



**UNIVERSIDAD  
NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**



---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**EXPRESIÓN DEL RECEPTOR TROMBOGÉNICO  
FACTOR TISULAR (TF) EN MONOCITOS  
ESTIMULADOS CON EL VIRUS DENGUE**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A**

**BIÓL. JANET GARCÍA PILLADO**

**TUTOR:**

**DRA. BLANCA H. RUIZ ORDAZ**



**México, D. F., abril 2011.**



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.

## **DEDICATORIA:**

A la Vida que me ha dado tanto...

...Me ha dado el sonido y el abecedario  
con él las palabras que pienso y declaro...

...Me dio el corazón que agita su marco  
cuando miro el fruto del cerebro humano...

**† A la memoria de Soco**

## **Agradecimientos I**

### **A la Dra. Blanca Ruiz Ordaz:**

Por la oportunidad primero de trabajar en su laboratorio para aprender y formarme como científico; luego por creer en mí, en lo que hago y en lo que puedo hacer. Porque bajo ninguna circunstancia ha dejado de brindarme su apoyo: ora en el laboratorio, ora en los seminarios, luego en la oficina; y finalmente, por su ejemplo como investigadora de gran calidez y compromiso humano. Mi estima, admiración y respeto a su persona.

### **A la Dra. Verónica Monroy Martínez:**

Primero por su apoyo en el laboratorio, particularmente con el manejo y cuidado de los cultivos celulares, del virus Dengue, por su asesoría con las técnicas de ELISA y de Citometría de Flujo y todo lo que sea necesario para el uso de reactivos y manejo de equipos. Luego por su apoyo no solo en las discusiones para solucionar los problemas cuándo no resultan los ensayos como uno espera, sino en aquellos momentos en donde las palabras de ánimo y consejo son valiosas. Por todo ello debo expresar mi aprecio y respeto hacia Ud.

### **A Miguel Tapia:**

Por su valiosa ayuda con el uso de los Microscopios Invertido y Confocal y la captura de todas las micrografías que presento en esta tesis.

### **Al QFB Carlos Castellanos:**

Por su asesoría en la adquisición de muestras en el Citómetro de Flujo FascCalibur

### **Al Dr. Carlos Cabello Gutiérrez:**

Por su apoyo para la detección de TNF $\alpha$  por ELISA, por su tiempo y paciencia.

### **A todos y cada uno de mis colegas y al mismo tiempo queridos amigos del laboratorio:**

desde Jorge-súper cassiopeo-, Carlitos, César- mi ex concubino-, Adri (gran amiga de tanto tiempo), Gibrán, Gaby –mi rémorita-, Verito, Jomarpoa hasta Jaqui; por sus valiosas observaciones y sugerencias, por su apoyo cuando los experimentos no salen, por las ideas compartidas, en los seminarios y por sobre todo, por su cálida compañía como mi familia en mi otra casa, es decir, en el laboratorio.

## Agradecimientos II

A mi mami, que siempre me acompañas en este camino que a veces parece interminable; por el aliento que me das cada día para continuar y por el amor que me has enseñado a tener por la vida, por mi vida.



A mi hermano, mi borregüito, que por sobre todo, siempre has estado ahí para mí, cómo sea y en dónde sea... tu apoyo fue determinante pero tu cariño imprescindible.



A mi hermana Chiquis, por tu apoyo y cariño, por la severidad de tus consejos y por lo mismo útiles así como por el ejemplo que me das cada día con tu empeño y dedicación en lo que haces.



A mi querida Alejandra, “la pareja”, por haberte quedado quietecita en el momento preciso para que pudiera encontrarte, le has dado otro sentido a todas aquellas cosas que parecían nimiedades y que por ello ahora somos compañeras en sueños de toda clase, porque volar como vuelas, tienes un pedacito en mi vida!



A mi Joel, por tu amor infinito... por llegar a la playa de mi vida y alentarme cuando la pesadez y cansancio se empañaron en acompañarme.



A todas las personas que de una u otra forma me han acompañado en esta vida, particularmente mientras hago lo que amo hacer: esta tesis como ejemplo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por dejarme seguir formándome en ella, por la oportunidad de enriquecer mi vida como bióloga de los virus y como ser humano.



Al posgrado por todas las oportunidades que nos brinda para prepararnos y continuar haciéndolo.



A CONACyT, por la beca otorgada para obtener el grado de maestra en ciencias: Becaria (CVU) Así como por los recursos para la adquisición de reactivos y equipo para llevar a cabo todos los ensayos de esta tesis.

Los virus vienen y se van,  
mientras algunos se adaptan y sobreviven,  
otros desaparecen.

(Eigen, 1993)

## RESUMEN

### **Expresión del receptor trombogénico Factor Tisular (TF) en monocitos estimulados con el virus Dengue.**

La incidencia del Dengue se ha incrementado en las dos últimas décadas. Aproximadamente un 40% de la población mundial se encuentra en riesgo de presentar la enfermedad. La OMS refiere 50-100 millones de casos de Dengue al año en el mundo y aproximadamente un 2,5% de los afectados fallecen. El Dengue severo se caracteriza por alteraciones hemostáticas como la CID cuyos mecanismos etiopatogénicos no están totalmente entendidos. El TF es el receptor fisiológico de inicio de la cascada de coagulación. La sobreexpresión del TF en monocitos ha sido asociada con alteraciones trombóticas como la CID. Este receptor puede ser liberado al torrente circulatorio en forma de MPs que pueden inducir efectos biológicos en células como el endotelio vascular. Se ha reportado que existe una asociación de los niveles elevados de TF en pacientes con Dengue severo. Estudios previos de nuestro grupo confirmaron la participación del TF en la alteración de la regulación de la hemostasia a nivel del endotelio vascular durante la infección por DENV. Los monocitos-macrófagos son las principales células diana para el DENV las cuales se activan en presencia del virus por lo que se propone que la activación de monocitos humanos por el DENV, favorece la sobreexpresión del receptor TF y la formación de micropartículas derivadas del monocito. En este trabajo se observó que el DENV es capaz de activar a los monocitos induciendo cambios de adherencia, tamaño y morfología desde las 6 hpe así como la producción de la citocina pro-inflamatoria TNF $\alpha$  siendo a las 12 hpe cuando se dió su máxima producción. Mediante ensayos de citometría de flujo se detectó la expresión de TF en la superficie membranal de monocitos estimulados con DENV de manera dosis dependiente desde las 6 hpe mientras que la máxima expresión de TF se presentó a las 12 hpe. Finalmente, se observó por citometría de flujo y microscopía confocal, que el DENV induce la formación de MPs a partir de los monocitos THP-1 estimulados con DENV desde las 6 hpe, siendo a las 12 hpe cuando se detectó el nivel más elevado de MPs. Por lo anterior, el DENV es capaz de favorecer la activación de la respuesta proinflamatoria y procoagulante en monocitos humanos. En el presente estudio se reporta por primera vez, la formación de micropartículas, derivadas de monocitos activados por DENV.

Abreviaciones: **OMS**, Organización Mundial de la Salud; **DHF/DSS**, Fiebre Hemorrágica por Dengue / Síndrome de Choque por Dengue; **CID**, Coagulación Intravascular Diseminada; **DENV**, Virus Dengue; **TNF $\alpha$** , Factor de Necrosis Tumoral alfa; **TF**, Factor Tisular; **MPs**, micropartículas **hpe**, horas post estimulación.

# ÍNDICE

Página:

1. INTRODUCCIÓN.	
1.1. Epidemiología.	2
1.2. El virus Dengue.	4
1.3. Cuadro Clínico del Dengue (OMS, 2009).	6
1.3.1. Fase febril o Dengue Clásico	6
1.3.2. Fase Crítica.	7
1.3.3. Fase de Recuperación.	8
1.3.4. Dengue Severo.	8
1.4 Fisiopatología del Dengue Severo (DHF/DSS).	9
1.4.1. Inmunopatogénia y Dengue Severo.	10
1.5. Factores de Riesgo.	12
2. ANTECEDENTES.	
2.1. Hemostasia y Dengue.	14
2.2. Coagulopatía en Dengue Severo.	16
2.3. El receptor trombogénico Factor Tisular (TF).	18
2.4. El TF y la Coagulación Intravascular Diseminada.	20
2.5. Micropartículas.	22
2.6. La participación del monocito durante la infección con DENV	24
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	26
4. JUSTIFICACIÓN.	26
5. HIPÓTESIS.	27
6. OBJETIVO GENERAL	27
6.1. Objetivos Particulares	27
 	28
7. MATERIAL Y MÉTODOS.	
7.1 Cultivo del virus Dengue en células LLC-MK2.	28



7.2. Determinación de TF por Citometría de Flujo.	28
7.3. Activación y adherencia de los monocitos THP-1 en presencia del DENV.	29
7.4. Detección de TNF $\alpha$ en monocitos THP-1 estimulados con DENV2	30
7.4.1. Preparación de los sobrenadantes.	30
7.4.2. ELISA sándwich para la cuantificación de TNF $\alpha$ .	30
7.5. Detección de Factor Tisular por Inmunofluorescencia en monocitos estimulados con DENV2.	31
7.6. Obtención y Detección de MPs monocitarias tras el estímulo con DENV2.	32
7.6.1. Micropartículas Fluorescentes	32
7.7. Análisis de los datos	33
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	34
9. RESULTADOS	
9.1. Amplificación y titulación del DENV-2.	35
9.2. Estímulo de monocitos THP-1 con el Virus Dengue. Activación y adherencia.	36
9.3. Producción de TNF $\alpha$ en monocitos THP-1 estimulados con DENV.	38
9.4. Cinética de Expresión del Factor Tisular en monocitos estimulados con diferentes multiplicidades de infección del virus Dengue.	39
9.5. Cinética de Expresión de Factor Tisular en monocitos estimulados el virus Dengue a diferentes tiempos de estimulación.	40
9.6. Detección de Factor Tisular en monocitos estimulados con DENV mediante inmunofluorescencia.	42
9.7. Obtención y Detección de MPs de monocitos estimulados con DENV.	44
10. DISCUSIÓN	49
11. CONCLUSIONES	61
12. PERSPECTIVAS	61
12. LITERATURA CITADA	62

## Índice de Abreviaturas\*

<b>DENV</b>	virus del dengue
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>DF</b>	Fiebre por Dengue
<b>DHF</b>	Fiebre hemorrágica por Dengue
<b>DSS</b>	Síndrome de Choque por Dengue
<b>NS</b>	No estructural (proteína)
<b>RME</b>	endocitosis mediada por receptor
<b>DIC</b>	Coagulación intravascular diseminada
<b>ADE</b>	Incremento dependiente de anticuerpos
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>MHC-I y II</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II
<b>Fc<math>\gamma</math>R</b>	Receptor de la fracción cristalizable de inmunoglobulinas tipo G
<b>IL</b>	interleucina
<b>UTRs</b>	regiones no traducidas
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano o
<b>TF</b>	Factor tisular
<b>MPs</b>	micropartículas
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección
<b>CPE</b>	Efecto citopático
<b>pfu</b>	Unidades formadoras de placa lítica
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>LPS</b>	lipopolisacárido
<b>DENV2-NGC</b>	Virus Dengue serotipo 2 Nueva Guinea C
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>SSC-H</b>	Side light scatter, dispersión lateral de la luz
<b>FSC-H</b>	forward light scatter, dispersión frontal de la luz
<b>cal</b>	calcimicina
<b>hpe</b>	Horas post-estimulación
<b>sn</b>	sobrenadante
<b>PS</b>	Fosfatidil serina

\* por sus siglas en inglés

# Expresión del receptor trombogénico Factor Tisular (TF) en monocitos estimulados con el virus Dengue.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. Epidemiología.

La infección ocasionada por el virus dengue (DENV) afecta a dos quintas partes de la población mundial, las cuales habitan en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, por lo que 2,800 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad (Figura 1.1). La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que cerca de 50-100 millones de individuos se infectan cada año, de éstos 500 000 presentan las formas graves (Dengue Severo) como la Fiebre Hemorrágica por Dengue (DHF) y el Síndrome de Choque por Dengue (DSS), con una letalidad muy elevada que va del 2 al 20 % (Halstead 2007; OMS 2008).



**Figura 1. 1.** Distribución mundial del vector del virus del Dengue. Las líneas en color rojo corresponden a las isotermas de Enero y Julio que indican el límite geográfico potencial de los hemisferios norte y sur para la sobrevivencia anual de *Aedes aegypti*, el principal vector del Virus Dengue. Tomado de la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), 2008.

Previo a 1940, epidemiológicamente el Dengue se presentaba en forma de brotes epidémicos esporádicos y en general, en las localidades se reportaba la circulación de un serotipo viral. Sin embargo, cuando aumentó la presencia tanto de hospederos susceptibles como de la densidad del vector, se incrementó la transmisión viral y la enfermedad. Hoy en día, el DENV circula ampliamente entre el mosquito y el hospedero, e incluso en algunas regiones se ha registrado la presencia de varios serotipos circulando a la vez (hiperendemicidad regional), lo cual incrementa el riesgo para las formas graves de la enfermedad.

La primera epidemia conocida en Asia ocurrió en Manila, Filipinas en 1953-1954, seguida por Bangkok, Tailandia en 1958 y en Malasia, Singapur y Vietman en 1960. Con la globalización económica y

la urbanización asociada, la enfermedad se dispersó rápidamente afectando gran parte de Asia. En la década de los 60, la Organización Panamericana de la Salud auspició una campaña continental de erradicación del mosquito *Aedes aegypti* en la región de las Américas (Norte, Centro y Sur) para el control de La Fiebre Amarilla, cuyo vector también es *Ae. aegypti*, por lo que hubo un período epidemiológicamente de silencio para el Dengue de 10 años. Posteriormente, se descuidaron las campañas de fumigación, resurgieron mosquitos resistentes a insecticidas y se descuidaron las campañas de recolección de desechos, por lo que, a finales de los 70 resurgió el vector y la enfermedad en América. A principios de los 80 ocurrió un gran brote en Cuba. Con ello, la epidemia se extendió en los trópicos del Pacífico y de América por lo que actualmente es endémico en más de 60 países. El Dengue continúa expandiéndose y los únicos continentes que no han registrado casos son Europa y La Antártida. Entre los factores que han contribuido a la expansión dramática del Dengue son el crecimiento poblacional, la urbanización, el inadecuado manejo de agua estancada, la falta de un adecuado control del mosquito y el desplazamiento global de individuos por el mundo. En los últimos años, el cambio climático pudo haber contribuido tanto a la expansión del hábitat del vector como al incremento en la actividad epidémica. Por otro lado, se ha reportado la emergencia de cepas o genotipos con gran potencial epidémico (Gubler 1998; Teo *et al.*, 2009).

El principal vector del DENV es el mosquito *Aedes aegypti* (figura 1.2), sin embargo, también puede ser transmitido por los mosquitos *Ae. albopictus* y *Ae. polynesiensis*. Los humanos infectados son los principales portadores del DENV. La hembra del mosquito adquiere al virus al alimentarse de un humano infectado en la fase virémica y llega a ser infectivo después de un período de incubación en el mosquito de 7-14 días. Subsecuentemente, el mosquito es capaz de transmitir el virus por el resto de su vida en cada alimentación. *Ae. aegypti* es un mosquito altamente doméstico que se reproduce en contenedores artificiales como tanques de agua, llantas, tinas, charcos, etc. El comportamiento múltiple de alimentación de *Ae. aegypti* y su preferencia por el hospedero humano contribuye a la dispersión y extensión del DENV aún en presencia de una población pequeña de vectores (Teo *et al.*, 2009).



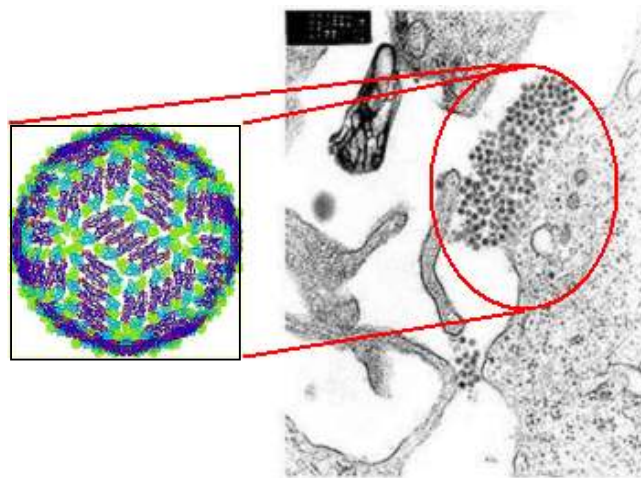
**Figura 1.2.** Vector artrópodo del DENV, el mosquito *Aedes aegypti* cuyo hábitat se localiza en regiones tropicales y subtropicales.

En la actualidad, no existe un tratamiento específico (anti-viral) disponible para el Dengue. El manejo apropiado de los fluidos para corregir la hipovolemia en los casos severos, ha tenido éxito para reducir la

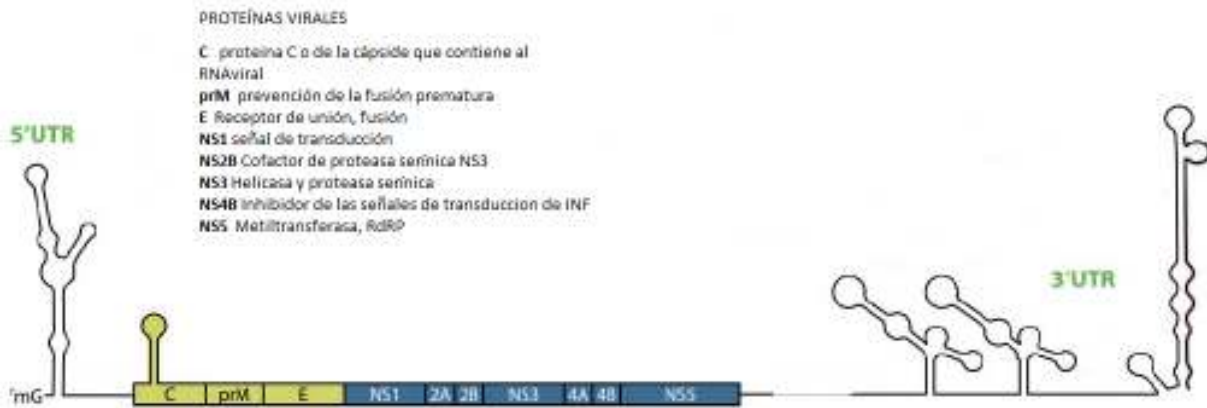
tasa de mortalidad; aunque el acceso a los servicios médicos representa un problema en ciudades subdesarrolladas. Cuando no existe un diagnóstico temprano del Dengue severo ni un tratamiento oportuno, la tasa de letalidad puede exceder al 20% (OMS, 2008). El control del mosquito, el cual es costoso y a veces inefectivo, es hasta ahora el único método disponible de prevenir el Dengue. Por lo que el desarrollo de una vacuna efectiva y segura contra el DENV ha sido prioritario para la OMS (Rothman 2004).

## 1.2. El Virus Dengue (DENV).

El DENV pertenece a la familia Flaviviridae, género Flavivirus y presenta 4 serotipos distintos entre sí (aunque relacionados genéticamente) denominados DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4. Las partículas virales tienen un diámetro entre 40 y 50 nm aproximadamente. Este virus está formado por nucleocápside de naturaleza proteica con simetría icosaédrica y cubierto por una envoltura lipídica (figura 1.3). El genoma del virus Dengue es un RNA de cadena sencilla de polaridad positiva con una longitud de 11 Kilobases que codifica para 3 proteínas estructurales: la proteína de cápside (C), la proteína precursora de membrana (pre-M) y la proteína de envoltura (E). Ésta última está involucrada en las principales funciones biológicas del virus y es responsable del reconocimiento al receptor, el transporte en la célula hospedera además de que se asocia con la inducción de anticuerpos neutralizantes y el desarrollo de una respuesta inmune protectora en el hospedero. El genoma, codifica 7 proteínas no estructurales llamadas; NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (figura 1.4) cuya síntesis ocurre en el citoplasma de la célula hospedera y entre las que se encuentran las enzimas necesarias para la replicación viral (Gubler 1998; Kurane 2007; Noisakran & Chuen 2007).

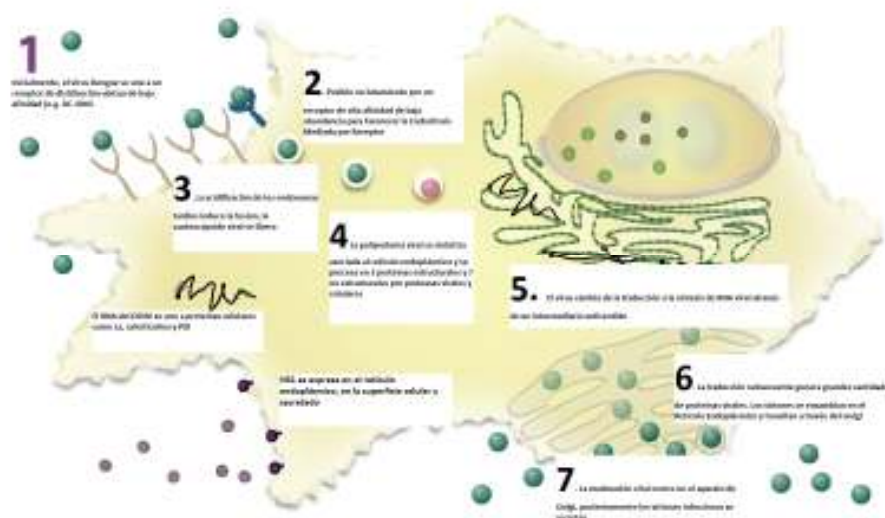


**Figura 1.3.** Partículas virales maduras detectadas por Microscopía Electrónica. El cuadro resalta una partícula viral que muestra el arreglo icosaédrico de la proteína E o de la envoltura. Tomado del Centro de Control de Enfermedades, CDC.



**Figura 1.4.** Estructura del genoma del virus Dengue. El RNA de sentido positivo contiene una estructura cap 5' (mG) y el marco de lectura abierto está flanqueado por UTRs (regiones no traducidas) 5' y 3'. Esta estructura secundaria esta basada en cepas del sureste asiático del Serotipo DENV-2 y es similar en diferentes cepas y serotipos. RdRP, polimerasa de RNA dependiente de RNA. Modificado de Clayde *et al.*, 2006.

El ciclo de vida intracelular del DENV en el hospedero humano, inicia cuando el vector artrópodo, que previamente se encontraba infectado, en una nueva alimentación transmite el virus al humano. El DENV se une y se internaliza en las células permisivas del huésped por endocitosis mediada por receptor (RME). Con la internalización y acidificación del endosoma, la fusión de las membranas virales y vesiculares permite la liberación de la nucleocápside en el citoplasma y el genoma viral queda descubierto. La síntesis del intermediario de RNA de polaridad negativa sirve como templado para la producción de múltiples copias de RNA de sentido positivo o vRNA (figura 1.5). Eventos sucesivos de traducción producen niveles altos de proteínas virales (C, prM y E) junto con RNA de hebra positiva, que en conjunto se ensamblan para dar a lugar a la progenie viral; éstas se transporta a través del compartimiento del aparato de Golgi y posteriormente se secreta de la célula (Clayde *et al.*, 2006).



**Figura 1.5.** *Ciclo de Vida intracelular del DENV.* El virus se une (paso 1) y entra (paso 2) a la célula mediante un receptor no caracterizado por RME. La acidificación endosomal (paso 3) genera una trimerización irreversible de la proteína E, exponiendo el dominio de fusión. Después de que se ha desnudado, el vRNA (RNA de polaridad positiva) se traduce en las membranas derivadas del RE en donde se procesará en tres proteínas estructurales y siete no estructurales (NS). Después de que el complejo de replicación se ha sintetizado, la traducción del vRNA termina y comienza la síntesis de RNA (paso 5). Subsecuentemente, eventos sucesivos de traducción (paso 6) continúan por el ensamble en el RE. El virión madura en el compartimento del Golgi (paso 7) y se libera por la vía secretora. Las proteínas virales C, E, NS3 y NS5 se han observado en el núcleo de células infectadas y el vRNA se asocia específicamente con algunas proteínas celulares; sin embargo, su significado biológico continúa sin determinarse. ribonucleoproteína nuclear heterogénea L; PDI, proteína disulfuro isomerasa. DC-SING, molécula intercelular de adhesión, no integrina de anclaje a ICAM-3 específica de células dendríticas de Langerhans, que residen en la piel. Modificado de Clayde *et al.*, 2006.

### 1.3. Cuadro Clínico del Dengue (OMS, 2009).

El Dengue tiene un amplio espectro de manifestaciones clínicas, a menudo con una evolución y desenlace clínico impredecible. Mientras que el 95% de los pacientes se recuperan después de un estado clínico moderado y auto limitante, el 5% restante, progresa a la enfermedad severa, caracterizada principalmente por la salida de plasma con o sin hemorragia. La rehidratación intravenosa es la terapia de elección, esta intervención puede reducir los casos fatales a menos del 1%. La progresión del Dengue no severo al Severo es difícil de predecir.

La infección por dengue es una enfermedad sistémica y dinámica. Presenta un amplio espectro clínico que incluye manifestaciones clínicas graves y no graves. Después del período de incubación, la enfermedad comienza abruptamente y le siguen tres fases de evolución: la febril, la crítica y la de convalecencia.

#### 1.3.1. Fase febril o Dengue Clásico.

En el Dengue clásico (recientemente definido como Dengue no Severo, OMS 2009), los pacientes desarrollan repentinamente una fiebre elevada. Esta fase febril aguda tiene una duración de 2-7 días y con frecuencia se acompaña por enrojecimiento facial, eritema, dolor de cuerpo generalizado, mialgias, artralgias (fiebre “quebranta-huesos”) y dolor de cabeza. Algunos pacientes presentan dolor de garganta dolor retro-orbital y conjuntivitis, entre otros. La anorexia, náusea y/o vómito son comunes. El diagnóstico diferencial se hace con diferentes enfermedades exantemáticas como el Sarampión y la Rubeóla, entre otras debido a que puede ser difícil distinguir el Dengue de cualquier otra enfermedad febril. Asimismo, las manifestaciones clínicas iniciales son indistinguibles entre los casos de dengue severo y no severo (Dengue Clásico). Por tanto, el monitoreo de los signos de alarma y otros parámetros clínicos es crucial para reconocer la progresión de la fase clínica. Se pueden observar manifestaciones hemorrágicas de mediana severidad como las petequias y el sangrado de las membranas mucosas como

en nariz y encías. Aunque no es común, se puede presentar sangrado vaginal y gastrointestinal masivo. Con frecuencia el hígado se agranda (hepatomegalia). La anomalía más temprana en la circulación sanguínea es un decremento progresivo en la cuenta total de leucocitos.

La cuenta plaquetaria es normal y no hay defectos en la coagulación. En algunos casos, los pacientes con DF presentan trombocitopenia y elevación sérica de transaminasas hepáticas. Ninguno de estos parámetros son suficientemente específicos para hacer un diagnóstico clínico confirmatorio.

### 1.3.2. Fase Crítica.

En los días 3-7 de la enfermedad, alrededor de la defervescencia (la temperatura es  $\leq 37.5-38$  °C y ya no aumenta) puede presentarse un incremento en la permeabilidad vascular (a nivel capilar) en paralelo con un incremento de los niveles del hematocrito. Esto marca el inicio de la fase crítica.

Se detecta leucopenia progresiva seguida por una decremento rápido de la cuenta plaquetaria que usualmente precede al incremento en la permeabilidad vascular y a la salida de plasma. En este punto los pacientes que no manifiesten fuga de plasma mejoran, mientras que aquellos que muestran datos de incremento en la permeabilidad del endotelio vascular, pueden estar en riesgo de presentar choque hipovolémico. El grado del incremento en el hematocrito puede reflejar la severidad de la salida de plasma. El choque se presenta cuando un volumen crítico de plasma se ha perdido. La temperatura corporal puede estar debajo de lo normal cuando el paciente entra en choque, la hipoperfusión orgánica (disminución del flujo de sangre que pasa por un órgano) consecuente puede generar daño orgánico progresivo, acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada (CID). Esto favorece un cuadro de hemorragia ocasionando el decremento del hematocrito en el choque severo. Además, puede haber daño a diferentes órganos presentándose hepatitis, encefalitis, miocarditis. Asimismo, la hemorragia severa se puede desarrollar de forma independiente al Síndrome de choque. Cabe mencionar que los pacientes que mejoran después de la defervescencia (60% de los casos) no cursan con Dengue Severo (figura 1.6).

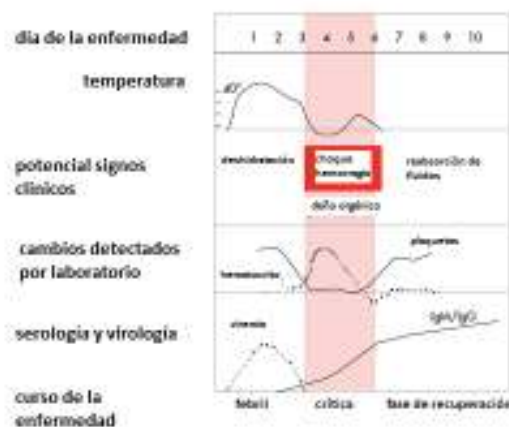


Figura 1.6. El curso de la enfermedad del Dengue, Modificado de la OMS 2009.



### 1.3.4. Fase de Recuperación.

Si el paciente sobrevive a las 24-48 horas posteriores a la fase crítica, comenzara a darse la reabsorción gradual de los fluidos del compartimiento extravascular en las siguientes 48-72 horas. El hematocrito se estabiliza, la cuenta de leucocitos comienza a subir después de la defervescencia pero la cuenta plaquetaria típicamente tarda un poco más en normalizarse (tabla 1.7).

1	Fase febril	Deshidratación; la fiebre alta puede causar trastornos neurológicos y convulsiones febriles en niños pequeños.
2	Fase crítica	Choque a causa de la extravasación de plasma; hemorragia importante; deterioro de órganos.
3	Fase de convalecencia	Hipervolemia (solo si la terapia de líquidos intravenosos ha sido excesiva o se ha extendido a esta fase).

**Tabla 1.7.** Fases Febril, Crítica y de Recuperación en pacientes con Dengue, OMS 2009.

### 1.3.4. Dengue Severo.

El Dengue Severo (también denominado DHF/DSS) se define por uno o más de los siguientes criterios: i) salida de plasma que puede llevar al choque y /o ii) la acumulación de fluidos con o sin complicaciones respiratorias, iii) y/o sangrado severo, iv) y/o daño orgánico severo.

En la medida que la permeabilidad vascular progresa, la hipovolemia se complica lo que lleva al choque. Usualmente ocurre alrededor de la defervescencia, en los días 4 o 5 de la enfermedad, precedido por signos de alarma.

Durante el estadio inicial del choque, los mecanismos compensatorios que mantienen la presión sanguínea sistólica normal también producen taquicardia y vasoconstricción periférica con perfusión reducida (llevar oxígeno y nutrientes a un tejido por medio de la sangre), lo que lleva al enfriamiento de las extremidades. El paciente presenta compromiso circulatorio o choque (pulso débil o indetectable). Se considera que el paciente tiene choque si la presión arterial es de  $\leq 20$  mm de mercurio (Hg). Existe también compromiso gastrointestinal que se manifiesta por vomito persistente, dolor abdominal intenso, hepatomegalia e ictericia.

Los pacientes con Dengue severo pueden presentar alteraciones importantes de la coagulación. Cuando se presentan hemorragias severas casi siempre se asocia con un profundo choque lo que en combinación con la trombocitopenia, hipoxia y acidosis puede llevar una falla orgánica múltiple (falla hepática y renal agudas, cardiopatías, entre otras menos usuales) y CID (Figura 1.8).



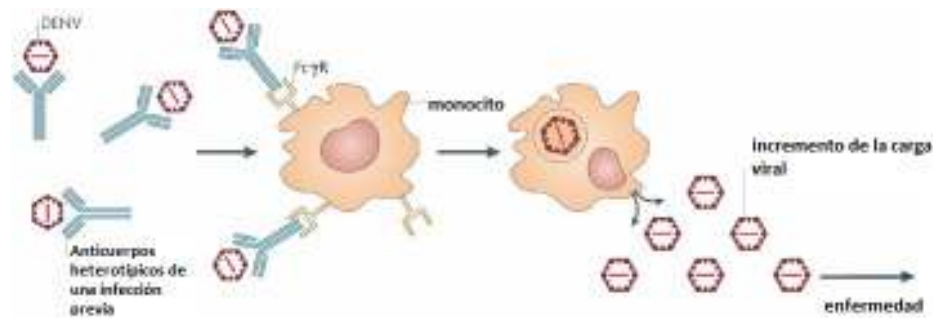
Figura 1.8. Clasificación de los casos de Dengue y niveles de severidad, OMS 2009.

#### 1.4. Fisiopatología del Dengue Severo (DHF/DSS).

El incremento en la permeabilidad vascular es el signo patognomónico de la DHF/DSS, que propicia la salida de plasma del espacio intravascular al intersticial, ocasionando de hemoconcentración y presión arterial baja. Durante la permeabilidad vascular (por separación entre las células endoteliales) no se ha observado necrosis o lesión inflamatoria a nivel endotelial, lo que sugiere que la permeabilidad pueda deberse a una disfunción celular ocasionada probablemente por un mediador de corta acción. El incremento en la permeabilidad ocurre tardíamente durante la infección aguda o cercana a la defervescencia y coincide con la eliminación del virus lo que podría sugerir que esta disfunción del endotelio está mediada por la respuesta del hospedero, más que por el daño tisular directo del virus (Vaughn *et al.*, 2000; Teo *et al.*, 2009). A pesar de que en la década pasada hubo avances importantes en la biología del DENV incluyendo la determinación de su estructura así como de las proteínas virales, la replicación y traducción así como la caracterización funcional de las proteínas virales; la patogénesis por DENV continua siendo un rompecabezas complejo de interacciones entre el virus y el hospedero, en parte se ha debido a la falta de un modelo animal apropiado.

Existen dos hipótesis que intentan explicar los casos de Dengue Severo. Una teoría está basada en la *variación antigénica*: las cepas de Dengue virulentas ocasionan DHF/DSS mientras que las no virulentas ocasionan DF (Rosen 1986). Esta teoría asume que el DENV, como cualquier virus animal puede variar genéticamente como resultado de presiones de selección del hospedero que genera cambios fenotípicos. La otra teoría, propuesta en 1977, sostiene un *mecanismo inmunopatogénico* el cual sugiere que el Dengue severo es causado por la respuesta inmune del hospedero, particularmente por anticuerpos heterotípicos

no neutralizantes o incremento dependiente de anticuerpos (ADE) que facilitan tanto la infección por DENV (Figura 1.9) como un incremento en la carga viral (Halstead 2007; Kurane 2007).



**Figura 1.9.** Facilitación dependiente de anticuerpos en la infección con DENV. Modificado de Stephen *et al.*, 2007.

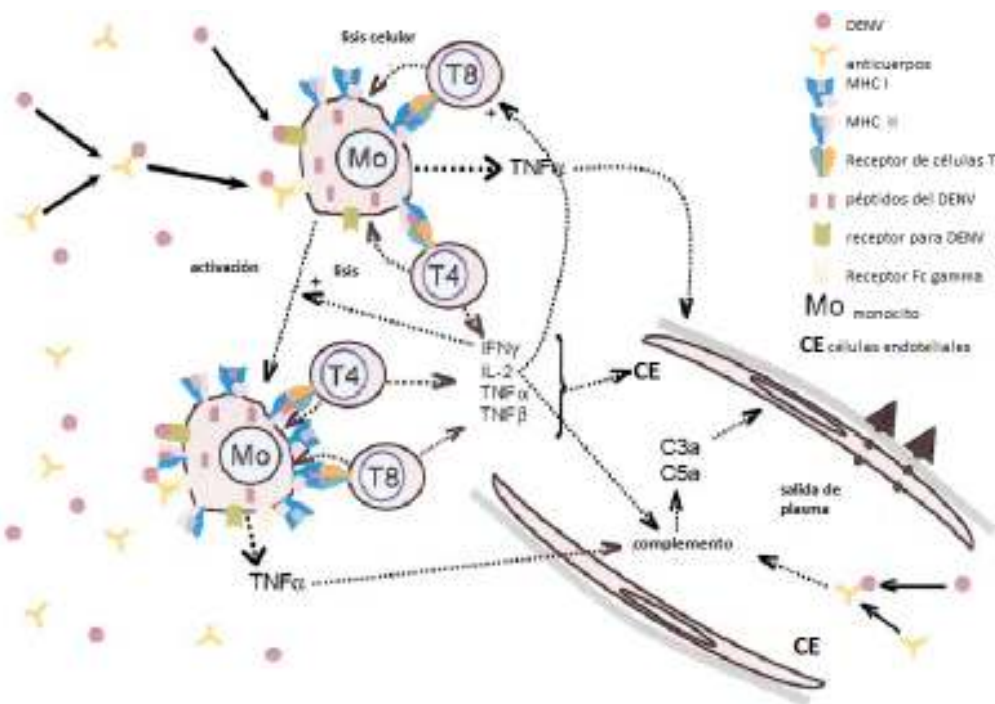
En este contexto, el ADE podría explicar la presencia del Dengue severo en el curso de una infección secundaria causada por un serotipo de DENV distinto al de la primo-infección. Es decir, durante la infección primaria, se generan anticuerpos con capacidad de neutralizar al virus causante. Sin embargo, en el curso de una segunda (ó posterior) infección con un serotipo viral distinto al de la primo-infección, los anticuerpos IgG de memoria no tienen capacidad de neutralizar al DENV diferente, por lo que sólo se formarán complejos virus-anticuerpos, que se unirán a los receptores Fc $\gamma$  favoreciendo la internalización viral en células de linaje fagocito-mononuclear que expresen estos receptores Fc (figura 1.9). En respuesta a la infección viral, estas células secretan mediadores vasoactivos y citocinas pro-inflamatorias que pueden inducir el incremento en la permeabilidad del endotelio vascular (Gubler 1998; Kurane 2007). Con respecto a las hipótesis planteadas, existe una discusión fundamental referente a la asociación de la infección secundaria con un serotipo heterólogo y el desarrollo del Dengue Severo, el cual fue documentado en el sureste de Asia en la década de los 60s. Desde entonces diferentes grupos han llevado a cabo estudios epidemiológicos en otras regiones como Asia y América, sugiriendo que la infección secundaria es un factor importante de riesgo para las manifestaciones severas de la enfermedad. Sin embargo, también se han reportado casos de DHF/DSS en el curso de una infección primaria (Balmaseda *et al.*, 2006), aunado al hecho de que el 95% de los casos de infección secundaria no cursan con DHF/DSS.

#### 1.4.1. Inmunopatogenia y Dengue Severo.

Además de la teoría de la *Facilitación Mediada por Anticuerpos*, se han propuesto otras hipótesis que intentan explicar la DHF/DSS, como la de la Inmunopatogenia. Este propone la participación de diferentes mecanismos inmunológicos como la cascada del Complemento, que se activa por complejos inmunes virus-anticuerpo así como por varias citocinas, las cuales a su vez favorecen el incremento en la permeabilidad vascular; la presencia de anticuerpos anti-NS1 que reaccionan de manera cruzada con el

endotelio vascular y las plaquetas, la tormenta de citocinas y otros mediadores solubles como el receptor de IL-2, CD4, CD8, TNF $\alpha$  e IL-10 y el factor de inhibición de migración de macrófagos, entre otros. De acuerdo a esta hipótesis, los diferentes efectores inmunológicos en respuesta al virus, afectan indirectamente al endotelio vascular y por consecuencia, pueden incrementar el riesgo de presentar las formas severas de la enfermedad. (Basu & Chaturvedi 2008, Rothman & Ennis 1999).

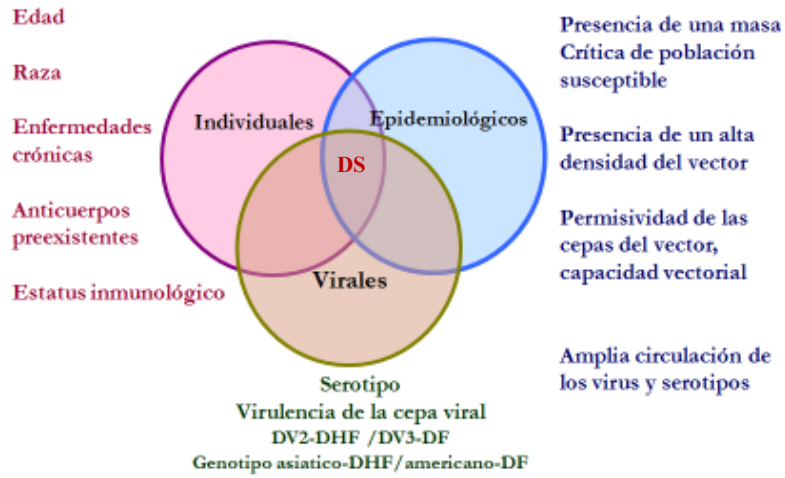
Por otra parte, en respuesta a la infección por DENV se activan los linfocitos CD4<sup>+</sup> de memoria y T CD8<sup>+</sup> de reacción cruzada con serotipos de DENV, que reconocen antígenos virales en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad I y II (MHC I y II). Estos linfocitos producen citocinas como INF $\gamma$ , IL-2 y TNF $\alpha$  y  $\beta$  para lisar monocitos infectados con DENV (figura 1.10), presentando a su vez efectos indirectos en las células endoteliales. El INF $\gamma$  activa a los monocitos lo que incrementa tanto la expresión de moléculas MHC y Fc $\gamma$ R como la producción de TNF $\alpha$  e IL-2 que facilitan la proliferación de linfocitos T. (Rothman & Ennis 1999). Así mismo, se ha observado un incremento en los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 en el suero de pacientes con DHF/DSS (Lin *et al.*, 2006). El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es la citocina directamente asociada en la patogénesis del DHF/DSS, ya que su liberación sistémica puede participar en el incremento de la permeabilidad vascular (Clayde *et al.*, 2006). Durante un estímulo antigénico persistente, la respuesta inflamatoria exacerbada puede contribuir en la patogénesis del Dengue. En este contexto, el ambiente inflamatorio que generan las citocinas, juegan un papel importante en la inmunopatogenia del Dengue (Rothman 2004; Mathew & Rothman 2008).



**Figura 1.10.** Modelo Inmunopatogénico de la permeabilidad vascular en DHF/DSS. Modificado de Rothman & Ennis 1999.

### 1.5. Factores de Riesgo.

Entre los factores de riesgo asociados con DHF/DSS se encuentran la edad: en niños menores de 15 años la sintomatología de la enfermedad tiende a ser medianamente severa con respecto a los adultos y el riesgo de desarrollar DHF/DSS es mayor. Muchos casos severos de Dengue desarrollados en el curso de una infección primaria en niños que viven en lugares en donde el Dengue es endémico, pueden explicarse por la transferencia transplacentaria de anticuerpos anti-DENV no neutralizantes que recibieron previamente de madres inmunes a Flavivirus. Estos anticuerpos favorecen el incremento en la carga viral y la subsiguiente activación inmune por la facilitación dependiente de anticuerpos o ADE (Gubler 1998; Guzmán *et al.*, 2002; Simmons *et al.*, 2007). La hospitalización y tasa de mortalidad para Dengue Severo, es mayor en pacientes menores a 15 años de edad y mayores a 65 años. Por otra parte, el estado clínico del paciente con diabetes mellitus, hipertensión e insuficiencia renal incrementa la susceptibilidad a DHF/DSS (Teo *et al.*, 2009). Otro factor es el tipo viral: la infección con los serotipos DENV-2 y DENV-3 se ha asociado con DHF (Balsamede *et al.*, 2006). Existen genotipos virales de aislados del pacientes con DHF *versus* DF, asociados con la severidad, lo que sugiere diferencias en virulencia entre las cepas de DENV que circulan en la naturaleza entre el huésped y el vector (figura 1.11). Se observó que tanto mutaciones puntuales en la posición 390 de la secuencia de la proteína E como en las regiones no traducidas (UTRs) 5' y 3' del genoma de DENV pueden contribuir a la virulencia de las cepas aisladas de pacientes (Cologna *et al.*, 2005; Mathew & Rothman 2008). Adicionalmente, se ha reportado que el genotipo Asiático es más agresivo que el genotipo Americano (Rico-Hesse *et al.*, 1997). Por otra parte, el fondo genético del hospedero (antígeno leucocitario humano o HLA) también se ha asociado con susceptibilidad y protección frente a la infección; por ejemplo, los pacientes que presentan los alelos HLA-A\*0203 y 33 se han relacionado con un fenotipo protector, mientras que los pacientes susceptibles son portadores de los alelos HLA-A0207 y \*24, en poblaciones étnicas de Thai y Vietnam, respectivamente (Chiewsilp *et al.*, 1981). Existen también factores epidemiológicos, por ejemplo en Haití se han registrado pocos casos de DHF a pesar de que la tasa de transmisión es del 30 % y que en la población circulan los 4 serotipos virales (Halstead *et al.*, 2001). Estudios retrospectivos y prospectivos han demostrado que una infección secundaria por un serotipo heterólogo es un factor de riesgo importante para desarrollar DHS/DSS (Halstead 2007). Cabe mencionar que el riesgo para causar las formas severas del Dengue en el curso de una infección primaria, varía entre los distintos serotipos del DENV (Vaughn *et al.*, 2000; Balsamede *et al.*, 2006).



**Figura 1.11.** Interacción de factores que determinan el cuadro clínico del Dengue Severo (DS). Tomado del CDC 2009.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Hemostasia y Dengue.

El Dengue severo se caracteriza por la presencia de alteraciones hemostáticas importantes, como la trombocitopenia, la coagulopatía y la vasculopatía que están asociadas con la patogénesis del DHF/DSS (Huang *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2007). De manera general, la hemostasia se mantiene por el balance entre la regulación de la coagulación y la fibrinólisis. El sistema de la coagulación se puede activar tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca para formar trombina la cual polimeriza el fibrinógeno a fibrina durante la formación del coágulo sanguíneo (figura 2.1). Por otra parte, el sistema fibrinolítico, degrada enzimáticamente la fibrina en productos de la degradación de fibrina (dímeros D). El plasminógeno es un zimógeno que puede ser activada a plasmina, a través de sus principales activadores: el activador tipo tisular (tPA) y el activador tipo urocinasa (uPA). El tPA circulante en plasma se deriva principalmente del endotelio vascular. El tPA a su vez es regulado por el inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1) que se produce por las plaquetas, el hígado y el endotelio vascular (Huang *et al.*, 2001).

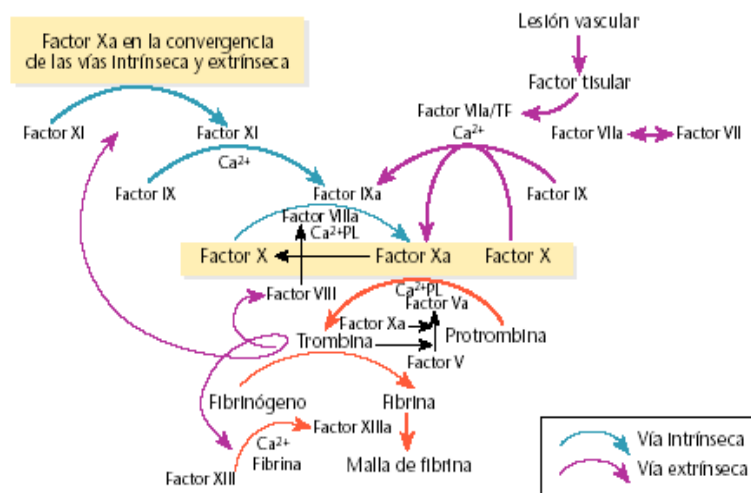


Figura 2.1. Cascada de Coagulación. Se muestran las dos vías para activar la coagulación, la intrínseca y extrínseca.

La patogénesis del Dengue severo no está completamente entendida. Los defectos en la coagulación y/o en la fibrinólisis, pueden predisponer la presencia de la Coagulación Intravascular Diseminada o CID. Un síndrome que se observa en los casos graves de la enfermedad. El endotelio vascular en reposo, produce inhibidores de la coagulación y moduladores de la fibrinólisis (Trombomodulina, heparán sulfato y activadores del plasminógeno) que en conjunto inhiben la formación de trombos, contribuyendo al mantenimiento de la integridad vascular y la hemostasia (Mairuhu *et al.*, 2003). Pero cuando el endotelio es activado, los mecanismos hemostáticos se alteran. Continúa en debate si la

infección por DENV actúa directa o indirectamente en la desregulación de la hemostasia y la evolución a los casos graves de la enfermedad.

La desregulación de la hemostasia en pacientes con DHF/DSS se ha demostrado en diferentes estudios (Willis *et al.*, 2002). Se han reportado alteraciones a diferentes niveles, por ejemplo: El incremento en el tiempo parcial de tromboplastina, tiempo de protrombina, tiempo de trombina, así como una disminución variable en la actividad de los factores II, V, VII, VII, IX y X. Asimismo, se ha reportado que el decremento del fibrinógeno correlaciona con la severidad de la enfermedad. En un estudio reciente en niños que presentaban DHF grado III y IV, se demostró la relación existente entre la activación del sistema de coagulación y la mortalidad. Los pacientes que no sobrevivieron presentaron una disminución en las proteínas C y S que participan en la vía anti-coagulante. Así mismo, se presentó un incremento en la activación del sistema fibrinolítico con niveles elevados de tPA, complejos plasmina-antiplasmina y dímeros D (tabla 2.1); los niveles de PAI se incrementaron significativamente en los niños que no sobrevivieron. En este estudio se confirmó la participación del sistema fibrinolítico, promoviendo un estado pro-coagulante (van Gorp *et al.*, 2002).

**Tabla 2.1.** Marcadores de Coagulación y Fibrinólisis en el día de admisión de pacientes infantiles con DHF grado III y IV.

	All patients (n = 50)	Survivors (n = 37)	Nonsurvivors (n = 13)	Normal	P*
Activated partial thromboplastin time (sec)	52.0 (43.4–64.1)	47.6 (40.1–59.7)	71.1 (52.6–97.4)	24–36	0.001
Prothrombin time (sec)	13.2 (11.9–15.4)	12.6 (11.4–13.9)	16.3 (15.0–25.8)	10.5–13.5	0.001
Prothrombin fragment 1 + 2 (nmol/L)	3.2 (2.0–5.0)	2.8 (1.9–4.0)	4.9 (2.7–7.2)	< 1.1	0.008
Thrombin–antithrombin complexes (mg/L)	27.2 (13.3–65.7)	21.0 (10.9–52.0)	50.9 (28.5–117.5)	< 4.1	0.004
Fibrinogen (g/L)	1.6 (1.3–1.9)	1.7 (1.5–2.1)	1.3 (0.8–1.6)	1.7–4.0	0.005
Protein C (%)	52.5 (36.8–66.3)	56.0 (48.0–68.0)	38.0 (10.0–63.5)	100%	0.04
Protein S activity (%)	51.0 (39.0–64.3)	54 (42.5–66.5)	34.0 (30.5–48.0)	100%	0.002
Protein S free (%)	23.0 (19.0–28.0)	23.0 (20.0–28.0)	18.0 (14.3–24.8)	100%	0.02
Tissue-type plasminogen activator (ng/ml)	52.5 (41.0–61.0)	54.0 (41.0–61.0)	51.0 (25.0–69.0)	< 10	0.93
Plasmin–antiplasmin complexes (nmol)	8.6 (6.3–12.0)	10.0 (7.1–13.0)	6.4 (4.1–8.5)	< 7	0.03
Plasminogen activator inhibitor (ng/ml)	183.0 (86.8–392.5)	130.0 (65.0–280.5)	394.0 (270.0–1573.0)	30–60	0.001
D-Dimer (ng/ml)	241.0 (197.3–761.0)	234.0 (179.5–715.5)	301.0 (205.0–1303.0)	< 39	0.23
Thrombin–antithrombin to plasmin–antiplasmin ratio	2.8 (1.3–6.5)	2.3 (1.1–5.8)	7.8 (3.3–23.7)	—	0.03

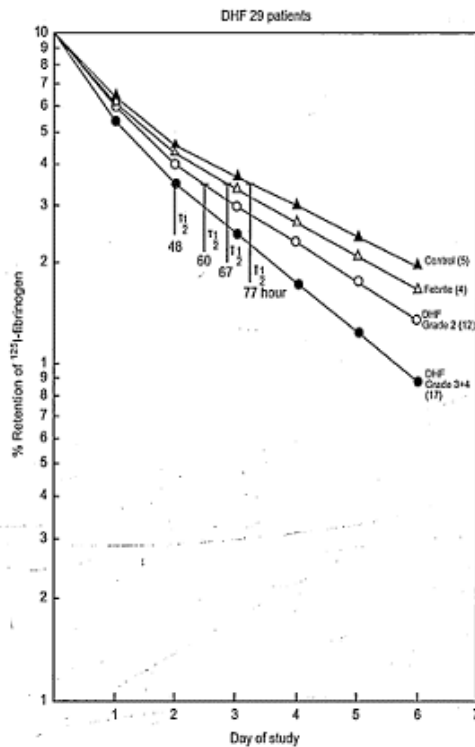
† valor de los marcadores de coagulación y fibrinólisis en el día 1 de admisión en todos los niños (n=50) con DHF grados III y IV. También se muestran los valores del subgrupo de sobrevivientes (n=37) y no sobrevivientes (n=12). \*Denota el valor de P resultante después de la comparación de sobrevivientes y no sobrevivientes, utilizando la prueba Mann-Whitney.

Tomado de van Gorp *et al.*, 2002.



**2.2. Coagulopatía y Dengue Severo.**

La ocurrencia de Coagulación Intravascular Diseminada en los casos severos de la enfermedad, se ha apoyado en estudios de histoquímica llevados a cabo en adolescentes y adultos que manifestaron sangrado severo y DSS (Strichaikul *et al.*, 1975, 1977; Srichaikul & Nimmannitya 2000). Funahara y col. reportaron la presencia de CID, trombocitopenia, prolongación en los tiempos de protrombina y de tromboplastina parcial activada, así como un decremento en los niveles de fibrinógeno, factor VIII, antitrombina y plasminógeno (figura 2.2) en adultos con Dengue severo, proponiendo que la trombina circulante pueda incrementar el sangrado ya sea por la activación (y posible liberación) del tPA de células endoteliales ó por la posible activación de la Proteína C , a nivel de la superficie del endotelio vascular, lo que en conjunto resulta en el incremento de la formación de plasmina por la disminución del PAI (Funahara *et al.*, 1985).



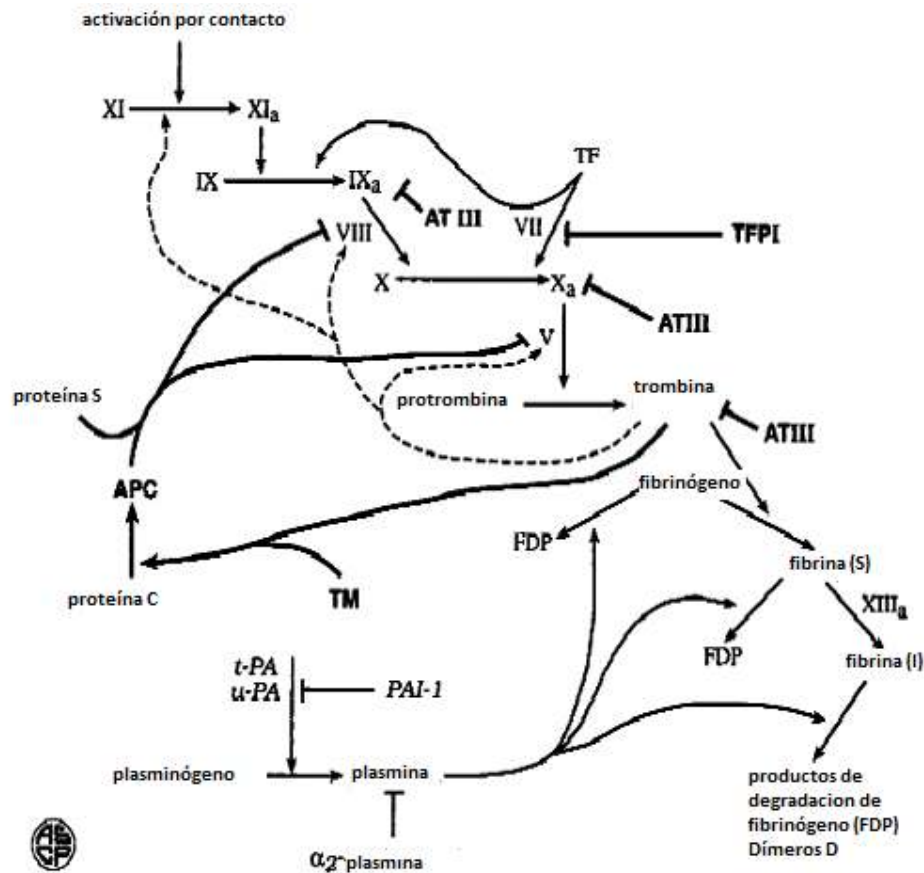
**Figura 2.2.** Consumo de fibrinógeno en el plasma de pacientes con Dengue Hemorrágico. El número entre paréntesis indica el número de sujetos estudiados en cada grupo. Tomado de Srichaikul *et al.*, 1989 Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 20: 19-25 en Srichaikul y Nimmannitya 2000.

La CID es una complicación presente en enfermedades diferentes al Dengue. Por ejemplo durante la infección con otros virus hemorrágicos como el Ébola Zaire (Geisbert *et al.*, 2003). La CID no es una enfermedad o un síntoma, es un síndrome adquirido, que se caracteriza por la activación de modo sistémico de la coagulación, favoreciendo la formación y presencia de microtrombos en toda la microvasculatura, los cuales, ocluyen vasos sanguíneos de diferente calibre. Esta condición puede comprometer el suministro sanguíneo a los diferentes órganos, favoreciendo la presencia de falla multi-

orgánica y muerte. La CID se presenta como una complicación subyacente a otro desorden, siendo los más comunes: la infección viral y/o bacteriana, trauma severo, malignidad tumoral y complicaciones obstétricas (Geisbert *et al.*, 2003; Mammen 2000).

Previo a que la CID aguda se manifieste, en el huésped se activan mecanismos compensatorios de regulación a nivel de la superficie del endotelio vascular, como el sistema Trombina-Trombomodulina o el de la proteína C activada (APC), cuya función es antagonizar el proceso pro-trombótico a través de la inactivación enzimática (por APC) de los factores V y VIII de la coagulación así como por la producción de inhibidores de la cascada de coagulación. Sin embargo, los inhibidores y los factores de la coagulación se consumen y si la tasa de consumo excede la tasa de síntesis en células parenquimales del hígado, los niveles plasmáticos se agotan, ocasionando una *Coagulopatía por consumo*, que inicia con CID y concluye con la instalación del proceso hemorrágico (Geisbert *et al.*, 2003). Por otro lado, el daño al endotelio vascular puede contribuir a la activación sistémica de la coagulación mediante la adhesión y agregación plaquetaria, formación de trombina y alteración del sistema fibrinolítico.

La presencia sistémica de trombos está mediada por la generación de trombina posterior a la expresión del Factor Tisular por el endotelio vascular. Simultáneamente ocurre una activación de los mecanismos inhibitorios como el de la antitrombina y la proteína C (figura 2.3). Además, la formación incrementada de fibrina, la eliminación de coágulos de fibrina se altera por la desregulación del sistema fibrinolítico. La trombolisis endógena es ocasionada por la presencia de niveles elevados de PAI-1 en circulación. En la fase tardía de la CID, la actividad fibrinolítica puede incrementarse, contribuyendo a la presencia de hemorragia (Levi *et al.*, 1999).

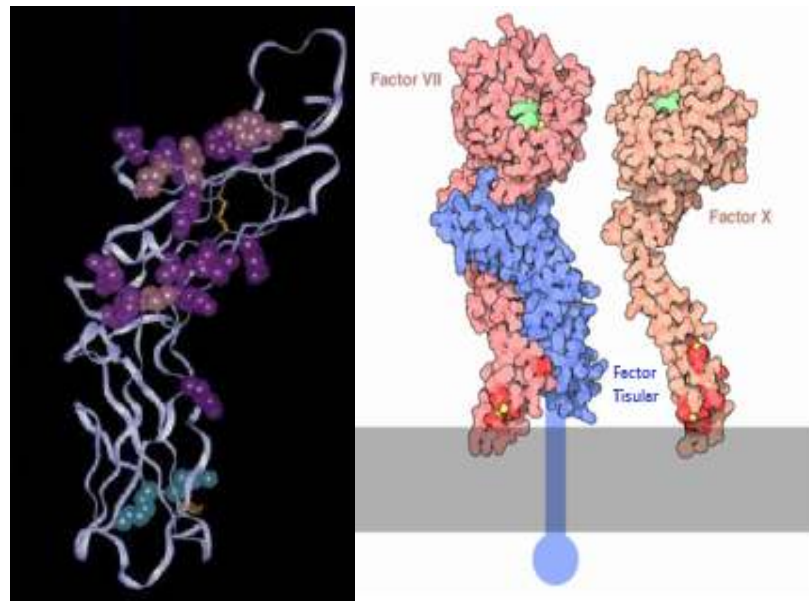


**Figura 2.3.** *Regulación de la Coagulación y Fibrinólisis.* Las interacciones entre los mecanismos fibrinolíticos y de coagulación permiten numerosas oportunidades de disfunción lo que resulta en CID. El sistema fibrinolítico se resalta en *italicas* y la vía reguladora anticoagulante se muestra en **negritas**. La línea punteada representa vías de retroalimentación positiva por la trombina. El **Factor Tisular (TF)** es el principal iniciador de la coagulación en la DIC. Los mecanismos anticoagulantes (**antitrombina III, AT III, inhibidor de la vía del factor tisular TFPI, vía de la proteína C- trombomodulina TM, proteína C activada, APC, S, soluble, I, insoluble**) regulan la formación de trombina. Los mecanismos fibrinolíticos generan plasmina que corta los trombos de fibrina aunque en la DIC puede darse una excesiva fibrinólisis. *t-PA= activador del plasminógeno tisular, u-PA= activador del plasminógeno de urocinasa, PAI-1= inhibidor del activador del plasminógeno-1, fibrina<sub>s</sub>= fibrina soluble (no polimerizada), fibrina<sub>i</sub>= fibrina insoluble (polimerizada), FDP= productos de degradación de fibrina o fibrinógeno.* Tomado de Carey & Rodgers 1998.

### 2.3. El receptor trombogénico, Factor Tisular (TF).

El Factor Tisular o TF es el principal iniciador fisiológico de la coagulación. Es un receptor de alta afinidad para su ligando específico, la proteasa-serina FVIIa (factor VII activado) y su zimógeno precursor FVII (figura 2.4). El TF es un cofactor esencial durante la hidrólisis (activación) eficientemente los factores IX y X a sus formas activas (factores IXa y Xa, respectivamente). El complejo protrombinasa de los factores Xa/Va activa la protrombina a trombina que polimeriza el fibrinógeno para la producción de fibrina (figura 2.3).

El TF es una glicoproteína transmembranal de 47 kDa que se expresa de modo constitutivo en varios tipos celulares como astrocitos, trofoblastos y fibroblastos o células sub-endoteliales y en células en circulación como monocitos y plaquetas. Estructuralmente, el TF es un miembro de la superfamilia de receptores de citocinas (Chu 2005; Wolberg & Roubey 2004; Mackman 2004). El TF también circula en el torrente circulatorio (concentraciones bajas) en condiciones fisiológicas asociado a microvesículas derivadas de la membrana celular denominadas Micropartículas (MPs), y soluble –representa una isoforma de edición de la proteína que carece de la región transmembranal - (Bogdanov *et al.*, 2003).



**Figura 2.4.** El Factor Tisular (TF). Receptor fisiológico de inicio de la vía extrínseca de la cascada de coagulación. *Izquierda:* Modelo molecular del TF; los residuos de unión a su ligando se muestran en color morado y los sitios de reconocimiento sus sustrato, en azul. *Derecha,* unión del TF con su sustrato factor VII activando al factor X. Tomado de Martín *et al.*, 1995.

Las células endoteliales, los monocitos y otras células que tienen contacto con la sangre, no expresan constitutivamente TF funcional. Sin embargo, en respuesta a la estimulación con antígenos específicos como los lipopolisácaridos (LPS), quimiocinas, homocisteína, P-selectina y/o ciertas citocinas inflamatorias, estas expresan TF (Wolberg & Roubey 2004).

El inhibidor de la vía del Factor Tisular o TFPI, es una proteasa trivalente que presenta dominios tipo-Kunitz que participan en la modulación de la fase inicial de la coagulación. El TFPI inhibe la actividad del TF mediante la formación de un complejo cuaternario (TFPI, TF, VIIa, Xa) a través de una interacción dependiente de iones calcio, la cual se incrementa por la presencia de fosfolípidos aniónicos de membrana. El TFPI también puede inhibir tanto el complejo VIIa/TF sin el factor Xa, como al factor Xa independiente de la presencia de fosfolípidos aniónicos. Este inhibidor se puede encontrar tanto en el torrente circulatorio como en los vasos sanguíneos y se puede liberar por la acción de la

heparina ya sea administrada de una manera exógena (inyectada) ó endógenamente a través de la liberación de la heparina almacenada en las plaquetas (en concentraciones bajas), posterior a la activación plaquetaria (Wolberg & Roubey 2004).

#### **2.4. El TF y la Coagulación Intravascular Diseminada (CID).**

El incremento en la expresión de TF se ha asociado con la presencia de alteraciones trombóticas. La sobre-expresión de TF en células del endotelio vascular y monocitos, se ha reportado en pacientes con cáncer (Zhao *et al.*, 2009), sepsis bacteriana por gram-negativos (Gregory *et al.*, 1989) y arteroesclerosis, entre otras. (Wolberg & Roubey 2004). Existe evidencia clínica que indican la participación de las proteasas de la coagulación (Trombina, Factor VIIa) en la activación de la respuesta inflamatoria, independientemente de su participación en la cascada de coagulación (Riewald & Ruf 2003). El diálogo cruzado en los procesos de coagulación- inflamación-infección, durante el choque séptico esta bien documentado (Schouten *et al.*, 2008). En el caso del DSS, las citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ ) y los marcadores de activación de coagulación-fibrinólisis se han correlacionado con los reportados (TNF- $\alpha$ ) durante la sepsis bacteriana humana. (Suharti *et al.*, 2002).

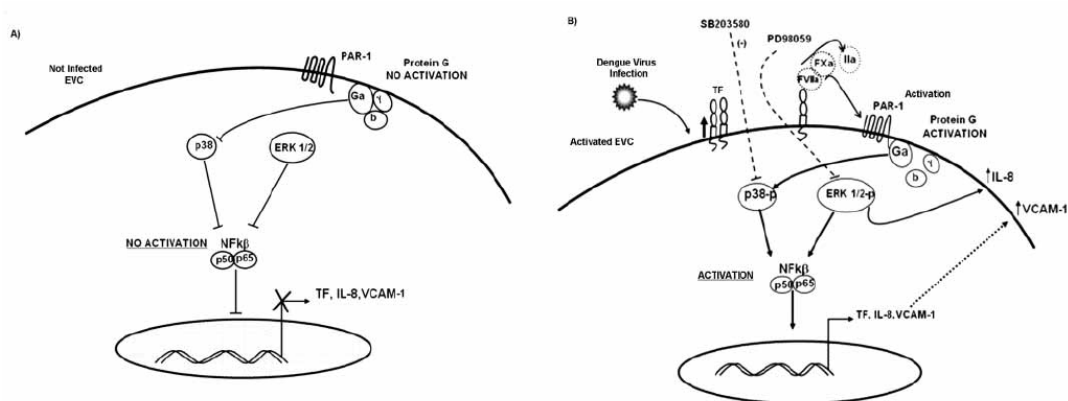
La participación de TF (con la generación de proteasas) quedó demostrada en los estudios en los que se observó que el bloqueo de TF redujo la letalidad en un modelo de sepsis experimental llevado a cabo en primates babuinos, a los que se les administró inhibidores del complejo ternario TF-VIIa-Xa (anticuerpos anti TF, anticuerpos contra el sitio activo del FVIIa y el inhibidor de la vía del TF, TFPI). Se observó una disminución del proceso de inflamación en lugar de una atenuación en la coagulación (Geisbert *et al.*, 2003). Existe un reporte similar, en el que se utilizó un modelo experimental de infección con el virus Ébola, en el que se administró a monos Rhesus, un inhibidor recombinante (rNAPc2) para el complejo TF-FVIIa que fue capaz de contrarrestar la respuesta inflamatoria sistémica y disminuir los efectos adversos de la fiebre hemorrágica por Ébola en los monos. El papel que tiene el TF en la instalación de la CID, presente en la infección por el virus Ébola es ambiguo; no obstante, la intervención terapéutica exitosa de bloqueo del TF en primates infectados con el Ébola virus, ha proporcionado evidencia clara de la participación de las proteasas de la coagulación en el proceso inflamatorio, presente en la fiebre hemorrágica, posterior a una infección viral. De acuerdo a lo anterior, el TF puede ser un blanco terapéutico útil en el control de la sobreexpresión de la respuesta inmune, durante la infección por virus hemorrágicos (Ruf 2004).

La asociación entre los niveles elevados de TF en pacientes con DHF/DSS (Dengue Severo) y la severidad de la enfermedad, han sido sugeridos. En el reporte de Willis *et al.*, 2000 observaron en el plasma de pacientes pediátricos con Síndrome de choque por Dengue un incremento en la

concentración de TF durante el primer día de admisión al hospital mientras que en el trabajo de Sosothikul *et al.*, 2007 también en pacientes pediátricos, se encontró un incremento significativo de este receptor durante la fase febril de la enfermedad con respecto a los valores de TF en individuos sanos, particularmente en aquellos pacientes con Dengue Severo o DHF. Sin embargo, el origen celular de este receptor aún no está totalmente claro.

Durante la CID, la vía extrínseca de la coagulación dependiente de TF es la ruta dominante para la generación de trombina y el depósito de fibrina. La activación CID por TF es un fenómeno importante relacionado con la letalidad durante la septicemia bacteriana experimental (Mammen 2000). La sobreexpresión de TF puede llevar tanto a CID como a la presencia de trombosis relacionada con la falla multiorgánica. El TF presente en circulación, puede ser el factor que ocasione el inicio de CID. La expresión de TF por los monocitos, puede promover la dispersión de trombos. En el caso del Dengue severo, aunque la presencia de CID es frecuente los mecanismos involucrados en la instalación de éste síndrome, aún no han sido elucidados. Con base en lo anterior, la sobreexpresión de TF en monocitos de pacientes que cursan con Dengue severo, podría explicar la presencia de CID en las formas graves de la enfermedad. Asimismo, se conoce que durante la infección por DENV se puede activar de manera exacerbada la fibrinólisis, incrementando la degradación del fibrinógeno, lo que promueve una activación secundaria de diferentes mecanismos hemostáticos pro-coagulantes que incluyen el incremento en la expresión del TF (Willis *et al.*, 2002).

Recientemente, reportamos que la infección con DENV de células del endotelio vascular humano, induce la sobreexpresión de TF, el cual participa de manera central en la generación de proteasas de la coagulación como la trombina, las que inician el diálogo cruzado entre los procesos de inflamación y coagulación, a través de la activación de Receptores Activados por Proteasas (PARs) y la expresión de moléculas tanto pro-adherentes como pro-inflamatorias (figura 2.5), a nivel del endotelio vascular humano (Huerta-Zepeda *et al.*, 2008).



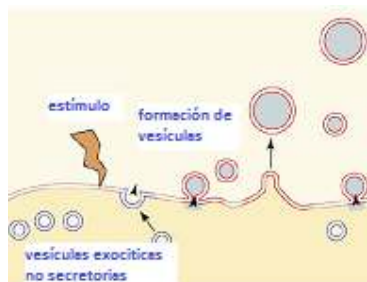
	Negative control	Positive control	DF-DV	DHF-DV
TF	512 ± 2.55	3419 ± 7.12 *(p<0.02)	22.75 ± 3.97 *(p=0.02)	41.26 ± 6.51 *(p<0.02)
PAR-1	6.94 ± 3.32	36.10 ± 7.63 *(p<0.0003)	28.37 ± 8.59 *(p<0.0003)	49.41 ± 9.71 *(p<0.0003)
VCAM-1	1.81 ± 0.23	71.14 ± 4.81 *(p<0.001)	61.33 ± 5.71 *(p<0.005)	85.90 ± 5.98 *(p<0.001)

**Figura 2.5** Diálogo cruzado entre coagulación e inflamación durante la infección de células del endotelio vascular humano con el virus Dengue. En este esquema se resumen las posibles vías de señalización intracelular involucradas en la activación de las células endoteliales, que podrían explicar diferentes aspectos de la patogénesis del DHF/DSS. Se observó que un aislado viral procedente de un caso clínico de DHF favoreció la presencia de una respuesta proinflamatoria y procoagulante, las cuales involucran la fosforilación de MAPK-p38 y ERK 1/2 así como la sobre regulación de los receptores TF y PAR1. Tomado de Huerta-Zepeda *et al*, 2008.

Asimismo, en un estudio realizado en 25 monos Rhesus infectados con el virus hemorrágico Ébola, se observó la sobreexpresión del TF en los monocitos/macrófagos que se incrementa significativamente al día 2 post infección. Así mismo, se detectó en el plasma de éstos macacos un número elevado de micropartículas TF positivas, proponiendo que tales observaciones explicarían la CID característica de la infección por el virus Ébola a través de la dispersión de TF en las MPs circulantes favoreciendo la formación localizada de microtrombos en toda la vasculatura (Geisbert *et al.*, 2003).

**2.5. Micropartículas.**

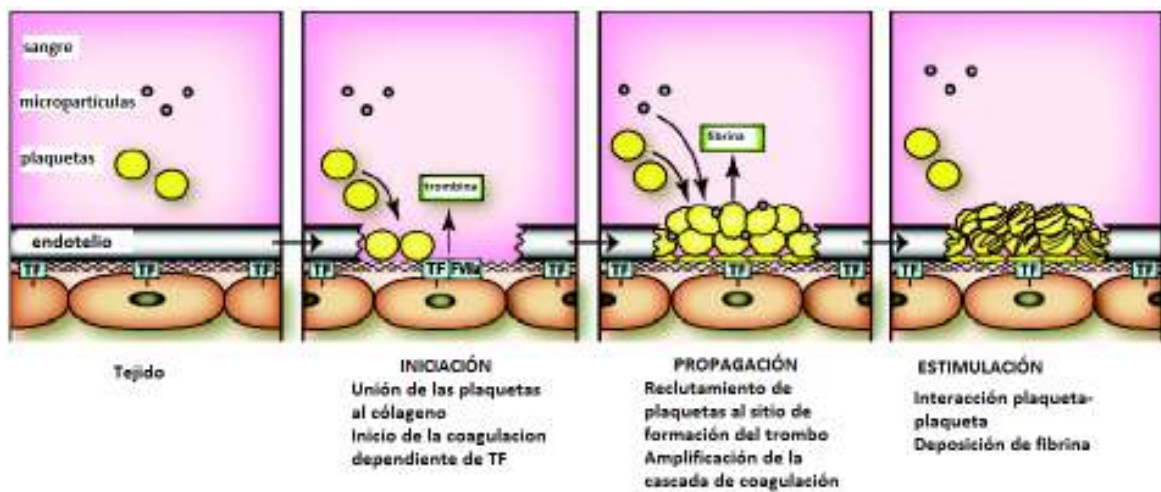
Las micropartículas (MPs) son una subpoblación de microvesículas entre las que se incluyen los exosomas. En condiciones fisiológicas se encuentran en el torrente circulatorio en concentraciones muy bajas y se incrementan en algunas enfermedades. Las MPs se forman por rearrreglos estructurales del citoesqueleto y se liberan de la membrana celular después de un proceso de activación o durante la apoptosis (figura 2.6); varían en tamaño (alrededor de 1 micra), composición de fosfolípidos y proteínas de membrana (Cocucci *et al.*, 2008).



**Figura 2.6.** Generación de micropartículas a partir de células activadas o en apoptosis.

Modificado de Cocucci *et al.*, 2008

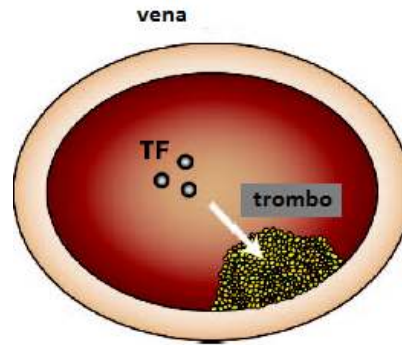
Las MPs contienen proteínas o antígenos que reflejan su origen celular. Se conoce que las células endoteliales, las plaquetas, las células de músculo liso y los leucocitos pueden liberar MPs TF positivas (Aarón *et al.*, 2008). En circulación, las MPs facilitan la interacción célula-célula e inducen diferentes vías de señalización intracelular, pueden participar en los procesos de inflamación, trombosis, angiogénesis y disfunción vascular. Así mismo, las propiedades protrombóticas de las MPs se han asociado con la presencia del TF en la membrana de las MPs (del Conde *et al.*, 2005). Por otro lado, también se ha reportado la asociación de vasculopatías como la trombosis con un incremento en las MPs *in vivo*. Las MPs TF positivas afectan diferentes vías en células endoteliales, como la apoptosis, y la coagulación (Aarón *et al.*, 2008). Las MPs se unen a plaquetas activadas durante la formación de trombos, a través de su ligando glicoproteína -1 P selectina (PSGL-1) y la P-selectina en las plaquetas, favoreciendo el reclutamiento del TF en el trombo en formación (del Conde *et al.*, 2005).



**Figura 2.7.** Formación de un trombo en el sitio de daño vascular. En un individuo sano, el TF se expresa por las células de músculo liso y fibroblastos adventicios en la pared del vaso que está separado físicamente de su ligando FVII/FVIIa por el endotelio. El daño endotelial lleva a la rápida unión de plaquetas al sub-endotelio y la activación de la cascada de coagulación por TF. La propagación del trombo involucra el reclutamiento de más plaquetas, la amplificación de la cascada de coagulación por la vía intrínseca y posiblemente por MPs TF positivas, así como el TF almacenado en plaquetas. Finalmente, la deposición de fibrina estabiliza el trombo. Modificado de Mackman *et al.*, 2007.

Se ha reportado que los niveles de MPs TF positivas se incrementa en una variedad de entidades nosológicas como las septicemia, el cáncer y la aterosclerosis; contribuyendo a la instalación de un estado protrombótico (figura 2.8) o el desarrollo de CID (Mackman 2009).





**Figura 2.8.** El Factor Tisular de las Micropartículas juega un papel importante en la trombosis venosa. Modificado de Mackman *et al.*, 2007.

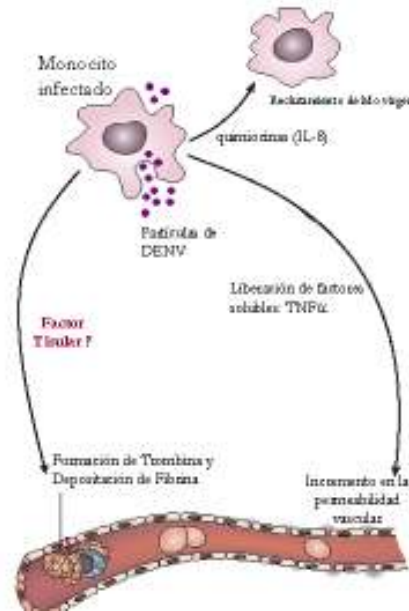
Las MPs TF positivas provenientes de monocitos, probablemente sean el factor primario que de inicio a los procesos de activación celular exacerbados que pueden propiciar la Coagulopatía o CID reportada en los casos desafortunados del Dengue. No obstante, a pesar de que ya se ha reportado que la sobreexpresión de TF a nivel del endotelio vascular humano durante la infección con DENV participa en la instalación del daño vascular, no se conoce aún si el TF que se expresa durante la infección, activación de los monocitos y la generación de MPs TF positivas inducidas por el proceso infeccioso por DENV, permitiría entender la participación del TF a nivel sistémico, durante el desarrollo de la CID en el Dengue severo. Hasta ahora se desconoce la contribución de MPs derivadas de monocitos (TF positivas) durante la infección por el DENV.

## 2.6. Participación del monocito durante la infección por DENV.

Los monocitos-macrófagos son células efectoras muy importantes en la defensa del hospedero frente a una infección por DENV. En general los macrófagos pueden inactivar a los virus o bien actuar como sus portadores pasivos; por otra parte, pueden ser permisivos a algunos virus, como ocurre con el DENV mediante la Facilitación Mediada por Anticuerpos. En el caso de la infección con DENV, los macrófagos son las principales células diana (Rizvi *et al.*, 1987).

Adicionalmente, los macrófagos activados por  $\text{INF-}\gamma$  juegan un papel muy importante al participar en la eliminación viral a través de la producción de óxido nítrico (NO) el cual ha demostrado inhibir la replicación de DENV *in vitro* (figura 2.11). La producción de NO podría a su vez, causar daño al endotelio (Neves-Souza *et al.*, 2005). El  $\text{TNF-}\alpha$ , es la principal citocina asociada tanto en la fiebre por Dengue como en DHF/DSS. Esta citocina se expresa en monocitos infectados con DENV así como en células endoteliales activadas favoreciendo un incremento en la permeabilidad del endotelio vascular

(Chakravarti *et al.*, 2006; Clayde *et al.*, 2006). Por lo tanto, el entendimiento de los mecanismos que llevan a la activación y producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos representa una pieza clave para elucidar alguno(s) de los posibles mecanismos patogénicos que favorecen el desarrollo de DHF/DSS.



**Figura 2.11.** El papel de los monocitos-macrófagos durante la infección con DENV. El monocito infectado con el virus Dengue se activa liberando quimiocinas y citocinas proinflamatorias como IL-8 y TNF- $\alpha$ ; éste último se ha asociado con la patogénesis del DHF/DSS, ya que su liberación sistémica puede participar en el incremento de la permeabilidad vascular. El daño al endotelio vascular favorece la expresión del receptor trombogénico, Factor Tisular.

### **3. Planteamiento del Problema.**

En los casos de Dengue severo se presentan alteraciones hemostáticas muy importantes como la coagulopatía por consumo que inicia con CID y culmina con la presencia de Hemorragia. Sin embargo, los mecanismos etipatogénicos involucrados en estos procesos aún no están totalmente entendidos. Por lo que en el presente trabajo nos proponemos llevar a cabo el estudio de uno de los posibles receptores involucrados en el inicio de los procesos de coagulación-inflamación durante la infección por el virus Dengue. Estudios previos de nuestro grupo apoyan la participación del receptor trombogénico Factor Tisular (TF) durante la infección con el virus dengue a nivel del endotelio vascular. Sin embargo, desconocemos si el monocito (principal célula efectora y célula diana para el DENV) juega un papel importante durante el desarrollo de la CID. La sobreexpresión de TF en monocitos estimulados con DENV a nivel de la superficie membranal y su posterior liberación en las micropartículas (MPs TF positivas) derivadas del monocito, podrían explicar la coagulación a nivel sistémico, como ocurre en la CID.

### **4. Justificación.**

La incidencia del Dengue tanto a nivel mundial como en nuestro país se ha incrementado dramáticamente en las dos últimas décadas. Aproximadamente un 40% de la población mundial presenta el riesgo de presentar la enfermedad. La OMS estima que cada año se presentan 50-100 millones de casos de Dengue en el mundo y aproximadamente un 2,5% de los afectados mueren. No existe un tratamiento específico (anti-viral) ni una vacuna efectiva que prevenga la enfermedad, por lo que las tasas de letalidad del Dengue severo han superado el 20%. Asimismo, no existe un modelo animal para el estudio de los mecanismos etipatogénicos de la DHF/DSS. Por lo que el estudio de los posibles mecanismos patogénicos involucrados en los trastornos hemostáticos presentes en los casos severos de la enfermedad como la coagulopatía por Dengue (CID y Hemorragia) es importante. El presente trabajo permite entender en parte, la participación de receptores trombogénicos que inician los procesos de coagulación-inflamación durante la infección por el DENV. Además puede ayudar a encontrar y proponer posibles indicadores de riesgo de DHF/DSS, útiles en la prognosis de los casos desafortunados del Dengue.

### **5. Hipótesis:**

La activación de monocitos humanos por el virus Dengue, favorece tanto la producción de TNF $\alpha$  y la sobreexpresión del Factor Tisular a nivel de la superficie membranal como la formación de micropartículas derivadas de este monocito activado.

### **6. Objetivo General:**

Evaluar la posible expresión del receptor trombogénico, Factor Tisular, a nivel de la superficie membranal de monocito humano THP-1, posterior a su estimulación con el virus Dengue. Asimismo, se evaluará la producción de TNF $\alpha$  como un marcador de activación así como la posible inducción de Micropartículas generadas por monocitos humanos estimulados con el virus Dengue.

#### **6.1. Objetivos Particulares:**

- Evaluar la expresión de TNF $\alpha$  en monocitos humanos THP-1 activados con DENV.
- Determinar la expresión de TF en monocitos humanos THP-1 posterior a la estimulación con DENV.
- Evaluar si la estimulación de monocitos humanos THP-1 con DENV induce la generación de micropartículas monocitarias.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 7.1. Cultivo del virus Dengue en células LLC-MK2.

Durante el desarrollo del presente estudio, se utilizó un aislado viral procedente de un caso de Dengue clásico serotipo-2, el cual es la cepa prototipo del DENV-2, denominada DENV-2 Nueva Guinea- C. Este aislado se propagó, tituló y purificó en células de riñón de mono verde africano LLC-MK2. El serotipo se confirmó con el anticuerpo monoclonal específico Mab8702 (Millopore 92590, CA). La amplificación viral se llevó a cabo en células LLC-MK2 con una confluencia del 80% las cuales se inocularon con una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta observar que el efecto citopático (CPE) fuera aproximadamente del 90% (alrededor de 6-8 días). Los sobrenadantes (sn) de cultivo se colectaron, y se clarificaron de restos celulares mediante centrifugación a 900 g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, los sobrenadantes, se centrifugaron a 16 000 g durante 45 minutos, colectando el precipitado, el cual se almacenó a -70° hasta su uso. El título viral se determinó mediante ensayo de placa lítica, para lo cual, las células LLC-MK2 se sembraron en placas de cultivo de 24 pozos y se incubaron a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub> hasta obtener una monocapa al 100% de confluencia. Estos cultivos se inocularon por duplicado, con 100 µL de DENV-2 utilizando diluciones seriadas en base 10 y se incubaron por 2 h a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se eliminó el virus no adsorbido y los cultivos se lavaron con PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76 mM; pH 7.4). Las monocapas se cubrieron con 1 mL de medio D-MEM completo (Biowest L0107-500) con 2% de metil-celulosa y posteriormente se incubaron hasta observar CPE. Finalmente, las células se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta al 1% durante 15 minutos. El título viral se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

**PFU/mL = n (10) (factor dilución)** en donde:

n, numero de placas contadas

10, factor de corrección

Factor de dilución, dilución correspondiente a la columna en donde se hizo el conteo de placas líticas

### 7.2. Determinación de TF en monocitos mediante Citometría de Flujo.

Para evaluar la estimulación de monocitos humanos THP-1 (línea celular que procede de un paciente pediátrico con leucemia monocítica aguda; Tsuchiya *et al.*, 1980) en presencia

del virus Dengue, inicialmente se cultivaron  $5 \times 10^5$  células, en placas de cultivo de 24 pozos en medio RPMI 1640 (Biowest L0501-500) complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, los monocitos se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  en presencia del DENV2-NGC con  $\text{MOI} = 0.1, 1$  y 10 por pozo (se hicieron duplicados para cada condición) durante 6, 12 y 24 horas. Transcurrido los tiempos de estimulación, los monocitos se lavaron 2 veces con PBS 1X frío (se centrifugaron a  $100 \times g$  durante 10 minutos), desechando el sobrenadante y recuperando el pellet el cual se resuspendió en PBS 1X. Posteriormente, se adicionó un anticuerpo monoclonal primario, anti -TF humano hecho en ratón (American Diagnostica. 4503) a una concentración de  $1 \mu\text{g}$  por cada  $5 \times 10^4$  células y las muestras se incubaron en hielo durante 40 minutos. Las células se lavaron con PBS 1X y el pellet celular se resuspendió en una dilución 1:1000 del anticuerpo secundario anti IgG hecho en ratón acoplado a FITC (Millipore AP308F) en PBS 1X. Las muestras se incubaron en hielo durante 30 minutos cuidando que no se expusieran a la luz. Las células se lavaron y se resuspendieron en buffer de adquisición (FacsFluid®). Finalmente, las muestras fueron analizadas mediante Citometría de Flujo (FacsCalibur). Los datos de los histogramas se evaluaron con el software CellQuest® y WinMD® Versión 2.9. Las células control se incubaron con un anticuerpo no específico acoplado con FITC (anti IgG ratón Santa Cruz, sc-2939). Como control positivo, los monocitos se estimularon con  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  de Lipopolisacáridos (LPS) de *Escherichia coli* 026:B6 (Sigma, L2654-1MG) durante 6 horas.

### **7.3 Activación y adherencia de monocitos THP-1 en presencia del virus Dengue.**

A partir de un cultivo de monocitos THP-1 se hizo un conteo celular con hemocitómetro (Bright-Line, Hausser Scientific, USA) y se cultivaron  $1 \times 10^6$  células en una placa de cultivo de 6 pozos en medio RPMI 1640 complementado con SFB al 10%. Se dejaron en incubación a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  con un estímulo de 10 MOI de DENV2-NGC por pozo. Como control negativo, los monocitos fueron tratados con el pellet obtenido por ultra centrifugación a partir de un cultivo de células MK2 sin infectar. Se prepararon pozos duplicados para cada condición. Se dejaron con el estímulo viral durante 6, 12, 24 y 48 horas; al final de ese tiempo, se retiró todo el sobrenadante de los pozos, se lavaron dos veces con PBS1X a  $37^\circ\text{C}$  y se observaron por microscopía de campo claro (20X y 40X) en un Microscopio invertido Olympus IX71 equipado con una cámara Evolution VF (Media Cybernetics). La captura de imágenes se realizó con el software QCapture Pro® (Media Cybernetics) para determinar la adhesión y morfología de los monocitos a la placa de cultivo, posterior a la estimulación con DENV.

#### **7.4. Detección de TNF $\alpha$ en monocitos THP-1 estimulados con DENV2-NGC.**

El TNF $\alpha$  presente en los sobrenadantes de monocitos THP-1 estimulados con DENV2-NGC se cuantificó de acuerdo con el protocolo siguiente:

##### **7.4.1. Preparación de los sobrenadantes.**

Para la determinación del TNF $\alpha$  en los sobrenadantes de los cultivos de monocitos estimulados con DENV2-NGC, se cultivaron  $5 \times 10^5$  monocitos en placas de cultivo de 24 pozos en medio RPMI 1640 complementado con SFB al 10%. Se dejaron en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> con un estímulo de 10 MOI de DENV2-NGC por pozo (se hicieron duplicados por condición) y se estimularon durante 6, 12, 24 y 48 horas. Al final, se colectaron los sobrenadantes y se centrifugaron a 100 x *g* durante 10 minutos para desechar el pellet celular. Se recuperó el sobrenadante y se hicieron alícuotas en tubos para centrifuga de 1.5 mL que se conservaron a -20°C hasta su uso.

##### **7.4.2. ELISA sándwich para la cuantificación de TNF $\alpha$ .**

Para cuantificar el TNF $\alpha$  a partir de los sobrenadantes, se preparó una curva estándar con TNF $\alpha$  humana recombinante (rhTNF $\alpha$ , R&D Systems 210-TA). Se sensibilizó una placa para ELISA de 96 pozos (Nunc, 80040LE 0903) con 50  $\mu$ L (4 $\mu$ g/mL) con una dilución del anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  humano (R&D Systems, MAB610) en buffer de carbonatos (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, NaN<sub>3</sub> 0.2 g/L; pH 9.6) y se dejó en incubación a 4°C durante 16 horas. Se lavó 3 veces con PBS 1X-Tween 20 al 0.05%. Se bloquearon sitios de pegado inespecífico con 200  $\mu$ L por pozo con PBS 1X-albumina bovina sérica (BSA) al 1% y se dejó en incubación a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora. Se lavó de la manera previamente descrita. Posteriormente, para hacer la curva patrón del TNF $\alpha$  recombinante, se agregaron en 8 pozos por triplicado, 100  $\mu$ L de la proteína recombinante en las siguientes concentraciones: 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 y 7.81 pg/mL. Paralelamente, en la placa de titulación se agregaron 100  $\mu$ L de los sobrenadantes de los cultivos no estimulados y estimulados con DENV2-NGC por triplicado, incubando las muestras a TA durante 2 horas. Se lavó la placa y se agregaron 100  $\mu$ L por pozo (0.3  $\mu$ g/mL) del anticuerpo anti IgG biotinilado hecho en cabra (R&D Systems, BAF210), incubándose a TA durante 2 horas. La placa se lavó y posteriormente se agregaron 100  $\mu$ L de una dilución 1:300 de estreptavidina conjugada a peroxidasa (Sigma,

E-2886) en PBS 1X-BSA 1%, incubándose a TA durante 30 minutos. Finalmente, se lavó la placa y se añadieron 100  $\mu$ L por pozo de Tetrametilbenzidina o TMB (Sigma, T0440) en oscuridad durante 15 minutos hasta observar el cambio de color. Se detuvo la reacción con 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.19 N y se hizo la lectura de la densidad óptica (DO) a 450 nm en un lector para placas de ELISA (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems). A partir de las curva patrón obtenida (DO *versus* pg/mL), se determinó la concentración de TNF $\alpha$  en los sobrenadantes problema.

### **7.5. Detección del Factor Tisular en monocitos estimulados con DENV2-NG mediante inmunofluorescencia.**

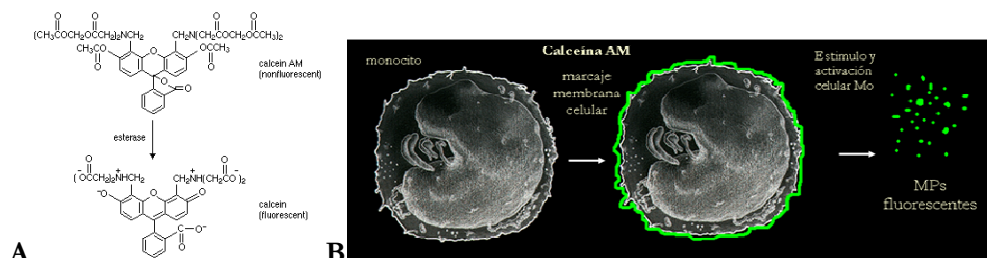
Se cultivaron 5 x10<sup>5</sup> monocitos en placas de cultivo de 24 pozos en medio RPMI 1640 complementado con SFB al 10%. Se dejaron en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> con una MOI=10 de DENV2-NGC por pozo y se dejaron en estimulación durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, los monocitos se lavaron dos veces con PBS 1X frío (se centrifugaron a 100 x g durante 10 minutos), se descartó el sobrenadante y la pastilla o pellet celular se resuspendió en buffer de fijación (PBS 1X, para-formaldehído al 4%), incubándose en hielo durante 20 minutos. Las muestras se lavaron con PBS 1X-BSA 0.5% y el pellet final se resuspendió en 100  $\mu$ L de PBS 1X. Se hizo el conteo celular, agregando 5x10<sup>4</sup> células en portaobjetos de vidrio salinizados (Fisherbrand, 12-550-15) para cada condición o tratamiento. Los portaobjetos se dejaron secar a TA y se lavaron con 100  $\mu$ L de PBS 1X-BSA 0.5% y se bloquearon con 100  $\mu$ L de PBS1X-BSA 3% durante 10 minutos a TA. Se retiró el exceso de solución de bloqueo y se añadió la dilución (1  $\mu$ g por cada 5x 10<sup>4</sup> células) del anticuerpo anti-TF humano acoplado a FITC (American Diagnostica Inc. 080320) en PBS1X-BSA 0.5% incubándose a 4°C durante 16 horas en una cámara húmeda. Finalmente, las laminillas o portaobjetos se lavaron con PBS 1X-BSA 0.5% y se añadieron 10  $\mu$ L de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en solución de montaje (Vectashield, Vector Laboratories Inc., 94010). Se colocó un cubreobjetos sobre la muestra, sellando los bordes de la laminilla con esmalte incoloro. Se protegieron de la exposición a la luz hasta su evaluación por microscopía confocal (Microscopio Olympus BX51WI equipado con una unidad de disco giratorio -DSU- y una cámara EM-CCD Hamamatsu). La captura se realizó con el software StereoInvestigator® (MicroBrightfield.)



## 7.6. Obtención y Detección de MPs de monocitos estimulados con DENV2-NG.

### 7.6.1. Micropartículas Fluorescentes.

Los monocitos THP-1 se marcaron con Calceína AM, compuesto que al entrar a la célula es cortado por esterasas intracelulares quedando insertado en la membrana, por lo que la membrana se marca con este compuesto fluorescente y puede ser identificado mediante Citometría de flujo (figura 7.1).



**Figura 7.1.A.** Calceína AM, molécula que ser cortada por esterasas intracelulares, forma un compuesto fluorescente unido covalentemente a la membrana del monocito. **B.** Se marca la membrana con Calceína AM para que posterior a la estimulación y activación de la célula, la liberación de micropartículas puede ser detectada por la emisión de fluorescencia.

Los monocitos se lavaron 2 veces con PBS 1X de la forma anteriormente descrita y se incubaron a 37°C durante 45 minutos con 1µM de Calceína AM (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) protegiéndolas de la luz. Se añadió un volumen de medio completo RPMI y se centrifugaron a 100 x g durante 10 minutos, el pellet celular se resuspendió en Medio Completo, cultivando 5 x10<sup>5</sup> monocitos en placas de 24 pozos en medio RPMI 1640 complementado con SFB al 10%, incubándose a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> con un MOI 10 de DENV2-NG por pozo, por triplicado y se dejaron en estimulación durante 12 horas. Al final del estímulo, se colectaron los sobrenadantes y se centrifugaron a 100 x g durante 20 minutos para descartar el pellet celular. Se recuperó el sobrenadante y este se centrifugó a 16 100 x g durante 40 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 200 µL de FacsFluid® cuidando de no exponerlo a la luz y se analizó por Citometría de Flujo.

Para montar las MPs en portaobjetos y visualizarlas por microscopia confocal, se obtuvieron como ya se ha descrito en el apartado anterior, con la siguiente modificación: el pellet resultante de la centrifugación a 16 100 x g durante 40 minutos, se resuspendió en 100 µL de buffer de fijación y se colocaron 30 µL en cada círculo trazado con un lápiz hidrofóbico, en el portaobjetos salinizado (Fisherbrand, 12-550-15). Se dejaron secar a TA

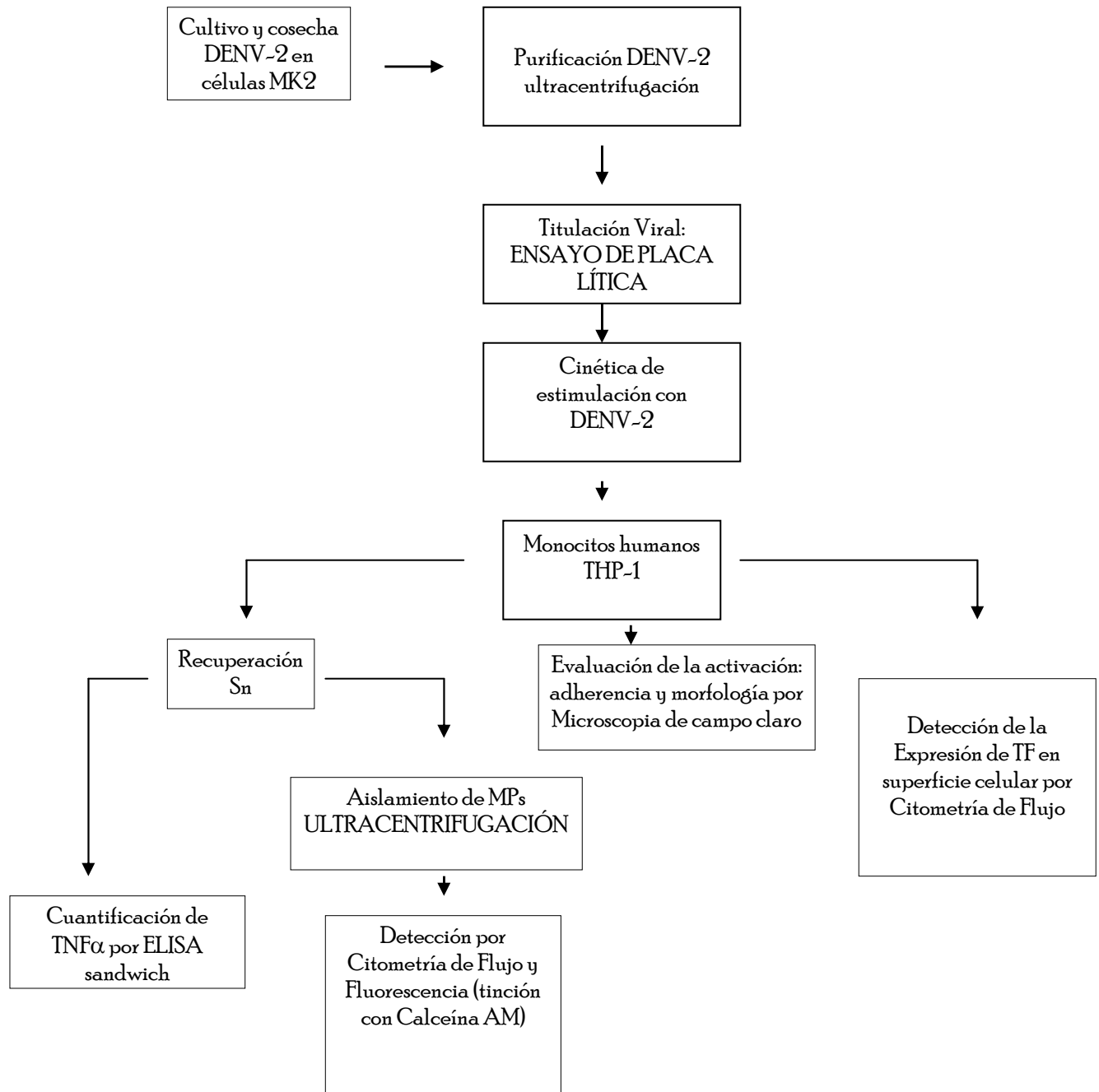
y se lavaron con PBS 1X-BSA 0.5%. Se les añadieron 10  $\mu$ L de solución de montaje con DAPI. Se colocó un cubreobjetos sobre la muestra, sellando los bordes de la laminilla con esmalte incoloro. Se protegieron de la exposición a la luz hasta su evaluación por microscopía de confocal (*Idem*).

Para inducir la formación de micropartículas, las células THP-1 se trataron con 5 ó 10  $\mu$ M de un ionóforo de calcio, denominado Calcimicina A23187 (Calbiochem, 100105). Se incubaron a 37°C durante 15 minutos y se procedió con el aislamiento de MPs a partir de los sobrenadantes de estos cultivos de monocitos de la manera anteriormente descrita.

### **7.7. Análisis de Datos.**

Para el análisis de los datos, se compararon las medias de los grupos utilizando la prueba estadística no paramétrica de *Mann-Whitney* con un intervalo de confianza del 95%. Se consideraron los valores de  $p < 0.05$  como diferencia significativa entre las medias comparadas. Para la elaboración de los gráficos y el análisis estadístico se utilizó el Software Prisma® versión 5.0.

## 8. Estrategia Experimental.



MPs= micropartículas; DENV-2 = virus Dengue serotipo 2, TF= factor tisular, Sn=sobrenadante del cultivo celular

9. RESULTADOS.

9.1. Amplificación y titulación del DENV-2.

El cultivo, cosecha y titulación del Virus Dengue Serotipo 2 Nueva Guinea C (DENV-2NG), se realizó con la línea de células epiteliales de riñón de mono verde LLC-MK2. En la figura 9.1 A se muestra una monocapa homogénea de células sin infectar, mientras que en la figura 9.1.B se observa un cultivo de ocho días post infección con DENV a una multiplicidad de infección (MOI) de 1; se muestra el desprendimiento celular o placas líticas debido al efecto citopático ocasionado por la infección viral que altera la integridad de la monocapa.

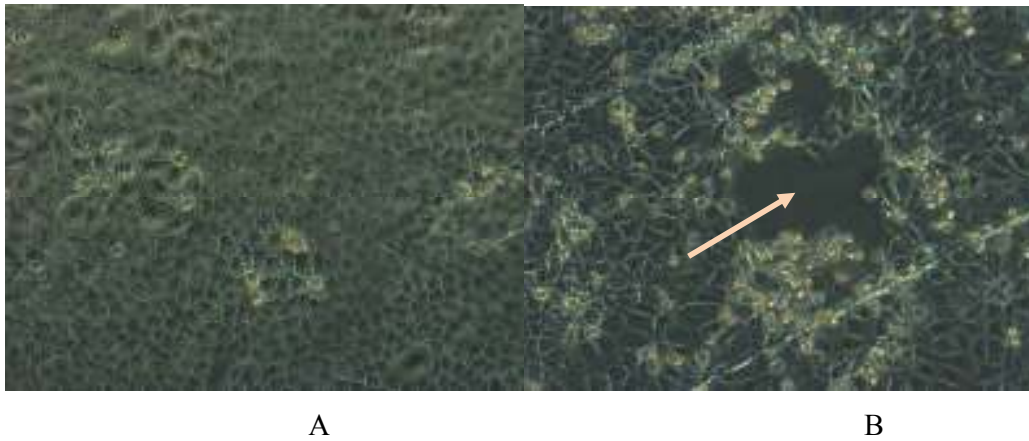


Figura 9.1. Infección de células LLC-MK2 con el virus Dengue. A) Células sin infectar. B) Células infectadas con DENV a 1.0 MOI. La flecha blanca señala el efecto citopático (placa lítica).

Cuando se observó el efecto citopático máximo en los cultivos de células LLC-MK2, ( antes de que se desprendiera la monocapa celular) se colectaron los sobrenadantes a partir de los cuales se llevó a cabo la purificación viral mediante ultra centrifugación. El título viral del stock del DENV, se determinó mediante ensayo de placa lítica. Alrededor del día 10 post-infección, observamos la formación de placas líticas completamente definidas (figura 9.2).

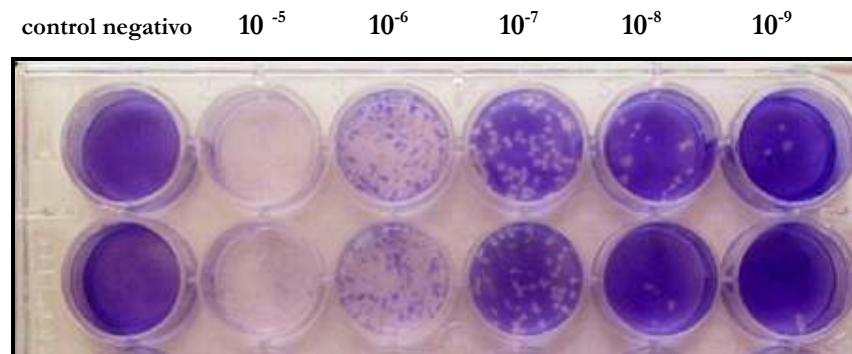
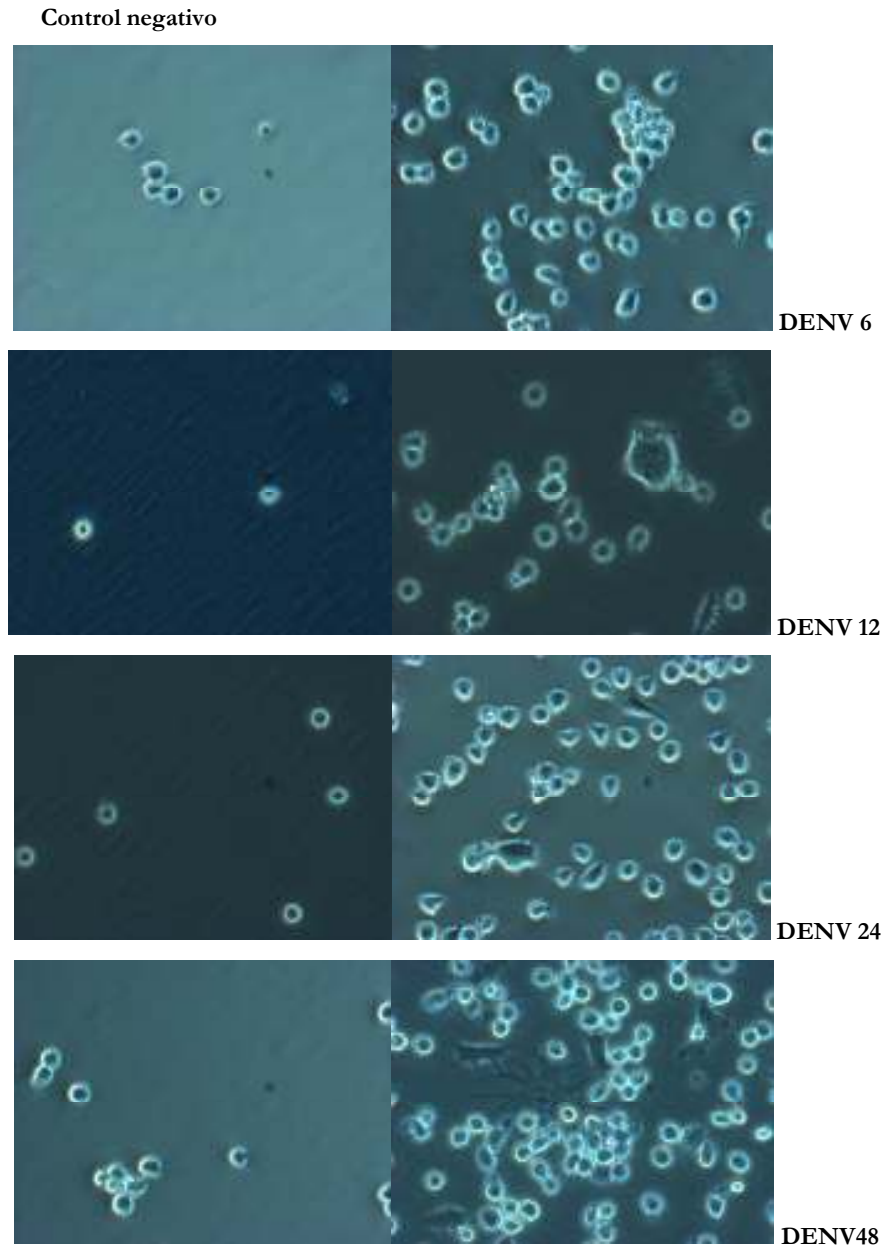


Figura 9.2. Titulación Viral por ensayo de placa lítica. Duplicados de las diluciones logarítmicas en base 10 del stock viral en células LLC-MK2

Se consideró la columna de la dilución más alta en la que se pudieron contar placas líticas: en la dilución  $10^8$  se observaron 15 placas en promedio de los dos pozos. El título viral ( $1.5 \times 10^{11}$ ) se expresó como unidades formadoras de placa (PFU) por mL (PFU/mL). A partir de esta muestra se llevaron a cabo todos los ensayos del presente trabajo.

## **9.2. Estímulo de monocitos THP-1 con el Virus Dengue. Activación y adherencia.**

Inicialmente se llevó a cabo la evaluación de la activación, morfología y adherencia de los monocitos THP-1 estimulados con el DENV. Las células THP-1 normalmente crecen en suspensión, sin formar monocapas. Sin embargo, posterior a un estímulo como el reconocimiento de un antígeno específico, se inicia un proceso de activación y adherencia celular a la placa de cultivo con la subsiguiente diferenciación a macrófagos. Por microscopía de campo claro se evaluó la adherencia de los monocitos THP-1 a la superficie de la placa de cultivo a las 6, 12, 24 y 48 posterior a la estimulación con DENV. Como se observa en las figura 9.3, las células activadas en presencia del DENV se adhirieron a la placa de cultivo. Así mismo, se presentaron los siguientes cambios en la morfología celular: aumento de tamaño, cambio en la forma redondeada a un plasmalema rugoso y la extensión de filipodios. Estas modificaciones fueron más notables a mayor tiempo de estimulación en donde se pudieron observar células diferenciadas (figura 9.3, DENV 48h). Estos efectos se presentaron desde las 6 h de estimulación (hpe) aunque es probable que los cambios inicien a tiempos más tempranos. En contraparte, las células que no fueron estimuladas no se adhirieron a la placa de cultivo ni mostraron cambios en su morfología.



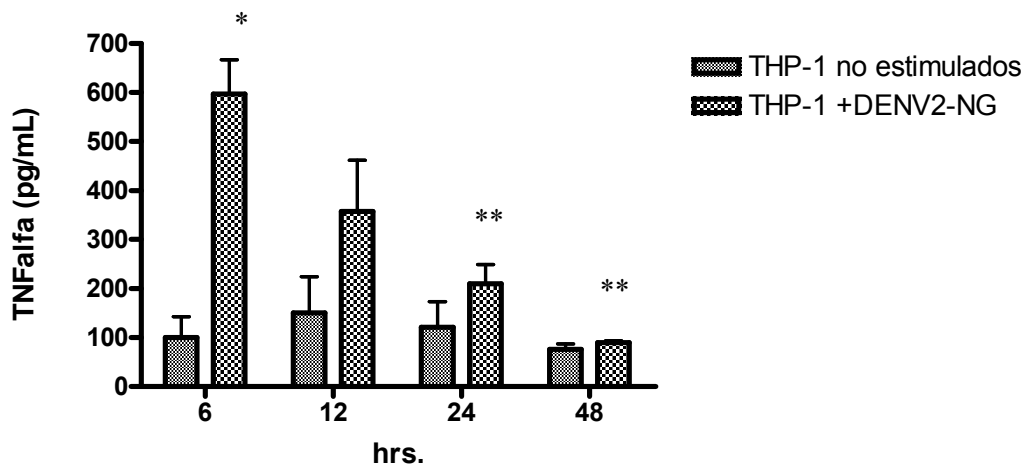
**Figura 9.3.** Activación y Adherencia de monocitos estimulados con DENV. *Derecha:* Adherencia de las células a la placa de cultivo así como la inducción filipodios y maduración de los monocitos THP-1 estimulados a diferentes tiempos (6, 12, 24 y 48 h) con DENV (MOI=10). *Izquierda:* Monocitos sin estimulación. Microscopía de campo claro 20X.

Se observó que no todos los monocitos responden de igual forma al estímulo con DENV, algunos, aunque están adheridos a la placa no presentaron extensiones de la membrana celular o diferenciación a macrófagos.

### 9.3. Producción de TNF $\alpha$ en monocitos THP-1 estimulados con DENV.

Posteriormente, evaluamos la respuesta inflamatoria de los monocitos THP-1 en presencia del virus Dengue, mediante la cuantificación de la producción de esta citocina.

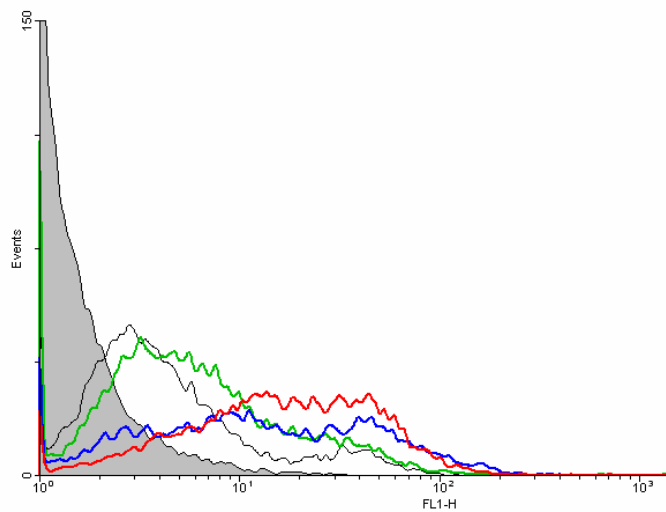
En la gráfica 9.1, se observa que los monocitos THP-1 secretan TNF $\alpha$  posterior al estímulo con DENV (MOI=10). La mayor concentración de TNF $\alpha$  se encontró a las 6 hpe: las células sin estimular presentaron  $100.1 \pm 74.1$  pg/mL *versus* los cultivos celulares estimulados:  $597.2 \pm 119.5$  pg/mL, concentración que se mantiene hasta las 12 hpe: células sin estimular  $150 \pm 128.7$  pg/mL *versus* células estimuladas  $357.5 \pm 180.3$  pg/mL; al final del tiempo de estimulación (24 y 48 h), la presencia del TNF $\alpha$  en el sobrenadante de los cultivos estimulados con DENV es prácticamente igual que en los controles negativos. Los datos anteriores pueden sugerir que los eventos de activación celular se presentan antes de las 6 hpe, alcanzándose la máxima respuesta a las 6 hrs. Estos resultados concuerdan con lo que se ha reportado en la literatura para monocitos aislados de sangre periférica, estimulados con antígenos del Virus Dengue (Espina *et al.*, 2003). Por otro lado, estos resultados son congruentes con los datos obtenidos por microscopía, respecto a los cambios en la morfología de los monocitos estimulados a las 6 hpe (figura 9.3).



**Gráfica 9.1.** Cuantificación por ELISA sandwich de la producción de TNF $\alpha$  en monocitos THP-1 a diferentes tiempos de estimulación con DENV (MOI 10). Resultado del promedio de tres experimentos independientes. Prueba no paramétrica de Mann-Whitney. \* $p < 0.05$  cuando se compara con los monocitos sin estimular, \*\* $p < 0.05$  cuando se compara con el valor de los monocitos estimulados con DENV durante 6 h.

**9.4. Cinética de Expresión del Factor Tisular en monocitos estimulados con diferentes multiplicidades de infección del virus Dengue.**

De acuerdo con que el DENV es capaz de activar a los monocitos THP-1 favoreciendo su respuesta proinflamatoria a través de la producción de TNF $\alpha$ ; se evaluó por Citometría de Flujo si la estimulación con el DENV induce la actividad procoagulante del monocito a través de la expresión de Factor Tisular. Para evaluar la expresión de TF en los monocitos activados, se hizo una cinética de estimulación utilizando diferentes multiplicidades de infección o MOI de DENV (MOI=0.1, 1 y 10) como se muestra en el histograma 9.1.



**Histograma 9.1.** Expresión de Factor Tisular (TF) en monocitos THP-1 estimulados con diferentes multiplicidades de infección (MOI) de DENV: MOI = 0.1 (verde), 1 (azul) y 10 (rojo) de DENV durante 12 h. Control de isotipo (gris) células sin estimular (negro). Adquisición de  $1 \times 10^4$  eventos. **FL1-H**, fluorescencia emitida por las células marcadas con el anticuerpo anti-TF-FITC; **Events**, representa el número relativo de células.

Se observó que las células activadas en presencia del DENV expresan TF a nivel de la superficie membranal y que esta respuesta es dosis dependiente. La expresión de TF fue significativamente mayor utilizando la MOI de DENV más elevada (10):  $16.935 \pm 1.379$  versus monocitos no estimulados =  $3.950 \pm 0.679$ ,  $p=0.0069$ . En los cultivos infectados con una MOI de 0.1, la intensidad de fluorescencia media (MIF) fue de  $6.750 \pm 1.315$  versus no estimuladas  $3.950 \pm 0.679$  mientras que en los monocitos estimulados con una MOI de 1, la MIF fue de  $13.540 \pm 1.541$  versus no estimulados  $3.950 \pm 0.679$ , con un valor de  $p=0.0151$  (tabla 9.1).



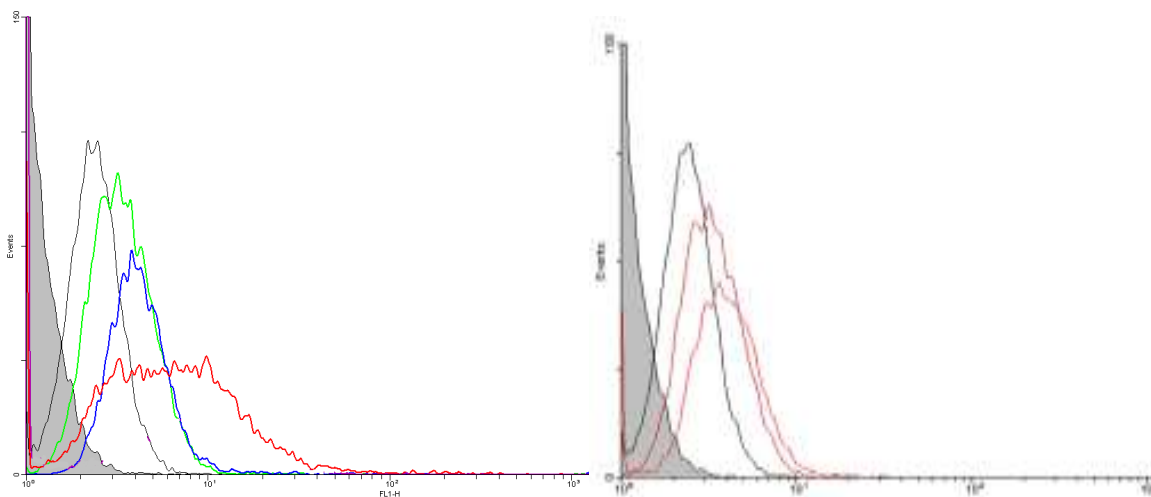
**Tabla 9.1.** Media de la intensidad de fluorescencia (MIF) dada por la expresión de Factor Tisular en monocitos estimulados con DENV y detectado por Citometría de Flujo.

Condición	Media de la intensidad de fluorescencia (MIF)*	Valor de p**
Control de isotipo	1.165 ± 0.021	-
Control negativo	3.950 ± 0.679	-
DENV2 MOI 0.1	6.750 ± 1.315	NS
DENV2 MOI 1	13.540 ± 1.541	0.0151
DENV2 MOI 10	16.935 ± 1.379	0.0069

\* Los resultados corresponden a la media ± 1 DE de dos experimentos independientes \*\*indica valores de p cuando las muestras en presencia del Virus Dengue se compararon con células sin estimular o control negativo (p<0.05). Prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

**9.5. Cinética de Expresión del Factor Tisular en monocitos estimulados con el virus Dengue.**

De acuerdo con la observación anterior en donde la máxima expresión de TF en los monocitos se dio con la mayor MOI de DENV probada; no se sabía a partir de qué momento se podía detectar la sobreexpresión de este TF. Por tanto, se llevó a cabo una cinética de tiempo de estimulación de monocitos con DENV (MOI=10) para evaluar la expresión de TF mediante Citometría de Flujo (histograma 9.2.A).



**A** **B**  
**Histograma 9.2.** Expresión de TF en monocitos THP-1 a diferentes tiempos de estimulación con DENV. Cinética de estimulación de los monocitos THP-1 con DENV (MOI 10). **A.** control de isotipo (relleno gris); células sin estímulo (negro), DENV estímulo de 6h (verde), DENV, estímulo de 12 h (rojo), DENV estímulo de 24h (azul). **B.** Control de isotipo (relleno gris), control negativo o sin estímulo (negro), DENV estímulo de 6h (rojo intenso) y 10 µg/mL de LPS estímulo de 6 h (rojo claro). Adquisición de 1x 10<sup>4</sup> eventos. **FL1-H**, fluorescencia emitida por las células marcadas con el anticuerpo anti-TF-FITC; **Events**, representa el número relativo de células.

En el histograma 9.2.A y la tabla 9.2, se observa un incremento en la expresión de TF, en los monocitos a partir de las 6 hpe (que apoya las observaciones realizadas por microscopía de campo claro desde las 6hpe, sección 9.2), a diferencia de los cultivos no estimulados. A las 12 hpe se presentó la máxima expresión de TF registrándose una MIF de  $6.92 \pm 0.601$  versus no estimulados  $3.125 \pm 0.554$  ( $p=0.0268$ ). La expresión de TF se mantuvo después de 12 h, decayendo a las 24 h (tabla 9.2).

Los monocitos se estimularon con LPS de *Escherichia coli* como control positivo dado que esta endotoxina es un fuerte inductor de TF en monocitos y es a las 6 hpe cuando se presenta la expresión más elevada de este receptor (Aharon *et al.*, 2008). El histograma 9.2.B, muestra que la respuesta a las 6 h de estimulación con LPS, es similar a la que se observó a las 6hpe con DENV aunque fue significativamente mayor con la endotoxina ( $4.95 \pm 0.212$  versus  $4.11 \pm 1.123$ , respectivamente  $p=0.0420$ ; tabla 9.2).

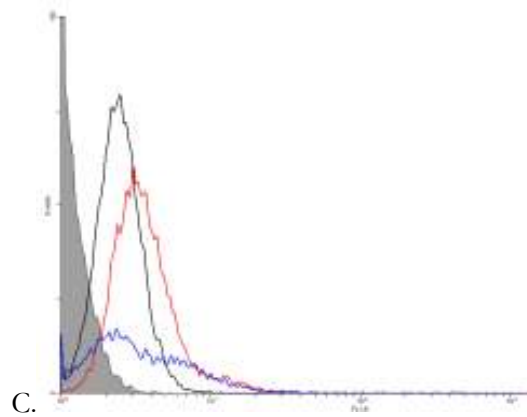
**Tabla 9.2.** Media de la intensidad de fluorescencia dada por la expresión de Factor Tisular en monocitos estimulados con DENV a diferentes tiempos de estimulación y detectado por Citometría de Flujo.

	Condición	Media de la intensidad de fluorescencia (MIF)*	**Valor de p
<b>A.</b>	Control de isotipo	$1.265 \pm 0.049$	-
	Control negativo	$3.125 \pm 0.554$	-
	DENV2 6h	$4.265 \pm 0.926$	NS
	DENV2 12h	$6.92 \pm 0.601$	0.0268
	DENV2 24h	$5.52 \pm 1.485$	0.0461
<b>B.</b>	Control de Isotipo	$1.13 \pm 0.03$	-
	Control negativo	$2.97 \pm 0.67$	-
	DENV 6h	$4.11 \pm 1.123$	NS
	LPS 6h	$4.95 \pm 0.212$	0.0420
<b>C.</b>	Control de Isotipo	$1.37 \pm 0.085$	-
	Control negativo	$2.86 \pm 0.552$	-
	DENV2 hervido y radiado 6h	$3.79 \pm 1.48$	NS
	DENV2 hervido y radiado 12h	$3.87 \pm 1.973$	NS

\* Los resultados corresponden a la media  $\pm$  1 DE de dos experimentos independientes \*\*indica valores de p cuando las muestras en presencia del Virus Dengue se compararon con células sin estimular o control negativo ( $p < 0.05$ ). Prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Así mismo, para determinar si el efecto inducido por el DENV en el monocito es ocasionado por el virus activo, se evaluó la estimulación de los THP-1 utilizando una muestra de pellet viral hervido durante 5 min a  $98^{\circ}\text{C}$  y posteriormente radiado con luz UV durante 20 min. Como se observa en el

histograma 9.3, no se presentó un incremento significativo de la expresión de TF en presencia del virus inactivado entre las 6 y 12 h (MIF de 3.79 y 3.87 respectivamente) con respecto a las células sin estimular (MIF de 2.86), lo cual indica que son las partículas o antígenos virales biológicamente activos los que están induciendo tanto la activación celular como la expresión de TF (tabla 9.2.C).

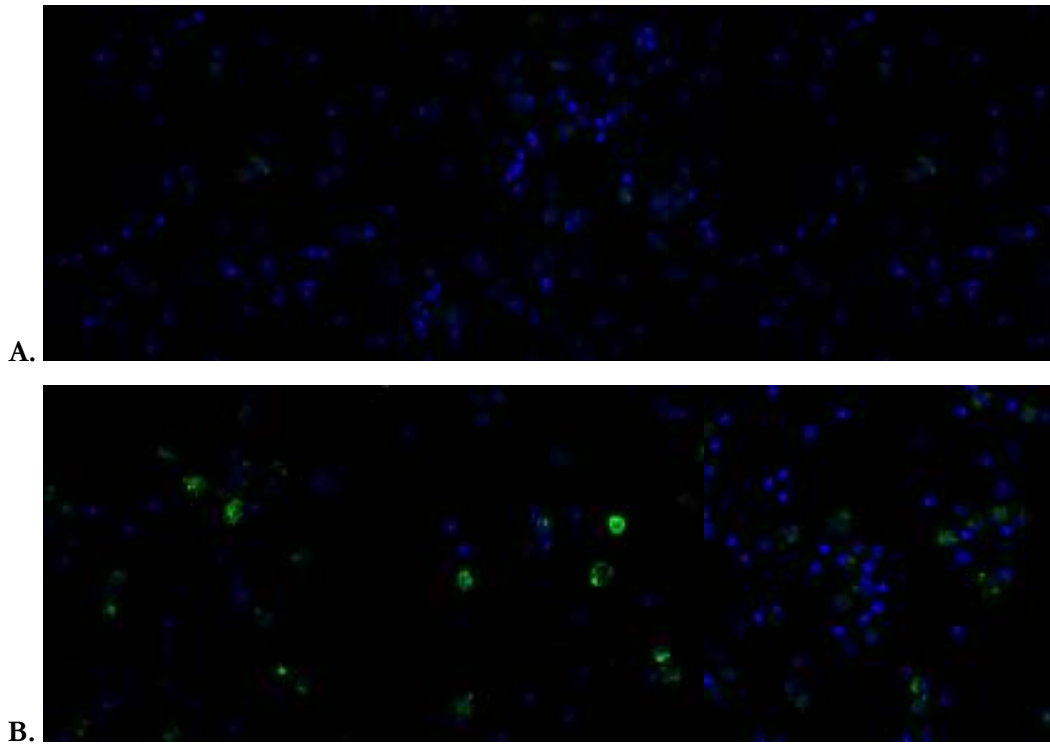


**Histograma 9.3.** Efecto del DENV inactivo en la expresión de TF en los monocitos THP-1. Control de isotipo (relleno gris), control negativo o sin estímulo (negro), virus hervido y radiado, estímulo de 6 h (rojo) y 12 h (azul). Adquisición de  $1 \times 10^4$  eventos. **FL1-H**, fluorescencia emitida por las células marcadas con el anticuerpo anti-TF-FITC; **Events**, representa el número relativo de células.

Por lo anterior, el DENV induce la expresión de Factor Tisular en los monocitos THP-1 de manera dosis dependiente y aunque la activación celular se puede observar a partir de las 6 h de estimulación, la máxima expresión de TF se presenta a las 12 h post infección.

### 9.6. Detección del Factor Tisular en monocitos estimulados con DENV mediante inmunofluorescencia.

La expresión de TF posterior a la estimulación con DENV se evaluó también mediante inmunofluorescencia. En la figura 9.4 se observa un incremento en la fluorescencia emitida por los monocitos en presencia del DENV, en comparación de las células que no fueron estimuladas. Asimismo, encontramos que no todas las células responden al estímulo con DENV.

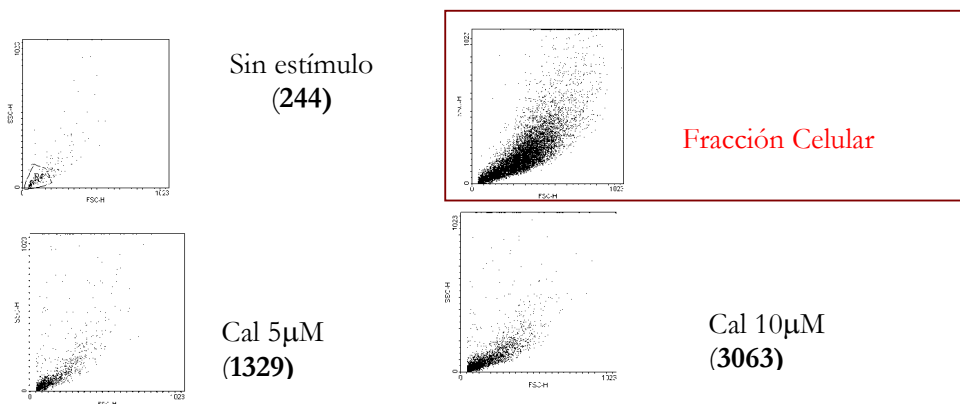


**Figura 9.4.** Expresión de TF en monocitos estimulados con DENV: **A.** Inmunofluorescencia que muestra el marcaje con un anticuerpo anti-TF acoplado a FITC (verde) en células THP-1 no estimuladas y **B.** estimuladas con DENV MOI= 10, durante 12 h. Marcaje de núcleos con DAPI (azul). Microscopía de Confocal 40X.

**9.7. Obtención y Detección de MPs de monocitos estimulados con DENV.**

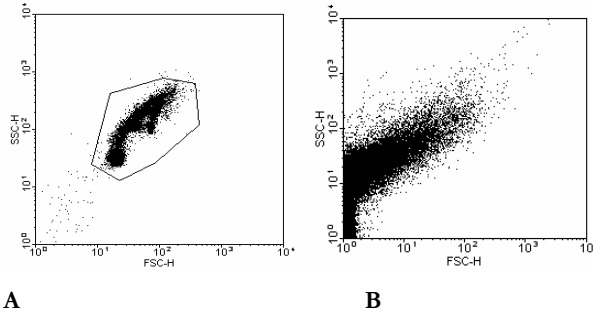
Con base a que observamos que durante la infección de monocitos THP-1 con el DENV se favorece la activación celular, mediante la expresión tanto del receptor trombogénico TF como de la producción de TNF $\alpha$ , decidimos evaluar la posible presencia de otros productos de activación celular como son las micropartículas (MPs), a partir de los monocitos estimulados con DENV. Inicialmente llevamos a cabo diferentes ensayos de estandarización de la técnica para aislar y detectar MPs a partir de sobrenadantes de cultivos de monocitos THP-1 activados. Se utilizó Calcimicina A23187 como control positivo. La calcimicina es un ionóforo de calcio que se utiliza como activador de células a través de la movilización de calcio intracelular lo que promueve la formación y liberación de micropartículas de membrana celular (Aharon *et al.*, 2008).

En la figura 9.5 se presentan los resultados obtenidos a partir de sobrenadantes de cultivo de monocitos THP-1, estimulados durante 15 min con 5 y 10  $\mu$ M de Calcimicina (Cal) que fueron analizados por Citometría de Flujo. Se observaron partículas celulares de menor tamaño y celularidad (FSC-H y SSC-H, respectivamente, dotplots de la figura 9.5) en comparación con las células. El número de partículas se incrementó en los monocitos activados con calcimicina, este aumento fue dosis dependiente ya que con 5  $\mu$ M de Cal se detectaron 1329 eventos, mientras que con 10  $\mu$ M 3063 eventos, respectivamente.



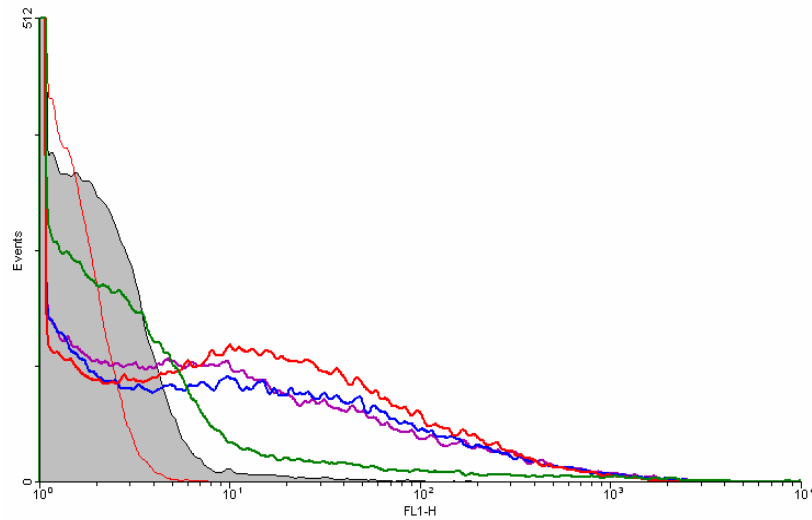
**Figura 9.5.** Dotplots que muestran las partículas detectadas en sobrenadantes de cultivos monocitarios THP-1 y estimulados con Calcimicina (5  $\mu$ M ó 10  $\mu$ M) durante 15 min. Entre paréntesis se indica el número de eventos detectados en cada condición de tratamiento en una misma cantidad de muestra durante 1 minuto de adquisición en el Citómetro de Flujo FascCalibur. El recuadro rojo muestra los eventos correspondientes a la adquisición de células THP-1.

En los ensayos posteriores de citometría de flujo para la detección de MPs a partir de sobrenadantes de cultivo de monocitos estimulados con DENV, utilizamos microperlas de poliestireno de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro (MicrobeadNIST 64030, Polysciences, Inc.) ajustando los parámetros del *dotplot* para la adquisición en el citómetro de las partículas ó MPs con un tamaño entre 0.1 a 1 micras de (figura 9.6).



**Figura 9.6.** Dotplots que muestran (A) el polígono o región R1 seleccionada a partir de la adquisición de microperlas de poliestireno de 1 $\mu\text{m}$  (B) las partículas detectadas en este dotplot ajustado con los parámetros de SSC-H y FSC-H dados en A, en una muestra de sobrenadante de cultivo de monocitos estimulados con DENV durante 6h, donde posiblemente hay MPs de 1 $\mu\text{m}$  de tamaño y menor.

Posterior a la estandarización de los parámetros para la detección de micropartículas por citometría de flujo, llevamos a cabo paralelamente la detección de MPs mediante fluorescencia. Para evaluar si la estimulación de los monocitos con DENV, además de inducir la activación del monocito y la expresión de TF, induce la formación de MPs, se llevaron a cabo ensayos en los que se marcaron las células THP-1 con Calceína AM y posteriormente se estimularon con DENV y Calcimicina como control positivo. Se recuperaron los sobrenadantes de cultivo a partir de los que se aislaron las MPs mediante ultracentrifugación, analizándose por citometría de flujo. Como se observa en el histograma 9.4, las células estimuladas con Calcimicina mostraron mayor intensidad de fluorescencia ya que al haberse activado generaron un gran número de micropartículas a partir de la membrana celular (histograma 9.4, tabla 9.3). Esta activación aumentó significativamente cuando los monocitos se estimularon con DENV durante 12 h:  $5.27 \pm 0.622$  *versus* no estimulados  $1.77 \pm 0.396$  ( $p=0.0215$ ) y 24 h:  $5.5 \pm 0.990$  *versus* no estimulados  $1.77 \pm 0.396$  ( $p=0.0385$ ) con respecto a las células estimuladas únicamente con Calcimicina ( $2.62 \pm 0.707$ ).



**Histograma 9.4.** Se muestra la fluorescencia de las partículas de  $1 < y < 1 \mu\text{M}$  marcadas con Calceína AM y adquiridas en el Citómetro de Flujo Facscaibur. Blanco - células sin marcaje con Calceína AM- (rojo, línea delgada), sin estímulo (gris), Calcimicina  $10 \mu\text{M}$  (verde), estimulación de 12 h con DENV (azul), estimulación de 24 h con DENV (morado), estimulación de 24 h con DENV + Calcimicina  $10 \mu\text{M}$  (rojo línea gruesa). Adquisición de  $1 \times 10^4$  eventos. **FL1-H**, fluorescencia emitida por las células marcadas con Calceína AM; **Events**, representa el número relativo de micropartículas.

Se observó que la media de la intensidad de fluorescencia de las MPs resultante de células estimuladas durante 24 h con DENV y al final del estímulo con calcimicina  $10 \mu\text{M}$  durante 15 min, fue significativamente mayor en comparación con la MIF de MPs originadas a partir de células únicamente estimuladas con DENV o calcimicina: DENVy cal,  $7.76 \pm 1.676$  *versus* no estimulados  $1.77 \pm 0.396$  ( $p=0.0389$ ), lo que sugiere un efecto sumatorio que potencializa la activación celular y la formación de MPs bajo estas condiciones (tabla 9.3).

**Tabla.9.3.** Media de la intensidad de fluorescencia de MPs fluorescentes a partir de monocitos estimulados con DENV y detectado por Citometría de Flujo.

Condición	Media de la intensidad de fluorescencia (MIF)*	Valor de p**
blanco	1.44 ± 0.382	-
Control negativo	1.77 ± 0.396	-
Calcimicina 10 µM	2.62 ± 0.707	NS
DENV 12h	5.27 ± 0.622	0.0215
DENV 24h	5.5 ± 0.990	0.0385
DENV 24 h + Calcimicina 10 µM	7.76 ± 1.676	0.0389

\* Los resultados corresponden a la media ± 1 DE de dos experimentos independientes \*\*indica valores de p cuando las muestras en presencia del Virus Dengue se compararon con células sin estimular ( $p < 0.05$ ). Prueba estadística no paramétrica de Mann-Whitney.

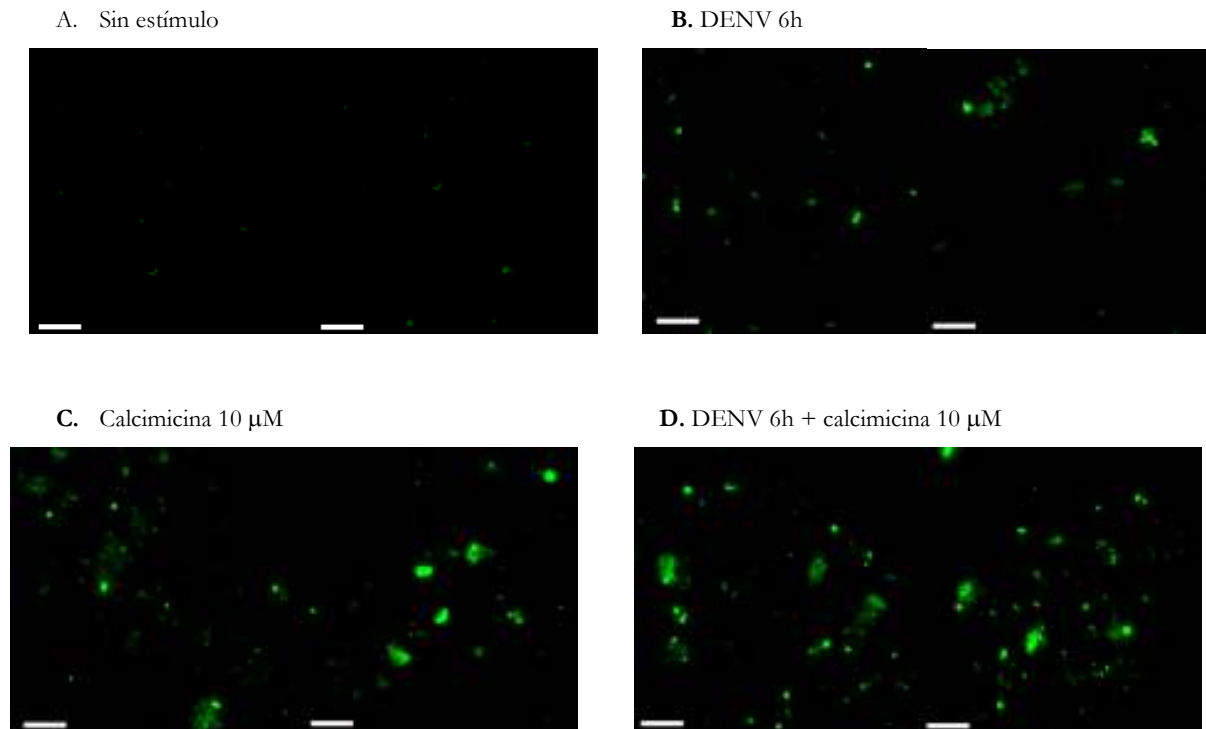
Adicionalmente al ensayo de citometría, se aislaron micropartículas como se ha descrito anteriormente y se fijaron en paraformaldehído al 4% para montarlas en laminillas y observarlas por microscopia confocal (figura 9.7). Encontramos que el estímulo de los monocitos con DENV durante 6 h induce la formación de partículas derivadas de la membrana celular a diferencia de los monocitos que no son estimulados (figuras 9.7). Los resultados de fluorescencia confirman los datos obtenidos mediante citometría de flujo, en donde aumenta la presencia de MPs originadas a partir de células estimuladas con DENV con respecto a las MPs que se generan a partir de células no estimuladas. Así mismo, se observaron los fragmentos de membrana o micropartículas derivadas de las células estimuladas con calcimicina, que fue utilizado como control positivo (figura 9.7).

Por otra parte, la formación de MPs se potencializa cuando las células se trataron previamente con un estímulo conjunto de DENV y calcimicina (figura 9.7). Así mismo, la liberación de micropartículas parece ser un evento temprano ya que a partir de las 6 h de estimulación, ya se está llevando a cabo este proceso, lo cual era de esperarse de acuerdo con los datos presentados: la activación celular por DENV se puede determinar desde las 6 h post estimulación. Sin embargo, en un futuro será necesario evaluar la carga antigénica presente en las MPs. De acuerdo a los datos obtenidos por citometría de flujo, es posible que las MPs que se están liberando durante las primeras h de la estimulación viral (durante las primeras 6 h aproximadamente) lleven consigo el TF que se expresado en el monocito durante la activación con DENV. Sin embargo, el TF detectable en MPs a tiempos posteriores a las 12 h pos



estimulación puede ser considerablemente mayor, pues es cuando se da la máxima expresión de TF en la superficie celular (histograma 9.2). Incluso, es posible que un mayor número de MPs se libere a las 12 h de estimulación coincidiendo con la máxima expresión de TF.

Observamos que el tamaño y morfología de las partículas obtenidas a partir del estímulo tanto con calcimicina como con DENV, cambió notablemente con respecto al control (figura 9.7) tales como numerosos agregados.



**Figura 9.7.** Fluorescencia de micropartículas generadas a partir de monocitos cuya membrana se marcó con Calceína AM de **A.** células sin estímulo **B** estimuladas con DENV durante 6 h (MOI =10), **C** estimuladas con 10  $\mu$ M de calcimicina durante 15 min y **D** estimuladas con DENV durante 6 h y calcimicina 10  $\mu$ M durante 15 min. Microscopía de Confocal, 60X Escala 20  $\mu$ m.

## 10. DISCUSIÓN

### **Activación de monocitos humanos en presencia del Virus Dengue.**

Los monocitos son las principales células blanco para el Virus Dengue y juegan un papel importante durante la diseminación viral en el hospedero humano (Gubler 1998; Halstead 1988). Se ha demostrado que en el Dengue severo, se presenta una activación exacerbada de los monocitos (Halstead 1989) induciendo la expresión de diferentes mediadores solubles como citocinas proinflamatorias: TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8, los cuales a su vez participan en la activación del endotelio vascular, que favorece el incremento en la permeabilidad de las células endoteliales (Anderson *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1994; Espina *et al.*, 2003). Estos datos sugieren la participación de los monocitos en la patogénesis del Síndrome de Choque por Dengue.

En el presente trabajo, se llevó a cabo la evaluación de la respuesta pro-inflamatoria y pro-coagulante de monocitos humanos estimulados con el virus Dengue. Como modelo de estudio, usamos la línea celular humana THP-1, la cual ha sido ampliamente utilizada en estudios funcionales, debido a su comportamiento similar al de los monocitos humanos derivados de sangre periférica: producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8, la expresión de receptores Fc $\gamma$  y C3b, moléculas de adhesión, la diferenciación a macrófagos y fagocitosis, entre otras (Auwerx 1991). Cabe mencionar que, las células THP-1 se han utilizado en diferentes estudios *in vitro* referentes a la elucidación de los mecanismos involucrados en la interacción DENV-monocito (Hober *et al.*, 1996; Ubol *et al.*, 2008; Padwad *et al.*, 2010).

En este estudio, se evaluó la activación celular inducida por DENV: tanto la morfología como la capacidad de adherencia de los monocitos THP-1. Las THP-1 no activadas, crecen en suspensión sin formar monocapa (Tsuchiya *et al.*, 1980). Sin embargo, como se observó en el presente trabajo, a partir de las 6 horas post-estimulación (hpe) con el DENV, los monocitos se activaron favoreciendo la expresión de moléculas pro-adherentes, ya que los cultivos permanecieron adheridos a la placa de cultivo. Con el transcurso de la estimulación mostraron una maduración a macrófagos. Esta observación es congruente con estudios previos *in vitro* en donde se reporta la activación de monocitos a las 6 horas post-infección con DENV. También a partir de este tiempo, observaron tanto partículas virales adheridas a la superficie celular como antígenos virales en las vacuolas intra-citoplasmáticas y fagosomas (Espina *et al.*, 2003). Por lo anterior confirmamos la participación del monocito como una célula efectora importante durante las primeras horas de la infección por DENV.

A pesar de que no se conoce cuál(es) es (son) el(los) receptor(s) que participa (n) en el reconocimiento específico del virus Dengue en los monocitos THP-1 y la subsiguiente activación

celular, es un hecho que las células THP-1 presentan un incremento en su capacidad de adherencia, un cambio en su morfología y su maduración a macrófagos ante la estimulación y activación con el virus Dengue, siendo un modelo celular útil en el estudio de las interacciones tempranas del DENV con su célula diana.

Se propone que la activación de monocitos pueda estar mediada por diferentes receptores presentes en la superficie celular monocitaria como: CD14, CD11b/18, TLR2 y 4 para lipopolisacáridos bacterianos o bien por el reconocimiento de antígenos opsonizados por moléculas de IgG a través de sus receptores Fcγ (Abbas *et al.*, 2007). El reconocimiento de lipopolisacáridos bacterianos está mediado por el complejo CD14/TLR4 (Matthew *et al.*, 1998). En 1999, Chen *et al.*, demostraron mediante ensayos *in vitro* que el LPS bloquea la infección de monocitos- macrófagos con DENV, probablemente porque el LPS interactúa con alguna molécula de unión celular aún no determinada, la cual pueda ser importante durante la unión de las partículas virales con el receptor de membrana en el monocito por lo que el CD14 es una de las moléculas propuestas para la internalización del DENV en monocitos. Es posible que durante la internalización celular del DENV mediada por receptor (RME), estén participando dos o más moléculas: un co-receptor ubicuo, de baja afinidad como el DC-SIGN (molécula de adhesión intracelular 3- específica de células dendríticas no integrina inmovilizadora de ICAM-3) y/o heparán sulfato, que localiza al virus en la superficie celular (incrementando la concentración local) y un segundo receptor de alta afinidad que favorece la internalización del DENV (Clyde *et al.*, 2006). Recientemente, se reportó que la molécula CLEC5A (C-type lectin domain family 5 member A) también conocida como lectina mielóide asociada a DAP12 (MDL-1), es capaz de reconocer específicamente al DENV2 (Chen *et al.*, 2008) ya que a diferencia de DC-SIGN, el complejo CLEC5A-DENV induce señalización celular para la expresión de TNF $\alpha$ . Asimismo, se conoce que la secreción de TNF $\alpha$  esta mediada por CLEC5A y TLR7-MyD88. A través de este receptor, el DENV favorece la liberación de diferentes citocinas pro-inflamatorias a nivel del macrófago, por lo que su bloqueo atenúa la respuesta inflamatoria y mantiene la inmunidad del hospedero para eliminar al virus (Chen *et al.*, 2008). Así, aunque es posible que la activación celular de los THP-1 que se observó en este trabajo este llevándose a cabo a través de los receptores discutidos anteriormente o que la activación de los monocitos puede estar mediada por más de un receptor, no todos los monocitos responden de igual forma ante el estímulo viral; algunos, aunque están adheridos a la placa no presentan extensiones de la membrana celular o maduración a macrófagos, probablemente por la heterogeneidad de la línea celular al momento de trabajar con ella.

**Producción de TNF $\alpha$  en monocitos THP-1 estimulados con el Virus Dengue.**

Aunado a los cambios morfológicos y de adherencia presentes en los monocitos humanos estimulados con el virus Dengue, en el presente trabajo encontramos que la línea celular THP-1 es capaz de activarse e inducir la producción de TNF $\alpha$ , como un mecanismo efector ante la infección con DENV.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) estimula la fase aguda de la respuesta inflamatoria y se produce principalmente por monocitos-macrófagos. En presencia de LPS u otras endotoxinas bacterianas se pueden liberar grandes cantidades de esta citocina (Abbas *et al.*, 2007). La principal función del TNF $\alpha$  es el reclutamiento de células efectoras, inicialmente neutrófilos, subsecuentemente monocitos y leucocitos al sitio de la infección, favoreciendo tanto la expresión de moléculas de adhesión (selectinas e integrinas) en células endoteliales, como la activación celular durante la eliminación del patógeno. El TNF $\alpha$  puede inducir muerte celular por apoptosis, inflamación e inhibir la replicación viral (Tracey 1988).

En este estudio, se observó que las células THP-1 estimuladas con DENV, presentan un incremento en la producción de TNF $\alpha$  durante las primeras 12 hpe; presentándose la máxima producción a las 6 hpe. Estos resultados apoyan los datos encontrados por microscopía de campo claro y los cambios en la morfología de los monocitos en presencia del DENV2 también a las 6 hpe. Asimismo, Espina y col. demostraron que monocitos aislados de sangre periférica, estimulados con antígenos del DENV fueron capaces de producir TNF $\alpha$ , alcanzando su máxima expresión a las 6 h post-infección (Espina *et al.*, 2003). Por tanto, la producción temprana de TNF $\alpha$  posterior a la estimulación viral del monocito, favorece la activación celular para contener la infección viral a través tanto de la fagocitosis como de la producción de citocinas pro-inflamatorias. Es importante recordar que el TNF- $\alpha$ , es la principal citocina implicada en el Dengue Severo o DHF/DSS (Anderson 2003). Se ha demostrado que los mediadores solubles secretados por monocitos infectados con DENV como el TNF $\alpha$  e IL-1 participan tanto en la activación endotelial como en el incremento en la permeabilidad vascular (Anderson, R *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1994; Espina *et al.*, 2003), sugiriendo que la interacción entre el virus dengue y los monocitos juega un papel importante en la patogénesis del Síndrome de Choque por Dengue. Se ha reportado que en el suero de pacientes con DHF/DSS se presenta un incremento de TNF $\alpha$  y que el tratamiento de células endoteliales con el suero de estos pacientes favorece la expresión de VCAM-1, efecto que se abatió con anticuerpos anti-TNF $\alpha$  (Cardier *et al.*, 2005), por lo que el incremento de esta citocina en pacientes con Dengue Severo (Hober *et al.*, 1996; Chakravarti & Kumaria 2006) se asocia con la progresión a las formas graves de la enfermedad.

Por otra parte, el TNF $\alpha$  es una molécula muy pleiotrópica que participa activando otros sistemas como el de la coagulación, mediante la modificación de las propiedades anticoagulantes del endotelio vascular como la inducción de la expresión del Factor Tisular (receptor de inicio de la coagulación) y la inhibición de la expresión de Trombomodulina, la cual inicia la vía anti-coagulante (Rodgers 1988). Por otra parte, se sabe que la producción desregulada de TNF $\alpha$  se ha asociado con enfermedades severas como el choque séptico por infecciones bacterianas y CID (Tracey 1988). Asimismo, la producción de TNF $\alpha$  durante la infección por Dengue, podría modificar la respuesta proinflamatoria- procoagulante del hospedero.

### **Expresión del Factor Tisular (TF) en monocitos THP-1 activados con el Virus Dengue.**

Uno de los objetivos centrales del presente trabajo fue la evaluación de la actividad pro-coagulante proveniente de monocitos activados por DENV, mediante la detección de la expresión del Factor Tisular. Se observó que durante la infección por DENV el TF se sobre expresó como consecuencia de la activación de las células monocíticas.

En reposo, las células endoteliales y los monocitos no expresan constitutivamente TF funcional. Sin embargo, en respuesta a la estimulación con ciertos antígenos como los lipopolisacáridos (LPS), quimiocinas, homocisteína, P-selectina y/o ciertas citocinas inflamatorias se favorece la expresión de TF en estas células (Wolberg & Roubey. 2004). Geisbert *et al.*, 2003 propusieron que la sobre-expresión de TF en monocitos/macrófagos tiene un papel central en el inicio de las complicaciones procoagulantes y hemorrágicas que caracterizan la infección con el Virus Ébola. Sin embargo, durante la infección con el Virus Dengue, aún no se conoce el papel que tiene este receptor en el contexto fisiopatológico del Dengue Severo y la coagulopatía como la CID asociada. En este contexto, los monocitos THP-1 son un modelo de estudio adecuado para evaluar tanto la activación celular por DENV así como sus diferentes efectos tales como la producción de citocinas pro-inflamatorias, expresión de TF y la formación de Micropartículas. Con base en lo anterior, se determinó la expresión de TF en monocitos estimulados a diferentes multiplicidades de infección y tiempos de estimulación; se encontró un incremento en la expresión de TF desde las 6 hpe con el DENV con un nivel similar al encontrado con LPS. Observamos que a las 12 hpe se presentó la máxima expresión de este receptor que fue disminuyendo hasta 24 h. En nuestro grupo (Huerta-Zepeda *et al.*, 2008), previamente reportamos que durante la infección de células del endotelio vascular humano se observa un incremento en la expresión de TF a las 8 horas post infección. Nuestros resultados sugieren dos posibilidades respecto al tiempo en el que se da la expresión de este receptor: que la expresión de TF en monocitos estimulados con un agonista distinto a LPS o endotoxinas bacterianas, lleve más de 6 horas, o bien; que la sobre-expresión de TF sea un efecto sumatorio del estímulo viral que requiera la presencia de mediadores solubles (e.g. citocinas como

TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8) producidos previamente por los monocitos en respuesta al estímulo por DENV lo que en conjunto potencializaría la respuesta procoagulante (la máxima producción de TNF $\alpha$  se presentó a las 6 hpe, antes de que se observara la máxima producción de TF). Así, la respuesta procoagulante observada en los monocitos puede ser un efecto secundario inducido por el TNF $\alpha$  (u otros mediadores). Importantemente, se ha demostrado que el TNF $\alpha$  participa en la actividad procoagulante de monocitos, a través de la expresión del Factor Tisular (Clonking *et al.*, 1988). Mediante ensayos de bloqueo de esta citocina (e.g. anticuerpos anti-TNF $\alpha$ ), se determinaría en qué medida el TNF $\alpha$  pueda estar contribuyendo al desarrollo de una respuesta pro-coagulante dependiente del monocito así como determinar el efecto que por sí mismo el Virus Dengue ejerce en los monocitos.

Por otra parte, en este mismo trabajo de Huerta-Zepeda (*Idem*) se encontró que existe una diferencia en la respuesta de células endoteliales que es dependiente del aislado viral que se utilice en los ensayos de activación celular, ya que se observó un incremento significativo de TF en las células infectas con un aislado viral proveniente de un caso fatal de Dengue, en comparación del efecto obtenido por la infección con un aislado proveniente de un paciente con Dengue Clásico. En este trabajo de tesis, los diferentes ensayos se llevaron a cabo utilizando el DENV serotipo 2 (Nueva Guinea C, NGC) que corresponde al aislado de un paciente con Dengue Clásico. Por lo que la expresión de TF observada en este estudio, puede deberse no solo al efecto *per se* que el DENV2 induce en los monocitos (del que se hipotéticamente se esperaría una respuesta de menor magnitud con respecto a la activación inducida por un aislado viral de Dengue Severo). No se puede descartar que otro (s) agonista (s) además del DENV, como los mediadores inflamatorios producidos por los monocitos previamente estimulados con DENV puedan participar en la activación celular observada. Es decir, el efecto que el DENV induce en el monocito humano es inicialmente su activación (en términos de la respuesta inflamatoria evaluada), favoreciendo a su vez la instalación de una respuesta procoagulante secundaria a través de la expresión de TF en el monocito, amplificando indirectamente el estímulo primario por el DENV.

Asimismo, observamos que el nivel de expresión de TF en el monocito depende de la multiplicidad de infección utilizada, ya que el número de partículas virales tiene un efecto directo en la activación celular y de manera consecutiva, en la expresión de TF. Esto puede ser importante en el paciente con Dengue severo, ya que se ha propuesto que dependiendo de la carga viral que presente el paciente durante la fase febril o virémica, las manifestaciones clínicas pueden asociarse con el Dengue Severo (Thomas *et al.*, 2008; Wei-Kung *et al.*, 2003; Guilarde *et al.*, 2008). Lo anterior sugiere que tanto la replicación viral activa o el retraso en la eliminación de la viremia contribuyen con el desarrollo de las manifestaciones severas de la enfermedad. En conjunto, la presencia de una carga antigénica elevada y

un estímulo viral sostenido, así como la activación del monocito constante, favorece a su vez la activación de otros sistemas, como el de coagulación, mediante la expresión de TF.

Willis *et al.*, 2002, demostraron que en pacientes pediátricos, los niveles plasmáticos de TF están significativamente incrementados durante los dos primeros días en que los niños son admitidos al hospital para recibir la terapia de reposición de líquidos. La sobre-expresión de TF correlacionó con la severidad de la enfermedad. Por otro lado, Sosotikul *et al.*, en 2007, encontraron que pacientes pediátricos con DHF/DSS presentaron un incremento significativo de los niveles plasmáticos de TF durante la fase febril. Estos dos reportes confirman que la sobre-expresión de TF tiene relación con la viremia durante la fase febril, pero también durante la defervescencia (cuando baja la fiebre y se está eliminando al virus). En este sentido, no se puede determinar con precisión cuál (es) es (son) el (los) agonista(s) que sostienen la expresión de TF, si es el virus o la respuesta efectora de células activadas inicialmente durante la infección por DENV. Por otra parte, en los reportes tanto de Sosotikul como de Wills, se desconoce cuál es la fuente celular del TF detectado en el plasma, por lo que el presente trabajo es relevante, ya que demuestra que los monocitos pueden ser una fuente importante del receptor trombogénico TF durante la infección por DENV.

El mecanismo propuesto para la producción de TF en monocitos estimulados con DENV es similar a lo que ocurre durante la sepsis bacteriana y/o durante la coagulación intravascular diseminada. La septicemia es la entidad más comúnmente asociada con CID. Existen diferentes factores involucrados en el desarrollo de CID en pacientes con infección bacteriana, como la presencia de polisacáridos o endotoxinas (e.g. toxina  $\alpha$ -estafilococal). Estos componentes participan en una respuesta inflamatoria generalizada que se caracteriza por la liberación sistémica de citocinas como IL.6, IL.8, IL-1 y TNF $\alpha$ . Estas citocinas se producen principalmente por células mononucleares en respuesta a un estímulo determinado. Se ha reportado que el desbalance de la coagulación durante la DIC ocurre por el efecto diferencial de varias citocinas (Levi *et al.*, 1997). El diálogo cruzado entre los procesos de coagulación e inflamación-infección durante el choque séptico está bien documentado (Schouten *et al.*, 2008). En el caso del Dengue Severo (DSS), las citocinas pro-inflamatorias y los marcadores de activación de coagulación-fibrinólisis se han correlacionado con marcadores involucrados en la sepsis bacteriana humana. (Suharti, C *et al.*, 2002). El TF se expresa en células mononucleares que se han activado por citocinas pro-inflamatorias que favorecen la activación de la vía extrínseca de la coagulación (Conkling *et al.*, 1988).

Durante la CID, la vía extrínseca de la coagulación dependiente de TF es la ruta dominante para la generación de trombina que conlleva a la deposición de fibrina y la trombosis relacionada con una falla orgánica múltiple. La instalación de CID por TF es un proceso asociado con letalidad durante la

septicemia bacteriana experimental (Mammen 2000). En la mayoría de los casos de DIC, el TF expuesto en la circulación es la única causa que subyace al inicio de la DIC, siendo la expresión monocítica de TF la que promueve la formación de trombos. A éste respecto, existen diferentes reportes que apoyan el papel de las citocinas en la inmunopatogénesis del DENV debido principalmente a su efecto proinflamatorio a nivel de las células del endotelio vascular. El TNF $\alpha$  es la principal citocina implicada en la patogénesis del Dengue Severo; (Anderson *et al.*, 1997). Sin embargo, las acciones específicas de varias citocinas y quimiocinas y su relación con la severidad de la enfermedad aún se desconocen. En este trabajo, se propone que uno de los efectos del TNF $\alpha$ , además de lo ya propuesto (e.g. activación del endotelio vascular humano e incremento de la permeabilidad vascular), es favorecer la actividad procoagulante del monocito mediante la expresión de Factor Tisular, el cual puede contribuir importantemente en el desbalance del equilibrio hemostático, probablemente debido a una actividad pro-trombótica dominante, que explicaría la coagulopatía (CID), que se presenta en algunos pacientes con Dengue Severo.

Recientemente Azeredo *at al.*, 2010, demostraron que la expresión de TF en monocitos está incrementada significativamente en pacientes con Dengue Severo durante la fase aguda de la enfermedad, en comparación con pacientes con Dengue clásico e individuos sanos. Sin embargo, queda por resolver cuál es el efecto del virus en los monocitos o bien de las moléculas que están induciendo la expresión de TF. Asimismo, sería importante determinar si la expresión de TF en los monocitos puede tener alguna relación con la activación subsecuente de la inflamación como se demostró en el trabajo de Huerta-Zepeda *et al.*, 2008. Dado que el TF induce la generación de proteasas de la coagulación como la trombina que activa los receptores activados por proteasas ó PARs, éstos dan inicio a diferentes vías de señalización, tanto de moléculas inflamatorias (a través de la vía de las MAP cinasas como p38 y ERK 1/2) como de moléculas de adhesión (VCAM-1), aportando evidencia sólida sobre el diálogo cruzado entre la coagulación e inflamación en células endoteliales que ocurre durante la infección por DENV. La traducción biológica de la expresión de TF en monocitos por DENV, será un extenso campo de estudio que permitan explicar los mecanismos involucrados durante la coagulopatía presente en pacientes con Dengue Severo. En este sentido, el estudio de las micropartículas monocitarias TF positivas, que se generan durante la activación celular, puede ofrecer algunas respuestas sobre el papel biológico del TF expresado en monocitos.



**Formación de Micropartículas (MPs) de monocitos THP-1 estimulados con DENV.**

La activación celular por DENV tiene un papel central en la activación de otros sistemas como el de la inflamación mediante la producción de citocinas como TNF $\alpha$  y la coagulación (mediante la expresión de TF). La activación celular con DENV puede participar de forma importante en la formación de MPs de origen monocitario. Las MPs son fragmentos de la membrana plasmática que pueden ser liberadas prácticamente por todas las células eucariotes cuando son objeto de múltiples condiciones de estrés, incluyendo la activación celular y apoptosis (Beaudoin & Grondin 1991; Zwaal & Schroit, 1997; Freyssinet *et al.*, 1999). A pesar de que durante mucho tiempo las MPs se asociaron con detritus celulares, recientemente, se les ha considerado como un marcador de la activación celular, estimulación y/o apoptosis (Freyssinet *et al.*, 1999).

Las MPs son pequeñas en tamaño (1  $\mu$ m) exponen fosfolípidos (PL) aniónicos como fosfatidil serina (PS) en la cara externa de la membrana y exponen antígenos que reflejan su origen celular (Jy *et al.*, 2004). Entre los mecanismos estudiados de la asimetría de fosfolípidos de membrana, se encuentran los movimientos enzimáticos y unidireccionales de la aminofosfolípido traslocasa y /o la asociación entre los fosfolípidos cargados negativamente y elementos en el citoplasma, incluyendo componentes del citoesqueleto y sus proteínas acompañantes. La liberación de MPs es una parte integral del proceso de remodelado de la membrana celular en donde la distribución normal asimétrica de los fosfolípidos entre las dos caras de la membrana se pierde. Se propone que la entrada de calcio, la activación de la calpaína y la actividad de la escramblasa son pasos importantes tanto en la pérdida de la asimetría lipídica como en la formación de MPs aunque aún se desconoce la secuencia de estos eventos (Kunzelman-Marche *et al.*, 2001).

Las MPs circulantes en plasma, modulan la actividad de sus células blanco, facilitando tanto interacciones célula-célula como la inducción de señalización intracelular (Simak, J & Gelderman, M 2006). Las MPs pueden jugar un papel importante en la inflamación, trombosis, angiogénesis y disfunción vascular (Morel *et al.*, 2005). Del Conde y col. reportaron que la estimulación de monocitos con lipopolisacáridos (LPS) o citocinas pro-inflamatorias induce la sobre-expresión de Factor Tisular en la superficie celular así como la liberación de este receptor en forma de micropartículas o MPs (del Conde *et al.*, 2005). Dado que el virus Dengue es capaz de inducir la activación de monocitos y la expresión de TF de origen monocitario, existe la posibilidad que este receptor sea liberado en forma de MPs durante la infección por DENV. Por tanto, en el presente trabajo, se llevó a cabo la evaluación de la presencia de MPs en el sobrenadante (sn) de monocitos THP-1 estimulados con DENV. Observamos una población de partículas cuyo número aumentó ante la estimulación con el Virus Dengue. Este hallazgo fue de gran interés puesto que hasta ahora no existe un antecedente en la literatura referente a la

producción de MPs y Dengue. Inicialmente determinamos que no se tratara de alguna respuesta inespecífica y que la población de estas partículas correspondía en efecto, con MPs por lo que fue necesario: *primero*, hacer el ajuste de los parámetros de determinación (adquisición) en el citómetro de Flujo para lo que se utilizaron micro perlas de poliestireno de 1 micra de tamaño y determinar que el tamaño y la granularidad de los eventos (en este caso micropartículas) debía hacerse en escala logarítmica, a diferencia de la escala lineal que se utiliza para evaluar muestras celulares. Con estos ajustes se pudo definir una región de adquisición o ventana (Gate R1) en el *dot plot* que incluyera micropartículas de 1 micra de tamaño y a partir de este, partículas con un tamaño menor a 1. *Segundo*, se utilizó un ionóforo de calcio (Calcimicina A23187), el cual se sabe que en presencia de calcio activa las células por la movilización del calcio intracelular y con ello la formación y liberación de micropartículas de membrana en monocitos activados (Aharon *et al.*, 2008). En los resultados iniciales de Citometría de flujo, observamos (en los dot plots, ver figura 9.5) que se presentaba un incremento en el número de eventos, probablemente debido a la vesiculación de las células tratadas con calcimicina. En la Fig.7.9 se observa que aunque no se trataba de una adquisición con los parámetros correspondientes tanto a partículas de 1 micra y/o de menor tamaño, si se presentó una clara diferencia entre el control positivo y el negativo, lo cual fue útil para el establecimiento del control positivo, en el que se observó el efecto esperado con respecto a la formación de MPs. En el dot plot (Fig. 7.9) se observa que hay no solo partículas de 1 micra o de menor tamaño, sino que también existen partículas de más de 1 micra, por lo que la determinación de la región para MPs (Gate R1) fue útil para descartar por tamaño las vesículas diferentes a MPs. *Tercero*, fue necesario corroborar que las partículas resultantes de la activación/estimulación celular por el DENV fueran estrictamente derivadas de la membrana plasmática. Para esto, se llevó a cabo la detección de MPs mediante fluorescencia, marcando la membrana del monocito con Calceina AM. De esta manera, cualquier vesícula liberada de la membrana celular fue detectada por fluorescencia. Asimismo, se pudieron descartar otras microvesículas como los exosomas (vesículas liberadas por exocitosis de cuerpos multivesiculares cuya membrana deriva de organelos intracelulares).

Con estos criterios se pudieron detectar las MPs marcadas con fluorescencia y se evaluó mediante citometría de flujo la presencia de MPs en el sobrenadante de cultivos de monocitos estimulados con DENV. Encontramos que la activación celular observada desde las 6 hpe con el DENV (cambios morfológicos y maduración a macrófagos, producción de  $TNF\alpha$  y expresión de TF), induce también la formación de MPs, desde las 6 hpe y 12 hpe, mientras que a las 24 hpe la media de la intensidad de fluorescencia (MIF) decae (similar a las 12 hpe), sugiriendo que el proceso de liberación de MPs tiene su máximo efecto entre las 6 y 12 hpe. Estos datos son interesantes ya que coincidieron con la máxima expresión de TF en la superficie del monocito lo que nos permite suponer que las MPs que se están

liberando a las 12 hpe llevan consigo importantes niveles de este receptor procoagulante. En este contexto, la liberación de MPs representaría un gradiente de información celular dependiente del tiempo que determina en qué momento se expresan ciertos receptores, los cuales pueden ser liberados con las MPs. Es probable que a pesar de que las MPs liberadas desde que se inicia el proceso de activación celular expongan fosfolípidos aniónicos como la Fosfatidil serina (PS) que independiente de la presencia o no de TF, estas MPs proveerían una superficie aniónica para interactuar con factores de la coagulación durante la formación de un trombo (Key 2010). Esto se podría evaluar mediante la detección de PS de manera indirecta por la unión de Anexina V marcada con FITC que se une a este fosfolípido en MPs aisladas a diferentes tiempos de estimulación y determinar si desde el inicio de la activación celular, estas MPs exponen tanto PS como TF. A pesar de que mediante Citometría de Flujo y Microscopía confocal se observó que por la fluorescencia emitida que las MPs detectadas proceden directamente de la membrana plasmática se podría determinar la exposición de PS en las MPs lo que definiría que son el resultado de un cambio en la simetría de los fosfolípidos de membrana por efecto de la activación celular inducida por el DENV y no por la ruptura de la membrana celular a causa del manejo de las células durante la separación de MPs. Por otro parte, será importante determinar en las MPs algunos de los posibles antígenos funcionales de la célula que les dio origen, en este caso del monocito. Se ha demostrado que las MPs de origen monocitario expresan además de TF, PSGL-1 -P selectina glycoprotein ligand-1- (del Conde *et al.*, 2005). La unión de las MPs a la P-selectina en células endoteliales o plaquetas activadas en el trombo en formación promueve la acumulación de TF y la generación localizada de trombina. Así mismo, se ha detectado en MPs la presencia de CD14, CD18 y CD11a, lo que resalta su potencial actividad de adhesión con otras células (Satta *et al.*, 1994).

En los ensayos de microscopía confocal, hubo diferencias entre las MPs obtenidas bajo diferentes condiciones, por ejemplo: las MPs generadas por el estímulo sumatorio de Calcimicina y DENV se observaron agregados de MPs, que podrían haberse conglomerado por diferentes condiciones, ya sea por la técnica de separación y montaje para la microscopia o bien, por la presencia de alguna molécula que podrían favorecer la adhesión o unión de las MPS entre sí por lo que la determinación de moléculas de adhesión será importante para descartar o no tales suposiciones.

En el presente trabajo, se presentan datos novedosos referentes a la generación de MPs durante la infección con el Virus Dengue. No obstante, aún hay muchas preguntas por responder al respecto, iniciando por la caracterización biológica de estas partículas y su posible efecto en células tan importantes en el contexto del la patogenia del Dengue Severo como son las células del endotelio vascular. Posteriormente, determinar si las MPs podrían ser de utilidad como bio-marcadores (o indicadores de riesgo) durante la instalación del Dengue severo. A pesar de que hay niveles basales de MPs en la sangre los individuos sanos (Berckmans *et al.*, 2001), se ha reportado por varios grupos, que

los niveles de MPs en circulación se ven incrementados en diferentes entidades patológicas, como en el caso de la infección por el Virus Ébola, en donde se demostró la generación exacerbada de TF y que se encontraba en MPs que se generaron a partir de monocitos /macrófagos infectados con este virus. Asimismo, se ha reportado el potencial procoagulante de las MPs en pacientes con riesgo incrementado de eventos tromboembólicos como la DIC (Nieuwland *et al.*, 2000). Existen diferentes reportes de pacientes con sépsis meningococal fulminante, en los cuales se han encontrado niveles elevados de MPs TF y CD14 positivas, as cuales inducen una fuerte generación de trombina *in vitro* (Sabatier *et al.*, 2002). En pacientes con malaria cerebral (Combes *et al.*, 2004) también se han encontrado MPs que ejercen un potente efecto pro-inflamatorio a través de activación de macrófagos y la producción de TNF $\alpha$ . En general, la liberación de MPs durante el proceso infeccioso por el virus dengue, podría ser importante en la diseminación de la actividad pro-coagulante, sugiriendo que las MPs derivadas de los monocitos activados, pueden participar en la estimulación y/o daño al endotelio vascular, lo cual puede favorecer un incremento en la permeabilidad de la célula endotelial, durante el Síndrome de choque por Dengue. Considerando que uno de los criterios centrales que determina la diferencia entre el Dengue Clásico y el Dengue Severo es el daño al endotelio vascular. En el presente trabajo se propone que la expresión de TF en el monocito posterior a la activación celular con el DENV representa una respuesta efectora ante la presencia del virus que dependiendo de las características del estímulo (e.g. un estímulo persistente), puede tener repercusiones importantes en el balance hemostático del hospedero.

Por otra parte, este estudio nos permite plantear preguntas importantes referentes al debate fundamental que ha existido desde hace más de 40 años sobre la patogenia del Dengue severo. En principio, lo que se observó en este trabajo apoya la hipótesis de la *virulencia* del DENV, la cual subraya que en ausencia de anticuerpos de memoria y en su caso, de anticuerpos heterotípicos no neutralizantes, hay un efecto de activación celular que se da por la interacción del DENV con el monocito, que induce la respuesta efectora para contener la infección. En este sentido, es el virus DENV *per se* el que inicia el proceso de activación celular que dependiendo de su magnitud y en su caso del aislado viral, podría contenerse la infección, exacerbarse o bien activar otros sistemas. Por lo anterior, se podrían explicar los casos severos de Dengue en el curso de una infección primaria. Por otro lado, es probable que la respuesta primaria (inflamatoria) inducida por el DENV, active al sistema de la coagulación a través de la expresión de TF y la formación de micropartículas. Así, la respuesta del hospedero y particularmente, la respuesta inmune ante la infección viral dan lugar a procesos fisiopatogénicos por la activación de otros sistemas apoyando la *hipótesis inmunopatogénica* del Dengue Severo. En otras palabras, es claro que ambas hipótesis no son mutuamente excluyentes y que en conjunto, pueden explicar de manera integral lo que ocurre en el paciente con Dengue. La naturaleza de la interacción del hospedero con el virus lo que

determina que un paciente pueda autolimitar la infección, resolverla después de presentar Dengue Clásico o bien que evolucione a un cuadro clínicamente grave como es el Dengue Severo.

Finalmente, cabe mencionar, que a pesar de que el sistema inmune controla satisfactoriamente muchas de las infecciones virales; algunas veces este sistema de defensa, paradójicamente puede ocasionar daño directo al hospedero o bien, puede darse una reacción desfavorable que comúnmente ocurre después de la infección. Se advierte que el sistema de la respuesta inmune innata, evolutivamente seleccionado para resolver de manera efectiva y regulada la infección viral y mantener la salud del hospedero, puede contribuir a lo contrario, ocasionando daño tisular y enfermedad atribuido a una respuesta efectora inadecuadamente controlada o inadecuadamente dirigida a los tejidos y células del hospedero y en tales situaciones, la respuesta normal benéfica es la causa de la enfermedad. Así, el resultado se verá determinado por las propiedades del virus que infecta, las circunstancias de la infección, las características del hospedero y como se ha resaltado en este estudio, del diálogo que el sistema inmune innato puede tener con otros sistemas.

## 11. CONCLUSIONES.

En el presente trabajo, se alcanzaron los objetivos propuestos en este proyecto de Tesis de Maestría. Se demostró que el Virus Dengue induce la activación celular del monocito y que este fenómeno es importante tanto en el proceso pro-inflamatorio a través de la producción de  $\text{TNF}\alpha$ ; como en la respuesta pro-coagulante, a través de la expresión del receptor trombogénico, Factor Tisular. Así mismo, se observó por primera vez que la activación celular favorece la formación de micropartículas, cuya caracterización fenotípica y funcional (posteriormente) respondería preguntas esenciales en referencia a la actividad pro-coagulante del monocito una vez que se ha activado por el DENV, durante la instalación del Dengue Severo, en dónde los mecanismos involucrados con la presencia de la coagulopatía aún no se han elucidado. La expresión de TF en los monocitos y su liberación en micropartículas representa un mecanismo central que subyace a la coagulación intravascular diseminada, cuyo estudio debe ampliarse para desarrollar estrategias de tratamiento y prevención del Dengue Severo.

## 12. PERSPECTIVAS.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis dan lugar a preguntas que precisan ser contestadas con el objetivo de determinar el efecto biológico de actividad procoagulante del monocito a través de la expresión de TF y la formación de MPs, por lo que se propone trabajar en los siguientes aspectos:

1. Evaluar y comparar la expresión de TF en monocitos aislados de sangre periférica de individuos sanos con diferentes aislados virales.
2. Bloquear la actividad del  $\text{TNF}\alpha$  de los sobrenadantes de los cultivos de los monocitos estimulados con DENV
3. Determinar la exposición de Fosfatidilserina en las MPs obtenidas a partir de los monocitos infectados con DENV así como la detección de TF y de moléculas de adhesión, principalmente PSGL-1.
4. Determinar la actividad procoagulante *in vitro* de la MPs así como su efecto en células endoteliales (e.g. actividad proinflamatoria).
5. Detección de niveles altos de MPs en circulación en pacientes con Dengue Clásico y Dengue Severo como posible marcador de riesgo o de severidad de la enfermedad.

**13. Literatura citada.**

Abbas A., Lichtman, A., & Pillai, S. 2007. *Cellular and molecular immunology*. 6° edición. Saunders Elsevier. 566 páginas.

Aharon, A., Tamari, T. & Brenner, B. 2008. *Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells*. Thrombosis and Haemostasia. 100: 878–885.

Anderson R, Wang S, Osioy C & Issekutz A. 1997. *Activation of Endothelial Cells via Antibody-Enhanced Dengue Virus Infection of Peripheral Blood Monocytes*. Journal of Virology. 71 (6). 4226–4232

Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking T & Ignatyev G. 2003. *Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection*. Indian J Med Res. 35(1):33-42.

Balmaseda, A., Hammond, L., Perez, Y., Tellez, S., Saborio, J., Mercado, R., Cuadra, J., Rocha, M., Perez, S., Rocha, C. & Harris, E. 2006. *Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue*. American Journal of Tropical Medicine Hygiene. 74:449–456.

Basu, A. & Chaturvedi, U. 2008. *Vascular endothelium: the battlefield of Dengue viruses*. FEMS Immunology Medic and Microbiology. 53: 287-299.

Beaudoin A & Grondin G. 1999. *Shedding of vesicular material from the cell surface of eukaryotic cells: different cellular phenomena*. Thromb Haemost. 82(2):727-35.

Berckmans R, Nieuwland R, Böing A, Romijn F, Hack C & Sturk A. 2001. *Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation*. Thromb Haemost. 85(4):639-46.

Bergh N, Ulfhammer E, Glise K, Jern S & Karlsson L. 2009. *Influence of TNF-alpha and biomechanical stress on endothelial anti- and prothrombotic genes*. Biochem Biophys Res Commun. 385(3): 314-8.

Bhamarapravati, N. 1989. *Hemostatic defects in Dengue Hemorrhagic Fever*. Infectious Diseases. 11: S826-S829.

- Bogdanov, V., Balasubramanian, V., Hathcock, J. Vele, O., Lieb, M. & Nemerson, Y. 2003. *Alternatively Spliced Human Tissue Factor: A Circulating, Soluble, Thrombogenic Protein.* Nature Medicine. 9 (4): 458-462.
- Chakravarti, A & Kumaria, R. 2006. *Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak.* FEMS Immunol Med Microbio. 123(1):25-30.
- Chakravarti, A., & Kumaria, R. 2006. *Circulating levels of tumour necrosis factor-a and interferon-g in patients with dengue and dengue haemorrhagic fever during an outbreak.* Indian J. Med. Res. 123:25–30.
- Chen Y, Wang S & King C.1999. *Bacterial Lipopolysaccharide Inhibits Dengue Virus Infection of Primary Human Monocytes/Macrophages by Blockade of Virus Entry via a CD14-Dependent Mechanism.* Journal of Virology. 73.42650–2657.
- Chen, S; Lin, Y., Huang, M., Wu, M., Cheng, S., Lei, H., Lee, C., Chiou, T., Wong, C & Hsieh, S. 2008. *CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease.* Nature. 453 (29): 672-678.
- Chiewsilp, P., Scott, RM. & Bhamarapavati, N. 1981. *Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever.* American Journal of Tropical Medicine Hygiene. 30: 1100-1105.
- Chu, A. 2005. *Tissue factor mediates inflammation.* Archives of Biochemistry and Biophysics. 440 : 123–132.
- Clyde, K., Kyle, J. & Harris, E. 2006. *Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants Of Dengue Virus Replication and Pathogenesis.* Journal of Virology. 80: 11418–11431.
- Cocucci, E., Racchetti, G & Meldolesi, J. 2008. *Shedding microvesicles: artefacts no more.* Trends in Cell Biology. 19(2): 43-51.
- Coffey, L., Mertens, E., Brehin, A., Fernández-García, M., Amara, A., Després, P. & Sakuntabhai, A. 2009. *Human genetics determinants of dengue virus susceptibility.* Microbes and Infection. 11: 143-156.



Cologna, R., Armstrong, PM. & Rico-Hesse, R. 2005. *Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes.* Journal of Virology. 78: 853-859.

Combes V, Taylor T, Juhan-Vague I, Mège J, Mwenechanya J, Tembo M, Grau G & Molyneux M. 2004. *Circulating endothelial microparticles in malawian children with severe falciparum malaria complicated with coma.* JAMA. 291(21):2542-4.

Conkling P, Greenberg C & Weinberg J. 1988. *Tumor necrosis factor induces tissue factor-like activity in human leukemia cell line U937 and peripheral blood monocytes.* Blood. 72(1):128-33.

de Azeredo E, Kubelka C, Albuquerque L, Barbosa L, Damasco P, Avila C, Motta-Castro A, da Cunha R & Monteiro R. 2010. *Tissue factor expression on monocytes from patients with severe dengue fever.* Blood Cells Mol Dis. 45(4):334-5.

Del Conde I, Shrimpton C, Thiagarajan P & López J. 2005. *Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation.* Blood. 106(5):1604-11.

del Conde, I., Shrimpton, C., Thiagarajan, P. & López, J. 2005. *Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation.* Blood. 106 (5):1604-1611.

Espina L, Valero N, Hernández J & Mosquera J. 2003. *Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor-alpha caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus.* Am J Trop Med Hyg. 68(1):48-53.

Freyssinet J, Toti F, Hugel B, Gidon-Jeangirard C, Kunzelmann C, Martínez M & Meyer D. 1991. *Apoptosis in vascular disease.* Biochim Biophys Acta. 1071(3):203-19.

Funahara, Y., Shirahata, A. & Sumarmo. 1985. *Coagulopathy in DHF/DSS and elimination of the risk factor.* ICMR Annual. 5: 9-15.

Geisbert, T., Hensley, L, Jarrling P, Larsen T, Geisbert J, Paragas J, Young H, Fredeking T, Rote W & Vlasuk G. 2003. *Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: a study in rhesus monkeys.* Lancet. 362: 1953-1958.

- Geisbert, T., Young, H., Jahrling, P., Davis, K., Kagan, E. & Hensley, L. 2003. *Mechanisms Underlying Coagulation Abnormalities in Ebola Hemorrhagic Fever: Overexpression of Tissue Factor in Primate Monocytes/Macrophages Is a Key Event*. The Journal of Infectious Diseases. 188:1618–1629.
- Gregory S., Morrissey J. & Edgington, T. 1989. *Regulation of tissue factor gene expression in the monocyte procoagulant response to endotoxin*. Molecular Cell Biology. 9:2752-2755.
- Guía para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control del Dengue*. Organización Mundial de la Salud. 2009.
- Gubler, D. J. 1998. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Clinical Microbiology Reviews. 11:480–496.
- Guilarde A, Turchi M, Siqueira J, Feres V, Rocha B, Levi J, Souza V, Vilas Boas L, Pannuti C & Martelli C. 2008. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever among Adults: Clinical Outcomes Related to Viremia, Serotypes, and Antibody Response*. The Journal of Infectious Diseases. 197:817–24.
- Halstead S. 1988. *Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology*. Science. 239(4839):476-81.
- Halstead S.1989. *Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade*. Rev Infect Dis. Suplemento 4:S830-9.
- Halstead, S. 2007. *Dengue*. Lancet .370: 1644–52.
- Halstead, S., Streit, T., Lafontant, J., Putvatana, R., Russell, K., Sun, W., Kanasa-Thasan, N., Hayes, C. & Watts, D. 2001. *Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 65:180–183.
- Hober D, Shen L, Benyoucef S, De Groot D, Deubel V & Wattré P. 1996. *Enhanced TNF alpha production by monocytic-like cells exposed to dengue virus antigens*. Immunol Lett. 53(2): 115-20.
- Huang, Y., Liu, C., Wang, S., Lei, H., Liu, H., Lin, Y., Wu, H. & Yeh, T. 2001. *Activation of Coagulation and Fibrinolysis During Dengue Virus Infection*. Journal of Medical Virology. 63:247-251.

- Huerta-Zepeda, A., Cabello-Gutiérrez, C., Cime-Castillo, J., Monroy-Martínez, V., Manjarrez-Zavala, M., Gutiérrez-Rodríguez, M., Izaguirre, R. & Ruiz-Ordaz, B. 2008. *Crosstalk between coagulation and inflammation during Dengue virus infection*. Thrombosis and Haemostasia. 99: 936–943.
- Jiang, Z., Tang, X., Xiao, R., Jiang, L. & Chen, X. 2007. *Dengue virus regulates the expression of hemostasis-related molecules in human vein endothelial cells*. Journal of Infection. 55: e23 -e28.
- Jy W, Horstman L, Jimenez J, Ahn Y, Biró E, Nieuwland R, Sturk A, Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J, Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM, Nomura S, Shet AS, Key N & Hebbel R. 2004. *Measuring circulating cell-derived microparticles*. J Thromb Haemost. 2(10):1842-51.
- Key, N. 2010. *Analysis of tissue factor positive microparticles*. Thrombosis Research. 125: S42–S45.
- Krishnamurti, C., Kalayanarooj, S., Cutting, M., Peat, R., Rothwell, S., Reid, T., Green, S., Nisalak, A., Pandy, P., Vaughn, D., Nimmannitya, S. & Innis, B. 2001. *Mechanisms Of Hemorrhage In Dengue Without Circulatory Collapse*. American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene. 65(6): 840-847.
- Kunzelmann-Marche C, Freyssinet J & Martínez M. 2001. *Regulation of phosphatidylserine transbilayer redistribution by store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: role of actin cytoskeleton*. J Biol Chem. 276(7):5134-9.
- Kurane, I. 2007. *Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis*. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases 30: 329–340.
- Levi, M., de Jonge, E., der Poll, T. & ten Cate, H. 1999. *Disseminated Intravascular Coagulation*. Thrombosis and Haemostasia. 82(2): 695-705.
- Lin, C., Wan, S., Cheng, H., Lei, H. & Lin, Y. 2006. *Autoimmune Pathogenesis In Dengue Virus Infection*. Viral Immunology. 19(2): 127–132.
- Mackman, N. 2004. *Role of Tissue Factor in Hemostasis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 24:1015-1022.
- Mackman, N. 2009. *The many faces of tissue factor*. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 7 (1): 136–139.

- Mackman, N., Tilley, R. & Key, N. 2007. *Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 27:1687-1693.
- Mairuhu A, Mac Gillavry M, Setiati T, Soemantri A, ten Cate H, Brandjes D & van Gorp E. 2003. *Is clinical outcome of dengue-virus infections influenced by coagulation and fibrinolysis? A critical review of the evidence*. Lancet Infect Dis. 3(1):33-41.
- Mammen E. 2000. *Disseminated intravascular coagulation (DIC)*. Clin Lab Sci. 13(4):239-45.
- Martin, D., William, C., Boys, G. & Ruf, W. 1995. *Tissue Factor: molecular recognition and cofactor function*. The FASEB Journal. 9, 852-859.
- Mathew, A. & Rothman, A. 2008. *Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis*. Immunological Reviews. 225: 300-313.
- Matthew F & Douglas G. 1998. LPS-binding proteins and receptors. J. Leukoc. Biol. 64:25–32.
- Mercado, R. Cuadra, J. Rocha, M. A. Perez, S. Silva, C. Rocha & Harris, E. 2006. *Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue*. American Journal of Tropical Medicine Hygiene.74:449–456.
- Morel O, Morel N, Hugel B, Jesel L, Vinzio S, Goichot B, Bakouboula B, Grunebaum L, Freyssinet J & Toti F. 2005. *The significance of circulating microparticles in physiology, inflammatory and thrombotic diseases*. Rev Med Interne. 26(10): 791-801.
- Nieuwland R, Berckmans R, McGregor S, Böing A, Romijn A, Westendorp R, Hack E & Sturk, A. 2000. *Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis*. 95: 930-935.
- Nieves-Souza, P., Azeredo, E., Zagne, S., Valles-de-Souza, R., Reis, S., Cerqueira, D., Nogueira, R. & Kubelka, C. 2005. *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute dengue fever in patients and during in vitro infection*. BMC Infectious Diseases. 5:64.

- Noisakran, S. & Chuen, G. 2007. *Alternate hypothesis on the pathogenesis of Dengue hemorrhagic fever (DHF)/Dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection* Experimental Biology and Medicine. 401-108.
- Padwad Y, Mishra K, Jain M, Chanda S & Ganju L. 2010. *Dengue virus infection activates cellular chaperone Hsp70 in THP-1 cells: downregulation of Hsp70 by siRNA revealed decreased viral replication*. Viral Immunol. 23(6):557-65.
- Rico-Hesse, R., Harrison, L., Salas, R., Tovar, D., Nisalak, A., Ramos, C., Boshell, J., de Mesa, M., Nogueira, R. & da Rosa, A. 1997. *Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas*. Virology 230:244–251.
- Riewald M & Ruf W. 2003. *Science review: role of coagulation protease cascades in sepsis*. Crit Care. 7:123-129.
- Rizvi, N., Chaturvedi, C., Nagar, R. & Mathur, A. 1987. *Macrophage functions during dengue virus infections: antigenic stimulation of B cells*. Immunology. 62:493-198.
- Rosen, L. 1986. *Pathogenesis of The dengue Haemorrhagic fever*. Arbovirus Program, Pacific Biomedical Research Center, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii. 40-42.
- Rothman, A. & Ennis, F. 1999. *Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever*. Virology. 257:1-6.
- Rothman, A. 2004. *Dengue: defining protective versus pathologic immunity*. The Journal of Clinical Investigation. 113(7):946-951.
- Ruf, W. 2004. *Emerging roles of tissue factor in viral Hemorrhagic fever*. Trends in Immunology. 25(9).461-464.
- Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J & Dignat-George F. 2002. *Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity*. Blood. 99(11):3962-70.

- Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwège V, Hedman H & Freyssinet JM. 1994. *Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide.* J Immunol. 153(7):3245-55.
- Shouten, M, Joost, W, Levi, M & van der Poll, T. 2008. *Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis.* Journal of Leukocyte Biology. 83: 563-543.
- Simak J & Gelderman MP. 2006. *Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers.* Transfus Med Rev. 20(1):1-26.
- Simmons, C Chau N, Thuy T, Tuan N, Hoang D, Thien N, Lien le B, Quy N, Hieu N, Hien T, McElnea C, Young P, Whitehead S, Hung N, Farrar J. 2007. *Maternal antibody and viral factors in the pathogenesis of dengue virus in infants.* Journal of Infectious Diseases. 196:416-424.
- Sosothikul, D., Seksarn, P., Pongsewalak, S., Thisyakorn, U. & Lusher, J. 2007. *Activation of endothelial cells, ciagulation and fibrinolysis in children with Dengue Virus infection.* Trombosis and Haemostasis. 97: 627-634.
- Srichaikul, T., Nimmanitaya, S., Artchararit, N., Siriasawakul, T. & Sungpeuk, P. 1977. *Fibrinogen metabolism and Disseminated Intravascular Coagulation in Dengue Hemorrhagic Fever.* American Journal of Tropical Medicine Hygiene. 26:525-532.
- Strichaikul, T., Punguyagupta, S., Nitivanant, P. & Alkarawong, K. 1975. *Disseminated intravascular coagulation in adult dengue haemorrhagic fever: report of three cases.* Journal of Tropical Medicine Public Health. 6: 106-114.
- Srichaikul, T & Nimmannitya S. 2000. *Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever.* Baillière's Clinical Haematology. 13(2): 261-276.
- Suharti C, van Gorp E, Setati, T, Dolmans, W, Djokomoeljanto, R., Hack, C, ten C & van der Meer, J. 2002. *The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock síndrome.* Thrombosis and Haemostasis. 87(1): 42-45.

Teo, D., Ng, L. & Lam, S. 2009. *Is Dengue a threat to the blood supply?*. Transfusion Medicine. 19: 66-77.

Thomas L, Verlaeten O, Cabié A, Kaidomar S, Moravie V, Martial J, Najjoullah F, Plumelle Y, Fonteau C, Dussart P & Césaire R. 2008. *Influence of the Dengue Serotype, Previous Dengue Infection, and Plasma Viral Load on Clinical Presentation and Outcome During a Dengue-2 and Dengue-4 Co-Epidemic*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 78(6): 990–998.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T & Tada K. 1980. *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. Int J Cancer. 26(2): 171-6.

Ubol S, Chareonsirisuthigul T, Kasisith J & Klungthong C. 2008. *Clinical isolates of dengue virus with distinctive susceptibility to nitric oxide radical induce differential gene responses in THP-1 cells*. Virology. 376(2):290-6.

van Gorp, E., Setiatti, T., Mairuhu, A., Suharti, C., ten Cate, H., Dolmans, W., van der Meer, J., Hack, E. & Brandjes, D. 2002. *Impaired Fibrinolysis in the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever*. Journal of Medical Virology. 67: 549-554.

Vaughn, D., Green, S., Kalayanarooj, S., Innis, B., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Endy, T., Raengsakulrach, B., Rothman, A., Ennis, F. & Nisalak, A. 2000. *Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity*. Journal of Infectious Diseases. 181:2–9.

Wang W, Chao D, Kao C, Wu H, Liu Y, Li C, Lin S, Ho S, Huang J & King C. 2003. *High Levels of Plasma Dengue Viral Load during Defervescence in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever*. Implications for Pathogenesis .Virology.305, 330–338.

Welty-Wolf, K, Carraway, M., Ortel, T., Ghio, A., Idell, S., Egan, J., Zhu, X., Jiao, J., Wong & Piantadosi, C. 2006. *Blockade of tissue factor-factor X binding attenuates sepsis-induced respiratory and renal failure*. American Journal of Physiology and Cell Molecular Physiology. 290: L21-L31.

Whitehead, S, Blaney J., Durbin A & Murphy B. 2007. *Prospects for a dengue virus vaccine*. Nature Reviews Microbiology .5, 518–528.

Wills, B., Oragui, E., Stephens, A., Daramola, O., Dung, N., Loan, H., Chau, N., Chambers, M. Stepniewska, K., Farrar, J. & Levin, M. 2002. *Coagulation Abnormalities in Dengue Hemorrhagic Fever*:

*Serial Investigations in 167 Vietnamese Children with Dengue Shock Syndrome.* Clinical Infectious Diseases. 35:277–85.

Wolberg, A. & Roubey, R. 2004. *Mechanisms of autoantibody-induced monocyte tissue factor expression.* Thrombosis Research. 114: 391—396.

Wolf, P. 1967. *The nature and significance of platelet products in human plasma.* Br J Haematol. 13(3):269-88.

Zhao J, Aguilar G, Palencia S, Newton E, & Abo A. 2009. *rNAPc2 inhibits colorectal cancer in mice through tissue factor.* Clin Cancer Res. 15(1):208-16.

Zwaal R & Schroit A. 1997. *Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells.* Blood. 89(4):1121-32.