



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**DENGUE SEVERO: PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA PLASMINÓGENO-
PLASMINA EN EL DAÑO AL ENDOTELIO VASCULAR**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
QFB. HÉCTOR FRAYDE GÓMEZ**

TUTOR PRINCIPAL

**DRA. BLANCA HAYDÉ RUIZ ORDAZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM**

**DR. EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO. ABRIL, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme realizar mis estudios de Posgrado dentro del Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la beca de excelencia para llevar a cabo la presente Tesis de Maestría.

A la Dra. Blanca Haydé Ruíz Ordaz, Por confiar en mí y permitirme trabajar en una de sus líneas de investigación. Por su asesoría académica y apoyo a lo largo de la realización de este proyecto, así como sus atenciones, palabras de aliento y observaciones para llevar a buen término mi trabajo de tesis de posgrado.

A la Dra. Verónica Monroy Martínez, por el apoyo técnico y la paciencia de enseñar el manejo de los diferentes equipos y técnicas empleadas en la realización de este proyecto, células en cultivo, desarrollo de los ensayos enzimáticos e inmunohistoquímica. Por todo su apoyo, amable oído y palabras.

A los compañeros del laboratorio que hicieron la estancia y las largas horas de trabajo más amenas, Elizabeth Quiroz, Andrea Catalina y particularmente a Pedro Pablo, por todas esas pláticas, apuestas, mal entendidos, enseñanzas y palabras de motivación.

A mi familia, por todo el apoyo que me mostraron a lo largo de mis estudios de maestría, por apoyarme en las decisiones que tomo y estar siempre conmigo.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez responsable de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por el apoyo brindado en la captura de imágenes de histoquímica y edición de las mismas.

A la Lic. Martha Cariño del servicio de Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por su disposición y apoyo en la búsqueda de información y referencias bibliográficas.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) y CONACYT por los recursos otorgados para la realización de este proyecto.

ABREVIATURAS

DCSA	Dengue con signos de Alarma
DENV	Virus Dengue
DENV - 2 - NGC	Virus Dengue 2 cepa Nueva Guinea C
DENV-Plm	Plasminógeno activado por DENV
DF	Fiebre del Dengue
DHF	Fiebre Hemorrágica por Dengue
DNG	Dengue No Grave
DS	Dengue Severo
DSS	Síndrome de choque por Dengue
DSSA	Dengue sin signos de Alarma
EC	Ectodominio - Extra Celular domain
EFG	Factor de crecimiento epidermal
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HMEC-1	Células de microvasculatura endotelial Humana
IAV	Virus de la Influenza A
IL-8	Interleucina - 8
LBS	Sitios de unión a lisina
LLC-MK2	Línea celular de epitelio renal de mono <i>Macaca mulatta</i>
NS	No estructural
PAI-1	Inhibidor tipo 1 del activador de plasminógeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
Plg	Plasminógeno
PlgR	Receptor del plasminógeno
Plm	Plasmina producida en presencia del DENV
TF	Factor tisular
SK	Estreptoquinasa
SK-Plm	Plasminógeno activado con estreptoquinasa
tPA	Activador de plasminógeno tisular
uPA	Activador de plasminógeno tisular tipo uroquinasa
VE- Cad	Cadherina vascular endotelial

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Epidemiología y transmisión del virus Dengue	1
1.2 Genoma y características bioquímicas del virus Dengue	2
1.3 Ciclo de replicación viral	4
1.4 Manifestaciones clínicas y clasificación de casos	5
1.4.1 Fases de la enfermedad	7
1.4.1.1 Fase febril	7
1.4.1.2 Fase crítica	7
1.4.1.3 Fase de convalecencia	8
1.5 Diagnóstico y manejo de casos	8
II. ANTECEDENTES	
2.1 El endotelio vascular	10
2.2 El sistema plasminógeno - plasmina	13
2.2.1 Plasminógeno	14
2.2.2 Activadores e inhibidores del plasminógeno	14
3. Interacción del sistema plasminógeno - plasmina con patógenos	17
4. El endotelio vascular durante la infección por DENV e interacción con plasmina	19
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
IV. HIPOTESIS	23
V. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo General	23
5.2 Objetivos específicos	23
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	24
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	
7.1 Cultivo, cosecha, purificación y titulación de DENV en la línea celular LLC-MK2	25
7.2 Cultivo de células de microvasculatura endotelial humano (HMEC-1)	26
7.3 Activación del plasminógeno por interacción con DENV	27
7.4 Evaluación in vitro de la degradación de VE-Cadherina por plasmina	28
7.5 Microscopia de inmunofluorescencia en células HMEC-1	28
7.6 Sistema transwell para evaluar el efecto sobre permeabilidad por plasmina sobre células HMEC-1	29
VIII. RESULTADOS	
8.1 Amplificación, purificación y titulación viral	31
8.2 Activación del plasminógeno por interacción con DENV	31
8.3 Evaluación de la degradación de VE-Cadherina por plasmina	32
8.4 Inmunohistoquímica para la evaluación del efecto de la plasmina en VE-Cadherina en células HMEC-1	33
8.5 Determinar efecto de la plasmina sobre cultivo celular en sistema de dos cámaras o transwell	36

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
X. CONCLUSIÓN	42
XI. PERSPECTIVAS	43
XII. BIBLIOGRAFÍA	44

RESUMEN

El Dengue, se considera la infección transmitida por artrópodos más importante a nivel mundial, con un estimado de 390 millones de casos anuales. Clínicamente presenta un espectro clínico muy amplio, que va desde un síndrome febril inespecífico que es autolimitante (90-95% de los casos), hasta las formas severas de la enfermedad que se caracterizan por fiebre elevada, trombocitopenia, aumento en la permeabilidad vascular, hemorragia y/o daño al endotelio vascular conocido como vasculopatía por Dengue, que puede dar lugar al Síndrome de choque por Dengue (DSS), cuya mortalidad es muy elevada. En nuestro grupo previamente reportamos que el virus Dengue (DENV) es capaz de interactuar con el plasminógeno humano, favoreciendo su activación a plasmina, enzima responsable de la degradación de los coágulos de fibrina y la liberación de fibrinopéptidos, los cuales pueden participar en el proceso inflamatorio a nivel del endotelio vascular. Así mismo, se ha reportado que proteasas de serina, pueden hidrolizar a proteínas presentes en las uniones adherentes, que participan en la barrera endotelial, como la VE-Cadherina, favoreciendo un incremento en la permeabilidad vascular. Con base en lo anterior, nos propusimos evaluar la participación del sistema plasminógeno-plasmina en la vasculopatía por Dengue (permeabilidad vascular) presente en los casos de Dengue Severo como el DSS. La activación del plasminógeno por interacción con el DENV se evaluó *in vitro* mediante ensayo cromogénico. El efecto que tiene la plasmina, generada por interacción con DENV, para hidrolizar la proteína de unión VE-Cadherina se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Este mismo efecto se observó mediante inmunohistoquímica, para lo cual, cultivos de células endoteliales se crecieron a confluencia, se incubaron con plasmina a diferentes tiempos y se evaluaron las uniones adherentes con ayuda de un anticuerpo específico para VE-Cadherina. Paralelamente, se llevaron a cabo ensayos de permeabilidad endotelial, en sistema transwell, que permitió determinar el efecto de la plasmina en la barrera endotelial. Los datos obtenidos, muestran que la plasmina, mediante hidrólisis, puede degradar la VE-Cadherina endotelial, principal proteína de uniones adherentes, y que esta degradación favorece un incremento en la permeabilidad endotelial a las 24 horas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten proponer que durante la infección por DENV, la activación del plasminógeno por la interacción con el virus favorece la pérdida de barrera endotelial, con un incremento en la permeabilidad del endotelio vascular, lo que podría explicar la instalación del Síndrome de choque por Dengue, descrito en los casos severos de la enfermedad.

DENGUE SEVERO: PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA PLASMINÓGENO-PLASMINA EN EL DAÑO AL ENDOTELIO VASCULAR

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología y transmisión del virus Dengue

El Dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos de más rápida propagación y transmisión a nivel mundial, la cual puede ser causada por cualquiera de los cuatro serotipos del virus dengue (DENV 1-4), y puede ser transmitido por mosquitos hembra del género *Aedes*, *A. aegypti* y *A. albopictus*. En regiones tropicales y subtropicales, el dengue es un problema de salud pública muy importante, con un impacto socio económico muy elevado (Guzmán & Harris, 2015). De acuerdo a la Organización mundial de la salud (OMS) anualmente ocurren 390 millones de casos a nivel mundial, de los cuales 96 millones llegan a presentar manifestaciones clínicas. Se estima que 50% de la población mundial vive en zonas donde el dengue es endémico; esto comprende 128 países ubicados en regiones del sureste asiático, el Continente Americano, la región del pacífico occidental, África y regiones del mediterráneo que se localizan en zonas tropicales y subtropicales (Figura 1) (OMS, 2009). Actualmente existe un incremento progresivo de brotes en la India y en la región Este del mediterráneo, así como reportes de casos de dengue severo en Pakistán, Arabia Saudita, Sudan, Yemen y Madagascar; así como actividad reemergente documentada en Hawái, las islas Galápagos, la isla de Pascua, Hong Kong y Buenos Aires, y reportes de aparición de diferentes serotipos circulantes en Florida, el sureste de Francia y en la Isla de Madeira en Portugal (Guzmán & Harris, 2015). Este incremento se debe a la creciente expansión geográfica a nuevos países, el cambio climático, la migración de poblaciones y esto asociado también a la adaptación de mosquitos del género *Aedes* al proceso de urbanización aumentando el riesgo de transmisión (Singh & Ruzek, 2014).

La transmisión efectiva del DENV es multifactorial, incluyendo factores tanto del huésped, el mosquito vector, el serotipo viral, factores epidemiológicos y medioambientales (OMS, 2009). El ciclo de transmisión del DENV inicia cuando la

hembra de mosquitos del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus* se alimentan de una persona infectada que se encuentra en la fase de viremia, y se hace portador del virus, el cual se replica dentro del mosquito en un periodo que se conoce como incubación extrínseca, que dura entre 7 y 10 días. Cuando el mosquito vuelve a alimentarse, es capaz de transmitir el virus a un nuevo hospedero por el resto de su vida. En el huésped vertebrado, el DENV se replica en un periodo que oscila entre los 5 y 15 días posterior a la picadura, al cual se le conoce como periodo de incubación intrínseca (CDC, 2015)

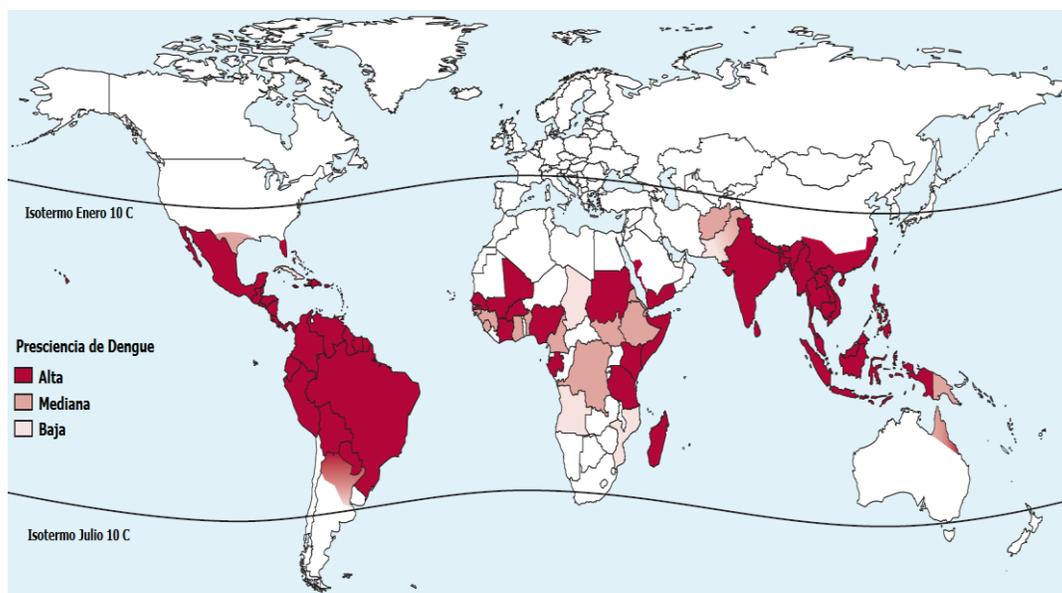


Figura 1. Distribución geográfica de los países en riesgo que han reportado la presencia de la enfermedad de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud. Modificado de Guzmán MG & Harris E. 2015. Dengue. *The Lancet*. 385(9966):453-465

1.2 Genoma y características bioquímicas del virus Dengue

El DENV, pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus* del cual se han descrito cuatro serotipos genéticamente relacionados, pero antigénicamente diferentes que se denominan como DENV-1 al DENV-4 (Vervaeke et al, 2015). El genoma del virus consta de un ARN de cadena sencilla de polaridad positiva que contiene aproximadamente 11, 000 pb con un marco abierto de lectura único, que

codifica para una poliproteína que es modificada postraduccionalmente dando lugar a tres proteínas estructurales, proteína C , proteína de cápside, la proteína prM, proteína precursora de membrana y la proteína E de envoltura, así como siete proteínas no estructurales (NS, por las siglas en ingles Non Structural) NS1/2A/2B/3/4A/4B/5, dentro de las cuales se encuentran las enzimas necesarias para la replicación viral y cuyas funciones se describen a continuación (Figura 2A). La proteína NS1 tiene la capacidad de fijar el complemento, la proteína NS3 es una proteína que presenta diferentes actividades: De proteasa en el extremo amino terminal, con función similar a la quimiotripsina, perteneciente al grupo de las proteasas de serina, y también presenta función de ARN helicasa y NTPasa esto en el extremo carboxilo terminal, utilizando como cofactores a las proteínas NS2A y NS2B. La proteína NS5 es también bifuncional con un dominio metiltransferasa en el extremo amino terminal, mientras que en el extremo carboxilo tiene un dominio de RNA polimerasa dependiente de ARN y utiliza a las proteínas NS4A y NS4B como cofactores (Perera & Kuhn, 2008). El genoma del DENV presenta dos regiones UTR, el extremo 5´ se encuentra protegido por el cap $m^7G5'ppp5'A$, mientras que el extremo 3´ carece de la secuencia poli-A, pero se encuentra protegido por la estructura secundaria que forma la región UTR. El genoma está rodeado por una nucleocápside de simetría icosaédrica, la cual está constituida por la proteína C y una envoltura lipídica de 10 nm de grosor, dentro de la cual se encuentran embebidas las proteínas M y E. El virión completo mide alrededor de 50 - 60 nm de diámetro y tiene forma esférica (Figura 2B) (Whitehead *et al.*, 2007).

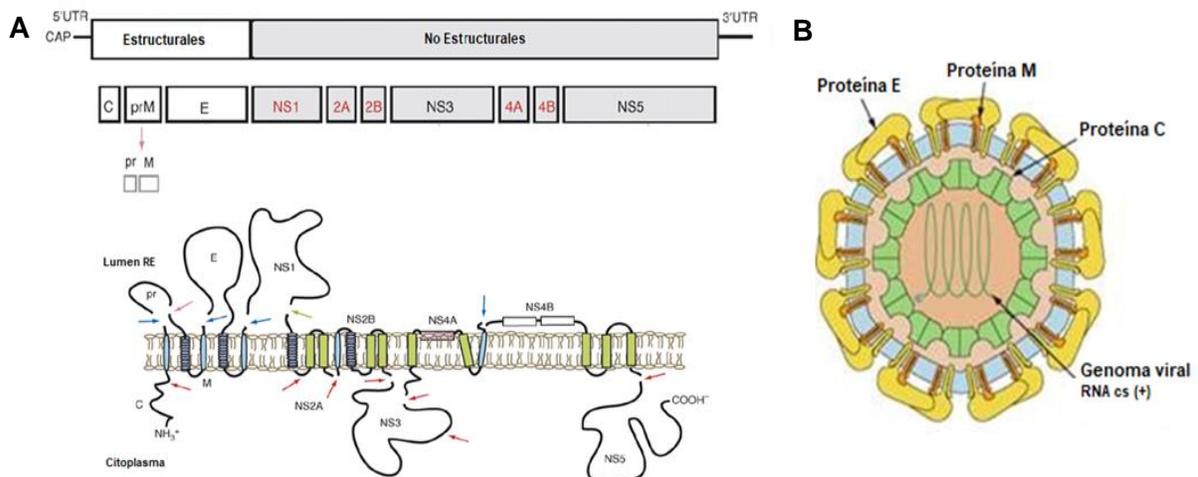


Figura 2. Genoma y estructura del virus Dengue. A) Poliproteína codificada por ARN genómico. Modificado de Perera, R & Khun, R.J. 2008. Structural Proteomics of Dengue Virus. B) composición estructural del virión. Modificado de Swiss Institute of Bioinformatics.

1.3 Ciclo de replicación viral

Una vez que el virus es internalizado en el huésped mediante la picadura del mosquito, las partículas virales se internalizan en células blancas por endocitosis mediada por el receptor. Una vez formado el endosoma temprano, a este se acopla una ATPasa tipo V, favoreciendo la acidificación del mismo, lo que induce la trimerización de la proteína E y la fusión de la membrana viral con la membrana celular, esto promueve la liberación del genoma viral. Posteriormente, se lleva a cabo la traducción de la poliproteína viral, la cual es procesada postraduccionalmente produciendo las tres proteínas estructurales (C, prM y E) y las siete proteínas no estructurales NS1/2A/2B/3/4A/4B/5 (Gubler et al, 2014). El péptido señal de la proteína trasloca a la proteína NS1, así como los ectodominios de las proteínas prM y E hacia el lumen del retículo endoplásmico, mientras que las proteínas C, NS3 y NS5 quedan localizadas del lado citoplasmático, las proteínas NS2 A/B y NS4 A/B se conservan como proteínas transmembrana (Perera & Kuhn, 2008). El complejo de replicación de las proteínas no estructurales, en el cual participa la proteína NS3, la cual como se ha descrito en su extremo amino terminal posee actividad de proteasa, llevando a cabo la ruptura de la poliproteína viral en los sitios NS2B-NS3, NS3-NS4A y NS4B-NS5, así como en los sitios internos de las proteínas C, NS2A y NS4A. Las dos funciones que presenta la proteína NS5 (metiltransferasa en el extremo amino terminal y de RNA polimerasa dependiente de RNA en el extremo carboxilo terminal) están involucradas en la síntesis de novo de la cadena negativa del RNA usando como molde el genoma viral, estas cadenas negativas serán posteriormente utilizadas como moldes para la síntesis de cadenas positivas (Junjhon et al. 2010). El ARN sintetizado y las proteínas de la cápside son posteriormente envueltas por la membrana reticular durante el ensamblaje de los viriones inmaduros que emergen del retículo endoplásmico. Estas partículas virales son transportadas a través del sistema secretor del aparato de Golgi (red trans-Golgi). Dentro de esta red, el pH ácido favorece la acción de la furina, enzima celular

que corta la unión del péptido pr de la proteína M, formando una partícula viral madura. Durante el paso de las partículas virales a través del aparato de Golgi, se llevan a cabo rearrreglos estructurales en la cápside viral en el que se glicosila la proteína E. Concluido este proceso los virus son liberados mediante exocitosis (Figura 3) (Perera & Kuhn, 2008).

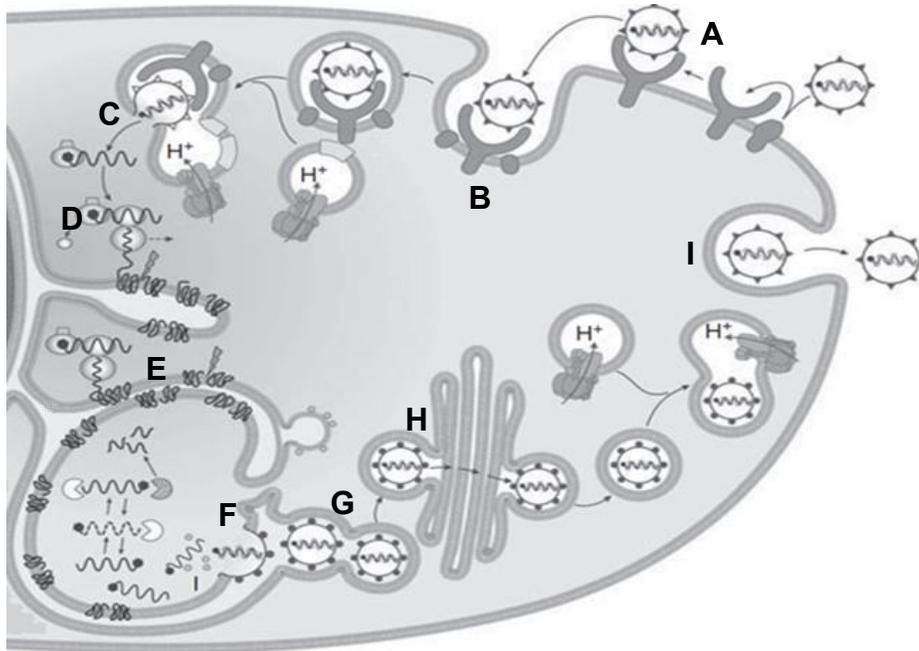


Figura 3. Ciclo de replicación viral del DENV. Modificado de Gubler et al. 2014 A) Fijación B) Endocitosis C) Liberación del genoma D) Traducción E) Replicación F) Ensamblaje G) Secreción H) Maduración I) Liberación viriones

1.4 Manifestaciones clínicas y clasificación de casos

El Dengue tiene un amplio espectro de presentaciones clínicas, a menudo con evolución clínica y resultados impredecibles. Aunque la mayoría de los pacientes se recuperan después de un curso clínico benigno y de resolución espontánea (90-95% del total de casos), una pequeña proporción (5-10% de los casos), progresa a una enfermedad grave, caracterizada principalmente por un aumento en la permeabilidad vascular, con hemorragia o trastornos en la coagulación (Corrales & Hun, 2012). La primera clasificación para la enfermedad del Dengue fue implementada por la OMS en el año 1974 y fue posteriormente evaluada en 1997.

Esta clasificaba la enfermedad en tres categorías: fiebre del dengue (DF, por sus siglas en inglés), fiebre hemorrágica del dengue (DHF, por sus siglas en inglés) y el síndrome de choque por dengue (DSS, por sus siglas en inglés) (Alexander *et al.*, 2011). La definición de caso para DHF se basaba en cuatro criterios: Fiebre, manifestaciones hemorrágicas, trombocitopenia ($<100,000$ plaquetas/mm³) así como evidencia de fuga de plasma (efusión pleural, ascitis o hemoconcentración $\geq 20\%$ o hipoproteinemia). En la definición de caso de DSS la OMS lo definía con choque hipotensivo o una reducción en el pulso más los signos clínicos de choque. Sin embargo, se encontraron limitaciones en cuanto a su complejidad y aplicabilidad, particularmente en pacientes con signos y/o síntomas severos. El reconocimiento de estas limitaciones llevó a los expertos de investigación de enfermedades tropicales (TDR, Tropical Disease Research) de la OMS a realizar un estudio multicéntrico en cuatro países de Asia y tres países de América Latina. De este estudio surgió un nuevo esquema de clasificación (Alexander *et al.*, 2011). La nueva clasificación divide la enfermedad en dos grupos: Dengue no grave (DNG) que se divide en dengue sin signos de alarma (DSSA) y dengue con signos de alarma (DCSA) y el segundo grupo es el del dengue severo (DS) (Narvaez *et al.*, 2011)

La definición de caso en pacientes con DSSA, comprende síntomas de malestar general como náuseas, vómito, prurito y leucopenia. Estos pacientes pueden o no llegar a presentar dolor abdominal intenso o presentar abdomen doloroso a la palpación, vómitos persistentes, sangrado de mucosas, hepatomegalia (>2 cm), signos que indiquen la acumulación de fluidos y puede presentarse un aumento en el hematocrito, estos son considerados signos de alarma y requieren de estricta observación e intervención médica. En conjunto DSSA y DCSA representan el 90-95% de los casos, en la que la enfermedad es auto limitada y es considerado como DNG. En la definición de caso para DS presenta ya manifestaciones hemorrágicas, acumulación de líquidos, en algunos casos con insuficiencia respiratoria (derrame pleural), extravasación del plasma debido a un aumento en la permeabilidad vascular; este aumento en la permeabilidad vascular puede conducir DSS, en el que puede existir un compromiso grave órganos, en algunos casos se puede presentar

alteración de la conciencia; este grupo representa de un 5-10% del total de casos. La letalidad puede variar de un 2-10% si no se cuenta con atención médica adecuada. (OMS, 2009)

1.4.1 Fases de la enfermedad

De acuerdo a la guía de diagnóstico de la enfermedad publicada por la OMS, posterior al periodo de incubación viral, la enfermedad inicia de manera abrupta y presenta tres fases de evolución: fase febril, fase crítica y fase de convalecencia.

1.4.1.1 Fase febril

Aparece de forma abrupta con un aumento brusco en la temperatura corporal mayor a los 38°C y tiene un periodo de duración que va de los dos a los siete días y puede o no estar acompañada de rubor facial, eritema de la piel, dolor corporal generalizado, mialgias, artralgias y cefaleas. Algunos pacientes pueden presentar dolor de garganta, anorexia, náuseas y vómito. El hígado a menudo está aumentado de tamaño y blando al tacto después de algunos días de fiebre. La anomalía más temprana en el cuadro hemático es una reducción progresiva de los glóbulos blancos totales.

1.4.1.2 Fase crítica

Esta fase se ve relacionada con la disminución de la fiebre (defervescencia) por debajo de los 38°C, esto oscila entre el tercer y séptimo día del inicio de los síntomas, se puede presentar un aumento en la permeabilidad capilar en el que puede o no observarse un aumento en los valores del hematocrito. Este punto es el que marca el inicio de esta fase. El periodo de extravasación del plasma dura entre 24 y 48 horas; esto precedido por una leucopenia progresiva y una disminución rápida del conteo plaquetario. Es en este punto en el que los pacientes que no presentan un aumento en la permeabilidad capilar mejoran, mientras que los que

presentan un aumento en la permeabilidad pueden empeorar por pérdida del volumen plasmático, el cual puede variar. El valor aumentado en el hematocrito a menudo refleja la gravedad de la extravasación de plasma. El choque se presenta cuando hay una pérdida crítica del volumen plasmático, que a menudo es precedido por signos de alerta como por ejemplo un descenso en la temperatura por debajo de los 37°C. Si el choque es prolongado, se puede presentar un daño orgánico progresivo debido a la hipoperfusión, se presenta acidosis metabólica y coagulación extravascular diseminada. Esto evoluciona a hemorragias más severas en donde se observa una disminución muy marcada en el hematocrito asociado a un estado de choque grave. Otra observación general es que hay un aumento en el conteo de glóbulos blancos en pacientes con sangrado grave. También es posible que se desarrolle un deterioro orgánico importante como hepatitis, encefalitis, miocarditis.

1.4.1.3 Fase de convalecencia

También denominada de recuperación, se observa cuando el paciente sobrevive a la fase crítica de 24 a 48 horas. Dentro de las siguientes 48 a 72 horas tiene lugar una reabsorción gradual de líquidos del compartimiento extravascular, se observa una mejoría general y se estabiliza el estado hemodinámico. El hematocrito se estabiliza y el conteo de los leucocitos comienzan a elevarse generalmente posterior al cese de la fiebre, aunque la recuperación del número de plaquetas es posterior al aumento en el número de los leucocitos.

1.5 Diagnóstico y manejo de casos

La infección por DENV produce una gran diversidad de síntomas, muchos de los cuales no son específicos por lo que no se puede hacer un diagnóstico basado únicamente en los síntomas clínicos. La confirmación temprana del diagnóstico clínico por el laboratorio puede ser valiosa, ya que en algunas ocasiones la evolución clínica de la enfermedad de leve a grave se da en poco tiempo, llegando en ocasiones a la muerte. La infección por DENV puede confundirse fácilmente con

enfermedades febriles no relacionadas con el Dengue. Según el origen geográfico de la persona, se deben descartar otras causas incluyendo infecciones por otros flavivirus, como Fiebre amarilla, Encefalitis japonesa, Nilo occidental o Zika; con alfavirus como Chikungunya y otras causas de fiebre como malaria y leptospirosis (OMS. 2009).

Las pruebas serológicas se deben llevar a cabo para hacer el diferencial de la infección de otras enfermedades y realizar el seguimiento epidemiológico. Las pruebas específicas se basan en la detección de antígeno NS1 mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), el cual es abundante en los primeros días de infección. Sin embargo, la prueba de detección de anticuerpos IgM e IgG es la prueba de elección, ya que pueden detectarse entre 4 y 5 días posteriores a la aparición de la fiebre (Beltrán-Silva et al., 2016). La segunda técnica utilizada para la confirmación de los casos es la detección y amplificación del RNA viral mediante técnicas como RT-PCR o RT-PCR en tiempo real (OMS,2009).

Como anteriormente se ha mencionado, generalmente la infección es autolimitada y no se necesita de mayores cuidados. La hospitalización está indicada para tomar medidas preventivas como asegurar la ingesta correcta de líquidos y mantener la temperatura por debajo de los 39°C. En los pacientes que presentan Dengue con signos de alarma, con signos de shock o en estado de shock deben ser trasladados de urgencia a un hospital. Los pacientes con Dengue grave en la fase crítica de la enfermedad requieren tratamiento de emergencia. El tratamiento más eficaz para prevenir muertes por extravasación de plasma es el uso de rehidratación intravenosa con soluciones isotónicas y generalmente es la única intervención que se requiere. Las soluciones coloidales pueden utilizarse en caso de choque hipotensivo. Es necesario registrar y evaluar los signos vitales, las curvas de temperatura, hematocrito, diuresis, así como pruebas funcionales hepáticas, renales y evaluación de los tiempos de coagulación. Se recomienda la evaluación a las 48 de la desaparición de la fiebre. La transfusión sanguínea está únicamente indicada en casos de sospecha de sangrado o existencia de sangrado masivo (OMS, 2009).

II. ANTECEDENTES

2.1 El endotelio vascular

La pared vascular está integrada por tres capas tisulares, describiendo el tejido de la capa más externa hacia la luz del vaso, se encuentra la túnica adventicia. La capa de tejido conjuntivo más externa, compuesta principalmente por colágeno y fibras musculares elásticas. Después se localiza la túnica media, ubicada entre las otras dos túnicas y consiste principalmente en estratos circunferenciales de células musculares lisas. Por último, se localiza la túnica íntima, la capa más interna de la pared del vaso, conformada por tres componentes: una capa simple de células endoteliales planas, denominado endotelio, la lámina basal de las células endoteliales y la capa subendotelial compuesta por tejido conjuntivo laxo en el que se pueden encontrar células musculares lisas (Ross & Wojciech, 2012). La integridad del endotelio se mantiene por un complejo equilibrio funcional entre múltiples actividades celulares que modulan la actividad inhibitoria de la pared vascular a trombosis o reacciones inflamatorias. Las uniones célula-célula tienen un papel crucial en estos procesos porque no solo mantienen la adhesión intercelular, sino que también transmiten señales intracelulares que modulan la inhibición por contacto del crecimiento celular, la formación del lumen y las interacciones entre los pericitos y las células del músculo liso. Por lo tanto, las condiciones que alteran las uniones endoteliales podrían no solo aumentar la permeabilidad vascular abriendo espacios intercelulares, sino también cambiar las respuestas de las células endoteliales al ambiente y a las células que las rodean (Giannotta, Trani & Dejana, 2013). En los vasos sanguíneos, es necesaria una adhesión célula-célula fuerte para retener la sangre circulante del lumen del vaso, mientras la pared endotelial se encuentra bajo presión. Sin embargo, el equilibrio entre la adhesión y la permeabilidad dentro de los vasos sanguíneos es adaptable, ya que la unión necesita conservar un potencial para debilitarse, por ejemplo, en la transmigración leucocitaria (Lagenijk & Hogan, 2015).

La región lateral de las células epiteliales se encuentra en contacto con las regiones laterales opuestas de las células vecinas, que se caracteriza por la presencia de

proteínas exclusivas y altamente especializadas de unión que reciben el nombre de complejo de unión. Estos complejos están compuestos por tres tipos de uniones, la primera de ellas son las uniones ocluyentes, también denominadas estrechas; estas forman la barrera primaria a la difusión intercelular y se ubican en la zona más apical de las células. Las uniones estrechas limitan el movimiento de agua y moléculas a través del espacio intercelular, impiden la migración de lípidos y proteínas especializadas de membrana entre la superficie apical y lateral, además de atraer moléculas que señalizan a la superficie celular y vincularlas con los filamentos de actina del citoesqueleto. El segundo grupo son las uniones adherentes que proveen estabilidad mecánica a las células endoteliales mediante la unión del citoesqueleto de una célula con el citoesqueleto de la célula contigua, estas uniones son importantes para crear y mantener la unidad estructural del epitelio, este tipo de unión interacciona con los filamentos de actina y los filamentos intermedios. El tercer grupo son las uniones comunicantes que permiten la comunicación directa entre células adyacentes mediante la difusión de moléculas pequeñas como iones, metabolitos o aminoácidos, estas uniones son importantes para mantener la homeostasis de los órganos (Ross & Wojciech, 2012).

En las uniones estrechas la *zonula ocludens* es el componente más apical del complejo de unión entre células epiteliales, no funciona como un sello continuo sino como una serie de fusiones focales entre las células, las cuales son creadas por proteínas transmembrana de células contiguas que se unen en el espacio intercelular. Las uniones estrechas presentan tres grupos principales de proteínas transmembrana: ocludinas, claudinas y molécula adhesiva de unión (JAM, por sus siglas en inglés) (Ross & Wojciech, 2012).

Las uniones adherentes proveen adhesiones laterales entre célula-célula, donde participan proteínas conocidas como moléculas de adhesión celular (CAM, por sus siglas en inglés), dentro de las cuales se encuentran diferencias proteínas como cadherinas, integrinas, selectinas y la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF, por sus siglas en inglés) (Neissen & Gottardi, 2008).

En las uniones adherentes, la adhesión es mediada por las cadherinas, que son moléculas de adhesión dependientes de calcio. La cadherina vascular endotelial (VE-Cadherina) está conformada por una región extracelular, una región transmembrana y una región intracelular. La región extracelular está constituida por cinco dominios, nombrados de EC1-EC5. La proteína solo tiene un cruce transmembrana. La región intracelular es homóloga a otros miembros de la familia de las cadherinas, ejemplo de estas son la cadherina neural (N-cadherina) o la cadherina epitelial (E-Cadherina) y comporten con ellas interacción con proteínas intracelulares como p120-catenina o β -catenina (Figura 4) (Giannota, Trani & Dejana, 2013). Una excepción es la placoglobina, que está asociada comúnmente a desmosomas en células epiteliales, pero puede unirse directamente a VE-cadherina en células endoteliales que carecen de desmosomas. Únicamente la VE-cadherina se agrupa en las uniones célula-célula (Lagendijk & Hogan, 2015). La adhesión celular entre las dos moléculas de VE-cadherina es de manera homofílica, y es crucial para la organización vascular. La adhesión homofílica entre las dos moléculas no requiere de la región citoplasmática, sin embargo, esta región es esencial para estabilizar la unión, e interacciona con moléculas que participan como andamios moleculares o con actividad enzimática como GTPasas, así como proteínas activadoras de las GTPasas (GAP, por sus siglas en inglés) (Lampugnani, Dejana & Giampietro, 2017). Es por esto que las uniones adherentes pueden transferir señales intracelulares y que comunican células que están unidas entre sí para construir y mantener la organización vascular. La red de señalización mediada por VE-cadherina es compleja y varía en diferentes condiciones funcionales y en la vasculatura en crecimiento o en reposo. Como concepto general, el estado natural de las células endoteliales en un vaso maduro es el de una monocapa confluyente, en el cual las uniones adherentes están correctamente organizadas. En estas condiciones la señalización a través de la VE-cadherina promueve la estabilidad vascular, así como la inhibición por contacto en el crecimiento, protección en la activación de la apoptosis y el control de la permeabilidad vascular (Gionnota, Tani & Dejana, 2013).

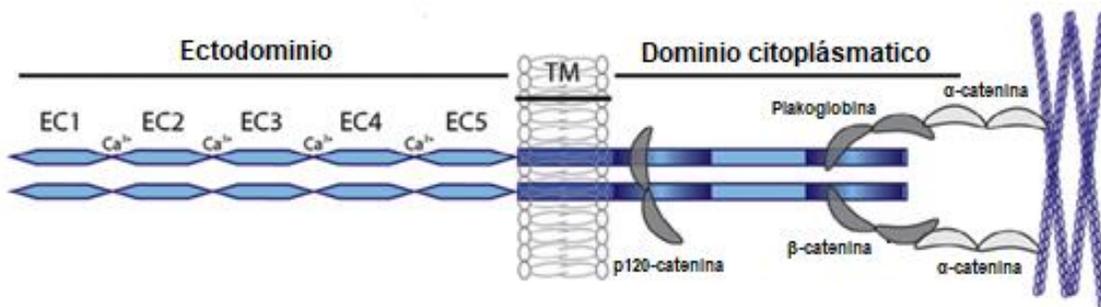


Figura 4. Esquema de VE-Cadherina. La interacción homofílica ocurre en los ectodominios extracelulares (EC) 1 y 2. Modificado de Legendijk & Hogan. 2015. VE- Cadherin in vascular development: a coordinator of cell signaling and tissue morphogenesis.

2.2 El sistema plasminógeno – plasmina

El sistema del plasminógeno – plasmina o fibrinolítico, tiene como función principal, la activación del zimógeno plasminógeno a la enzima activa que es la plasmina, la cual degrada al polímero insoluble fibrina, en fibrinopéptidos y en dímeros de fibrina (dímero D). Similar a otros sistemas mediados por proteasas como el sistema del complemento o el sistema de la coagulación, se encuentra regulado por diferentes activadores e inhibidores. (Deryugina & Quigley, 2012).

La activación del plasminógeno en plasmina ocurre por un corte proteolítico mediado por sus dos activadores fisiológicos, el activador del plasminógeno tisular (tPA) y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA). El tPA se encuentra relacionado con la activación a nivel intravascular y depende de la presencia de la fibrina, para participar en el proceso fibrinolítico, mientras que el uPA depende de su unión al receptor (uPAR), no requiere de la presencia de fibrina, es por esta razón que está más relacionada con la respuesta inflamatoria. La plasmina es una endopeptidasa que hidroliza enlaces peptídicos en residuos de arginina y lisina, de manera similar a la tripsina, teniendo una mayor especificidad por el residuo lisina. (Syrovets *et al.*, 2012). La fibrina es considerada el sustrato principal de la plasmina, sin embargo, la plasmina también degrada proteínas de la matriz extracelular como laminina, fibronectina, activación de prohormonas así como factores de crecimiento (Peetermans *et al.*, 2016; Syrovets *et al.*, 2012). Este sistema se encuentra regulado tanto a nivel de su activación, por el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 y 2 (PAI, por sus siglas en inglés), como a nivel de la enzima activa por la α 2-

antiplasmina y en menor medida por α 2-macroglobulina (Figura 5) (Rijken & Lijnen, 2009).

2.2.1 Plasminógeno

El plasminógeno humano es sintetizado en el hígado, como una glicoproteína de 810 aminoácidos. Del extremo amino terminal son removidos 19 aminoácidos que constituyen el péptido señal. El plasminógeno tiene un peso molecular aproximado de 92 kDa y su concentración en plasma va entre los 1.8 y 2 μ M. La activación de la proenzima ocurre por un corte proteolítico en Arg⁵⁶¹ – Val⁵⁶² por los activadores tPA y uPA, y este corte permite la formación de una cadena ligera y una cadena pesada unidas por dos puentes desulfuro. La cadena ligera (C-terminal) contiene la triada His⁶⁰³, Asp⁶⁴⁶ y Ser⁷⁴¹, que conforman el sitio activo de proteasa serínica; mientras que la cadena pesada (N-terminal) consiste de los 5 dominios kringle que contienen los sitios de unión lisina (LBS, lysine binding sites) que permiten la interacción con moléculas blanco o con receptores del plasminógeno (PlgR) (Law et al. 2013). La unión a estos receptores facilita la activación del plasminógeno a plasmina, así como la unión del complejo plasmina-receptor protege a la plasmina de su inhibición por la α 2-antiplasmina. La remoción de un fragmento de 8 kDa en el extremo amino terminal convierte al plasminógeno nativo (Glu-Plg) en Lys-Plg, ocasionando un cambio de conformación de cerrado a abierto permitiendo una interacción más fuerte con las moléculas diana y facilitando también su activación (Xue et al., 2012).

2.2.2 Activadores e inhibidores del plasminógeno

La activación del plasminógeno es un mecanismo finamente regulado debido a la participación en distintos procesos biológicos. Este sistema se encuentra regulado a nivel de la actividad de la plasmina, así como a nivel de la activación del plasminógeno, mediante la síntesis y liberación tanto de activadores como sus inhibidores. El tPA es una proteasa serínica de 70 kDa conformada por 527 aminoácidos. Sin embargo, el tPA nativo contiene en el extremo amino terminal tres

aminoácidos (Gly-Ala-Arg-). El tPA es convertido por la plasmina en dos cadenas por hidrólisis en el enlace peptídico Arg²⁷⁵-Ile²⁷⁶ (Deryugina & Quigley, 2012); la diferencia con el tPA de cadena sencilla es que esta última es la enzimáticamente activa. El amino terminal del tPA está compuesto por varios dominios que tienen homología con otras proteínas. Un dominio tipo dedo (finger) que comprende los residuos 4-50, un dominio similar al factor de crecimiento epidermal con los residuos 50-87, y dos dominios Kringle localizados en los residuos 87-176 y 179-262 respectivamente. La región constituida por los residuos 276-527 contiene la región proteasa de serina que contiene el sitio catalítico compuesto por los residuos His³²², Asp³⁷¹ y Ser⁴⁷⁸. Estos distintos dominios están involucrados en las diferentes funciones de la enzima, incluyendo su unión a la fibrina y la activación del plasminógeno, su rápida depuración, así como la unión a sus receptores (Peetermans *et al.*, 2016). El tPA posee tres sitios potenciales para sufrir N-Glicosilación en Asn¹¹⁷, Asn¹⁸⁴ y Asn⁴⁴⁸, así como un sitio de unión para sufrir O-fucosilación en el residuo Thr⁶¹. Es producido y secretado por las células endoteliales y la activación del plasminógeno mediada por tPA depende de la presencia de fibrina, esto permite la lisis de depósitos de fibrina intravasculares (Rijken & Lijnen, 2009).

El uPA es una glicoproteína conformada por 411 aminoácidos con un peso de 52 kDa. La triada catalítica se localiza en el extremo carboxilo terminal y está compuesto por Asp²⁵⁵, His²⁰⁴ y Ser³⁵⁶. En el extremo amino terminal posee un dominio similar al factor de crecimiento epidermal localizado entre los residuos 5-49, y un dominio Kringle formado por los residuos 50-131, el cual no posee LBS, esto explica por qué el uPA se une directamente a la fibrina. En presencia de altas concentraciones de plasmina se produce uPA de bajo peso molecular 33 kDa, por hidrólisis en Lys¹³⁵-Lys¹³⁶ (Rijken & Lijnen, 2009). El uPA se une a su receptor (uPAR) y activa al plasminógeno a nivel de la superficie celular, esta activación del plasminógeno a plasmina se involucra en la adhesión celular, así como migración celular a través de la matriz extracelular (Peetermans *et al.*, 2016).

Para evitar una degradación inespecífica en los tejidos por acción de la plasmina, su actividad está regulada no solo a nivel de la activación de la plasmina, sino también por su inactivación directa. Los PlgR participan de manera indirecta en el

control de la actividad de la plasmina a nivel de la superficie celular (Law et al., 2013).

Los principales inhibidores de este sistema pertenecen al grupo de inhibidores de proteasas serínicas conocidos también como serpinas. Estos inhibidores forman un complejo estable entre la región del sitio activo de la proteasa blanco y el sitio reactivo semejante al sustrato en la serpina. La proteasa corta el asa del sitio reactivo de la serpina formándose un intermediario covalente enzima-acilo que modifica el sitio activo de la enzima previniendo su desacilación, de esta manera la enzima queda inactiva (Figura 5) (Law et al., 2013).

El inhibidor de activador de plasminógeno 1 (PAI-1, por sus siglas en inglés), es una proteína monocatenaria formada por 379 aminoácidos y un peso de 52 kDa y pertenece a la superfamilia de las serpinas. Forma un complejo 1:1 con ambos activadores del plasminógeno, impidiendo así su activación (Gonzales et al., 2016).

La α 2- antiplasmina es una glicoproteína monomérica que pesa 70 kDa y posee aproximadamente 13% de carbohidratos. Está formada por 464 aminoácidos. Su sitio reactivo es en los residuos Arg³⁷⁶-Met³⁷⁷ y se diferencia de otras serpinas por tener un segundo sitio de unión a la plasmina, interactuando con los kringles 1 – 3 de esta última. Su concentración en plasma oscila entre 1 – 1.2 μ M (Syrovets et al., 2012).

Algunos microorganismos han desarrollado estrategias moleculares para mantener su capacidad de unir y activar diferentes componentes del sistema plasminógeno-plasmina. La presencia de activadores del plasminógeno por diferentes microorganismos patógenos, ha sido un particular punto de interés. Uno de los activadores bacterianos mejor caracterizados es la estreptoquinasa (SK, por sus siglas en inglés) secretada por bacterias del grupo streptococci (Degen, 2007). Esta es una proteína extracelular, monocatenaria con tres dominios denominados α , β y γ y no tiene actividad proteolítica. La activación del plasminógeno la lleva a cabo manera indirecta formando un complejo equimolar denominado complejo activador SK-Plg (Kunamneni, Abdelghani & Ellaiah, 2007). La interacción de los dominios α y γ con el plasminógeno induce un cambio conformacional en este último, exponiendo el sitio catalítico induciendo la activación del plasminógeno sin la hidrólisis en Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶². La formación del complejo SK-PLG puede una vez

activo, activar otras moléculas de plasminógeno. El cambio conformacional protege al plasminógeno de ser inactivado por $\alpha 2$ -antiplasmina (Peetermans, 2016).

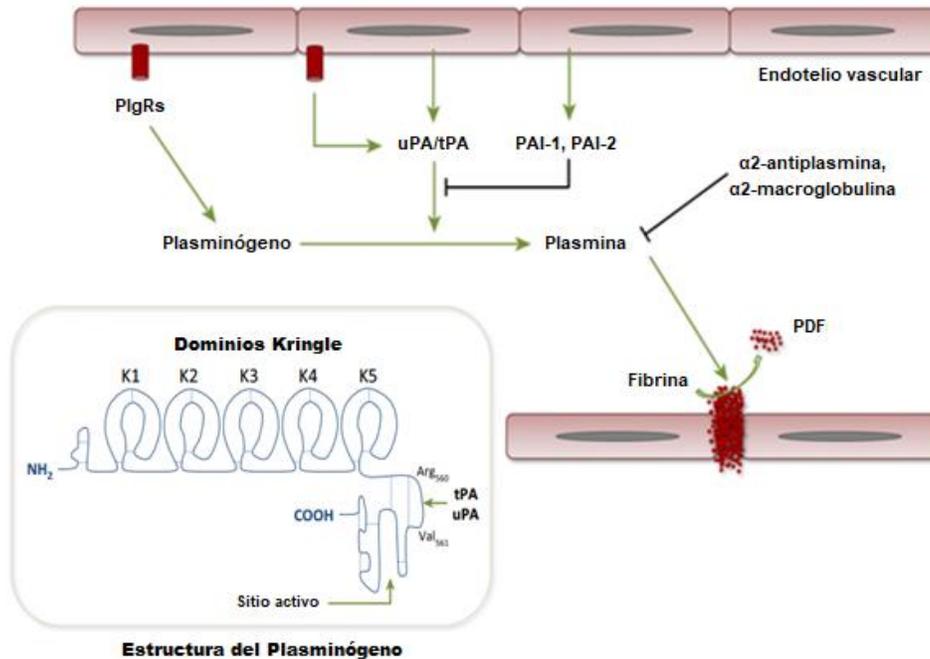


Figura 5. Estructura del plasminógeno y componentes del sistema fibrinolítico. Modificado de Gonzales et al. 2016 Plasmin in parasitic chronic Infections: Friend or Foe? Trends in Parasitology

3. Interacción del sistema plasminógeno - plasmina con patógenos

El sistema fibrinolítico constituye un potente sistema proteolítico que los patógenos suelen utilizar para favorecer su diseminación a través de las barreras tisulares. Solo algunas bacterias muestran diferentes mecanismos para activar directamente al plasminógeno por la secreción de activadores del plasminógeno bacteriano, sin embargo, un gran número de patógenos desarrollaron mecanismos para unir al plasminógeno a su superficie, facilitando la activación del mismo (Peetermans *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha descrito que durante la infección bacteriana hay un aumento en la concentración de los componentes del sistema fibrinolítico, esto por efecto de exotoxinas bacterianas o la producción de citocinas pro inflamatorias

como IL-1 β y TNF- α , que son liberadas durante el proceso infeccioso. (Mondino & Blasi, 2004).

El secuestro de la actividad de la plasmina ha sido documentado para distintos patógenos invasores como *Cryptococcus neoformans*, *Helicobacter pylori*, bacterias como el estafilococo y estreptococo, influenza y *Yersinia pestis*. Cada uno de estos microorganismos poseen diferentes mecanismos para beneficiarse de la activación del plasminógeno e incrementar su potencial invasivo (Kornhonen et al., 2013). Esta capacidad de invasión puede clasificarse en tres mecanismos: Degradación de la matriz extracelular, evasión de la respuesta inmune y degradación de coágulos de fibrina, los cuales se generan como mecanismo de contención de la infección (Raymund & Djordevic, 2015). Hay evidencia que muestra que las bacterias dependen de la activación del plasminógeno para atravesar monocapas confluentes celulares, degradando la matriz extracelular lo que facilita la diseminación bacteriana (Attali et al., 2008). El efecto de la plasmina en la degradación de la matriz extracelular y la membrana basal ha sido demostrado para *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*. Estos patógenos son los principales responsables de meningitis bacteriana nosocomial. La capacidad de secuestrar a la plasmina puede ser crucial para la invasión a sistema nervioso central, resaltando la importancia clínica de esta interacción. (Sun, 2006). Sin embargo, la activación de este sistema no solo es utilizado como mecanismo de invasión. Un segundo mecanismo es la evasión a la respuesta inmune. Este mecanismo es muy benéfico para las bacterias ya que favorece la degradación de péptidos y proteínas involucradas en la primera línea de defensa del huésped, este incluye proteínas del complemento, así como péptidos antimicrobianos. Un ejemplo muy bien descrito es la proteína Pla presente en la membrana de *Y. pestis*, adhiere y activa al plasminógeno en la membrana celular, la plasmina escinde a la proteína C3, por lo que no hay migración de macrófagos al sitio de infección, asociándose a la falta de activación del sistema del complemento (Caulfield & Wyndham, 2012). La habilidad de estreptococos del grupo A (GAS, por sus siglas en inglés) depende de su capacidad de invadir tejidos y de evadir la respuesta inmune del hospedero (Torsten et al., 2014). Se ha demostrado que la unión del plasminógeno a la membrana bacteriana, así como la activación del mismo por acción de la estreptoquinasa (SK), contribuye de manera

importante en la virulencia de bacterias que pertenecen a este grupo (Cook et al., 2012). La activación del plasminógeno en la infección por GAS está asociado a la presencia de las lesiones necróticas y un aumento en la mortalidad (Sanderson-Smith, et al., 2008). El tercer mecanismo descrito, es resultado de la activación del sistema de coagulación como mecanismo de respuesta al proceso infeccioso. La activación del sistema de coagulación culmina con la formación de los coágulos de fibrina y como resultado el encapsulamiento de la bacteria. La bacteria entonces modula la activación del plasminógeno para degradar la red de fibrina y favorecer su diseminación (Peetermans *et al.*, 2016). Ejemplo de este mecanismo fue descrito en un modelo murino *knock out* para plasminógeno. En el que se demostró que durante la infección con *Y. pestis* la deficiencia del plasminógeno posee un efecto protector sobre la infección de esta bacteria reduciendo significativamente la mortalidad en este modelo (Degen et al., 2007). En un modelo similar se utilizó para evaluar la participación del sistema fibrinolítico durante la infección con el virus de la Influenza A (IAV) en donde concluyeron que la ausencia del plasminógeno favorece a una disminución en la mortalidad durante la infección, así como una disminución en el proceso inflamatorio pulmonar por la ausencia de los péptidos de la degradación de la fibrina durante la infección con IAV (Berri et al., 2013). En 2008 el grupo de Attali y colaboradores determinaron que la interacción de la bacteria *Streptococcus pneumoniae* con la plasmina favorece el proceso de trans migración endotelial en monocapas confluentes de EaHy, así como de células de epitelio alveolar (A549) mediado por la degradación de la VE-cadherina por efecto asociado a la actividad proteolítica de la plasmina, esto se demostró al utilizar el inhibidor de proteasas, aprotinina; con el cual no se observó el aumento en la permeabilidad.

4. El endotelio vascular durante la infección por DENV e interacción con plasmina

El tropismo del DENV hacia células endoteliales *in vivo*, está poco esclarecido. Algunos estudios preliminares de biopsias de piel indican que la microvasculatura localizada en la dermis es el sitio más afectado, aunque no se ha detectado antígeno

del virus en las células que rodean la microvasculatura. Por el contrario, hay evidencia de antígeno del virus en la vasculatura endotelial pulmonar, aunque esto no significa necesariamente una replicación activa del DENV. *In vitro*, se ha demostrado la replicación de los cuatro serotipos virales en células endoteliales y la consecuencia de esta infección suele producir daño funcional más que morfológico. Se propone que la respuesta del sistema vascular a la infección por DENV, se manifieste por un estado de inflamación severa de las células endoteliales. El patrón de infección del virus en las células de la microvasculatura es distinto lo que sugiere que diferentes tejidos tienen varios patrones de activación. Está demostrado que el incremento en la permeabilidad de la microvasculatura periférica ocurre tanto en el paciente con dengue severo como con síndrome de choque por dengue. Por lo tanto, las células endoteliales de pulmón y de la región abdominal podrían reaccionar de una manera específica ante la infección por DENV (Corrales & Hun, 2012). La vasculopatía es resultado de la disfunción endotelial ocasionada tanto por factores virales como un mecanismo directo, así como por factores individuales del hospedero como mecanismos indirectos, que en última instancia afectan al endotelio vascular (Cabello- Gutiérrez *et al.*, 2009).

Mediante ensayos *in vitro* diferentes grupos han demostrado que, durante la infección por el DENV, se disminuye la continuidad de la barrera del endotelio vascular. Durante la infección por DENV de una línea de células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1), mediante técnicas inmunohistoquímicas, se demostró, que a medida que progresa la infección existe una relocalización de las proteínas de unión, en el estudio publicado por Talavera y col (Talavera *et al*, 2004). Los autores identificaron que la ocludina, proteína presente en las uniones estrechas se relocaliza en el citoplasma a las 48 horas post infección. Así mismo, la confluencia de la monocapa celular se va perdiendo, lo cual se corresponde con un reordenamiento en la actina (Talavera *et al*, 2004). En un estudio realizado por Kanlaya y colaboradores, realizado con la línea celular derivada de células endoteliales humanas (EaHy 926), demostraron mediante análisis de inmunohistoquímica que se lleva a cabo una reorganización y disminución en los filamentos de actina, así como una disminución en la expresión de proteínas de

adherencia como la VE- cadherina y en proteínas de unión estrecha como la proteína ZO-1 a las 48 horas (Kanlaya *et al.*, 2009). Asimismo, se conoce que el DENV favorece la producción de IL-8 en células de microvasculatura endotelial humana (HMEC-1), la cual unida a otros factores causa una reorganización del citoesqueleto. El efecto directo del virus en las uniones estrechas y el citoesqueleto, junto con la liberación de IL-8 inducen modificaciones estructurales que pueden ser importantes en la alteración de la permeabilidad endotelial, favoreciendo la extravasación de plasma (Corrales & Hun, 2012). Está demostrado que durante la infección por DENV, la expresión del Factor Tisular en respuesta al daño se expresa en la superficie celular activando el sistema de coagulación que induce la activación de la trombina. La trombina una vez activa, al ser una enzima perteneciente a la familia de las proteasas serínicas, induce la activación del receptor activado por proteasas (PAR-1, por sus siglas en inglés) culminando con la activación del factor de transcripción NFκB. Este factor participa en la transcripción de citocinas pro-inflamatorias como IL-8, de proteínas de adhesión como V-CAM y la expresión más factor tisular. Lo que induce un cambio en el fenotipo del endotelio vascular, cambiando a un estado pro inflamatorio, pro adherente y pro coagulante, demostrando que la participación de las proteasas de la coagulación, desempeñan un papel importante en la instalación de la forma severa de la enfermedad (Huerta-Zepeda *et al.*, 2008).

En 2001, Huang y colaboradores, reportaron alteraciones del sistema fibrinolítico en pacientes con DHF/DSS, en los que la concentración plasmática del tPA y su inhibidor fisiológico PAI-1, presentaban un aumento de tres veces o más en la relación tPA/PAI-1, en el que siguieron que la participación del tPA está relacionado con un aumento en la concentración de la plasmina circulante (Huang *et al.*, 2001). Por otra parte, en nuestro grupo se llevó a cabo un estudio en el que se demostró que la proteína de envoltura viral ó Y es capaz de unirse al plasminógeno, y a la vez de activarlo a su forma activa. Sin embargo, aún no se ha elucidado el efecto biológico que pudiera tener la proteasa de serina a nivel del endotelio vascular durante la infección por DENV (Monroy & Ruiz, 2000).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha reportado que, durante la vasculopatía por Dengue, se presenta un cambio en el fenotipo de las células endoteliales, de un estado de barrera, anti inflamatorio y anticoagulante a uno pro-inflamatorio, pro-coagulante con incremento en la permeabilidad endotelial que puede favorecer la perdida de barrera vascular. Durante las formas severas de la enfermedad (Síndrome de choque por dengue), el sistema plasminógeno-plasmina puede tener un papel importante durante el proceso de permeabilidad del endotelio vascular.

En nuestro grupo previamente hemos reportado que el DENV es capaz de unirse al plasminógeno y favorecer su activación a plasmina. Por otro lado, se conoce que algunas proteasas de serina, pueden participar en la degradación de la VE-Cadherina endotelial, principal proteína de unión que participa en el establecimiento de la barrera endotelial, favoreciendo un incremento en la permeabilidad del endotelio vascular. Ambos antecedentes hacen relevante el estudio de la activación del sistema plasminógeno plasmina, durante la infección por DENV. Por lo que es posible que la participación del plasminógeno-plasmina, en el establecimiento de los casos severos la enfermedad como el Síndrome de Choque por dengue, tenga un papel importante durante la instalación de la vasculopatía por dengue. Con base en lo anterior, en el presente proyecto nos propusimos evaluar la posible participación de la plasmina en la degradación de la VE-Cadherina endotelial, como fenómeno importante en el establecimiento de la vasculopatía descrita en los casos severos, como el Síndrome de choque por dengue. Con base en estos antecedentes, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

IV. HIPÓTESIS

La plasmina producida por la interacción del plasminógeno con el virus dengue, puede participar en la degradación de la VE-Cadherina favoreciendo un incremento en la permeabilidad del endotelio vascular, presente en el Síndrome de Choque por dengue.

V. OBJETIVOS

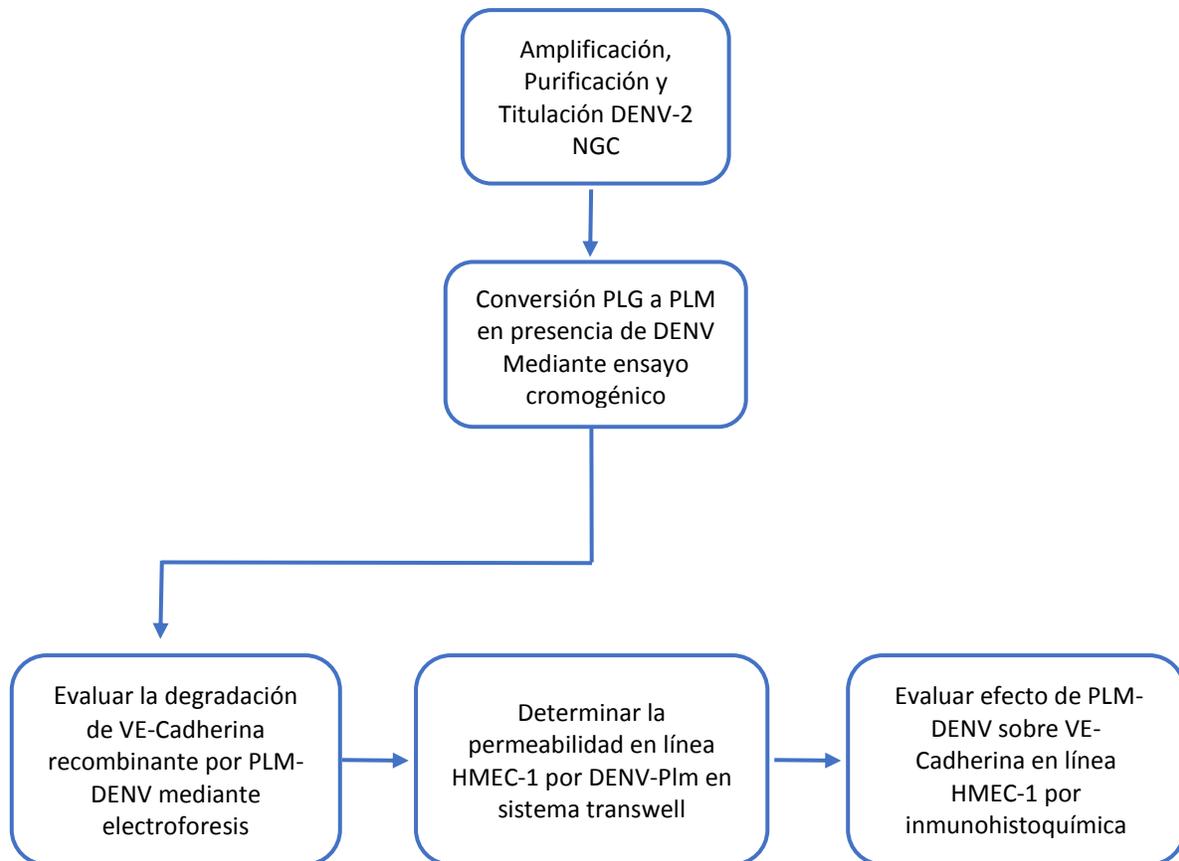
5.1 Objetivo General

Determinar si la plasmina que se genera por la interacción del plasminógeno con el DENV participa en el incremento de la permeabilidad del endotelio vascular (HMEC-1) mediante la degradación de la VE-Cadherina endotelial, como un fenómeno importante en el establecimiento de la vasculopatía por dengue.

5.2 Objetivos específicos

- Amplificación, titulación y purificación el DENV-2-NGC en células LLC-MK2.
- Determinar la conversión del plasminógeno humano a plasmina en presencia del DENV, mediante ensayo cromogénico.
- Evaluar la posible degradación de la VE-Cadherina recombinante por la plasmina generada en el ensayo anterior, mediante electroforesis.
- Evaluar el efecto de la plasmina generada en los ensayos anteriores en la VE-Cadherina en células HMEC-1, mediante inmunohistoquímica.
- Determinar en cultivo de células de endotelio vascular humano (HMEC-1), si la plasmina generada en el ensayo anterior favorece un incremento en la permeabilidad vascular, mediante un sistema transwell.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cultivo, cosecha, purificación y titulación de DENV en la línea celular LLC-MK2

Para la amplificación del virus utilizado en este trabajo, Virus Dengue 2 Nueva Guinea C (DENV-2-NGC), se utilizó una línea celular derivada de riñón de mono *Rhesus* (LLC-MK2 ATCC® CCL™7). El cultivo se realizó en cajas de cultivo hasta crecimiento celular a una confluencia del 90% utilizando el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose suplementado con suero fetal bovino a una concentración final de 10% y L-glutamina 200 mM esterilizado por filtración al vacío. Las células fueron infectadas a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 y puestas en incubación a 37°C en ambiente húmedo 5% CO₂ hasta la formación de sincicios (efecto citopático). Las células fueron congeladas a -70°C durante 24 horas, descongeladas en una cama de hielo y agua y nuevamente congeladas a -25°C y descongeladas en cama de agua y hielo, el medio fue homogenizado, mezclando 10 veces con pipeta serológica y centrifugado durante 10 minutos a 3000 rpm a 4°C en centrifuga Beckman Coulter Allegra. Del sobrenadante se realizaron alícuotas las cuales fueron conservadas a -70°C hasta su uso.

La purificación del virus se realizó por ultra centrifugación con el rotor sw40Ti. Las alícuotas de la cosecha fueron descongeladas en hielo, homogenizadas y colocadas en tubos para ultracentrífuga y llevados hasta tres cuartas partes del mismo con agua bidestilada estéril, esto solo si el volumen de las alícuotas no era suficiente, las muestras fueron centrifugadas a 25, 000 rpm a 4°C durante 120 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendió en 500 µL de PBS estéril, homogenizado y almacenado en alícuotas de 50 µL a -70°C hasta su uso.

La titulación del virus se realizó por ensayo de placa lítica, la cual se realizó en cajas múltiples de 12 pozos, en los cuales se sembraron células de la línea celular LLC – MK2 las cuales fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂ hasta la formación de la

monocapa a una confluencia del 90% a las que se les fue retirado el medio y se realizó un lavado con PBS (NaCl 137 Mm, KCl 2.7 Mm, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM, pH 7.4) e inoculadas utilizando diluciones seriadas en base 10 del stock viral, 10⁻¹ – 10⁻¹¹, tomando 100 µL del stock viral y 900 µL de medio sin suplementar como la dilución 10⁻¹. Se tomaron 400 µL de cada dilución y fueron colocados en pozos identificados previamente, cada dilución se realizó por duplicado. El virus se dejó adsorber sobre la monocapa durante dos horas en condiciones de incubación (37°C en ambiente húmedo y 5%CO₂), transcurrido el tiempo el inóculo fue retirado y los pozos fueron lavados con PBS, posteriormente a cada pozo se agregó 1 mL de medio sin suplementar y metilcelulosa al 1%, y las cajas fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂ hasta que el efecto citopático fue observado. El medio fue retirado y las células fueron fijadas con metanol puro, eliminado por evaporación. Las monocapas fueron teñidas con cristal violeta al 1% durante 15 minutos, el colorante fue descartado y las monocapas lavadas con agua. Para determinar el título (unidad formado de placa, UFP) del virus se contaron el número de placas en la mayor dilución posible y se realizó el cálculo con la siguiente UFP/mL= (n) (10) (factor de dilución), donde n, número de placas contadas; 10, factor de corrección, factor de dilución, dilución en la que se realiza el conteo del número de placas.

7.2 Cultivo de células de microvasculatura endotelial humana (HMEC-1)

Para evaluar el efecto que tiene la plasmina producida por la interacción con el virus dengue sobre células del endotelio vascular, se decidió utilizar la línea celular derivada de células de microvasculatura endotelial humana (HMEC-1 ATCC® CRL-3243™), una línea celular adherente inmortalizada de células capilares (Ades et al, 1992). Las células fueron cultivadas en cajas de cultivo F75, utilizando medio MDCB131 (Sigma life science) suplementado con 10 ng/mL de factor de crecimiento endotelial (EGF), 1 µg/mL de hidrocortisona, 10 mM de Glutamina, suero fetal bovino al 10% e incubadas a 37°C y 5% CO₂ hasta confluencia del 95%. De acuerdo al ensayo a realizar, al cultivo se le retiró el medio y la monocapa celular fue lavada con 5 mL de Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS) libre de calcio y magnesio,

el cual fue descartado. Posteriormente se utilizaron 4 mL de solución 0.25% tripsina/0.53 mM EDTA para despegar las células, las cuales se observan en dispersión en microscopio invertido, fueron homogenizadas y transferidas a tubos falcon de 15 mL y fueron centrifugadas a 2, 500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue descartado y el pellet celular fue resuspendido en 1 mL de medio completo fresco para contabilizar las células con azul de tripano en una dilución 1:10 en la cámara de Neubauer contando los cuatro cuadrantes externos. Para realizar el subcultivo celular, el pellet celular fue resuspendido en 1 mL de medio nuevo, homogenizado y llevado al volumen final de las cajas de cultivo a utilizar y se dejaron en incubación a 37°C en ambiente húmedo y 5% CO₂.

7.3 Activación de plasminógeno por interacción con DENV

La activación del plasminógeno a plasmina por interacción con el virus se realizó mediante ensayo cromogénico en placas de 96 pozos de fondo plano, este ensayo utilizó un sustrato cromogénico específico para la enzima activa. El sustrato es escindido por acción de la plasmina liberando p-nitroanilina, convirtiendo el color de la reacción a amarillo, a mayor concentración de p-nitroanilina mayor es la cantidad de enzima activa. Para realizar estos ensayos los pozos fueron lavados con una solución 50 mM Tris-HCl, 110 mM NaCl, pH 7.4. A cada pozo se le adicionaron 15 µL (5 µM) de cromógeno (H-D-Nle-CHA-Lys-pNA.2AcOH, Spectrozyme PL® Sekisui Diagnostics), como control positivo se utilizaron 20 µL de estreptoquinasa (SK). Para determinar la concentración viral óptima se utilizaron diluciones del virus purificado en diferentes concentraciones 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 y 1×10^3 UFP/mL, a los cuales se les adicionaron 5 µL (20 U/mL) de plasminógeno. Todas las reacciones se ajustaron a un volumen final de 100 µL con PBS 1X. Las cinéticas se hicieron a una temperatura de 37°C. La absorbancia se midió y registró en un lector de placas de 96 pozos Multiskan de Thermo LabSystems a una longitud de onda de lectura de 405 nm cada 5 minutos durante 120 minutos.

7.4 Evaluación *in vitro* de la degradación de VE-cadherina por plasmina

Para generar plasmina se colocaron 5 μ L de plasminógeno (20 U/mL) con el virus (1×10^5 UFP/mL) en un volumen final de 50 μ L en PBS e incubados a 37°C durante 90 minutos. A la mezcla, se añadió 0.5 μ g de VE-cadherina recombinante (R&D systems) y se dejó incubar durante 60 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo la mezcla fue homogenizada y fueron tomados 10 μ L de la mezcla y se le adicionaron 10 μ L de amortiguador de carga, se homogenizaron y se calentaron a 100°C durante 6 minutos. Las muestras fueron cargados en geles de poliacrilamida al 12% se realizó la electroforesis en condiciones reductoras durante 60 minutos a 80 V. Concluida la electroforesis, los geles fueron colocados en solución de fijado durante 5 minutos y posteriormente se agregó la solución de tinción con Coomassie G-250 durante 90 minutos. Posteriormente los geles se dejaron en solución de decoloración durante la noche.

7.5 Microscopia de inmunofluorescencia en células HMEC-1

Para evaluar el efecto de la plasmina generada por interacción con DENV sobre las células endoteliales humanas, esto mediante inmunohistoquímica, se utilizaron portaobjetos con plástico separador de ocho pozos de Lab Tek®, en los cuales fueron sembradas 5×10^4 células por pozo, dejándose con 200 μ L de medio completo durante 48 horas a 37°C y 5% CO₂ y ambiente húmedo para permitir la formación de la monocapa. Para los ensayos de permeabilidad utilizamos el sistema transwell de Millipore™, el pozo interno o inserto el cual fue hidratado durante 15 minutos a temperatura ambiente con 200 μ L de medio, concluido el tiempo el medio fue retirado y se sembraron 3.5×10^5 en 200 μ L de medio por pozo con un tamaño de poro de 0.4 μ m, se añadieron 300 μ L de medio completo en el pozo externo y la placa fue incubada a 37°C en ambiente húmedo y 5% CO₂ durante 72 horas para permitir la formación de la monocapa. Una vez formada las monocapas sobre el portaobjetos, les fue retirado el medio y se realizó un lavado con 150 μ L de PBS 1x y posteriormente fueron colocados 100 μ L de los diferentes estímulos, como control negativo se utilizó medio sin complementar, como control positivo se colocó

plasmina generada con estreptoquinasa (SK-Plm), y para evaluar el efecto del virus se utilizaron dos diferentes MOI de 1 y 3, así como plasmina generada por interacción con DENV (DV-Plm). Los estímulos fueron colocados a diferentes tiempos 6, 12, 24 y 48 h. Transcurrido el tiempo de estimulación, estos fueron retirados de cada pozo. Cada pozo fue lavado con 150 μ L de PBS 1x. Las células fueron fijadas con una solución de p-formaldehído 2%/PBS durante cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la monocapa fue bloqueada con 150 μ L por pozo de la solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución fue retirada y se agregaron 100 μ L por pozo del anticuerpo anti VE-Cadherina en una dilución 1:100 en una solución BSA 0.5%/PBS el cual se dejó incubando a 4°C durante la noche. El anticuerpo primario fue retirado, y se colocaron 100 μ L por pozo del anticuerpo secundario Dy-Light 488 anti-conejo (Jackson Inmunoresearch) diluido 1:300 en PBS dejándolo incubar 60 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. El anticuerpo no pegado fue retirado, fue retirado el plástico separador del portaobjetos, fueron colocados 15 μ L por pozo de medio de montaje con 4´6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Vector Laboratories), se colocó el cubreobjetos de 24 x 50 mm, previamente limpiado con alcohol, evitando la formación de burbujas de aire, sellando con barniz. Para evaluar las imágenes se utilizó microscopio invertido Olympus IX71.

7.6 Sistema transwell para evaluar efecto sobre permeabilidad de plasmina sobre células HMEC-1

El modelo del sistema transwell permite evaluar cuantitativamente el efecto o daño que tiene de un estímulo sobre la monocapa celular y se basa en la evaluación del paso de Isotiocianato de fluoresceína dextran (FITC-dextran) 40 kDa (Chondrex Inc.) entre las células que forman la monocapa y una membrana semi permeable con un tamaño de poro de 0.4 μ m (Figura 6). Una vez formada la monocapa sobre la cámara apical, fue retirado el medio, y fueron colocados en un volumen final de 200 μ L los siguientes estímulos, medio sin complementar, DENV MOI 3, plasmina generada por interacción con estreptoquinasa como control positivo y plasmina

generada con DENV; los volúmenes se ajustaron con medio MCDB131 sin complementar. Para evaluar el porcentaje de barrera que presenta la monocapa utilizamos únicamente medio sin complementar, como control positivo se utilizó plasmina generada con SK, para evaluar el efecto del virus fue utilizada una MOI 3, y plasmina generada por interacción con DENV. Estos estímulos fueron colocados a diferentes tiempos 6, 12, 24 y 48 horas. Transcurrido el tiempo, los estímulos fueron retirados, y las cámaras apicales fueron colocadas en cámaras basolaterales limpias. Para evaluar el efecto del estímulo sobre la monocapa endotelial, se colocaron 100 μ L en la parte superior de la monocapa, en una dilución 1:60 en medio sin complementar de FITC-dextran de 40 kDa, mientras que en la cámara basolateral fueron colocados 200 μ L de medio sin complementar. Se dejó en incubación a 37°C durante 60 minutos permitiendo que las moléculas fluorescentes pasaran a través de la monocapa, al finalizar el tiempo la cámara apical fue retirada, y el medio homogenizado. Se colocaron 50 μ L de cada cámara basolateral en placas de 96 pozos oscura de fondo plano. Esta placa fue leída en lector de placas SynergyH4-reader Biotek utilizando una longitud de onda de 490 nm y 520 nm como excitación y emisión respectivamente.

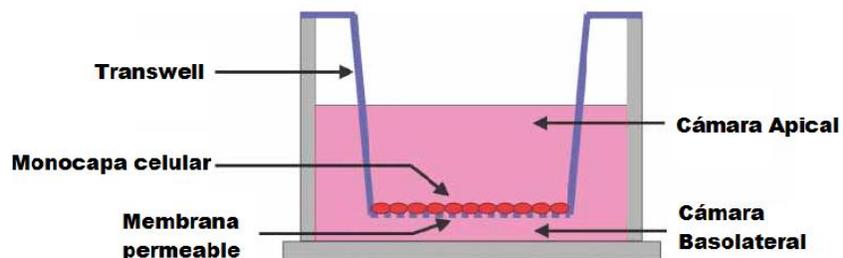


Figura 6. Esquema de un pozo en el sistema transwell utilizado para cuantificar el proceso de permeabilidad en la monocapa de la línea celular HMEC-1. Este sistema está conformado por dos cámaras una cámara apical (sobre la cual se forma la monocapa), y una cámara basolateral que se utiliza para mantener hidratada a las células o la recolección del FITC-dextran.

VII. RESULTADOS

8.1 Amplificación, purificación y titulación viral

La amplificación viral (DENV-2 NGC) se llevó a cabo en células de riñón de mono (LLC-MK2). El efecto citopático (formación de sincicios) fue observado entre los 11 días post-infección (PI). El título viral que se obtuvo del sobrenadante fue de 7.5×10^5 UFP/mL (Figura 7). Este título fue el que se utilizó para realizar los ensayos posteriores.

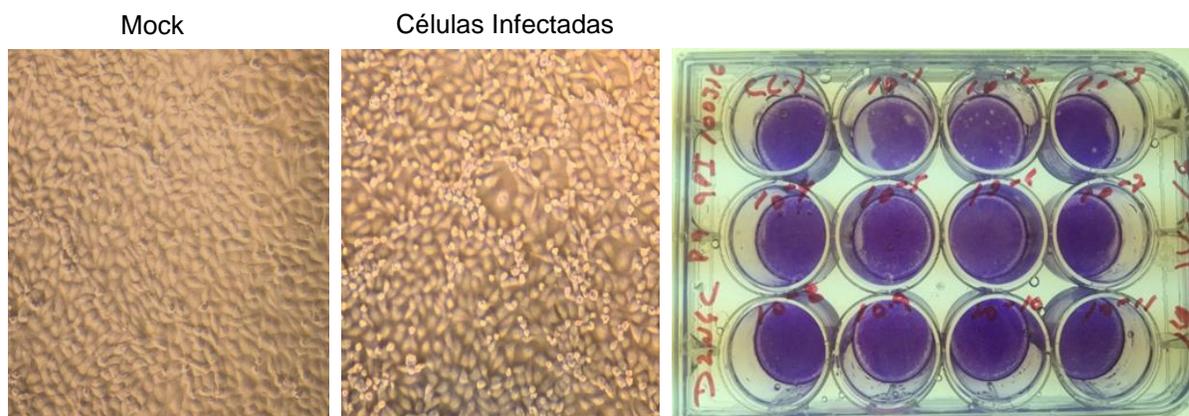


Figura 7. Amplificación y titulación por placa lítica de virus Dengue. Cultivo celular de línea celular LLC-MK2 células sin infectar (Mock) y células infectadas 11 días PI. Placa utilizada para la titulación viral, en el pozo con la dilución 10^4 , se puede observar el menor número de placas líticas de DENV.

8.2 Activación de plasminógeno por interacción con DENV

Para evaluar el efecto del plasminógeno activado por el virus se determinó la mejor concentración viral para la formación de plasmina, esto se determinó con el uso de un sustrato cromogénico de la plasmina. Se utilizaron diferentes concentraciones del virus, manteniendo constante la concentración de Plg y de sustrato cromogénico. Las concentraciones virales utilizadas fueron de 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 y 1×10^3 UFP/mL (Figura 8). La concentración viral de 1×10^6 al finalizar los 120 minutos obtuvo un porcentaje de activación máximo de $46 \pm 0.3\%$. Para la concentración de 1×10^5 a los 80 minutos se obtuvo la máxima activación del plasminógeno con un porcentaje del $99.02 \pm 0.58\%$ de activación. Las concentraciones virales de 1×10^4 y 1×10^3 mostraron un comportamiento similar,

alcanzando la máxima activación de Plg a los 110 minutos para ambos casos y con un porcentaje de activación de $83.53 \pm 1.2\%$ y $81.23 \pm 0.98\%$ respectivamente.

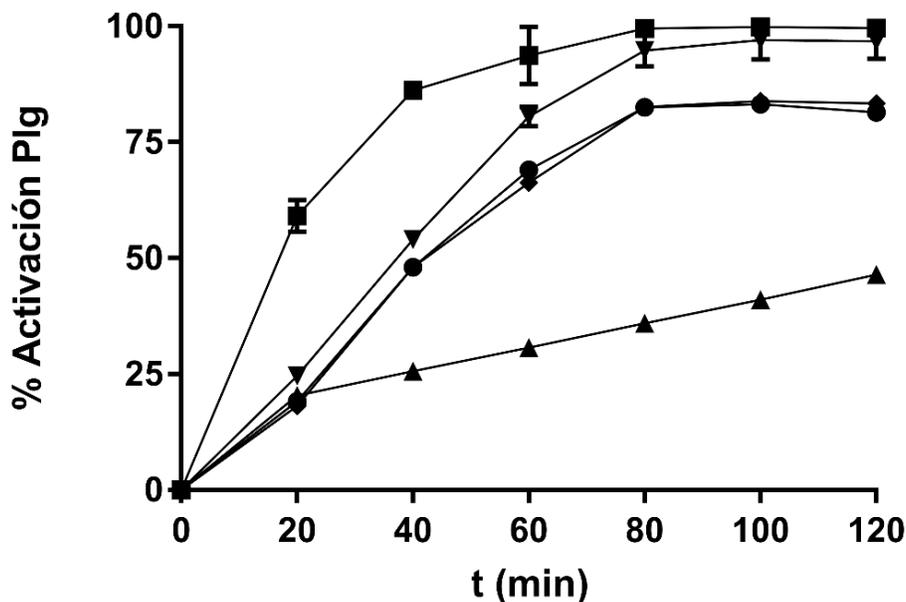


Figura 8. Curva de activación del plasminógeno por efecto del virus (porcentaje de activación). Como control positivo se utilizó estreptoquinasa (SK, ■). Se muestran los porcentajes de activación de las diferentes concentraciones virales de DENV 1×10^6 (▲) 1×10^5 (▼), 1×10^4 (◆) y 1×10^3 (●)

8.3 Evaluación de la degradación de la VE-Cadherina por plasmina

Para evaluar la degradación de la VE-Cadherina por efecto de la plasmina generada con la interacción del plasminógeno con el virus se colocaron 5 μ L de plasminógeno (20 U/mL) con el virus (1×10^5 UFP/mL) en un volumen final de 50 μ L en PBS e incubados a 37°C durante 90 minutos. A la mezcla, se añadió 0.5 μ g de VE-cadherina recombinante (R&D systems) y se dejó incubar durante 60 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo la mezcla fue homogenizada y fueron tomados 10 μ L de la mezcla y se le adicionaron 10 μ L de amortiguador de carga, se homogenizaron y se calentaron a 100°C durante 6 minutos. Las muestras fueron cargadas en un gel al 12%. El carril 2 corresponde a VE-Cadherina con un peso aproximado de 117 kDa. En el carril 3 se puede observar la degradación de la VE-Cadherina por la

plasmina generada con estreptoquinasa con un peso esperado entre los 85 -90 kDa. En el último carril se muestra el efecto que tiene la plasmina generada por interacción con el virus del Dengue sobre la VE-Cadherina recombinante, en donde se observa la degradación de VE-Cadherina con un peso aproximado entre los 85 – 90 kDa (Figura 9).

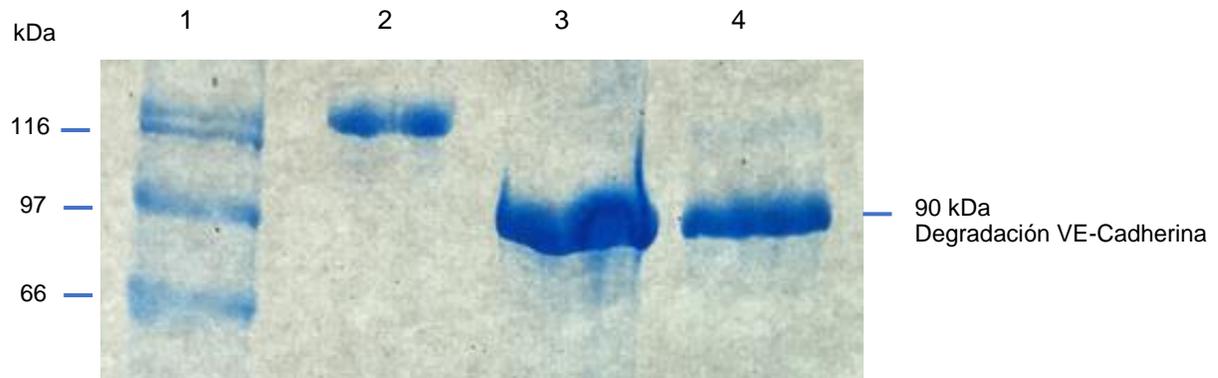


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% para evaluar la degradación de VE-Cadherina por efecto de la plasmina. Carril 1) Marcador de peso molecular 2) VE-Cadherina recombinante 3) Estreptoquinasa + Plasmina + VE-Cadherina 4) DENV + Plasmina + VE-Cadherina.

8.4 Inmunohistoquímica para la evaluación del efecto de la plasmina en VE-Cadherina en células HMEC-1

Encontramos que la plasmina degrada la proteína de unión VE-cadherina, por lo que nos propusimos evaluar el posible efecto que tendría la plasmina en células endoteliales en cultivo. Para el control, se utilizaron células que no fueron estimuladas. Para evaluar el efecto que tendría el virus en el endotelio vascular, se decidió trabajar con dos MOI diferentes de 1 y 3, como control positivo se utilizó plasmina generada con estreptoquinasa (SK-Plm). El primer punto realizado a las 6 horas se observa que por efecto del virus a las diferentes MOI, no hay diferencia con respecto a las células control. Mientras que para SK-Plm y DENV-Plm se aprecian diferentes puntos donde hay pérdida de punto de contacto en las células que conforman la monocapa endotelial. El segundo punto fue realizado con 12 horas de exposición al estímulo, donde se observan la pérdida de unión entre las células

a las diferentes MOI virales; se puede observar una mayor pérdida en las uniones celulares a las 12 horas tanto en la plasmina generada con SK como con la plasmina generada en con DENV, y se puede apreciar una relocalización de la proteína VE-Cadherina dentro del citoplasma de las células. A las 24 horas se observa el incremento en la permeabilidad en la monocapas que fueron expuestas a las diferentes MOI. Se observa un mayor efecto en la MOI 3 comparando con MOI 1; en ambas inmunohistoquímicas se observa una localización citoplasmática de VE-Cadherina. A las monocapas estimuladas con plasmina se aprecia la pérdida total de uniones celulares en ambos casos. El último punto analizado fue el de las 48 horas; con respecto al efecto que tiene la plasmina generada, por el virus o estreptoquinasa, no se aprecian uniones celulares desde el punto anterior, sin embargo, se puede apreciar un menor número de células, siendo más drástico el efecto en la plasmina generada con el virus. Mientras que a las monocapas expuestas únicamente a efecto del virus a una MOI 3 se observa el mayor efecto (Figura 10).

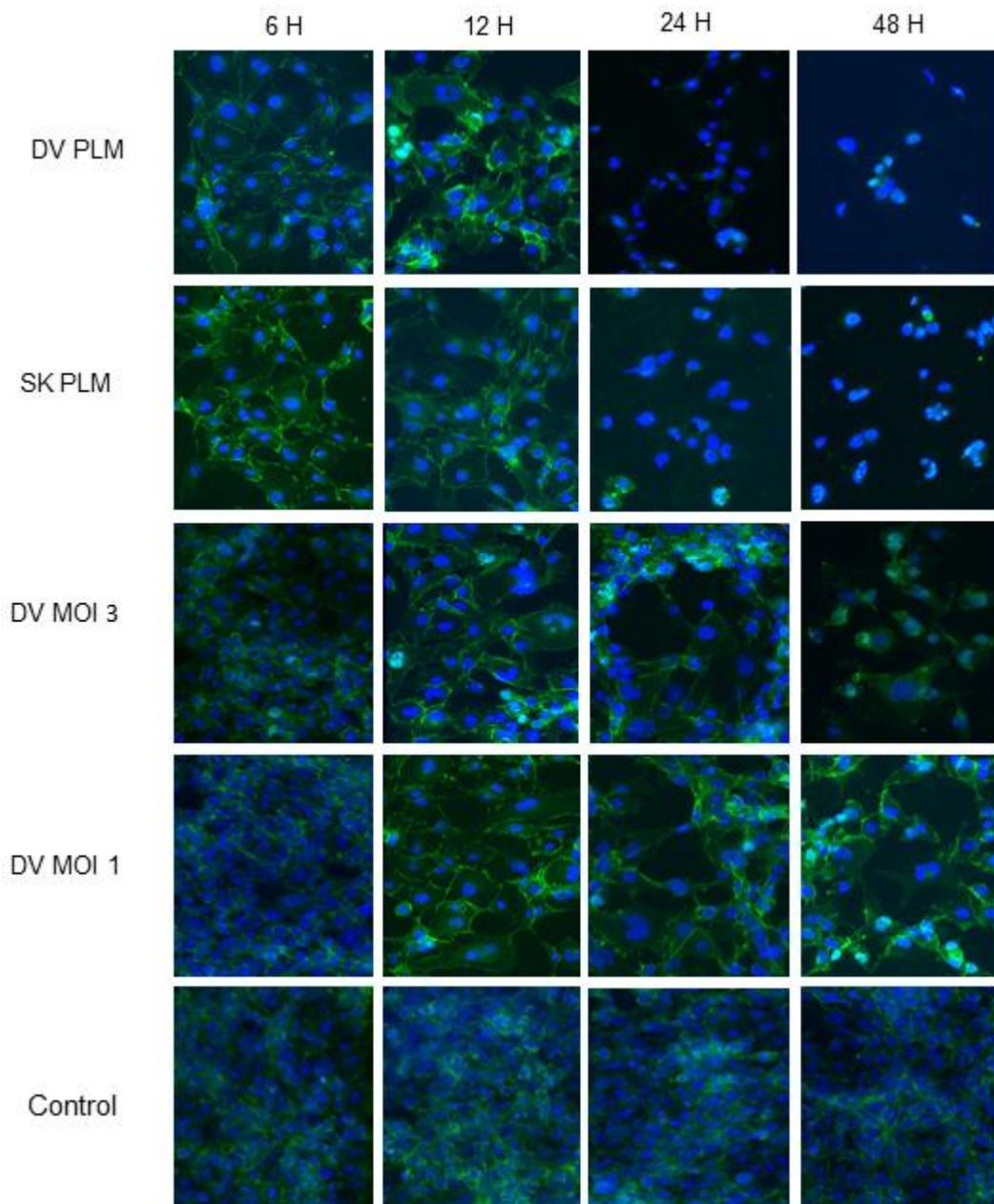


Figura 10. Inmunohistoquímica realizada en la línea celular HMEC-1 para evaluar el efecto de la plasmina generada con el virus del Dengue. La VE-Cadherina fue detectada con un anticuerpo acoplado a un cromóforo verde, mientras que los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Para evaluar el efecto del virus se utilizaron dos MOI distintas 1 y 3. Como control positivo se utilizó plasmina generada con estreptoquinasa.

8.5 Determinación el efecto de la plasmina sobre cultivo celular en sistema de dos cámaras o sistema transwell

Para determinar cuantitativamente la pérdida de barrera endotelial, se utilizó el sistema de dos cámaras ó transwell (Ver Fig. 6) en el cual, la cámara apical se forma la monocapa y en la cámara basolateral que se recolecta el marcador (FITC-dextran) de permeabilidad. Se evaluaron cuatro puntos de estimulación, utilizando células sin estímulo (SE), para evaluar la permeabilidad de la monocapa, para evaluar el efecto que tiene el virus sobre la monocapa se decidió trabajar con una MOI de 3, como control positivo se utilizó plasmina generada con estreptoquinasa. El primer punto evaluado fue de 6 horas el porcentaje de barrera obtenido fue de 13.44%, para células estimuladas con DENV MOI 3 fue de 14.5%, plasmina generada con SK 14.70% y por último para la plasmina genera con DENV de 16.95, sin mostrar diferencia estadística significativa. El segundo punto que corresponde a las 12 horas se obtuvo un porcentaje de barrera de 13.78%, para DENV MOI 3 fue de 16.88%, para SK-Plm se obtuvo un porcentaje de permeabilidad de 43.66% mientras que para DENV-Plm fue de 46.61, en donde se obtuvo una $p < 0.005$ (*) comparando con el efecto del virus a las 6 horas. A las 24 horas el porcentaje de barrera que se obtuvo fue de 13.54%, la permeabilidad generada por efecto del virus (MOI 3) fue de 25.97%, para SK-Plm se obtuvo un porcentaje de permeabilidad de 48.40% y de 54.75% para DENV-Plm, obteniendo un valor de $p < 0.005$ (**). A las 48 horas la monocapa formó un efecto de barrera del 13.77%, el porcentaje de permeabilidad alcanzado por el virus fue de 34.84%, mientras que por efecto de la plasmina generada por estreptoquinasa y por el virus fue de 90.88% y 95.09% respectivamente, donde estadísticamente se encontró una diferencia significativa entre los valores de la permeabilidad por efecto de la plasmina comparada con efecto del virus por si solo con un valor de $p < 0.005$ (***) (Figura 11).

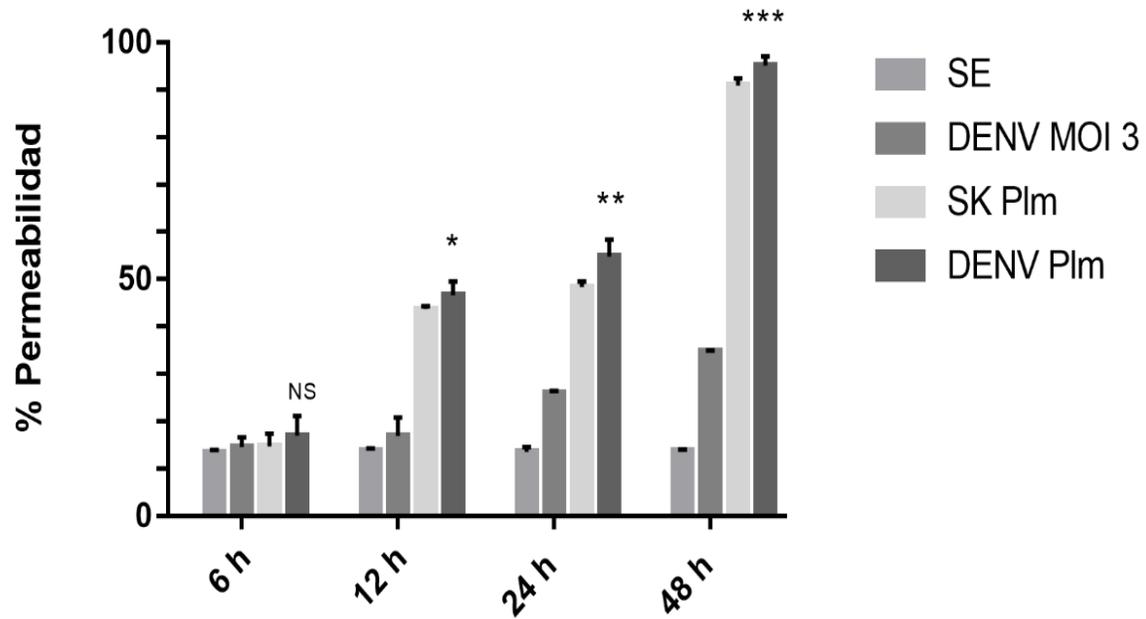


Figura 11. Porcentajes de permeabilidad evaluado mediante sistema transwell con un tamaño de poro de 0.4 μ L. Para determinar el porcentaje de permeabilidad se utilizó FITC-dextran de 40 kDa. Como control se utilizaron células que no recibieron estímulo (SE), y como controles se utilizó una MOI de 3 (DENV MOI 3) y plasmina generada con estreptoquinasa (SK-Plm) y las condiciones

IX. DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, en nuestro grupo (Monroy & Ruiz, 2000) reportamos, que el DENV puede unirse al plasminógeno e inducir su activación, lo cual es mediado por la proteína de envoltura.

Por otra parte, se ha descrito y demostrado que diferentes microorganismos tienen diferentes mecanismos para unirse y activar el plasminógeno humano. En el caso de *S. pneumoniae* se demostró que la plasmina que genera por acción de la estreptoquinasa facilita el proceso de migración a través del endotelio pulmonar mediado por la degradación de la proteína de uniones adherentes VE-Cadherina (Attali et al, 2008). Sin embargo, no hay reporte en la literatura de la posible participación del sistema plasminógeno-plasmina, enzima perteneciente a la familia de las proteasas de serina, sobre el endotelio o su participación en el establecimiento de la vasculopatía por Dengue.

La activación del zimógeno plasminógeno a la enzima activa plasmina por efecto del DENV fue reportado en el año 2000 (Monroy & Ruiz, 2000). Sin embargo, desconocíamos el posible efecto biológico de la plasmina en el contexto de la infección por DENV. En el presente trabajo se pudo confirmar el hallazgo anterior referente a la generación de plasmina en presencia del DENV. Inicialmente, se hizo una curva de activación del plasminógeno por efecto del virus DENV-2-NGC utilizando diferentes concentraciones virales. La mejor concentración para la activación del plasminógeno para estas condiciones fue de 1×10^5 UFP/mL con un porcentaje de activación del 99.02% con un tiempo de activación de 80 minutos, el cual fue el título utilizado para la realización de todos los ensayos *in vitro*. Sin embargo, las concentraciones virales de 1×10^4 y 1×10^3 , como se mencionó anteriormente alcanzaron un porcentaje de activación del plasminógeno de 83% y 81%, respectivamente (Figura 8). Estos resultados sugieren que, durante la infección, con diferentes títulos virales, hay activación del plasminógeno por interacción con el virus. Huang y colaboradores en 2001, demuestran un aumento del tPA, activador fisiológico del plasminógeno, lo que podría implicar que la

activación del plasminógeno pudiera ser un mecanismo asociado al establecimiento de la vasculopatía reportada en los casos severos de la enfermedad.

Establecidas las condiciones para la activación del plasminógeno por efecto del virus se evaluó la posible degradación de la VE-Cadherina por acción de la plasmina. En la literatura no existen reportes en relación a la degradación de VE-Cadherina por acción de la plasmina. Sin embargo, hay reportes de la degradación de VE-Cadherina por acción de otras proteasas de serina como la elastasa y la catepsina G de los neutrófilos, donde reportan que por acción de estas enzimas se produce un corte proteolítico en el extremo amino terminal entre los residuos 200 y 203 (Hermant et al., 2003). Resultando en la reducción del peso total de la VE-cadherina entre 25 - 30 kDa. La proteína recombinante VE-Cadherina en condiciones reductoras tiene un peso de 117 kDa (carril 2, figura 9), mientras que se observa una reducción en el peso molecular de la VE-cadherina de aproximadamente 25 kDa, resultando en una banda en los 90 kDa aproximadamente, en el carril tres (figura 9) que corresponde a nuestro control positivo, VE-Cadherina expuesta a la actividad de plasmina generada con estreptoquinasa y en el carril cuatro (figura 9) VE-Cadherina expuesta a la actividad de la plasmina generada por interacción con el virus Dengue. Este resultado podría implicar la acción directa de la plasmina en las uniones adherentes de células endoteliales favoreciendo el proceso de permeabilidad vascular descrita en el Síndrome de Choque por Dengue.

Para evaluar el efecto de la plasmina en las uniones adherentes, se llevaron a cabo ensayos de inmunohistoquímica con tiempos de exposición a la enzima de 6, 12, 24 y 48 h (figura 10). Para evaluar el efecto que tiene el DENV en células endoteliales utilizamos dos MOI diferentes de 1 y 3. Como control positivo utilizamos SK-Plm. Por efecto del virus a las seis horas no se observó efecto en la monocapa celular, mientras que para ambos estímulos con plasmina se observó que, en el primer tiempo, se pierden discretamente en diferentes puntos uniones célula- célula. A las doce horas de estimulación es evidente la pérdida de confluencia en las monocapas que fueron expuestas a la acción de la plasmina, mientras que para las monocapas

expuestas al efecto del virus, se observa el inicio de la pérdida de barrera, siendo mayor el efecto en la MOI 3. A las 24 horas, la pérdida de uniones adherentes, y de barrera endotelial, fue evidente en las monocapas celulares que fueron estimuladas con plasmina, en el control positivo y por efecto de la interacción con el DENV. A las 48 horas de exposición al estímulo de plasmina se observa únicamente la presencia de un menor número de células y pobre expresión de VE-Cadherina, este efecto se observó de igual manera tanto en el control positivo como en la monocapa expuesta a la plasmina generada por interacción con el virus. Con base en estos resultados, proponemos que la activación del plasminógeno participa y favorece el proceso de pérdida de barrera a nivel de la microvasculatura endotelial.

El sistema de dos cámaras ó transwell se hizo siguiendo los mismos puntos de la cinética de inmunohistoquímica y con base en los resultados anteriores se decidió trabajar únicamente con la MOI 3 (figura 11). El primer punto evaluado a las seis horas no mostró diferencia significativa entre los estímulos. A partir de las 12 horas, se observó una diferencia significativa en el aumento de la permeabilidad por la plasmina generada por interacción con el virus y por efecto del virus ($p < 0.005$). A las 24 y 48 horas el porcentaje de permeabilidad del control positivo (SK-Plm) mostró un comportamiento similar comparado con la plasmina generada con DENV. Sin embargo, hay una diferencia significativa entre el estímulo de plasmina generada con el virus y el virus a una MOI 3 ($p < 0.005$). El aumento discreto que se observa entre el punto de SK-Plm y la plasmina generada por interacción con el DENV, aunque estadísticamente no fue significativa, pero resulta de interés debido a que esta diferencia pudiera deberse a una sinergia de la acción de la plasmina y por efecto del virus, este último ha sido demostrado que favorece la permeabilidad en la misma línea celular entre las 72 y 96 horas.

El Dengue severo se caracteriza por la instalación abrupta de fuga de plasma del espacio intravascular al espacio intersticial, favorecida por un cambio en el fenotipo del endotelio vascular, en donde se presenta tanto un incremento en la permeabilidad del endotelio vascular, como en el fenómeno pro-adherente y pro-inflamatorio, a través de los receptores activados por proteasas (Huerta-Zepeda et al., 2008), desconociéndose la(s) proteasa(s) que participan en este proceso.

Nuestros resultados demuestran que durante la infección por DENV, la permeabilidad del endotelio vascular se favorece por el corte proteolítico de la principal proteína de las uniones adherentes, mediado por acción de la plasmina. Estos datos fueron determinados tanto en sistema transwell (método cuantitativo) como mediante inmunohistoquímica. Los presentes hallazgos, son importantes en el entendimiento de los mecanismos patogénicos durante la instalación del Síndrome de choque por dengue.

X. CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos en el presente trabajo, nos permiten proponer que la activación del plasminógeno en el contexto de la infección por DENV, tiene una acción directa en el endotelio vascular, mediante la degradación de la principal proteína de unión endotelial, VE-Cadherina. La activación del plasminógeno podría ser un mecanismo importante que favorece la pérdida de barrera en el endotelio vascular, que ha sido reportada en los casos severos de la enfermedad como el Síndrome de Choque por dengue, el cual presenta una letalidad muy elevada.

XI. PERSPECTIVAS

Se propone evaluar mediante ensayos *in silico* la interacción de la proteína E del virus con el plasminógeno humano con el objetivo de elucidar el posible mecanismo de interacción y/o activación del mismo y con esto proponer moléculas inhibitorias. Así como evaluar la posible participación de otras enzimas con capacidad proteolítica como la trombina durante la infección por DENV, las cuales podrían presentar un mecanismo similar a la plasmina en el endotelio vascular.

XII. BIBLIOGRAFÍA

Alexander N, Balmaseda A, Coelho ICB, Dimaano E, Hien TT, Hung NT, Jänisch T, Kroeger A, Lum CSL, Martinez E, Siqueira JB, Thuy TT, Villalobos I, Villegas Elci Willis B. 2011. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. *Tropical Medicine & International Health*, 16: 936-948 doi: 10.1111/j.1365-3156.2011.02793.x |

Attali C, Durmort C, Vernet T, Di Guilmi AM. 2008. The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediated transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infect Immun*. 76(11):5350-6 doi: 10.1128/IAI.00184-08

Attali C, Frolet C, Durmort C, Offant J, Vernet T, Di Guilmi AM. 2008. *Streptococcus pneumoniae* choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix. *Infect Immun* 76(2):466-76 doi: 10.1128/IAI.01261-07

Beltrán-Silva SL, Chacón-Hernández, Moreno-Palacios E, Pereyra-Molina JA. 2016. Clinical and differential Diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. *Revista Médica del Hospital General de México* doi: 10.1016/j.hgmx.2016.09.011

Berri F, Rimmelzwaan GF, Hans M, Albina E, Foucault-Grunenwald ML, Le VB, Vogelzang-van Trierum SE, Gil P, Camerer E, Martinez D, Lina B, Lijnen R, Carmeliet P, Riteau B. 2013. Plasminogen controls inflammation and pathogenesis of influenza virus infection via fibrinolysis. *PLoS Pathog* 9(3): e1003229 doi: 10.1371/journal.ppat.1003229

Cabello-Gutiérrez C, Manjarrez-Zavala ME, Huerta-Zepeda A, Cime-Castillo J, Monroy-Martínez V, Correa BB, Ruiz-Ordaz BH. 2009. Modification of the cytoprotective protein C pathway during Dengue virus infection of human endothelial vascular cells. *Thromb Haemost* 101(5):916-28 doi: 10.1160/TH08-04-0271

Caulfield AJ & Latham WW. 2012. Substrates of the plasminogen activator protease of *Yersinia pestis*. *Adv Exp Med Biol*. 954:253-60 doi: 10.1007/978-1-4614-3561-1-7_32.

Corrales-Aguilar & Hun-Opfer. 2012. New perspectives on dengue pathogenesis. *Acta méd. Costarric*. Vol 54 (2), April-June ISSN 0001-6002/2012/54/2/75-85

Cook SM, Skora A, Gillen CM, Walker MJ, McArthur JD. 2012. Streptokinase variants from *Streptococcus pyogenes* isolates display altered plasminogen activation characteristics – implications for pathogenesis. *Mol Microbiol*. 86(5): 1052-62 doi: 10.1111/mmi.12037

- Degen JL, Bugge TH, Goquen JD. 2007. Fibrin and fibrinolysis in infection and host defense. *J Thromb Haemost Suppl* 1:24-31 doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02519.x
- Deryugina EI, Quigley JP. 2012. Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme *J Biomed Biotechnol* 2012:564259 doi:10.1155/2012/564259
- Giannotta M, Trani M, Dejana E. 2013. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell*. 26(5):441-54 doi: 10.1016/j.devcel.2013.08.020
- González-Miguel J, Siles-Lucas M, Kartashev V, Morchón R, Simón F. 2016. Plasmin in Parasitic Chronic Infections: Friend or Foe? *Trends Parasitol* 32(4):325-35 doi: 10.1016/j.pt.2015.12.012
- Gubler DJ, Ooi EE, Kuno G, Vasudevan S, Farrar J. 2014. Dengue and dengue hemorrhagic fever.
- Guzman MG, Harris E. 2015. Dengue. *The lancet* Vol 385: 453-65 doi: 10.1016/S0140/6736 (14)60572-9
- Huerta-Zepeda A, Cabello-Gutierrez C, Cime-Castillo J, Monroy-Martínez V, Manjarrez-Zavala ME, Gutiérrez-Rodríguez M, Izaquirre R, Ruiz-Ordaz BH. 2008. Crosstalk between coagulation and inflammation during Dengue virus infection. *Thromb Haemost* 99(5):936-43 doi: 10.1160/TH-08-0438
- Huang YH, Liu CC, Wang ST, Lei HY, Liu HL, Lin YS, Wu HL, Yeh TM. 2001. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. *J Med Virol* 63(3):247-51 doi: 10.1002/1096-9071(200103)63:3
- Junjhon J, Edwards TJ, Utaipat U, Bowman VD, Holdaway HA, Zhang W, Keelapang P, Puttikhunt C, Perera R, Chipman PR, Kasinerk W, Malasit P, Kuhn RJ, Sittisombut N. 2010. Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles, *J Virol* 84(16):8353-8 doi: 10.1128/JVI.00696-10
- Kanlaya R, Pattanakitsakul SN, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V. 2009. Alterations in actin cytoskeletal assembly and junctional protein complexes in human endothelial cells induced by dengue virus infection and mimicry of leukocyte transendothelial migration. *J Proteome Res* 8(5):2551-62 doi: 10.1021/pr9000060g
- Korhonen TK, Haiko J, Laakkonen L, Järvinen HM, Westerlund-Wikström B. 2013. Fibrinolytic and coagulative activities of *Yersinia pestis*. *Front Cell Infect Microbiol* 3:35 doi: 10.3389/fcimb.2013.00035
- Kunamneni A, Abdelghani TT, Ellaiah P. 2007. Streptokinase: the drug of choice for thrombolytic therapy. *J Thromb Thrombolysis* 23(1): 9-23 doi: 10.1007/s11239-006-9011-x
- Lagendijk AK, Hogan BM. 2015. VE-cadherin in vascular development: a coordinator of cell signaling and tissue morphogenesis. *Curr Top Dev Biol*. 112:325-52 doi: 10.1016/bs.ctdb.2014.11.024

- Lampugnani MG, Dejana E, Giampietro C. 2017. Vascular endothelial (VE)-Cadherin, endothelial junctions and vascular disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* doi: 10.1101/cshperspect.a029322
- Law RH, Abu-Ssaydeh D, Whisstock JC. 2013. New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Curr Opin Structu Biol* 23(6):836-41 doi: 10.1016/j.sbi.2013.10.006
- Mondino A & Blasi F. Upa and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. 2004. *Trends Immunol* 25(8):450-5 doi: 10.1016/j.it.2004.06.004
- Monroy V and Ruiz-Ordaz BH. 2000. Participation of the Dengue virus in the fibrinolytic process. *Virus Genes* 21:3, 197-208 doi: 10.1023/A: 1008191530962
- Narvaez F, Gutierrez G, Angeles-Pérez MA, Elizondo D, Nuñez A, Balmaseda A, Harris E. 2011. Evaluation of the traditional and revised WHO Classifications of Dengue Disease Severity. *Plos Neglected tropical diseases* doi: 10.1371/journal.pntd.0001397
- Niessen CM, Gottardi CJ. 2008. Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta.* 1778(3):562-71 doi: 10.1016/j.bbamem.2007.12.015
- Peetermans M, Vanassche T, Liesenborghs L, Lijnen RH, Verhamme P. 2016. Bacterial pathogens activate plasminogen to breach tissue barriers and escape from innate immunity. *Crit Rev Microbiol* 42(6):866-82 doi: 10.3109/10400841X.2015.1080214
- Perera R & Kuhn RJ. 2008. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol* 11(4):369-77. doi: 10.1016/j.mib.2008.06.004. Epub 2008 Jul 31
- Rijken DC & Lijnen HR. 2009. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost* 7(1):4-13 doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03220
- Ross MH & Pawlina W. 2012. *Histología: Texto y atlas color biología celular y molecular 6ta Edición* Editorial Panamericana
- Sanderson-Smith ML, Dinkla K, Cole JN, Cork AJ, Maamary PG, McArthur JD. 2008. *FASEB J* 22(8):2715-22 doi: 10.1096/fj.07-105643
- Singh SK, Ruzek D. 2014. *Viral Hemorrhagic fevers.* CRC press Boca Raton, FL ISBN: 978-1-4398-8429-4
- Sun H. 2006. The interaction between pathogens and the host coagulation system. *Physiology (Bethesda)* 21:281-8 doi: 10.1152/physiol.00059.2005
- Syrovets T, Lunov O, Simmet T. 2012. Plasmin as a proinflammatory cell activator. *J Leukoc Biol* 92(3):509-19 doi: 10.1189/jlb.0212056
- Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza I. 2004. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamics reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol* 85(Pt 7):1801-13 doi: 10.1099/vir.0.19652-0

Torsten GL, Deicke C, Medina E. 2014. The role of coagulation/fibrinolysis during *Streptococcus pyogenes* infection. *Front Cell Infect Microbiol* 4:128 doi: 10.3389/fcimb.2014.00128

Vervaeke P, Vermeire K, Liekens S. 2015. Endothelial dysfunction in dengue virus pathology. *Rev Med Virol*. 25(1):50-67. doi: 10.1002/rmv.1818.

Xue Y, Bodin C, Olsson K. 2012. Crystal structure of the native plasminogen reveals an activation-resistant compact conformation. *J Thromb Haemost* 10:1385-96 doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04765.x.

Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. 2007. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* 7:518-28 doi: 10.1038/nrmicro1690

World Health Organization. 2009. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Traduced in La Paz, Bolivia. ISBN: 978924 1254787 1