

Reactividad plaquetaria y fenotipo inflamatorio inducido por la proteína SARS-CoV-2 de pico de longitud completa y su dominio RBD

Por Alan Cano-Méndez ^{1,2}, Nallely García-Larragoiti ¹, María Damián Vázquez ¹, Patricia Guzmán-Cancino ¹, Sandra López-Castañeda ¹, Alejandra Ochoa-Zarzosa ^{2,3} y Martha Eva Viveros-Sandoval ^{1,2}

¹ División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58000, México

² Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58000, México

³ Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina y Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58000, México

*Autor al que debe dirigirse la correspondencia. *Int. J. Mol.* **2022**, 23(23), 15191;

<https://doi.org/10.3390/ijms232315191>

Recibido: 30 Septiembre 2022 / Revisado: 24 Noviembre 2022 / Aprobado: 28 Noviembre 2022 / Publicado: 2 Diciembre 2022

(Este artículo pertenece al número especial [Avances en biología y funciones plaquetarias](#))

Resumen

Se ha reportado un estado de inmunotrombosis en COVID-19. Las plaquetas participan activamente en este proceso. Sin embargo, se sabe poco sobre la capacidad de las proteínas del virus SARS-CoV-2 para inducir actividad plaquetaria. El plasma rico en plaquetas (PRP) se incubó con proteína de longitud completa de pico y el dominio RBD en ensayos independientes. Se evaluó la activación plaquetaria a través de la expresión de P-selectina y la activación de la glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), determinada por citometría de flujo y la capacidad de las proteínas para inducir la agregación plaquetaria. Se determinaron concentraciones de biomarcadores inmunotrombóticos en sobrenadante PRP tratado con las proteínas. Determinamos que las proteínas de longitud completa de pico y el dominio RBD indujeron un aumento en la expresión de P-selectina y activación de GP IIb/IIIa ($p < 0,0001$). Observamos que las proteínas no indujeron la agregación plaquetaria, sino que favorecieron un estado proagregante que, en respuesta a dosis mínimas de colágeno, podría restablecer el proceso ($p < 0,0001$). Por otro lado, las proteínas virales estimularon la liberación de interleucina 6, interleucina 8, P-selectina y la fracción soluble del ligando CD40 (sCD40L), moléculas que favorecen un estado inflamatorio $p < 0,05$. Estos resultados indican que la proteína espiga de longitud completa y su dominio RBD pueden inducir la activación plaquetaria favoreciendo un fenotipo inflamatorio que podría contribuir al desarrollo de un estado inmunotrombótico.

Palabras llave:

activación plaquetaria; agregación plaquetaria; SARS-CoV-2; proteína espiga; Dominio RBD

1. Introducción

El Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2) es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo envuelto que causa la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) y se ha propagado por todo el mundo, causando predominantemente enfermedades respiratorias [1,2]. El genoma del SARS-CoV-2 codifica un total de 16 proteínas no estructurales (nsp 1-16) y cuatro proteínas estructurales: espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N) [3]. La proteína S se encuentra en la superficie del SARS-CoV-2, con un peso molecular de alrededor de 180 kDa, y pertenece a una familia de proteínas transmembrana de tipo I [4] organizada en dos subunidades: una N-terminal S1 y una C-terminal S2. La entrada viral depende de un compromiso entre el dominio de unión al receptor (RBD), ubicado en la subunidad S1 de la proteína, y la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor de entrada [5,6]. El RBD se compone de una secuencia de 200 aminoácidos y ahora se caracteriza como un sitio con un gran número de mutaciones relacionadas con todas las nuevas variantes del SARS-CoV-2 [7,8]. Los pacientes con

COVID-19 en estado crítico muestran síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), acompañado de un desequilibrio de hemostasia caracterizado por un proceso de coagulación activo y activación plaquetaria asociada con inflamación sistémica (tormenta de citoquinas) en un proceso definido como inmunotrombosis [9]. Las plaquetas son células anucleadas circulantes del torrente sanguíneo, tradicionalmente asociadas con procesos hemostáticos a través de su rápida respuesta al daño vascular [10]. Recientemente, las plaquetas se han posicionado como células centinela del sistema inmune debido a sus características estructurales, funcionales y generacionales únicas, y se ha demostrado que son mediadores clave en la trombosis y la inflamación [11,12,13,14]. Además, las plaquetas pueden interactuar directamente con los virus y participar en la respuesta inmune, ya que las plaquetas expresan una amplia gama de receptores que utilizan para interactuar con patógenos [15,16,17]. Se ha propuesto que diferentes receptores plaquetarios involucrados en el reconocimiento del SARS-CoV-2 conducen a un estado de hiperactividad plaquetaria y un aumento en la agregación y adhesión [9,18,19,20,21]. El papel de la proteína espiga del SARS-CoV-2 y su dominio en la interacción plaqueta-virus, así como su capacidad para promover el desarrollo de un estado proinflamatorio y protrombótico, requiere una mayor aclaración. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta plaquetaria a la proteína espiga y los dominios del SARS-CoV-2.

2. Resultados

2.1. La proteína de longitud completa del pico del SARS-CoV-2 y el dominio RBD inducen la activación plaquetaria

En primer lugar, evaluamos diferentes concentraciones (0,5, 1 y 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$) de la proteína espiga del SARS-CoV-2 de longitud completa (completa) y de su dominio RBD, y su capacidad para inducir la activación plaquetaria. Observamos la mayor activación celular a una concentración de proteína de 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Este resultado coincidió para ambas proteínas; Por lo tanto, los ensayos posteriores se realizaron utilizando esta misma concentración. La expresión media de fluorescencia de la P-selectina plaquetaria y la actividad GP IIb/IIIa se muestran en (Figura 1A, B). Luego, exploramos la capacidad de la proteína espiga de longitud completa y el dominio RBD para activar las plaquetas de una manera dependiente del tiempo. Los resultados de la expresión fluorescente de los marcadores de activación plaquetaria P-selectina y GP IIb/IIIa se muestran en (Figura 1C, D). En comparación con el control, la proteína espiga de longitud completa fue capaz de inducir la máxima expresión de marcadores de activación plaquetaria a los 30 min después de la estimulación ($p < 0,0001$). Curiosamente, el dominio RBD indujo la mayor expresión de estas proteínas a los 120 min, y se observó una diferencia estadística cuando se comparó con las plaquetas no estimuladas ($p < 0,0001$). El control negativo fue tratado en las mismas condiciones que los grupos experimentales pero sin la estimulación de proteínas virales. Finalmente, comparamos los resultados de expresión más altos de estos marcadores de activación para cada proteína y el porcentaje de células positivas para la expresión de marcadores de activación celular, con la expresión de estos biomarcadores inducidos por agonistas de activación conocidos, células no estimuladas y con los estímulos inducidos por el tampón de Tyrode utilizado como vehículo. Nuestros resultados muestran que el dominio RBD indujo una mayor expresión tanto de P-selectina como de GP IIb/IIIa que la epinefrina y el ADP, pero menor que el colágeno ($p < 0,0001$). Además, la expresión de los marcadores de activación generados por la proteína espiga de longitud completa fue similar a la inducida por la epinefrina, pero estadísticamente menor que el ADP y el colágeno ($p < 0,0001$). Estos resultados se muestran en (Figura 1E-H) y confirman que tanto la proteína espiga como el dominio RBD son capaces de activar las plaquetas.

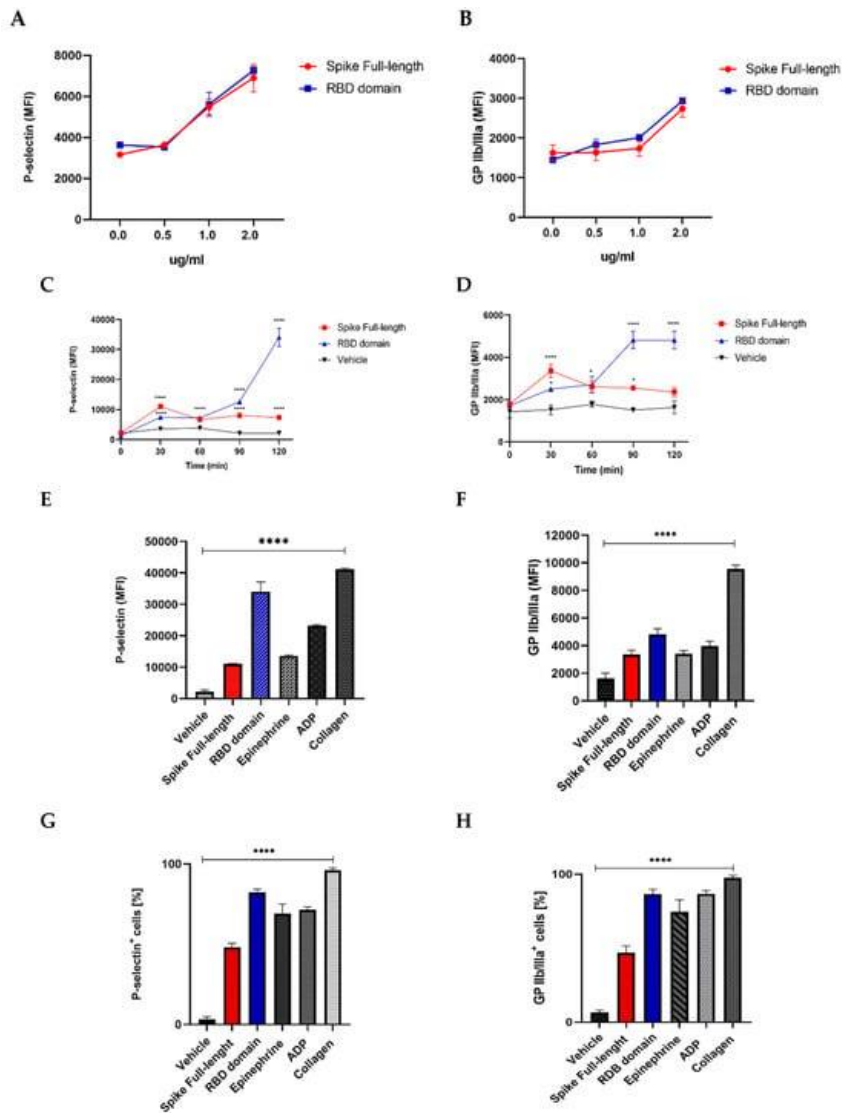


Figura 1. Estimulación plaquetaria con proteína espiga de longitud completa y dominio RBD. El plasma rico en plaquetas se incubó durante 60 min a 37 °C con espiga de longitud completa y dominio RBD a diferentes concentraciones. Expresión media de fluorescencia de marcadores de activación plaquetaria cuando se incuban con el espiga de longitud completa y dominio RBD (A, B). El plasma rico en plaquetas se incubó durante diferentes momentos a 37 °C con espiga de longitud completa y dominio RBD a una concentración de 2,0 µg/mL. El tampón de Tyrode se utilizó como control (C,D). Expresión de intensidad de fluorescencia media de P-selectina y GP IIb/IIIa, respectivamente, en la superficie de las plaquetas cuando se incuban con proteína de longitud completa de espiga, dominio RBD y tampón de Tyrode en diferentes momentos (E, F). Comparación entre la expresión máxima de los marcadores de activación P-selectina (CD62) y GP IIb/IIIa (PAC1). Proteína de pico de longitud completa durante 30 min (2,0 µg/ml), dominio RBD 120 min 2,0 µg/ml, tampón de Tyrode como vehículo y ADP 20 µM (20 min), epinefrina 100 µM (40 min) y colágeno 20 µM (30 min) como agonistas de activación conocidos (G,H). Comparación de la expresión máxima de marcadores de activación que indican los porcentajes de células P-selectina (G)- y GP IIb/IIIa (H)-positivas después de la estimulación con proteínas virales pico de longitud completa y dominio RBD, agonistas de activación conocidos y vehículo. Los valores de p se calcularon mediante ANOVA unidireccional y pruebas post-hoc de Tukey (n = 3). Datos presentados como Media ± DE. * p < 0.05, ****: diferencia estadística p < 0.0001.

2.2. La espiga de longitud completa promueve la agregación plaquetaria en presencia de dosis bajas de colágeno

Después de determinar que ambas proteínas eran capaces de inducir la activación plaquetaria, decidimos investigar si la proteína espiga o su dominio RBD eran capaces de inducir la agregación plaquetaria, otra función importante de las plaquetas.

Nuestros resultados demuestran que ni la proteína espiga completa ni el dominio RBD inducen la agregación plaquetaria por sí solos en comparación con los agonistas de agregación conocidos, que alcanzan porcentajes de agregación de más del 90% ($p < 0.0001$) (Figura 2A-H). Una vez que observamos que las proteínas indujeron activación pero no agregación, basándonos en resultados previos reportados en nuestro laboratorio por García-Larragoiti et al. [22] y en un trabajo previo realizado por Chiao-Hsuan et al. [23], decidimos evaluar si la hiperreactividad plaquetaria inducida por la estimulación de proteínas virales, además de dosis subumbrales de agonistas de agregación conocidos, podría restaurar la capacidad de agregación de plaquetas.

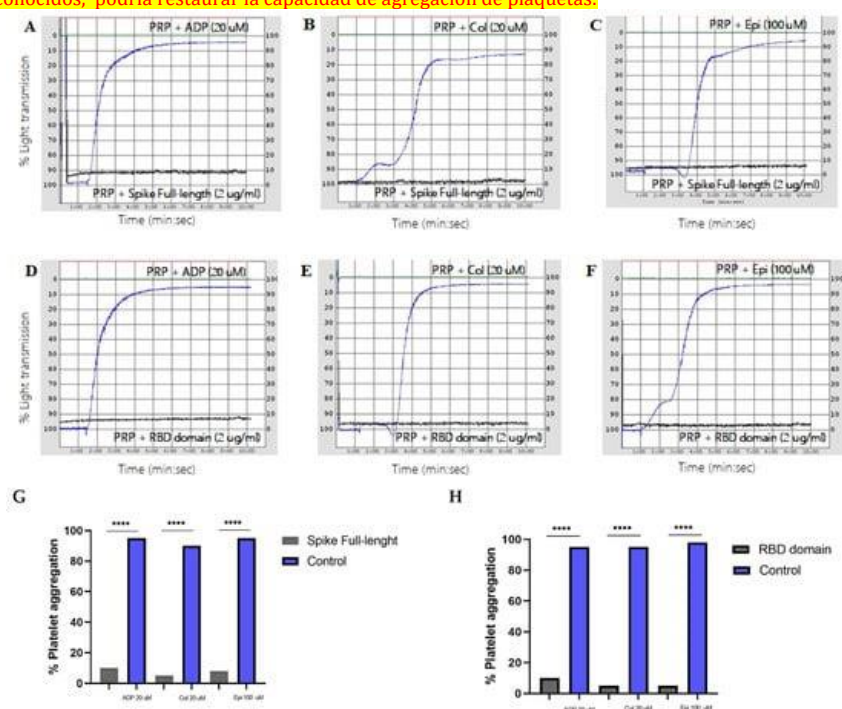


Figura 2. Determinación de la capacidad de agregación de plaquetas en respuesta a espigas de longitud completa y dominio RBD (A-C). El plasma rico en plaquetas (PRP) se incubó con proteína de longitud completa de pico (2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 30 min y se comparó con los controles positivos estimulados con una dosis de 20 μM ADP, 20 μM de colágeno y 100 μM de epinefrina (D-F). El PRP se incubó con dominio RBD (2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 120 min y se comparó con controles positivos estimulados con una dosis de 20 μM de ADP, 20 μM de colágeno y 100 μM de epinefrina (G,H). Comparación de la agregación plaquetaria inducida por agonistas conocidos en comparación con PRP tratado con proteínas virales. Los agonistas plaquetarios, pero no las proteínas, fueron capaces de inducir más del 80% de la agregación. Los valores de p se calcularon mediante ANOVA unidireccional y pruebas post-hoc de Tukey ($n = 3$). Datos presentados como Media \pm DE; : Diferencia estadística $p < 0,000$.

Curiosamente, nuestros resultados mostrados en la Figura 3 demuestran que dosis mínimas de colágeno fueron capaces de restablecer la agregación plaquetaria hasta en un 90% en células previamente tratadas con la proteína espiga de longitud completa ($p < 0,0001$) (Figura 3 B); sin embargo, esto no se observó en los ensayos a los que se agregaron ADP o EPI (Figura 3 A-C). Por otro lado, como se muestra en (Figura 3D-F), ninguna de las dosis mínimas de agonistas conocidos fue capaz de inducir agregados plaquetarios en aquellas células previamente estimuladas con el dominio RBD. Nuestros resultados sugieren que las proteínas de longitud completa del SARS-CoV-2

inducen un estado hiperreactivo en las plaquetas formando agregados cuando se exponen a factores de agregación.

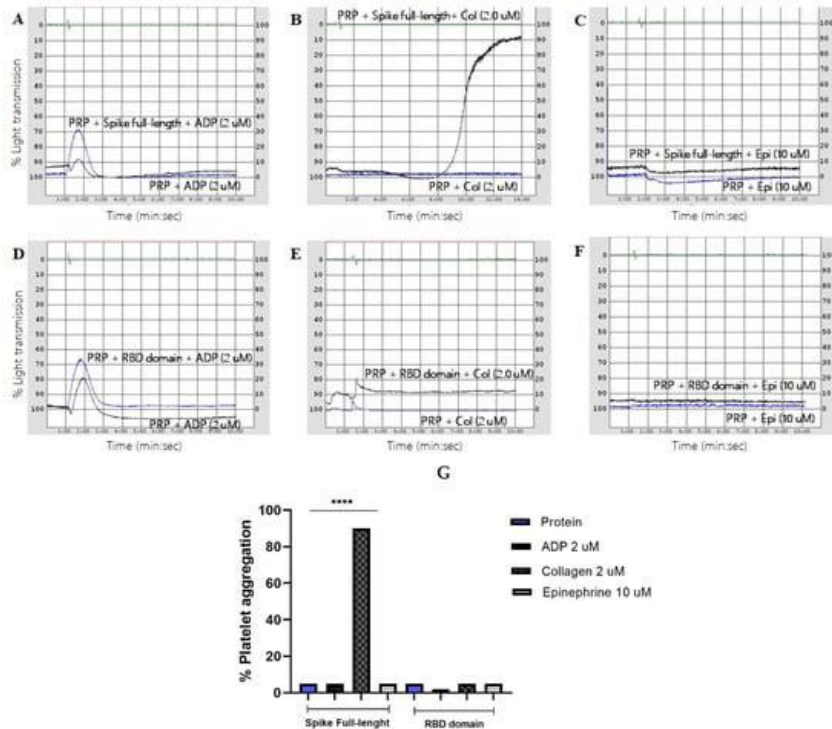
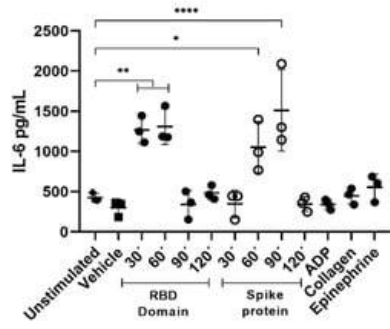
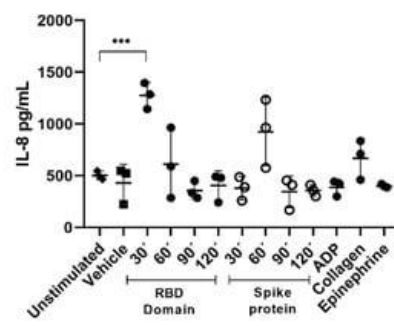
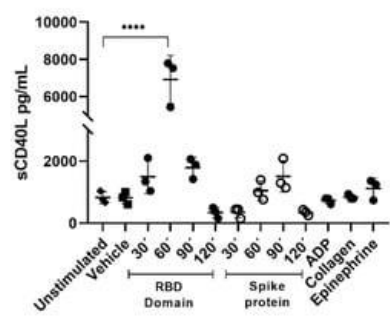
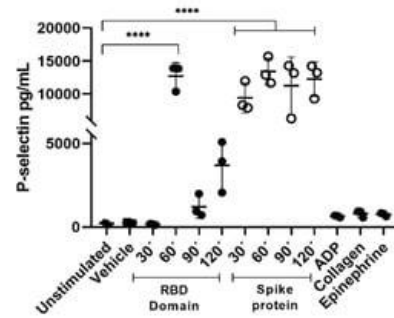


Figura 3. Determinación de la capacidad de agregación de plaquetas incubadas con espiga de longitud completa o dominio RBD en respuesta a dosis subumrales de agonistas de agregación conocidos (A-C). El PRP se incubó con proteína de longitud completa de pico (2,0 µg / ml) durante 30 min y se agregó una dosis de 2 µM de ADP, 2 µM de colágeno y 10 µM de epinefrina. Solo la dosis mínima de colágeno fue capaz de inducir la agregación de PRP en comparación con el control negativo (PRP + 2 µM ADP, 2 µM colágeno y 10 µM de epinefrina, respectivamente) (D-F). El PRP se incubó con dominio RBD (2,0 µg/mL) durante 120 min y se añadió una dosis de 2 µM de ADP, 2 µM de colágeno y 10 µM de epinefrina (G). Comparación de la agregación plaquetaria inducida por dosis mínimas de agonistas conocidos en PRP incubados con proteínas de pico o RBD de longitud completa en comparación con PRP agregado con dosis mínimas de agonistas de agregación conocidos. Ninguno de los agonistas conocidos fue capaz de inducir la agregación de PRP en comparación con el control negativo (PRP + 2 µM ADP, 2 µM colágeno y 10 µM de epinefrina, respectivamente). Los valores de p se calcularon mediante ANOVA unidireccional y pruebas post-hoc de Tukey (n = 3). Datos presentados como Media ± DE. : Diferencia estadística p < 0.0001.

2.3. La proteína espiga y su dominio RBD estimulan la liberación de factores proinflamatorios de las plaquetas

Con el fin de abordar el papel de las plaquetas en respuesta a las proteínas virales, decidimos evaluar la concentración de diferentes biomarcadores relacionados con la inflamación en el sobrenadante de PRP estimulado con cada proteína SARS-CoV-2 en diferentes momentos. Encontramos que la concentración de IL-6 fue mayor en PRP después de la estimulación durante 30 y 60 min (min) con el dominio RBD en comparación con PRP no estimulado (p < 0,01). Curiosamente, la proteína espiga de longitud completa muestra un aumento en la concentración de IL-6 a los 60 min (p < 0,05), presentando la selección principal a los 90 min (p < 0,0001) en comparación con los controles (Figura 4 A). Además, sólo RBD fue capaz de inducir la liberación plaquetaria de IL-8 después de un estímulo de 30 min (p < 0,001). sCD40L a los 60 min de estimulación con el dominio RBD mostró diferencias en la concentración en comparación con el control (p < 0,0001) (Figura 4B, C). Finalmente, observamos que ambas proteínas estimularon la liberación significativa de P-selectina, pero no la expresión de PSGL-1 (Figura 4D,E). Se observó una liberación significativa de P-selectina inducida por RBD a los 60 min (p < 0,0001), mientras que la proteína espiga de longitud

completa mantuvo concentraciones significativas durante 30, 60, 90 y 120 min, en comparación con el PRP no estimulado ($p < 0.0001$). Curiosamente, ninguno de los agonistas de activación conocidos como ADP, EPI o colágeno mostró un aumento en la concentración de biomarcadores relacionados con la inflamación. Estos resultados sugieren que las plaquetas pueden contribuir a la tormenta de citoquinas reportada en la infección por SARS-CoV-2 al mostrar un fenotipo proinflamatorio.

A**B****C****D**

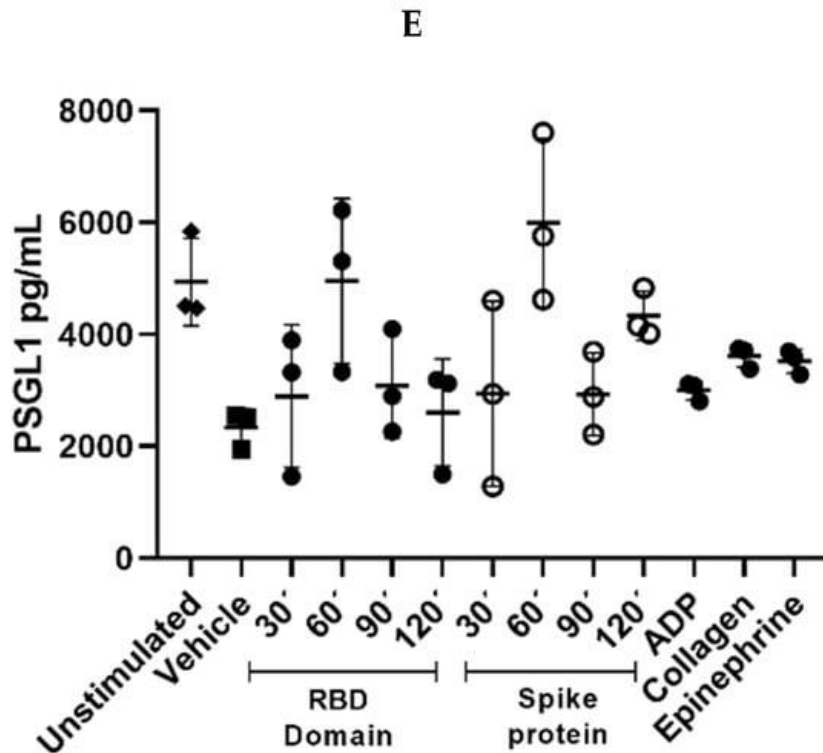


Figura 4. La proteína espiga y su dominio RBD estimulan la liberación de factores proinflamatorios de las plaquetas. Comparación de la concentración sobrenadante de (A) IL-6, (B) IL-8, (C) sCD40L, (D) P-selectina y (E) PSGL-1 en PRP incubado con proteína de longitud completa de pico (2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y dominio RBD (2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en diferentes momentos. Se utilizaron agonistas conocidos de agregación plaquetaria como controles de activación (20 μM ADP, 20 μM colágeno y 100 μM de epinefrina), el tampón de Tyrode como vehículo y PRP tratado en las mismas condiciones pero sin estímulos externos como control negativo. Los valores de p se calcularon mediante ANOVA unidireccional y pruebas post-hoc de Tukey ($n = 3$). Datos presentados como Media \pm DE. Diferencia estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

2.4. Las plaquetas contribuyen a un microambiente procoagulante cuando se estimulan con proteína espiga de longitud completa y dominio RBD

Los procesos de hemostasia y fibrinólisis se alteran en COVID-19 grave, y las plaquetas son una fuente importante de factores de coagulación y fibrinolíticos. Para medir si las plaquetas estimuladas por proteínas contribuyen a este desequilibrio, determinamos cinco biomarcadores diferentes relacionados con un estado protrombótico. Se encontró que las concentraciones del dímero D eran significativamente mayores en las plaquetas estimuladas con el dominio RBD durante 60 min ($p < 0,01$) y con la proteína de longitud completa a los 60 min ($p < 0,0001$) (Figura 5 A). Además, sólo la proteína espiga completa indujo un aumento significativo en las concentraciones de factor IX después de 60 min de estímulos ($p < 0,0001$). Sólo EPI mostró incrementos de FIX ($p < 0,05$) (Figura 5B). Curiosamente, tanto la proteína espiga de longitud completa como el dominio RBD indujeron una liberación dependiente del tiempo de PAI-1, siendo 60 min el tiempo donde se encontraron las concentraciones más altas ($p < 0,0001$). (Figura 5C). No encontramos diferencias en TF y tPA en ningún momento (Figura 5D,E). Estos resultados indican que las plaquetas liberan factores de coagulación que contribuyen a un estado protrombótico cuando se exponen a un insulto inmune, como el reportado en COVID-19.

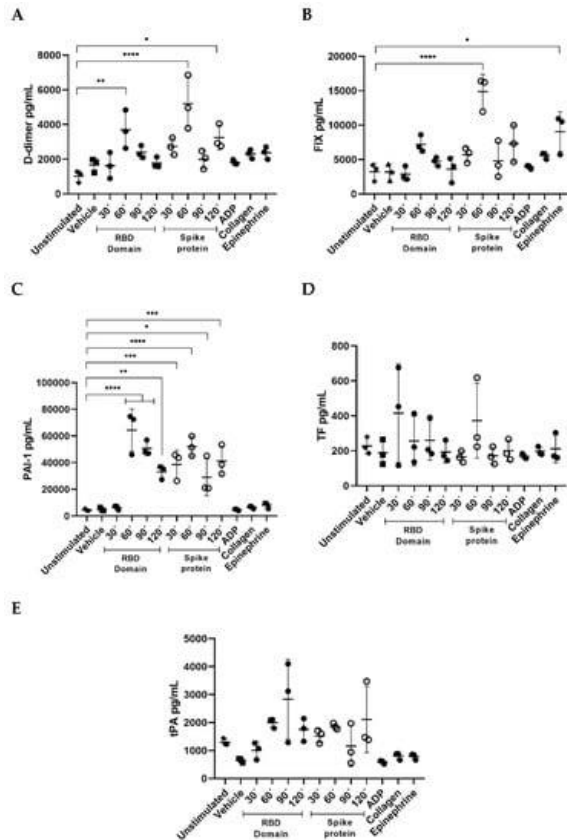


Figura 5. La proteína espiga y su dominio RBD estimulan la liberación de factores proinflamatorios de las plaquetas. Comparación de la concentración sobrenadante de (A) dímero D, (B) FIX, (C) PAI-1, (D) TF y (E) tPA en PRP incubado con proteína de longitud completa de pico (2.0 $\mu\text{g/ml}$) y dominio RBD (2.0 $\mu\text{g/ml}$) en diferentes momentos. Se utilizaron agonistas conocidos de agregación plaquetaria como controles de activación (20 μM ADP, 20 μM colágeno y 100 μM de epinefrina), el tampón de Tyrode como vehículo y PRP tratado en las mismas condiciones pero sin estímulos externos como control negativo. Los valores de p se calcularon mediante ANOVA unidireccional y pruebas post-hoc de Tukey ($n = 3$). Datos presentados como Media \pm DE. Diferencia estadística * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

3. Discusión

Las plaquetas se pueden encontrar en grandes cantidades en la sangre periférica, y debido a sus características funcionales, estas células pueden desempeñar un papel importante en la respuesta inmune. El recuento de plaquetas en COVID-19 varía según la gravedad de la enfermedad. La trombocitopenia grave rara vez se informa en pacientes con COVID-19 y se correlaciona con una mayor morbilidad / mortalidad [24]. Además, se ha detectado trombocitopenia leve en la mayoría de los casos. Esta caída en el recuento de plaquetas puede estar relacionada con un empeoramiento del estado trombotico [25,26]. Sin embargo, la información sobre la capacidad de las proteínas estructurales y sus dominios para activar las plaquetas no está del todo clara. Con respecto a la interacción de estas proteínas virales con las plaquetas en este estudio, demostramos mediante citometría de flujo que la proteína de pico de longitud completa y RBD pueden inducir la activación y desgranulación plaquetaria. Inicialmente, observamos que la proteína espiga de longitud completa y el dominio RBD indujeron la mayor activación plaquetaria a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Zhang et al., quienes también utilizaron esta concentración para realizar ensayos de estimulación plaquetaria con proteína espiga y la subunidad

S1 de la proteína [20]. Tanto la proteína completa como su dominio fueron capaces de inducir una alta expresión de P-selectina y la glicoproteína IIb/IIIa, marcadores conocidos de desgranulación y activación plaquetaria, respectivamente [10,27]. Grobbelaar et al. informaron previamente que la subunidad de pico 1 (S1) del SARS-CoV-2 puede inducir resistencia a la fibrina a la fibrinólisis e inducir la activación plaquetaria, contribuyendo a la formación de coágulos [28]. **Somos uno de los primeros grupos en reportar la capacidad del dominio RBD para inducir la activación plaquetaria.**

Sin embargo, no hay consenso sobre la hipótesis de que la activación plaquetaria en el SARS-CoV-2 se deba al receptor ACE2 [20,21,29,30,31]. **Se ha informado que las plaquetas expresan ACE2 y que la unión a la proteína espiga induce la activación plaquetaria y la desgranulación con el aumento de la expresión superficial de P-selectina. Además, también se ha informado de la expresión de GP IIb/IIIa inducida por viriones SARS-CoV-2, que contribuye a una mayor trombosis en COVID-19 [20].** Por otro lado, otros grupos han propuesto diferentes mecanismos de activación plaquetaria en COVID-19 basados en la expresión de EMMPRIM plaquetaria (CD147) [21], mecanismos independientes de ACE2 [29,30] y la presencia de glicosilación aberrante en anticuerpos contra espiga [31]. **Nuestros resultados confirman que la proteína espiga de longitud completa y el RBD participan activamente en la inmunopatogénesis del SARS-CoV-2 al inducir la activación y desgranulación plaquetaria. Este proceso puede estar mediado no solo por un receptor, sino por la participación de diferentes proteínas de la membrana de la superficie plaquetaria.** Otros estudios de acoplamiento molecular pueden ser útiles para evaluar la variedad de posibles receptores en la superficie de la membrana plaquetaria a la proteína espiga y el dominio.

La fisiología plaquetaria indica que la activación es seguida por un proceso de agregación que contribuye a la formación de microtrombos. Para abordar si las proteínas pueden inducir agregados plaquetarios, incubamos las plaquetas con las proteínas SARS-CoV-2. Nuestros resultados de agregación indican que estas proteínas no pueden inducir la agregación de plaquetas, pero informamos que las plaquetas que se incubaron con proteína de pico de longitud completa y se estimularon con dosis bajas de colágeno recuperaron la capacidad de agregación. Esto concuerda con los resultados de Zhang et al., que mostraron que las células prestimuladas con la proteína espiga o sus subunidades inducen un estado hiperreactivo en las plaquetas que puede agregarse cuando se agregan dosis bajas de agonistas conocidos [20]. Además, existe evidencia de que las respuestas de las plaquetas a los agonistas de agregación conocidos difieren según el agonista y la dosis utilizada [32,33]. Las diferencias en la inducción del fenotipo plaquetario por viriones, proteínas o dominios pueden deberse a alteraciones en el proteoma celular, lo que puede explicar por qué observamos la recuperación de la agregación cuando se utiliza un agonista fuerte como el colágeno. Este comportamiento ha sido reportado previamente con otras proteínas virales. García-Larragoiti et al. encontraron que la proteína no estructural 1 (NS1) del virus del dengue induce reactividad plaquetaria que favorece la formación de agregados plaquetarios cuando se agregan dosis bajas de epinefrina [22].

La hiperactivación de las plaquetas en la infección por SARS-CoV-2 no solo puede contribuir al riesgo trombótico, sino también al proceso de inflamación. Los pacientes con COVID-19 con peores resultados presentan altos niveles plasmáticos de citoquinas inflamatorias y factores protrombóticos [33,34]. Las plaquetas representan una rica fuente de estos factores, ya que contienen gránulos con grandes cantidades de moléculas que participan en procesos inflamatorios y de hemostasia. Nuestros resultados demuestran que la proteína espiga de longitud completa y su dominio RBD promueven la liberación de factores proinflamatorios de una manera dependiente del tiempo. Se encontraron diferencias en la respuesta plaquetaria al comparar un insulto inflamatorio con un estímulo agregador. Esto puede ser regulado por vías de señalización activadas por las plaquetas de acuerdo con el estímulo que induce su activación [35]. Se sabe que la cinética y concentración de moléculas liberadas por las plaquetas dependen del agonista de activación utilizado, así como de la concentración de las mismas. Las diferencias en la cantidad de estas biomoléculas liberadas pueden estar relacionadas con un proceso de desgranulación selectiva donde se almacenan, y nuestros resultados contribuyen a la hipótesis de la presencia de distintas subpoblaciones de gránulos de α en las plaquetas [36,37]. Por otro lado, nuestros resultados son similares a los encontrados por van Holten et al., quienes observaron mediante inmunoensayos y ensayos proteómicos que no existe un perfil de liberación homogéneo del contenido granular plaquetario. Más bien, es un proceso heterogéneo que depende de las características del agonista de activación utilizado [38]. Las variaciones en las concentraciones de factores inflamatorios trombóticos liberados por las plaquetas después de la estimulación con proteínas virales conocidas y agonistas de agregación pueden estar asociadas con diferentes aspectos. La vida media de algunos de estos factores es de solo unos

minutos. La desnaturalización posterior de estos factores puede estar mediada por mecanismos enzimáticos. Otro factor importante es la posible presencia de receptores de citoquinas solubles, generados por la escisión proteolítica de los receptores de membrana tras la activación de las células que los expresan. Estos receptores actúan como inhibidores competitivos de estos factores, disminuyendo su concentración [39]. **En esta área, informamos que las proteínas SARS-CoV-2 inducen la liberación de factores antifibrinolíticos y protrombóticos por las plaquetas. Estos resultados confirman que las proteínas virales en COVID-19 son capaces de inducir un fenotipo proinflamatorio y procoagulante en las plaquetas que puede contribuir a un proceso inmunotrombótico. Nuestro resultado coincide con trabajos previamente reportados donde las plaquetas mostraron un fenotipo procoagulante en COVID-19 [20,36,40].** Por otro lado, se ha reportado la respuesta diferencial de las plaquetas a otros virus. Assinger et al. demostraron que la interacción citomegalovirus-plaquetaria humana indujo una respuesta proinflamatoria y proangiogénica [41].

En conclusión, en este trabajo demostramos la capacidad de las plaquetas para participar activamente en la respuesta inmune contra las proteínas estructurales del SARS-CoV-2. Estos resultados mantienen el papel de las plaquetas en el desarrollo de un estado proinflamatorio y procoagulante.

Encontramos que las plaquetas tienen una respuesta de liberación de contenido granular que es diferencial según los estímulos recibidos. La respuesta de las plaquetas dirigida contra el estímulo viral también favorece la actividad de otras plaquetas, perpetuando esta respuesta. Nuestros resultados confirman que las plaquetas son células importantes en la respuesta contra agentes patógenos; Sin embargo, es importante llevar a cabo más estudios sobre la respuesta fisiológica de las plaquetas a los agentes patológicos frente a los desafíos inmunológicos que surgen constantemente en la actualidad.

4. Materiales y métodos

4.1. Proteínas de espiga de longitud completa y dominio RBD del SARS-CoV-2

La proteína completa recombinante SARS-CoV-2 fue proporcionada por Bio Vision Human CellExp (Waltham, MA, EUA). Cat # P1525, Tamaño: P1525-50 SARS-CoV-2 Spike protein, y la proteína SARS-CoV-2 Spike RBD fue proporcionada por GenScript (Piscataway, NY, EUA). Cat # Z03491 SARS-CoV-2 proteína de pico (RBD, mFc Tag). **

4.2. Recogida de muestras de sangre

La sangre humana entera se obtuvo de voluntarios sanos por venopunción limpia después de firmar el formulario de consentimiento informado. Los donantes sanos fueron individuos dentro de un rango normal del índice de masa corporal que no estaban tomando ningún tipo de medicamento y no mostraron ningún hallazgo anormal en las pruebas de química sanguínea y hematológicas de rutina. Todos los experimentos se realizaron en donantes que no presentaron exposición previa al SARS-CoV-2, exposición previa de al menos 1 año o exposición a vacunas contra el SARS-CoV-2, para garantizar la ausencia de anticuerpos contra el virus o sus proteínas virales que podrían interferir con los ensayos de estimulación plaquetaria. La sangre se obtuvo por venopunción limpia y el primer tubo (2 ml) de sangre se descartó para asegurar la precisión de la prueba de plaquetas. Las muestras se recolectaron en tubos vacutainer con solución de citrato de sodio al 3,2% (0,109 mol/L) como anticoagulante (Becton Dickinson) y se procesaron dentro de las 4 h posteriores a la recolección.

4.3. Aislamiento de plasma rico en plaquetas

El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo por centrifugación a $100\times g$ durante 10 min a temperatura ambiente (RT). El sobrenadante se recogió cuidadosamente para evitar interrumpir la capa leucocitaria y se dejó reposar durante 30 minutos en la oscuridad antes del análisis por citometría de flujo.

4.4. Estimulación plaquetaria con Spike SARS-CoV-2 y dominio RBD

El plasma rico en plaquetas se ajustó a una concentración de 1×10^7 con tampón de Tyrode para mantener la integridad de las plaquetas. Se incubaron directamente con la proteína espiga de longitud completa del SARS-CoV-2 y RBD para diferentes concentraciones (0,5, 1,0 y 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para determinar la mejor concentración de proteína para estimular las plaquetas. Posteriormente, el PRP se estimuló con proteínas virales a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante un mínimo de 30 min a un máximo de 120 min a una temperatura de 37 °C en ensayos individuales. La activación plaquetaria

Comentado [MI1]: Un estado procoagulante es conocido como hemoaglutinación, <https://sdpt.net/acncovid19/Respuesta%20inflamatoria%20en%20relaci%C3%B3n%20con%20COVID-19%20y%20otros%20fenotipos%20protromb%C3%B3ticos.pdf> el hecho también es atribuido este estado procoagulante o de hemoaglutinación por la proteínas del dominio prionico tal como el fibrinogeno amiloide, [https://sdpt.net/acncovid19/Un papel central para los microco%C3%A1gulos de fibrina amiloide en COVID_P ASC largo_or%C3%ADgenes e implicaciones terap%C3%A9uticas\[1\].pdf](https://sdpt.net/acncovid19/Un papel central para los microco%C3%A1gulos de fibrina amiloide en COVID_P ASC largo_or%C3%ADgenes e implicaciones terap%C3%A9uticas[1].pdf) Proteína espiga del SARS-CoV-2 en la patogénesis de enfermedades similares a los priones <https://sdpt.net/acncovid19/Prote%C3%ADna%20espiga%20del%20SARS-CoV-2%20en%20la%20patog%C3%A9nesis%20de%20los%20priones%20similares%20a%20los%20priones%20Enfermedades.pdf>

se confirmó mediante la activación del complejo heterodimérico GP IIb/IIIa (PAC1-FITC) y la expresión de P-selectina (CD62-PE) determinada por citometría de flujo. El sobrenadante se obtuvo después de la estimulación y se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso para la determinación de biomarcadores inmuntrombóticos. Los ensayos se diseñaron en base a estudios publicados previamente utilizando diferentes concentraciones de proteína de longitud completa de pico del SARS-CoV-2, sus dominios y subunidades, así como diferentes tiempos de incubación [20,21,28,42].

4.5. Ensayos de citometría de flujo

CD41/PECy7 (BioLegend Cat. No. 303718) se utilizó como marcador de identidad para plaquetas, PAC-1/FITC (BioLegend Cat. No. 362804) para la glicoproteína GP IIb/IIIa y CD62/PE (BioLegend Cat. No. 304906) para P-selectina se utilizaron como marcadores de activación. IgG1 k (BioLegend Cat. No. 400125), FITC Mouse IgM k Isotype (BioLegend Cat. No. 401605) y Mouse IgG1 k Isotype (BioLegend Cat. No. 400111) se utilizaron como control de isotipo, respectivamente. La estrategia de compuerta de las poblaciones celulares se realizó de acuerdo con lo informado previamente por el grupo de investigación en García-Larragoiti et al. [22]. Se utilizaron condiciones de oscuridad y manipulación mínima durante el ensayo para evitar la activación externa de las plaquetas. Se utilizaron fosfato de adenosina di (ADP) ($20\text{ }\mu\text{M}$) durante 20 min, colágeno ($20\text{ }\mu\text{M}$) durante 30 min y epinefrina (EPI) ($100\text{ }\mu\text{M}$) durante 40 min como controles positivos de activación plaquetaria [27]. Las concentraciones se utilizaron siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor PAR/PAK II BIO/DATA CORPORATION (Horsham, PA, EUA). La adquisición se realizó en un CytoFLEX, BECKMAN COULTER (Brea, CA, EUA). Los resultados se analizaron utilizando FlowJo v 10.8.0. **

4.6. Determinación de biomarcadores inmuntrombóticos en sobrenadante estimulado plaquetariamente

Como se describió anteriormente, el PRP estimulado dentro de las proteínas virales durante diferentes momentos se recolectó cuidadosamente con una pipeta. Se utilizaron como controles ensayos separados de PPR tratados con ADP ($20\text{ }\mu\text{M}$) durante 20 min, colágeno ($20\text{ }\mu\text{M}$) durante 30 min, epinefrina ($100\text{ }\mu\text{M}$) durante 40 min, tampón de Tyrode y PRP no estimulado. Se analizó un panel de 10 biomarcadores trombótico-inflamatorios: Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), P-selectina, P-selectina ligando 1 (PSGL-1), sCD40L, dímero D, activador tisular del plasminógeno (tPA), inhibidor 1 del activador del plasminógeno tisular (PAI-1), factor tisular y factor IX de coagulación. La determinación de estos biomarcadores se realizó mediante citometría de flujo utilizando el BioLegend (San Diego, CA, EUA) LEGENDplex Kit TM Human Thrombosis Panel Standard siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor. Las muestras se leyeron en un CytoFLEX, BECKMAN COULTER. Brevemente, las muestras se incubaron con cuentas que diferían en tamaño durante 2 h. Cada grupo de cuentas se conjugó con anticuerpos específicos en su superficie que capturaron un analito específico. Después del lavado, se agregó un cóctel de anticuerpos de detección biotinilados durante 1 h, formando un complejo de detección entre el anticuerpo de detección de perla de captura-analito-. Finalmente, se añadió estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) y se incubó durante 30 min. Las muestras se llevaron al citómetro CytoFLEX para su análisis. **

4.7. Ensayos de agregación de transmisión de luz

Se obtuvo sangre total de donantes sanos que no presentaron exposición previa al SARS-CoV-2 o exposición previa de al menos 1 año en tubos con citrato de sodio (3,2%). El PRP se obtuvo en las condiciones descritas anteriormente y se incubó durante 30 min con la proteína espiga de longitud completa del SARS-CoV-2 y durante 120 min con RBD, ambos a una concentración de $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ en ensayos separados. El plasma pobre en plaquetas (PPP) se separó por centrifugación a $2500\times g$ durante 15 min y se utilizó como un espacio en blanco. Posteriormente, se colocaron $0,5\text{ mL}$ del PRP previamente incubado con las proteínas SARS-CoV-2 y $0,5\text{ mL}$ de PRP no estimulado en la cubeta del agregómetro, que contiene una barra magnética siliconada, a una temperatura constante de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; los resultados se compararon con controles positivos (PRP + ADP $20\text{ }\mu\text{M}$, PRP + colágeno $20\text{ }\mu\text{M}$, PRP + epinefrina $100\text{ }\mu\text{M}$). Para investigar si el agregado de dosis mínimas de agonistas de agregación conocidos en plaquetas previamente tratadas con proteínas SARS-CoV-2 podría mejorar la agregación plaquetaria, se agregaron dosis de ADP ($2,0\text{ }\mu\text{M}$), colágeno ($2,0\text{ }\mu\text{M}$) y epinefrina ($10\text{ }\mu\text{M}$). Los ensayos se realizaron por triplicado. La transmisión de luz se midió en un agregador Chronolog 560ca (Chrono-log). Todos los datos fueron analizados con el software AGGRO/LINK8. *

4.8. Declaración de ética

Todos los estudios con donantes sanos fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" de la UMSNH número de registro 004/P/5/2021 y el Hospital General "Dr. Miguel Silva"; número de registro CEI/2021/III-269. Morelia, México.

4.9. Análisis estadístico

Las comparaciones entre dos grupos se realizaron con una prueba *t* no pareada. Se realizaron comparaciones de grupos múltiples mediante un análisis unidireccional de varianza. La prueba de Tukey se utilizó como una prueba post hoc para comparaciones por pares. Los datos que normalmente no se distribuían se analizaron mediante análisis estadístico no paramétrico. Todos los experimentos se repitieron de forma independiente tres veces. $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Todos los datos se presentaron como medias \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, EUA).

Contribuciones del autor

M.E.V.-S. diseñó la investigación; M.E.V.-S. y A.O.-Z. concibió y diseñó los experimentos; A.C.-M., N.G.-L. y M.D.-V. realizó los experimentos de citometría de flujo y análisis de datos; S.L.-C. participó en el diseño de la investigación y las aprobaciones éticas; A.C.-M., M.D.-V. y P.G.-C. diseñó y realizó experimentos de agregación plaquetaria; M.E.V.-S. y N.G.-L. análisis de datos realizados; A.C.-M. escribió el manuscrito original y M.E.V.-S., N.G.-L., S.L.-C.; y A.O.-Z. revisó y editó el manuscrito. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Financiación

Esta investigación fue financiada por CIC-UMSNH y CONACyT México en su convocatoria "Ciencia de Frontera: Paradigmas y controversias 2021", subvención número 320085. A. Cano-Méndez y P. Guzmán-Cancino son beneficiarios de becas CONACyT-México para estudiantes de posgrado. Los patrocinadores de este estudio son organizaciones públicas o sin fines de lucro que apoyan la ciencia en general y no tuvieron ningún papel en la recopilación, análisis o interpretación de los datos.

Declaración de la Junta de Revisión Institucional

El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Revisión Institucional y el Comité de Ética de la UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO. Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez". Código de protocolo CEI/2021/III-269, de 10 de marzo de 2021.

Declaración de consentimiento informado

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos involucrados en el estudio.

Declaración de disponibilidad de datos

No aplica.

Reconocimientos

R. Villa, D. Hernández-Hernández y A.G. Vargas-Ruiz Laboratorio de Trombosis, Departamento de Hematología y Oncología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

1. Hu, B.; Guo, H.; Zhou, P.; Shi, Z.-L. Características del SARS-CoV-2 y COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, págs. 19, 141–154. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. V'kovski, P.; Kratzel, A.; Steiner, S.; Stalder, H.; Thiel, V. Biología y replicación del coronavirus: implicaciones para el SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, 19, 155–170. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
3. Harrison, A.G.; Lin, T.; Wang, P. Mecanismos de transmisión y patogénesis del SARS-CoV-2. *Tendencias Immunol.* **2020**, 41, 1100–1115. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sternberg, A.; Naujokat, C. Características estructurales de la proteína de pico del SARS-CoV-2 del coronavirus: objetivos para la vacunación. *Life Sci.* **2020**, 257, 118056. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Krüger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T.S.; Herrler, G.; Wu, N.-H.; Nitsche, A.; et al. La entrada de células SARS-CoV-2 depende de ACE2 y TMPRSS2 y está bloqueada por un inhibidor de proteasa clínicamente probado. *Celda* **2020**, 181, 271–280.e8. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Guruprasad, L. Mutaciones de la proteína de pico del SARS CoV-2 humano. *Proteínas* **2021**, 89, 569–576. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Boehm, E.; Kronig, I.; Neher, R.A.; Eckerle, I.; Vetter, P.; Kaiser, L. Nuevas variantes del SARS-CoV-2: las pandemias dentro de la pandemia. *Clin. Microbiol. Infecta.* **2021**, 27, 1109–1117. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
8. Papanikolaou, V.; Chrysovergis, A.; Ragos, V.; Tsiambas, E.; Katsinis, S.; Manoli, A.; Papouliakos, S.; Roukas, D.; Mastroiannis, S.; Peschos, D.; et al. From Delta to Omicron: S1-RBD/S2 Mutation/Deletion Equilibrium in SARS-CoV-2 Defined Variants. *Generación* **2022**, 814, 146134. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
9. Rohlfing, A.-K.; Rath, D.; Geisler, T.; Gawaz, M. Plaquetas y COVID-19. *Hamostaseologie* **2021**, 41, 379–385. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
10. Linden, M.D. Fisiología plaquetaria. En *hemostasia*; Monagle, P., Ed.; Métodos en Biología Molecular; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2013; Volumen 992, págs. 13–30. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
11. Ali, R.A.; Wuescher, L.M.; Worth, R.G. Plaquetas: Componentes esenciales del sistema inmunológico. *Curr. Tendencias Immunol.* **2016**, págs. 16, 65–78. [[Google Académico](#)]
12. Kapur, R.; Zufferey, A.; Boilard, E.; Semple, J.W. Nouvelle Cuisine: Plaquetas servidas con inflamación. *J. Immunol.* **2015**, 194, 5579–5587. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Semple, J.W.; Italiano, J.E.; Freedman, J. Plaquetas y el continuo inmune. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, 11, 264–274. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Koupenova, M.; Clancy, L.; Corkrey, H.A.; Freedman, J.E. Plaquetas circulantes como mediadores de inmunidad, inflamación y trombosis. *Circ.* **2018**, págs. 122, 337–351. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Assinger, A. Plaquetas e infección: un papel emergente de las plaquetas en la infección viral. *Frente. Immunol.* **2014**, 5, 12. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Seyoum, M.; Enawgaw, B.; Melku, M. Plaquetas y virus de la sangre humana: mecanismo de defensa y papel en la eliminación de patógenos virales. *Trombón. J.* **2018**, 16, 16. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
17. Schrottmair, W.C.; Schmuckenschlager, A.; Pirabe, A.; Assinger, A. Plaquetas en infecciones virales: soldados valientes o caballos de Troya. *Frente. Immunol.* **2022**, 13, 856713. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
18. Barale, C.; Melchionda, E.; Morotti, A.; Russo, I. Fenotipo protrombótico en COVID-19: enfoque en las plaquetas. *Int. J. Mol.* **2021**, 22, 13638. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
19. Bury, L.; Camilloni, B.; Castronari, R.; Piselli, E.; Malvestiti, M.; Borghi, M.; KuchiBotla, H.; Falcinelli, E.; Petito, E.; Amato, F.; et al. Search for SARS-CoV-2 RNA in Platelets from COVID-19 Patients. *Plaquetas* **2021**, 32, 284–287. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
20. Zhang, S.; Liu, Y.; Wang, X.; Yang, L.; Li, H.; Wang, Y.; Liu, M.; Zhao, X.; Xie, Y.; Yang, Y.; et al. SARS-CoV-2 se une a la ECA plaquetaria para mejorar la trombosis en COVID-19. *J. Hematol. Oncol.* **2020**, 13, 120. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]

21. Maugeri, N.; De Lorenzo, R.; Clementi, N.; Antonia Diotti, R.; Criscuolo, E.; Godino, C.; Tresoldi, C.; Bio Angels para el Grupo de Estudio COVID-BioB; Bonini, C.; Clementi, M.; et al. Activación plaquetaria no convencional dependiente de CD147 provocada por el SARS-CoV-2 en COVID-19. *J. Trombón. Más haemost.* **2022**, *20*, 434–448. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
22. García-Larragoiti, N.; Kim, Y.C.; López-Camacho, C.; Cano-Méndez, A.; López-Castaneda, S.; Hernández-Hernández, D.; Vargas-Ruiz, Á.G.; Vázquez-Garcidueñas, M.S.; Reyes-Sandoval, A.; Viveros-Sandoval, M.E. Activación plaquetaria y respuesta de agregación a la proteína no estructural 1 y dominios del virus del dengue. *J. Trombón. Más haemost.* **2021**, *19*, 2572–2582. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Chao, C.H.; Wu, W.C.; Lai, Y.C.; Tsai, P.J.; Perng, G.C.; Lin, Y.S.; Yeh, T.M. La proteína no estructural 1 del virus del dengue activa las plaquetas a través del receptor 4 tipo Toll, lo que lleva a trombocitopenia y hemorragia. *PLoS Pathog.* **2021**, *15*, e1007625. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
24. Zhang, Y.; Zeng, X.; Jiao, Y.; Li, Z.; Liu, Q.; Ye, J.; Yang, M. Mecanismos implicados en el desarrollo de trombocitopenia en pacientes con COVID-19. *Trombón.* **2020**, *193*, 110–115. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yang, X.; Yang, Q.; Wang, Y.; Wu, Y.; Xu, J.; Yu, Y.; Shang, Y. Trombocitopenia y su asociación con la mortalidad en pacientes con COVID-19. *J. Trombón. Más haemost.* **2020**, *18*, 1469–1472. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lana, G.D.; Miller, J.L. El impacto de la enfermedad COVID-19 en las plaquetas y la coagulación. *Patobiología* **2021**, *88*, 15–27. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
27. Linden, M.D. Citometría de flujo plaquetario. En *hemostasia*; Monagle, P., Ed.; Métodos en Biología Molecular; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2013; Volumen 992, págs. 241–262. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
28. Grobbelaar, L.M.; Venter, C.; Vlok, M.; Ngoepe, M.; Laubscher, G.J.; Lourens, P.J.; Steenkamp, J.; Kell, D.B.; Pretorius, E. SARS-CoV-2 Spike Protein S1 induce fibrina (Ogen) resistente a la fibrinólisis: implicaciones para la formación de microcoágulos en COVID-19. *Biosci. Rep.* **2021**, *41*, BSR20210611. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
29. Koupenova, M.; Corkrey, H.A.; Vitseva, O.; Tanriverdi, K.; Somasundaran, M.; Liu, P.; Soofi, S.; Bhandari, R.; Godwin, M.; Parsi, K.M.; et al. SARS-CoV-2 inicia la muerte celular programada en plaquetas. *Circ.* **2021**, págs. 129, 631–646. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
30. Shen, S.; Zhang, J.; Colmillo, Y.; Lu, S.; Wu, J.; Zheng, X.; Deng, F. SARS-CoV-2 interactúa con plaquetas y megacariocitos a través del mecanismo independiente de ACE2. *J. Hematol. Oncol.* **2021**, *14*, 72. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
31. Adió, A.P.; Hoepel, W.; Mitchell, J.L.; Jégouic, S.; Loureiro, S.; Salvia, T.; Vidarsson, G.; Nouta, J.; Wuhler, M.; de Taeye, S.; et al. Aberrant Glycosylation of Anti-SARS-CoV-2 Spike IgG Is a Prothrombotic Stimulus for Platelets. *Sangre* **2021**, *138*, 1481–1489. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
32. Nicolai, L.; Leunig, A.; Brambs, S.; Kaiser, R.; Weinberger, T.; Weigand, M.; Muenchhoff, M.; Hellmuth, J.C.; Ledderose, S.; Schulz, H.; et al. La desregulación inmunotrombótica en la neumonía por COVID-19 se asocia con insuficiencia respiratoria y coagulopatía. *Circulación* **2020**, *142*, 1176–1189. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
33. Leopoldo, V.; Pereverzeva, L.; Schuurman, A.R.; Reijnders, T.D.Y.; Saris, A.; de Brabander, J.; van Linge, C.C.A.; Douma, R.A.; Chouchane, O.; Nieuwland, R.; et al. Las plaquetas están hiperactivadas pero muestran una reactividad reducida de la glicoproteína VI en pacientes con COVID-19. *Trombón. Más haemost.* **2021**, *121*, 1258–1262. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hottz, E.D.; Azevedo-Quintanilha, I.G.; Palhinha, L.; Teixeira, L.; Barreto, E.A.; Pão, C.R.R.; Righy, C.; Franco, S.; Souza, T.M.L.; Kurtz, P.; et al. La activación plaquetaria y la formación de agregados de monocitos plaquetarios desencadenan la expresión del factor tisular en pacientes con COVID-19 grave (La activación plaquetaria y la formación de agregados de monocitos plaquetarios desencadenan la expresión del factor tisular en pacientes con COVID-19 grave). *Sangre* **2020**, *136*, 1330–1341. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rex, S.; Beaulieu, L.M.; Perlman, D.H.; Vitseva, O.; Blair, P.S.; McComb, M.E.; Costello, C.E.; Freedman, J.E. La estimulación inmune versus trombótica de plaquetas regula diferencialmente las vías de señalización, las interacciones intracelulares proteína-proteína

- y la liberación de gránulos α . *Trombón. Más haemost.* **2009**, *102*, 97–110. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Italiano, J.E., Jr.; Battinelli, E.M. Selective Sorting of Alpha-Granule Proteins. *J. Trombón. Más haemost.* **2009**, *7*, 173–176. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 37. Sharda, A.; Flaumenhaft, R. El ciclo de vida de los gránulos plaquetarios. *F1000Research* **2018**, *7*, 236. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 38. van Holten, T.C.; Bleijerveld, O.B.; Wijten, P.; de Groot, P.G.; Diablos, A.J.; Barendrecht, A.D.; Merckx, T.H.; Scholten, A.; Roest, M. El análisis proteómico cuantitativo revela perfiles de liberación similares después de la estimulación específica de PAR-1 o PAR-4 de las plaquetas. *Cardiovasc. Res.* **2014**, págs. *103*, 140–146. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 39. Liu, C.; Chu, D.; Kalantar-Zadeh, K.; Jorge, J.; Young, H.A.; Liu, G. Citoquinas: de la importancia clínica a la cuantificación. *Adv. Sci.* **2021**, *8*, 2004433. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 40. Comer, S.P.; Cullivan, S.; Szklanna, P.B.; Weiss, L.; Cullen, S.; Kelliher, S.; Smolenski, A.; Murphy, C.; Altaie, H.; Curran, J.; et al. COVID-19 induce un fenotipo hiperactivo en plaquetas circulantes. *PLoS Biol.* **2021**, *19*, e3001109. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 41. Assinger, A.; Kral, J.B.; Yaiw, K.C.; Schrottmaier, W.C.; Kurzejamska, E.; Wang, Y.; Mohammad, A.-A.; Religa, P.; Rahbar, A.; Schabbauer, G.; et al. Human Cytomegalovirus—Platelet Interaction Triggers Toll-Like Receptor 2-Dependent Proinflammatory and Proangiogenic Responses). *Arterioscler. Trombón. Vasc. Biol.* **2014**, págs. *34*, 801–809. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 42. Li, T.; Yang, Y.; Wang, Z.; Ma, F.; Luo, R.; Xu, X.; Zhou, G.; Wang, J.; Niu, J.; Ly, G.; et al. Las plaquetas median la activación inflamatoria de monocitos por la proteína espiga del SARS-CoV-2. *J. Clin. Investig.* **2022**, *132*, e150101. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]

Nota del editor: MDPI se mantiene neutral con respecto a las reclamaciones jurisdiccionales en los mapas publicados y las afiliaciones institucionales

© 2022 por los autores. Licenciario MDPI, Basilea, Suiza. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).