



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
División de Estudios de Posgrado
Maestría en Ciencias de la Salud



**Estudio de la activación plaquetaria en respuesta a la proteína no
estructural 1 (NS1) de los virus de dengue y Zika.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA

Licenciado en Bioquímica Diagnóstica
Alan Fabricio Cano Méndez

Dirección de tesis

D. en C. Martha Eva Viveros Sandoval

Codirección de tesis

D. en F. Gabriel Espinosa Pérez

Mayo de 2020, Morelia, Mich. México.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular de la división de estudios de posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en colaboración con el departamento Nuffield de Medicina de la Universidad de Oxford en Inglaterra y el Instituto de Física y Matemáticas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, bajo la dirección de la D. en C. Martha Eva Viveros Sandoval y del D. en C. Gabriel Espinosa Pérez.

Durante la realización del proyecto se contó con el apoyo de CONACYT mediante la beca nacional para estudiantes responsables del proyecto, con número de registro de becario **702771** y con una beca mixta de movilidad en el extranjero con la que se realizó una estancia en el departamento Nuffield de Medicina de la Universidad de Oxford, en Oxford, Inglaterra.

Índice

Abreviaturas	1
1. Resumen	3
2. Abstract	4
3. Introducción	5
4. Antecedentes	8
4.1. Plaquetas	8
4.1.1. Estructura plaquetaria.....	9
4.1.2. Participación de las plaquetas en la respuesta inmune	13
4.2. Arbovirus.....	15
4.3. Virus del dengue.....	16
4.4. Virus de Zika.....	18
4.5. Proteína no estructural 1.....	19
4.6. Microscopia de fuerza atómica	21
4.7. Microbalanza de cristal de cuarzo	23
5. Justificación.....	25
6. Hipótesis.....	26
7. Objetivo general	26
8. Objetivos particulares.....	26
9. Estrategia experimental	27
10. Materiales y métodos	28
10.1. Tipo y clasificación del estudio.....	28
10.2. Universo o población.....	28
10.3. Muestra.....	28
10.3.1. Obtención de la muestra.....	28
10.4. Criterios de inclusión.....	28
10.5. Criterios de exclusión.....	28
10.6. Criterios de eliminación	29
10.7. Definición de plan de procesamiento y presentación	29
10.8. Cuantificación de plaquetas.....	29
10.9. Microscopia de fuerza atómica.....	30
10.10. Microbalanza de cristal de cuarzo	30
10.11. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas	31

10.12. Citometría de flujo.....	31
10.13. Plan de análisis estadístico	32
10.14. Aspectos éticos.....	32
11. Resultados	34
11.1. Determinación del estado serológico de muestras	34
11.2. Determinación de las condiciones de estímulo plaquetario con proteína no estructural 1 de dengue y Zika mediante citometría de flujo.....	35
11.2.1. Evaluación de activación celular mediada por agonistas conocidos	36
11.2.2. Cinética de activación con proteína no estructural 1 de dengue	39
11.2.3. Cinética de activación con proteína no estructural 1 de Zika.....	48
11.3. Evaluación de reactividad plaquetaria en respuesta a estímulo con NS1 de dengue y Zika mediante AFM	58
11.3.1. Determinación de condiciones para la aplicación de AFM en plaquetas	58
11.3.2. Evaluación de reactividad plaquetaria en respuesta a proteína NS1 de los virus de dengue y Zika.....	60
11.4. Evaluación de reactividad plaquetaria en respuesta a estímulo con NS1 de dengue y Zika mediante QCM.....	61
11.4.1. Determinación de condiciones para la aplicación de QCM en plaquetas.....	61
11.4.2. Evaluación del comportamiento de la interacción proteína NS1 DENV – plaquetas y NS1 ZIKV – plaquetas mediante QCM	66
12. Discusión.....	73
13. Conclusiones	80
14. Cronograma de actividades	81
15. Referencias.....	82
16. Anexos.....	89
16.1. Carta de consentimiento informado	89
16.2. Cuestionario estado general de salud	90
16.3. Constancia de aprobación de proyecto por parte del comité de ética de facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la UMSNH.....	92
16.4. Constancia de aprobación de proyecto por parte del comité de ética del Hospital Civil de Morelia “Dr. Miguel Silva”	93

Índice de tablas

Tabla 1. Generalidades de los gránulos plaquetarios	10
Tabla 2. Función de las moléculas contenidas en los gránulos α de las plaquetas.....	11
Tabla 3. Función de las moléculas contenidas en los gránulos densos de las plaquetas	12
Tabla 4. Productos plaquetarios bioactivos y su función inmunológica	14
Tabla 5. Determinación de IgG contra proteína NS1 de virus de dengue y Zika	34
Tabla 6. Determinación de IgM contra proteína NS1 de virus de dengue y Zika	35
Tabla 7. Media geométrica de expresión de glicoproteína IIbIIIa y de P-Selectina en plaquetas estimuladas con agonistas conocidos	36
Tabla 8. Media geométrica de expresión de marcadores de activación en plaquetas estimuladas con NS1 DENV a diferentes tiempos	45
Tabla 9. Media geométrica de expresión de marcadores de activación en plaquetas estimuladas con NS1 ZIKV a diferentes tiempos	55
Tabla 10. Evaluación de plaquetas mediante AFM bajo diferentes condiciones.....	58
Tabla 11. Evaluación estructural de plaquetas activadas <i>in vitro</i> con agonistas conocidos mediante AFM.....	60
Tabla 12. Evaluación estructural de plaquetas activadas <i>in vitro</i> con proteína NS1 de los virus de dengue y Zika.....	61
Tabla 13. Modificaciones en la frecuencia (Δf [Hz]) de la interacción de NS1 de dengue con diferentes muestras biológicas	70
Tabla 14. Modificaciones en la frecuencia (Δf [Hz]) de la interacción de NS1 de Zika con diferentes muestras biológicas	71
Tabla 15. Modificaciones en la frecuencia (Δf [Hz]) de la interacción de NS1 de dengue y Zika con PRP.....	72

Índice de figuras

Figura 1. Estructura plaquetaria	13
Figura 2. Mosco <i>Aedes</i> spp.	16
Figura 3. Ciclo biológico del virus del dengue	17
Figura 4. Esquema de la estructura del genoma del virus de Zika	19
Figura 5. Estructura tridimensional de la proteína no estructural 1	20
Figura 6. Microscopio de fuerza atómica.....	22
Figura 7. Microbalanza de cristal de cuarzo.....	23
Figura 8. Selección de población correspondiente a plaquetas.	36
Figura 9. Estimulación celular con ADP incrementa la expresión de P-Selectina y PAC-1 en la superficie plaquetaria.	37

Figura 10. Estimulación celular con colágeno incrementa la expresión de P-Selectina y PAC-1 en la superficie plaquetaria.	38
Figura 11. Estimulación celular con epinefrina incrementa la expresión de P-Selectina y PAC-1 en la superficie plaquetaria.	39
Figura 12. Estimulación celular con NS1 DENV (2.5 µg/mL) durante 20 minutos	41
Figura 13. Estimulación celular con NS1 DENV (2.5 µg/mL) durante 40 minutos	42
Figura 14. Estimulación celular con NS1 DENV (2.5 µg/mL) durante 60 minutos	44
Figura 15. Estimulación celular con NS1 DENV (2.5 µg/mL) durante 120 minutos	45
Figura 16. Cinética de la expresión PAC-1 respecto al tiempo de estimulación con NS1 DENV....	46
Figura 17. Cinética de la expresión P-selectina respecto al tiempo de estimulación con NS1 DENV.	46
Figura 18. Expresión de PAC-1 en respuesta a diferentes estímulos: NS1 de DENV y agonistas conocidos.....	47
Figura 19. Expresión de P-Selectina en respuesta a NS1 de DENV y agonistas conocidos.....	48
Figura 20. Estimulación celular con NS1 ZIKV (2.5 µg/mL) durante 20 minutos.....	50
Figura 21. Estimulación celular con NS1 ZIKV (2.5 µg/mL) durante 40 minutos.....	51
Figura 22. Estimulación celular con NS1 ZIKV (2.5 µg/mL) durante 60 minutos.....	53
Figura 23. Estimulación celular con NS1 ZIKV (2.5 µg/mL) durante 120 minutos.....	54
Figura 24. Comparación de la expresión de GP IIbIIIa respecto al tiempo de estimulación con NS1 ZIKV contra el estado basal	55
Figura 25. Comparación de la expresión P-selectina respecto al tiempo de estimulación con NS1 ZIKV	56
Figura 26. Expresión de GP IIbIIIa en respuesta a diferentes estímulos: sin estímulo, NS1 de ZIKV y con agonistas conocidos.....	57
Figura 27. Expresión de P-Selectina en respuesta a diferentes estímulos: NS1 de ZIKV y agonistas conocidos	57
Figura 28. Evaluación de la adición de proteína NS1 DENV evaluada por QCM	62
Figura 29. Evaluación de la adición de proteína NS1 ZIKV evaluada por QCM	63
Figura 30. Evaluación de la adición de suero con presencia de anticuerpos contra proteína NS1 DENV evaluada por QCM	64
Figura 31. Evaluación de la adición de suero con presencia de anticuerpos contra proteína NS1 ZIKV evaluada por QCM.	64
Figura 32. Efecto de la adición de suero sin presencia de anticuerpos contra proteínas NS1 DENV evaluada por QCM.	65
Figura 33. Efecto de la adición de suero sin presencia de anticuerpos contra proteínas NS1 ZIKV evaluada por QCM.	65
Figura 34. Efecto de la adición de PRP evaluada por QCM.	66
Figura 35. Efecto de la proteína NS1 DENV sobre PRP evaluada por QCM	67
Figura 36. Efecto de la proteína NS1 DENV sobre PPP evaluada por QCM.	68
Figura 37. Efecto de la proteína NS1 ZIKV sobre PRP evaluada por QCM.	68

Figura 38. Efecto de la proteína NS1 DENV sobre PPP evaluada por QCM	69
Figura 39. Modificaciones en la frecuencia de cuarzo sensibilizado con NS1 de dengue (2.5 µg/mL) y posterior interacción con diferentes muestras biológicas.	70
Figura 40. Modificaciones en la frecuencia de cuarzo sensibilizado con NS1 de Zika (2.5 µg/mL) y posterior interacción con diferentes muestras biológicas.	71
Figura 41. Cambios en la frecuencia de cuarzo sensibilizado independiente con NS1 de dengue y Zika y plasma rico en plaquetas.	72

Abreviaturas

ADAMST	Desintegrina y metaloproteínasa en un motivo de trombospondina
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
β -TG	β -Tromboglobulina
BMP	Proteínas morfogénicas óseas
CCL	Quimiocina
CD	Marca de diferenciación
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
DHAP	Dihidroacetona fosfato
EGF	Factor de crecimiento endotelial
Fg	Fibrinógeno
Fn	Fibraectina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GPIb	Glicoproteína Ib
GRO	Oncogen relacionado con crecimiento
HGF	Factor de crecimiento hepático
HMGB1	Proteínas del grupo de alta movilidad β 1
HMWK	Quininógeno de alto peso molecular
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IGFBP3	Proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a insulina
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos
MIP	Proteína inflamatoria del macrófago
MMP	Metaloproteínasas
NAP	Péptido activador de neutrófilos
PAI	Inhibidor del activador de plasminógenos

PECAM	Molécula de adhesión plaqueto-endotelial
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PF	Factor Plaquetario
PKC	Proteína cinasa C
PRP	Plasma rico en plaquetas
SCUBE	Péptido señal CUB
TAFI	Inhibidor de la activación fibrinolítica por trombina
TF	Factor tisular
TFPI	Inhibidor de la vía del factor tisular
TGF	Factor de crecimiento transformante
TIMPs	Inhibidores de metaloproteinasas tisulares
TLT	Receptor desencadenante expresado en células mieloides
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
TSP	Trombospondina
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
Vn	Vimentina
vWF	Factor de von Willebrand
1,3 BPG	Ácido 1,3-bifosfoglicérico

1. Resumen

Introducción: Células discoides y anucleadas, las plaquetas han estado asociadas tradicionalmente a los procesos de hemostasia y trombosis; sin embargo, recientemente se ha descrito su participación en otros procesos biológicos incluida la respuesta inmunológica contra virus. El dengue (DENV) y el Zika (ZIKV) son arbovirus que poseen un genoma que codifica 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales. La proteína no estructural 1 (NS1) participa principalmente en la replicación del material genético viral. NS1 puede también ser secretada por células infectadas y su presencia en circulación se ha asociado a la evasión de la respuesta inmune contra estos virus. **Objetivo:** Estudiar la reactividad plaquetaria en respuesta a estímulo con la proteína NS1 del virus de dengue y Zika. **Materiales y métodos:** Obtención de muestra sanguínea por venopunción con sistema Vacutainer® de voluntarios que acepten participar en el protocolo y cumplan con los criterios de inclusión. Determinación del estado serológico de las muestras contra NS1 de dengue y Zika mediante ELISA. Obtención de plasma rico en plaquetas (PRP) y de plasma pobre en plaquetas (PPP). Determinación de las condiciones de estímulo plaquetario mediante citometría de flujo (CytoFLEX, Beckman Coulter®). Estandarización de microscopia de fuerza atómica (AFM) y microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) para posterior evaluación de la reactividad celular posterior a estímulo con proteína NS1. Se utilizó un microscopio NT-MDT® NTEGRA y una microbalanza QCMopen, Novaetech®. **Resultados:** Se confirmó la seronegatividad de las 3 muestras de trabajo. La mayor expresión de los marcadores P-Selectina y GP α IIb β 1 por citometría de flujo se observaron a los 60 minutos con una concentración de proteína de 2.5 μ g/mL y que esta fue mayor al compararse con ADP, colágeno y epinefrina y la expresión basal en plaquetas inactivas. Se determinó PRP/Buffer Tyrodes sobre superficie de vidrio para la evaluación de plaquetas mediante AFM. Se observaron plaquetas activadas al ser estimuladas con las proteínas virales y agregados plaquetarios al utilizar colágeno y epinefrina. Para el ensayo de QCM se determinó un flujo de 30 μ L/min por 30 minutos para permitir la adhesión de ambas proteínas sobre el cuarzo y de 30 μ L/min por 30 minutos [200,000 plaquetas/mL] para evaluación de la interacción de estas con las proteínas. Se observa una disminución significativa en la frecuencia de oscilación del cuarzo al inyectar PRP en contraste con la observada al inyectar PPP y buffer de lavado. **Conclusión:** Existe reactividad plaquetaria al ser expuestas a las proteínas no estructurales 1 de los virus de dengue y Zika, observándose un aumento en la expresión de marcadores de activación celular, interacción directa de estas con las proteínas y modificaciones a nivel morfológico.

Palabras clave: dengue, Zika, NS1, plaquetas, reactividad.

2. Abstract

Introduction: Discoid and anucleate cells, platelets have traditionally been associated with the processes of haemostasis and thrombosis; however, its involvement in other biological processes has recently been described including the immune response against viruses. Dengue (DENV) and Zika (ZIKV) are arboviruses that have a genome that encodes 3 structural and 7 non-structural proteins. Non-structural protein 1 (NS1) is mainly involved in the replication of viral genetic material. NS1 can also be secreted by infected cells and their circulating presence has been associated with the evasion of the immune response against these viruses. **Objective:** Study platelet reactivity in response to stimulus with the NS1 protein of dengue and Zika virus. **Materials and methods:** Blood sample was obtained by venepuncture with Vacutainer system® volunteers who agree to participate in the protocol and meet the criteria of inclusion. Determination of the serological status of NS1 samples of dengue and Zika using ELISA method. Obtention of platelet-rich plasma (PRP) 1000, and platelet-poor-plasma (PPP). Determination of platelet stimulus conditions by flow cytometry (CytoFLEX, Beckman Coulter®). Standardization of atomic force microscopy (AFM) and quartz crystal microbalance (QCM) for further evaluation of post-stimulus cell reactivity with NS1 protein. NT-MDT microscope® NTEGRA and a QCMopen, Novaetech® microbalance was used. **Results:** The seronegativity of the 3 working samples was confirmed. The increased expression of markers P-Selectin and GP aIIb β I by flow cytometry were observed at 60 min with a protein concentration of 2.5 μ g/mL and this was higher when compared to known agonists of activation (ADP, collagen and epinephrine), and the basal expression in inactive platelets. We determined PRP/Buffered Tyrodes onto glass surface for the assessment of platelet by AFM. We observed activated platelets when stimulated with the viral proteins and aggregates of platelet by using collagen and epinephrine. For the QCM assay it was determined a flow rate of 30 μ L/min for 30 minutes to allow adhesion of both proteins on the quartz and 30 μ L /min for 30 minutes [200,000 platelets/mL] for evaluation of the interaction of these with the proteins. We observe a significant decrease in the oscillation frequency of the quartz when PRP was injected in contrast with the observed when injecting PPP and wash buffer. **Conclusion:** There is platelet reactivity when exposed to the non-structural protein 1 of dengue and Zika viruses, observing an increase in the expression of markers of cellular activation, direct interaction with these proteins and modifications at morphological level.

Key words: dengue, Zika, NS1, platelets, reactivity.

3. Introducción

Los virus transmitidos por artrópodos, también llamados arbovirus, representan una epidemia que se ha convertido en un grave problema de salud pública para México. Los virus de dengue (DENV) y Zika (ZIKV) comparten como mecanismo de transmisión la picadura de un mosquito hembra del género *Aedes* el cual ha logrado diseminarse y establecerse en regiones no endémicas a consecuencia de diversos factores tales como: el cambio climático, la resistencia a insecticidas y el aumento de la densidad poblacional. De acuerdo con datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), durante 2019, en México se registraron un total 27,884 casos de dengue no grave, 10,264 casos de dengue con signos de alarma y 3,357 casos de dengue grave, dando un total de 41,505 casos de esta virosis en el país. Los anteriores datos encienden las alarmas en el sector salud. Por otro lado, se ha registrado un total de 12,935 casos de infección por virus de Zika en un periodo comprendido de 2015 a 2019. Durante 2019 se han registrado 129 casos (SINAVE, 2019). Las infecciones causadas por estos virus se asocian a una amplia variedad de signos y síntomas, entre los más frecuentes se encuentran: mialgias, artralgias, fiebre, dolor retroocular, exantema y clásicamente existe una relación del número de plaquetas circulantes en torrente sanguíneo (plaquetopenia), conllevando a problemas asociados a la coagulación.

Su participación en la hemostasia y la trombosis ha sido la principal función estudiada en las plaquetas; sin embargo, estudios recientes reportan que estas células participan además en otros eventos fisiológicos, entre los que destacan: la modulación de respuesta inmunológica ante agentes externos y el proceso inflamatorio. Dentro de las pruebas dirigidas al estudio de las plaquetas se pueden evaluar la cantidad de células en un volumen determinado y su funcionalidad. La técnica clásica para el estudio de la actividad plaquetaria es la agregometría plaquetaria que tiene como principio la inducción *in vitro* de la agregación plaquetaria con sustancias agonistas como el adenosin difosfato (ADP), epinefrina, colágena o la ristocetina. Por otro lado, la citometría es la metodología utilizada para determinar el número de células encontradas en un volumen de muestra dado y se puede evaluar actividad de la célula mediante el uso de anticuerpos específicos. También es posible determinar modificaciones a nivel de membrana que pueden estar asociadas a activación celular mediante la microscopia (Martínez et al., 2015).

Dentro de las variantes de la microscopia existe una técnica que nos permite evaluar morfología de las células con una alta resolución, además de características bioquímicas y fisicoquímicas propias de la muestra. La microscopía de fuerza atómica (AFM) está incluida dentro de un grupo de técnicas

llamadas “microscopias de fuerza de barrido”; en estas técnicas la superficie de una muestra es escaneada con una sonda siguiendo líneas paralelas, midiendo la interacción entre las superficies y la sonda. (Santos & Castanho, 2004). Mediante AFM es posible obtener imágenes de muestras mantenidas en superficies líquidas o en seco, no conductoras o conductoras, lo anterior alcanzando resoluciones nanométricas entre diferentes puntos de medida, y una fuerza de piconewtons al evaluar la fuerza de adhesión o repulsión entre un ligando localizado en la punta de escaneo y un potencial receptor en la muestra analizada (Carvalho & Santos, 2012). Aunado a lo anterior, las muestras analizadas pueden ser desde material genético, proteínas, orgánulos y hasta estructuras celulares completas que no requieren un tratamiento complejo para su análisis, facilitando su uso y disminuyendo los costos de la aplicación. La AFM se ha utilizado con éxito en el estudio de la interacción entre algunas biomoléculas y las plaquetas, tales como el factor de von Willebrand y la glicoproteína Ib α presente en la membrana de esta célula (Tobimatsu et al., 2015), en el análisis de los cambios morfológicos durante su activación (Kitamura et al., 2018), las interacciones fibrina-plaqueta activada y las asociaciones de estas en patologías como la cardiopatía isquémica y los accidentes cerebrovasculares (Du-Plooy et al., 2013; Van-Rooy et al., 2015).

La microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) se fundamenta en el efecto piezoeléctrico que tienen algunos materiales como cristales, cerámicos, algunos materiales biológicos, etc. El efecto piezoeléctrico se obtiene al aplicar una diferencia de potencial eléctrico a través del material, este se deforma y viceversa (al deformar el material se produce una diferencia de potencial). En nuestro caso utilizamos un cristal de cuarzo en forma de disco y sus caras circulares tienen un recubrimiento parcial de oro para formar un ánodo y un cátodo que permite hacer la diferencia de potencial a través del espesor del disco. Se puede enviar una señal del potencial eléctrico de manera oscilatoria a determinada frecuencia, el material se deformará a una frecuencia dada menor debido a disipaciones del cuarzo. Al conocer la frecuencia de respuesta del material puro, es posible establecer la frecuencia y disipación que una muestra adherida al sustrato presenta al entrar en contacto con otra masa confluyente en la celda. Los cambios en la frecuencia detectada sugieren modificaciones en la masa adsorbida sobre el sustrato o por interacción con la muestra (Yao et al., 2018). Los estudios con microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) han sido utilizados ampliamente durante los últimos años para el análisis de interacciones biomoleculares entre diferentes células, célula-biomolécula o biomolécula-biomolécula, entre otras; arrojando información de suma utilidad para el entendimiento subyacente de dichos modelos biológicos (Li et al., 2013). Esta metodología resulta prometedora en el estudio de la actividad plaquetaria bajo diferentes estímulos y situaciones fisiológicas debido a su practicidad y relativa simplicidad en su uso.

Actualmente se cuenta con escasos reportes que estudien el papel que tienen las plaquetas en infecciones causadas por arbovirus. El estudio de la respuesta plaquetaria a proteínas de dengue y Zika mediante estas dos nobles metodologías permitirá aportar información sobre la comunicación que se establece entre estos virus y las plaquetas, el papel de estas células en la respuesta inmunológica contra agentes patógenos externos, su posible activación y la liberación de biomoléculas que modulen dichos eventos.

4. Antecedentes

4.1. Plaquetas

Provenientes del megacariocito célula localizada principalmente en medula ósea, las plaquetas son células que circulan en torrente sanguíneo, cuya función fisiológica más importante y estudiada es su participación en Los procesos de hemostasia y trombosis (Arcuri, 2013). Descritas por primera vez por Donne y colaboradores a mediados del siglo XIX y confirmadas como elementos celulares únicos en 1872 por Hayem, las plaquetas pueden activarse al ser expuestas a elementos expresados por la matriz extracelular lesionada, moléculas solubles agonistas secretadas por las mismas plaquetas u otras células del microambiente o durante procesos infecciosos causados por bacterias y virus. Este último proceso fue descrito recientemente y se desconoce el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo. Las plaquetas activadas adquieren una estructura morfológica y fenotípica característica. Esta respuesta permite a las plaquetas aumentar su adhesividad y capacidad de agregación al expresar ligandos y receptores para interactuar con otras células presentes en circulación y con el endotelio lesionado. Otra característica es el aumento en su superficie de contacto y a su vez liberar una variedad de mediadores capaces de intervenir en la coagulación, inflamación y quimiotaxis del sitio lesionado, afectando la trombosis y la homeostasis del sistema vascular (Linden, 2013; Rodak, 2004; Sorrentino et al., 2016; Thon & Italiano, 2012).

Las plaquetas son células anucleadas con morfología discoide, miden alrededor de 2 a 5 μm de diámetro en estado inactivo. El ser humano adulto posee cerca de un trillón de plaquetas en circulación. Estas células cuentan con un tiempo de vida media que va de 8 a 10 días aproximadamente. Para mantener el volumen plaquetario de $150\text{-}400 \times 10^9$ células/L, en un adulto es necesario generar alrededor de 100 billones de nuevas plaquetas por día (Linden, 2013).

Por su parte, el megacariocito es una célula de gran tamaño proveniente de linaje mieloide que constituye menos del 0.1% de la población celular en medula ósea. Durante su maduración el megacariocito sufre un proceso constante de replicación del material genético (8, 16, 32 y hasta 64 divisiones cromosomales) sin pasar por la fase mitótica, proceso conocido como endomitosis. Durante este paso, la célula incrementa su tamaño paulatinamente hasta 100 μm (Linden, 2013; Rodak, 2004). Una vez maduro, el megacariocito en contacto con la célula endotelial del sinusoides vascular de la médula ósea emite largas prolongaciones citoplasmáticas denominadas proplaquetas o *swellings*, los cuales a su vez presentan una serie de terminaciones o *tips*, sitio donde ocurre la

liberación de las plaquetas. Una vez liberadas continúan su maduración en circulación. Un solo megacariocito puede dar lugar a un aproximado de 1000-5000 plaquetas antes de que su material nuclear sea eliminado por fagocitosis mediada por macrófagos (Bermejo, 2017; Heller, 2017; Linden, 2013).

4.1.1. Estructura plaquetaria

La ultraestructura plaquetaria está conformada por 4 zonas con funciones características: una zona periférica, una zona denominada sol-gel, la zona de organelos y el sistema de membranas (Bermejo, 2017; Gremmel et al., 2016). En la zona periférica se localiza una membrana recubierta por una capa de glucocálix la cual participa principalmente en el contacto asegurando la adhesión de las células al endotelio lesionado y posteriormente favoreciendo la agregación de estas. El glucocálix es una estructura dinámica y el primer sitio de interacción con el exterior celular, se encuentra conformada por cadenas de oligosacáridos provenientes de glicoproteínas de membrana, polisacáridos originados de proteoglicanos de membrana y proteínas como albumina y fibrinógeno; además, ahí se localizan los complejos receptores GPIIb-IX-V mediadores de la adhesión plaquetaria a la porción de adhesión del factor de von Willebrand (vWF); la GP VI por su parte es el receptor para colágeno más importante. La GPIb se une a la trombina y la GPIIbIIIa a fibrinógeno durante la formación del tampón hemostático. La carga negativa de las plaquetas responsable de que no se lleven a cabo interacciones no deseadas, está dada por la presencia de residuos de ácido siálico (Bermejo, 2017; Gremmel et al., 2016; Rodak, 2004). Situada por debajo de la glucocálix, se encuentra la membrana plaquetaria; está posee un espesor de aproximadamente 20 nm y se trata de una bicapa lipídica rica en glicoproteínas. Al igual que muchas otras membranas biológicas posee proteínas integrales que funcionan como receptores, bombas, enzimas y cofactores necesarios para la actividad plaquetaria (Bermejo, 2017; Gremmel et al., 2016).

La región llamada sol-gel se conforma por una sustancia viscosa y una red de microfilamentos de actina los cuales forman una matriz en donde se encuentran suspendidos los organelos celulares, los microtúbulos involucrados en el soporte del citoesqueleto y glucógeno. Se localizan también vesículas de clatrina y organelos de secreción. En esta área se incluye el sistema tubular denso (DTS, *dense tubular system*), proveniente del retículo endoplásmico liso del megacariocito. Es el sitio donde se localiza la mayor fuente de calcio interno, fundamental para llevar a cabo los mecanismos funcionales de la plaqueta. Por otro lado, el sistema canalicular abierto se encuentra formando parte de la membrana plaquetaria, prolongándose hacia el interior de la célula. Funciona como canal de

transporte entre la célula y el medio extracelular, participa en la adhesión plaquetaria favoreciendo el incremento de la superficie de contacto de la plaqueta (Bermejo, 2017; Gremmel et al., 2016; Rodak, 2004).

Dentro de los organelos que poseen las plaquetas se encuentran: las mitocondrias involucradas en el metabolismo energético de la célula, los glicosomas, cadenas densas de electrones, retículo endoplásmico y 3 tipos de gránulos secretores clasificados de acuerdo con su ultraestructura, densidad y contenido en: gránulos alfa (α), gránulos densos (δ) y lisosomas (λ), como se muestra en la Figura 1 (Bermejo, 2017; Gremmel et al., 2016).

Tabla 1. Generalidades de los gránulos plaquetarios

	Cantidad/plaqueta	Diámetro (nm)	Área de superficie (μm^2) / plaqueta	Marcadores comunes	Funciones generales
α-gránulos	50-80	200 – 500	14	vWF, CXCL (PF4), P-selectina	Hemostasis/trombosis Inflamación Angiogenesis Defensa del huésped Mitogenesis
δ-gránulos	3-8	150	< 1	CD63, Serotonina	Hemostasis/trombosis Inflamación
Lisosomas	< 3	200 – 250	< 1	Fosfatasa ácida	Digestión endosomal

Modificado de: Gremmel et. al., 2016.

Los gránulos α aparecen en la región trans del aparato de Golgi formando pequeñas vesículas; transitan de manera inmadura a través de cuerpos multivesiculares hasta alcanzar su tamaño y densidad final. Se pueden determinar 3 zonas en el gránulo: un área nuclear rica en los proteoglicanos: β -trombomodulina y factor plaquetario 4. Posterior a esta se encuentra una región asociada con la marcación de fibrinógeno, trombospondina, albúmina y factores de crecimiento; seguido de una zona clara o periférica la cual alberga vWF en su forma multimérica de alto peso molecular (Bermejo, 2017). Las proteínas almacenadas en estos compartimentos pueden tener su origen en la pre-síntesis por parte de la propia célula que posteriormente son almacenados en gránulos inmaduros o por endocitosis del plasma extracelular la cual es llevada a cabo tanto por el megacariocito durante el

proceso de maduración celular, como por la propia plaqueta (Gremmel et al., 2016). El contenido de los gránulos y sus funciones generales se sintetizan en la siguiente tabla (Tabla 2).

Tabla 2. Función de las moléculas contenidas en los gránulos α de las plaquetas

TIPO DE MOLÉCULA	CONTENIDO DE GRÁNULO	FUNCIONES
Proteínas de adhesión	vWF + pro-péptido, Fg, Fn, Vn, TSP-1, TSP-2, laminina-8	Interacciones de contacto celular, hemostasia primaria y constituyentes de la matriz extracelular
Factores de la coagulación y sus inhibidores	Factor V/Va, factor XI, multimerina, proteínas S, HMWK, proteasas, nexina-1 y -2, TFPI, inhibidor de proteína C, gas6	Generación de trombina, formación del coágulo y proliferación de la matriz extracelular
Factores fibrinolíticos y sus inhibidores	Plaminógeno, PAI-1, u-PA, α 2-antiplasmina, TAFI, α 2-macroglobulina	Producción de plasmina y remodelación vascular
Proteasas y antiproteasas	MMP-1, -2, -9, ADAMTS13, ADAMS10, ADAMS17, TIMPs 1-4, inhibidor plaquetario del FIX, C1 inhibidor, α 2-antitripsina	Angiogénesis, regulación de la coagulación y de mecanismos celulares
Factores de crecimiento y mitogénicos	PDGF (A, B y C), EGF, IGF-1, VEGF (A y C), bFGF (FGF-2), HGF, BMN-2, -4, -6, CTGF, SCUBE1, IGFBP3	Quimiotaxis, proliferación celular y angiogénesis
Quimiocinas, citocinas y otros	TGF- β 1 y β 2, IL-1, RANTES (CCL-5), IL-8, MIP-1 α , MIP-2, GRO- α , MCP-1, MCP-3, PF4, β -TG, NAP-2, angiopoyetina-1, HMGB1, IL-6sR, endostatina, osteonectina, dickkopf-1, osteoprotegerina	Regulación de angiogénesis, quimiotaxis, interacción celular, remodelación vascular
Proteínas antimicrobianas	Trombocidinas, quinocidinas	Bactericida, fungicida
Glicoproteínas de membrana	α IIb β 3, α v β 3, GPIb, PECAM-1, constituyentes de la membrana plasmática, receptores para agonistas primarios, P-selectina, TLT-1, CD63, CD40L, TF, TRAIL, furina, cellubrevina, syntazina-2, clatrina	Adhesión y agregación plaquetaria, endocitosis de proteínas, secreción, inflamación, generación de trombina, interacción plaqueta-leucocito y plaqueta – pared vascular
Otras	4-sulfato de condroitina, albúmina, inmunoglobulinas G y M, precursor de amilode b proteína, factor H de complemento, semaforin 3 ^a	Varias

Modificado de: Bermejo, 2017.

Los cuerpos o gránulos densos (δ) tienen una génesis asociada al desarrollo del sistema endosomal de la célula durante la maduración del megacariocito para posteriormente ser depositadas en corpúsculos multivesiculares al igual que los gránulos alfa. Almacenan moléculas como la serotonina, potente vasoconstrictor y Ca^{+2} , Mg^{+2} , ADP y ATP, componentes de gran importancia en la fisiología plaquetaria. La secreción de estas biomoléculas se lleva a cabo durante la activación plaquetaria mediante la fusión del cuerpo denso con la membrana celular (Bermejo, 2017; Gremmel et al., 2016). Las moléculas presentes en los gránulos densos de las plaquetas se muestran detalladas en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3. Función de las moléculas contenidas en los gránulos densos de las plaquetas

TIPO DE MOLÉCULA	CONTENIDO DE GRANULO	FUNCIÓN
Señalización celular	Rho-GDP-inhibidor del dominio N terminal de calcio-calmodulina, 14-3-3 proteína	Regulador de proteínas Rho, movilización y unión de calcio, activadores de Tyr 3-hidroxilasas, unión de proteínas a fosfatidilserina
Moléculas chaperonas	Ciclofilina A, grp78, proteína de choque térmico de 70 KDa, disulfuro-isomerasa	Facilitan el ensamblaje de proteínas multiméricas, actúan en unión de Ca ²⁺ y ATP, catalizan uniones -S-S-
Citoesqueleto	B actina, α 1actina, proteína asociada a adenilatociclasa, cofilina 1, filamina A, precursor de gelsolin, kindin1, cadena liviana de miosina-2, pleckstrina, talina 1, transgelina 2, la cadena β de latrombopoyetina, tropomiosina, vinculina.	Involucran movilidad celular, reciclan actina y cofilina, controlan la polimerización de actina, anclan proteínas de membrana a la actina, regulan cambio de forma y secreción, pueden ser sustratos de PKC en la reorganización del citoesqueleto, entre otras.
Glicólisis	Aldolasa, aenolasa 1, GAPDH, lactato deshidrogenasa B, piruvatocinasa	Convierte: F-1, 6-DP en DHAP, piruvato en GAP, GAP en 1,3 BPG, piruvato en lactato y fosfoenolpiruvato
Relacionadas con la función plaquetaria	Precursor de beta-tromboglobulina, FXIII, precursor de la cadena alfa de fibrinógeno, región C de la cadena Ig gamma, factor plaquetario 4, glicoproteína II, precursores de proplaquetas, albumina sérica, precursor de trombospondina-1	Neutralización de heparinas (asociadas a α - gránulos), entrecruzamiento de las cadenas de las cadenas de fibrina, polimerización de fibrina, actúan como cofactor en la agregación y son receptores para fibrinógeno y fibronectina

Modificado de: Bermejo, 2017.

Las plaquetas, además, poseen gránulos lambda o lisosomales los cuales presentan una estructura homogénea. Su principal función durante la activación de la plaqueta está asociada a interacciones con la pared vascular y la digestión de la matriz subendotelial. En las plaquetas en reposo fungen como estructuras autofágicas eliminando desechos o estructuras no deseadas. Realizan su función mediante enzimas como las catepsinas, elastasas, colagenasas, galactosidasas y fosfatasaas acidas. De igual manera se han descrito corpúsculos con actividad peroxidasa y catalasa, denominados homólogos de los peroxisomas (Bermejo, 2017; Gremmel et al., 2016).

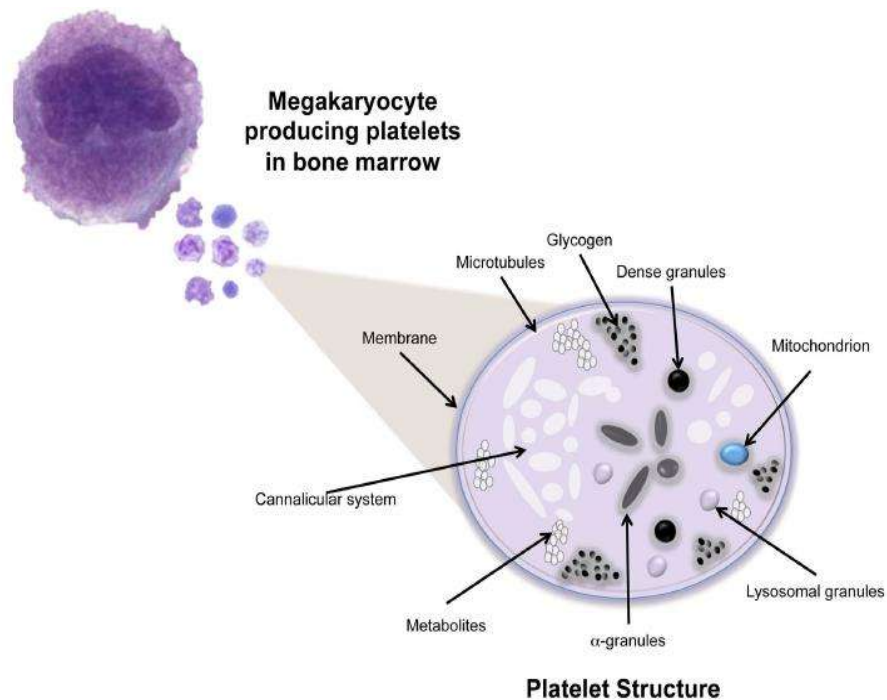


Figura 1. Estructura plaquetaria. Las plaquetas cuentan con un sistema canalicular, microtúbulos, mitocondrias, gránulos alfa, densos y lisosomales los cuales concentran una gran variedad de factores quimiotácticos solubles, además de depósitos de glicógeno. Zapata et al., (2014). The role of platelets in the pathogenesis of viral hemorrhagic fevers. *PLOS Neglected Tropical Diseases*.

La liberación del contenido granular, cambios en la estructura del citoesqueleto y la expresión de una amplia gama de receptores membranales, son sin duda los procesos más estudiados de las plaquetas durante su activación posterior a una lesión vascular; sin embargo, no es el único rol que juegan estas células, durante la última década se ha descrito su participación en la inmunidad innata, inflamación, angiogénesis, y en la defensa contra agentes patógenos como bacterias y virus (Assinger, 2014; Hamzeh-Cognasse et al., 2015; Linden, 2013; Sorrentino et al., 2016; Thon & Italiano, 2012).

4.1.2. Participación de las plaquetas en la respuesta inmune

La participación de las plaquetas en la inmunidad está sugerida por sus características estructurales y de generación únicas. Dada su elevada concentración en sangre y su habilidad para secretar biomoléculas activas de diversa índole (Tabla 4), las plaquetas se posicionan como células centinelas del sistema inmune. Debido a que las plaquetas no se internan en tejido linfático la interacción con los leucocitos ocurre en el bazo, hígado y torrente sanguíneo, desconociéndose los mecanismos exactos de este proceso (Semple et al., 2011). La amplia gama de mediadores internalizados en las plaquetas puede ser liberados a la circulación o translocadas a la membrana

plasmática de la célula durante su activación. Otra particularidad de estas es su capacidad para liberar biomoléculas sintetizadas *de novo*. Se ha demostrado que las plaquetas contienen una gran cantidad de ARN mensajero (ARNm) y además contar con la maquinaria necesaria para que se lleve a cabo el proceso de traducción. Tanto los compuestos preformados, como los sintetizados, están implicados en la modulación de la respuesta celular a diversos microambientes como los que se presentan durante: procesos infecciosos, cáncer o patologías propias de las células (Lindemann & Gawaz, 2007; Rowley et al., 2012; Wicki et al., 1989).

Tabla 4. Productos plaquetarios bioactivos y su función inmunológica

Molécula	Función
Histamina	Modulador proinflamatorio de células endoteliales y leucocitos.
Serotonina	Modulador de la respuesta proinflamatoria y la activación de monocitos y células T.
Ca⁺², PO₃⁻	Adhesión celular.
Fibrinógeno, vWF, P-selectina	Promotores de la adhesión e interacción entre leucocitos, plaquetas y células endoteliales.
GPIIb-IIIa	Promueve la agregación plaquetaria y la interacción con células endoteliales y leucocitos. Recluta PMN.
CXCL-1 (GROα) CXCL-4 (PF4) CXCL-5 (ENA-78) CXCL-8 (IL-8)	Reclutamiento de PMN y diferenciación de monocitos.
CCL-2 (MCP-1) CCL-3 (MIP-1-α)	Reclutamiento y activación de leucocitos.
CCL-5 (RANTES)	Reclutamiento y modulación de la actividad de diferentes linfocitos y monocitos.
IL-1β sCD40 ligando	Potencia la presentación antigénica por las CPA y el cambio de clase por las células B.
PDGF TGFβ	Moduladores de la respuesta inmune (inmunosupresión).
Kinocidinas Trombocidinas 1 y 2 Defensinas 1 y 2 Timosina β4	Péptidos antimicrobianos.
Tromboxano A2 PAF	Procoagulante, promotores de inflamación.
TLR1-7	Detección de patógenos.
TREM1 ligando CD40 ligando	Potencian la presentación antigénica por células CPA y cambio de clase por las células B.

Modificado de: Ali et al., 2015.

Un gran número de infecciones virales cursan con una disminución en el número de plaquetas circulantes, ya sea por lisis celular o por inhibición en la producción de estas; además, virus como el de la inmunodeficiencia humana, influenza, hepatitis C y dengue se han localizado internalizados en

las mismas (Jenne & Kubas, 2015). Existe cada vez más evidencia de que las plaquetas no son simples observadores de la defensa del organismo sino más bien necesarias para la eliminación de algunos patógenos. Un ejemplo de esto es la protección que ejercen las plaquetas frente al virus de la coriomeningitis linfocítica (Loria et al., 2013). Se ha observado que la interacción plaqueta-neutrófilo podría ser inducida por la vía del ligando del receptor de tipo toll 3 (TLR3), receptor asociado clásicamente con infecciones virales, aunque el mecanismo no ha sido comprobado, puesto que no se ha demostrado la expresión de este receptor en la plaqueta. En estudios recientes se ha demostrado que las plaquetas de donadores sanos expresan TLR7 el cual reconoce específicamente ARN de cadena sencilla (ARNcs), un patrón molecular asociado a patógenos (PAMPs) viral clásico, indicando que la estimulación de la plaqueta mediante este receptor conlleva a su activación y desgranulación; sin embargo, puesto que el TLR7 está presente únicamente en endosomas, el virus debe ser reconocido por otro receptor aún no identificado para ser internalizado (Jenne & Kubas, 2015). Lo anterior sustenta la hipótesis de que los virus pueden activar directamente las plaquetas favoreciendo así su participación en la respuesta inmune desencadenada por infecciones virales, como las arbovirosis.

4.2. Arbovirus

Los arbovirus (ARthropod-BORne VIRUS) son un grupo heterogéneo de virus transmitidos por insectos artrópodos. Estos virus presentan una distribución mundial, localizándose principalmente en regiones con climas tropicales. La incidencia actual de estas infecciones se encuentra al alza, conllevando un fuerte impacto a la salud pública y económica de los países afectados. En América, el problema se ha detonado durante las últimas décadas afectando principalmente regiones selváticas y tropicales, afectando incluso zonas no endémicas. Dentro de la gran variedad de arbovirus encontrados en el continente americano destacan los virus del dengue (DENV) y Zika (ZIKV), los cuales se posicionan como las abrovirosis con mayor incidencia y prevalencia en nuestro continente (Kantor, 2016; Peña-García et al., 2017). A nivel mundial se reportan anualmente alrededor de 390 millones de casos de dengue, de las cuales cerca de 96 millones son casos sintomáticos. El virus del Zika se ha reportado ya en 31 países, entre ellos México, ocasionando graves problemas principalmente en mujeres embarazadas y niños (Kantor, 2018).

En nuestro país de acuerdo con la información del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) y la Dirección General de Epidemiología (DGE), durante 2019 se presentaron un total de 41,505 casos de dengue confirmados con una letalidad de 1.40% y 12,935

casos confirmados de Zika en un periodo comprendido entre 2015 a 2019, siendo los estados del sureste mexicano los más afectados (SINAVE/DGE, 2019). Estas 2 arbovirosis además de cursar con una sintomatología similar, donde se incluyen: mialgias, artralgias, fiebre, cefaleas, dolor retroocular, exantema, náuseas y vómitos; comparten también el mecanismo de transmisión, la picadura de un mosquito hembra del género *Aedes*, siendo *Aedes aegypti* sobre *Aedes albopictus* (Figura 2) el que presenta mayor asociación con estas virosis (Peña-García et al., 2017).



Figura 2. Mosquito hembra vector de los virus de dengue y Zika. En la imagen izquierda se muestra *Aedes aegypti* y del lado derecho *Aedes albopictus*. Center for Disease Control and Prevention. 2018. Chikungunya transmission. [En línea]. Consultado el 14 de enero de 2019. Disponible en: <https://www.cdc.gov/chikungunya/transmission/index.html>.

4.3. Virus de dengue

El dengue es una enfermedad sistémica ocasionada por un virus del mismo nombre. El DENV presenta 4 diferentes serotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* y posee material genético de tipo ARN con polaridad positiva el cual codifica para un total de 10 proteínas, 3 de ellas conforman su estructura: proteínas de cápside (C), de membrana (M) y de envoltura (E), además de 7 proteínas no estructurales (NS) denominadas: NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B y NS5, involucradas principalmente en la replicación del propio genoma. Por otro lado, se ha demostrado la participación de la proteína no estructural 1 (NS1) en la respuesta inmunológica desencadenada por el virus, (figura 3) (Guzman et al., 2016). Mustafa *et al.*, han reportaron un quinto serotipo (DENV5) el cual se mantiene en ciclo selvático (Mustafa et al., 2015).

con alguno de los serotipos del virus generan inmunidad mediada por la presencia de inmunoglobulinas M (IgM) e inmunoglobulina G (IgG). Esta inmunidad es duradera y una infección secundaria con alguno de los otros serotipos genera una inmunidad transitoria, pero es capaz de dar lugar a un curso más grave de la enfermedad consecuencia de un proceso conocido como “viremia potenciada por anticuerpos anti-dengue” (Kantor, 2016). El dengue presenta un periodo de incubación de 4 a 10 días. Una vez transcurrido este lapso, el cuadro clínico se caracteriza principalmente por una fiebre que supera los 38°C, cefaleas, dolor retroocular, artralgias y mialgias, inflamaciones de los ganglios linfáticos y petequias usualmente localizadas en extremidades inferiores y tórax. En casos graves de dengue los pacientes llegan a presentar plaquetopenias, lo que conlleva a hemorragias que van de leves a severas (Whitehorn & Farrar, 2010).

3.4 Virus de Zika

El virus del Zika (ZIKV) es un virus que pertenece al género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae*. El genoma del virus consta de una molécula de ARN monocatenario positivo con 10,794 Kb, flanqueado por dos regiones no codificantes (NCR). La región codificante da origen a 3 proteínas estructurales: proteína de la cápside (C), la proteína precursora de membrana (prM), la proteína de envoltura (E) y a 7 proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5, las cuales participan en la replicación del material genético viral (Figura 4) (Ly-Phu et al., 2018, Perera, & Kuhn, 2008). La proteína E (53 kDa) es la principal proteína de superficie, está involucrada en varios aspectos del ciclo viral principalmente a través de la interacción del virus con las células hospederas (Faye et al., 2014). Al igual que el caso del dengue, en la infección por virus de Zika, se ha demostrado la participación de NS1 en la evasión de la respuesta inmune por parte del virus. Utilizándose también la confirmación de la presencia de esta proteína como metodología de diagnóstico de la enfermedad concentración en circulación sanguínea como marcador del estado de salud del paciente infectado (Viranaicken, et al., 2017).

Dentro de los síntomas referidos durante la infección con el virus se incluyen: cefaleas leves, erupciones maculopopulares características tanto en extremidades superiores como inferiores, fiebre mayor a 38°C, conjuntivitis y artralgias. Solo uno de cada 5 pacientes desarrolla síntomas sin llegar a ser fatal (Hayes, 2009). Uno de los principales problemas asociados con esta virosis es la alarmante relación existente entre la infección por Zika en mujeres embarazadas y el padecimiento de microcefalia en los productos. También la relación descrita entre la infección y el desarrollo de

autoinmidades tales como el síndrome de Gillan-Barré en personas adultas (Abushouk, et al., 2016).

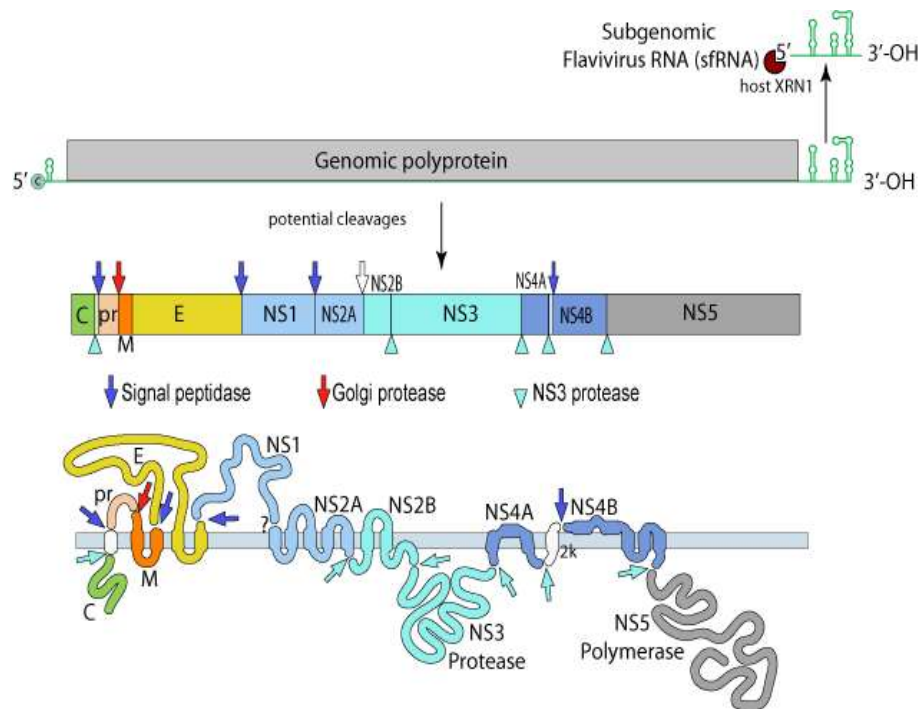


Figura 4. Genoma y proteoma de virus de Zika. Se muestran las proteínas estructurales: cápside (C), una región pre-membrana (prM), membrana (M) y envoltura (E), así como las proteínas no estructurales 1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B, 5, sus sitios de escisión y el sitio donde se lleva a cabo el proceso. Guzman, Bioinformatic Resource Portal. Zika virus genome. En línea. Consultado el 14 de enero de 2019. Disponible en: https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species

4.5. Proteína no estructural 1

La proteína no estructural 1 (NS1) es una glicoproteína altamente conservada en todos los flavivirus de alrededor de 46 a 55 kD dependiendo del grado de glicosilación y de los enlaces disulfuro intramoleculares (da Silva et al., 2018). La estructura secundaria consta de 21 hojas β y 2 hélices α distribuidas en 3 dominios: un dominio N-terminal o β -roll, un dominio ala o *wing*, rico en epítomos y un dominio C-terminal o β -ladder (Figura 5).

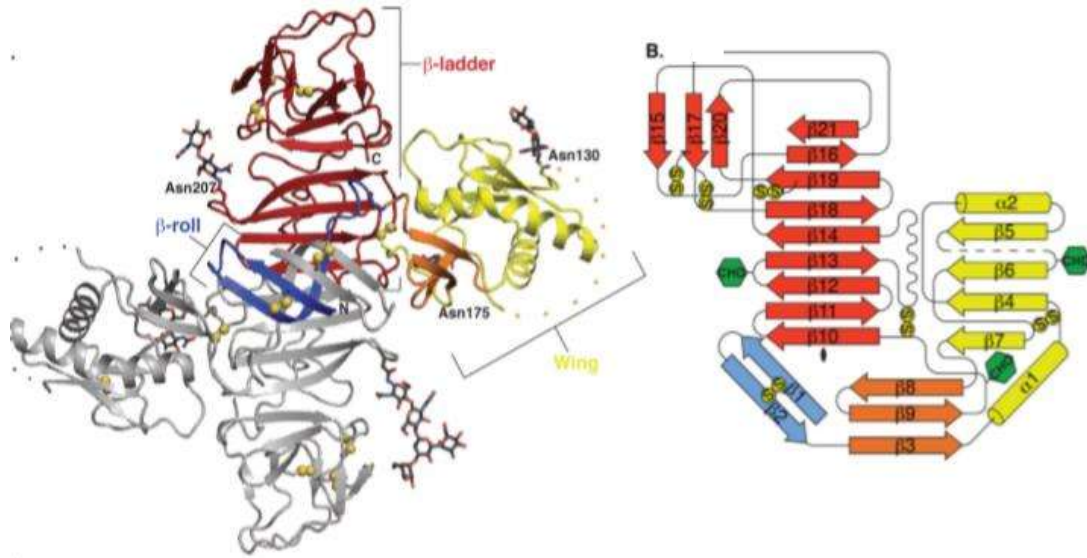


Figura 5. Estructura de la proteína NS1 de los flavivirus. La figura muestra la estructura de un dímero de NS1, una de las proteínas se colorea en gris y en colores rojo (β -ladder), azul (β -roll) y amarillo (wing) las regiones proteicas que forman a la proteína. Se observa también un diagrama topológico de la estructura monomérica de la proteína NS1. Akey et al. 2014. *Science*.

La función principal descrita de esta proteína es su participación en replicación del material genético del virus proponiéndose interacciones directas con NS4A y NS4B (Akey et al., 2014). Clásicamente se ha observado a la proteína en forma de monómero en el citosol de células infectadas. Posterior a las modificaciones postraduccionales ocurridas en retículo endoplasmático se observa a la proteína formando dímeros anclados en las membranas celulares. Los mecanismos mediante los cuales ocurre este proceso son desconocidos, pero, se propone asociación de la proteína a fosfatidilinositol y lípidos glicosilados. NS1 es la única proteína no estructural que tiene la capacidad de ser secretada al medio extracelular, lo hace formando hexámeros asociados a moléculas lipídicas, que le confieren características hidrofóbicas, asemejando una lipoproteína. Dadas estas características, se propone a NS1 como un potente inhibidor de la cascada de la coagulación irrumpiendo en la génesis endógena de partículas lipoproteicas (Akey et al., 2014; Chen et al., 2018). Niveles elevados de proteína NS1 en sangre se han observado en fases críticas de la enfermedad, asociando concentraciones superiores a 50 $\mu\text{g/ml}$ con mayor grado de agresividad de la patología (Libraty et al., 2002). Estudios previos han demostrado el daño endotelial mediante la internalización de la proteína a la célula endotelial y el desencadenamiento de una tormenta de citocinas proinflamatorias en el sitio de lesión. Se han observado que el bloqueo de los receptores TLR4 y 6 atenúa la producción de citocinas inflamatorias por parte de las células periféricas mononucleares (Chen et al., 2015). Posteriormente se reportó la interacción entre la proteína NS1 y la célula

endotelial mediante TLR4 induciendo el daño endotelial (Modharian et al., 2015). Es escasa la información en la literatura sobre reportes de interacciones directas y específicas entre las plaquetas y la proteína NS1.

4.6. Microscopía de fuerza atómica

Dentro de las técnicas utilizadas para la caracterización morfológica celular existen una amplia variedad de microscopias, las cuales van desde la microscopia óptica hasta aquellas que proveen imágenes de mayor resolución como la electrónica de barrido, de transmisión, digital o de efecto de túnel. Binnig *et al.*, desarrollaron en 1986 la microscopia de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés *Atomic Force Microscopy*). Esta técnica posee ciertas características que la diferencian de sus homólogas. Es capaz de capturar imágenes de muestras en superficies secas y líquidas, conductivas y no conductivas, alcanzando resoluciones atómicas y moleculares (Binnig et al., 1986; Carvalho & Santos, 2012).

La AFM es una técnica donde la muestra es escaneada por una punta que se encuentra al final de un cantiléver hecho a base de un material flexible que facilita la caracterización individual de la misma. La deflexión del cantiléver es detectada por un mecanismo óptico que asocia un valor de altura a cada posición en el plano “x”, “y” y “z”, dando como producto la reconstitución de una imagen pseudo tridimensional de la superficie de la muestra (Figura 6a). AFM también permite medir propiedades físico-mecánicas como viscoelasticidad y rugosidad de la superficie evaluada a través de la determinación de la fuerza de adhesión y/o repulsión entre la punta y la superficie de la muestra (Carvalho & Santos, 2012). La figura 6b muestra los elementos básicos necesarios para ejecutar la técnica.

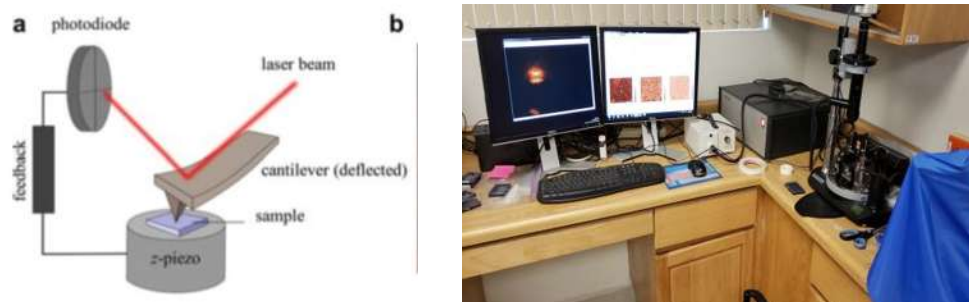


Figura 6. Microscopia de fuerza atómica. a) Esquema del fundamento de detección de la microscopia de fuerza atómica. b) Equipo necesario para llevar a cabo la técnica de AFM. Al costado derecho se observa el microscopio de fuerza atómica, seguido del equipo de transducción de señal y finalmente del lado izquierdo de la imagen se observan los monitores con los que se logra enfocar el microscopio y donde se observan los resultados de la señal traducida. Piontek & Roos, 2018, *Single Molecule Analysis: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*.

Diversos estudios han reportado el estudio de las plaquetas apoyados en la microscopia de fuerza atómica. Carvalho & Santos en el 2012 comprobaron que la fibrina no solo es capaz de interactuar con las plaquetas, sino también con los eritrocitos; sin embargo, determinaron que dicha interacción posee una menor fuerza y duración (Carvalho & Santos, 2012). En el 2013, Du Plooy *et al.*, compararon las plaquetas de pacientes sanos y fumadores observando cambios en la morfología de las células de pacientes fumadores lo cual podría estar asociado a un estado de tendencia a activación plaquetaria, la formación de coágulos y el aumento en el riesgo de sufrir un evento vascular cerebral (EVC) (Du Plooy *et al.*, 2013); dos años más tarde van Rooy *et al.*, demostraron que la actividad plaquetaria y la formación de los coágulos de fibrina no es causada por alteraciones en la coagulación, pero si por una activación prematura consecuencia de un proceso inflamatorio crónico en individuos con síndrome metabólico (van Rooy *et al.*, 2015). Ese mismo año Tobimatsu *et al.*, determinaron que la fuerza de adhesión entre el factor de von Willebrand y un dominio de la glicoproteína Iba es de 54 pN, muy cercana a la fuerza determinada mediante pinzas ópticas (50 pN), técnica utilizada normalmente en estos estudios (Tobimatsu *et al.*, 2015). Kitamura *et al.*, publicaron en el 2018 un estudio de evaluación cuantitativa de los cambios morfológicos en plaquetas activadas *in vitro* usando microscopia holográfica digital comparándola con otras técnicas, entre ellas, la microscopia de fuerza atómica, obteniendo resultados similares con las diferentes técnicas (Kitamura *et al.*, 2018).

En el presente estudio se pretende evaluar la reactividad plaquetaria mediada por proteínas virales de dengue y Zika, mediante la observación de modificaciones en la morfología de la célula, como el aumento del tamaño y cambios en las propiedades de la membrana celular, características indicativas de dicho proceso, apoyados con AFM.

4.7. Microbalanza de cristal de cuarzo

Descrita en 1880 por Pierre y Jacques Curie, la microbalanza de cristal de cuarzo (*QCM*, por sus siglas en inglés, *Quartz Crystal Microbalance*), es un equipo (Figura 7) que ha sido sumamente usado en estudios biológicos. El corazón de la tecnología de esta técnica es el efecto piezoeléctrico que presenta cuarzo, el cual puede oscilar a una frecuencia específica a consecuencia de una diferencia de potencial aplicada mediante electrodos también de manera oscilatoria. Las variaciones en la frecuencia de oscilación del cuarzo permiten determinar masas y modificaciones en ella en el intervalo de los ng a los µg. Los cambios de masa son determinados por la aplicación de la ecuación de Sauerbrey, mientras que modificaciones en la disipación reportada por el detector aportan información sobre la viscoelasticidad de la muestra (Rehman & Zeng, 2017, Yao et al., 2018).

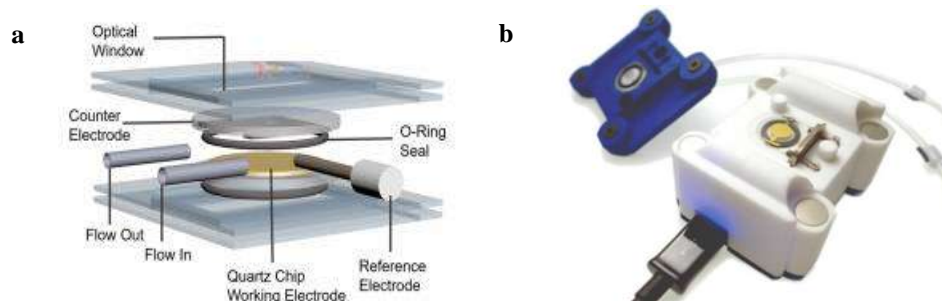


Figura 7. Microbalanza de Cristal de Cuarzo. a) Esquema de la estructura interna del equipo donde se muestran las zonas de flujo de entrada y salida, el chip de cuarzo donde se lleva a cabo la detección de la muestra, el electrodo de referencia y los anillos de sellado. b) Equipo necesario para llevar a cabo la técnica de QCM. Kornienko et al., 2019. *Accounts of Chemical Research*.

Durante las últimas décadas se han desarrollado diferentes aplicaciones de la QCM para el entendimiento de eventos de interacción celular, como son la reacción antígeno anticuerpo, detección de patógenos o adhesión celular. Esta técnica ha sido escasamente utilizada en el estudio de las plaquetas, a pesar de que esta novedosa metodología arroja información de suma relevancia en intervalos de tiempo cortos y sin ser una técnica invasiva para las células (Rehman & Zeng, 2017). Li *et al.*, evaluaron en 2013 mediante QCM la interacción que ocurría entre heparina y fibronectina con células endoteliales y plaquetas con la finalidad de aportar información que fuese relevante en el área del diseño de biomateriales y su potente uso en patologías cardiovasculares (Li et al., 2013). Santos-Martinez *et al.*, en el 2015 estudiaron las posibles vías moleculares y farmacológicas por las cuales las plaquetas se agregan al estar en contacto con nanopartículas utilizando QCM con disipación, contrastando sus resultados con los obtenidos por la técnica de agregometría al estimular las células con las nanopartículas observando correlación en ambas técnicas (Santos Martínez et al.,

2015). Recientemente Yao *et al.*, en 2018 diseñaron una plataforma para teléfonos inteligentes que tiene como fundamento el uso de QCM con disipación para llevar a cabo la determinación de los tiempos de coagulación (tiempo de tromboplastina parcial activada y tiempo de protombina) de la sangre que apoyen a pacientes con problemas de coagulación, con resultados exitosos al compararse con sistemas estandarizados de laboratorio (Yao et al., 2018). Hajtuch *et al.*, durante este año determinaron el efecto causado por nanopartículas de plata sobre la reactividad plaquetaria, demostrando la agregación de las células mediante disminuciones en la frecuencia y aumentos en los valores de disipación evaluados con QCM (Hajtuch et al., 2019).

La microbalanza de cuarzo también ha sido planteada como prototipo de técnica de diagnóstico en arbovirosis. Dar-Fu *et al.*, plantearon en 2006 la posibilidad de utilizar la QCM como técnica de diagnóstico en infección por virus de dengue al sensibilizar el chip de la microbalanza con un polímero que fungía como receptor específico para la proteína no estructural 1 de DENV. Posteriormente, probaron la propuesta con sueros de pacientes confirmados con infección por DENV comparando sus resultados con los obtenidos mediante la técnica de ELISA, obteniendo correlaciones significativas entre ambos (Dar-fu et al., 2006).

5. Justificación

Las enfermedades causadas por arbovirus como dengue y Zika representan un grave problema de salud pública debido al aumento en su incidencia y al establecimiento del vector en zonas no endémicas. En México, se reportaron más de 40,000 casos confirmados de DENV durante 2019 y alrededor de 13,000 casos de ZIKV en un periodo comprendido entre 2015-2019. Ambas virosis pueden cursar con un cuadro clínico asintomático o por el contrario generar complicaciones graves, incluso la muerte. La secreción de la proteína NS1 al medio extracelular por parte de células infectadas por estos virus es un mecanismo descrito y ampliamente conocido. Elevadas concentraciones de la proteína NS1 en sangre, hasta 50 $\mu\text{g/mL}$, se han asociado con daño endotelial y peor pronóstico para el paciente; sin embargo, se conoce muy poco sobre la interacción entre esta proteína y las plaquetas, células centinela del sistema inmunológico y actores principales en los procesos de hemostasia y trombosis. Se desconoce si existe reactividad celular mediada por dicha interacción y con ello modificaciones en la estructura, aparición de pseudópodos, aumento en la rugosidad de la membrana y pérdida de la viscoelasticidad, modificaciones características de la activación plaquetaria.

Existen algunas técnicas con el potencial de ser aplicadas en los estudios de biomedicina. La microscopia de fuerza atómica es una técnica que permite además de la obtención de imágenes con alta resolución, la evaluación de modificaciones en las características de la superficie de la muestra como cambios en la rugosidad y viscoelasticidad. La microbalanza de cristal de cuarzo permite el análisis de interacciones biomoleculares *in situ* en tiempo real, esenciales para entender de los mecanismos subyacentes que se establecen durante el proceso de comunicación biológica. Ambas técnicas pueden llevarse a cabo sin necesidad someter a la muestra a tratamientos previos de elevado costo y dificultad. Por otro lado, la citometría de flujo ha sido una técnica ampliamente utilizada en el estudio de diferentes poblaciones celulares, permitiendo obtener información de suma relevancia sobre estas.

Existe escasa información reportada sobre la respuesta plaquetaria a las proteínas virales no estructurales de dengue o Zika; así como la consecuencia de este proceso. El estudio de esta interacción se facilita mediante las técnicas de AFM, QCM y citometría de flujo con las cuales se permitirá conocer la respuesta de estas células al ser expuestas a estas proteínas.

6. Hipótesis

La proteína no estructural 1 (NS1) de los virus de dengue y Zika induce una respuesta celular plaquetaria.

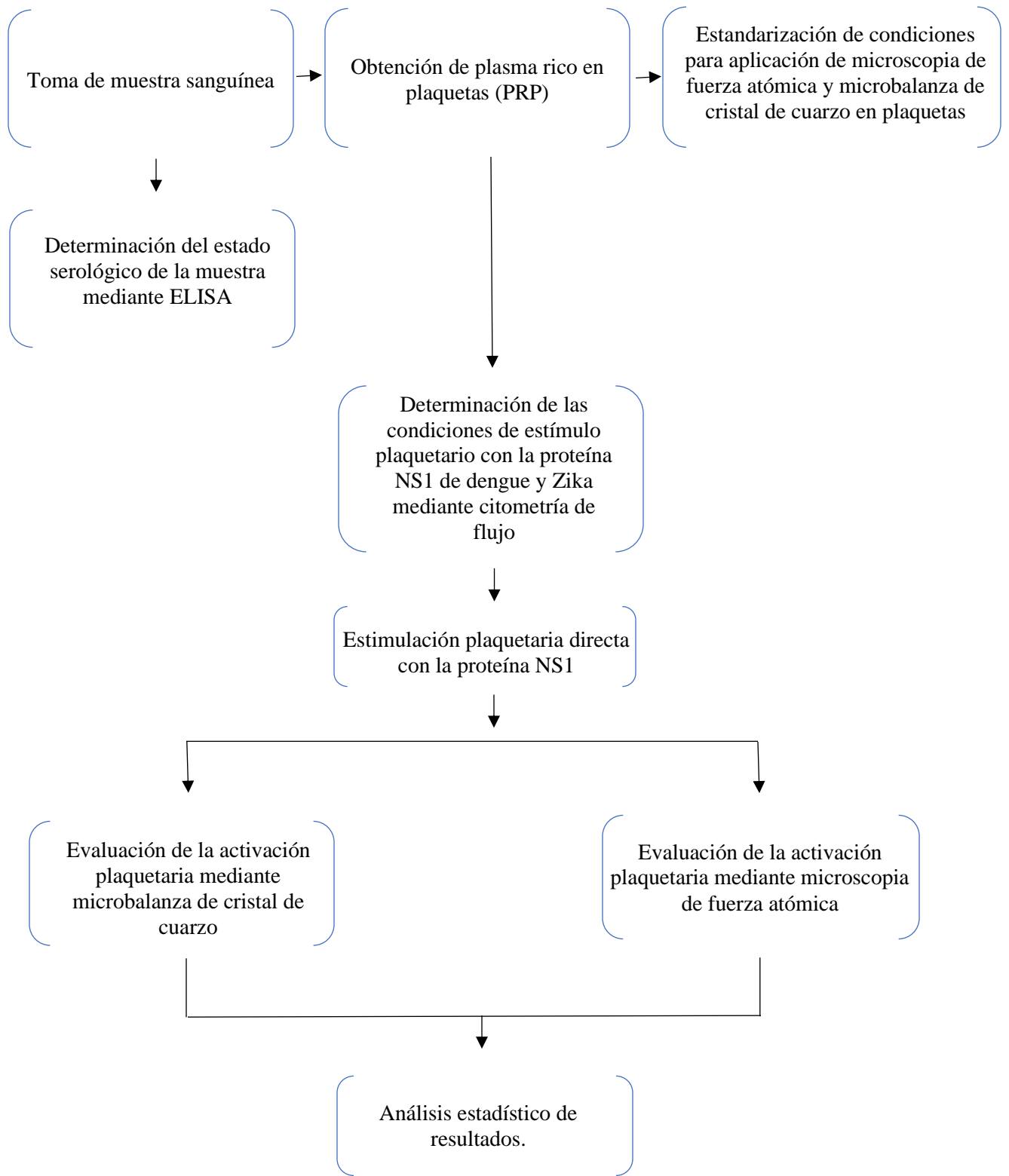
7. Objetivo general

Estudiar la reactividad plaquetaria en respuesta al estímulo con la proteína no estructural 1 (NS1) de los virus de dengue y Zika.

8. Objetivos particulares

- Determinación del estado serológico de las muestras contra NS1 de dengue y Zika mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).
- Determinación de las condiciones de estímulo plaquetario con la proteína NS1 de virus de dengue y Zika mediante citometría de flujo.
- Estandarización de condiciones para la aplicación de los métodos de microscopia de fuerza atómica y microbalanza de cristal de cuarzo en plaquetas.
- Estimulación y evaluación de la reactividad plaquetaria mediante microscopia de fuerza atómica y microbalanza de cristal de cuarzo.

9. Estrategia experimental



10. Materiales y métodos

10.1. Tipo y clasificación del estudio

Estudio analítico, experimental, transversal.

10.2. Universo o población

Muestras de individuos aparentemente sanos que presenten seronegatividad confirmada mediante ELISA contra proteína NS1 de los virus de dengue y Zika.

10.3. Tamaño de muestra

Muestra a conveniencia del estudio.

10.3.1. Obtención de la muestra

Se realizará toma de muestra de sangre periférica mediante venopunción de antebrazo con sistema Vacutainer® de recolección al vacío, técnica mínimamente invasiva. Las muestras serán tomadas en el Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” por un estudiante de posgrado asignado al proyecto. Se obtendrán 2 muestras, una muestra será anticoagulada con citrato de sodio al 3.2% que será utilizada para la obtención de plasma rico en plaquetas (PRP) y plasma pobre en plaquetas (PPP) y la otra muestra no tendrá ningún anticoagulante y se utilizará para las determinaciones del estado sérico de estas.

10.4. Criterios de inclusión

- Género indistinto.
- Edad \geq 18 años.
- Muestras de individuos aparentemente sanos que presenten seronegatividad confirmada mediante ELISA contra proteína NS1 de los virus de dengue y Zika.

10.5. Criterios de exclusión

- Muestras de individuos que cursen con enfermedades que involucren procesos inflamatorios agudos o crónicos: diabetes mellitus, hipertensión, artritis reumatoide, pacientes oncológicos, autoinmunidades, infecciones agudas.

- Muestras de individuos que cursen con tratamiento farmacológico antiagregante plaquetario.

10.6. Criterios de eliminación

- Muestras sanguíneas resulten insuficientes, hemolizadas o lipémicas.
- Muestras que presenten anticuerpos contra NS1 de los virus de dengue y/o Zika.

10.7. Definición del plan de procesamiento

Los individuos donadores que cumplan con los criterios de inclusión serán invitados a participar en el ensayo, previo ayuno de 8 horas, se obtendrán 3 muestras como se mencionó previamente. La muestra sanguínea tratada con citrato de sodio al 3.2% se utilizará para la obtención del PRP por centrifugación lenta (1000 rpm / 10 minutos) y posteriormente se obtendrá PPP de la muestra residual a una centrifugación de 3000 rpm por 10 min. De la muestra sin anticoagulante se obtendrá suero por centrifugación a 3500 rpm por 15 minutos. Con el suero se realizarán las pruebas inmunoenzimáticas. La estimulación plaquetaria se realizará con proteínas de dengue y Zika, se trabajará con la región no estructural 1 completa producida en el laboratorio del Dr. Arturo Reyes Sandoval en la Universidad de Oxford, Inglaterra, por la M. en C Nallely I. García Larragoitti y el Dr. Young Chan Kim. La determinación de las condiciones de estimulación plaquetaria se llevará a cabo mediante citometría de flujo en el edificio de posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. La técnica de microscopia de fuerza atómica se realizará en el Laboratorio de Inmunología y Virología en la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Jorge Luis Menchaca Arredondo. La técnica de microbalanza de cristal de cuarzo se llevará a cabo en el Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular a cargo de la Dra. Martha Eva Viveros Sandoval en colaboración con en Laboratorio de Biofísica a cargo del Dr. Gabriel Espinosa Pérez, ambos de la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. En la estadística descriptiva de acuerdo con la distribución de los resultados se realizará t-student, ANOVA o U de Mann-Whitney.

10.8. Cuantificación de plaquetas en cámara de Neubauer

El recuento de plaquetas en cámara de Neubauer consiste en determinar el número de trombocitos presentes en un volumen determinado de sangre o plasma. Se leyeron 5 cuadrados del cuadro central, se obtuvo el promedio del conteo y se multiplicó por las dimensiones de la cámara ($0.05 \times 0.05 \times 0.1$) mm³. Finalmente se obtiene mediante una regla de tres el número de células por

mm³. El resultado se multiplicará por el factor de dilución de la muestra (1:50 en buffer de Tyrodes). Una vez obtenido el número total de células, se determinó el volumen necesario de PRP para tener un total de 200,000 células/mL.

10.9. Microscopía de fuerza atómica

Para el presente protocolo se probaron diferentes condiciones de análisis, donde la constante fue el PRP seguido de una segunda centrifugación a 2000 rpm por 3 minutos con la finalidad de obtener un concentrado plaquetario. Se utilizaron diferentes soluciones de resuspensión: plasma autólogo, buffer salino de fosfatos (Buffer de fosfatos 0.01M, cloruro de potasio 0.0027M y cloruro de sodio 0.137M, pH=7.4) y buffer de Tyrodes (5 Mm HEPES, 137 mM NaCl, 2,7 mM NaHCO₃, 0.36 Mm NaH₂PO₄, 2 Mm CaCl₂, 5 mM Glucosa, 0.2% BSA, pH=7.4), así como dos diferentes superficies para colocar la muestra a estudiar: cubreobjetos de vidrio y mica. Se evaluaron plaquetas en estado basal y se compararon con células activadas con adenosín difosfato, epinefrina y colágeno, reconocidos agonistas de la activación plaquetaria; así como con plaquetas estimuladas con las proteínas NS1 de los virus de dengue y Zika por un tiempo de 60 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó un microscopio de fuerza atómica NT-MDT® NTEGRA, una punta de antimonio en base de silicona y cantiléver de 3.4 µm, fo: 300 KHz, L: 125 µm, k:40 N/m, W: 40 µm, RTESPA-300 BRUKER®. La obtención de imágenes se realizó con el método de escaneo en seco a temperatura ambiente. Se obtuvieron imágenes de altura, deflexión y fase; 60x60, 30x30, y 10x10 µm², las imágenes obtenidas sistemáticamente para cada muestra corresponden a al menos 3 diferentes regiones escaneadas. El análisis estructural para evaluar morfología plaquetaria se realizó con ayuda del sistema WSxM 5.0.

10.10. Microbalanza de cristal de cuarzo

Se utilizó la microbalanza de cristal de cuarzo open, Novaetech®, 58 mA, 10 MHz, proporcionada por el Dr. Gabriel Espinosa Pérez. El programa de detección utilizado es el openQCM-1.2®. La inyección de las muestras al sistema de QCM fue realizada con un equipo Genie Touch, Kent Scientific Corporation® facilitado por el laboratorio de Biofísica de la UMSNH. Los resultados se analizarán con el software de análisis estadístico R.

Se utilizó proteína NS1 de ambos virus a una concentración final de 2.5 µg/mL y se inyectó a un flujo de 10 µL/min durante 30 minutos para lograr su adhesión sobre la superficie del cristal de

cuarzo. Se usaron muestras séricas que presentaron altos títulos de anticuerpos contra estas proteínas, determinado por el método de ELISA, para confirmar la presencia de la proteína adherida al cuarzo. Y sueros con ausencia de anticuerpos, utilizados como controles de ensayo negativos. Ambas muestras se utilizaron a una dilución 1:200 en buffer de PBS. En ambos casos se utilizó un flujo de inyección de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 30 minutos.

Los ensayos con plaquetas se realizaron a una concentración final de 200,000 cel/mL y se inyectaron a un flujo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 30 minutos. Se utilizó el PPP a un flujo de inyección de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 30 minutos como un control negativo en los ensayos con plaquetas.

10.11. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La metodología utilizada en el Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular es una técnica de detección de inmunoglobulinas G e inmunoglobulinas M que reconozcan a la proteína no estructural 1 de los virus de dengue y Zika. La técnica es un ensayo tipo sándwich de punto final estandarizado por el Dr. Young Chang Kim y el Dr. Arturo Reyes Sandoval en la universidad de Oxford, Inglaterra (Kim et al., 2019). Su fundamento radica en la detección de la proteína NS1 de cada uno de los virus, la cual se encuentra sensibilizando una placa de 96 pozos y posterior a un bloqueo con el buffer Pierce, Thermo Scientific®, se pone en contacto la muestra problema. Se utiliza un anticuerpo anti-IgG o anti-IgM humanos dependiendo del ensayo, el cual está conjugado con fosfatasa alcalina, enzima que tiene como sustrato el *p*-nitrofenilfosfato, dando como producto *p*-nitrofenol el cual puede ser detectado mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 405 nm. La lectura se lleva a cabo en un lector de placas Multiskan FC, Thermo Scientific®.

10.12. Citometría de flujo

Se utilizó la técnica de citometría de flujo para determinar el tiempo de estímulo proteico óptimo para que las células a estudiar muestran mayor reactividad. Se utilizó un equipo CytoFLEX, BECKMAN COULTER®. A partir de la obtención de PRP se realizó un pool de las muestras del cual se toma el volumen necesario para tener un total de 200,000 células/ mL. A esta muestra se le añaden 25 μL de un “cocktail” de anticuerpos PAC-1/CD62/CD41 (22.5 μL , 1.0 μL , 2.4 μL en 450 μL de PBS) marcados por los fluorocromos FITC (Biolegend #cat 362803), PE (Biolegend #cat 304805) y PC7 (Biolegend cat#303718) respectivamente. PAC-1 reconoce el complejo glicoproteico IIb/IIIa y es utilizado como marcador de activación plaquetaria. CD62 reconoce a la P-Selectina y es

utilizado como un marcador tanto de identidad como de activación y CD41 que reconoce a la glicoproteína IIb presente en la membrana de la célula, es un marcador propio de identidad. La muestra es incubada a 37°C por 20 minutos. Posterior a la incubación, se somete a la muestra a una fijación con *p*-formaldehído al 4% por 30 minutos. La lectura en el citómetro de flujo consta de un total de 10,000 eventos. De manera paralela se utilizaron los isotipos recomendados por la casa comercial de cada uno de los anticuerpos utilizados previamente, los controles de isotipo tienen la función de optimizar el protocolo de tinción de superficie celular, facilitando la evaluación del nivel de marcaje de fondo inherente a los ensayos de unión anticuerpo-célula. Los controles de isotipo utilizados fueron: FITC Mouse IgM k Isotype Ctrl, Biolegend #cat 401605, PE Mouse IgG1 k Isotype Ctrl Biolegend #cat 400111, PE/Cy7 Mouse IgG1 k Isotype Ctrl Biolegend #cat 400125. Los controles de activación celular utilizados en este proyecto son: ADP, colágeno y epinefrina, biomoléculas que se utilizan en la clínica como activadores plaquetarios de manera *in vitro*. Se utilizó el kit PAR/PAK II (APD, collagen, epinephrine) de BIO/DATA CORPORATION #cat: 101310, siguiendo las recomendaciones propias de la casa comercial. El análisis de los resultados se realizó con el software FlowJo LLC®.

10.13. Plan de análisis estadístico

Los resultados obtenidos serán analizados de acuerdo con la distribución de estos. Para comparaciones entre más de dos grupos se usará ANOVA de una vía para evaluar diferencias con una prueba *post hoc* de Tukey. Comparaciones entre dos grupos se analizarán con t-Student en el caso de distribuciones paramétricas y U Mann-Whitney para datos no paramétricos. Será utilizado en el análisis estadístico y descriptivo el programa GraphPad Prism 6.0. Las imágenes obtenidas mediante AFM serán analizadas con ayuda del programa WSxM 5.0 y los gráficos obtenidos con QCM se evaluarán con IGOR Pro-6.05.

10.14. Aspectos éticos

En el presente estudio se respetan las disposiciones contenidas en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, de acuerdo con este reglamento, este tipo de investigación está clasificada como investigación con riesgo mínimo. El protocolo en ninguno de sus procedimientos atentará en contra de la integridad física y moral de los individuos que decidan participar en él; prevalece el criterio de respeto a la dignidad del individuo y la protección de sus derechos y bienestar como se establece en el artículo 13 de los aspectos éticos de la investigación en seres humanos reglamentado en la ley general de salud, además tal como se cita en el artículo 14 del

reglamento ya mencionado, el presente estudio será realizado por profesionales de la salud, con conocimiento y experiencia para cuidar la integridad del ser humano, bajo la responsabilidad de una institución de atención a la salud que actuará bajo la supervisión de las autoridades sanitarias competentes y contará con los recursos humanos y materiales necesarios que van a garantizar el bienestar del paciente que decida participar en la investigación.

Se respetarán cabalmente los principios éticos para la investigación médica en seres humanos numerados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (AMM), que fomenta al personal de salud "velar solícitamente y ante todo por la salud del paciente", asimismo, invita al reconocimiento de la investigación médica como una herramienta para generar nuevos conocimientos y no como un medio para la obtención de algún beneficio personal. También promueve el respeto a la intimidad de la persona que decida participar en la investigación, así como la confidencialidad de su información personal.

También serán considerados los principios básicos del Código de Núremberg, entre los que se menciona que el consentimiento voluntario del participante es primordial; esto implica el respeto por el individuo y su derecho a ejercer su libertad en cuanto a la toma de decisiones después de haber obtenido la información necesaria acerca de su posible participación en la investigación, así como ser informado sobre los resultados generales del estudio una vez que estos sean obtenidos.

11. Resultados

El laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular cuenta con un biobanco de muestras representativo del estado de Michoacán del cual se seleccionaron 3 ejemplares las cuales de acuerdo con su historia clínica cumplían con los criterios de inclusión establecidos en el protocolo, se contactó e invito a los individuos a participar en el estudio, posterior a la aceptación de la invitación y firma del consentimiento informado se realizó la toma de muestra sanguínea y se realizaron los diferentes ensayos propuestos.

11.1. Determinación de estado serológico de muestras

Una vez tomadas las muestras sanguíneas de los sujetos de estudio, se obtuvo el suero de estas y se procedió a realizar la determinación de inmunoglobulinas G y M contra proteína NS1 del virus de dengue y Zika mediante la técnica de ELISA siguiendo la metodología antes detallada y obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 5, 6). Las 3 muestras seleccionadas (001, 002, 003) presentan una densidad óptica (OD) por debajo del punto de corte, y marcadamente menor al control positivo (037). Se utilizó como control positivo una muestra del mismo biobanco que tiene confirmación de la infección de DENV y ZIKV de acuerdo con un ensayo de ELISA previo realizado por el grupo de trabajo en el laboratorio de hemostasia y biología vascular y confirmada por el Laboratorio Estatal de Salud Pública mediante qPCR. El punto de corte está determinado por el análisis estadístico posterior a la realización de la prueba de ELISA con un número de 30 muestras, ensayo realizado por la M. en C. Nallely García Larragoiti y el medico José Iván González Abarca. Una vez confirmada la seronegatividad de las muestras se continuo con los ensayos propuestos.

Tabla 5. Determinación de IgG contra proteína NS1 de virus de dengue y Zika.

Código de identificación	OD (IgG – NS1 DENV)	OD (IgG – NS1 ZIKV)
Blanco	0.088	0.098
001	0.200	0.863
002	0.338	0.197
003	0.410	0.741
Control positivo (037)	3.568	3.710
Punto de corte	1.7274	1.4996

Tabla 6. Determinación de IgM contra proteína NS1 de virus de dengue y Zika.

Código de identificación	Densidad óptica (IgM – NS1 DENV)	Densidad óptica (IgM – NS1 ZIKV)
Blanco	0.006	0.003
001	0.236	0.158
002	0.734	0.585
003	0.542	0.312
Control positivo (037)	2.418	1.178
Punto de corte	0.8163	0.6544

11.2. Determinación de las condiciones de estímulo plaquetario con la proteína NS1 de virus de dengue y Zika mediante citometría de flujo.

El siguiente objetivo del presente trabajo fue determinar las condiciones de estímulo celular adecuadas mediante citometría de flujo. Iniciamos con la obtención de PRP, seguido de la cuantificación del total de células en la muestra mediante cámara de Neubauer. Una vez determinado el volumen necesario para tener una concentración final de 200,000 cel/mL y realizarse el proceso de tinción y fijado. Lo primero a realizar fue la determinación de la población de estudio de acuerdo con las características de tamaño (FSC-H) y complejidad estructural (SSC-H) utilizando una escala logarítmica debido al diminuto tamaño de las plaquetas que va de 2 a 5 μm (Figura 8). Una vez seleccionada la población correspondiente a plaquetas, continuamos con los posteriores ensayos. Se procedió a evaluar la reactividad de las plaquetas en respuesta a agonistas de activación conocidos (ADP, colágeno y epinefrina), los cuales funcionarían como controles de activación positivos, para posteriormente evaluar diferentes tiempos de estimulación (0, 20, 40, 60 y 120 minutos) con la proteína NS1 a una concentración de 2.5 $\mu\text{g/mL}$, dicha concentración fue previamente determinada en trabajos dentro del laboratorio de hemostasia y biología vascular. Lo anterior permite comparar si existe o no reactividad celular ante la proteína NS1. La activación plaquetaria se evalúa con el grado expresión de CD62 (P-selectina) y PAC-1 (GP IIb/IIIa), mientras que la identificación celular se realiza con CD42 (GP IIb).

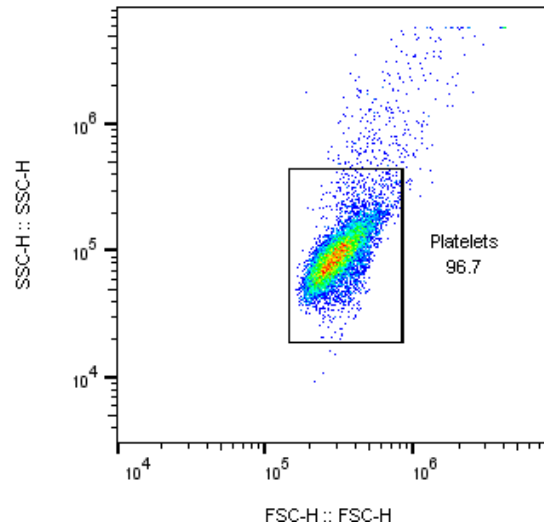


Figura 8. Selección de población correspondiente a plaquetas. El *plot* muestra la población plaquetaria de acuerdo con sus dimensiones de tamaño (FSC-H) y complejidad (SSC-H), utilizando un eje logarítmico debido al tamaño de estas células.

Todos los ensayos de citometría se realizaron utilizando el correspondiente control de isotipo. Estos anticuerpos de isotipo permiten determinar interacciones inespecíficas entre el anticuerpo utilizado y su blanco, lo anterior permite confirmar que la fluorescencia observada con los anticuerpos de trabajo corresponde a un anticuerpo asociado a su respectivo receptor.

11.2.1. Evaluación de activación celular mediada por agonistas conocidos

Inicialmente se determinó la activación celular mediada por ADP, y se comparó con un estado basal o no reactivo. Posterior a la estimulación con ADP la expresión de CD62 y PAC-1 en la población plaquetaria aumenta significativamente indicando células en estado de activación (Figura 9). La media \pm desviación estándar de los resultados obtenidos al realizar las 3 repeticiones independientes se observan en la Tabla 7.

Tabla 7. Media geométrica de expresión de glicoproteína IIbIIIa y de P-Selectina en plaquetas estimuladas con agonistas conocidos.

Condición	Media de emisión de fluorescencia de expresión de Glicoproteína IIbIIIa	Media de emisión de fluorescencia de expresión de P-Selectina
Control	3078 \pm 160	1358 \pm 307
ADP	4410 \pm 484	23310 \pm 271
Colágeno	9549 \pm 287	41158 \pm 360
Epinefrina	5475 \pm 729	13600 \pm 249

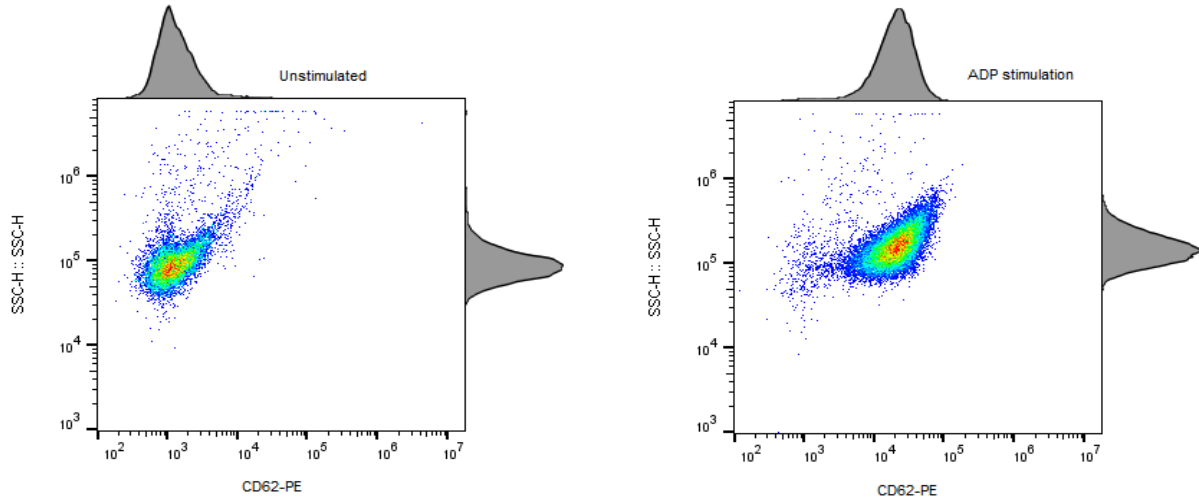
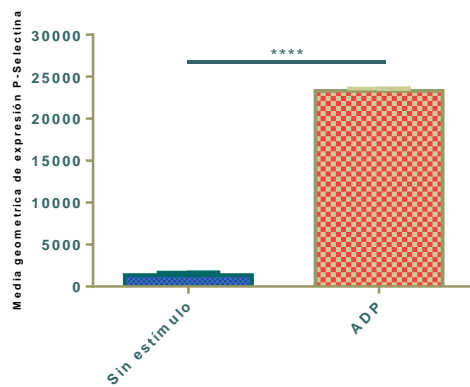
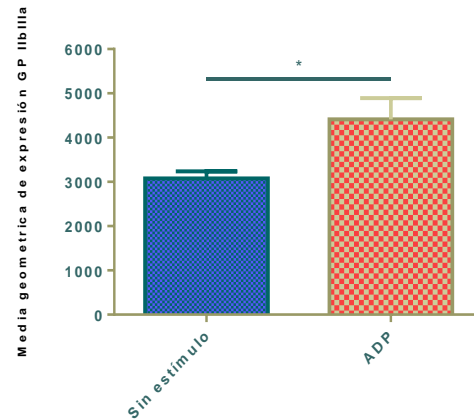
A**B****C**

Figura 9. Estimulación celular con ADP incrementa la expresión de P-Selectina y PAC-1 en la superficie plaquetaria. Notas: (A) Citometría de flujo representativa de los efectos del ADP sobre el aumento en la expresión de P-Selectina en la superficie plaquetaria. (B) Expresión de P-Selectina sobre la superficie plaquetaria de células sin estímulo y estimuladas con ADP. Los valores se muestran en promedio. (C) Expresión de GP IIb/IIIa sobre la superficie plaquetaria de células sin estímulo y estimuladas con ADP. Prueba *t* student, los valores se muestran en promedio \pm DS, $n=3$. **** $p<0.0001$, * $p<0.05$.

De igual manera que con ADP, la estimulación plaquetaria con colágeno aumenta significativamente la expresión de las proteínas membranales definidas como características de activación celular, el promedio de fluorescencia observado posterior a la estimulación con este agonista es considerablemente mayor a la fluorescencia observada con ADP y Epinefrina (Figura 10).

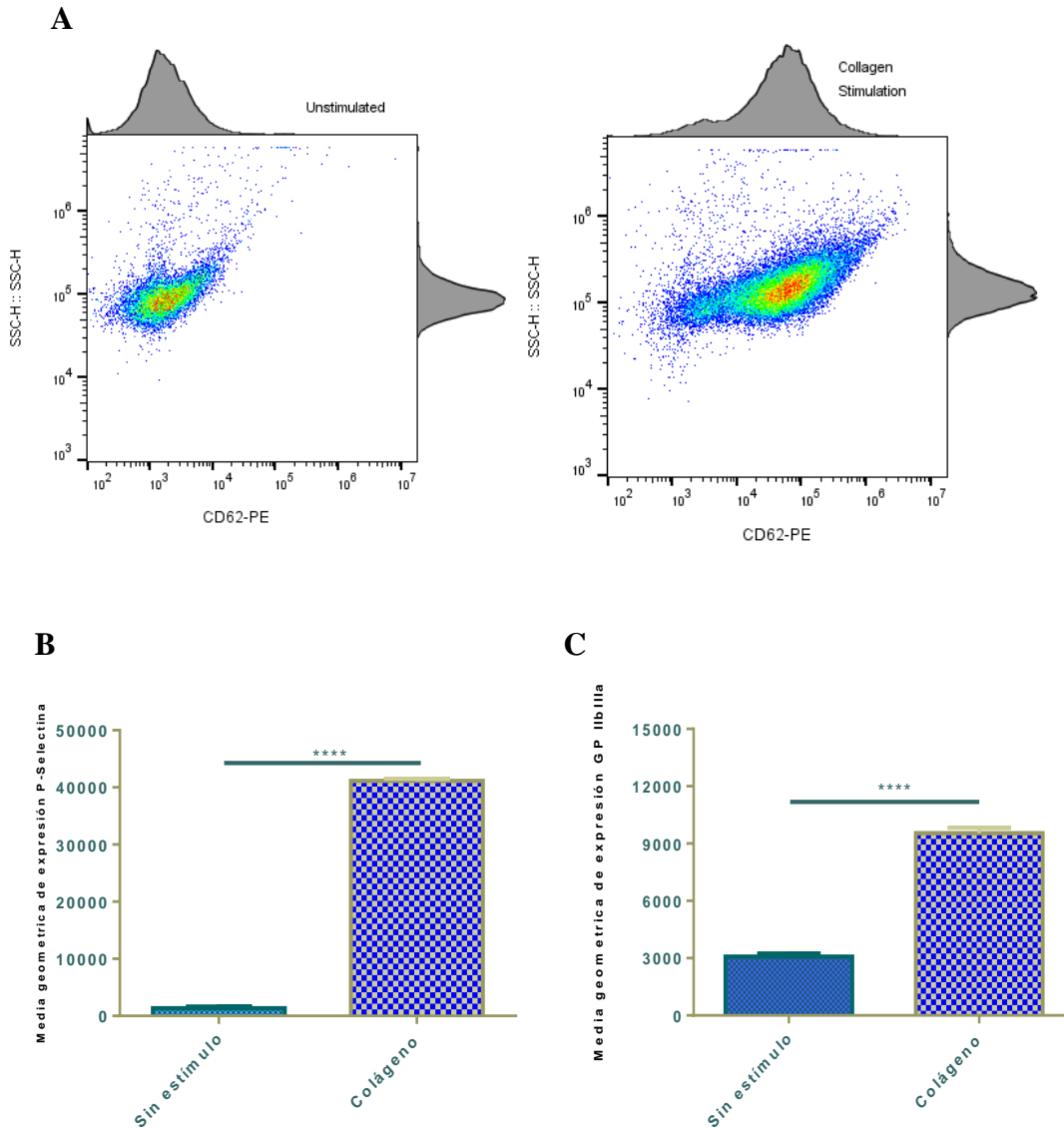


Figura 10. Estimulación celular con colágeno incrementa la expresión de P-Selectina y PAC-1 en la superficie plaquetaria. Notas: (A) Citometría de flujo representativa de los efectos del colágeno sobre el aumento en la expresión de P-Selectina en la superficie plaquetaria. (B) Expresión de P-Selectina sobre la superficie plaquetaria de células sin estímulo y estimuladas con colágeno. Los valores se muestran en promedio. (C) Expresión de GP IIb/IIIa sobre la superficie plaquetaria de células sin estímulo y estimuladas con colágeno. Prueba *t* student, los valores se muestran en promedio \pm DS, $n=3$. **** $p<0.0001$.

Finalmente, la estimulación con epinefrina también arroja diferencias significativas al compararlas con células en estado basal (Figura 11).

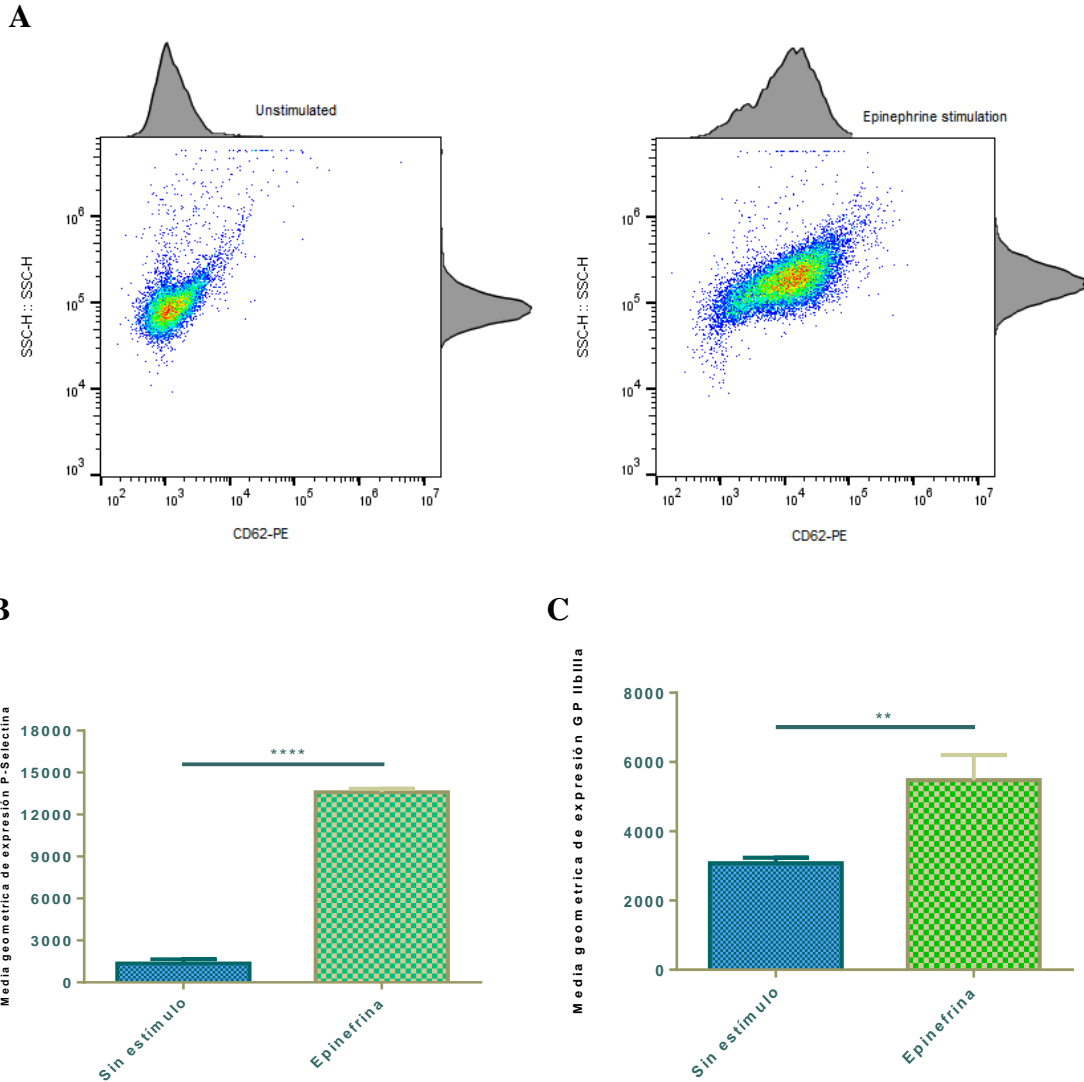


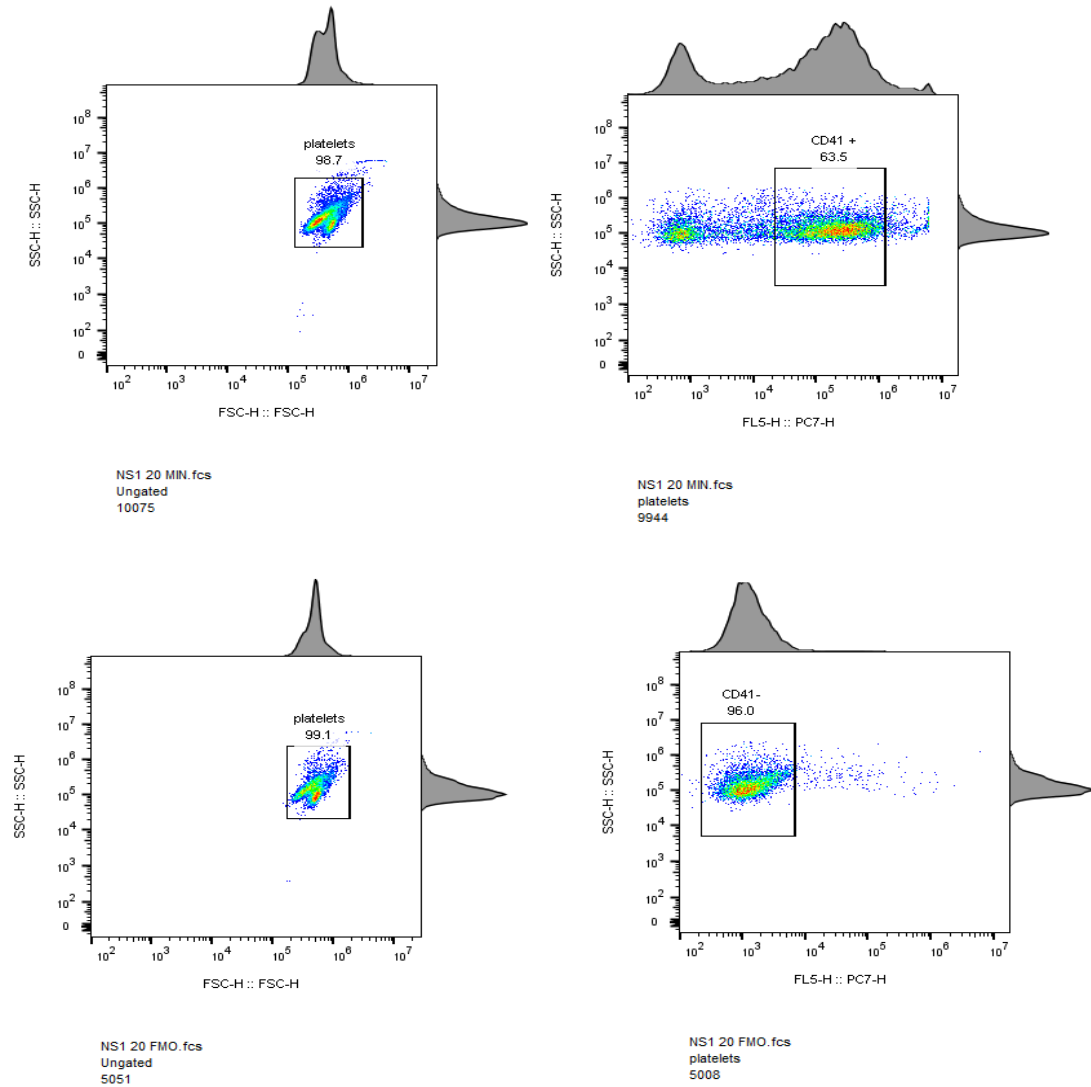
Figura 11. Estimulación celular con epinefrina incrementa la expresión de P-Selectina y PAC-1 en la superficie plaquetaria. Notas: **(A)** Citometría de flujo representativa de los efectos de epinefrina sobre el aumento en la expresión de P-Selectina en la superficie plaquetaria. **(B)** Expresión de P-Selectina sobre la superficie plaquetaria de células sin estímulo y estimuladas con epinefrina. Los valores se muestran en promedio. **(C)** Expresión de GP IIb/IIIa sobre la superficie plaquetaria de células sin estímulo y estimuladas con epinefrina. Prueba *t* student., los valores se muestran en promedio \pm SD, n=3. **** p <0.0001, ** p <0.01.

11.2.2. Cinética de activación con la proteína no estructural 1 de dengue

Una vez determinada la respuesta celular con los agonistas de activación conocidos, procedimos a realizar una cinética de activación celular respecto al tiempo con la proteína NS1, con una concentración de proteína de 2.5 μ g/mL. Se evaluaron 4 tiempos de estímulo diferentes (20, 40, 60 y 120 minutos). Los resultados obtenidos se muestran a continuación (Fig. 12, 13, 14, 15). En los *plots* observados a continuación se muestra primeramente la identificación de la población dadas las

características estructurales de las células (A), seguido de la confirmación mediante el uso del anticuerpo CD42 que funge como marcador celular (A) y finalmente la selección de la población que expresa doble positividad a los anticuerpos CD62 y PAC1 dirigidos a proteínas membranales expresadas en estado reactivo (B), debajo de los *plots*, en el caso A, o a un costado, para el caso B, se colocan los marcadores de isotipo identificados con una leyenda al pie de la imagen como FMO.

A



B

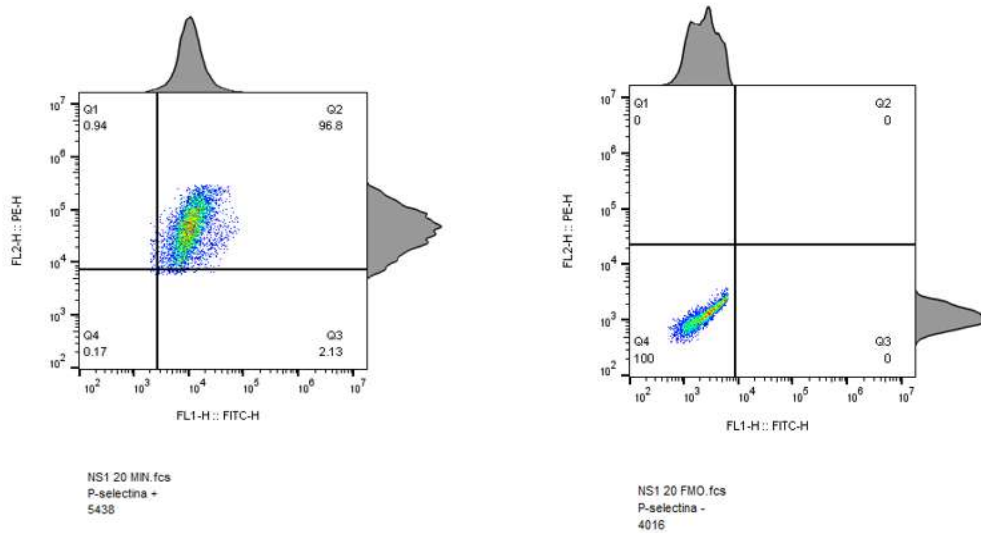
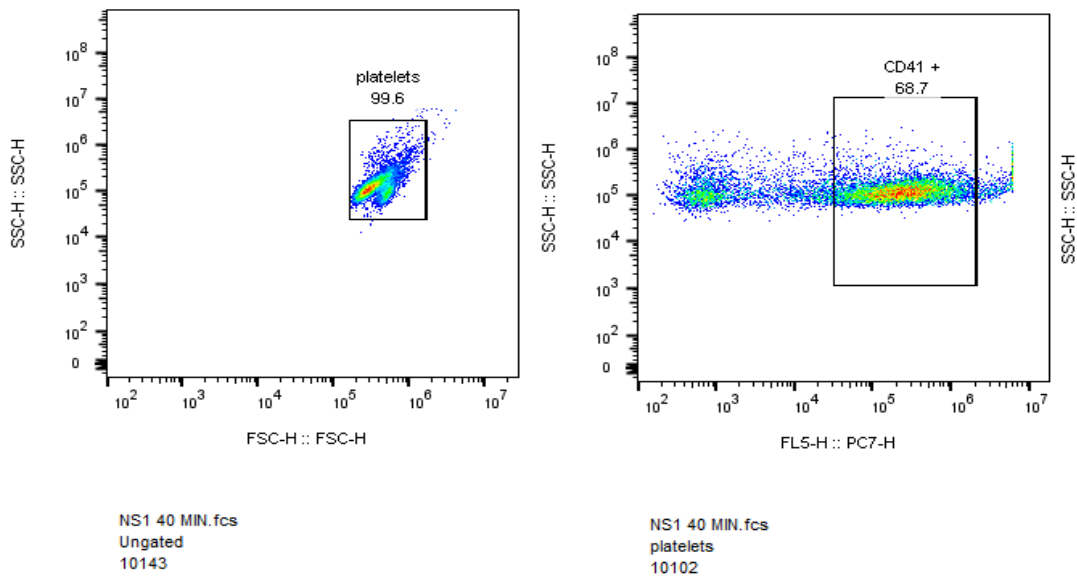
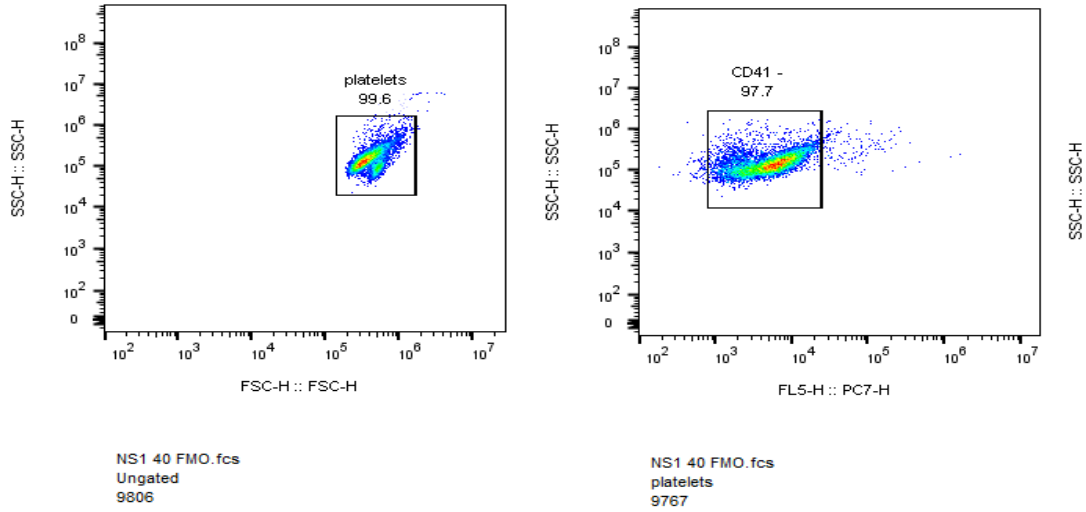


Figura 12. Estimulación celular NS1 DENV (2.5 µg/mL) durante 20 minutos. Notas: (A) Selección de población positiva al marcador de identidad plaquetaria CD41, se muestra también en la parte inferior el control de isotipo respectivo. (B) Población que presenta expresión de P-selectina y GP IIb/IIIa, se muestra el respectivo control isotipo (derecha).

A





B

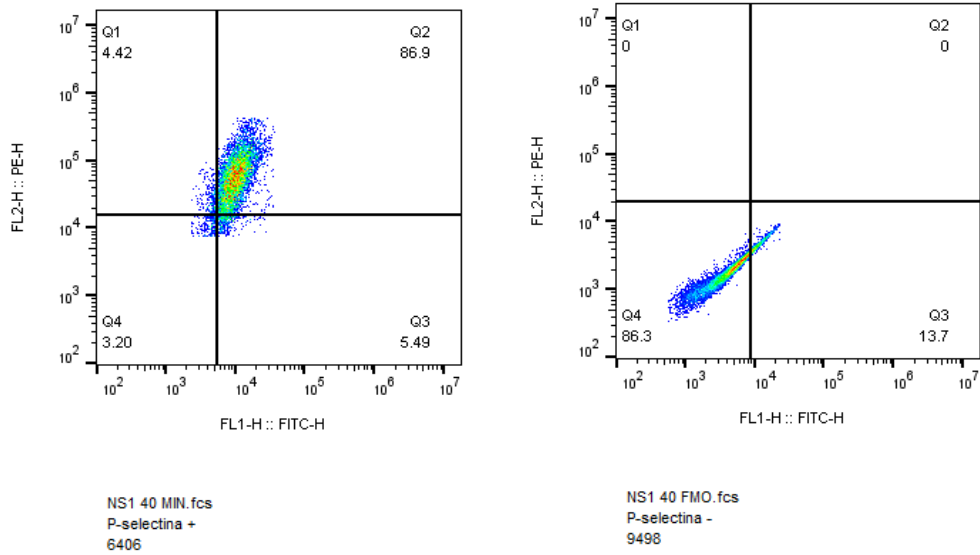
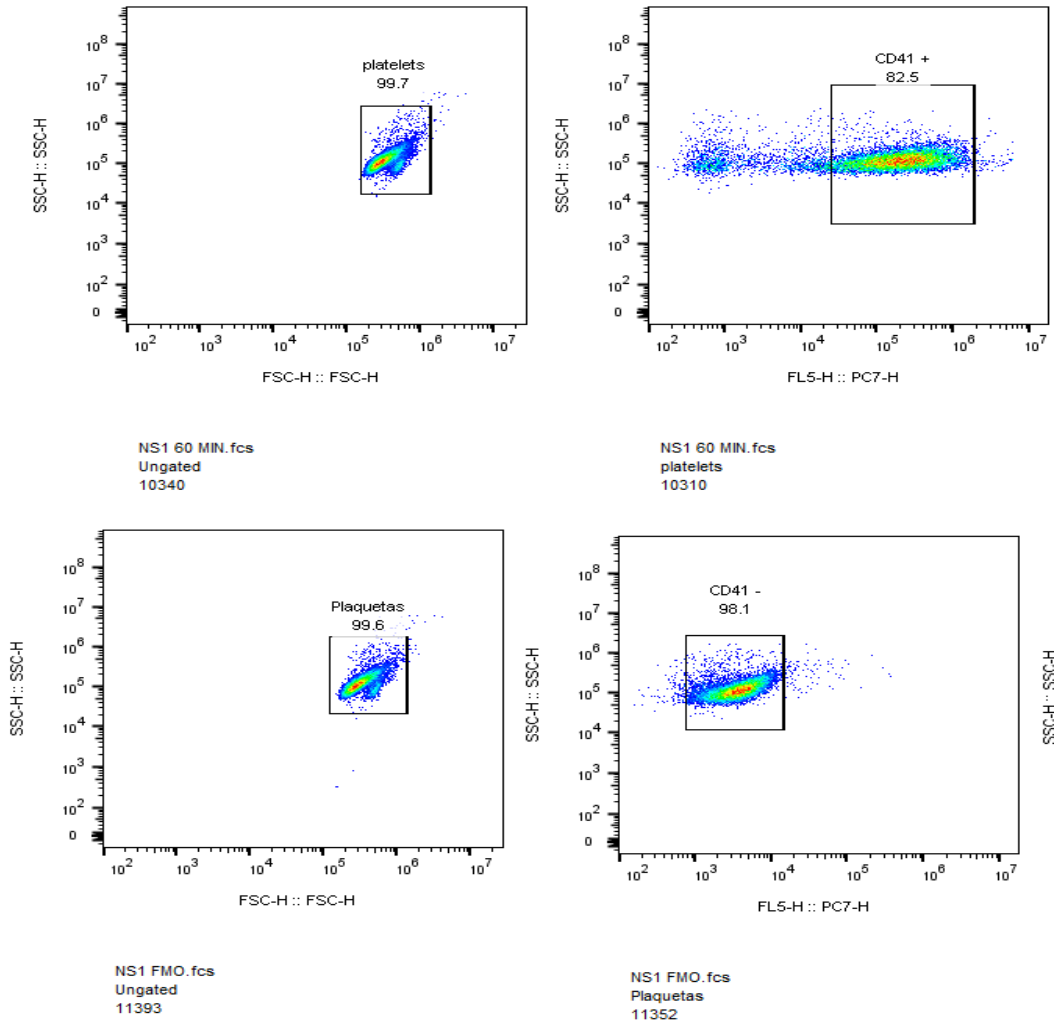


Figura 13. Estimulación celular NS1 DENV (2.5 µg/mL) durante 40 minutos. Notas: **(A)** Selección de población positiva al marcador de identidad plaquetaria CD41, se muestra también en la parte inferior el control de isotipo respectivo. **(B)** Población que presenta expresión de P-selectina y GP IIbIIIa, se muestra el respectivo control isotipo (derecha).

A



B

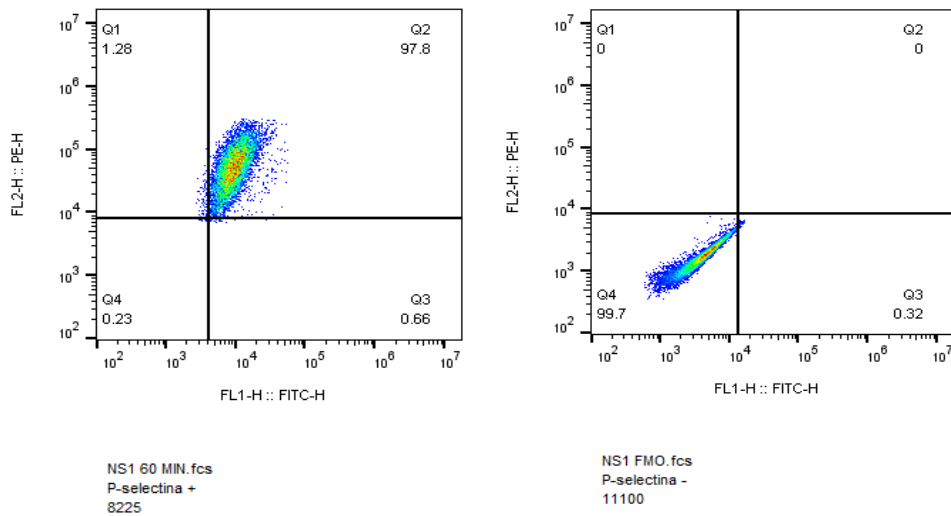
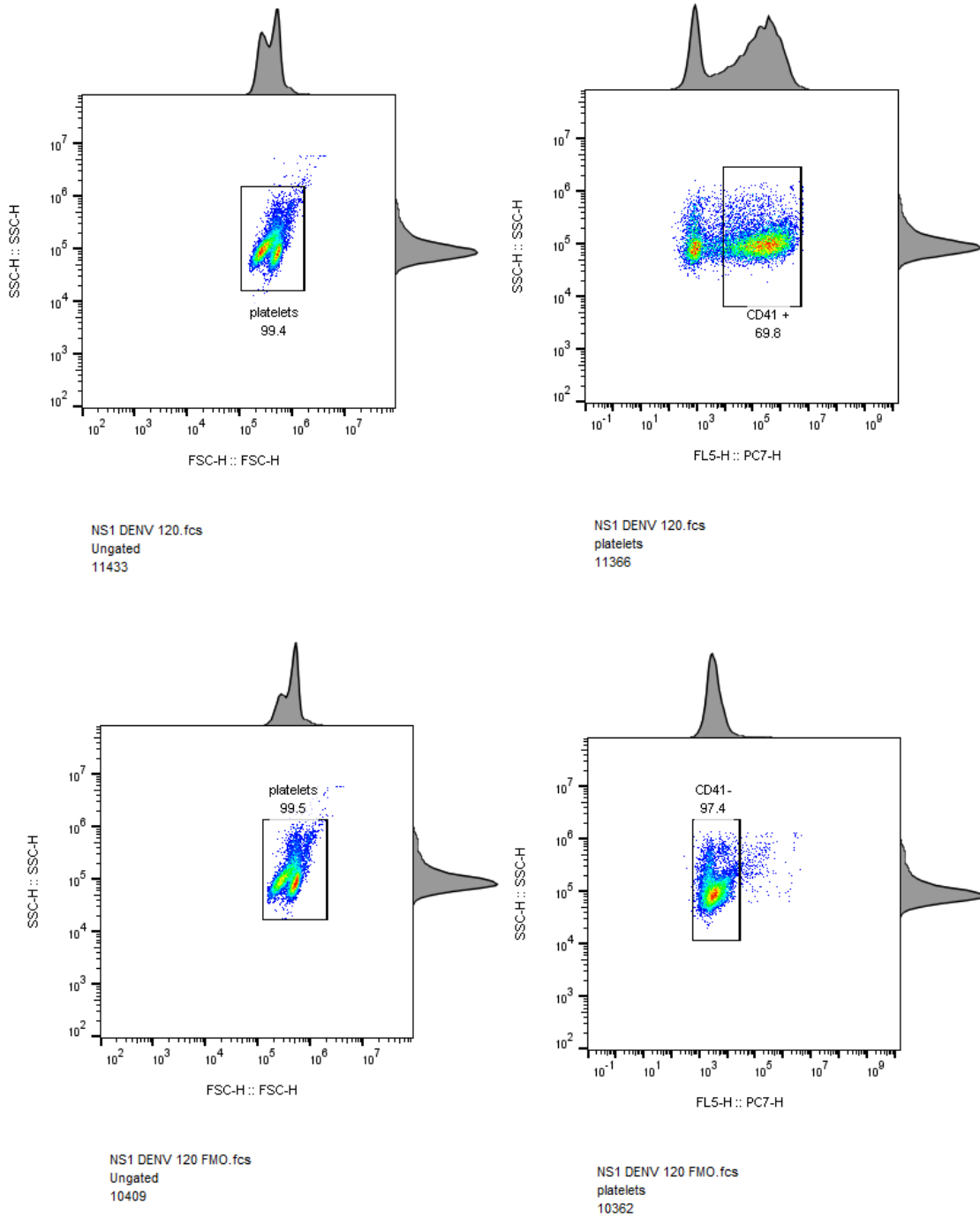


Figura 14. Estimulación celular NS1 DENV (2.5 µg/mL) durante 60 minutos. Notas: (A) Selección de población positiva al marcador de identidad plaquetaria CD41, se muestra también en la parte inferior el control de isotipo respectivo. (B) Población que presenta expresión de P-selectina y GP IIb/IIIa, se muestra el respectivo control isotipo (derecha).

A



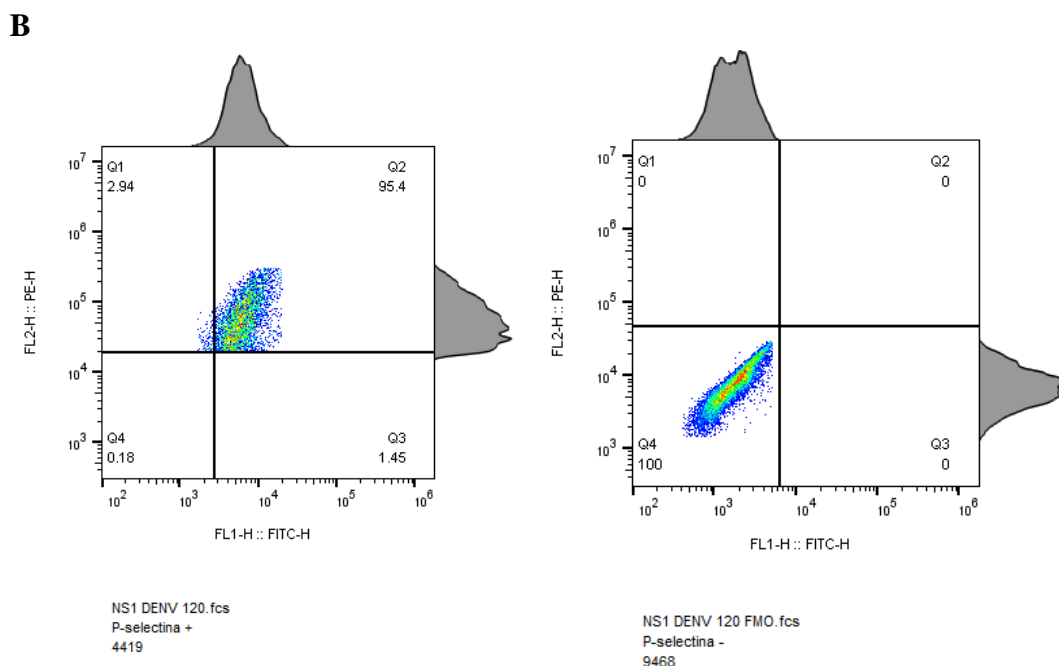


Figura 15. Estimulación celular NS1 DENV (2.5 µg/mL) durante 120 minutos. Notas: (A) Selección de población positiva al marcador de identidad plaquetaria CD41, se muestra también en la parte inferior el control de isotipo respectivo. (B) Población que presenta expresión de P-selectina y GP IIbIIIa, se muestra el respectivo control isotipo (derecha).

Se comparo la media geométrica de expresión tanto de GP IIbIIIa, como de P-selectina en cada uno de los tiempos de estimulación y se compararon con la expresión basal de los receptores. Los resultados de dichas comparaciones muestran un aumento significativo de la expresión de P-Selectina y el complejo glicoproteico a los 40 y 60 minutos en comparación con la expresión basal de los mismos; además es posible observar la característica campana de activación plaquetaria que inicia a los 20 minutos de estímulo con un ligero aumento en la expresión de los marcadores de activación los cuales alcanzan un punto máximo en 40 y 60 minutos y decaen a los 120 minutos (Fig. 16, 17). En la siguiente tabla se muestra la media \pm la DS de las repeticiones realizadas durante la cinética.

Tabla 8. Media geométrica de expresión de marcadores de activación en plaquetas estimuladas con NS1 DENV a diferentes tiempos.

Condición	Media de emisión de fluorescencia de expresión de Glicoproteína IIbIIIa	Media de emisión de fluorescencia de expresión de P-Selectina
0 minutos de estímulo	3078 \pm 160	1358 \pm 307
20 minutos de estímulo	4022 \pm 278	18719 \pm 255
40 minutos de estímulo	5083 \pm 281	46730 \pm 898
60 minutos de estímulo	5429 \pm 380	46639 \pm 489

120 minutos de estímulo	2923 ± 324	19587 ± 471
--------------------------------	------------	-------------

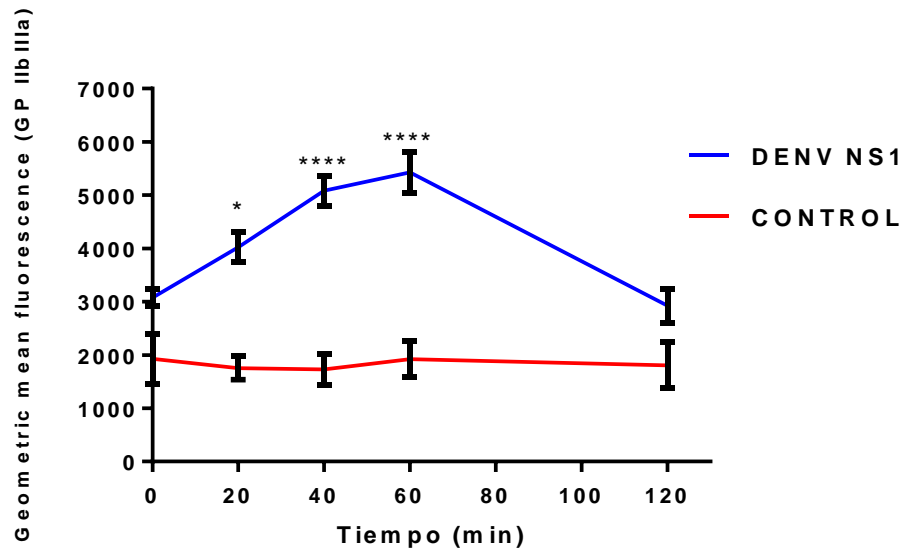


Figura 16. Cinética de la expresión PAC-1 respecto al tiempo de estimulación con NS1 DENV. Expresión de la GP IIb/IIIa sobre la superficie plaquetaria de células sin estímulo, a diferentes tiempos de estimulación con la proteína NS1 de DENV. Los valores se muestran en promedio ± DS, n=3. **** $p < 0.0001$, * $p < 0.05$. ANOVA de una vía. Prueba *post hoc* Tukey.

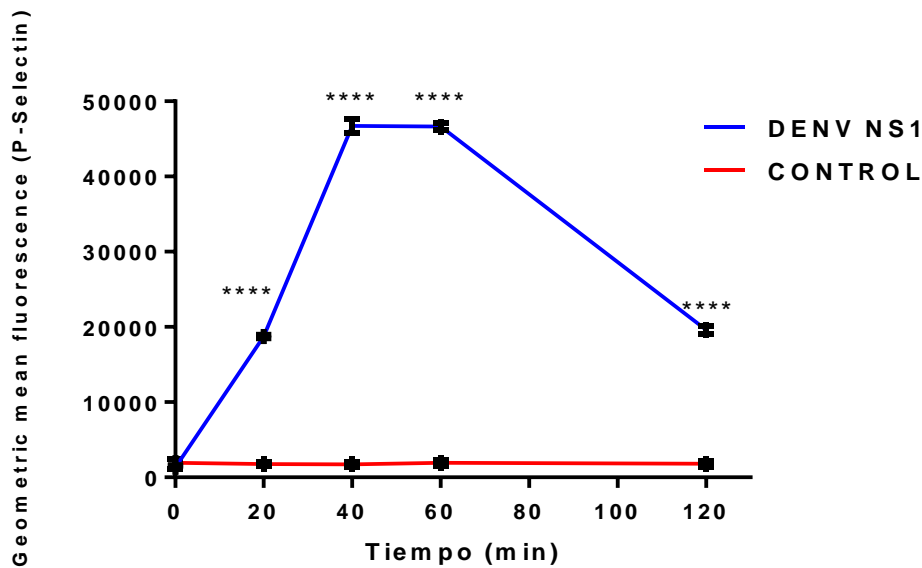


Figura 17. Cinética de la expresión P-selectina respecto al tiempo de estimulación con NS1 DENV. Expresión del receptor P-selectina sobre la superficie plaquetaria de células sin estímulo y a diferentes tiempos de estimulación con la proteína NS1 de DENV. Los valores se muestran en promedio ± DS, n=3. **** $p < 0.0001$. ANOVA una vía. Prueba *post hoc* Tukey.

De manera subsecuente, seleccionamos el tiempo de estímulo de 60 minutos que presenta el resultado promedio de fluorescencia emitida más alto y se comparó individualmente con los

resultados obtenidos de la estimulación con los agonistas conocidos (Fig. 18, 19). La expresión del complejo glicoproteico posterior a la estimulación con NS1 DENV, es semejante a la obtenida tras el estímulo con ADP y epinefrina, pero significativamente menor a la observada con colágeno. Por otro lado, la expresión de P-Selectina es significativamente mayor tras el estímulo con la proteína NS1 al confrontarse con la expresión observada posterior al uso de estímulos conocidos.

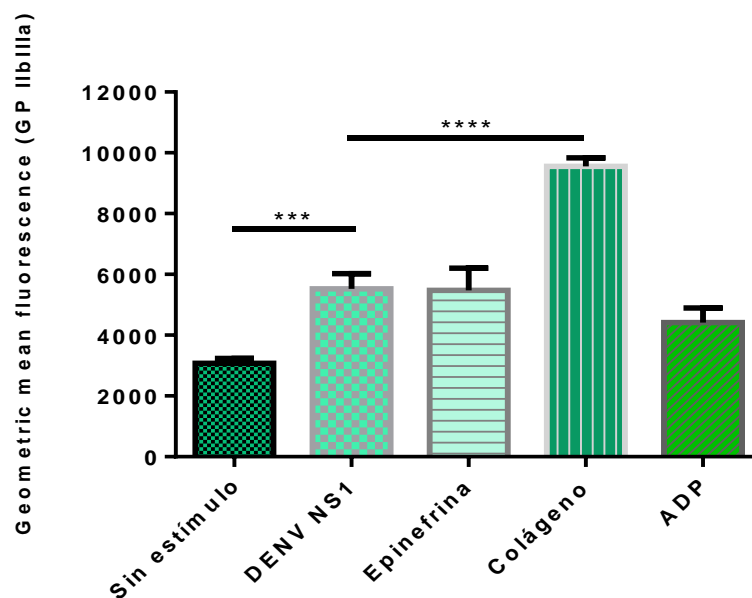


Figura 18. Expresión de PAC-1 en respuesta a diferentes estímulos: NS1 de DENV y agonistas conocidos. Expresión del receptor GP IIb/IIIa sobre la superficie plaquetaria de células sin estímulo y bajo el estímulo con NS1 por 60 minutos y con agonistas conocidos. Los valores se muestran en promedio \pm DS, n=3. **** p <0.0001. ANOVA una vía. Prueba *post hoc* Tukey.

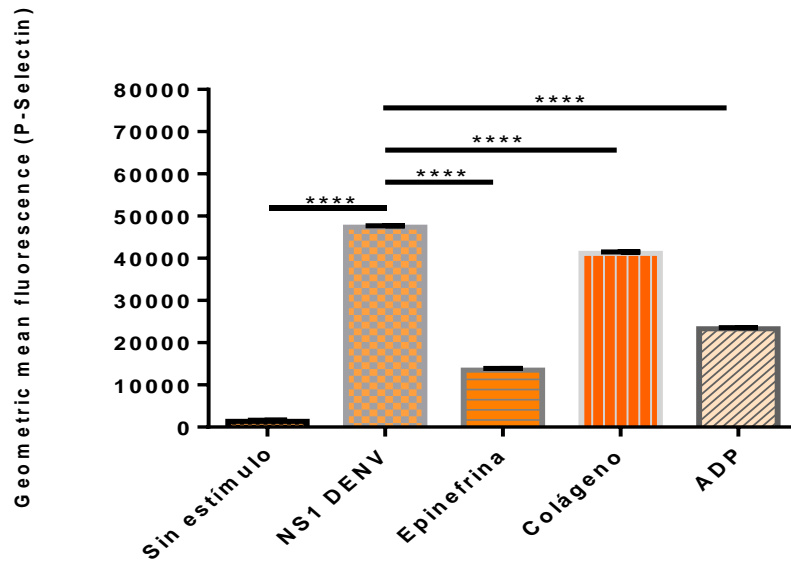
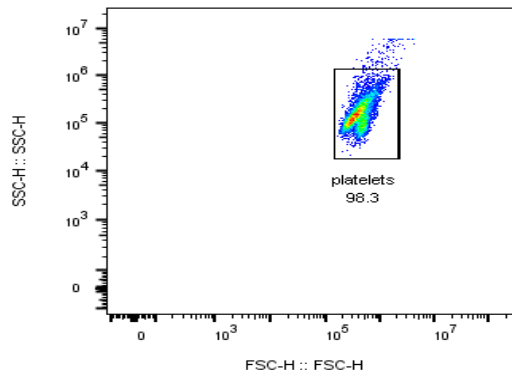


Figura 19. Expresión de P-Selectina en respuesta a NS1 de DENV y agonistas conocidos. Expresión del receptor P-Selectina sobre la superficie plaquetaria de células sin estímulo y bajo el estímulo con NS1 por 60 minutos y con agonistas conocidos. Los valores se muestran en promedio \pm DS, $n=3$. **** $p<0.0001$. ANOVA una vía. Prueba *post hoc* Tukey.

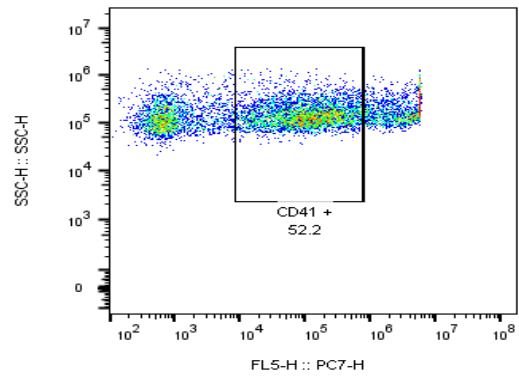
11.2.3. Cinética de activación con la proteína no estructural 1 de Zika

Posterior a la realización de la cinética de activación celular con la NS1 de virus de dengue con respecto al tiempo, se realizó lo mismo con la proteína NS1 de Zika, con una concentración de proteína de 2.5 $\mu\text{g/mL}$. Se evaluaron 4 tiempos de estímulo diferentes (20, 40, 60 y 120 minutos). Los resultados obtenidos se muestran a continuación (Fig. 20, 21, 22, 23). Se siguió el mismo procedimiento experimental. Primero se determinó la población correspondiente a las plaquetas (A), después se seleccionaron los eventos que expresaran el marcador plaquetario CD41 (A), finalmente para corroborar la reactividad celular se seleccionaron los eventos que mostraran doble positividad a P-Selectina y GP IIbIIIa (B). Todos los *plots* están acompañados de su correspondiente control de isotipo, identificado con la leyenda FMO al pie de este.

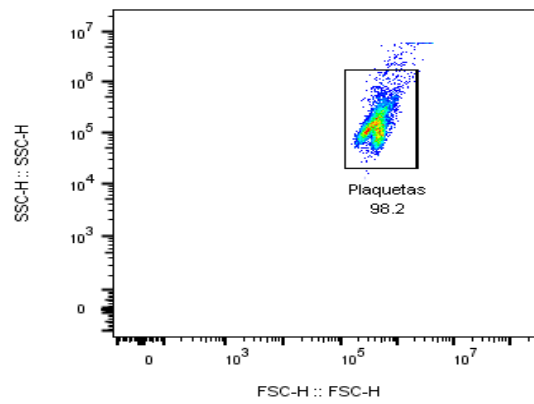
A



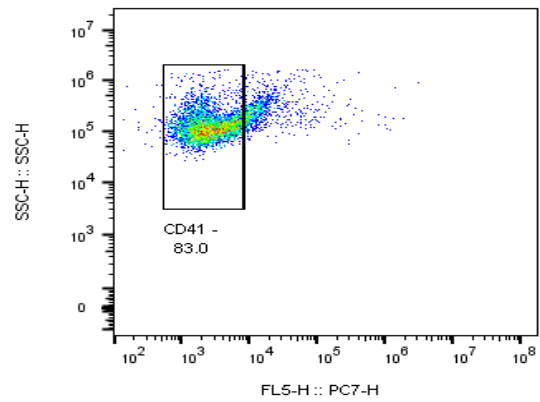
ZIKA 20.fcs
Ungated
8128



ZIKA 20.fcs
platelets
7990



ZIKA 20 FMO.fcs
Ungated
5640



ZIKA 20 FMO.fcs
Plaquetas
5538

B

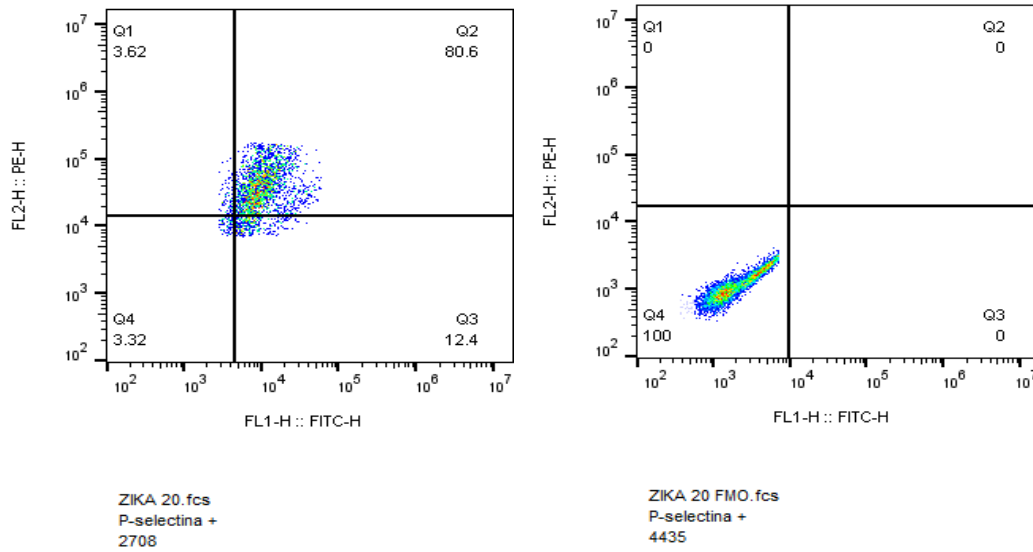
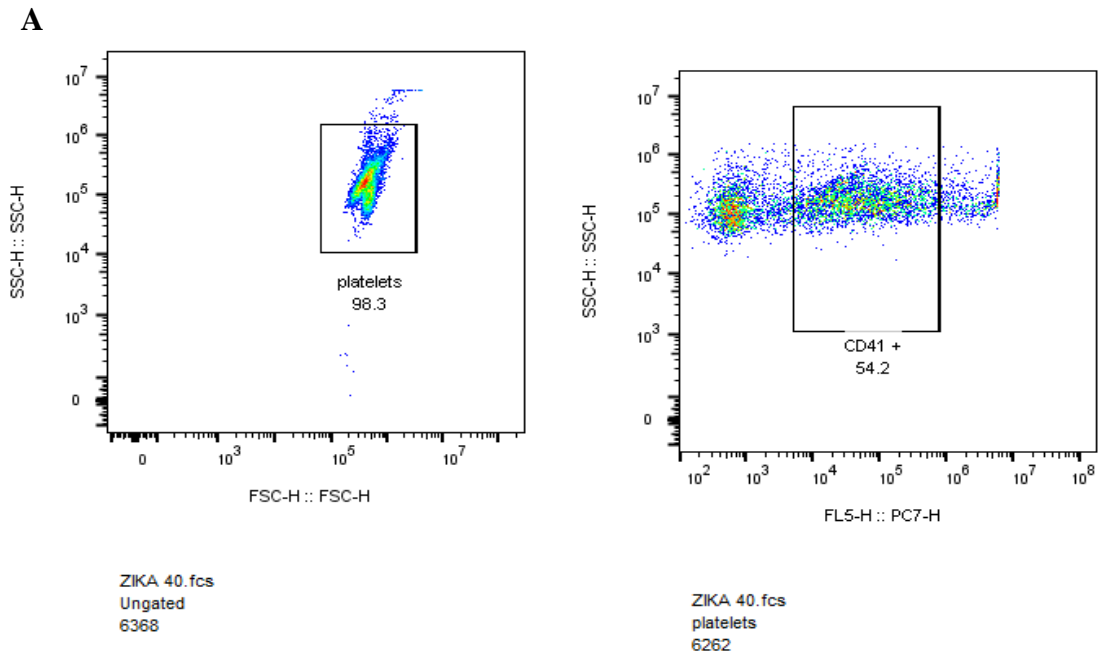
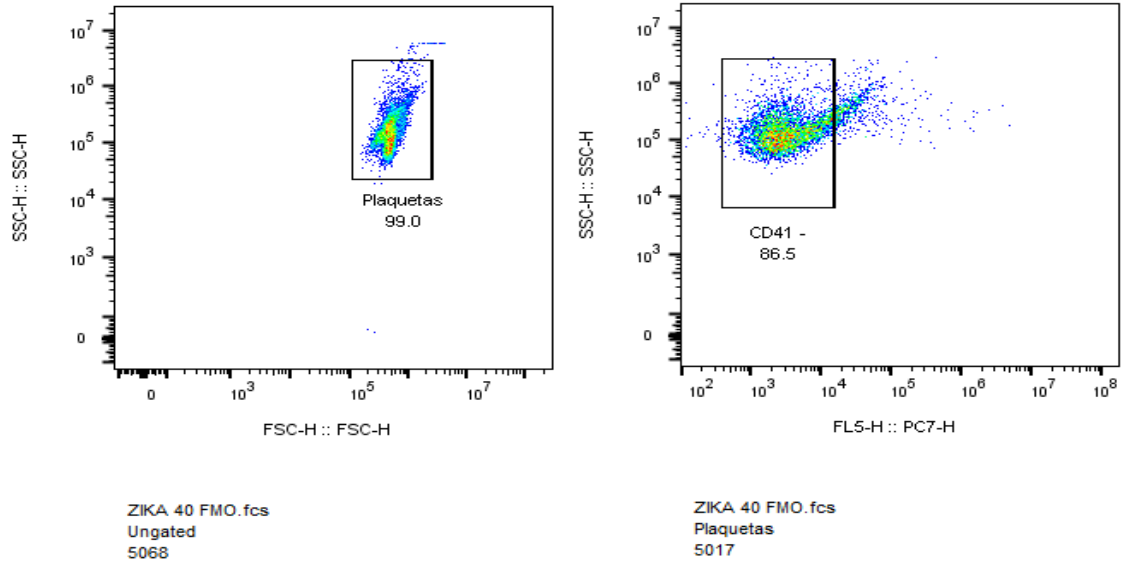


Figura 20. Estimulación celular NS1 ZIKV (2.5 µg/mL) durante 20 minutos. Notas: **(A)** Selección de población positiva al marcador de identidad plaquetaria CD41, se muestra también en la parte inferior el control de isotipo respectivo. **(B)** Población que presenta expresión de P-selectina y GP IIb/IIIa, se muestra el respectivo control isotipo (derecha).





B

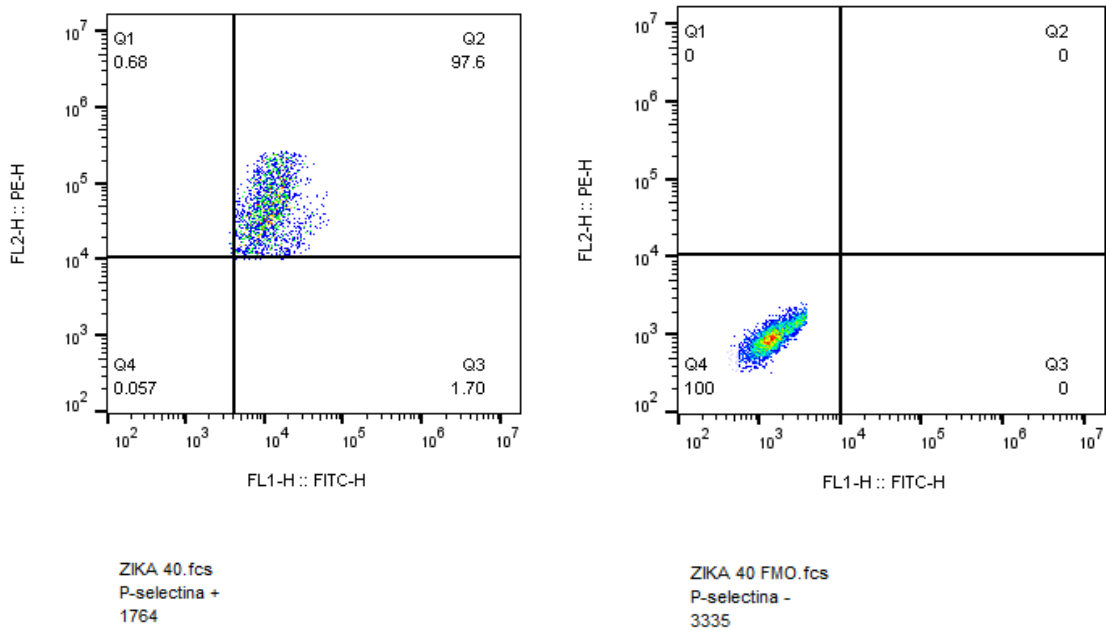
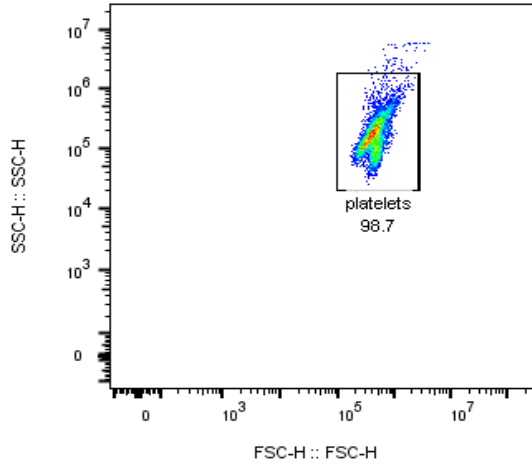
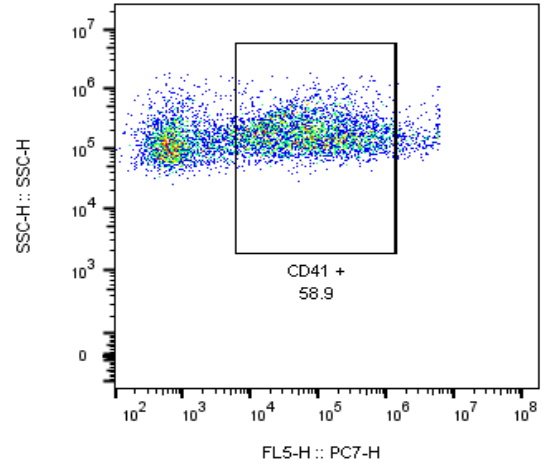


Figura 21. Estimulación celular NS1 ZIKV (2.5 µg/mL) durante 40 minutos. Notas: (A) Selección de población positiva al marcador de identidad plaquetaria CD41, se muestra también en la parte inferior el control de isotipo respectivo. (B) Población que presenta expresión de P-selectina y GP IIb/IIIa, se muestra el respectivo control isotipo (derecha).

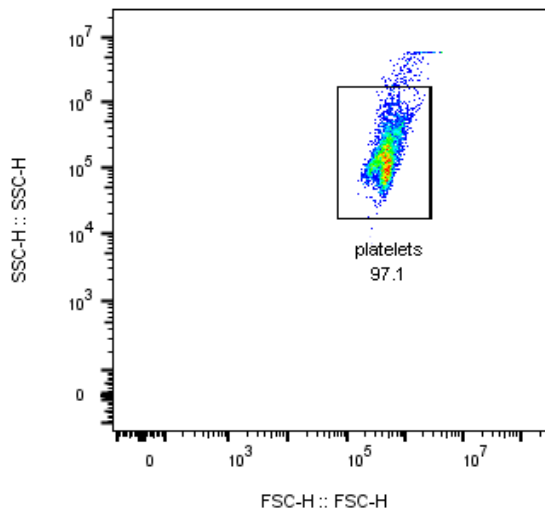
A



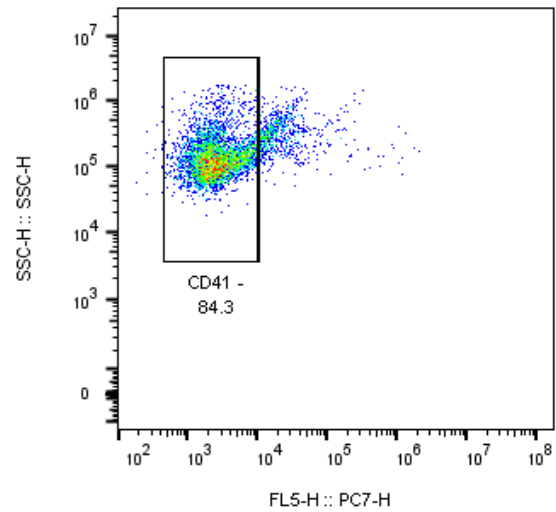
ZIKA 60.fcs
Ungated
5863



ZIKA 60.fcs
platelets
5789



ZIKA 60 FMO.fcs
Ungated
5155



ZIKA 60 FMO.fcs
platelets
5006

B

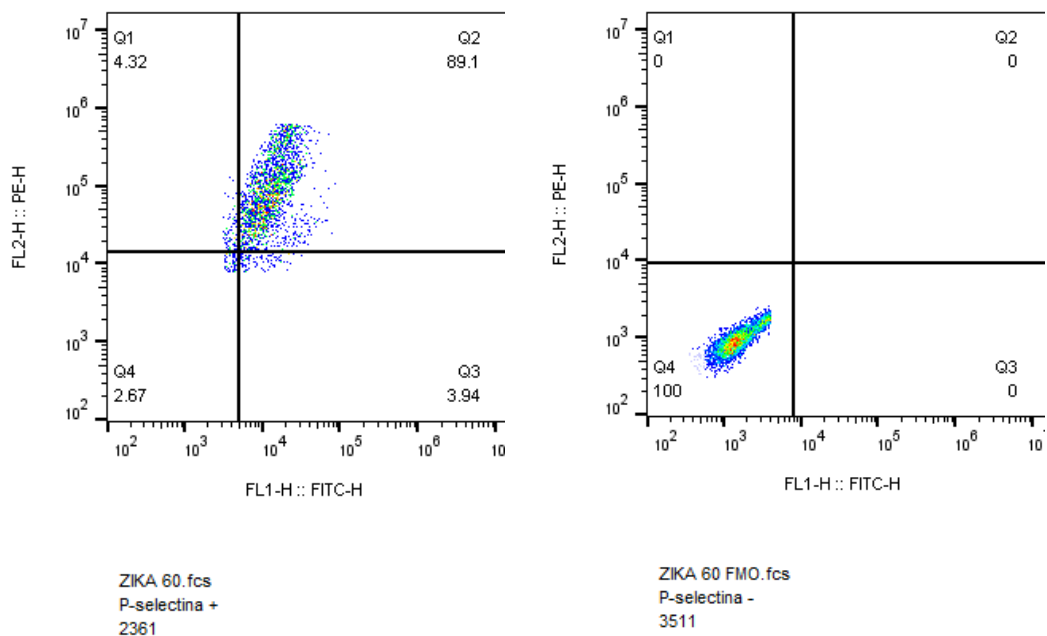
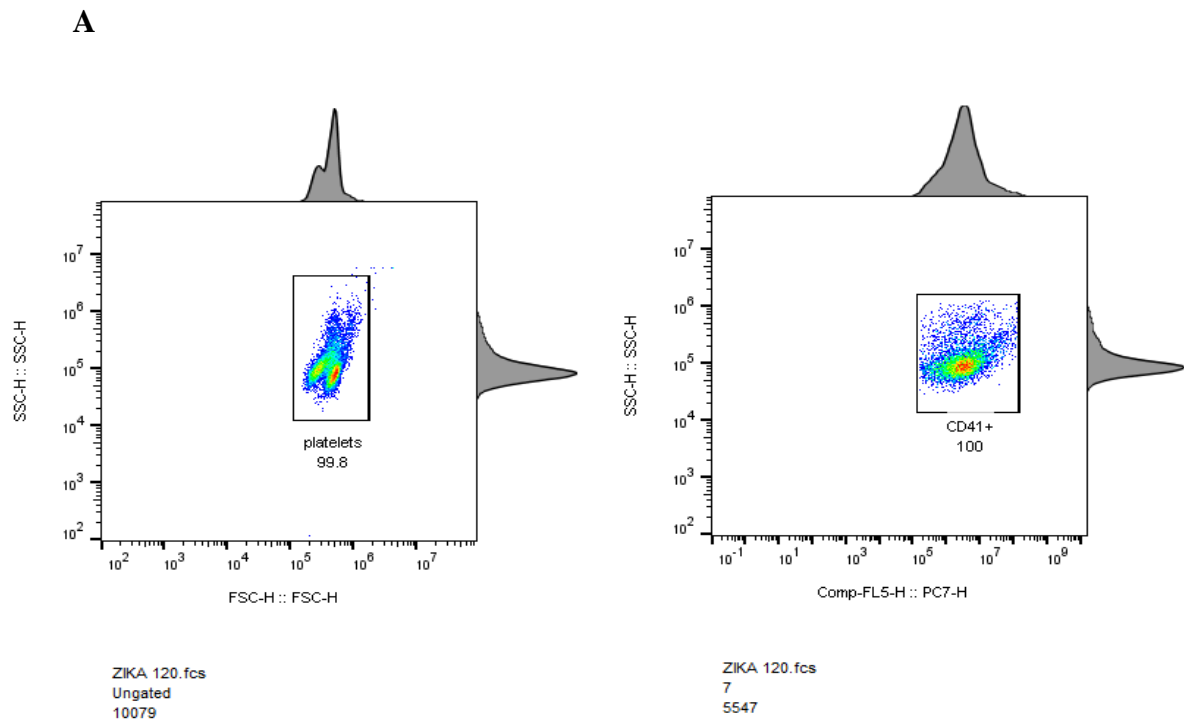


Figura 22. Estimulación celular NS1 ZIKV (2.5 µg/mL) durante 60 minutos. Notas: (A) Selección de población positiva al marcador de identidad plaquetaria CD41, se muestra también en la parte inferior el control de isotipo respectivo. (B) Población que presenta expresión de P-selectina y GP IIb/IIIa, se muestra el respectivo control isotipo (derecha).



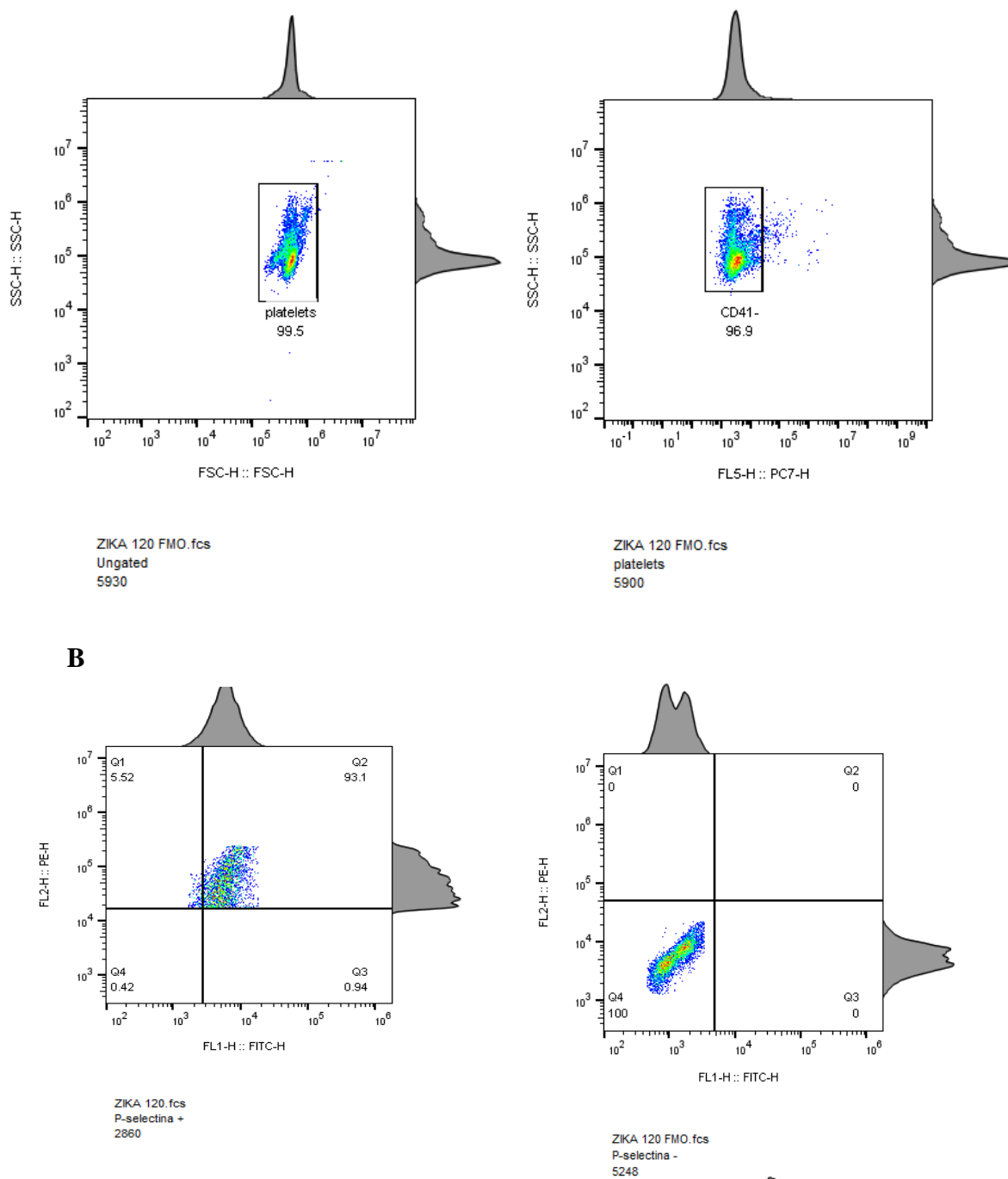


Figura 23. Estimulación celular NS1 ZIKV (2.5 µg/mL) durante 120 minutos. Notas: (A) Selección de población positiva al marcador de identidad plaquetaria CD41, se muestra también en la parte inferior el control de isotipo respectivo. (B) Población que presenta expresión de P-selectina y GP IIb/IIIa, se muestra el respectivo control isotipo (derecha).

Comparamos de igual manera la media geométrica de expresión de ambos marcadores de activación celular a los diferentes tiempos de estímulo observándose resultados similares a los

obtenidos con la proteína NS1 de dengue. Una fluorescencia a los 40 y 60 minutos significativamente mayor comparado con el estado basal en ambos receptores y de nuevo la apreciación de la característica campana de activación con un máximo a estos tiempos (40 y 60 minutos) y disminuido a los 20 y 120 minutos de estímulo (Fig. 24, 25). En la tabla 9 se muestran las medias \pm desviaciones estándar de la replicación de 3 experimentos independientes.

Tabla 9. Media geométrica de expresión de marcadores de activación en plaquetas estimuladas con NS1 ZIKV a diferentes tiempos.

Condición	Media de emisión de fluorescencia de expresión de Glicoproteína IIbIIIa	Media de emisión de fluorescencia de expresión de P-Selectina
0 minutos de estímulo	3078 \pm 160	1358 \pm 307
20 minutos de estímulo	6512 \pm 285	35902 \pm 1475
40 minutos de estímulo	12051 \pm 421	81474 \pm 1885
60 minutos de estímulo	12293 \pm 296	107320 \pm 630
120 minutos de estímulo	3143 \pm 264	19944 \pm 1182

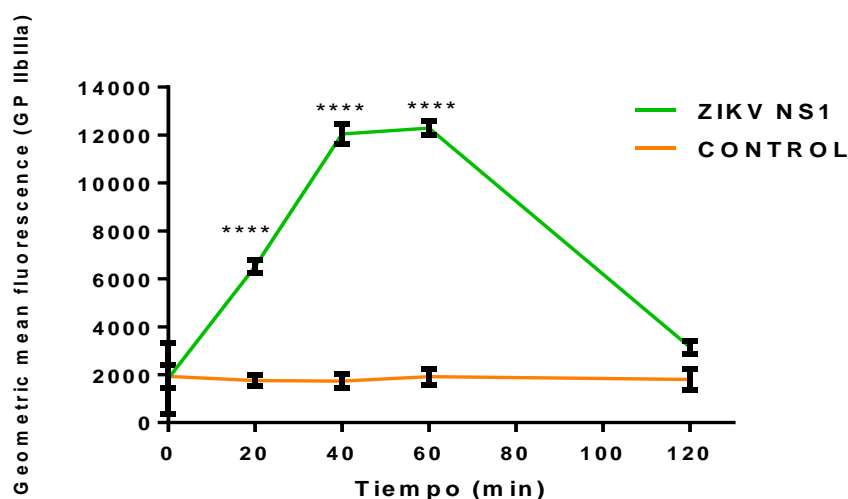


Figura 24. Comparación de la expresión de GP IIbIIIa respecto al tiempo de estimulación con NS1 ZIKV contra el estado basal. Expresión del receptor GP IIbIIIa sobre la superficie plaquetaria de células sin estímulo, a diferentes tiempos de estimulación con la proteína NS1 de ZIKV y estimuladas con los agonistas de activación conocidos. Los valores se muestran en promedio \pm DS, n=3. **** p <0.0001. ANOVA una vía. Prueba *post hoc* Tukey.

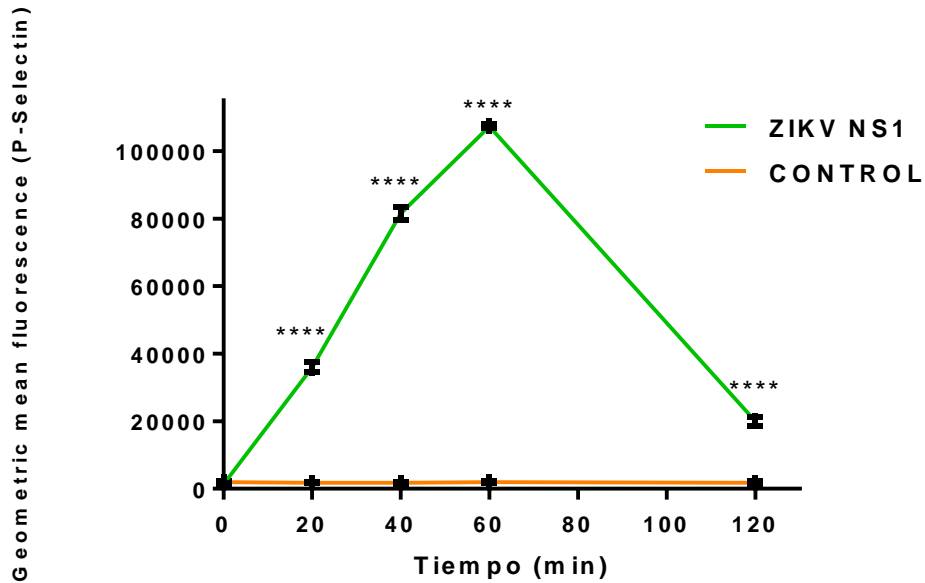


Figura 25. Comparación de la expresión P-selectina respecto al tiempo de estimulación con NS1 ZIKV. Expresión del receptor PAC-1 sobre la superficie plaquetaria de células sin estímulo, a diferentes tiempos de estimulación con la proteína NS1 de ZIKV. Los valores se muestran en promedio \pm DS, n=3. **** p <0.0001. ANOVA una vía. Prueba *post hoc* Tukey.

Sin embargo, contrario a lo observado con NS1 DENV, con la proteína viral de ZIKA al seleccionar la mayor fluorescencia emitida (60 minutos) y compararla con la fluorescencia emitida con los agonistas conocidos para ambos marcadores, se observa una diferencia significativa (p <0.0001) siendo mayor la expresión de P-Selectina y GP IIbIIIa en plaquetas estimuladas con la NS1 ZIKV al confrontarse con los resultados obtenidos con los agonistas conocidos (Fig. 26, 27).

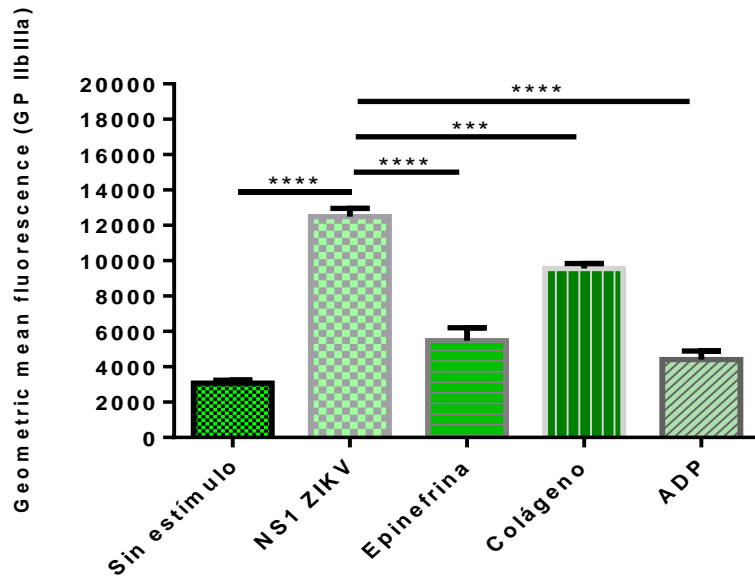


Figura 26. Expresión de GP IIb/IIIa en respuesta a diferentes estímulos: sin estímulo, NS1 de ZIKV y con agonistas conocidos. Expresión del receptor GP IIb/IIIa sobre la superficie plaquetaria de células sin estímulo y bajo el estímulo con NS1 de ZIKV por 60 minutos y con agonistas conocidos. Los valores se muestran en promedio \pm DS, n=3. **** p <0.0001, *** p <0.001. ANOVA una vía. Prueba *post hoc* Tukey.

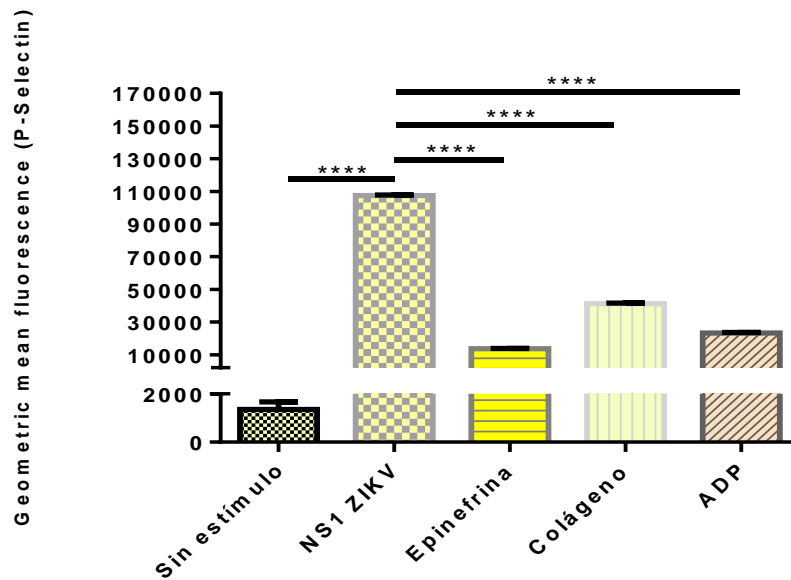


Figura 27. Expresión de P-Selectina en respuesta a diferentes estímulos: NS1 de ZIKV y agonistas conocidos. Expresión del receptor P-Selectina sobre la superficie plaquetaria de células sin estímulo y bajo el estímulo con NS1 de ZIKV por 60 minutos y con agonistas conocidos. Los valores se muestran en promedio \pm DS, n=3. **** p <0.0001. ANOVA una vía. Prueba *post hoc* Tukey.

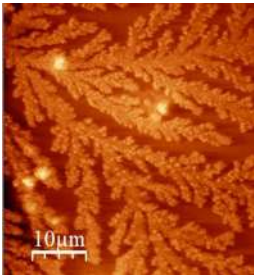
11.3. Evaluación de reactividad plaquetaria en respuesta a estímulo con NS1 de los virus de dengue y Zika mediante AFM



11.3.1 Determinación de condiciones para aplicar AFM en plaquetas

Dentro de los objetivos planteados para este proyecto se propuso la estandarización de las condiciones para la aplicación de AFM en plaquetas. La propuesta metodológica se basa en anteriores investigaciones que utilizan esta variante de la microscopia en células del torrente sanguíneo: eritrocitos y plaquetas, estudiando principalmente la interacción de estas células con diversos biomateriales (Carvalho et al., 2015; Ghosh et al., 2008; Kitamura et al., 2018; Wu et al., 2018).

Posterior a la obtención de plasma rico en plaquetas y la preparación de las superficies para lectura, como se mencionó en la sección de materiales y métodos. Procedimos a observar las estructuras obtenidas bajo cada condición. La evaluación de las condiciones se llevó a cabo en plaquetas en estado de reposo o inactivo. Las variantes se agruparon en 4 grupos de estudio: 1) PRP / PBS / mica, 2) PRP / PBS / cubreobjetos, 3) PRP / plasma autólogo / cubreobjetos, 4) PRP / Buffer de Tyrodes / cubreobjetos. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa WSxM 5.0, determinando las dimensiones de las estructuras logradas (Tabla 10).

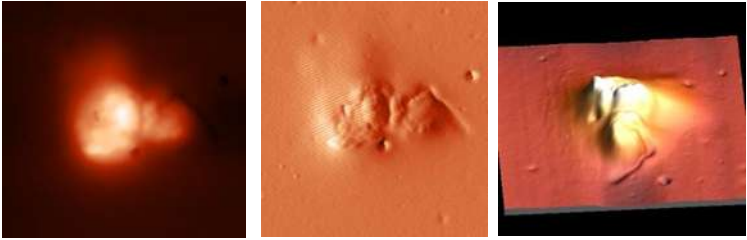
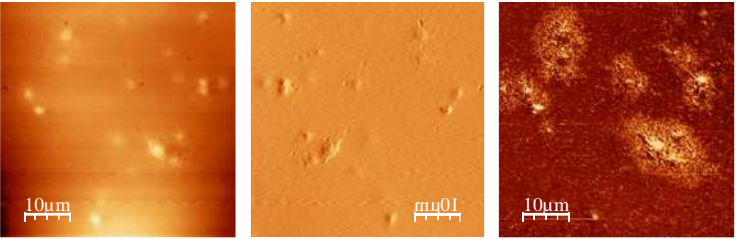
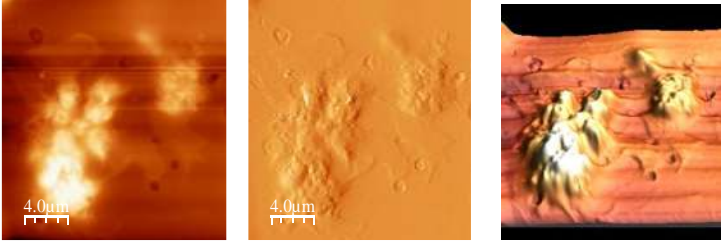
Tabla 10. Evaluación de plaquetas mediante AFM bajo diferentes condiciones.

Condición	Imagen	Dimensiones estructurales
PRP + Mica	No se logró la obtención imágenes bajo está condición.	No aplica
PRP + PBS + cubreobjetos de vidrio		Diámetro: 2.3 µm Altura: 341 nm Volumen: 6.4 fL.

<p>PRP + Plasma autólogo + cubreobjetos de vidrio</p>		<p>Diámetro: 3.2 μm Altura: 340 nm Volumen: 7.3 fL.</p>
<p>PRP + buffer de Tyrodes + cubreobjetos de vidrio</p>		<p>Diámetro: 3.1 μm Altura: 393 nm. Volumen: 7.5 fL.</p>

Se descarto de manera inicial el uso de mica como superficie de lectura ya que la fragilidad del material no permitía que la muestra fuese escaneada e impedía la obtención de imágenes, ya fuese porque se movía o era doblada por la fuerza de esta. Una vez descartada la mica como superficie de lectura, descartamos el PBS como solución de resuspensión del concentrado celular ya que al ser escaneada la muestra se observaba la formación de cristales propios del buffer, como se muestra en la fila 2 de la tabla 7. A pesar de la presencia de los cristales, si fue posible determinar las características de las estructuras observadas las cuales muestran un diámetro (2.3 μm) y volumen (6.4 fL) propios de las plaquetas, corroborando la presencia y el estado de inactivación de estas. La resuspensión con plasma autólogo y buffer de Tyrodes permiten la observación y análisis de estructuras claras sin la formación de cristales en el caso del buffer y con poca presencia de artefactos en el caso del plasma autólogo. En ambos casos es posible observar estructuras de entre 3.1 y 3.2 μm y un volumen que va de 7.3 a 7.5 fL. Sin embargo, apoyados por el grupo de investigación del Dr. Menchaca Arredondo, expertos en AFM, decidimos continuar los trabajos de investigación con la condición: PRP/buffer de Tyrodes/cubreobjetos, ya que es posible observar imágenes más limpias, facilitando su análisis estructural. Al determinarse esta condición como la adecuada para la aplicación de AFM en plaquetas, procedimos a corroborar su aplicación en células activadas. Se evaluaron plaquetas activadas *in vitro* con los agonistas de activación: ADP, colágeno y epinefrina, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 11).

Tabla 11. Evaluación estructural de plaquetas activadas *in vitro* con agonistas conocidos mediante AFM.

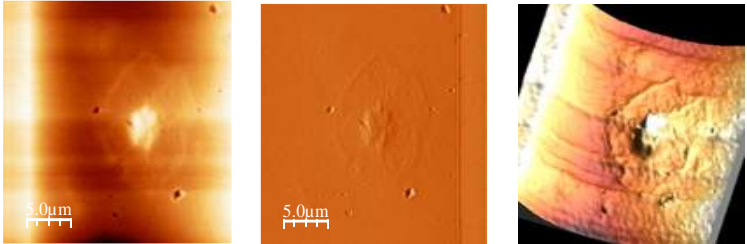
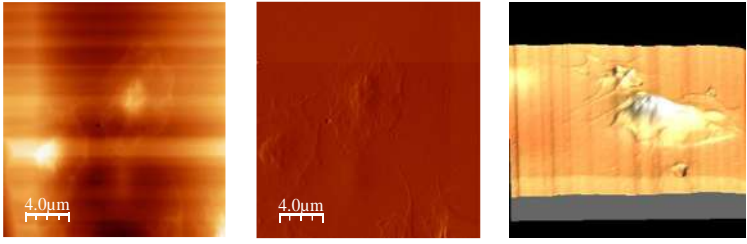
Condición	Imagen	Dimensiones estructurales
PRP + buffer de Tyrodes + ADP + cubreobjetos de vidrio		<p>Diámetro: 8.0 μm Altura: 352 nm. Volumen: 19.6 fL.</p>
PRP + buffer de Tyrodes + Colágeno + cubreobjetos de vidrio		<p>La imagen muestra agregados plaquetarios.</p>
PRP + buffer de Tyrodes + Epinefrina + cubreobjetos de vidrio		<p>La imagen muestra la agregación de plaquetas.</p>

En el caso de las plaquetas estimuladas con ADP, fue posible observar estructuras que aumentan ligeramente su tamaño a 8 μm y que casi triplican su volumen (19.6 fL), sello característico de una plaqueta reactiva. Así como una superficie claramente irregular comparada con las células observadas en estado no reactivo. Por otro lado, al activar las plaquetas con colágeno y epinefrina es posible observar agregados plaquetarios formados por más de 3 estructuras y la aparición de pseudópodos en estas, morfología característica de células en estado de activación.

11.3.2. Evaluación de reactividad plaquetaria en respuesta a proteína NS1 de los virus de dengue y Zika

Una vez determinadas las condiciones aptas para la aplicación de la técnica de AFM en plaquetas, procedimos a observar las consecuencias en la morfología plaquetaria al ser expuestas a las proteínas NS1 tanto del virus de dengue, como del virus de Zika. En ambos casos, es posible observar plaquetas que presentan una morfología característica de activación aumentando su tamaño hasta 10-14 μm y disminuyendo su altura en contraste con las células no activadas. Además, es posible observar en la imagen, una prolongación uniforme de su membrana con aparente formación de pseudopodos (Tabla 12).

Tabla 12. Evaluación estructural de plaquetas activadas *in vitro* con proteína NS1 de los virus de dengue y Zika.

Condición	Imagen	Dimensiones estructurales
PRP + buffer de Tyrodes + DENV NS1 + cubreobjetos de vidrio		Diámetro: 8.0 – 14 μm Altura: 160 nm.
PRP + buffer de Tyrodes + ZIKV NS1 + cubreobjetos de vidrio		Diámetro: 7.0 – 10 μm Altura: 200 nm.

11.4. Evaluación de reactividad plaquetaria en respuesta a estímulo con NS1 de los virus de dengue y Zika mediante QCM

11.4.1. Determinación de condiciones para la aplicación de QCM en plaquetas

La determinación de las condiciones idóneas para el uso de la QCM se basó en los trabajos reportados previamente por 3 grupos de investigación que utilizan esta técnica en células encontradas en circulación sanguínea, incluidas las plaquetas (Dar-fu et al., 2006; Li et al., 2013; Santos-Martínez et al., 2015).

Se utilizó una concentración de NS1 de dengue y Zika de 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluidas en buffer de fosfatos, concentración utilizada en AFM y en citometría de flujo. Inicialmente se habían propuesto 3 flujos de inyección para la proteína: 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 5 $\mu\text{L}/\text{min}$; sin embargo, decidimos continuar con una potencia de inyección de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 30 minutos, ya que con un flujo de inyección de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ se lograba la adhesión inicial de la proteína, pero la propia velocidad del flujo des adhería las proteínas aumentando la frecuencia de esta (información no mostrada). Con el flujo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ se lograba la adhesión de la proteína, pero por cuestiones de tiempo y volumen continuamos con 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ manteniéndose la temperatura en $25^\circ\text{C} \pm 2.5$ para lograr la obtención de la monocapa proteica sobre la superficie del cuarzo. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado (Fig. 28, 29).

En la figura 28 podemos observar el resultado de la inyección de la proteína NS1 de dengue. Es posible observar como la frecuencia de oscilación del cuarzo disminuye alrededor de 0.0015 MHz y se mantiene con mínimas modificaciones a lo largo del ensayo. De igual manera la proteína NS1 de Zika muestra una buena adhesión a la superficie de la microbalanza como se muestra en la figura 29 con una disminución en la frecuencia de oscilación posterior a la inyección de la proteína, la cual se mantiene oscilando a la misma frecuencia con respecto del tiempo transcurrido del ensayo.

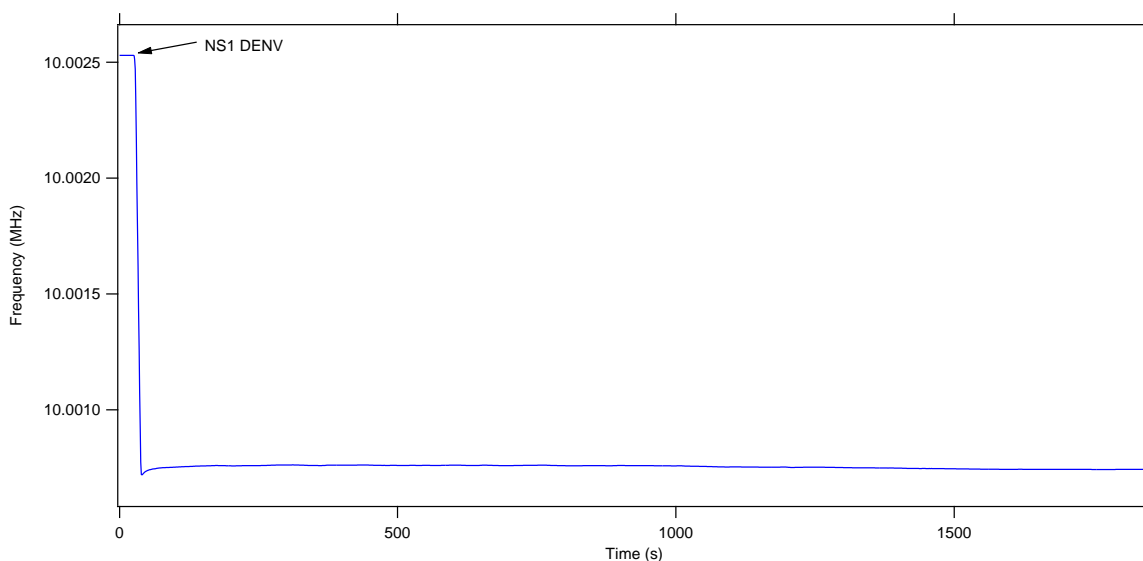


Figura 28. Evaluación de la adición de proteína NS1 DENV evaluada por QCM. Gráfico representativo del cambio en la frecuencia consecuyente a la adición de proteína NS1 DENV (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con respecto al tiempo transcurrido, línea azul.

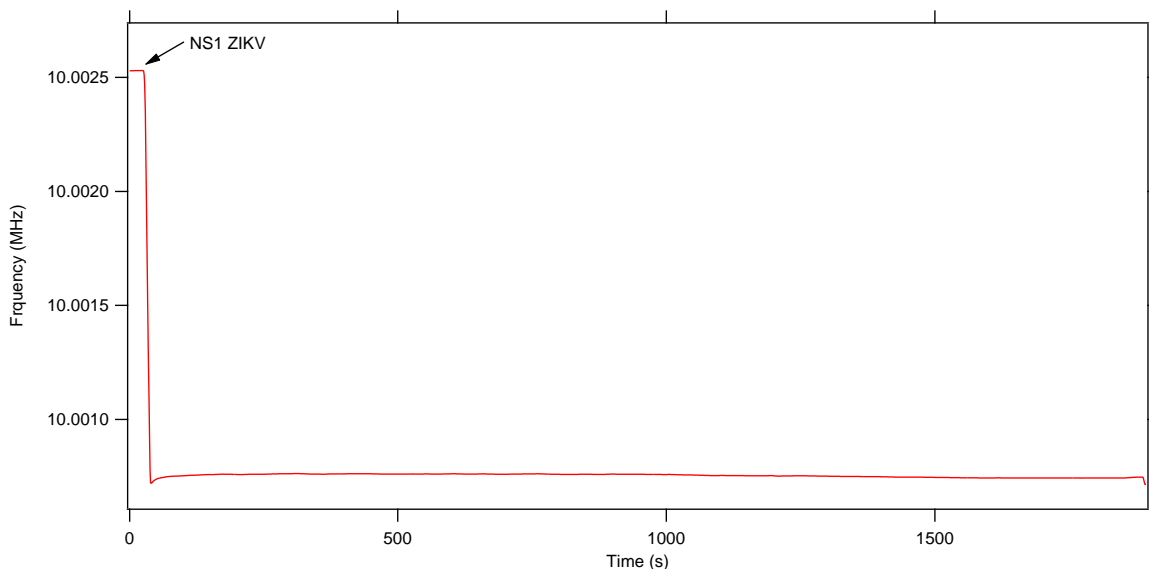


Figura 29. Evaluación de la adición de proteína NS1 ZIKV evaluada por QCM. Gráfico representativo del cambio en la frecuencia consecuente a la adición de proteína NS1 ZIKV (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con respecto al tiempo transcurrido, línea roja.

Posteriormente, para corroborar la presunta presencia de la monocapa proteica formada sobre la superficie del cristal de cuarzo se utilizaron muestras del biobanco que presentaron altos niveles de anticuerpos contra la proteína NS1 de ambos virus, esperando la formación de un inmunocomplejo proteína-anticuerpo anti-NS1. Se utilizaron las mismas condiciones de inyección previamente descritas. Los sueros se utilizaron a una dilución 1:200 en buffer de PBS, dilución utilizada por el grupo del Dr. Reyes-Sandoval en las pruebas inmuno-serológicas de ELISA. Se obtuvieron los siguientes resultados (Fig. 30, 31). En la figura 30 es posible observar la disminución de frecuencia característica de la adhesión de proteína NS1 de dengue la cual una vez más se mantiene con respecto del tiempo de inyección y posteriormente al ser inyectada la muestra sérica se muestra una segunda disminución de la frecuencia, respuesta que indica la formación del inmunocomplejo esperado y el cual se mantiene igualmente con la continua inyección del suero. Por otro lado, en la figura 31 también es posible observar la disminución de frecuencia posterior a la inyección del suero que presenta anticuerpos contra la proteína de Zika.

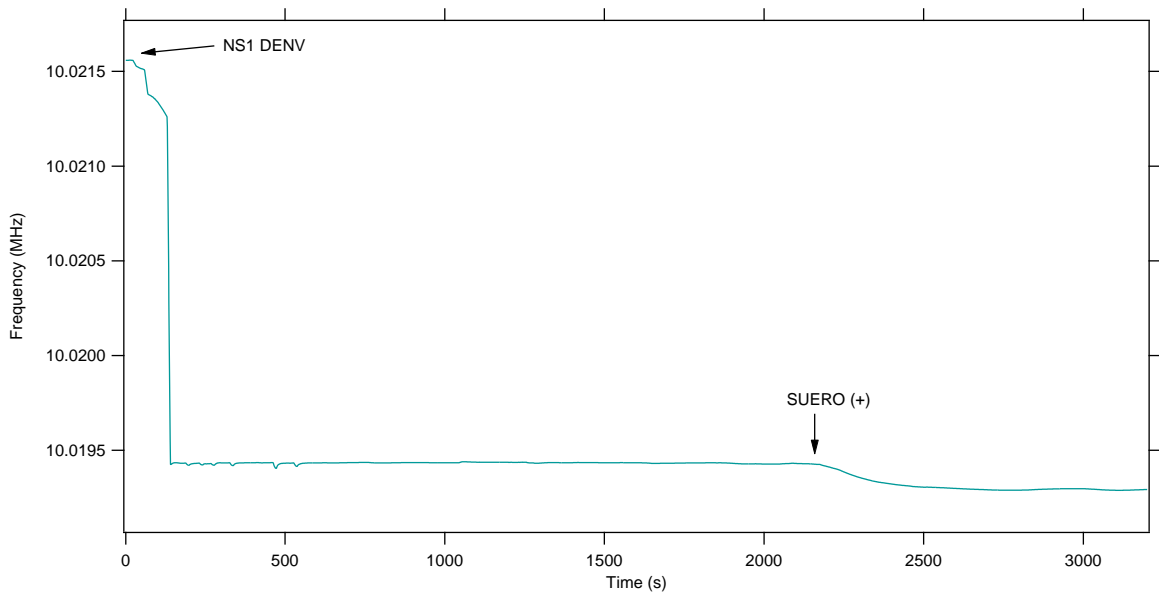


Figura 30. Evaluación de la adición de suero con presencia de anticuerpos contra proteína NS1 DENV evaluada por QCM. Gráfico representativo obtenido del cambio de frecuencia consecuente a la adición de proteína NS1 DENV (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y posterior inyección de suero con presencia confirmada por ELISA de anticuerpos con respecto al tiempo transcurrido, línea azul.

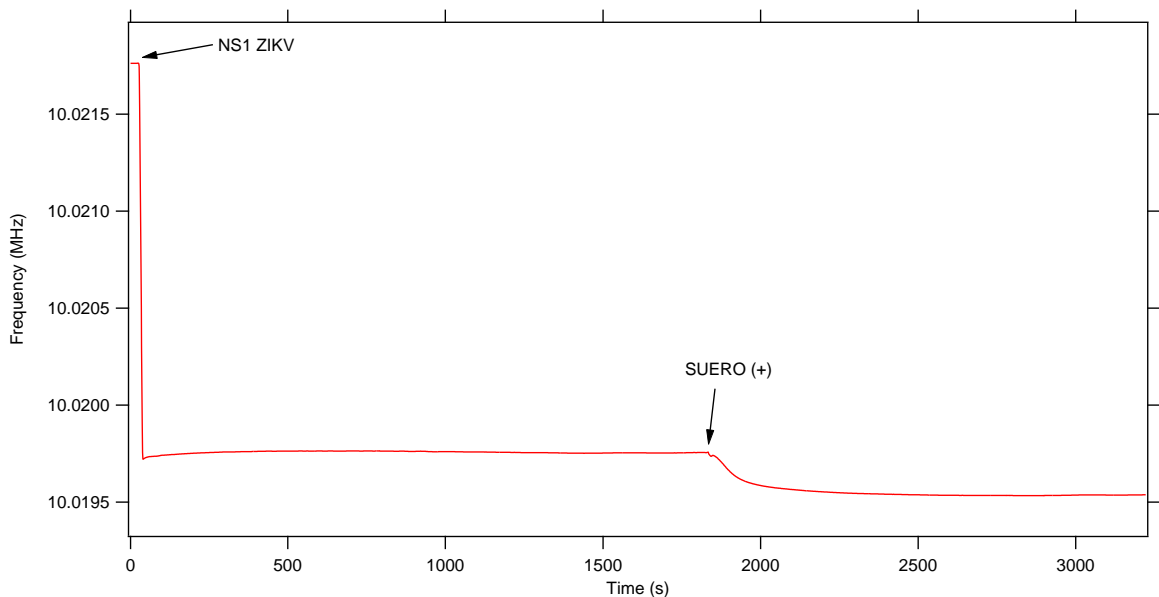


Figura 31. Evaluación de la adición de suero con presencia de anticuerpos contra proteína NS1 ZIKV evaluada por QCM. Gráfico representativo obtenido del cambio de frecuencia consecuente a la adición de proteína NS1 ZIKV (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y posterior inyección de suero con presencia confirmada por ELISA de anticuerpos con respecto al tiempo transcurrido, línea roja.

A continuación, se realizó el mismo procedimiento, pero utilizando sueros que no mostraban anticuerpos contra la proteína NS1 evaluados mediante ELISA, lo anterior con la finalidad de corroborar que los experimentos previos muestra una interacción anticuerpo-proteína y también

confirmar la ausencia de estos en las muestras seleccionadas (Fig. 32, 33). En ambas figuras es posible observar un fenómeno similar posterior a la adhesión de la proteína NS1 de ambos virus, al inyectar las muestras seronegativas no se observa una marcada disminución de la frecuencia comparada con la mostrada al inyectar sueros con anticuerpos contra la proteína.

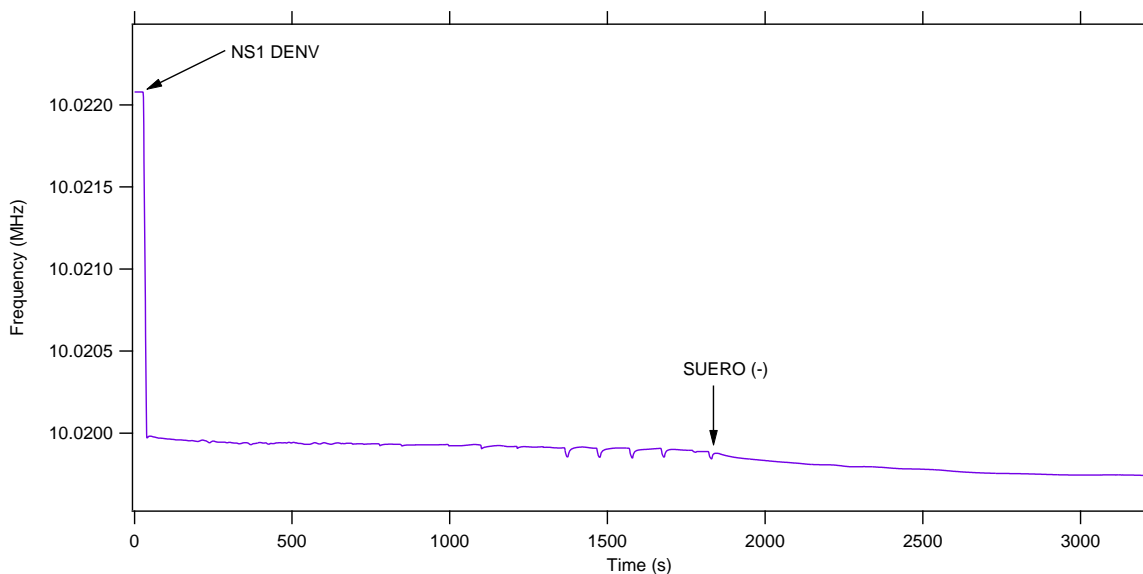


Figura 32. Efecto de la adición de suero sin presencia de anticuerpos contra proteínas NS1 DENV evaluada por QCM. Gráfico representativo obtenido del cambio de frecuencia consecuente a la adición de proteína NS1 DENV (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y posterior inyección de suero sin presencia confirmada por ELISA de anticuerpos con respecto al tiempo transcurrido, línea azul.

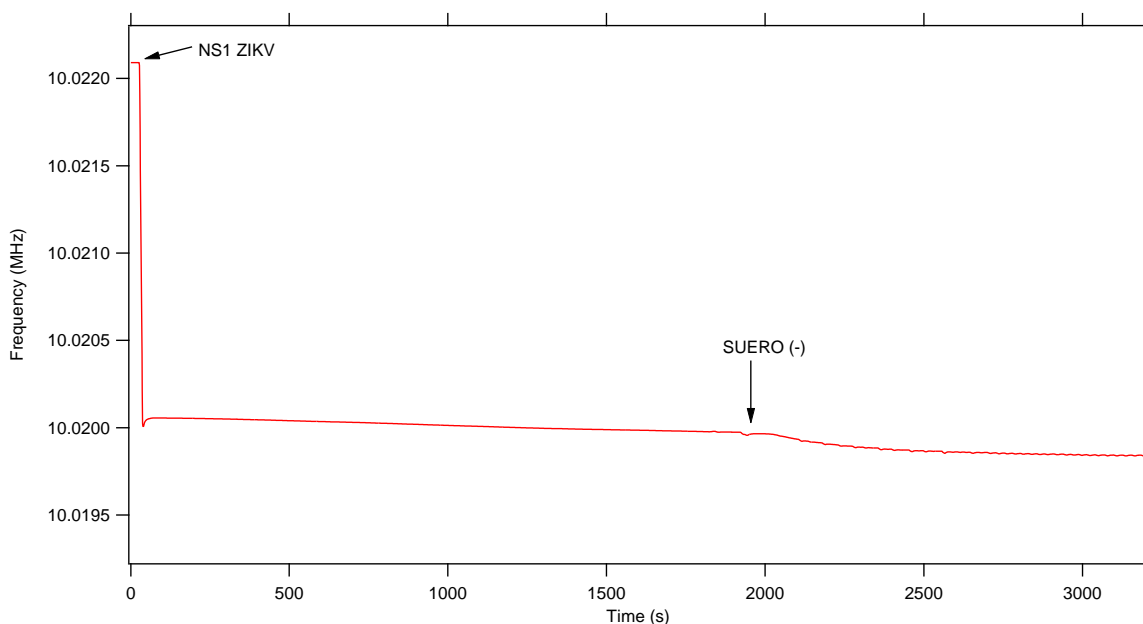


Figura 33. Efecto de la adición de suero sin presencia de anticuerpos contra proteínas NS1 ZIKV evaluada por QCM. Gráfico representativo obtenido del cambio de frecuencia consecuente a la adición de

proteína NS1 ZIKV (2.5 µg/mL) y posterior inyección de suero sin presencia confirmada por ELISA de anticuerpos con respecto al tiempo transcurrido, línea roja.

Una vez confirmada la adhesión de la proteína a la superficie de la QCM, decidimos evaluar el comportamiento del PRP al ser inyectado al equipo y sin la presencia de la proteína sobre el cuarzo. Se utilizó una concentración de 200,000 cel/mL y una inyección de 30 µL/minuto (Fig. 34). En la figura se observa la disminución en la frecuencia posterior a la inyección de la muestra indicando la presencia de una masa sobre la superficie del cuarzo, la cual posteriormente muestra una constante baja en la misma con forme el tiempo transcurrido, indicando que al igual que con las proteínas, las plaquetas pueden estar adhiriéndose a la superficie del cuarzo.

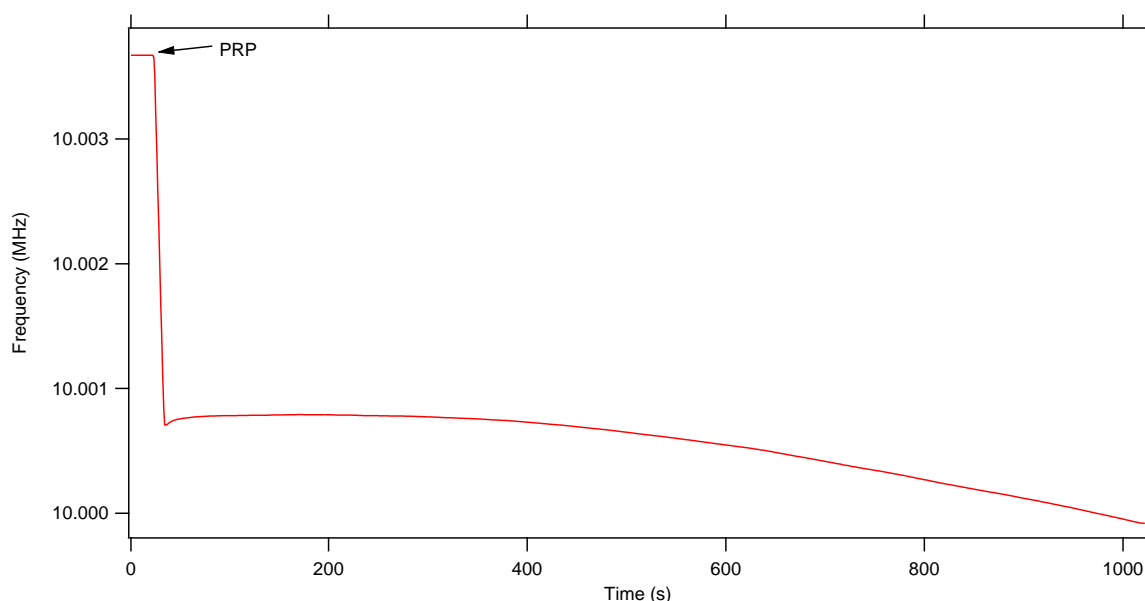


Figura 34. Efecto de la adición de PRP evaluada por QCM. Gráfico representativo obtenido de la adición de PRP (200,00 cel/mL) sobre la frecuencia con respecto al tiempo transcurrido línea roja.

11.4.2. Evaluación del comportamiento de la interacción proteína NS1 DENV – plaquetas y NS1 ZIKV - plaquetas mediante QCM

Una vez lograda y confirmada la adhesión de la proteína NS1 en el cuarzo, así como el comportamiento de las plaquetas sobre el cuarzo, experimentamos la posible interacción de estas. Los ensayos se realizaron con las dos proteínas y bajo las mismas condiciones de inyección descritas previamente. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (Fig. 35, 37). Para el caso del análisis de la interacción de la proteína NS1 DENV y PRP (Fig. 35), es posible observar la adhesión característica de la proteína y posterior a la inyección de PRP una constante disminución de la frecuencia mostrando una interacción entre la proteína adherida y las células analizadas. Cabe mencionar que, en las

diversas repeticiones realizadas bajo estas condiciones, alrededor de los 800 segundos (15 minutos) transcurridos posterior a la inyección del PRP, se elevaba drásticamente la frecuencia indicando la pérdida de la masa que se encontraba sobre la superficie de oro.

Por otro lado, en la evaluación de la interacción NS1 ZIKV y PRP (Fig. 37), es posible observar la correcta adhesión de la proteína sobre el cuarzo y como, posterior a la inyección del PRP la frecuencia disminuye de manera gradual, pero sin perderse la lectura como en el caso de la proteína NS1 DENV, reflejando la interacción entre las proteínas adheridas y las plaquetas.

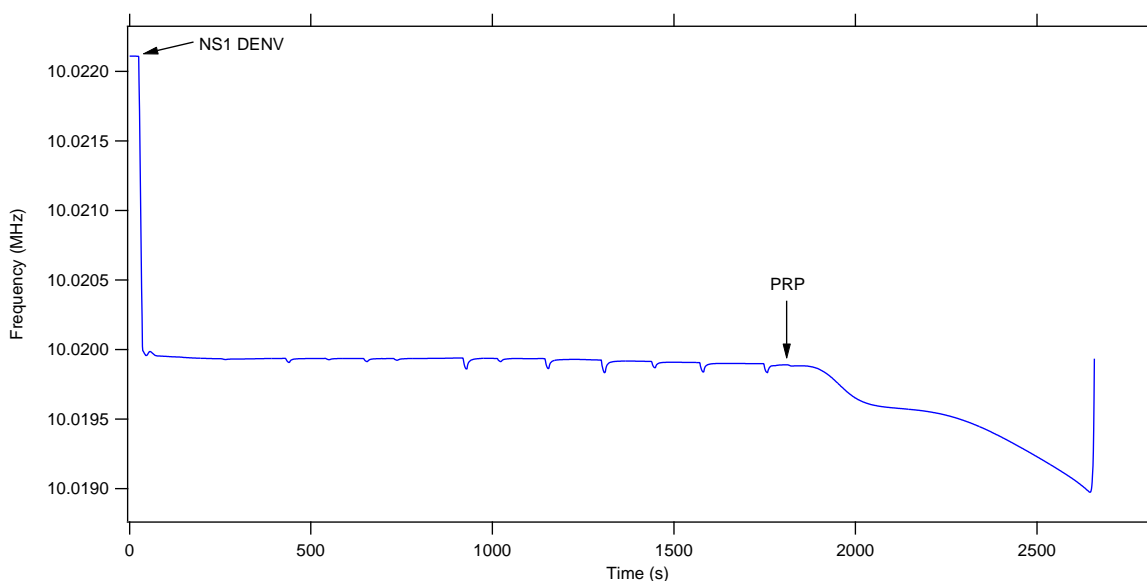


Figura 35. Efecto de la proteína NS1 DENV sobre PRP evaluada por QCM. Gráfico representativo obtenido del cambio de frecuencia consecuente a la adición de proteína NS1 DENV (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y posterior inyección de PRP (200,000 cel/ mL) con respecto al tiempo transcurrido, línea azul.

El ensayo anterior se replicó sustituyendo el PRP por PPP con la finalidad de confirmar que las interacciones descritas anteriormente entre NS1 y PRP son específicas y no se trata de una interacción NS1 y alguna otra biomolécula presente en el plasma, se utilizó el mismo flujo usado en la inyección de PRP (Fig. 36, 38). Los resultados revelan la adhesión de las proteínas tal y como se observa en experimentos anteriores y al inyectar el PPP es posible observar en ambos gráficos ligeras disminuciones repentinas en la frecuencia que a los pocos segundos aumenta a la constante previa.

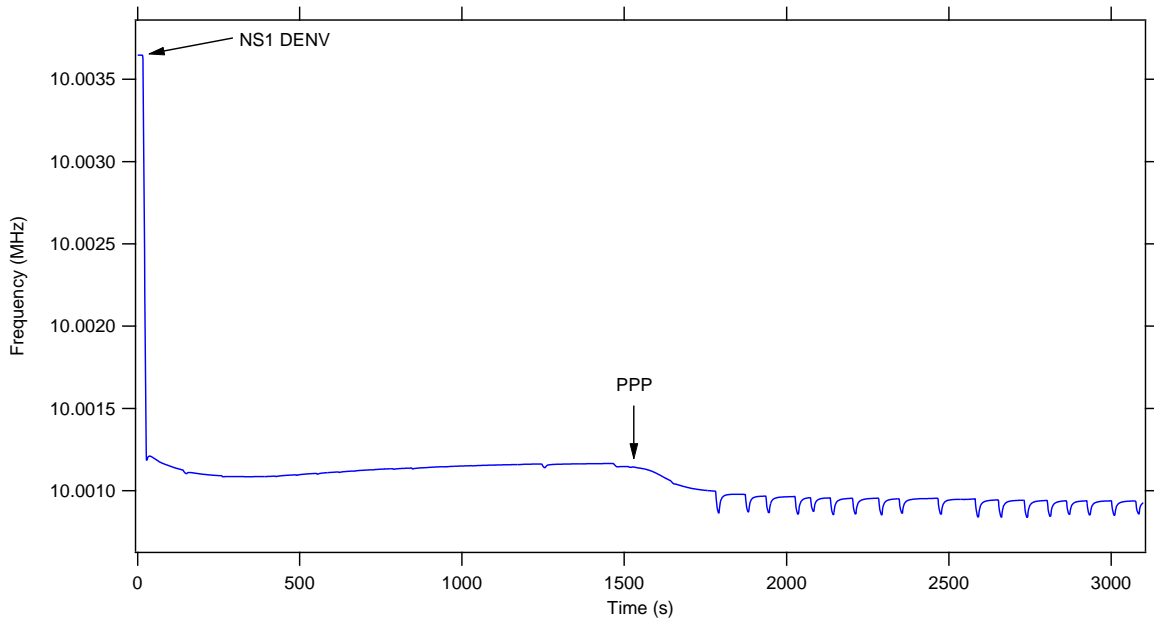


Figura 36. Efecto de la proteína NS1 DENV sobre PPP evaluada por QCM. Gráfico representativo obtenido del cambio de frecuencia consecuente a la adición de proteína NS1 DENV (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y posterior inyección de PPP con respecto al tiempo transcurrido, línea azul.

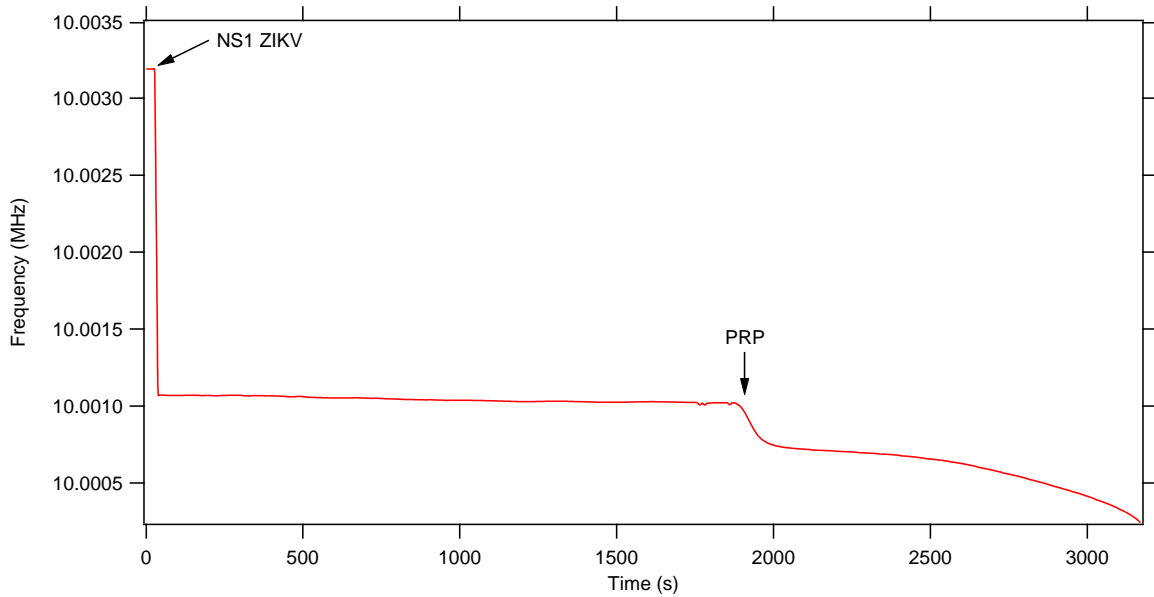


Figura 37. Efecto de la proteína NS1 ZIKV sobre PRP evaluada por QCM. Gráfico representativo obtenido del cambio de frecuencia consecuente a la adición de proteína NS1 ZIKV (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y posterior inyección de PRP (200,000 cel/ mL) con respecto al tiempo transcurrido, línea azul.

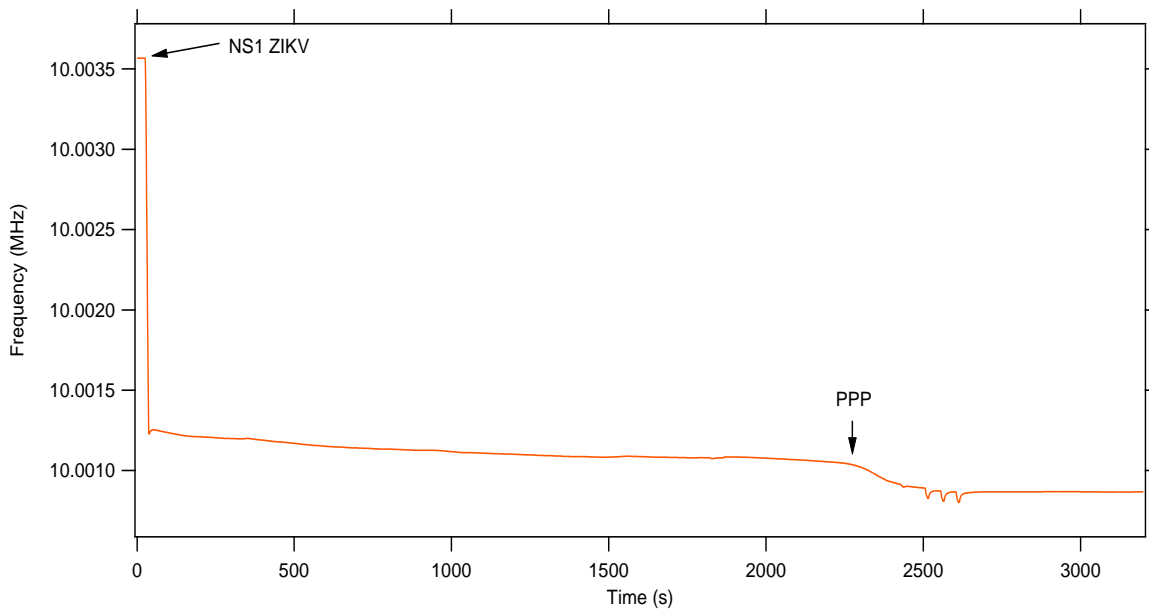


Figura 38. Efecto de la proteína NS1 DENV sobre PPP evaluada por QCM. Gráfico representativo obtenido del cambio de frecuencia consecuente a la adición de proteína NS1 ZIKV (2.5 $\mu\text{g/mL}$) y posterior inyección de PPP con respecto al tiempo transcurrido, línea roja.

Una vez obtenidas las gráficas, procedimos a calcular la diferencia de frecuencia de un cuarzo sin sensibilizar o no cargado contra uno que ha sido sensibilizado y la consecuencia de la presencia de la proteína sobre las diferentes muestras biológicas. Para realizar lo anterior es necesario calcular el Δf , el cual se calcula de la siguiente manera:

Cálculo de Δf [Hz]:

$$\Delta f \text{ [Hz]} = f_i - f_c$$

Donde:

Δf [Hz]= Cambio en la frecuencia

f_i = frecuencia sin carga o inicial

f_c = frecuencia cargada

Una vez realizadas las 3 repeticiones de cada uno de los experimentos, se calculó el Δf de cada uno de los eventos. En el caso de ambas proteínas se incluye el comportamiento de la proteína con flujo constante de buffer de fosfatos para determinar si mediante el flujo es posible des adherir esta; así como la inyección individual de PRP con la finalidad de observar su comportamiento sobre el cuarzo (Figuras 39 y 40). Se obtuvieron los resultados que se muestran a continuación: $n=3$, media

± DS, donde es posible observa una diferencia significativa ($p > 0.001$) en el cambio de la frecuencia al interaccionar las plaquetas con la proteína NS1 de dengue (figura 39), resultado que replica al realizar el ensayo con la proteína NS1 de Zika (figura 40). De igual manera, es posible observar diferencias estadísticamente significativas entre la interacción PRP-proteína y el PPP-proteína, así como el comportamiento individual del PRP.

Tabla 13. Modificaciones en la frecuencia (Δf [Hz]) de la interacción de NS1 de dengue con diferentes muestras biológicas.

Condición	Δf [Hz]
NS1 DENV – PBS	-11
NS1 DENV – PRP	-583 ± 108.48
NS1 DENV – PPP	-247 ± 42.05
NS1 DENV – Suero (+)	-143.33 ± 7.47
NS1 DENV – Suero (-)	-97.66 ± 12.25
PRP	-162.8127 ± 29.66

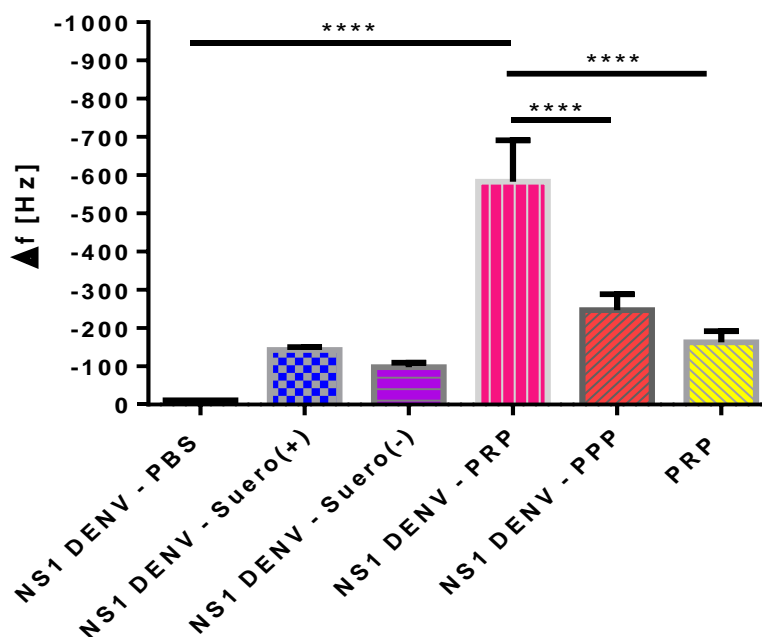


Figura 39. Modificaciones en la frecuencia de cuarzo sensibilizado con NS1 de dengue (2.5 $\mu\text{g/mL}$) y posterior interacción con diferentes muestras biológicas. Gráfico demostrativo de los cambios en la frecuencia de oscilación observadas en un cuarzo sensibilizado con NS1 de dengue al inyectar diferentes muestras biológicas. PRP: Plasma rico en plaquetas, PPP: Plasma pobre en plaquetas, Suero (-): muestra sérica sin presencia de anticuerpos contra NS1 de dengue, Suero (+): muestra sérica con presencia de anticuerpos contra NS1 de dengue. Se incluye en el gráfico el resultado del comportamiento del PRP sólo, sin utilizar cuarzo

sensibilizado. Una diferencia mayor en la frecuencia de oscilación es proporcional al aumento de la masa sobre la superficie del cuarzo. n=3, media \pm DS. * $p < 0.001$.

Tabla 14. Modificaciones en la frecuencia (Δf [Hz]) de la interacción de NS1 de Zika con diferentes muestras biológicas.

Condición	Δf [Hz]
NS1 ZIKV – PBS	-5.03
NS1 ZIKV – PRP	-510.66 \pm 108.48
NS1 ZIKV – PPP	-118.330 \pm 19.62
NS1 ZIKV – Suero (+)	-339.50 \pm 37.49
NS1 ZIKV – Suero (-)	-148 \pm 14.82
PRP	-162.8127 \pm 29.66

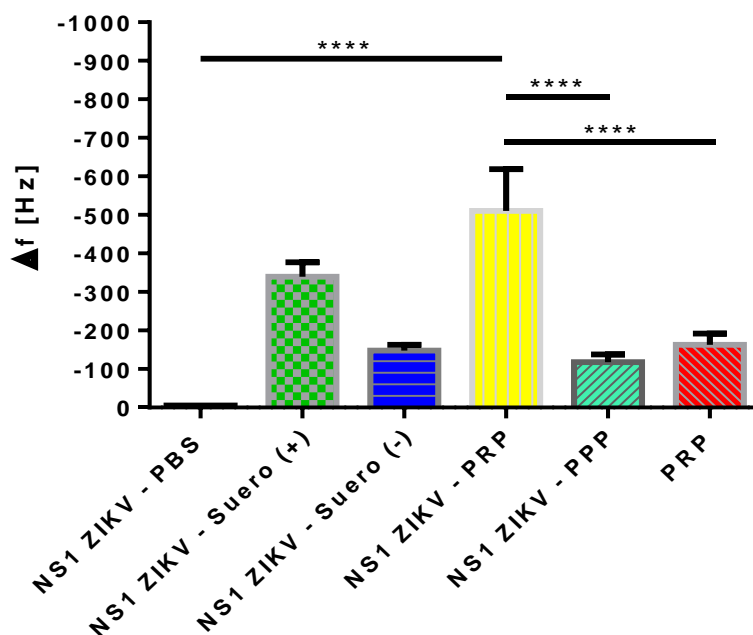


Figura 40. Modificaciones en la frecuencia de cuarzo sensibilizado con NS1 de Zika (2.5 $\mu\text{g/mL}$) y posterior interacción con diferentes muestras biológicas. Gráfico demostrativo de los cambios en la frecuencia observadas en un cuarzo sensibilizado con NS1 de Zika (min 0), que a los 15 minutos se evalúa una medición del cambio de frecuencia observado al inyectar la muestra biológica determinada y finalmente la medición final se realiza a los 30 minutos. PRP: Plasma rico en plaquetas, PPP: Plasma pobre en plaquetas, Suero (-): muestra sérica sin presencia de anticuerpos contra NS1 de Zika, Suero (+): muestra sérica con presencia de anticuerpos contra NS1 de Zika. Se incluye en el gráfico el resultado del comportamiento del PRP sólo, sin utilizar cuarzo sensibilizado. n=3, media \pm DS. * $p < 0.05$

Finalmente colocamos en el siguiente gráfico (Figura 41) una comparación del comportamiento de cada una de las proteínas con PRP, el propio comportamiento del PRP; así como un ensayo en el cual se inyecta la proteína NS1 de dengue y posterior a su adhesión se hace una

inyección con PBS, simulando un lavado y una posterior inyección con PRP, corroborando que la proteína no sufre modificaciones en su adhesión posterior al lavado y mantiene el efecto sobre el PRP siendo una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en la interacción PRP y las proteínas virales.

Tabla 15. Modificaciones en la frecuencia (Δf [Hz]) de la interacción de NS1 de dengue y Zika con PRP.

Condición	Δf [Hz]
NS1 DENV – PRP	-583.00 ± 108.48
NS1 ZIKV – PRP	-510.66 ± 23.05
PRP	-162.8127 ± 29.66
NS1 DENV – LAVADO PBS / + PRP	$-63.840 / -574.00$

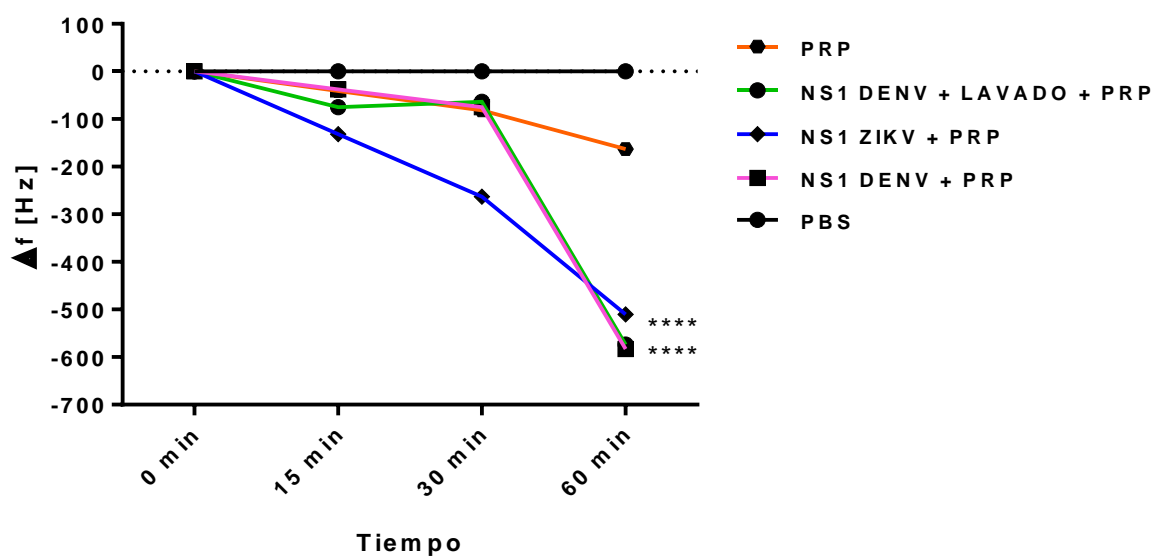


Figura 41. Cambios en la frecuencia de cuarzo sensibilizado independiente con NS1 de dengue y Zika y plasma rico en plaquetas. Cuarzos independientes cargados con NS1 de dengue y Zika respectivamente (min 0), a los 15 minutos se observa la disminución en la frecuencia propia de la proteína, la inyección continua hasta los 30 minutos, salvo la condición de lavado (línea roja) a la cual a los 15 minutos se le inyecta solución de lavado (PBS), y a los 30 minutos se inyecta el PRP en todas las condiciones; a los 60 minutos se evalúa una medición del cambio de frecuencia observado. PRP: Plasma rico en plaquetas, PPP: Plasma pobre en plaquetas, Así como un resultado en el cuál a los 15 minutos de flujo se inyectó PBS con la finalidad de evaluar si este era capaz de des adherir la proteína NS1 de dengue y 15 minutos después de inyectó PRP. $n=3$. Media \pm DS, $*p < 0.0001$

12. Discusión

Las plaquetas son células que poseen características de estructura y función que les permiten ser consideradas células del sistema inmunológico, más allá de su clásico papel en los procesos de coagulación. Existen algunas arbovirosis, tales como dengue y Zika, las cuales dentro de su proceso patogénico llegan a cursar con plaquetopenias durante infecciones agudas sin conocerse la etiología de esta y que pueden comprometer la salud del paciente. Por otro lado, se sabe que el virus es capaz de secretar una de sus proteínas no estructurales, clásicamente involucrada en la replicación del material genético, al medio extracelular y que esta favorece el proceso patológico del virus. Lo anterior abre un campo de investigación sobre la comunicación que existe entre estos virus, particularmente está proteína no estructural 1 y las plaquetas, así como las consecuencias de dicho proceso. El presente trabajo estudió esta interacción mediante diversas metodologías las cuales proporcionan información a nivel estructural y molecular, como son la microscopia de fuerza atómica, la microbalanza de cristal de cuarzo y la citometría de flujo.

Mediante la citometría de flujo, acoplándonos a los protocolos que Pasalic reportó en 2017 para aplicar la técnica en el estudio de las plaquetas (Pasalic *et al.* 2017), determinamos el aumento en la expresión de P-Selectina y GP IIb/IIIa al estimular las plaquetas con conocidos agonistas de activación celular, ADP, colágeno y epinefrina, los cuales poseen un grado de activación diferentes entre sí, ya que cada uno posee un receptor plaquetario distinto y la cascada de reacciones intracelulares provocada es diferente, aunque todas al final convergen en el aumento citoplasmático de calcio, liberación del contenido granular y el aumento del tamaño celular con emisión de pseudopodos, mecanismos característicos del proceso de activación plaquetario, siendo colágeno el agonista con un mayor índice de activación reportado (Stalker *et al.* 2012). Nuestros resultados confirman que colágeno provoca la mayor expresión de ambos marcadores de activación (Figura 10), seguido de ADP y epinefrina (Figura 9, 11) quienes de igual manera inducen la liberación granular y con ello el aumento en la expresión de P-Selectina, así como la formación del complejo glicoproteico $\alpha 2\beta 1$, confirmando que los agonistas utilizados inducen activación plaquetaria. Estos datos correlacionan con lo reportado por otros autores. Roes y *et.al.* en 2013 evaluaron la actividad plaquetaria mediante citometría de flujo bajo diferentes condiciones de tratamiento celular y concentraciones de agonistas, incluido el ADP, observando un comportamiento similar al observado por nosotros utilizando este agonista en la expresión de ambos marcadores (Roes *et al.* 2013). En el 2019 Hajtuch *et.al.* observaron un aumento en la expresión de P-Selectina y del complejo

glicoproteico IIbIIIa al estimular plaquetas con colágeno, utilizando esta condición como control positivo de activación (Hajtucj *et al.* 2019).

Los resultados de la cinética de activación plaquetaria con respecto al tiempo de estimulación con la proteína NS1 de dengue muestran que a los 60 minutos se observa la mayor expresión de ambos marcadores de actividad, siendo un resultado estadísticamente significativo ($p < 0.0001$) y el cual correlaciona con lo reportado por Chiao-Hsuan *et al.* en 2019, donde observan una máxima expresión de P-Selectina a los 60 y 120 minutos de estímulo con la proteína NS1 de dengue (Chiao-Hsuan *et al.* 2019). Los resultados de la cinética de activación utilizando la proteína NS1 de Zika arrojan de igual manera una activación celular máxima a los 60 minutos de estimulación siendo este resultado estadísticamente significativo ($p < 0.0001$) y con una alta similitud a lo observado con NS1 de dengue, asociado tal vez a la alta homología que existe entre la proteína de ambos virus que alcanza casi un 70% (Reyes-Sandoval & Ludert, 2019). Este resultado difiere de lo reportado por el grupo asiático, ya que ellos reportan que NS1 de Zika no induce activación celular plaquetaria (Chiao-Hsuan *et al.* 2019). Lo anterior puede atribuirse a la proteína utilizada al incubar a las células, los sistemas de expresión proteica y las modificaciones postraduccionales de esta. Nuestra proteína es expresada en una línea celular de mamífero (HEK293), que tiene la capacidad de secretar la proteína al medio extracelular y la proteína es sometida a las modificaciones post traduccionales altamente fieles a lo ocurrido en un estado *in vivo* (Chang-Kim *et al.* *Artículo en impresión*); por otro lado, otra manera de producir la proteína es en sistemas procariotas, donde se obtiene una mayor concentración de esta, pero que carece de los mecanismos postraduccionales antes mencionados. Los autores del trabajo citado mencionan el uso de una proteína comercial y en el sitio referido no mencionan el proceso de producción; sin embargo, a esto se le pudiera atribuir esta discrepancia. Al comparar la expresión de la P-Selectina en plaquetas al ser expuestas durante 60 minutos a la proteína NS1 de dengue, contra la observada con los agonistas de activación conocidos, determinamos que es significativamente mayor ($p < 0.0001$) a la expresión basal de estos, e incluso se observa una expresión estadísticamente significativa mayor a la expresión causada por la estimulación plaquetaria con agonistas de activación conocidos, como el ADP, colágeno y epinefrina. Estos resultados guardan relación con lo que sostienen Chiao-Hsuan *et al.* en 2019, donde observan un aumento significativo en la expresión de la P-Selectina sobre la superficie plaquetaria al exponer las células a la NS1 de dengue a partir de los 60 y hasta los 120 minutos. En este mismo trabajo confirman la interacción entre NS1 y las plaquetas al neutralizar la proteína con un anticuerpo monoclonal y observar una disminución en la expresión de P-Selectina (Chiao-Hsuan *et al.* 2019). De igual manera, nuestros resultados concuerdan con lo observado en 2008 por Ghos *et al.*, quienes observan un aumento en la

expresión de P-Selectina en plaquetas al exponerlas al virus completo de dengue al compararlo con un control sin estimulación y una estimulación con el virus de la encefalitis japonesa (Ghos *et al.* 2008). En 2018, otro estudio realizado por Nuñez-Avellaneda *et.al.*, reporta también un aumento estadísticamente significativo de la expresión de P-Selectina en plaquetas estimuladas durante 4 horas con el virus completo de dengue (Nuñez-Avellaneda *et al.* 2018). La expresión de P-Selectina por las plaquetas en la estimulación con la proteína NS1 de dengue es mayor ($P<0.0001$), a la observada por el estímulo con colágeno, el agonista de activación utilizado de mayor fuerza, el cual reconoce a los receptores glicoproteína VI y glicoproteína $\alpha 2\beta 1$ ocasionando el aumento de calcio intracelular y con ello la activación de la plaqueta (Stalker *et al.* 2012), lo anterior permitiría catalogar a la proteína NS1 de dengue como un potente agente activador de las plaquetas. También se avaluó la expresión del complejo glicoproteico IIbIIIa, el cual es expresado en plaquetas en estado activo y está involucrado en los mecanismos de agregación plaquetaria. Cabe mencionar que no existen reportes donde utilicen la expresión de este marcador como indicador de activación en respuesta a estímulos provenientes de microorganismos patogénicos para el ser humano; sin embargo, si se ha reportado a esta glicoproteína como indicador de activación y agregación plaquetaria en patológicas cardiovasculares (Hally *et al.* 2018; Kicken *et al.* 2017; Tomer, 2004) y en trastornos de la fisiología plaquetaria (Hauschner *et al.* 2019). La expresión máxima de este marcador se observó a los 60 minutos de la estimulación con NS1 de dengue y es estadísticamente significativo ($p<0.0001$) con respecto a la expresión basal de la glicoproteína, confirmando que la proteína es capaz de activar a las plaquetas. Por otro lado, la presencia del marcador glicoproteico en la superficie plaquetaria contrario a lo observado con P-Selectina, es estadísticamente menor a la observada al ser estimuladas con colágeno ($p<0.0001$) y ADP ($p<0.05$), lo anterior puede estar relacionado con la actividad que induce la proteína sobre las plaquetas, ya que al aumentar la expresión de P-Selectina sobre la superficie plaquetaria, se favorece la comunicación entre las plaquetas y otras células del sistema inmunológico como los linfocitos y los neutrófilos y con ello la respuesta inmune contra el virus (Kapur *et al.* 2015), mientras que la glicoproteína, si aumenta su expresión con respecto al estado basal; sin embargo, no es similar a la observada con los agonistas de activación conocidos, indicando que NS1 tiene la capacidad de activar plaquetas y con ello su participación en la respuesta inmunológica, pero no llevarlas hasta la agregación de estas. Al observar los resultados obtenidos al estimular las plaquetas con la proteína NS1 de Zika, observamos que esta es capaz de inducir un aumento estadísticamente significativo ($p<0.0001$) de los receptores estudiados en comparación con los resultados observados con los agonistas conocidos y el estado basal y que es incluso mayor al observado con la proteína de dengue. Somos el primer grupo en reportar la capacidad de NS1 ZIKV para estimular y activar a las plaquetas. Durante el proceso patológico de esta enfermedad, no se reconocen eventos trombocitopénicos, ni

hemorrágicos. Nuestros resultados pudieran sugerir que al menos la proteína al poseer esta capacidad de inducir la activación de la plaqueta favorece que estas medien la respuesta inmunológica en su contra. Es necesario complementar los resultados reportados con ensayos que permitan determinar los niveles de citocinas, quimiocinas y factores involucrados en la respuesta inmunológica contra patógenos expresados por las plaquetas al ser estimuladas con las proteínas, así como la evaluación de marcadores de muerte celular que pudieran indicar la capacidad de la proteína para inducir apoptosis en las plaquetas.

Mediante la microscopía de fuerza atómica pretendíamos evaluar los cambios morfológicos ocasionados por la estimulación plaquetaria con las proteínas virales y los agonistas conocidos. Posteriormente y basados en distintos estudios donde observan el comportamiento plaquetario mediante AFM como se mencionó anteriormente, seleccionamos la superficie de vidrio como base para la obtención de imágenes. Todas las estructuras observadas bajo las diferentes condiciones de resuspensión evaluadas (Tabla 10) concuerdan con las características estructurales de las plaquetas reportadas en la literatura, presentando diámetros de entre 1.5 a 5 μm (Radmacher et al., 1996; Sorrtetino et al., 2016; Wu et al., 2018), confirmando la presencia de estas células. La selección del buffer de Tyrodes como solución de resuspensión debido a la calidad de las imágenes observadas, concuerda con reportes en la literatura donde se evalúan las propiedades morfológicas y viscoelásticas de las plaquetas en medio líquido al colocarlas sobre distintos biomateriales y donde utilizan buffer de Tyrodes como solución de suspensión (Du Plooy et al., 2013; Ghosh et al., 2008; Radmacher et al., 1996).

Los resultados de las imágenes obtenidas posterior a la activación inducida con ADP muestran estructuras que aumentan su diámetro hasta 5 micras, así como su volumen a 19 fL, y deforman su estructura celular, características propias de una célula activada. Paralelamente al incubar a las plaquetas con colágeno y epinefrina fue posible observar agregados plaquetarios, paso subsecuente a la activación de estas células (Tabla 11). Nuestros resultados al estimular a las células con ADP correlacionan con los reportados por Karagkiozaki *et. al.* en 2016 donde observan mediante AFM la estructura topográfica aumentada de una plaqueta activada consecuencia de su interacción con biomaterial a base de titanio (Karagkiozaki *et al.* 2016), así como lo reportado por Kitamura *et. al.* en 2018, donde observan un aumento similar en el diámetro plaquetario posterior a una activación *in vitro* utilizando cloruro de calcio al 0.1% (Kitamura et al., 2018). Nuestro grupo es el primero en reportar mediante AFM la formación de agregados plaquetarios consecuencia de la inducción de la activación con agonistas como colágeno y epinefrina. En las estructuras obtenidas es posible observar

con claridad la agregación de al menos 3 células formando una maraña, así como el aumento en las prolongaciones de la membrana y la aparición de pseudopodos. Corroboramos los resultados que obtuvimos mediante citometría de flujo al observar células activadas al ser estimuladas con las proteínas virales. En la tabla 12 es posible apreciar estructuras que aumentan su diámetro hasta 14 μm , así como el volumen de su membrana y la aparición de prolongaciones de esta. No se observaron agregados plaquetarios al escanear al menos 3 regiones diferentes de la superficie, lo anterior sustenta nuestra hipótesis de que las proteínas virales inducen activación celular, pero no agregación plaquetaria.

Mediante la microbalanza de cristal de cuarzo es posible determinar interacciones específicas entre dos agentes independientes. En el presente proyecto, utilizamos la técnica para determinar si existe una interacción directa entre la proteína NS1 de ambos virus y las plaquetas; además, el mecanismo de acción de la QCM asemeja un modelo *in vitro* del flujo sanguíneo lo que permite un acercamiento a lo que posiblemente ocurra en condiciones *in vivo*. De acuerdo con los resultados obtenidos observamos una correcta adhesión de ambas proteínas sobre la superficie del cristal de cuarzo (Figuras 28, 29, 39 y 40) al observar una disminución en la frecuencia de oscilación, la cual se mantiene a lo largo del tiempo e incluso al inyectar PBS como solución de lavado y que corroboramos al inyectar una muestra sérica con presencia de anticuerpos anti NS1 de dengue y Zika, observando una segunda disminución en la frecuencia de la QCM que presumimos es consecuencia de la formación de un inmunocomplejo proteína-anticuerpo y con ello aumento de la masa sobre la superficie. El anterior fenómeno no se observa al inyectar, posterior a la adhesión proteica, una muestra con ausencia de anticuerpos, confirmando la presencia de la proteína sobre el cuarzo (Figuras 30,31,32,33,39 y 40). Esta característica coincide con lo reportado por Tai *et al.* en 2005, quienes probaron diferentes concentraciones de NS1 de dengue y corroboraban la presencia de la proteína al inyectar una solución de anticuerpos contra NS1 de dengue, observando una disminución en la frecuencia relativa de oscilación (Tai *et al.* 2005). Este fenómeno de adhesión de la proteína puede estar justificado por la formación de enlaces covalentes entre los grupos disulfuro de las proteínas y el oro del cuarzo. Lo anterior fue reportado por Stadler *et al.* en 2003, donde lograron la adhesión de albumina sérica bovina sobre el cuarzo y atribuyen esta adhesión a este mismo fenómeno (Stadler *et al.*, 2003)

Nuestros resultados indican en el caso de NS1 de dengue que al interaccionar el flujo plaquetario con la proteína adherida sobre la superficie (figura 35), se observa una constante disminución en la frecuencia a partir del momento de inyección de PRP, esto estaría indicando que

existe interacción directa entre las plaquetas y la proteína y que al cabo de alrededor de 20 minutos se pierde la lectura por parte del equipo, lo anterior ocurre cuando la masa sobre la superficie se desprende. Esto pudiera estar asociado a la formación de un complejo proteína-plaqueta y que este con el flujo constante del equipo pueda ser desprendido de la superficie el equipo de detección pierde la lectura. Al utilizar NS1 de Zika observamos de igual manera una constante disminución en la frecuencia a partir de la inyección del PRP (figura 37), a lo largo de los 30 minutos que efectuamos el experimento. Esto sugiere que las plaquetas pueden interaccionar con NS1 de Zika, pero sin llegar a des adherirse, esto pudiera estar asociado a la afinidad de la proteína NS1 Zika por el cuarzo que sea más fuerte en comparación con la de dengue y que las plaquetas presentan una mayor afinidad por la proteína de dengue y que al activarse y liberar su contenido granular donde se encuentran una gran cantidad de activadores plaquetarios como el ADP favorecen la inducción indirecta de las plaquetas vecinas. Lo anterior es posible observarlo al comparar los Δf [Hz] donde la proteína de Zika presenta una mayor diferencia de frecuencia que NS1 de dengue indicando una mayor concentración de esta sobre la superficie del cuarzo; sin embargo, al inyectar el PRP, observamos que las plaquetas presentan una mayor afinidad por NS1 de dengue que por su homóloga de Zika. Los anteriores experimentos se realizaron utilizando PPP como un control negativo, en ambos casos se observan momentáneas bajas en la frecuencia de oscilación que posteriormente regresan a la frecuencia inicial sugiriendo que las plaquetas si interaccionan con las proteínas virales, pero que debido al bajo número de estas en el PPP y al constante flujo de la QCM, no se mantiene el complejo proteína-plaqueta (Figuras 36, 38, 39 y 40). Finalmente, como un tercer control experimental, en la figura 34 observamos el comportamiento individual de las plaquetas sobre la QCM, observándose una disminución en la frecuencia de oscilación que no se asemeja a la obtenida con la previa sensibilización del cuarzo con la proteína. Corroborando que la oscilación propia del equipo no repercute en el comportamiento de estas células. Como se mencionó anteriormente, somos el primer grupo en determinar la interacción plaqueta y proteína mediante QCM y es escasa la información en la literatura sobre la respuesta de estas células a estímulos patogénicos; sin embargo, si existen reportes que estudian la activación y agregación plaquetaria en respuesta a diferentes biomateriales y los cuales correlacionan con nuestros resultados. Santos-Martínez *et. al.* en 2012 propusieron utilizar la QCM como técnica para evaluar activación y agregación plaquetaria en respuesta a nanopartículas sensibilizadas, observando que plaquetas activadas y agregadas aumentan dramáticamente la frecuencia de oscilación de la QCM al compararse con PRP no estimulado o con PPP (Santos-Martínez *et al.* 2012). Posteriormente el mismo grupo en 2015 reportan en su estudio que las nanopartículas de sílice de 10 nm son capaces de inducir activación y agregación plaquetaria, observando un aumento significativo en la frecuencia de oscilación de la QCM al compararla con

PPP y el uso de PRP bajo diferentes biomoléculas antiagregantes plaquetarias (Santos-Martínez *et al.* 2015). Durante 2019, Hajtuch *et. al.*, reportaron que nanopartículas de plata sensibilizadas con diferentes moléculas organizadas son capaces de activar plaquetas, lo anterior al observar una disminución drástica en la frecuencia al inyectar PRP y el cual se comporta diferente al estudio de solo el PRP, reportando una activación y agregación celular (Hajtuch *et al.*, 2019). Después confirman la activación celular mediante microscopia confocal y citometría de flujo.

Los resultados de nuestro equipo de trabajo confirman la reactividad plaquetaria causada por NS1 de dengue y Zika; sin embargo, es solo un parteaguas en el estudio de las plaquetas respondiendo a patrones patogénicos. Sin duda es necesario realizar un mayor número de experimentos para determinar el receptor específico con el que interacciona la proteína, así como la respuesta que esta ejerce sobre la plaqueta, es decir el perfil de biomoléculas que son liberadas por estas al entrar en contacto con estos agentes. Lo que si podemos deducir de acuerdo con los hallazgos obtenidos es sin duda la necesidad de dirigir el tratamiento durante infecciones agudas de estas virosis contra la proteína NS1, lo que podría mejorar el estado y pronóstico del paciente.

13. Conclusiones

Nuestros resultados permiten confirmar que las proteínas NS1 de los virus de dengue y Zika son capaces de activar, pero no agregar, a las plaquetas.

Las plaquetas estimuladas con ambas proteínas presentan un aumento significativo en la expresión de P-Selectina a nivel membranar dilucidando la actividad inmunológica de las plaquetas células en estas infecciones virales.

La proteína NS1 debe ser considerada como un potente blanco terapéutico en pacientes que cursen con enfermedad causada por dengue o Zika debido las implicaciones fisiopatológicas que representa.

14. Cronograma de actividades

Actividad / Periodo	2018				2019												2020	
	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb
Revisión bibliográfica	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Diseño y presentación de protocolo de investigación	✓	✓																
Presentación de avances de resultados										✓						✓		
Capacitación en las técnicas de AFM y QCM			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓									
Síntesis y producción de proteínas virales										✓	✓	✓						
Estandarización de AFM y QCM para aplicación en plaquetas			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓									
Exposición de plaquetas a proteínas virales, evaluación de reactividad plaquetaria mediante AFM y QCM													✓	✓	✓	✓		
Análisis de resultados					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Escritura de tesis								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Examen de grado																		✓

15. Referencias

- Abushouk, A., Negida, A., & Ahmed, H. (2016). An updated review of Zika virus. *J Clin Virol.* 84:53-58. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.09.012>.
- Akey, D. L., Brown, W. C., Dutta, S., Konwerski, J., Jose, J., Jurkiw, T. J., DelProposto, J., Ogata, C. M., Skiniotis, G., Kuhn, R. J., & Smith, J. L. (2014). Flavivirus NS1 Crystal Structures Reveal a Surface for Membrane Association and Regions of Interaction with the Immune System. *Science.* 343 (6173), 881-885. <https://doi.org/10.1126/science.1247749>.
- Ali, R. A., Wuescher, L. M., & Worth, R. G. (2015). Platelets: essential components of the immune system. *Current Trends in Immunology*, 16, 65–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27818580>
- Assinger, A. (2014). Platelets and Infection - An Emerging Role of Platelets in Viral Infection. *Frontiers in Immunology*, 5: 649, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00649>.
- Arcuri, A. M. (2013). *Plasma Rico en Plaquetas. Recuperación de tejidos con factores estimulantes de crecimiento autólogos*. Ciudad de México, México: Amolca.
- Bermejo, E. (2017). Platelets. *Hematología*. 21, Fisiología de la hemostasia normal: 10-18. Disponible en: <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/06-Vol 21-extra.pdf>.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M. F., George, D. B., Jaenisch, T., William, G. R., Simmons, C. P., Scott, T. W., Farrar, J. J., & Hay, S. I. (2013). The Global Distribution and Burden of Dengue. *Nature*. 496 (7446): 504–507. <https://doi:10.1038/nature12060>.
- Binnig, G., Quate, C. F., & Gerber, Ch. (1986). Atomic Force Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 56, 930–933.
- Carvalho, FA., & Santos, NC. (2012). Atomic force microscopy-based force spectroscopy - biological and biomedical applications. *IUBMB Life*, 64(6), 465–472. <https://doi.org/10.1002/iub.1037>.
- Carvalho, FA, Freitas, T & Santos NC. (2015). Taking nanomedicine teaching into practice with atomic force microscopy and force spectroscopy. *Advanced Physiology Education*. 39: 360-366. <https://doi.org/10.1152/advan.00119.2014>.
- Chao, CH., Wu, WC., Lai, YC., Tsai, PJ., Perng, GC., Lin, YS & Yeh, TM. (2019). Dengue virus non-structural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4, leading to thrombocytopenia and haemorrhage. *PLoS Pathog.* 15(4): e10007625. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007625>.

Chen, HR., Lai, YC., & Yeh, TM. (2018). Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0462-0>.

Chen, J., Ng, M. M. L., & Chu, J. J. H. (2015). Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *PLOS Pathogens*, 11(7), e1005053. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005053>.

Comisión Nacional de Bioética. Código de Nurember, Normas éticas sobre experimentación en seres humanos. Consultado el 5 de julio de 2018. Disponible en: http://www.conbioetica-mexico.salud.gob.mx/descargas/pdf/normatividad/normatinternacional/2.INTL.Cod_Nuremberg.pdf

Cultek. (2006). Fundamentos y tipos de ELISA. Consultado el 9 de julio de 2018. Disponible en: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>

DECLARACION DE HELSINKI DE LA ASOCIACION MEDICA MUNDIAL Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos (59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008).

Du Plooy, J. N., Buys, A., Duim, W., & Pretorius, E. (2013). Comparison of Platelet Ultrastructure and Elastic Properties in Thrombo-Embolic Ischemic Stroke and Smoking Using Atomic Force and Scanning Electron Microscopy. *PLoS ONE*, 8(7), e69774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069774>.

Faye, O., Freire, C. C. M., Iamarino, A., Faye, O., de Oliveira, J. V. C., Diallo, M., Zanotto, P. M. A., & Sall, A. A. (2014). Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), 36. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636>.

Ghosh, K., Gangodkar, S., Jain, P., Shetty, S., Ramjee, S., Poddar, P & Basu, A. (2008). Imaging the interaction between dengue 2 virus and human blood platelets using atomic force and electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy*. 57(3): 113-118. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfn007>.

Gremmel, T., Frelinger, A., & Michelson, A. (2016). Platelet Physiology. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 42(03), 191–204. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1564835>.

Hajtuch, J., Hante, N., Tomczyk, E., Wojcik, M., Witold-Radomski, M., Santos-Martinez, M & Inkielewicz-Stepniak, I. (2019). Effects of Functionalized Silver Nanoparticles on Aggregation of Human Blood Platelets. *International Journal of Nanomedicine*. 14, 7399-7417. <https://doi.org/10.2147/IJN.S213499>.

Hally, KE., La Flamme, AC., Harding, SA & Larsen, PD. (2018). The effects of aspirin and tricagrelor on Toll-like receptor (TLR)-mediated platelet activation: results of a randomized, cross-over trial. *Platelets*. 1-9. <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1479520>.

- Hamzeh-Cognasse, H., Damien, P., Chabert, A., Pozzetto, B., Cognasse, F., & Garraud, O. (2015). Platelets and Infections - Complex Interactions with Bacteria. *Frontiers in Immunology*, 6(February), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00082>.
- Hauschener, H., Katz, T., Beigel, R., Matetzky, S., Sadeh, T., Strauss, Z., Kenet, G & Rosenberg, N. (2019). Platelets function in a drop of blood: flow cytometry analysis compared to platelet aggregation. *Harefuah*. 158(3): 168-172. PMID: 30916503.
- Hayes, E. B. (2009). Zika Virus Outside Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 15(9), 1347–1350. <https://doi.org/10.3201/eid1509.090442>.
- Heller, M. P., & Revisión, A. DE. (2017). Megacariocitopoyesis y trombopoyesis, *Hematología* 21, 7–9. Retrieved from [http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/05-Vol 21-extra.pdf](http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/05-Vol%2021-extra.pdf).
- Jenne, C. N., & Kubes, P. (2015). Platelets in inflammation and infection. *Platelets*, 26(4), 286–292. <https://doi.org/10.3109/09537104.2015.1010441>.
- Kantor, I. N. (2016). ARTÍCULO ESPECIAL DENGUE, ZIKA Y CHIKUNGUNYA Arbovirus y enfermedades virales transmitidas por artrópodos Dengue. *Medicina*, 76(2), 1–5.
- Karagkiozaki, V., Pappa, F., Arvaniti, D., Moumkas, A., Konstantinou, D & Logothetidis S. (2016). The melding of nanomedicine in thrombosis and treatment: a review. *Future Science OA*, 2(2). <https://doi.org/10.4155/fso.16.3>.
- Kicken, CH., Roest, M., Henskens, YMC., de Laat, B & Huskens, D. (2017). Application of an optimized Flow cytometry-based quantification of platelet activation (PACT): Monitoring platelet activation in platelets concentrates. *PLoS ONE*, 12(2): e0172265. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172265>.
- Kim, YC., López.Camacho, C., Garcia-Larragoiti, N., Cano-Mendez, A., Hernandez-Flores, KG., Domínguez-Alemán, CA., Mar, MA., Vivanco-Cid, H., Viveros-Sandoval, ME & Reyes-Sandoval, A. (2019). Development of an E2 ELISA Methodology to Assess Chikungunya Seroprevalence in Patients from an Endemic Region of Mexico. *Viruses*. 1:11(5). <https://doi:10.3390/v11050407>.
- Kitamura, Y., Isobe, K., Kawabata, H., Tsujino, T., Watanabe, T., Nakamura, M., ... Kawase, T. (2018). Quantitative evaluation of morphological changes in activated platelets in vitro using digital holographic microscopy. *Micron*, 113(June), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2018.06.011>.
- Kornienko, N., Ly, KH., Robinson, WE., Heidary, N., Zhang, JZ., & Reisner, E. (2019). Advancing Techniques for Investigating the Enzyme-Electrode Interface. *Accounts of Chemical Research*. <https://doi:10.1021/acs.accounts.9b00087>.
- Li, G., Yang, P., Huang, N., & Ding, H. (2013). Responses of platelets and endothelial cells to heparin/fibronectin complex on titanium: In situ investigation by quartz crystal microbalance with dissipation and immunochemistry. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(2), 235–245. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.02.008>.

Libraty, D., Young, P., Pickering, D., Endy, T., Kalayanarooj, S., Green, S., Vaughn, D., Nisalak, A., Ennis, F. & Rothman, A. (2002). High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. *The Journal of Infectious Diseases*. 186(8), 1165-1168. <https://doi.org/10.1086/343813>.

Lindemann, S., & Gawaz, M. (2007). The Active Platelet: Translation and Protein Synthesis in an Anucleate Cell. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 33(2), 144–150. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969027>.

Linden, M. D. (2013). *Haemostasis*. (P. Monagle, Ed.) (Vol. 992). Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-339-8>.

Loria, G. D., Romagnoli, P. A., Moseley, N. B., Rucavado, A., & Altman, J. D. (2013). Platelets support a protective immune response to LCMV by preventing splenic necrosis. *Blood*, 121(6), 940–950. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-376822>.

Ly, M. H. P., Moi, M. L., Vu, T. B. H., Tun, M. M. N., Saunders, T., Nguyen, C. N., Nguyen, A. K. T., Nguyen, H. M., Dao, T. H., Pham, D. O., Nguyen, T. T. T., Le, T. O. M., Hasebe, F., & Morita, K. (2018). Dengue virus infection-enhancement activity in neutralizing antibodies of healthy adults before dengue season as determined by using FcγR-expressing cells. *BMC Infectious Diseases*, 18(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2894-7>.

Martínez-Arias, M., López-Martínez, B., & Parra-Ortega RESUMEN, I. (2015). Pruebas de laboratorio para la evaluación de la función de las plaquetas. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 62(4), 245–252.

Medina, C., Tomaszewski, K., Gilmer, J., Bazou, D., Santos-Martinez, M., & Radomski, M. (2015). Pharmacological characterization of nanoparticle-induced platelet microaggregation using quartz crystal microbalance with dissipation: comparison with light aggregometry. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 5107. <https://doi.org/10.2147/IJN.S84305>.

Modhiran, N., Watterson, D., Muller, D. A., Panetta, A. K., Sester, D. P., Liu, L., Hume, D. A., Stacey, K. J., & Young, P. R. (2015). Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Science Translational Medicine*, 7(304), 304ra142-304ra142. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3863>.

Mustafa, M. S., Rasotgi, V., Jain, S., & Gupta, V. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(1), 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.09.011>.

Núñez-Avellaneda, D., Mosso-Pani, MA., Sánchez-Torres, L., Castro-Mussot, ME., Corona-de la Peña, NA & Salazar, MaI. (2018). Dengue virus induces the release of sCD40L and changes in levels of membranial CD42b and CD40L molecules in human plateles. *Viruses*. 10(7) 357. <https://doi.org/10.3390/v10070357>.

Pasalic, L., Pennings, GJ., Connor, D., Campbell, H., Kritharides L & Chen, VM. (2017). Flow cytometry protocols for the assessment of platelet function in whole blood. *Hemostasis and Thrombosis*. 369-389. http://doi.org/10.1007/978-1-4939-7196-1_28.

Peña-García, V.H. McCracken, M.K. & Christofferson, R.C. (2017). Examining the potencial for South American Arboviruses to Spread Beyond the New World. *Curr Clin Microbiol Rep.* 4 (4): 208-217. <https://doi.org/10.1007/s40588-017-0076-4>.

Perera, R. & Kuhn, R. J. (2008). Structural Proteomics of Dengue Virus. *Curr Opin Microbiol.*11(4), 369-477.

Piontek, M., & Roos, W. (2018). Atomic Force Microscopy: An Introduction. En Erwin, JG. Peterman (Ed.), *Single Molecule Analysis: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology.* Vol. 1665. pp: 243-252. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7271-5_13.

Radmacher, M., Fritz, M., Kacher, CM., Cleveland, JP & Hansma PK. (1996). Measuring the viscoelastic proprieties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophysical Journal.* 70: 556-567. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79602-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79602-9).

Rehman, A., & Zeng, X. (2017). Monitoring the Cellular Binding Events with Quartz Crystal Microbalance (QCM) Biosensors. En: Prickril B., Rasooly A. (eds). *Biosensors and Biodetection. Metods in Molecular Biology.* Vol. 1572. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6911-1_21.

Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Cervantes-Salazar, M., Lagunes Guillen, A. E., Chávez-Munguía, B., Salas-Benito, J. S., & Del Ángel, R. M. (2018). Strand-like structures and the nonstructural proteins 5, 3 and 1 are present in the nucleus of mosquito cells infected with dengue virus. *Virology*, 515(November 2017), 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.014>.

Rodak, B. (2004). *Hematología. Fundamentos y aplicaciones clínicas*, Buenos Aires, Argentina: Panamericana.

Roest, M., van Holten, TC., Fleurke, GJ & Remijn JA. (2013). Platelet activation test in unprocessed blood (Pac-t-UB) to monitor platelet concentrates and whole blood of thrombocytopenic patients. *Tranfusion Medicine and Hemotherapy.* 40: 117-125. <https://doi.org/10.1159/000350688>.

Rosa da Silva, C. M., Chura-Chambi, R. M., Ramos Pereira, L., Cordeiro, Y., de Souza Ferreira, L. C., & Morganti, L. (2018). Association of high pressure and alkaline condition for solubilization of inclusion bodies and refolding of the NS1 protein from zika virus. *BMC Biotechnology*, 18(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0486-2>.

Rowley, J. W., Schwertz, H., & Weyrich, A. S. (2012). Platelet mRNA. *Current Opinion in Hematology*, 19(5), 385–391. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328357010e>.

Santos, N. C., & Castanho, M. A. R. B. (2004). An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. *Biophysical Chemistry*, 107(2), 133–149. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2003.09.001>.

Santos-Martínez, MJ., Inkielewicz-Stepniak, I., Medina, C., Rahme, K., D'Arcy, DM., Fox, D., Holmes, JD., Zhang, H & Radomski, MW. (2012). The use of quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) for studying nanoparticle-induced platelet aggregation. *International Journal of Nanomedicine*. 7, 243-255. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26679>.

Santos-Martínez, MJ., Tomaszewski, KA., Medina, C., Bazou, D., GilmeR, JF & Radomski MW. (2015). Pharmacological characterization of nanoparticle-induced platelet microaggregation using quartz crystal microbalance with dissipation: comparison with light aggregometry. *International Journal of Nanomedicine*. 10, 5107-5119. <https://doi.org/10.2147/IJN.S84305>.

Semple, J. W., Italiano, J. E., & Freedman, J. (2011). Platelets and the immune continuum. *Nature Reviews Immunology*, 11(4), 264–274. <https://doi.org/10.1038/nri2956>.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología. (2019). *Boletín epidemiológico, semana 49*. Consultado el 15 de diciembre de 2018. Disponible en: <https://www.google.com.mx/search?q=boletin+epidemiologico&oq=bole&aqs=chrome..69i57j69i59j0l4.1896j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8>

Sorrentino, S., Studt, J.-D., Horev, M. B., Medalia, O., & Sapra, K. T. (2016). Toward correlating structure and mechanics of platelets. *Cell Adhesion & Migration*, 10(5), 568–575. <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1173803>.

Stadler, H., Mondon, M & Ziegler, C. (2003). Protein adsorption on surfaces: dynamic contact-angle (DCA) and quartz-crystal microbalance (QCM) measurements. *Anal Bioanal Chem*. 375: 53-61. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1664-5>.

Stalker, TJ., Newman, DB., Peisong, Ma., Wannemacher, KM & Brass, LF. (2012). Platelet signalling. *Handb Exp Pharmacol*. (210): 59-85. <https://www.doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5>.

Tai, DF., Lin, CY., Wu, TZ & Chen, LK. (2005). Recognition of dengue virus protein using epitope-mediated molecularly imprinted film. *Analytical Chemistry*. 77(16), 5140-5143. <https://doi.org/10.1021/ac0504060>.

Thon, J. N., & Italiano, J. E. (2012). *Antiplatelet Agents*. (P. Gresele, G. V. R. Born, C. Patrono, & C. P. Page, Eds.) (Vol. 210). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5>.

Tobimatsu, H., Nishibuchi, Y., Sudo, R., Goto, S., & Tanishita, K. (2015). Adhesive Forces between A1 Domain of von Willebrand Factor and N-terminus Domain of Glycoprotein Iba Measured by Atomic Force Microscopy. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 22(10), 1091–1099. <https://doi.org/10.5551/jat.28423>.

Tomer, A. (2004). Platelet activation as a marker for in vivo prothrombotic activity: detection by flow cytometry. *J Biol Regul Homeost Agents*. 18(2):172-7. PMID: 15471223.

van Rooy, M.-J., Duim, W., Ehlers, R., Buys, A. V., & Pretorius, E. (2015). Platelet hyperactivity and fibrin clot structure in transient ischemic attack individuals in the presence of metabolic

syndrome: a microscopy and thromboelastography® study. *Cardiovascular Diabetology*, 14(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12933-015-0249-5>.

Viranaicken, W., Ndebo, A., Bos, S., Souque, P., Gadea, G., El-Kalamouni, C., Krejbich-Trotot, P., Charneau, P., Després, P., & Roche, M. (2017). Recombinant Zika NS1 Protein Secreted from Vero Cells Is Efficient for Inducing Production of Immune Serum Directed against NS1 Dimer. *International Journal Molecular Science*.23:19 (1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010038>.

Whitehorn, J. & Farrar, J. (2010). Dengue. *Br. Med. Bull.* 95(1): 161-173. <https://doi:10.1093/bmb/ldq019>.

Wicki, A.N. Walz, A. Gerber-Huber, S.N. Vornhagen, R. & Clementson, K.J. (1989). Isolation and Characterization of Human Blood Platelet mRNA and Construction of a cDNA Library in λ gt11. Confirmation of the Platelet Derivation by Identification of GPIb Coding mRNA and Cloning of a GPIb Coding cDNA Insert. *Thromb. Haemost.* 50(7), 1581–1588. <https://doi:10.1111/j.1537-2995.2010.02585.x>.

Wong, K. Z., & Chu, J. J. H. (2018). The Interplay of Viral and Host Factors in Chikungunya Virus Infection: Targets for Antiviral Strategies. *Viruses*, 10(6), 294. <https://doi.org/10.3390/v10060294>.

Wu, J., Zhu, H., Yang, G., He, J., Wang, Y., Zhao, S., Zhang, X., Gui, L., Zhao, M., & Peng, S. (2018). Design and synthesis of nanoscaled IQCA-TAVV as a delivery system capable of antiplatelet activation targeting arterial thrombus and realising IQCA. *International Journal of Nanomedicine*. (13), 1139-1158. <https://doi.org/10.2147/IJN.S150205>

Yao, J., Feng, B., Zhang, Z., Li, C., Zhang, W., Guo, Z., Zhao, H & Zhou, L. (2018). Blood Coagulation Testing Smartphone Platform Using Quartz Crystal Microbalance Dissipation Method. *Sensors*, 18(9), 3073. <https://doi.org/10.3390/s18093073>.

Zapata, J. C., Cox, D., & Salvato, M. S. (2014). The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(6), e2858. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002858>.

16. Anexos

16.1. Carta de consentimiento informado

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL GENERAL "DR. MIGUEL SILVA"
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN**

Carta **CONSENTIMIENTO INFORMADO** Para participar en el protocolo de estudio: Estudio seroprevalencia de enfermedades causadas por arbovirus Zika, Dengue y Chikungunya en individuos aparentemente sanos de la ciudad de Morelia.

INTRODUCCION: La siguiente información describe el protocolo al cual se le está invitando para participar de forma activa. El investigador deberá responder cualquier duda que surja a partir de la lectura de ésta.

PROPOSITO DEL ESTUDIO: Estudiar la seroprevalencia de infecciones causadas por arbovirus, en personal de riesgo.

PROCEDIMIENTO: Ha sido elegido para participar en este estudio, si usted desea participar, contestará un cuestionario y proporcionará una muestra de sangre, la cual será procesada y almacenada para posteriormente determinar los niveles séricos de biomarcadores inflamatorios y anticuerpos específicos para Dengue, Chikungunya y Zika, cabe mencionar que dichas muestras no serán utilizadas con fines genéticos.

BENEFICIOS PARA PARTICIPANTES: Los resultados aportarán información nueva e importante para posteriormente realizar estudios clínicos fase I y II de modelos de vacunas.

CONFIDENCIALIDAD. La información obtenida durante el desarrollo de este estudio es absolutamente confidencial y no puede ser utilizada con otro fin. Usted será informado acerca de cualquier hallazgo de importancia para su salud durante el desarrollo de este estudio.

PARTICIPACION VOLUNTARIA: Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación en el momento que lo desee. Además, sé que puedo pedir información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio. Recibiré, si así lo solicito una copia de los resultados de laboratorio de los estudios que se me practiquen. Debo informar, tan pronto como sea posible a los investigadores de cualquier cambio importante que ocurra en mi salud, incluyendo el consumo de medicamentos, suspensión o inicio de algún hábito (p. ej. tabaquismo, alcoholismo) o cambio de domicilio. Sé que las muestras obtenidas sólo podrán ser utilizadas para los fines de este estudio. Los costos del estudio los cubrirán los fondos del proyecto y el paciente no pagará por los estudios paraclínicos propios del proyecto de investigación.

En caso de cualquier duda o inconformidad con el presente proyecto puede usted dirigirse con la Dra. María Teresa Silvia Tinoco Zamudio presidenta del Comité de Ética en Investigación, teléfono 3-17-29-97.

He comprendido el contenido de esta carta de consentimiento informado, mis dudas han sido resueltas y voluntariamente acepto participar en este estudio.

FIRMA DEL INVESTIGADOR Y FECHA.

NOMBRE, FIRMA DEL PACIENTE Y FECHA

FIRMA DE TESTIGO I Y FECHA

FIRMA DE TESTIGO II Y FECHA

16.2. Cuestionario estado general de salud.

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHAVEZ"
DIVISION ESTUDIOS DE POSGRADO
LABORATORIO DE HEMOSTASIA Y BIOLOGIA VASCULAR
FECHA:

NOMBRE: _____ SEXO: _____ EDAD: _____

ORIGEN: _____ RESIDENCIA: _____

OCUPACIÓN: _____ ESTADO CIVIL: _____

TEL: (____) _____

1. Enfermedades concomitantes.

- | | Sí | No |
|--|--------------------------|--------------------------|
| • ¿Padece Diabetes Mellitus? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| • ¿Padece Hipertensión arterial? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| • ¿Padece de alguna enfermedad? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ○ ¿Cuál? _____ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| • ¿Ha padecido Dengue, Chikungunya o Zika? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| • ¿Ha padecido dolor articular incapacitante, sin causa aparente? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ○ ¿Cuándo? _____ | | |
| • ¿Ha padecido fiebre, por más de 3 y menos de 7 días, sin causa aparente? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ○ ¿Cuándo? _____ | | |
| • ¿Ha presentado exantema sin causa aparente? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ○ ¿Cuándo? _____ | | |
| • ¿Has viajado a Tierra Caliente o La costa, en los últimos 6 meses? | | |
| ○ ¿Cuándo? _____ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

2. Medicamentos.

- ❖ Toma usted algún medicamento: Sí _____ No _____
 ○ En caso de respuesta afirmativa, dosis y frecuencia _____

3. Medidas antropométricas.

Peso	Talla	IMC

IMC (Kg/m ²)	Clasificación
18.5-24.9	Normal
25-29.9	Sobrepeso
>30	obesidad

4. Signos vitales.

Presión arterial sistólica	
Presión arterial diastólica	
Frecuencia cardíaca	
Frecuencia respiratoria	
Temperatura	

5. Marcadores bioquímicos.

Variables de estudio	Quantificación sérica de anticuerpos contra Dengue	
	Quantificación sérica de anticuerpos contra Chikungunya	
	Quantificación sérica de anticuerpos contra Zika	
Biometría Hemática	Cuenta de plaquetas	
	VPM	
Biomarcadores inflamatorios	TNF-alfa	
	IL-6	
	IL-1	

16.3. Constancia de aprobación de proyecto por parte del comité de ética de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la UMSNH



Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
"Dr. Ignacio Chávez"

SECRETARÍA ACADÉMICA

A S U N T O: INFORMACIÓN

Morelia, Mich., 01 de Junio de 2018.

C. DRA. MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL
PROFESOR INVESTIGADOR DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
P R E S E N T E

Le notifico que el protocolo de investigación que Usted presentó ante esta Secretaría Académica a mi cargo, y cuyo título es **"Estudio de seroprevalencia de enfermedades causadas por arbovirus zika, dengue y chikungunya en individuos aparentemente sanos en la ciudad de Morelia"** y que fue sometido a la evaluación del Comité de Investigación y Ética en Investigación de esta Dependencia Universitaria, quien (es) de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores consideraron que cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación vigentes, por lo que el protocolo fue **AUTORIZADO**, habiéndose asignado el número de registro de la dependencia siguiente:

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA EN INVESTIGACIÓN	ÁREA	Nº DE REGISTRO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR. IGNACIO CHÁVEZ"	POSGRADO	002/P/5/2018

Se le solicita informar del grado de avance del mismo acorde al cronograma de actividades así como el título de la revista, volumen, año y páginas una vez que el mismo sea publicado. En caso de que el mismo contemple la graduación de un alumno indicar fecha y grado académico obtenido.

A t e n t a m e n t e:

DR. MARIO MIGUEL ANGEL HERRERA CHAYRES
SECRETARIO ACADÉMICO



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
SECRETARÍA ACADÉMICA

c.c.p. Coordinador de la Investigación Científica UMSNH
c.c.p. Archivo y Correspondencia de la Facultad.
c.c.p. Archivo de la Secretaría Académica.
c.c.p. Jefatura de Investigación Fac Cs Med y Biol. "Dr. Ignacio Chávez"
DR. MMAHC/CAA

16.4. Constancia de aprobación de proyecto por parte del comité de ética del Hospital Civil de Morelia “Dr. Miguel Silva”


Gobierno del Estado
de Michoacán de Ocampo

Dependencia: SECRETARÍA DE SALUD DE MICHOACÁN
Sub-dependencia: HOSPITAL GENERAL "DR. MIGUEL SILVA"
Oficina: DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA
No. de oficio: 5009388/18
Expediente:
Asunto: SE INFORMA SOBRE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

"2018, AÑO DEL CENTENARIO DE LA CONSTITUCIÓN POLÍTICA DEL ESTADO LIBRE Y SOBERANO DE MICHOACÁN DE OCAÑO"

Morelia, Michoacán, 23 de abril del 2018.

**C. DRA. MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL
PRESENTES.**

Por este conducto informo a ustedes, que el Comité de Ética en Investigación con número de registro Conbioética-16-CEI-004-20161212 de fecha de expedición 12 de diciembre del 2016 y el Comité de Investigación con número de Registro 17-CI-16053153 con fecha de expedición 11 de noviembre del 2017 de este Hospital General "Dr. Miguel Silva" revisaron y aprobaron el protocolo de investigación titulado:

"Estudio de seroprevalencia de enfermedades causadas por arbovirus Zika, Dengue y Chikungunya en individuos aparentemente sanos en la ciudad de la ciudad de Morelia.

No omito mencionar que deberán presentar a estos comités el informe final de su proyecto de investigación para lo cual deberá solicitar los criterios específicos a la Unidad de investigación.

Sin más por el momento, le envié un cordial saludo.

ATENTAMENTE


DRA. MARÍA TERESA SILVIA TINOCO ZAMUDIO
PRESIDENTA DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
DEL HOSPITAL GENERAL "DR. MIGUEL SILVA"


DR. JOSÉ FRANCISCO LÓPEZ BELTRÁN
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL GENERAL "DR. MIGUEL SILVA"


COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN


COMITÉ DE INVESTIGACIÓN
HOSPITAL GENERAL "DR. MIGUEL SILVA"
SECRETARÍA DE SALUD DE MICHOACÁN

Al contestar este oficio, deberá ser sellado, autografiado en el cuadro del ángulo superior derecho.