLANE and IMAGE PRO.

Protein C activation assay in DV-infected endothelial cells

The amidolytic activity of APC was evaluated using a chromogenic assay, as described by Calvey (21). The APC assay was performed using synthetic monomers (2×10^6 cells/well) in 24-well culture plates infected at different MOI (0.01, 0.1, or 1.0)

of DHF-DV or DHF-DV for 48 h. As the positive control, HUVEC were stimulated with 10 ng/ml TNF- α . The cultures were washed with buffer A, in which was added 100 μ l of buffer A plus 1.5 U/ml human thrombin, 150 nM human PC (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 5 mM CaCl₂ (Sigma). The cells were incubated for 2 h at 37°C. We collected 50 μ l of the culture supernatants and added 450 μ l of APC chromogenic substrate (S2256; 2 mM Chromogen) in the presence of 2.5 U/ml human (Sigma) to inhibit any free thrombin. After 30 min, the reaction was stopped with 200 μ l of 50% (vol/vol) acetic acid. The amidolytic activity of APC was read at 405 nm.

Phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPK1/p38 and MAPK3/ERK1/2)

Endothelial cells stimulated with TNF- α or infected with DHF-DV (MOI = 1.0) were lysed with cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.25% sodium dodecyl sulfate, 1 mM Na₂VO₄, 1 mM NaF, 1 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% Triton X-100, 1 μ g/ml protease inhibitors) for 10 min. The samples were centrifuged (14,000 rpm for 3 min) at 4°C and resuspended twice in sample buffer, boiled for 10 min, and analysed by SDS-PAGE (10%). The proteins were transferred (3.5 h) to 0.45 μ m nitrocellulose membrane and blocked for 1 h at RT, using TBST (wash) with 5% fat-free powdered milk as the blocking solution. The membranes were washed with PBS and 0.05% Tween 20 (PBST) and incubated overnight at 4°C in the presence of 1:1,000 primary antibody (anti-phospho-ERK, anti ERK, anti phospho p38, or anti-PAR-1 [ATAP; Santa Cruz Biotechnology]). The bound antibody was detected with a peroxidase-conjugated secondary antibody (Zymed 1:2,000; Dako, South San Francisco, CA, USA) diluted at 1:2,000 with BSA (2.5 mg/ml) in PBS, for 1 h at RT. The membranes were washed and the proteins detected with a Western blot luminal reagent. We performed a parallel assay to evaluate any changes in the phosphorylation of MAP kinases (MAPK1 or p38 and MAPK3 or ERK1/2) in DV-infected EVC pretreated for 2 h with either a specific inhibitor of ERK phosphorylation (PD 98059, 10 nM) at different times (1, 4, or 6 h), a specific p38 kinase inhibitor (SB 203580, 1 μ M), APC (10 ng/ml), a specific anti-PAR-1 antibody, or recombinant human interleukin 8 (IL-8, 10 ng/ml). The samples were analysed by Western blotting.

IL-8 determination

IL-8 levels were determined in the supernatants of DV-infected HUVEC (MOI = 1.0, 0.1, or 0.01) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Conditions were optimised treating the recombinant human IL-8 (rh IL-8) as described by Kitting (22). Briefly, a microtiter plate was covered with 100 μ l (10 μ g/ml) of anti-IL-8 monoclonal antibody (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) in bicarbonate buffer (pH 9.6) and incubated overnight at 4°C. The plate was washed with 0.05% PBST (pH 7.4) and blocked with 200 μ l of BSA (BS 30; 2 h at RT). The samples were washed in PBST and 100 μ l of the following substances was added: recombinant human IL-8 protein or the supernatant (SN) of DV-infected cells; the SN of uninfected HUVEC; the SN of EVC stimulated with 10 ng/ml TNF- α , and/or the SN of EVC pretreated with the ERK inhibitor PD98059. The cultures were incubated for 1.5 h at 37°C, washed, and then

100 μ l/well of biotinylated anti-IL-8 antibody (5 μ g/ml) was added and the cells were incubated for 1.5 h at 37°C. After the samples had been washed three times, 100 μ l/well of streptavidin-peroxidase (Sigma) diluted 1:5,000 was added and the cells were incubated for 1 h at 37°C, followed by three rounds of washing. The color was developed for 15 min using 100 μ l of tetramethylbenzidine substrate (Sigma). The reaction was stopped with 50 μ l/well of 0.05 M sulfuric acid. The optical densities were determined in an ELISA reader at 450 nm, at least four times. A parallel assay was performed on cultures that had been pretreated with 10 ng/ml APC and/or a specific anti-PAR-1 antibody for 2 h before they were infected with DHF-DV (MOI = 1.0).

Propidium iodide analysis

DHF-DV (MOI = 1.0)-infected HUVEC, DHF-DV-infected HUVEC pretreated with 10 ng/ml APC, and HUVEC stimulated with TNF- α (10 ng/ml) were fixed with 4% paraformaldehyde for 1 h at RT, washed with PBS (pH 7.45), and incubated with 0.5 mg/ml RNase. The samples were stained with propidium iodide (50 mg/ml; Sigma) for 15 min at RT, and washed with PBS. The samples were analyzed under a fluorescence microscope.

Vascular permeability assay

An *in vitro* vascular permeability assay (Chemicon Kit ECM640) was performed using 24-well culture plates containing culture inserts with symmetrical pores and polyethylene membranes, which permit the diffusion of molecules. Briefly, HUVEC were seeded at 2×10^5 cells per collagen-coated insert and grown to confluence, and then infected with DF-DV or DHF-DV (MOI = 1.0) or stimulated with TNF- α (positive control) for 48 h. FITC-dextran was then added to the samples for 1 h. Parallel assays were performed using pretreated inserts with 10 ng/ml IL-8, 10 ng/ml APC, specific MAPK inhibitors (PD98059 for ERK1/2 and SB203580 for p38), or specific anti-PAR-1 antibody. The extent of cell permeability was determined by measuring the fluorescence of the solution in each well at 492 nm (in triplicate).

Statistical analysis

Data from at least three independent experiments assayed in triplicate were expressed as means \pm standard deviation (SD) and evaluated with Student's *t*-test and the Mann-Whitney *U* test, using the Statistical (version 6) program. The significance level was set at $p < 0.05$.

Results

Detection of TM in DV-infected EVC

TM was detected on the surfaces of DV-infected HUVEC (MOI = 0.01, 0.1, or 1.0) by FACS. TM expression was correlated with the mean fluorescence intensity (MFI). As a positive control, HUVEC were stimulated with 10 ng/ml TNF- α . We observed that DV caused the downregulation of TM in EVC, as shown in Figure 1A–D. TM expression decreased to 85% (Fig. 1A and B, pink and purple bars) in the presence of DHF-DV at 48 h post-infection (p.i.; MOI = 1.0 or 0.1) and this effect was more prominent than that observed in the presence of TNF- α (35%; mean

bar, Fig. 1B and D). HUVEC infected with DF-DV showed a 28% reduction in MFI (Fig. 1C and D, pink bar) in the presence of the highest dose (MOI = 1.0). To confirm these data, we performed a parallel immunohistochemical assay of DF-DV or DHF-DV (MOI = 1.0)-infected EVC for 48 h. We observed the presence of constitutive TM at the surfaces of uninfected cells (Fig. 1E, panel 1). However, the maximum reduction in TM was observed in DHF-DV-infected HUVEC (Fig. 1E, panel 3). These samples presented lower amounts of TM than the positive control (TNF- α Fig. 1E, panel 2). Nevertheless, in presence of DF-DV (Fig. 1E, panel 4) the cell surface TM amount was similar to the constitutive TM (Fig. 1E, panel 1). These data correlate with our cytofluorometric results. To evaluate whether the reduction in TM levels was the result of deleterious effects of DV infection on cell viability, we performed a cell viability assay using trypan blue staining of HUVEC cultures infected with DF-DV or DHF-DV isolates (MOI = 0.01, 0.1, or 1.0) for 48 h. EVC viability (Fig. 1F) was around 90–96% in all samples (infected and negative and positive control cells), demonstrating that there was no cell death attributable to Dengue cytotoxicity.

Evaluation of TM release and PAR-1/EPCR localisation

The possible liberation of TM (sTM) from the cellular membrane to the culture supernatants of DHF-DV-infected HUVEC (MOI = 1.0) was evaluated with a Western blot assay. We examined the proteins present in the membrane extracts and those in the supernatants at different times (6, 12, 24, and 48 h p.i.). The constitutive form of TM was detected in the uninfected cells (Fig. 1G, upper panel, lane 1), but the amount of this protein gradually decreased in DV-infected cultures as the period of infection increased (Fig. 1G, upper panel, lanes 2–5). We found no free TM in the SN of the uninfected cells (Fig. 1G, upper panel, lane 6). The major band detected with the monoclonal antibody corresponded to a protein of approximately 96 kDa, but in some cases we detected a minor dimeric isoform of TM. Figure 1G (lower panel, lanes 2 and 3) shows that DV infection caused the release of TM into the culture supernatant at 36 and 48 h p.i. No TM was present in the SN of the uninfected cells (Fig. 1G, lower panel, lane 1). As previously discussed, low levels of TM result in down regulation of APC causing proinflammatory diathesis [12], as in addition to its well-studied anticoagulant effect, APC also elicits potent cytoprotective and antiinflammatory responses when APC forms complex with endothelial protein C (EPCR) that acquires a different specificity, thus activating PAR-1. Therefore, we evaluated the presence of PAR-1 and EPCR at endothelial cell surface in presence of DV. We observed by immunolocalisation (using double label and confocal microscopy) that EPCR and PAR-1 were colocalised (yellow band Fig. 1 I–J, I–M) at cell surface level in DV-infected HUVECs (Fig. 1 H–P). The relative immunofluorescence intensity was higher in presence of DHF-DV than in DF-DV infected cells.

APC activity assay in DV-infected EVC

We also evaluated if down regulation of APC modifies the amidolytic activity of APC in HUVEC infected with DF-DV or DHF-DV with the help of a chromogenic assay. APC activity was reduced in the presence of both DV isolates at 48 h p.i. at all doses,

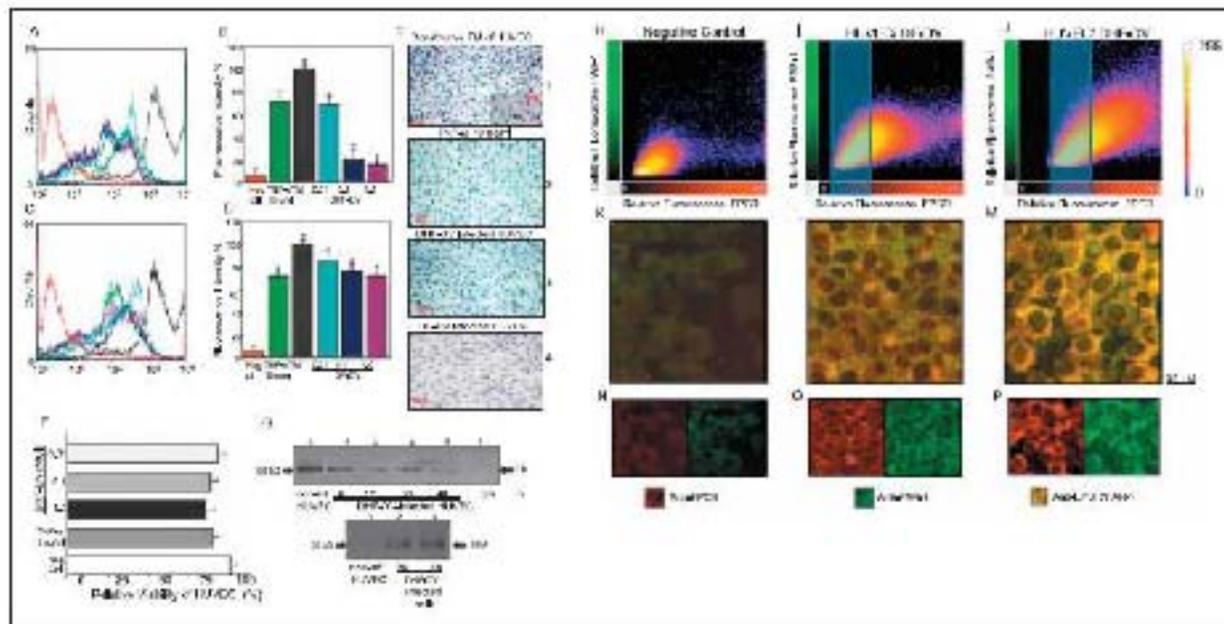


Figure 1: Detection of constitutive and free TM during DV infection of EVC. A–D) Determination of constitutive TM in HUVEC by flow cytometry. The histograms (A) and bars (B) correspond to the following samples: negative control (red), positive control (green), HUVEC cultures stimulated with 10 ng/ml TNF- α ; uninfected cells (black); DHE-DV-infected EVC at MOI = 0.01 (blue), or MOI = 0.1 (purple), and at MOI = 1.0 (pink). Figure 1C and D correspond to DHE-DV-infected HUVEC. Results are the means \pm SD of at least three independent experiments assayed in triplicate. * indicates p-values when samples in the presence of DV were compared with uninfected cells ($p < 0.05$). **E)** TM detection by immunohistochemistry assay. Panel 1 shows the constitutive form of TM at the cell surface of uninfected HUVEC cultures. Panel 2 shows the decrease in TM in HUVEC pretreated with 10 ng/ml TNF- α . TM was downregulated in DHE-DV-infected EVC (MOI = 1; panel 3) and DHE-DV-infected HUVECs (MOI = 1; panel 4) show similar TM amounts of constitutive TM. The data shown are representative of another three experiments that produced similar results. **F)** HUVEC viability assay. Endothelial cells were pretreated with 10 ng/ml TNF- α (grey bar) or infected with DHE-DV or DHE-DV at MOI = 0.01, 0.1, or 1.0. Open bar

shows the viability of uninfected HUVEC cultures. SD was calculated for each sample. **G)** Upper panel: TM identification in HUVEC cultures by Western blot assay. Uninfected cells (lane 1), DHE-DV-infected HUVEC (MOI = 1.0) at different time intervals (6, 12, 24, and 48 h p.i., lanes 2–5, respectively) and the culture supernatants (lane 6 and Fig. 1G lower). Lower panel: cTM in the SN of DHE-DV-infected cells at 36 and 48 h p.i. (lanes 2 and 3, respectively). Uninfected cells (lane 1). The data shown are representative of another three assays with similar results. **H–J)** Colocalisation of PAR-1 and EPCR receptors by confocal microscopy. The colocalisation of PAR-1 and EPCR was represented by the yellow zone. Panel H shows uninfected cells. Panel I colocalisation in DHE-DV-infected HUVEC; Panel J colocalisation in DHE-DV-infected HUVEC. The data shown are representative of another three experiments that produced similar results. **K–P)** Localisation of PAR-1 and EPCR by immunostaining. Panel K uninfected cells. Panel L PAR-1/EPCR immunolocalisation in DHE-DV-infected cells. Panel M PAR-1/EPCR immunolocalisation in DHE-DV-infected cultures. Panels N–P show independent immunostaining of PAR-1 and EPCR. The fluorescence values were given in arbitrary units ($p < 0.005$).

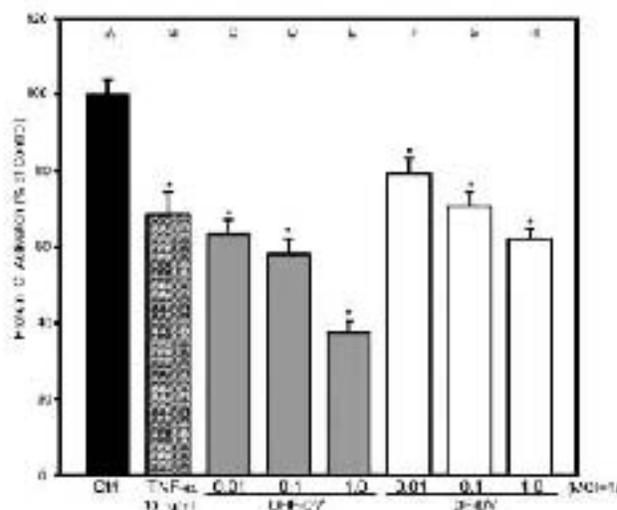
(MOI = 1.0, 0.1, and 0.01) compared with that of the uninfected cells, which were considered to have 100% amidolytic activity (Fig. 2A). The APC activity in DHE-DV-infected EVC decreased 70% at the highest dose (Fig. 2E), which was lower than that in the TNF- α -treated cells (Fig. 2B). APC activity in DHE-DV-infected cells decreased 40% at the highest dose (Fig. 2I). These data suggest that DV infection affects the formation of the TM-11b-PC complex and APC generation, mainly in the presence of DHE-DV, which is consistent with the cytofluorometry results.

Anti-inflammatory effect of APC in DHE-DV-infected EVC

In addition to its anticoagulant activity, APC has anti-inflammatory properties and downregulates the expression of inflammatory interleukins, such as IL-8. We evaluated the consequence of decreased APC activity on IL-8 production in endothelial cells in-

fecting with different doses of DHE-DV or DHE-DV at 48 h p.i., using an ELISA assay. We detected high levels of IL-8 at all doses of DHE-DV in infected cells (Fig. 3A, bars 3–5) when compared with that in uninfected cultures and negative control (Fig. 3A, bar 1 and 3) and with the positive control (TNF- α , 115.61 pg/ml, Fig. 3, bar 2). At MOI = 1.0, the amount of IL-8 was 180 pg/ml; at MOI = 0.1, it was 160 pg/ml; and at MOI = 0.01, it was 150 pg/ml. In cultures infected with high doses of DHE-DV (MOI = 1.0), the amount of IL-8 was 28.33 pg/ml (Fig. 3A, bar 9). Cytokine production in the presence of DHE-DV was higher than that in the positive control. To evaluate the participation of APC in cytoprotection, a parallel assay was performed using DHE-DV-infected HUVEC (MOI = 1.0) that had been pretreated with 10 ng/ml of recombinant APC (Fig. 3B). IL-8 production decreased by as much as 90% (Fig. 3B, bar 5) with respect to that in DHE-DV-infected EVC in the absence of APC (Fig. 3B, bar 4). The same ef-

Figure 2: APC activity assay during DV infection of EVC. Uninfected HUVEC (control A), cultures pretreated with 10 ng/ml TNF- α (B), DHF-DV-infected cells at different MOIs (0.01, 0.1, and 1.0 as bars C, D, and E, respectively), DHF-DV-infected EVC at MOI = 0.01, 0.1, and 1.0 (bars F, G, and H, respectively). Values represent means \pm SD of at least three independent experiments assayed in triplicate. * indicates *p*-values (*p* < 0.05) when samples in the presence of DV were compared with uninfected cultures.



fect was observed in TNF- α -stimulated cultures pretreated with APC (Fig. 3B, bars 2 and 3). However, the poor response of IL-8 in presence of the avirulent strain does not permit to evaluate the APC activity (Fig. 3B, bars 6 and 7).

The mechanisms involved during the induction of IL-8 in DV-infected EVC have remained elusive. In other viral hemorrhagic fevers, such as Ebola or Marburg, and in septic shock, the participation of MAPKs in this process has been established [23–25]. Therefore, we assessed whether IL-8 expression is under the control of ERK1/2 kinases in the vascular endothelium, using Western blot and ELISA analyses. ERK1/2 activation in DHF-DV-infected EVC (MOI = 1.0) was determined. Figure 4A shows that MAPK ERK1/2 was phosphorylated in the first 5 min and the signal gradually increased until 90 min, although at 180 min the signal began to decrease. Figure 4B shows the presence of constitutive ERK in HUVEC cultures. We also evaluated whether IL-8 production is under phospho-ERK control, using an inhibitory IL-8 ELISA in the presence of the specific ERK1/2 inhibitor PD98059 at different time intervals (1, 4, and 6 h) before DV infection. Figure 4C shows that IL-8 production was clearly inhibited in DHF-DV-infected cultures pretreated for 6 h with PD98059, and a concentration of only 39 pg/ml IL-8 was detected. To confirm these results, a parallel Western blot assay was performed. HUVEC cultures preincubated for 6 h with PD98059 showed the lowest ERK phosphorylation (Fig. 4C, top square 1). We then examined the possible activation of p38 during DV infection (DHF-DV, MOI = 1.0) of endothelial cells, using a Western blot assay. Figure 5A (lane 3) shows that, during DV infection, p38 was phosphorylated in the first 30 min, as in the positive control (TNF- α , lane 2), and as in the presence of IL-8 (lane 4). To evaluate the specificity of these data, a parallel assay was performed in the presence of the p38-specific inhibitor, SB203580 (10 μ M). The downregulation of p38 activation was evident in both the DHF-DV-infected cells and the EVC treated with 10 ng/ml IL-8 (Fig. 5A, lanes 5 and 6). A recent

study has indicated that genes that are upregulated by APC are also induced by agonist peptides of PAR-1 [26]. Therefore, we tested whether the APC response is mediated by the PAR-1-MAPK pathway, using Western blotting and ELISA. We first examined the possible activation of the MAPKs ERK1/2 in the presence of APC. Figure 5B (lane 2) shows the phosphorylation of ERK1/2 in HUVEC cultures pretreated with APC (10 ng/ml). A parallel assay was performed using specific anti-PAR-1 antibody. Phospho-ERK1/2 was downregulated in the presence of anti-PAR-1 antibody, as shown in Figure 5B, lane 6. In a similar assay, phospho-ERK1/2 was determined in DHF-DV-infected EVC (MOI = 1.0, Fig. 5B, lane 4) in the presence of specific anti-PAR-1 antibody. A significant reduction in phospho-ERK1/2 was also observed (Fig. 5B, lane 5). In a parallel IL-8 blocking assay (using specific anti-PAR-1 antibody) in DHF-DV-infected EVC (MOI = 1.0), IL-8 production was also downregulated in the presence of anti-PAR-1 antibody (Fig. 5C, lanes 3–6). Our data suggest that the phosphorylation of the MAPKs ERK1/2 induced by APC may be PAR-1 dependent, in a similar way to IL-8 production. These novel and important findings indicate the main role of the MAPKs p38 and ERK1/2 in the APC-PAR-1 signalling pathways regulating IL-8 induction, during DV infection of endothelial cells.

Role of APC and ERK1/2 or p38 MAPKs in EVC permeability

Based on the data presented here, we also explored the involvement of APC and ERK1/2 or p38 MAPKs in the endothelial barrier function during DV infection of HUVEC cultures (DHF-DV, MOI = 1.0), using a vascular permeability assay (Chemicon), as described in *Materials and methods*. Endothelial cells treated with only culture medium, were used as the positive control for monolayer integrity (Fig. 6B) in which no cell permeability was observed. These samples represent the background FITC-dextran values. Inserts without cell monolayers were considered the

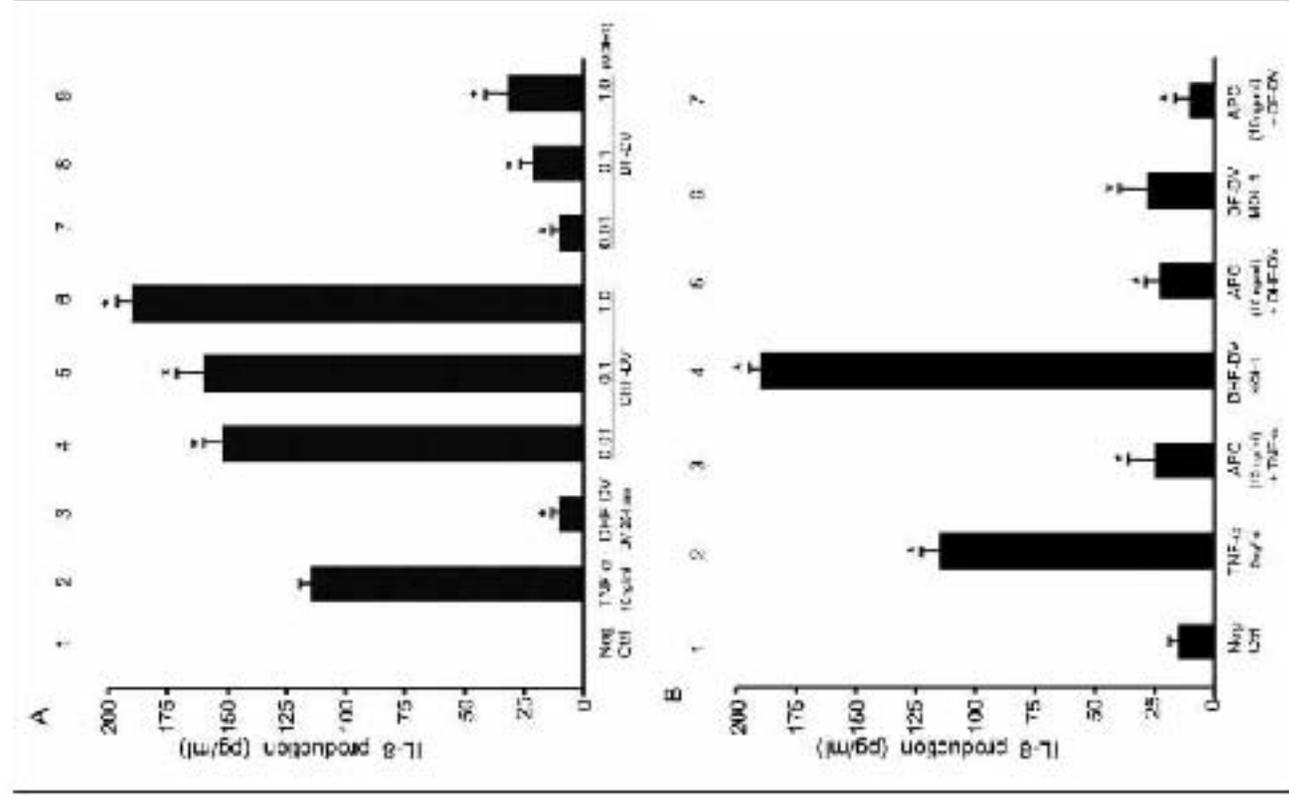


Figure 1: Cytoprotective effect of APC on DV-infected endothelial cells. We measured IL-8 in the presence of DENV or DENV-infected HUVEC (MOI = 0.01, 0.1, and 1.0), as shown in Figure 3A (lanes 4–9). Figure 3A lanes 3 show the IL-8 production in presence of DENV-HUVEC stimulated with 10 ng/ml TNF- α were used as the positive control (lane 2). In this figure, * indicates the p-value ($P < 0.05$) when samples in the presence of DV were compared with uninfected cells. We then assayed the cytoprotective effects of APC in TNF- α -stimulated or DENV-stimulated EVC (MOI = 1) pretreated (2 h) with 10 ng/ml APC (Fig. 3B, lanes 3, 5 and 7). * Indicates p-values ($P < 0.05$) when samples pretreated with 10 ng/ml APC were compared with nonpretreated cultures (lanes 2, 4 and 6).

100% permeability control (Fig. 6A). The DENV-DV-infected cultures displayed a notable increase in cell permeability (Fig. 6B), at a level similar to that of the positive controls treated with TNF- α or IL-8 (Fig. 6C and D). However, in the DENV-DV infected cells or IL-8-stimulated cultures pretreated with either APC (10 ng/ml, panels E and G) or the specific inhibitors of the MAPKs p38 and ERK1/2 (Fig. 6J and K), a partial protection in terms of the endothelial barrier was apparent. The poor response

of DENV-DV isolate with respect to the permeability effect could be due to evaluate the APC outcome (Fig. 6J and K). Our data support a partial barrier protective role for APC.

Assay of APC cytoprotection during DV infection of EVC

The protective role of APC during tissue injury has been well studied [7, 12, 13, 27–30]. We evaluated the possible cytopro-

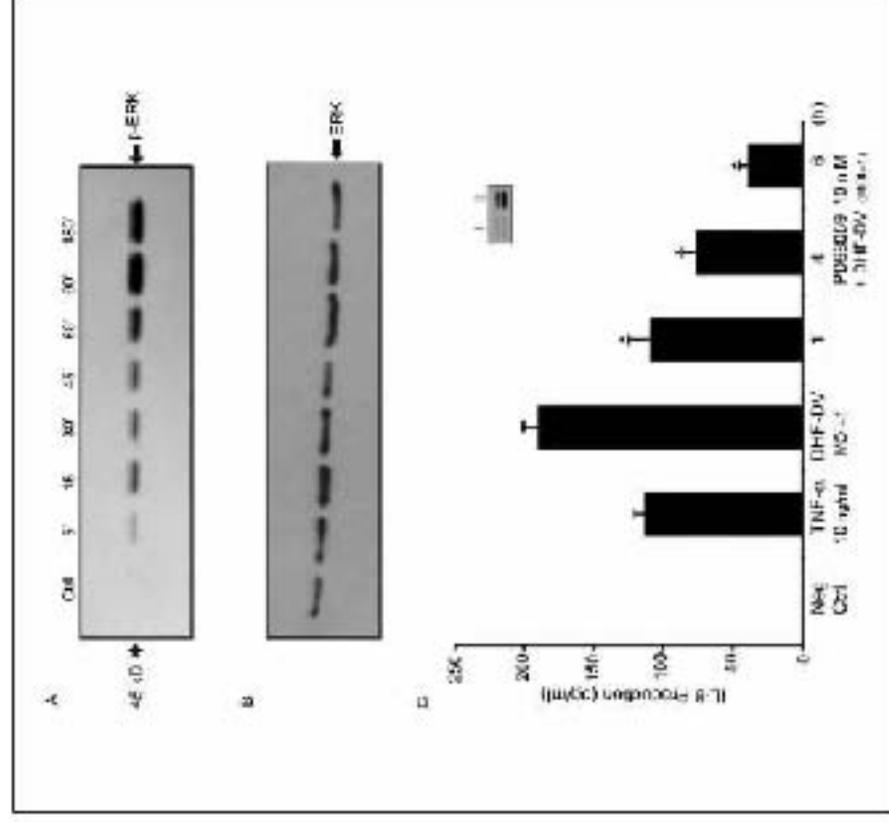


Figure 4: MAPK ERK1/2 activation in DV-infected EVC. MAPK (ERK 1/2) phospho-tylation (p) was detected by Western blot assay in the presence of DVH-DV. ERK activation was evident in the first 5 min and gradually increased with increasing infection time (Fig. 4A). Maximum p-ERK was observed at 90 min, and it started to decrease at 180 min. Lane 1 shows the uninfected HUVEC (Ctrl). Control: uninfected HUVEC (Ctrl). Figure 4C shows the effects of the ERK1/2-specific inhibitor PD360255 (μ -value based for 1, 4, or 6 h) on IL-8 production during DHF-DV (MOI = 1.0) infection of EVC. † indicates the p-values when samples in the presence of the ERK1/2 inhibitor PD360255 were compared with DHF-DV-infected cells in the absence of inhibitor ($p < 0.05$).

live capacity of APC in DHF-DV-infected HUVEC (MOI = 1.0), using propidium iodide staining of proapoptotic nuclei. Cultures infected with DHF-DV (MOI = 1.0) displayed proapoptotic nuclei, with high levels of propidium iodide accumulation (Fig. 7C) similar to those found in the presence of 10 ng/ml TNF- α (positive control). However, in the DHF-DV-infected cells pretreated for 72 h with 10 ng/ml APC before DV infection, a significant protective effect was observed as a reduction in the numbers of proapoptotic nuclei (Fig. 7E). A similar effect was observed in HUVEC cultures stimulated with TNF- α and pretreated for 72 h with 10 ng/ml APC (Fig. 7E). We found no apoptotic nuclei in the negative control (Fig. 7A) or in the presence of UV-inactivated DHF-DV (Fig. 7D).

Discussion

The pathogenesis of DHF/DSS has been explained by two theories. Loon Rosen's hypothesis (31–32) is based on the virulence of DV isolates and Halstead's theory on immunopathogenesis in the course of a secondary infection (33). Both hypotheses are supported by epidemiological and experimental data, both appear to represent different aspects of the same phenomenon, and they are not mutually exclusive. Both are probably valid but un-

fortunately there are no good animal models of DHF/DSS, which makes studies of their pathogenesis difficult to interpret. DHF/DSS are determined by multiple factors, such as the host's immunological status, host age, genetics, intercurrent infections and DV virulence among others (epidemiological factors).

Current hypotheses are insufficient to explain some clinical manifestations, such as the thrombocytopenia and haemorrhagic fever caused by endothelial activation (damage). Vascular pathology is the result of endothelial dysfunction, caused by both direct (viral factors) and indirect (host factors) mechanisms, that ultimately targets vascular endothelium (making it better field) leading to severe disease. Unquestionably, DV can infect endothelial cells *in vitro* (27–39), which have been used widely to study the pathophysiological changes that occur during DV infection, to answer questions raised in patients with DHF/DSS. Most of the DHF/DSS pathogenic mechanistic information has come from *in-vitro* experiments and remains to be translated to human patients. However, these *in-vitro* experiments have generated useful knowledge about the mechanisms that may be occurring intracellularly.

Because strong and consistent clinical evidence suggests that vascular activation (or damage) is involved in the pathophysiology of DHF/DSS, many groups have demonstrated data *ex vivo*

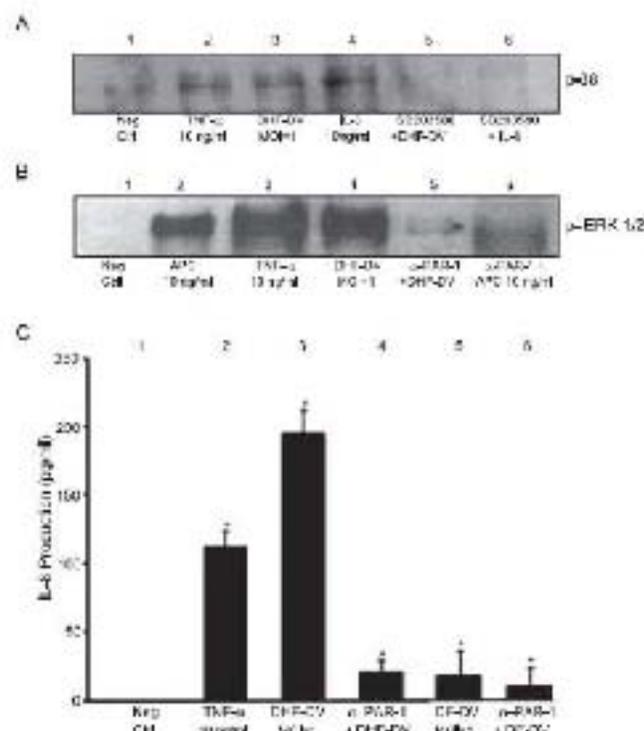


Figure 5: Role of APC, PAR-1, and MAPKs (p38 and ERK 1/2) in the inflammatory response of endothelial cells in the presence of DV. A) Activation of p38 during DV infection of HUVEC (lane 2) or in the presence of TNF- α (lane 3) and I- β (lane 4). We evaluated the specificity of these data in a parallel assay in the presence of a p38-specific inhibitor (lanes 5 and 6). B) Activation of MAPKs ERK1/2 in HUVEC pretreated with 10 ng/ml APC (lane 2), which is similar to the activation in DHF-DV-infected HUVEC (lane 4) or in cultures stimulated with TNF- α . However, a downregulation of p-ERK1/2 was observed in the presence of DV or in APC-stimulated cultures that had been pretreated with anti-PAR-1 specific antibody (lanes 5 and 6). The results presented here are representative of another three experiments with similar results. C) Production of IL-8 in DHF-DV-infected cultures pretreated with specific anti-PAR-1 antibody. The results in Figure 5C are the means \pm SD of at least four independent experiments assayed in triplicate. * Indicates the p-value ($p < 0.05$) when HUVEC infected with DV and pretreated with anti-PAR-1 antibody were compared with cultures infected with DV but in absence of anti-PAR-1 antibody.

(34–36), *in vitro* (32, 37–39) and *in vivo* (40–42) for the EVC participation. Therefore, Donner and O'Sullivan (37) proposed the use of EVC as an appropriate model for studying DSS. Accordingly, we employed de HUVEC monolayers as our model. Here, we present novel insights into the participation of DV in endothelial cell modifications of the cytoprotective protein C pathway. Inflammation, coagulation, apoptosis, and barrier protection are essential parts of the host's defensive response during tissue damage (3) and have several convergent points of interaction (cross-talk) via the protease-activated receptors (PARs). PARs are molecules coupled to G-proteins, which are involved in regulatory signalling pathways (14, 26, 29). The first link between these processes is mediated by the vascular endothelium (5), which localises and promotes the diverse biochemical transformations involved in the cytoprotective APC pathway (PC activation, APC anticoagulant activity, anti-inflammatory effect, antiapoptotic response, and endothelial barrier stabilization). Because of its pleiotropic activities, APC has a potential role in the treatment of complex disorders, including sepsis, thrombosis, and ischemic stroke among others (29, 30). Therefore, we evaluated the basic mechanisms that could regulate these processes during dengue virus infection of EVC. We examined the TM-TB-PC complex at the endothelial surface (which plays a key role in APC generation) in the presence of DV. Recently, Butler (16) and Sosothikul (4) have reported elevated sTM levels in the plasma of patients with DF during the toxic phase of the dis-

ease, suggesting damage to (and specific activation of) vascular endothelial cells. Patients with DSS (DHF grade III or IV) show higher concentrations of sTM than those of patients with DF or DHF grades I and II. In both studies, sTM levels correlated with the severity of the disease.

Blood sTM was proposed as an early predictor of DSS during the febrile stage (16). However, the role of DV in the development of the vasculopathy that presents during DSS is unclear. We observed that, in the presence of DHF-DV (MOI = 1.0), the amount of TM at the endothelial surface was reduced to 85% relative to that of uninfected cells (Fig. 1A and B). This effect was more prominent than those in cultures pretreated with TNF- α (positive control). The DHF-DV-infected HUVEC (MOI = 1.0) showed a 28% reduction in MIT in the cytofluorometric analysis, and these data are similar to the TNF- α response (Fig. 1D). We demonstrated that the reduction in TM at the EVC surface is associated with the presence of DV, because the surface TM gradually decreased as the infection proceeded (Fig. 1G, upper panel). In agreement with this, the level of sTM was elevated in the SN of DV-infected cultures, and this was more evident at 26 and 48 h p.i. (Fig. 1G, lower panel). These data strongly suggest the participation of DV in EVC alteration and may explain the presence of sTM in the plasma during the febrile phase in patients at risk of DSS, as reported by Butler (16).

TM is a cell-surface receptor that plays a critical role in endothelial anticoagulant activity through its cofactor function

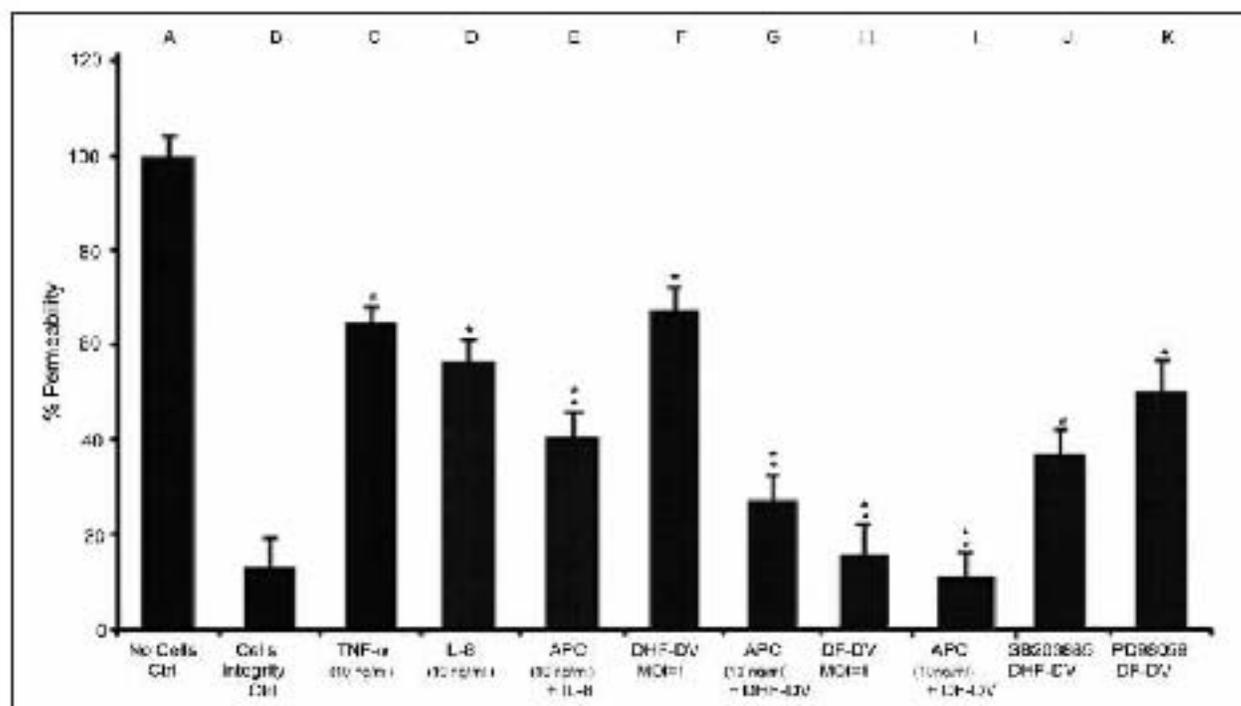


Figure 6: Assay of APC participation in endothelial barrier protection. We evaluated the participation of APC and MAPKs (ERK1/2 and p38) in the endothelial barrier function during DV infection of EVC, using a vascular permeability assay as described in Materials and methods. Figure 6 (bar B) shows HUVEC in the presence of culture medium only, which represents the monolayer integrity of the positive control. The inserts with no cell monolayer (bar A) represent the 100% permeability control. The percentage EVC permeability in the presence of TNF- α (bar C), IL-8 (bar D), APC+IL-8 (bar E), DHF-DV MOI = 1.0 (bar F),

APC+DHF-DV (bar G), DF-DV (bar H), APC+DF-DV (bar I), SB203685+DHF-DV MOI = 1.0 (bar J), or PD98059+DHF-DV MOI = 1.0 (bar K) are shown. The data are representative of three independent experiments assayed in triplicate, and are shown as mean \pm SD. * Indicates the p-value ($p < 0.05$) when all samples were compared with the integrity control cells, and when pretreated APC samples when compared with DV-infected HUVECs. Δ indicates p-value ($p < 0.05$) when DF-DV were compared with APC+DF-DV.

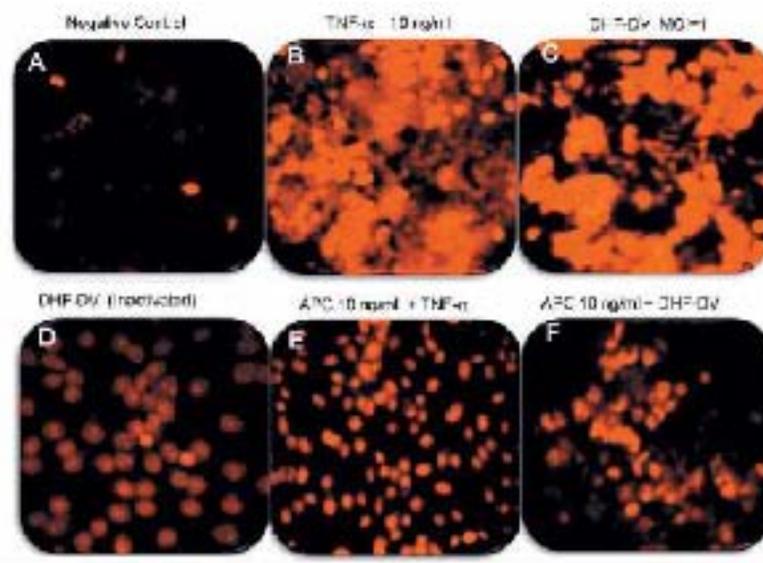


Figure 7: Antiapoptotic APC activity in DV-infected EVC. Propidium iodide staining of propoptotic nuclei was determined in the following samples: uninfected HUVEC (negative control, panel A), HUVEC pretreated with TNF- α (panel B), DHF-DV-infected EVC MOI = 1.0 (panel C), DHF-DV (UV inactivated) MOI = 1.0 (panel D), TNF- α -stimulated EVC pretreated with 10 ng/ml APC (panel E), and DHF-DV (MOI = 1.0)-infected HUVEC pretreated with APC (panel F). The assays are representative of at least three experiments with similar results.

during the thrombin-catalysed activation of human protein C (the most important vasoprotective molecule). It is well known that the downregulation of TM causes low APC levels, promoting procoagulant and proinflammatory diathesis (5–6). We evaluated the APC activity in HUVEC cultures infected with DHF-DV or DHF-DSS. We observed the downregulation of the TM-TB-PC complex (Fig. 2) and found that DV modifies the anti-thrombotic state of the EVC surface. The transformation of the anticoagulant/anti-inflammatory state into a procoagulant/proinflammatory phenotype in vascular cells is of foremost im-

portance. Similarly, high levels of IL-8 production in DHF-DV-infected cultures (Fig. 3A) were detected, which agrees with the previous clinical observations by Rajgopal (43), who demonstrated a correlation between elevated levels of IL-8 in patients with grade III or IV DHF/DSS and low levels of IL-8 in DF patients. Our study confirms the participation of APC in the anti-inflammatory response of EVC during DV infection (Fig. 3B), because DHF-DV-infected cells pretreated with 10 ng/ml APC displayed downregulated IL-8 production. We also demonstrated the contribution of MAPKs (ERK1/2 and p38) to IL-8 expression in DHF-DV-infected cells. The specificity of these data was confirmed by the assay in which MAPK phosphorylation was inhibited because the pharmacological inhibition of these protein kinases downregulated IL-8 production (Figs. 4C and 5B). It has also been reported that APC initiates intracellular signalling via the activation of PAR-1 and EPCR receptors (14, 26). We found that in absence of TM (Fig. 1G), PAR-1 and EPCR are present (Fig. 1H–M), which suggests their participation in this process. In a recent study, Bae et al. (14) provided some insight into the PAR-1-dependent signalling mechanisms, demonstrating that both EPCR and PAR-1 are associated with caveolin-1 within lipid rafts of HUVEC in which the occupancy of EPCR by APC, leads to dissociation of EPCR from caveolin-1 and recruitment of PAR-1 to a protective signalling pathway. Figure 5C shows that in DHF-DV-infected cultures pretreated with specific anti-PAR-1 antibody, IL-8 was downregulated. Similarly, when DHF-DV-infected cells were pretreated with APC or anti-PAR-1 antibody, phospho-ERK1/2 was reduced (Fig. 5B). Meza (44) and Lee (45) reported that the release of IL-8 induces an increase in vascular permeability, during DV infection of endothelial cells. We have presented novel data relating to the endothelial barrier stabilisation mediated by APC during DV infection of EVC. Figure 6 (panels E and G) shows that DV-infected cells that had been pretreated with APC were less permeable than cells not treated with APC. We also observed that a barrier protective effect can be induced (at least in part) by the MAPKs p38 and ERK1/2.

In the present study, we also observed the participation of APC in the downregulation of the apoptotic response induced by the DV infection of EVC. Laguna (46) and Malsada (47) proposed that apoptosis contribute to pathogenesis and tissue damage during Dengue virus infection. APC reduces organ damage in animal models of sepsis and directly prevents apoptosis in hypoxic human brain endothelium (48, 49). There is some evidence that the APC antiapoptotic function is independent of its anticoagulant properties, in that two APC mutants with substantially reduced anticoagulant activity retain their antiapoptotic effects (50). Both basic and clinical studies have provided an extensive body of research into the cytoprotective role of the protein C pathway (12–13, 15, 51). Our data support this idea. Figure 8 shows a schematic representation of our experimental findings, which may explain different aspects of DHF/DSS pathogenesis. In Figure 8A, we indicate physiological EVC homeostasis via anti-thrombotic and cytoprotective effects in uninfected cells. However, during the DV infection of EVC (mainly in the presence of the more aggressive viral isolate), we observed an endothelial surface transformation of the anti-inflammatory/anticoagulant state into a procoagulant/proinflammatory phenotype.

What is known about this topic?

There is no safe vaccine, no experimental animal model and no specific treatment (antiviral) for Dengue virus (DV) infection. The pathogenic mechanisms of the severe forms of the disease, such as Dengue shock syndrome (DSS) and Dengue haemorrhagic fever (DHF) are not fully understood.

The vasculopathy observed during DHF/DSS is the result of endothelial dysfunction caused by both direct (viral factors) and indirect (host factors) mechanisms, but to date research on Dengue pathogenesis has almost exclusively relied on studies of host factors. Very few reports of viral factors are available.

- Recently, we found that during endothelial vascular cell (EVC) injury caused by an aggressive DV isolate, tissue factor is up-regulated, which favors thrombin generation and the activation of the protease activated receptor type-1 (PAR-1). We also demonstrated that PAR-1 (inflammation) and TF (coagulation) receptors can be down-regulated in the presence of MAPK's (p38 and ERK1/2) specific inhibitors suggesting a link between coagulation and inflammation.

What does this paper add?

- We reported for the first time, the downregulation of the cytoprotective protein C pathway (inflammation-coagulation, apoptosis and barrier protection) in human endothelial vascular cells (EVC) during DV infection.
- We present novel data on the specific activation (damage) of EVC by DV, that causes thrombomodulin (TM) release, which affects the formation of the TM-thrombin-protein C complex and APC generation, that modify the anti-thrombotic/anti-inflammatory state into a procoagulant/proinflammatory phenotype of endothelial vascular cells, which could be explain the vascular damage (vasculopathy) observed during DHF/DSS.
- Furthermore, we observed that APC cytoprotective regulatory pathways involve the MAPK's, p-38 and ERK 1/2 pathways via PAR-1 and EPCR receptors during the DV infection of EVC.
- This study provides new perspectives and has implications in the design of appropriate (e.g. pharmacological administration of APC) therapies to target the thrombo-inflammatory responses that occur during DHF/DSS.

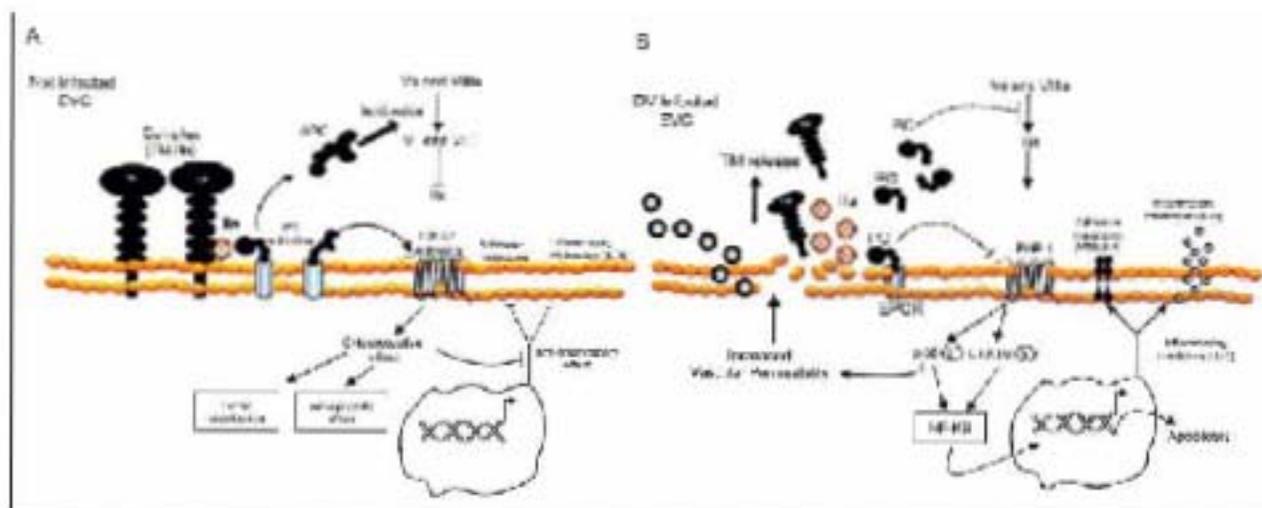


Figure 2: Role of the TM-TB-PC complex during DV infection of endothelial cells. In this model, we summarize the possible regulatory signaling pathways involved in FVC activation, which might explain different aspects of DHF/DSS pathogenesis. A) Physiological FVC homeostasis in terms of the anticoagulant and cytoprotective effects in uninfected cells. However, during DV infection of EVC (panel B), we observed an endothelial surface transformation of the anti-inflammatory/anticoagulant state into a procoagulant/proinflammatory phenotype. DV induces TM release (sTM), affecting the formation of the TM-TB complex, altering both the anticoagulant and cytoprotective protein C pathways and destabilizing the endothelial barrier, producing increased vascular permeability. Our data support the involvement of the MAPKs, p38 and ERK1/2, and PAR-1 response in this process.

DV causes TM release (sTM), which affects the formation of the TM-TB complex and alters both the anticoagulant and cytoprotective protein C pathways. Our data support the involvement of the MAPKs p38 and ERK1/2 in this process. This study provides a new perspective and has important implications for the design of appropriate therapies to target the thrombo-inflammatory responses that occur during DHF/DSS. It is well known that the pharmacological administration of APC reduces the mortality associated with severe sepsis in humans (Recombinant Human Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis [PROWESS] clinical trial) (51, 52) and in murine injury models. The cytopro-

teactive effects of APC may also be of fundamental importance during the control of DSS.

Acknowledgements

We wish to thank Dr. Daniel Nájera, Dr. Escobedo and Dr. Ramirez of the Gynecology and Obstetrics Clinic No. 4 of the Mexican Institute for Social Security (IMSS) for their generous donation of the biological material for establishing primary cultures. We also thank the CONACYT and PAPPEI Program of DGA/UNAM, for their financial support. We are grateful to Dr. Freddy Chumbe, C. Castellanos and Dr. Luis Viza for their support in the Confocal microscopy image and the Biomedical Science PhD program (PDCB) - UNAM. We thank also to Ma. Lora Reyes for writing support.

References

- World Health Organization. www.who.int/emery/coups/en/whodoc/wklydr0604.pdf
- Reshadi SN. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988; 229: 406-411.
- Selvaraj C, van Camp EC, Selvaraj TE, et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb Haemost* 2001; 87: 43-48.
- Soschinski D, Selvaraj E, Figueiredo S, et al. Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection. *Thromb Haemost* 2007; 97: 627-634.
- Shinkovskaya S. Blood coagulation-dependent inflammation: Coagulation dependent in the arteries and in fibrinolysis dependent thrombolysis. *Thromb Haemost* 2006; 11: 26-30.
- Selvaraj M, Nairanjan WL, Laxmi M, et al. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Intensive Care Med* 2008; 23: 1-10.
- Coffin B, Fernandez JA, Cole AJ, et al. Activated protein C. *J Thromb Haemost* 2007; 7: 75-80.
- Kaabe KL, Bernsdorfer A, Shen L, et al. Probing the activation of protein C by the thrombomodulin-thrombin complex using structural analysis, site-directed mutagenesis, and computer modeling. *Proteins* 1999; 35: 218-234.
- Tsai SN, Hayward RS, Levin M. Coagulation in severe sepsis: A central role for thrombomodulin and activated protein C. *Crit Care Med* 2001; 29: S62-S68.
- Lakkhaves AV, Bevilacqua AR, Idell S. Thrombomodulin-mediated inhibition of protein C by plasma endothelial and vascular endothelial cells. *Thromb Haemost* 2007; 98: 627-634.
- Wenke H. Some models of thrombotic endothelial cells. *Thromb Haemost* 2005; 95: 467-477.
- Morales LO, Zickovic BV, Griffin JL. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2006; 108: 2151-2152.
- Cañales E, Medina F, Novaro S, et al. The multi-functional protein C system. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2007; 7: 119-131.
- Das JS, Dennis AR. Proteinase-activated receptor-1 (PAR-1) activation by thrombin is protective in human pulmonary artery endothelial cells if endothelial protein C receptor is occupied by its natural ligand. *Thromb Haemost* 2008; 100: 101-109.
- Yoon SH, Lee M, Hwang JH, et al. Dysfunction of endothelial protein C activation in acute meningococcal sepsis. *N Engl J Med* 2001; 345: 405-416.
- Montoya A, Chhabra N, Jangamreddy K, et al. Elevated soluble thrombomodulin in the critical stage related to patients at risk for dengue shock syndrome. *Polish J Med Sci* 2004; 75: 804-809.
- Sánchez JL, Ruiz DE. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 (American strain) leads to increased virulence in mice. *J Gen Virol* 1998; 79: 2541-2545.
- Olson E. Culturing of human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells. In *Cell Biology* 1998; 1: 142-147.
- Wong MW, Deng Y, Barth U, et al. Release of endothelial nitric oxide from all cells by essential action of TNF alpha and endothelin in vivo and in vitro studies. *Immunology* 1996; 87: 134-143.

20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
21. Cadroy Y, Dupeluis A, Uggouy D, et al. The thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor pathway modulates the fibrinolytic properties of the normal coagulation and fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 520-527.
22. König HJ, Temperton W, Rajjani D, et al. Determination of human neutrophil factor alpha levels in dengue virus infected patients by sensitive biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods* 2000; 99: 51-57.
23. Chang EI, Ponsard-Sevan JA, Kallams S, et al. Haemorrhagic virus and double-stranded RNA increase human vascular permeability: role of p38 MAPK. *J Clin Immunol* 2005; 26: 406-416.
24. Bonger J, van den Briel R, Weijer S, et al. Inhibition of coagulation, fibrinolysis, and endothelial cell activation by a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxaemia. *Blood* 2003; 101: 4446-4448.
25. Noll M, Noll-Bayr C, Fischer D, et al. Activated protein C downregulates p38 mitogen-activated protein kinase and improves clinical parameters in an *m-vivo* model of septic shock. *Thromb Haemost* 2007; 98: 1118-1126.
26. Russell HM, Peterson RE, Domsch A, et al. Activated protein C signals through the thrombin receptor PAR1 in endothelial cells. *J Endothel Res* 2003; 9: 317-321.
27. Jayo DE, Cibral J, Garcia A, et al. Gene expression profile of endothelial protein defines new mechanisms mediating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 11199-11201.
28. Forstner C, Schaeffrich RA, Mosnier LO, et al. Selective signaling by activated protein C is mechanistically linked to protein C activation on endothelial cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 20977-20984.
29. Okajima K. Regulation of inflammatory responses by activated protein C: the molecular mechanism(s) and therapeutic implications. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 137-161.
30. Macias WL, Yan SL, Williams MD, et al. New insights into the protein C pathway: potential implications for the biological activities of drotrecogin alpha (activated). *Crit Care* 2005; 9: S38-S42.
31. Barnes WS, Reese L. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. *Am J Trop Med Hyg* 1974; 23: 495-497.
32. Rowland J. The mosquito-borne viruses and their functions in the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26: 337-341.
33. Hobden SB. Immunopathological parameters of dengue haemorrhagic syndrome. In: *The Dengue Virus*. New York: Academic Press, 1980: 107-123.
34. Sahapong S, Riangprohok S, Bhamarapravati N, et al. Electron microscope study of the vascular endothelial cell in dengue haemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1981; 11: 194-204.
35. Karnes C, Sánchez G, Pardo RH, et al. Dengue virus in the brain microvascular endothelial cells of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurosci* 1998; 4: 485-488.
36. Bhamarapravati N, Tachibana D, Bomyaratkul V. Pathology of Thailand hemorrhagic fever: A study of 10 autopsy cases. *Ann Trop Med Parasitol* 1993; 61: 500-510.
37. Bonger S, O'Sullivan MA. Endothelial cell monolayers as a model system to investigate dengue shock syndrome. *J Virol Methods* 1998; 71: 135-167.
38. Eyo-Ohie HN, Fawcett R, Chin GS, et al. Dengue virus infection of human microvascular endothelial cells from different vascular beds promotes both common and specific functional changes. *J Virol* 2006; 78: 229-242.
39. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *PLoS Immunol Med Microbiol* 2003; 3: 287-289.
40. Limenta D, Capó V, Torres G, et al. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J Clin Virol* 2007; 45: 50-54.
41. Jesse K, Long MY, Devi S, et al. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunofluorescence and antibody inhibition. *J Infect Dis* 2001; 183: 1411-1418.
42. Barth OM, Torres DE, Pao MV, et al. Morphological studies in a model for dengue 2 virus infection in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 905-915.
43. Raghupathy S, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, et al. Elevated levels of IL-8 in dengue haemorrhagic fever. *J Med Virol* 1998; 56: 280-285.
44. Talavera D, Carillo AM, Dominguez MC, et al. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization contribute to permeability increase induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol* 2004; 85: 1801-1813.
45. Fan YR, Liu MT, Lai PY, et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol* 2006; 87: 3621-3630.
46. Espino JM, Wilson NJ, Hernandez JM, et al. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor- α caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 68: 63-71.
47. Matsuda T, Akao M, Tamita M, et al. Dengue virus induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Gen Virol* 2005; 86: 1655-1665.
48. Cheng T, Liu D, Griffin JJ, et al. Activated protein C blocks p38-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Naturo Med* 2003; 9: 338-342.
49. Domster E, Bannister O, Griffin JJ, et al. Activated protein C blocks cytokine-induced flux in human brain endothelium via binding to endothelial protein C receptor and activation of protease-activated receptor 1. *Blood* 2003; 101: 4797-4801.
50. Mosnier LO, Gale AJ, Yegorovskan S, et al. Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity. *Blood* 2004; 104: 1710-1714.
51. Demaree GR, Vincent JL, Lacerre FJ, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344: 690-698.
52. Bennett GB, Vesovic D, Joyce DE, et al. Safety assessment of drotrecogin alpha (activated) in the treatment of adult patients with severe sepsis. *Crit Care* 2003; 7: 155-165.