



UNIVERSIDAD MICHUACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
*Cuna de héroes, crisol de pensadores*



# **UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA**

\_\_\_\_\_  
TESIS:

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE SECUENCIAS PROTEICAS DE VIRUS DE DENGUE E  
INDUCCIÓN DE RESPUESTA CELULAR MEDIADA POR PLAQUETAS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CON OPCION EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR AGROPECUARIA**

PRESENTA:

**M. EN C. NALLELY ITANDEHUI GARCÍA LARRAGOITI**

DIRECTORA DE TESIS:

**D.C. MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL**

CO-DIRECTORA DE TESIS:

**D.C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS**

**Morelia Michoacán Febrero 2022**

*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 Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, bajo la dirección de la D. en C. Martha Eva Viveros Sandoval y la D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas. Durante la realización del proyecto se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT mediante la beca nacional para estudiantes responsables del proyecto, con número de registro de becario 28647*

## **COMITÉ TUTORAL**

D.C. Alejandra Ochoa Zarzosa

D.C. Gerardo Vázquez Marrufo

D.C. Arturo Reyes Sandoval

*Dedicatoria*

*A José Fabio.*

*Eres y serás mi razón de vida.*

## **Agradecimientos**

A la Dra. Martha Eva Viveros Sandoval, por ser mi guía, consejera, amiga y mentora. Por creer en mí para llevar a cabo este proyecto y apoyarme en cada paso. *“Lo único imposible es aquello que no se intenta”* gracias por hacerme creer en esto.

Al Dr. Arturo Reyes Sandoval, por abrirme las puertas de su laboratorio, fue una experiencia enriquecedora a nivel personal y profesional. Gracias por los consejos y todo el apoyo.

A la Dra. Soledad Vázquez Garcidueñas, por ser un ejemplo de trabajo y disciplina, por la paciencia, la confianza y la dedicación al proyecto.

Al Dr. Gerardo Vázquez Marrufo y la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa, por su invaluable ayuda y aportes durante cada seminario, porque siempre tuvieron la mejor disposición para compartir su tiempo y conocimiento.

A mis compañeros del laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular, por hacer de este lugar mi segundo hogar, por todo su apoyo, cariño y trabajo en equipo.

A la Dra. Sandra López Castañeda, y el M.C. Alan Cano Méndez, por siempre estar a mi lado, por la palabra de aliento, el abrazo en tiempos difíciles. Mi admiración y amor siempre.

A mi familia, mis padres por el apoyo y el amor incondicional, estoy orgullosa de ser su hija, a mis hermanos por siempre hacerme reír, por ser los mejores compañeros de vida. A mi Marianita porque gracias a ti mi vida es más feliz y más plena.

A Fabio mi compañero de vida y proyectos, por todo tu apoyo, por ser mi amor bonito.

A Conacyt y a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el apoyo que me dieron durante todo el proceso.

## ÍNDICE GENERAL

1. Introducción .....	1
1.1 Plaquetas .....	2
1.1.2 Estructura plaquetaria.....	3
1.2 Plaquetas e inmunidad.....	10
1.3 Arbovirus.....	11
1.4 Epidemiología .....	12
1.5 Patogénesis del dengue.....	12
1.6 Estructura del virus de Dengue .....	14
1.6.1 Proteína no estructural 1 (NS1) del virus de dengue.....	16
1.6.2 Estructura de NS1 de DENV .....	17
1.7 Respuesta inmune contra NS1.....	18
1.8 Proteína no estructural 1 (NS1) y plaquetas.....	19
2. Justificación.....	25
3. Planteamiento del problema .....	26
4. Hipótesis.....	27
5. Objetivos .....	27
5.1 Objetivo General .....	27
5.2 Objetivos específicos.....	27
Capítulo I.....	28
<i>Production and Purification of Dengue Virus NS1 Glycoprotein in HEK293 Cells</i> .....	28
1. Introducción .....	29
2. Materiales y métodos .....	30
2.1 Expresión de la proteína NS1 usando células HEK293T.....	30
2.2 Purificación de proteínas secretadas usando una etiqueta His-6 (IMAC).....	30
2.3 Purificación adicional por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).....	30
2.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot (WB) .....	30
3. Resultados .....	31
3.1 Producción y purificación de las proteínas DENV NS1 completa, NS1 wing, NS1 $\beta$ -ladder y NS1 mutante.....	31

4. Conclusión.....	34
5. Notas .....	34
6. Referencias .....	36
Capitulo II .....	38
<i>Platelet activation and aggregation response to dengue virus nonstructural protein 1 and domains</i> .....	38
1. Introducción .....	40
2. Material y métodos.....	40
2.1 Production and purification of DENV NS1 full-length protein and domains .....	40
2.2 Blood sample collection .....	41
2.3 Platelet isolation .....	41
2.4 Platelet stimulation with NS1 DENV and viral proteins domains .....	41
2.5 Flow cytometry assays .....	41
2.6 Strategy to obtain platelet activation positive control .....	41
2.7 Light transmission aggregation assays .....	41
2.8 Statement of ethics .....	42
2.9 Statistical analysis .....	42
3. Resultados .....	42
3.1 Production and purification of DENV NS1 full-length protein and domains.....	42
3.2 DENV NS1 protein and domains induced platelet activation.....	43
3.3 NS1 full-length promotes platelet aggregation in the presence of low doses of platelet agonists.....	45
3.4 Platelet aggregation capacity stimulated by NS1 wing, NS1 $\beta$ -ladder, and NS1 mutant..	45
4. Discusión.....	45
5. Acknowledgments.....	48
6. Referencias .....	48
Capitulo III.....	50
<i>Respuesta trombo-inflamatoria en pacientes con virus de Dengue</i> .....	50
1. Introducción .....	51
1.1 Características clínicas de la enfermedad del dengue .....	52
1.2 Patogenia mediada por citoquinas .....	52
2. Material y métodos.....	53
2.1 Obtención de la muestra.....	53
2.2 Aislamiento de plaquetas .....	53

2.3 Ensayos de determinación de citocinas .....	54
2.4 Plan de análisis estadístico .....	54
2.5 Aspectos éticos.....	55
3. Resultados .....	56
3.1 Evaluación de la actividad plaquetaria en pacientes con diagnóstico positivo a DENV en estado agudo.....	56
3.2 Evaluación de la citocinas en pacientes con diagnóstico positivo a dengue. ....	58
3.4 Evaluación de citocinas inflamatorias en pacientes con dengue. ....	59
3.4.1 IL-6.....	59
3.4.2 IL-8.....	60
3.5 Evaluación de marcadores trombóticos en pacientes con dengue.....	61
3.5.1 Dímero-D .....	61
3.6 Activador tisular del plasminógeno.....	63
3.7 Evaluación de moléculas de adhesión en pacientes con dengue. ....	64
3.7.1 P-Selectina.....	64
3.7.2 PSGL-1 .....	65
3.7.3 Factor tisular.....	66
4. Discusión.....	68
5. Conclusión.....	71
6. Referencias .....	71
Capítulo IV.....	77
<i>Un dúo peligroso: Calentamiento global y virus tropicales</i> .....	77
6. Discusión general .....	83
7. Conclusiones .....	90
8. Referencias.....	91
9. Anexos.....	96
9.1 Oficio de autorización del proyecto .....	96
9.2 Carta de consentimiento informado. ....	97

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Generalidades de los gránulos plaquetarios .....	5
Tabla 2. Función de las moléculas contenidas en los gránulos alfa de las plaquetas.....	6
Tabla 3. Función de las moléculas contenidas en los gránulos densos de las plaquetas...	18
Tabla 4 Características clínicas y demográficas de la población de estudio .....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1. Estructura plaquetaria.....	5
Ilustración 2 Genoma y ciclo biológico de los arbovirus .....	15
Ilustración 3 Estructura de la proteína NS1 de los flavivirus .....	18
Ilustración 4 Diseño y caracterización de los dominios de NS1 de DENV .....	33
Ilustración 5 Western blot de la proteína y los dominios DENV NS1 .....	34
Ilustración 6. Flow cytometry strategy to identify activated platelets.....	42
Ilustración 7 Detection of platelet activation with different agonists.....	43
Ilustración 8 Design and characterisation of dengue virus (DENV) non-structural protein 1 (NS1) protein and domains .....	44
Ilustración 9 Platelet stimulation with non-structural protein 1 (NS1) full-length and domains.46	
Ilustración 10 Comparison of activation markers .....	46
Ilustración 11. Determination of the aggregation capacity of platelets in response to non-structural protein 1 (NS1) full-length.....	47
Ilustración 12. Assessment of platelet aggregation capacity in response to dengue virus (DENV) .....	57
Ilustración 13 Comparación en los porcentajes de fluorescencia de $\alpha$ IIb $\beta$ III-FITC en pacientes con diagnóstico de dengue y plaquetas estimuladas con las proteínas virales. ....	58
Ilustración 14 Comparación en los porcentajes de fluorescencia de P-selectina-CD62 PE en pacientes con diagnóstico de dengue y plaquetas estimuladas con las proteínas virales .....	59
Ilustración 15 Comparación de las concentraciones plasmáticas de IL-6 en pacientes con DENV de acuerdo a los días de evolución .....	60
Ilustración 16. Comparación de las concentraciones plasmáticas de IL-8 en pacientes con DENV de acuerdo a los días de evolución.....	62
Ilustración 17 Comparación de las concentraciones plasmáticas de dímero DENV según la evolución de la enfermedad. ....	63
Ilustración 18. Concentraciones plasmáticas de PAI-1 en pacientes con DENV.....	64
Ilustración 19. Concentraciones plasmáticas de tPA en pacientes con DENV .....	65
Ilustración 20 Concentraciones plasmáticas de P-selectina en pacientes con DENV.....	66

Ilustración 21. Concentraciones plasmáticas de PSGL-1 en pacientes con DENV .....	67
Ilustración 22. Comparación de las concentraciones plasmáticas de dímero Factor Tisular según la evolución de la enfermedad.....	67

## RESUMEN

El dengue es una enfermedad viral reemergente responsable de 50-100 millones de casos clínicos y 10,000 muertes cada año en todo el mundo. Las plaquetas juegan un papel central en la interfaz de inmunidad y hemostasia durante las infecciones virales. Estas células ahora son reconocidas como centinelas inmunológicas en la primera línea de defensa que participan en la detección y respuesta a patógenos y son responsables de enviar señales de daño a la vasculatura y al espacio extravascular. Con frecuencia, esto da como resultado una disminución en el número de plaquetas circulantes fenómeno conocido como trombocitopenia.

La trombocitopenia es una característica común que ocurre en las manifestaciones de dengue leve y severo y está estrechamente relacionada con la gravedad de la enfermedad. Se han estudiado diferentes mecanismos para explicar la trombocitopenia en pacientes con dengue severo, uno de ellos es la participación de la proteína no estructural 1 (NS1) del virus del dengue (DENV) que puede secretarse a la circulación durante la infección por DENV promoviendo una infección más eficaz.

En este trabajo, demostramos que la proteína NS1 de DENV en su versión completa y sus dominios ( $\beta$ -ladder, NS1 wing y NS1 mutante) inducen la expresión del complejo P-selectina y glicoproteína  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 (integrina gpIIB/IIIa) en la superficie de las plaquetas. La proteína completa (DENV NS1) pudo inducir una agregación plaquetaria estable tras la adición de una dosis mínima de difosfato de adenosina (ADP), epinefrina (EPI) y colágeno. Curiosamente, solo EPI podría inducir la formación de agregados plaquetarios después de incubar con los dominios proteicos de NS1.

Nuestros resultados sugieren que todo el DENV NS1 y sus dominios promueven el reconocimiento, la activación y la agregación de plaquetas. En cuanto a los resultados obtenidos en la expresión de citocinas inflamatorias y trombóticas en pacientes infectados con DENV observamos una mayor expresión durante la fase aguda, lo que concuerda con el tiempo de circulación de la proteína NS1 en el organismo, por otro lado los resultados in vitro son similares a los que observamos en pacientes en fase aguda. Los niveles incrementados de citocinas inflamatorias y pro trombóticas al inicio de la infección pueden ser marcadores de pronóstico para la progresión a Dengue grave y parecen desempeñar un papel en la patogénesis de la enfermedad.

*Palabras clave: Dengue, Plaquetas, NS1, inflamación, trombosis.*

## ABSTRACT

Dengue is a viral re-emerging disease responsible of 50-100 million clinical cases and 10,000 deaths every year worldwide. Platelets play a central role in the interface of immunity and haemostasis during viral infections. These cells are now recognized as immunological sentries in the first line of defense that participate in the detection and response to pathogens and are responsible for sending signs of damage to the vasculature and extravascular space. This frequently results in a decrease in the number of circulating platelets. Thrombocytopenia is a common characteristic that occurs in mild and severe dengue and is closely related to the severity of the disease. Different mechanisms have been hypothesized to explain the thrombocytopenia in patients with severe dengue, one of them is the participation of the non-structural protein 1 (NS1) of dengue virus (DENV) which can be secreted into circulation during DENV infection and promotes a more efficient infection. In this report, we demonstrate that the Full-length DENV NS1 protein and its domains ( $\beta$ -ladder, wing and NS1 mutant) induce P-selectin and glycoprotein  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (gpIIb/IIIa, integrin) complex expression on platelets surface. The complete protein (DENV NS1) was able to induce a stable platelet aggregation after the addition of a minimal dose of adenosine diphosphate (ADP), epinephrine (EPI) and collagen. Interestingly, only EPI could induce the formation of platelet aggregates after incubating with the protein domains of NS1. Our results suggest that the entire DENV NS1 and its domains promote platelet recognition, activation, and aggregation.

Regarding the results obtained in the expression of inflammatory and thrombotic cytokines in patients infected with DENV, we observed a greater expression during the acute phase, which is consistent with the circulation time of the NS1 protein in the organism, and on the other hand the results in vitro are similar to those observed in patients in the acute phase. Increased levels of inflammatory and prothrombotic cytokines

at the onset of infection may be prognostic markers for progression to severe Dengue and appear to play a role in the pathogenesis of the disease.

*Keywords: Dengue, Platelets, NS1, inflammation, thrombosis*

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plaquetas son células anucleadas, que almacenan ARN para ser procesado mediante mecanismos de vías postranscripcionales altamente especializadas para sintetizar proteínas como factores de coagulación, proteínas de defensa y citocinas; almacenarlos en gránulos citoplasmáticos y finalmente secretarlos en respuesta a estímulos durante la activación plaquetaria (Semple, Italiano, & Freedman, 2011). El papel de las plaquetas se ha centrado tradicionalmente en la hemostasia y la trombosis, sin embargo, las funciones inflamatorias con una influencia importante en las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas apuntan hacia un papel principal de las plaquetas en la inmunidad (Hamzeh-cognasse et al., 2015). La trombocitopenia es un sello distintivo en pacientes con síntomas leves o graves de infección por el virus del dengue (DENV) (Simon, Sutherland, & Pryzdial, 2015). La caída del recuento de plaquetas y el aumento de la activación plaquetaria en pacientes con dengue se correlacionan con los niveles de inestabilidad hemodinámica y la gravedad de la enfermedad, mientras que su recuperación se asocia con una mejoría clínica (Simon, Sutherland, & Pryzdial, n.d.). Plaquetas que expresan moléculas de reconocimiento de patógenos específicos (Ojha et al., 2017). Además, las citocinas liberadas de las plaquetas activadas tras la degranulación pueden alterar las funciones endoteliales en condiciones patológicas, lo que conduce a la agregación plaquetaria (Azeredo, Monteiro, & Pinto, 2015); como resultado, una disminución en el número de plaquetas es una manifestación que se observa comúnmente en varias enfermedades infecciosas, incluidos los causados por virus. La infección por el virus del dengue (DENV) es la enfermedad viral transmitida por mosquitos más prevalente, y se transmite en entornos urbanos por mosquitos hembras infectados *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. La infección por DENV es endémica en más de 100 países y se considera responsable de aproximadamente 50-100 millones de casos cada año (Guzman et al., 2010). El DENV es un virus de ARN que codifica tres proteínas estructurales, la proteína de la envoltura (E), la proteína de membrana (M), la cápside (C) y siete proteínas no estructurales (NS). La proteína no estructural 1 (NS1) es una glicoproteína versátil de PM de 45-56 kDa que contiene 352 residuos de aminoácidos (Akey, Brown, Dutta, Konwerski, & Jose, 2014). NS1 participa en la replicación del genoma viral como un dímero intracelular, puede expresarse en la superficie celular de la célula infectada y participa en la

evasión del sistema inmunológico como un hexámero secretado a la circulación. El análisis de la estructura cristalográfica revela que cada monómero NS1 está organizado en tres dominios diferentes: el  $\beta$ -roll altamente hidrofóbico (1-29 aminoácidos), el ala (30-180 aminoácidos) y la  $\beta$ -ladder (181-352 aminoácidos) (Rastogi, Sharma, & Singh, 2016). La evidencia experimental sugiere que NS1 podría desempeñar un papel importante durante la replicación del virus. Se ha informado que los niveles séricos de NS1 en pacientes infectados con dengue se correlacionan con la gravedad de la enfermedad y estos pueden alcanzar hasta 50  $\mu\text{g} / \text{ml}$  en la etapa aguda de la infección (Alcon et al., 2002). La detección de NS1 circulante en el suero de pacientes infectados es un enfoque comúnmente utilizado para el diagnóstico precoz de esta infección por DENV (Lai et al., 2017). Se ha sugerido que DENV NS1 podría unirse directamente a las plaquetas e inducir la activación plaquetaria a través de la transducción de señales (Edeling, Diamond, & Fremont, 2014), lo que puede aumentar la secreción plaquetaria de factores de coagulación, mediadores inflamatorios y conducir a la agregación plaquetaria, aunque se reconoce que la proteína NS1 desempeña un papel fundamental en la patogenia del dengue, se sabe poco sobre el papel que desempeñan los dominios NS1 individuales en la respuesta plaquetaria.

### **1.1 Plaquetas.**

Las plaquetas son células provenientes del megacariocito, célula localizada principalmente en medula ósea, y cuya función fisiológica más importante y estudiada es su participación en los procesos de hemostasia y trombosis (López & Macaya, 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. 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, liberan 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  (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, las cuales a su vez presentan una serie de terminaciones 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).

### **1.1.2 Estructura plaquetaria**

La estructura 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; esta posee un espesor de aproximadamente 20 nm y se trata de una bicapa lipídica rica en glucoproteínas.

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 secretorios clasificados de acuerdo con su ultraestructura, densidad y contenido en: gránulos alfa ( $\alpha$ ), gránulos densos ( $\delta$ ) y lisosomas ( $\lambda$ ), como se muestra en la figura 1 y en la tabla 1 (Bermejo, 2017; Gremmel et al., 2016).

No se encuentran elementos de tabla de ilustraciones.

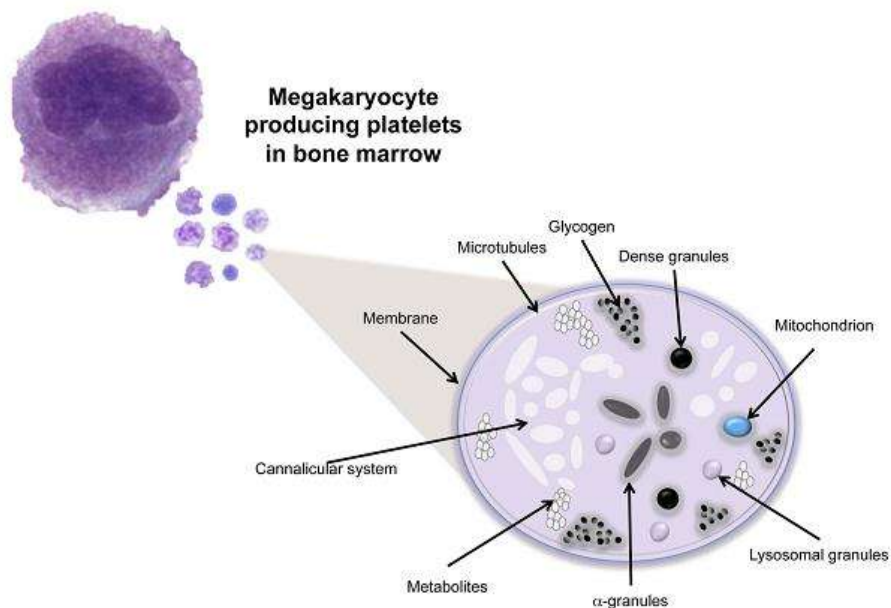


Ilustración 1. Estructura plaquetaria

**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*.

**Tabla 1. Generalidades de los gránulos plaquetarios**

	Cantidad/ plaqueta	Diámetro (nm)	Área de superficie ( $\mu\text{m}^2$ ) / plaqueta	Marcadores comunes	Funciones generales
<b><math>\alpha</math>-gránulos</b>	50-80	200-500	14	vWF, CXCL (PF4), P-selectina	Hemostasis/trombosis Inflamación

					Angiogénesis Defensa del huésped Mitogénesis
<b>δ-gránulos</b>	3-8	150	< 1	CD63, Serotonina	Hemostasis/trombosis Inflamación
<b>Lisosomas</b>	< 3	200-250	< 1	Fosfatasa ácida	Digestión endosomal

*Modificado de: Gremmel et. al., 2016.*

Los gránulos  $\alpha$  aparecen en la región trans (TGN, Trans-Golgi Network) 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:  $\beta$ -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  $\alpha$  de las plaquetas**

TIPO DE MOLÉCULA	CONTENIDO DE GRÁNULO	FUNCIONES
<b>Proteínas de adhesión</b>	vWF + pro-péptido, Fg, Fn, Vn, TSP-1, TSP-2, laminina-8	Interacciones de contacto celular,

		hemostasia primaria y constituyentes de la matriz extracelular
<b>Factores de la coagulación y sus inhibidores</b>	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
<b>Factores fibrinolíticos y sus inhibidores</b>	Plaminógeno, PAI-1, u-PA, $\alpha$ 2-antiplasmina, TAFI, $\alpha$ 2-macroglobulina	Producción de plasmina y remodelación vascular
<b>Proteasas y antiproteasas</b>	MMP-1, -2, -9, ADAMTS13, ADAMS10, ADAMS17, TIMPs 1-4, inhibidor plaquetario del FIX, C1 inhibidor, $\alpha$ 2-antitripsina	Angiogénesis, regulación de la coagulación y de mecanismos celulares
<b>Factores de crecimiento y mitogénicos</b>	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
<b>Quimiocinas, citocinas y otros</b>	TGF- $\beta$ 1 y $\beta$ 2, IL-1, RANTES (CCL-5), IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, GRO- $\alpha$ , MCP-1, MCP-3, PF4, $\beta$ -TG, NAP-2, angiopoyetina-1, HMGB1, IL-6sR, endostatina, osteonectina, dickkopf-1, osteoprotegerina	Regulación de angiogénesis, quimiotaxis, interacción celular, remodelación vascular
<b>Proteínas antimicrobianas</b>	Trombocidinas, quinocidinas	Bactericida, fungicida
<b>Glicoproteínas de membrana</b>	$\alpha$ IIb $\beta$ 3, $\alpha$ v $\beta$ 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
<b>Otras</b>	4-sulfato de condroitina, albúmina, inmunoglobulinas G y M, precursor de amilode b	Varias

proteína, factor H de  
complemento, semaforin 3<sup>a</sup>

Modificado de: Bermejo, 2017.

Los cuerpos o gránulos densos ( $\delta$ ) 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 en forma detallada en la siguiente tabla (Tabla 3).

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

	<b>CONTENIDO DEL GRANULO</b>	<b>FUNCIÓN</b>
<b>Señalización celular</b>	Rho-GDP-inhibidor del dominio N terminal de calcio-calmodulina, 14-3-3 zproteína	Regulador de proteínas Rho, movilización y unión de calcio, activadores de Tyr 3-hidroxilasas, unión de proteínas a fosfatidilserina
<b>Moléculas chaperonas</b>	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
<b>Citoesqueleto</b>	B actina, $\alpha$ lactina, proteína asociada a adenilatociclasa, cofilina 1, filamina A, precursor de gelsolin, kindin1, cadena liviana de miosina-2, pleckstrina,	Involucran movilidad celular, reciclan actina y cofilina, controlan la polimerización de actina, anclan proteínas de transmembrana a la actina,

	talina 1, transgelina 2, la cadena $\beta$ de latrombopoyetina, tropomiosina, vinculina.	regulan cambio de forma y secreción, pueden ser sustratos de PKC en la reorganización del citoesqueleto, entre otras.
<b>Glicólisis</b>	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
<b>Relacionadas con la función plaquetaria</b>	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 $\alpha$ -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 fosfatasas acidas. De igual manera se han descrito corpúsculos con actividad peroxidasa y catalasa, denominados homólogos de los peroxisomas (Bermejo, 2017; Gremmel et al., 2016).

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 papel que desempeñan 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).

## 1.2 Plaquetas e inmunidad

La hemostasia es un requisito fundamental de la vida humana con características indispensables para equilibrar los parámetros clave como la hemodinámica, la integridad de las células endoteliales y la permeabilidad de los vasos. Las plaquetas son células efectoras altamente especializadas y esenciales en la hemostasia que además de las importantes actividades hemostáticas en las que las plaquetas juegan un rol principal, se reconoce cada vez más que las plaquetas son también importantes células inflamatorias con papeles clave en las respuestas inmunes innatas y adaptativas (Hottz et al., 2013). Las plaquetas expresan, almacenan, sintetizan y liberan rápidamente una variedad de factores, incluyendo citocinas que regulan las interacciones con el endotelio y pueden alterar las funciones endoteliales en condiciones patológicas, también poseen las estructuras y funciones arquetípicas de las células profesionales de defensa del huésped.

Las relaciones aparentemente complejas entre las plaquetas y los patógenos infecciosos han sido objeto de revisiones recientes, llevaron a varios grupos a examinar la posibilidad de que las plaquetas desempeñan un papel específico en la inmunidad innata y principalmente en la detección del patógeno. 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 translocados a la membrana plasmática de la célula durante su activación. Otra particularidad de éstas 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). 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.

### **1.3 Arbovirus**

Las infecciones por arbovirus constituyen un grave problema de salud pública. Más de 100 arbovirus tienen la capacidad de infectar humanos y causar morbilidades, que van desde secuelas permanentes provocadas por encefalitis o artritis, hasta la muerte provocada por hemorragias severas. El problema causado por arbovirus sigue creciendo debido a que continúan ampliando su distribución geográfica. Se considera que el virus del dengue es causante de aproximadamente 50 millones de casos anuales. Numerosos virus entre ellos, Vaccinia, virus de la influenza, citomegalovirus, VIH, virus de la hepatitis C, interactúan con las plaquetas (Yeaman, 2014), indicando que existe una relación entre los virus y estas células que contribuye a la patología. Aunque las plaquetas tienen una función importante en la coagulación es cada vez más claro que poseen también un papel importante en la respuesta inmune, mediante funciones inflamatorias que tienen una profunda influencia en la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Las plaquetas son células con capacidad de almacenar

citocinas inflamatorias y quimiocinas en sus gránulos, las cuales son liberadas en respuesta a estímulos en la fase de activación plaquetaria. Al mismo tiempo, son blanco de la infección de virus como el dengue, lo cual podría influenciar profundamente la patofisiología de la enfermedad. Por lo anterior es que en el presente trabajo se estudiará la relación que existe entre los fenómenos inflamatorios propiciados por las plaquetas y su contribución a la patofisiología de la enfermedad.

#### **1.4 Epidemiología**

Los 4 serotipos del DENV, se transmiten dentro de las mismas regiones geográficas. La infección con el DENV puede resultar en fiebre no complicada (FD) o en formas severas de la infección como la fiebre hemorrágica por dengue (FHD) o el síndrome de choque por dengue (SCD) estos dos últimos se caracterizan por alteraciones hemodinámicas, permeabilidad vascular incrementada, hipovolemia e hipotensión. Se estima que 2.5 billones de personas están en riesgo de contraer una infección por este virus y alrededor de 50 millones de casos por Dengue ocurren cada año incluyendo 500,000 hospitalizaciones por dengue hemorrágico (Guzmán *et al.*, 2010), y de estos aproximadamente un 2.5% fallecen (OMS, 2016). En México a la semana epidemiológica 53 que corresponde a la última semana de Diciembre de 2020 se confirmaron un total de 24,313 casos, de los cuales 1,058 fueron dengue severo hemorrágico. El 59% de los casos confirmados corresponden a los estados de Jalisco, Michoacán, Tamaulipas, Nuevo León y San Luis Potosí. (SINAVE/DGE/SALUD).

#### **1.5 Patogénesis del dengue**

El DENV tiene 4 serotipos distintos (DENV 1-4), cuatro de ellos evolucionaron en primates no humanos de un antepasado común y cada uno entró en el ciclo urbano de manera independiente aproximadamente hace 500-1000 años atrás. La quinta variante DENV-5 fue aislada en octubre de 2013. Este serotipo sigue el ciclo silvestre a diferencia de los otros cuatro serotipos que siguen al ciclo humano. La causa probable de la aparición del nuevo serotipo podría ser la recombinación genética (Mustafa *et al.* 2014). Las propiedades biológicas del DENV, incluyendo la unión al receptor, la hemaglutinación de los eritrocitos,

la inducción de anticuerpos neutralizantes y la respuesta inmune, están asociadas con la glicoproteína E. Cada DENV comparte alrededor del 65% del genoma con los otros serotipos, que es aproximadamente el mismo grado de relación genética que el virus del Nilo Occidental comparte con el virus de la encefalitis japonesa. A pesar de estas diferencias, cada serotipo causa síndromes casi idénticos en los seres humanos y circula en el mismo nicho ecológico. Los mosquitos vectores, principalmente *Aedes aegypti*, se infectan cuando se alimentan de seres humanos infectados durante el período de viremia el cual dura habitualmente cinco días. El virus pasa del tracto intestinal del mosquito a las glándulas salivales después de un período de incubación extrínseca, un proceso que tarda aproximadamente 10 días y es más rápido en climas con a altas temperaturas. Las picaduras de mosquito después del período de incubación extrínseca resultan en una infección, que podría ser promovida por las proteínas salivales del mosquito. Las células dendríticas infectadas maduran y migran a los ganglios linfáticos locales donde presentan los antígenos virales a las células T, Iniciando las respuestas inmunes celulares y humorales. También hay evidencia de una abundante replicación del DENV en células hepáticas y en macrófagos de ganglios linfáticos, hígado y bazo, así como en monocitos de sangre periférica, los cuales participan en la potenciación inmunitaria. Recientemente, Reyes-Ruiz et al., demostraron que el DENV se replica en el retículo endoplasmático y que una parte del ciclo biológico del virus se lleva a cabo a nivel citoplasmático; de manera relevante, observaron que algunas proteínas virales (NS5 y C) son translocadas al núcleo durante el proceso infeccioso, en células de mama. En sus resultados encuentran las proteínas virales C, NS1, NS3 y NS5 en el núcleo de la línea celular C6/36, generando estructuras complejas denominadas “estructuras similares a hebras” (Reyes-Ruiz et al., 2018). El DENV produce varios síndromes que están condicionados por la edad y el estado inmunológico. Durante las infecciones iniciales del dengue, la mayoría de los niños experimentan infección subclínica o síndromes febriles indiferenciados leves. Durante las infecciones secundarias del dengue la fisiopatología de la enfermedad cambia dramáticamente, particularmente las infecciones secuenciales en las cuales la infección con DENV-1 es seguida por la infección con DENV-2 o DENV-3, o la infección con DENV-3 es seguida por la infección con DENV-2. Tales infecciones pueden dar como resultado un síndrome de permeabilidad vascular aguda conocido como síndrome de choque de dengue (DSS).

Los estudios *in vitro* demuestran que la infección de monocitos y células dendríticas maduras da lugar a una mayor replicación del virus como resultado de la supresión del sistema inmune. Posteriormente, el aumento del número de células infectadas presenta dianas para las células TCD4 y TCD8, produciendo grandes cantidades de interleucina (IL)-10, IL-2, interferón (IFN)- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral (TNF) que, aisladamente o en combinación, pueden contribuir al daño endotelial y una alteración de la hemostasia (Calvert et al., 2015). Los viriones liberados de las células infectadas también podría dañar directamente las células endoteliales y la absorción de la proteína no estructural NS1 por los hepatocitos podría promover la infección viral del hígado. Durante la FHD, también se activa la cascada del complemento y los niveles de los productos de activación del complemento C3a y C5a se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. Hipótesis alternativas de la patogénesis de DENV incluyen las sugerencias de que las respuestas de células T secundarias se atenúan porque la estimulación de la memoria de células T da lugar a la producción de células CD4 y CD8 que tienen una capacidad disminuida de matar pero liberan citocinas inflamatorias que contribuyen a la gravedad de la enfermedad así como hipótesis más recientes que sugieren que la reactividad cruzada entre NS1, plaquetas y células endoteliales genera anticuerpos que dañan estas células (Simon et al., 2015)

## **1.6 Estructura del virus de Dengue**

El DENV es un icosaedro de 50 nm, aproximadamente, conformado por una membrana lipídica (obtenida de las células del huésped), sobre la cual se insertan las proteínas de membrana y de envoltura. El interior del virus contiene el complejo riboproteico conformado por la proteína de la cápside y el genoma viral que consiste en una única hebra de ARN de sentido positivo que codifica para un poli péptido único, que contiene 3 proteínas estructurales: cápside (C), membrana (M) y envoltura (E) así como 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) que intervienen durante los procesos de ensamblaje y replicación del RNA genómico (Guzman et al., 2010) figura 2. La síntesis de la proteínas virales y ARN viral ocurren predominantemente en el citoplasma de las células hospederas. La replicación es lenta y comienza dentro de las 15 horas después de la infección. Las proteínas de la envoltura, con la que el virus se une a receptores de las

células anfitrionas, lleva a cabo las funciones biológicas del virus, incluido el transporte del genoma viral en la célula huésped, la hemaglutinación de los eritrocitos, la inducción de anticuerpos neutralizantes, y la respuesta inmune protectora (Gurugama *et al.*, 2010)

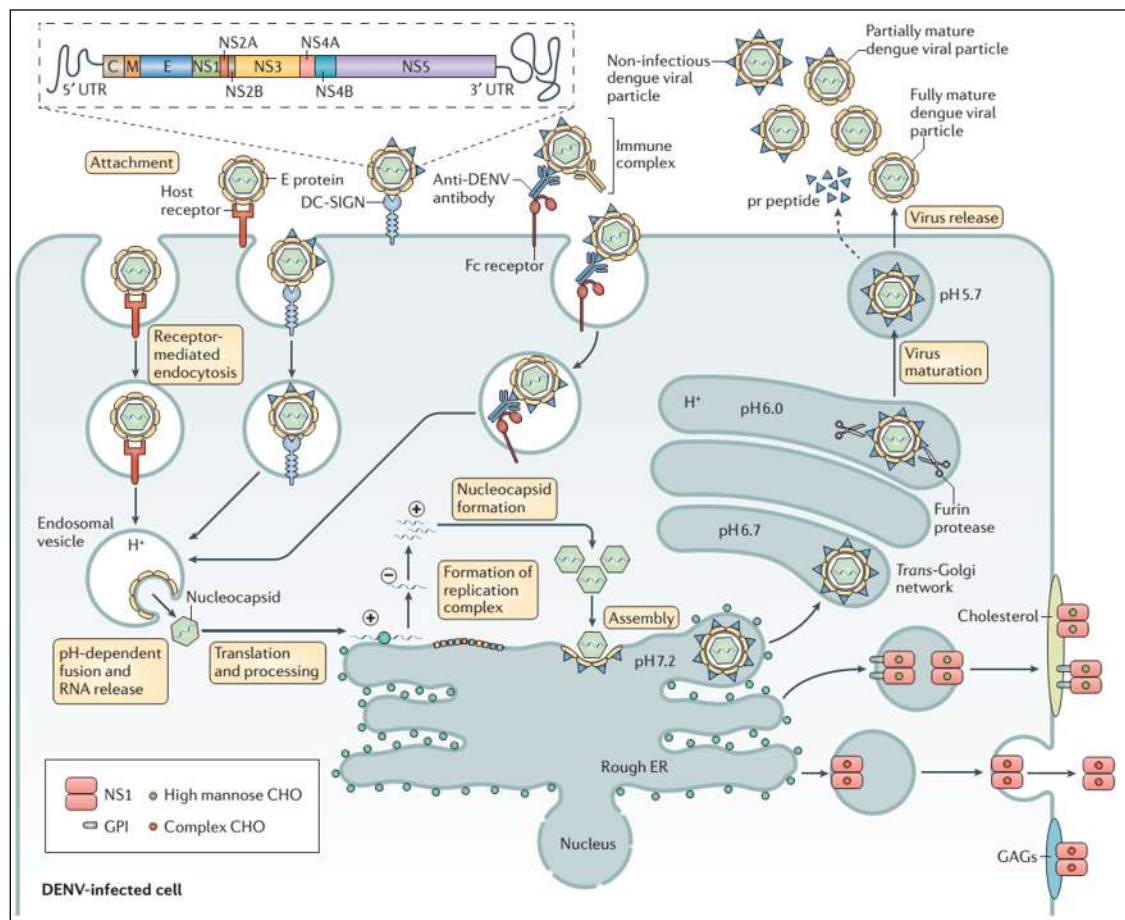


Ilustración 2 Genoma y ciclo biológico de los arbovirus

**Figura 2. Genoma y ciclo biológico de los arbovirus.** La figura muestra los receptores descritos para que se lleve a cabo la internalización del virus a la célula diana, siendo DC SING y el receptor Fc los principales descritos. El proceso replicación del material genético y ensamblaje de los viriones se lleva a cabo en citoplasma, lo anterior mediado principalmente por proteasas y modificaciones en el pH del medio. Por otra parte, se observa el papel individual que lleva a cabo la proteína NS1 y su capacidad para ser traslocada a la

membrana de la célula infectada en forma de dímero y excretada al medio extracelular en forma de hexámero, participando en la respuesta inmunológica contra el virus. Guzman et al. 2016 *Nature Rev.*

### **1.6.1 Proteína no estructural 1 (NS1) del virus de dengue**

Se sabe que las proteínas estructurales del DENV tienen una función específica, sin embargo las funciones de las proteínas no estructurales solo se han definido parcialmente. La proteína NS1 (46 kDa) forma dímeros o hexámeros asociados a balsas lipídicas de la membrana plasmática. Es una glicoproteína altamente conservada que participa activamente en la patogénesis de la enfermedad, contiene un marco de lectura de aproximadamente 353 a 354 aminoácidos y se puede encontrar soluble en el citoplasma y en el espacio extracelular; por esta razón, la NS1 puede estimular al sistema inmunitario. 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 µg/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 citosinas 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.

### **1.6.2 Estructura de NS1 de DENV**

La proteína no estructural 1 de DENV (NS1) es una glicoproteína versátil no estructural que se expresa en la superficie celular y se secreta en el espacio extracelular, donde tiene funciones de evasión inmune. Hasta la fecha, la biología estructural de NS1 es limitada, lo que ha dificultado una comprensión completa de sus funciones. Dos grupos independientes han descrito recientemente la estructura de NS1 (Akey et al., 2014; Edeling et al., 2014). NS1 existe como un monómero, un dímero (proteína unida a la membrana) y un hexámero (proteína secretada). La estructura tridimensional cristalográfica de rayos X del dímero NS1 sugiere tres dominios funcionalmente distinguibles: un  $\beta$ -roll hidrófobo (un tramo de 1-29 aminoácidos), un dominio de ala  $\alpha/\beta$  similar a RIG-I (38 - 151 residuos de aminoácidos) y  $\beta$ -ladder (181 – 352 aminoácidos), estabilizada por enlaces disulfuro (figura 3). La asociación de NS1 con la membrana y el complejo de replicación están mediados a través de estos tres dominios estructurales distintos. NS1 es la única proteína no estructural que entra en el lumen del retículo endoplásmico (RE), donde NS1 está glicosilado, forma un dímero, y posteriormente se secreta durante la replicación de DENV como dímeros o hexámeros, que son altamente inmunogénicos. Un estudio realizado por Yen L-C y colaboradores indicaron que el dominio conservado de  $\beta$ -ladder de la estructura NS1 multimérica, desencadena fácilmente respuestas de anticuerpos específicos del hospedero (Yen et al., 2016).

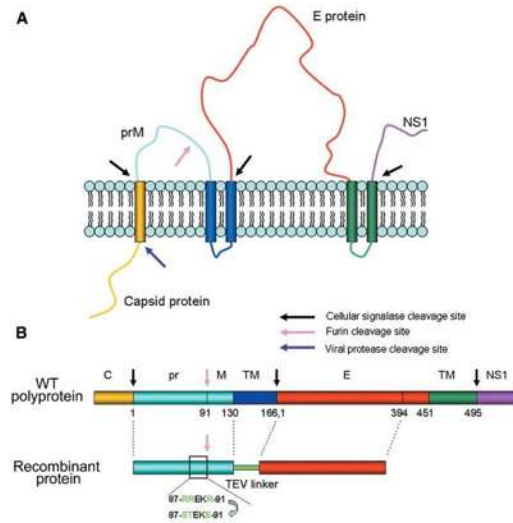
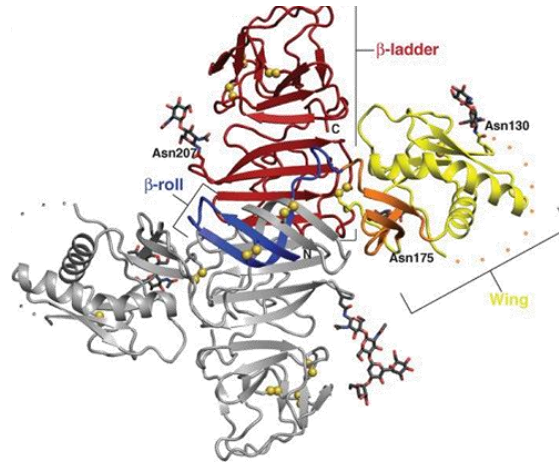


Ilustración 3 Estructura de la proteína NS1 de los flavivirus



**Figura 3. 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 ( $\beta$ -ladder), azul ( $\beta$ -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*.

### 1.7 Respuesta inmune contra NS1

La proteína NS1 de DENV es utilizada intracelularmente para promover la replicación viral, pero también es secretada a partir de células infectadas como una glicoproteína hexamérica de 300 kDa. Esta especie hexamérica se encuentra circulando en la sangre de individuos infectados y su presencia se utiliza para el diagnóstico rápido de la infección por DENV.

Recientes investigaciones sugieren un papel crítico para NS1 en el daño vascular que caracteriza la infección severa. Se sabe que NS1 activa los TLR e inhibe el sistema del complemento (Modhiran et al., 2017). NS1 juega un papel crucial tanto en la supresión y la activación de diversas respuestas celulares durante la infección por DENV (Rastogi et al., 2016).

Los TLRs han sido implicados en el reconocimiento de varios flavivirus, donde aumentan o suprimen las respuestas inmunes frente a patógenos. Se ha informado que la activación de TLR2 y TLR6 por NS1 durante la infección por DENV aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$ . Modhiran et al. Informó de la posible participación de TLR4 en el reconocimiento de NS1 de DENV (Modhiran et al., 2015). Se ha informado que NS1 activa las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) a través de TLR4, lo que condujo a la expresión de citocinas proinflamatorias. El aumento de la producción de estas citoquinas proinflamatorias afecta la integridad de las células endoteliales. Además, el antagonista de TLR4 y el tratamiento con anticuerpos anti-TLR4 inhibieron el daño vascular, un signo característico de la gravedad de la enfermedad del dengue. Recientemente se demostró que NS1 activa tanto las células inmunes como las endoteliales a través de TLR4 y además, se reportó que TLR2 no estuvo involucrado en la respuesta a NS1 (Modhiran et al., 2017). Estos hallazgos sugieren la interacción de NS1 con los TLRs.

### **1.8 Proteína no estructural 1 (NS1) y plaquetas.**

La presencia de virus en las plaquetas y su capacidad para ingresar dentro de esas células ha sido reconocida desde 1959, cuando en un estudio *in vitro* se introdujo al virus de influenza en las plaquetas (Danon, D., Jerushalmy, Z., & De Vries, 1959). Las observaciones a esta situación no se estudiaron entonces debido a que en esa época las plaquetas no eran reconocidas como células sino más bien como restos celulares del megacariocito que tenían una participación exclusiva en la coagulación (Danon, D., Jerushalmy, Z., & De Vries, 1959). DENV es el primer virus que se ha descrito como permisivo a la replicación por plaquetas (Simon et al., 2015). La infección por dengue suele producir trombocitopenia (tanto en formas leves como graves), y las plaquetas han emergido como viajeros clave en la patogénesis del dengue. Los estudios recientes han demostrado que el dengue induce la

activación plaquetaria y la apoptosis, que modulan las respuestas inflamatorias en los monocitos y un aumento constante de la expresión de CD62P en plaquetas aisladas de pacientes con dengue (Hottz et al., 2013). Además, la infección por dengue desencadena la síntesis y liberación de interleucina-1b (IL1b) por plaquetas humanas. Los autores confirman que el dengue se une directamente a DC-SIGN en la superficie de las plaquetas. Sin embargo hasta el momento no existe información suficiente del papel de NS1, algunos autores sugieren que NS1 de DENV podría unirse directamente a las plaquetas e inducir la activación plaquetaria a través de transducción de la señales, lo que puede aumentar la agregación plaquetaria. Estos resultados pueden explicar parte de las causas de la trombocitopenia y reenfatar el papel crítico de DENV NS1 en la patogénesis del dengue.

## 2.1 Referencias

- Akey, A. D. L., Brown, W. C., Dutta, S., Konwerski, J., & Jose, J. (2014). Flavivirus NS1 crystal structures reveal a surface for membrane association and regions of interaction with the immune system. *Science*, *343*(6173), 1–31. <https://doi.org/10.1126/science.1247749>.Flavivirus
- Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., & Flamand, M. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(2), 376–381. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.02.376-381.2002>
- Azeredo, E. L. De, Monteiro, R. Q., & Pinto, L. M. (2015). Thrombocytopenia in Dengue : Interrelationship between Virus and the Imbalance between Coagulation and Fibrinolysis and Inflammatory Mediators, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/313842>
- Calvert, J. K., Helbig, K. J., Dimasi, D., Cockshell, M., Beard, M. R., Pitson, S. M., ... Carr, J. M. (2015). Dengue Virus Infection of Primary Endothelial Cells in Endothelial Cells Function and Is Restricted by Interferon-Stimulated Responses, *00*(00), 1–12. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0195>
- Chabert, A., Hamzeh-cognasse, H., Pozzetto, B., Cognasse, F., Schattner, M., Gomez, R.

- M., & Garraud, O. (2015). Human platelets and their capacity of binding viruses : meaning and challenges ? *BMC Immunology*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0092-1>
- Chao, C., Wu, W., Lai, Y., & Tsai, P. (2019). Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4 , leading to thrombocytopenia and hemorrhage, 1–26.
- Conde, J. N., Silva, E. M., Barbosa, A. S., & Mohana-Borges, R. (2017). The complement system in flavivirus infections. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00213>
- Danon, D., Jerushalmy, Z., & De Vries, A. (1959). Incorporation of influenza virus in human blood platelets in vitro. Electron microscopical observation. *Virology*, 9, 719–722.
- Edeling, M. A., Diamond, M. S., & Fremont, D. H. (2014). Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(11), 4285–4290. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322036111>
- Guo, C., Zhou, Z., Wen, Z., Liu, Y., Zeng, C., Xiao, D., ... Yang, G. (2017). Global epidemiology of dengue outbreaks in 1990–2015: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(JUL), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00317>
- Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 1–26. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., ... Pelegrino, J. L. (2010). Dengue : a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12), S7–S16. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2460>
- 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>

- Hayes, C., Kitahara, S., & Tcherniantchouk, O. (2014). Decreased threshold of aggregation to low-dose epinephrine is evidence of platelet hyperaggregability in patients with thrombosis. *Hematology Reports*, 6(3), 45–50. <https://doi.org/10.4081/hr.2014.5326>
- Hottz, E. D., Lopes, J. F., Freitas, C., Valls-de-Souza, R., Oliveira, M. F., Bozza, M. T., ... Bozza, P. T. (2013). Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood*, 122(20), 3405–3415. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-504449>.F.A.B.
- Huang, J., Li, X., Shi, X., Zhu, M., Wang, J., Huang, S., ... Jin, J. (2019). Platelet integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ : Signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. *Journal of Hematology and Oncology*, 12(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0709-6>
- Kim, Y. C., López-Camacho, C., Garcia-Larragoiti, N., Cano-Mendez, A., Hernandez-Flores, K. G., Domínguez-Alemán, C. A., ... Reyes-Sandoval, A. (2019). Development of an E2 ELISA methodology to assess chikungunya seroprevalence in patients from an endemic region of Mexico. *Viruses*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/v11050407>
- Krishnamurti, C., Peat, R. A., Cutting, M. A., & Rothwell, S. W. (2002). Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(4), 435–441. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.435>
- Lai, Y. C., Chuang, Y. C., Liu, C. C., Ho, T. S., Lin, Y. S., Anderson, R., & Yeh, T. M. (2017). Antibodies Against Modified NS1 Wing Domain Peptide Protect Against Dengue Virus Infection. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07308-3>
- López, A., & Macaya, C. (2013). Plaqueta : fisiología de la activación y la inhibición. *Revista Española de Cardiología*, 13, 2–7.
- Malavige, G. N., & Ogg, G. S. (2017). Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology*, 151(3), 261–269. <https://doi.org/10.1111/imm.12748>
- Martin, A. C., Zlotnik, D., Bonete, G. P., Baron, E., Decouture, B., Belleville-Rolland, T., ... Bachelot-Loza, C. (2020). Epinephrine restores platelet functions inhibited by

- ticagrelor: A mechanistic approach. *European Journal of Pharmacology*, 866, 172798.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172798>
- Modhiran, N., Watterson, D., Blumenthal, A., Baxter, A. G., Young, P. R., & Stacey, K. J. (2017). Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. *Immunology and Cell Biology*, (December 2016), 1–5.  
<https://doi.org/10.1038/icb.2017.5>
- Modhiran, N., Watterson, D., Muller, D. A., Panetta, A. K., Sester, D. P., Liu, L., ... Young, P. R. (2015). Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Science*, 7(304).
- Mourão, M. P. G., Lacerda, M. V. G., Macedo, V. O., & Santos, J. B. (2007). Thrombocytopenia in patients with dengue virus infection in the Brazilian Amazon. *Platelets*, 18(8), 605–612. <https://doi.org/10.1080/09537100701426604>
- Ojha, A., Nandi, D., Batra, H., Singhal, R., Annarapu, G. K., Bhattacharyya, S., ... Guchhait, P. (2017). Platelet activation determines the severity of thrombocytopenia in dengue infection. *Scientific Reports*, 7(December 2016), 1–10.  
<https://doi.org/10.1038/srep41697>
- Rastogi, M., Sharma, N., & Singh, S. K. (2016). Flavivirus NS1 : a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal*, 13, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>
- Reyes-sandoval, A., & Ludert, J. E. (2019). The Dual Role of the Antibody Response Against the Flavivirus Non-structural Protein 1 ( NS1 ) in Protection and, 10(July), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01651>
- 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>
- Simon, A. Y., Sutherland, M. R., & Pryzdial, E. L. G. (n.d.). Dengue virus binding and replication by platelets.
- Simon, A. Y., Sutherland, M. R., & Pryzdial, E. L. G. (2015). Dengue virus binding and replication by platelets. *Blood*, 126(3), 378–385. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-598029>.The

- Sridhar, A., Sunil Kumar, B. M., Rau, A., & Rau, A. T. K. (2017). A Correlation of the Platelet Count with D-Dimer Levels as an Indicator for Component Therapy in Children with Dengue Hemorrhagic Fever. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. <https://doi.org/10.1007/s12288-016-0686-7>
- Sutherland, M. R., Simon, A. Y., Serrano, K., Schubert, P., Acker, J. P., & Pryzdial, E. L. G. (2016). Dengue virus persists and replicates during storage of platelet and red blood cell units. *Transfusion*, *56*(5), 1129–1137. <https://doi.org/10.1111/trf.13454>
- Yeaman, M. R. (2014). Platelets : at the nexus of antimicrobial defence. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(6), 426–437. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3269>
- Yen, L.-C., Liao, J.-T., Lee, H.-J., Chou, W.-Y., Chen, C.-W., Lin, Y.-L., & Liao, C.-L. (2016). The C-Terminus of the Core beta-Ladder domain in Japanese Encephalitis Virus Nonstructural Protein 1 Is Flexible for Accommodation of Heterologous Epitope Fusion. *Journal of Virology*, *90*(3), 1178–1189. <https://doi.org/10.1128/JVI.02057-15>
- Young Chan Kim, Cesar Lopez-Camacho, Nallely Garcia-Larragoiti, Martha Eva Viveros-Sandoval, A. R. S. (2020). Production and Purification of Zika Virus NS1 Glycoprotein in HEK293 Cells. In *Zika Virus: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. 93–102). <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0581-3>
- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002858>

## 2. JUSTIFICACIÓN

En el continente americano, el dengue se considera la enfermedad reemergente más importante y su forma hemorrágica es cada vez de mayor relevancia, especialmente debido al aumento progresivo en el número de defunciones. Las infecciones por DENV son un importante problema de salud pública en México al final de 2021 se confirmaron un total de 24,313 casos, de los cuales 1,058 fueron dengue severo hemorrágico, sin embargo en los últimos años. Las plaquetas han sido tradicionalmente vistas como mediadores fragmentarios de la coagulación. Sin embargo, la evidencia molecular y celular reciente sugiere que tienen papeles múltiples en la defensa del anfitrión contra las infecciones. Desde las primeras líneas de defensa que detectan patógenos y despliegan rápidamente péptidos de defensa del huésped, hasta los más especializados que reclutan y mejoran las funciones leucocitarias, las plaquetas representan el vínculo entre la homeostasis y la inmunología y a pesar de esto la mayor parte de los estudios de respuesta inmune a infección viral han pasado por alto a las plaquetas, que en años recientes han demostrado ser también moduladores de la inmunidad innata y adaptativa.

Los anticuerpos contra las proteínas virales de DENV NS1 juegan un papel central en la profilaxis y/o tratamiento de la infección por DENV mediante inmunización pasiva. Concentraciones elevadas de NS1 se correlaciona directamente con la gravedad de la enfermedad y el aumento de la viremia. La proteína NS1 es un objetivo importante para el diseño de inhibidores ya que NS1 secretado y asociado con la superficie celular son altamente inmunogénicos. La información sobre la estructura molecular de NS1 proporcionó una mejor comprensión del papel en la patología de DENV, sin embargo la vía por la cual logra activar a las células inmunológicas ha sido poco estudiada.

Por todo lo anterior se necesitan más investigaciones para dilucidar el papel de la participación de NS1 en la activación plaquetaria para una mejor comprensión de los mecanismos que afectan a las plaquetas en procesos infecciosos por DENV y los complejos mecanismos que conducen a la trombocitopenia que es característicamente observada en formas leves y severas de este padecimiento.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Las plaquetas han sido tradicionalmente vistas como mediadores fragmentarios de la coagulación. Sin embargo, la evidencia molecular y celular reciente sugiere que tienen papeles múltiples en la defensa del anfitrión contra las infecciones. Desde las primeras líneas de defensa que detectan patógenos y despliegan rápidamente péptidos de defensa del huésped, hasta los más especializados que reclutan y mejoran las funciones leucocitarias, las plaquetas representan el vínculo entre la homeostasis y la inmunología y a pesar de esto la mayor parte de los estudios de respuesta inmune a infección viral han pasado por alto a las plaquetas, que en años recientes han demostrado ser también moduladores de la inmunidad innata y adaptativa. La infección por el virus de dengue suele producir trombocitopenia (tanto en formas leves como graves), y las plaquetas han emergido como células clave en la patogénesis del mismo. En el continente americano, el dengue se considera la enfermedad reemergente más importante y su forma hemorrágica es cada vez de mayor relevancia, especialmente debido al aumento progresivo en el número de defunciones. Las infecciones por DENV son un importante problema de salud pública en México, al cierre de 2021 se confirmaron un total de 6746 casos positivos de los cuales 300 fueron casos de dengue severo. La proteína no estructural 1 de Dengue (NS1) es un objetivo importante para el diseño de inhibidores ya que NS1 secretado y asociado con la superficie celular es altamente inmunogénica. NS1 es una glicoproteína versátil con un PM de 45-56 kDa. Los anticuerpos contra las proteínas virales de DENV NS1 juegan un papel central en la profilaxis y/o tratamiento de la infección por DENV mediante inmunización pasiva. Concentraciones elevadas de NS1 se correlaciona directamente con la gravedad de la enfermedad y el aumento de la viremia. Por todo lo anterior se necesita dilucidar a participación de NS1 en la activación plaquetaria para una mejor comprensión de los mecanismos que afectan a las plaquetas en procesos infecciosos por DENV y los mecanismos que conducen a la trombocitopenia que es característicamente observada en formas leves y severas de este padecimiento.

#### **4. HIPÓTESIS.**

La proteína viral NS1 de Dengue induce una respuesta celular inmunológica mediada por plaquetas.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo General**

Analizar la respuesta plaquetaria a la proteína viral de DENV NS1 y cada uno de sus dominios

##### **5.2 Objetivos específicos**

1. Determinar activación plaquetaria antes y después de la estimulación con la proteína viral
2. Analizar la interacción de NS1 con receptores plaquetarios
3. Analizar la respuesta plaquetaria en pacientes con previa infección por DENV y correlacionar con datos clínicos
4. Determinar citosinas inflamatorias (IL-6, IL-8) moléculas de adhesión (P-selectina, PSGL-1) y trombóticas (Dímero D, Factor tisular, PAI-1)

## **CAPITULO I.**

### ***Production and Purification of Dengue Virus NS1 Glycoprotein in HEK293 Cells***

## 1. Introducción.

La glicoproteína NS1 del virus de Dengue (DENV) tiene un peso molecular de ~50 kDa y existe en múltiples formas oligoméricas, como dímeros NS1 intracelulares asociados a la membrana y NS1 secretada (sNS1) en forma de hexámero (trímero de dímeros). Cada monómero consta de tres dominios:  $\beta$ -roll N-terminal (1–30 residuos), wing (31–180 residuos) y  $\beta$ -ladder C-terminal (181–352 residuos) (Edeling et al., 2014). NS1 es un factor de patogenicidad multifuncional, que es esencial para la replicación del virus y la evasión inmune (Rastogi et al., 2016). La NS1 secretada es altamente inmunogénica y estimula altos títulos de anticuerpos específicos de NS1 (Edeling et al., 2014). Tanto la proteína NS1 como los anticuerpos se han implicado en la patogenia de la enfermedad. NS1 también es un biomarcador importante para el diagnóstico temprano de la enfermedad (Conde, Silva, Barbosa, & Mohana-Borges, 2017). En este capítulo, se describen los protocolos para la producción, purificación y caracterización de glicoproteínas NS1 de DENV (sNS1, wing NS1, NS1  $\beta$ -roll y NS1  $\beta$ -ladder) mediante transfección transitoria de células HEK293T.

Para producir glicoproteínas DENV NS1 recombinantes, se diseñaron genes con codones optimizados y se clonaron en un vector pHLsec que tiene una etiqueta His C-terminal, y su expresión en células HEK293T se confirmó mediante transfecciones a pequeña escala. A esto le siguió una transfección a gran escala del sistema de expresión de mamíferos HEK293T utilizando botellas giratorias y purificación mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC). La proteína  $\beta$ -ladder NS1 se obtuvo con alta pureza mediante IMAC solo, mientras que se llevaron a cabo purificaciones adicionales mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para obtener sNS1 de mayor pureza. Se caracterizaron las glicoproteínas DENV NS1 (sNS1,  $\beta$ -ladder, wing y  $\beta$ -roll).

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Expresión de la proteína NS1 usando células HEK293T.**

Se utilizaron células HEK293T cells, para su mantenimiento se usó el medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal de ternero (FCS), aminoácidos no esenciales (1:100), y L-glutamina (1:100), ácido etilendiaminotetraacético-tripsina (trypsin-EDTA). Tampón de fosfato salino (PBS): 0.01 M PBS, 0.0027 M cloruro de potasio, 0.137 M cloruro de sodio, y se ajustó a un pH de 7.4. Se utilizaron matraces de cultivo de tejidos T175. El ADN plasmídico con una relación A260/A280 mayor o igual a 1,8 (ver Nota 1). Se recomienda usar placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos. Medio Opti-MEM I, Lipofectamina 2000., Polietilenimina (PEI) (PEI ramificado de 25 kDa, 1 mg/ml en agua), Botellas de rodillos de superficie expandida. Filtro de tapa de botella de 0,22  $\mu\text{m}$ . Concentrador por centrifugación de ultrafiltración.

### **2.2 Purificación de proteínas secretadas usando una etiqueta His-6 (IMAC)**

Para el proceso de purificación se usaron Columna HisTrap de 1 o 5 ml, mediante un sistema de purificación A<sup>+</sup> KTA como A<sup>+</sup> KTA start<sup>TM</sup> o A<sup>+</sup> KTA pure<sup>TM</sup>. El tampón de lavado fue de níquel (filtrado y desgasificado): Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 40 mM y pH 7,5 (ver Nota 2). Para el proceso de elución se usó un tampón de elución de níquel (filtrado y desgasificado): Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM y se ajustó a un pH 7,5. Para el proceso de diálisis se usaron cassettes comerciales.

### **2.3 Purificación adicional por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)**

Se utilizó una columna de aumento Superdex 200. Sistema de purificación A<sup>+</sup> KTA como A<sup>+</sup> KTA pure<sup>TM</sup>. Tampón de exclusión por tamaño (filtrado y desgasificado): Tris 10 mM pH 8,0 y NaCl 150 mM. Agua Milli-Q filtrada. Etanol al 20% filtrado

### **2.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot (WB)**

Tampón de muestra de Laemmli 2x:  $\beta$ -mercaptoetanol 20 mM. Búfer de ejecución SDS-PAGE Tris. Bloque calefactor. Gel SDS-PAGE. Membrana de nitrocelulosa o PVDF. Tinción de proteínas. Estándares de transferencia Western. Solución salina tamponada con fosfato con Tween (PBST): tampón de fosfato 0,01 M, cloruro de potasio 0,0027 M, cloruro de sodio 0,137 M, Tween 20 al 0,05 % v/v y un pH de 7,4. Caja de incubación de transferencia Western. Leche al 5% en PBST. Solución de anticuerpo primario: dilución 1:1000 de un anticuerpo 6-His Tag de ratón (Thermo Fisher Scientific) y solución de anticuerpo secundario: IgG anti-ratón de cabra conjugada con HRP 1:5000 (Bio-Rad). Sustrato de transferencia Western. Sistema de formación de imágenes de detección de transferencia Western.

### **3. Resultados**

#### **3.1 Producción y purificación de las proteínas DENV NS1 completa, NS1 wing, NS1 $\beta$ -ladder y NS1 mutante.**

Los plásmidos de expresión de NS1 de DENV se diseñaron para codificar los dominios y la versión de NS1 completa, se clonaron en los vectores de expresión pHLSec para producir proteínas NS1 de DENV con una etiqueta His C-terminal con la excepción de la  $\beta$ -ladder, que tenía una etiqueta C-terminal C como se muestra en la Figura 1A.

Estas construcciones se usaron para transfectar células HEK293T y las proteínas secretadas se purificaron mediante cromatografía de afinidad y se analizaron mediante tinción SDS-PAGE Coomassie y WB usando un mAb con etiqueta His o un mAb con etiqueta C o un anticuerpo NS1 contra DENV (Figura 1B-E). El gel SDS-PAGE mostró las bandas del tamaño esperado de NS1 y sus dominios (Figura 1B). El dominio NS1  $\beta$ -ladder tenía una sola banda ~25 kDa con la mayor pureza.

La proteína NS1 completa mostró una banda esperada de alrededor de ~ 50 kDa, mientras que la versión mutante de NS1 tenía una banda de ~ 45 kDa correspondiente a una masa molecular ligeramente más pequeña debido a la eliminación del dominio  $\beta$ -roll. Además,

NS1 completa mostró bandas adicionales alrededor de ~ 30 kDa y 25 kDa, que pueden corresponder a NS1  $\beta$ -ladder-His y NS1  $\beta$ -roll-wing, respectivamente, formadas después de la autoescisión por la proteasa de la célula huésped. El dominio wing NS1 mostró una banda intensa de ~150 kDa probablemente debido a su estado multimérico además de una banda muy tenue de ~30 kDa que corresponde a la forma monomérica de wing.

El análisis WB de las proteínas NS1 del DENV (completas y mutantes) mostró masas moleculares esperadas de ~ 50 kDa y la versión mutante de NS1 tenía una masa molecular ligeramente menor debido a la eliminación del dominio  $\beta$ -roll (Figura 1C). Similar a SDS-PAGE, WB de DENV NS1 (completo) mostró bandas débiles alrededor de ~ 30 kDa que pueden corresponder a NS1  $\beta$ -ladder-His. El wing mostró bandas tenues ~25 kDa y ~50 kDa en la Figura 1C correspondientes a formas monoméricas y diméricas, respectivamente, y estas bandas se ven más claramente en la Figura 2 a una exposición más alta.

La banda de ~150 kDa que se muestra en SDS-PAGE de wing-NS1 no se detectó en WB y esto puede deberse al enmascaramiento del epítipo His. No se observó ninguna banda para el dominio  $\beta$ -ladder, ya que no tiene una etiqueta de His.

Por otro lado, la WB realizada con un mAb con etiqueta C mostró una banda de ~25 kDa que corresponde al tamaño esperado de  $\beta$ -ladder de DENV NS1 (Figura 1D). Para caracterizar aún más las proteínas NS1 del DENV purificadas, se llevó a cabo una WB con un anticuerpo de proteína NS1 del DENV policlonal que se dirige a la región central de NS1 del DENV (Figura 1E). El WB mostró tamaños moleculares esperados de ~50 kDa, ~45 kDa y ~25 kDa, que corresponden a proteínas NS1, NS1-mutante y  $\beta$ -ladder, respectivamente. No se observó una banda clara para wing en el WB y esto puede deberse a que este anticuerpo se une únicamente a la región de  $\beta$ -ladder de NS1.

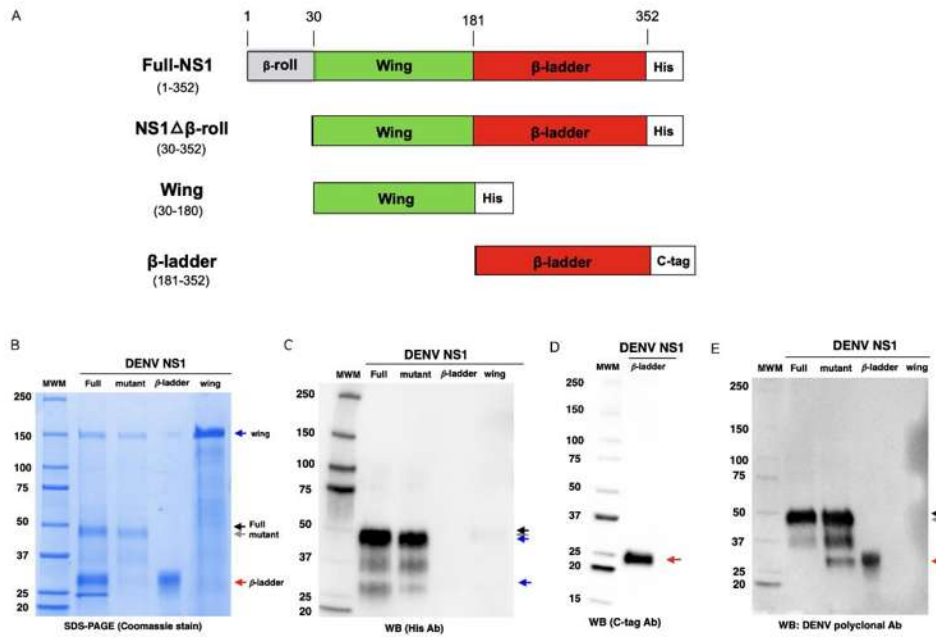


Ilustración 4 Diseño y caracterización de los dominios de NS1 de DENV

Fig. 1 Diseño y caracterización de la proteína y los dominios NS1 de DENV. (A) Diseño de dominios virales y la proteína NS1 completa (B) Gel SDS-PAGE teñido con Coomassie de dominios y proteínas NS1 de DENV purificados (NS1 completa, mutante,  $\beta$ -ladder y wing). (C) Western blot de la proteína y los dominios DENV NS1 purificados usando anticuerpo anti-His. (D) Western blot de proteína  $\beta$ ladder purificada utilizando un mAb de etiqueta C. (E) Western blot de la proteína y los dominios NS1 de DENV purificados utilizando un anticuerpo NS1 policlonal. Para SDS-PAGE, se cargó 1  $\mu$ g de las proteínas NS1 purificadas en cada carril, mientras que para WB se cargaron 0,5  $\mu$ g de proteínas NS1 por carril.

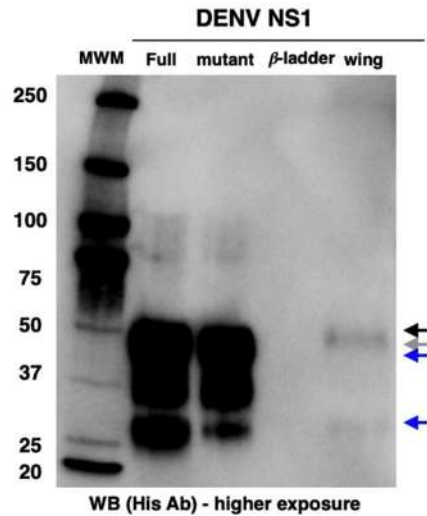


Ilustración 5 Western blot de la proteína y los dominios DENV NS1

Figura 2. Western blot de la proteína y los dominios DENV NS1 purificados (la transferencia WB idéntica que se muestra en la Figura 1C) usando anticuerpo anti-His a una exposición más alta.

#### 4. Conclusión

Estas glicoproteínas NS1 recombinantes fueron utilizadas para la estimulación de plaquetas que ayudaron a evaluar la respuesta de estas células a las proteínas virales y con ello entender mejor la fisiopatología de la infección con DENV sin embargo también se pueden utilizar para aplicaciones clínicas amplias, como el serodiagnóstico de DENV, como candidatos a vacunas basadas en subunidades y en otras aplicaciones bioquímicas.

#### 5. Notas

1. Muchos vectores están disponibles comercialmente para la expresión en células de mamíferos. En el caso de los genes sNS1 y  $\beta$ -ladder, estos se clonaron en el vector pHLsec que tiene una etiqueta His C-terminal.
2. Los tampones se filtran al vacío utilizando filtros de 0,45  $\mu$ m para eliminar el polvo y las burbujas de aire no deseados.

3. Las transfecciones se pueden reducir a 24 pocillos o 96 pocillos ajustando los volúmenes de medio, ADN y lipofectamina para guardar los reactivos.
4. El ADN para la transfección debe tener una relación A260/A280 igual o superior a 1,8, que se puede obtener utilizando kits comerciales estándar, como el kit PureLink HiPure Expi Plasmid Megaprep.
5. Si hay un bajo nivel de expresión de proteína después de 24 h, las condiciones de transfección pueden optimizarse variando las concentraciones de ADN y Lipofectamine 2000 e incubando durante 48 h. Como alternativa, el sobrenadante se puede concentrar mediante un concentrador centrífugo de ultrafiltración adecuado antes de volver a realizar la prueba en la WB con el anticuerpo anti-His.
6. Los paquetes de transferencia de nitrocelulosa Trans-Blot Turbo Mini se pueden usar para transferir la proteína de interés de los geles usando el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo. Alternativamente, el método de transferencia Western estándar que utiliza membranas de PVDF se puede utilizar como se describe en [13].
7. El volumen del tampón de bloqueo depende del tamaño del recipiente que contiene la membrana y el tampón debe cubrir completamente la membrana.
8. Si la incubación dura más de 10 min, esto puede resultar en una pérdida de eficiencia de transfección.
9. Se recomienda seleccionar el concentrador con corte de peso molecular (MWCO) basado en la mitad del peso molecular de la proteína de interés, ya que es posible que no adopte la conformación globular esperada, mientras que el MWCO del concentrador se estima utilizando un modelo de proteína globular.
10. Es posible que se requiera cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para obtener proteínas de mayor pureza para aplicaciones tales como vacunas basadas en proteínas.

## 6. Referencias.

1. Song H, Qi J, Haywood J et al (2016) Zika virus NS1 structure reveals diversity of electro- static surfaces among flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol* 23:456–458. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3213>
2. Xu X, Song H, Qi J et al (2016) Contribution of intertwined loop to membrane association revealed by Zika virus full-length NS1 structure. *EMBO J* 35:2170–2178. <https://doi.org/10.15252/embj.201695290>
3. Brown WC, Akey DL, Konwerski JR et al (2016) Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. *Nat Struct Mol Biol* 23:865–867. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3268>
4. Chung KM, Liszewski MK, Nybakken G et al (2006) West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19111–19116. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605668103>
5. Hilgenfeld R (2016) Zika virus NS1, a pathogenicity factor with many faces. *EMBO J* 35:2631–2633. <https://doi.org/10.15252/embj.201695871>
6. Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE et al (2010) Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med* 207:793–806. <https://doi.org/10.1084/jem.20092545>
7. Muller DA, Young PR (2013) The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antivir Res* 98:192–208. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008>
8. Modhiran N, Watterson D, Muller DA et al (2015) Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci Transl Med* 7:304ra142. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3863>
9. Huzly D, Hanselmann I, Schmidt-Chanasit J, Panning M (2016) High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. *Eur Secur* 21:30203. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.16.30203>
10. Lustig Y, Zelena H, Venturi G et al (2017) Sensitivity and kinetics of an NS1-based Zika virus enzyme-linked immunosorbent assay in Zika virus-infected


travelers from Israel, the Czech Republic, Italy, Belgium, Germany, and Chile. *J Clin Microbiol* 55:1894–1901. <https://doi.org/10.1128/JCM.00346-17>

11. Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R et al (2017) Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:8384–8389. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704984114>
12. Aricescu AR, Lu W, Jones EY (2006) A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62:1243–1250. <https://doi.org/10.1107/S0907444906029799>
13. Mahmood T, Yang P-C (2012) Western blot: technique, theory, and troubleshooting. *N Am J Med Sci* 4:429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>

## CAPITULO II

*Platelet activation and aggregation response to dengue virus nonstructural protein 1 and domains*

# Platelet activation and aggregation response to dengue virus nonstructural protein 1 and domains

Nallely García-Larragoiti<sup>1,2,3</sup> | Young Chan Kim<sup>4</sup> | César López-Camacho<sup>4</sup> | Alan Cano-Méndez<sup>1,2</sup> | Sandra López-Castaneda<sup>1,2</sup> | Darinel Hernández-Hernández<sup>5</sup> | Ángel G. Vargas-Ruiz<sup>5</sup> | Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas<sup>1</sup> | Arturo Reyes-Sandoval<sup>3,4,6</sup> | Martha E. Viveros-Sandoval<sup>1,2,3</sup> 

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

<sup>2</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México

<sup>3</sup>Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México

<sup>4</sup>Nuffield Department of Medicine, The Jenner Institute, University of Oxford, Oxford, UK

<sup>5</sup>Departamento de Hematología y Oncología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, México

<sup>6</sup>Unidad Adolfo López Mateos, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

## Correspondence

Martha E. Viveros-Sandoval, Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez," Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, UMSNH, CP. 58020, Morelia, Michoacán, México.  
Email: martha.viveros@umich.mx

## Funding information

Innovate UK, Grant/Award Number: 971557; Coordinación de la Investigación Científica CIC, Grant/Award Number: 16210,17290

## Abstract

**Background:** Platelets are now recognized as immunological sentries in the first line of defense that participate in the detection and response to pathogens. This frequently results in a decrease in the number of circulating platelets. Different mechanisms have been hypothesized to explain the thrombocytopenia in patients with severe dengue, one of them is the participation of the non-structural protein 1 (NS1) of dengue virus (DENV), which can be secreted into circulation during DENV infection and promotes a more efficient infection.

**Objective:** The present study aimed to investigate the ability of platelet response to stimulation with full-length DENV NS1 protein and its domains.

**Methods:** DENV NS1 plasmid was transfected into HEK-293T. Proteins were purified by Ni-NTA Sepharose affinity chromatography. Secreted proteins were assessed by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Coomassie staining and western blot. Platelet-rich plasma was directly incubated with DENV NS1 proteins. Platelet activation was confirmed by expression of  $\alpha$ IIb $\beta$ III and P-selectin by flow cytometry. Platelet aggregation was also assessed using DENV NS1 protein and its individual domains as agonists.

**Results:** DENV NS1 protein and its domains induce P-selectin and  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 complex expression on platelet surfaces. DENV NS1 induce a stable platelet aggregation after the addition of a minimal dose of adenosine diphosphate (ADP), epinephrine (EPI), or collagen. Interestingly, only EPI could induce the formation of platelet aggregates after incubation with the protein domains of NS1.

**Conclusion:** Our results suggest that the full DENV NS1 protein and also its domains promote platelet recognition, activation, and aggregation.

## KEYWORDS

dengue, dengue virus, platelet activation, platelet aggregation, thrombocytopenia

Manuscript Handled by: X. Long Zheng

Final decision: X. Long Zheng, 18 June 2021

© 2021 International Society on Thrombosis and Haemostasis

## 1 | INTRODUCTION

Platelets are anucleate cells that store RNA to be processed through mechanisms of highly specialized post-transcriptional pathways to synthesize proteins such as coagulation factors, defense proteins, and cytokines; store them in cytoplasmic granules; and finally secrete them in response to stimuli during platelet activation.<sup>1</sup> The role of platelets has traditionally focused on hemostasis and thrombosis; however, inflammatory functions with an important influence on both innate and adaptive immune responses point toward a major role of platelets in immunity.<sup>2-4</sup>

Thrombocytopenia is a hallmark in patients with mild or severe symptoms of dengue virus infection (DENV).<sup>5</sup> The drop of platelet count and rise in platelet activation in dengue patients correlate with levels of hemodynamic instability and severity of illness, while its recovery associates with clinical improvement.<sup>6</sup> Platelets express specific pathogen-recognition molecules.<sup>7</sup> Moreover, cytokines released from activated platelets upon degranulation can alter endothelial functions under pathological conditions, which leads to platelet aggregation;<sup>8,9</sup> as a result, a decrease in the number of platelets is a manifestation that is commonly observed in several infectious diseases, including those caused by viruses.<sup>10-12</sup> DENV infection is the most prevalent mosquito-borne viral disease, being transmitted in urban settings by infected female *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. DENV infection is endemic in more than 100 countries and is considered to be responsible for approximately 50 to 100 million cases each year.<sup>13-15</sup> DENV is an RNA virus that encodes three structural proteins, envelope protein (E), membrane protein (M), and capsid (C), plus seven non-structural proteins (NS). Non-structural protein 1 (NS1) is a versatile glycoprotein of 45–56 kDa that contains 352 amino acid residues.<sup>16</sup> NS1 participates in the replication of the viral genome as an intracellular dimer, can be expressed on the cell surface of the infected cell, and participates in the evasion of the immune system as a hexamer secreted into circulation.<sup>17</sup> The crystallographic structure analysis reveals that each NS1 monomer is organized into three different domains: the highly hydrophobic  $\beta$ -roll (1–29 amino acids), the wing (30–180 amino acids), and  $\beta$ -ladder (181–352 amino acids).<sup>18</sup> Experimental evidence suggests that NS1 could play an important role during virus replication. It has been reported that the serum levels of NS1 in patients infected with dengue correlate with the severity of the disease and these can reach up to 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in the acute stage of infection.<sup>19</sup> The detection of NS1 circulating in the sera of infected patients is a commonly used approach for the early diagnosis of this DENV infection.<sup>20</sup> It has been suggested that DENV NS1 could bind directly to platelets and induce platelet activation through signal transduction,<sup>21</sup> which can increase platelet secretion of coagulation factors and inflammatory mediators and lead to platelet aggregation. Although NS1 protein is recognized as playing a pivotal role in the pathogenesis of dengue, little is known about the role individual NS1 domains play in platelet response.<sup>22,23</sup>

### Essentials

- Thrombocytopenia is a hallmark in patients with mild or severe symptoms of dengue virus infection.
- Serum levels of non-structural protein 1 (NS1) in patients infected with dengue correlate with the severity of the disease.
- We observed that dengue NS1 protein and its domains induce P-selectin and glycoprotein  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  complex expression on platelet surfaces.
- Only NS1 full-length was able to induce a stable platelet aggregation after the addition of a minimal-dose platelet agonist.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Production and purification of DENV NS1 full-length protein and domains

For the expression and purification of the DENV NS1 proteins, the codon-optimized gene of NS1 (1096 bp) was synthesized by GeneArt® using the known sequence of NS1 DENV2 and used as a template to generate NS1 protein domains. DENV NS1 domains including NS1 wing (residues 30–180), and the mutant version of NS1 ( $\beta$ -roll domain deletion). Residues 1–29 were cloned by PCR and inserted into a pHLsec vector with a C-terminal His tag. Codon-optimized DENV NS1  $\beta$ -ladder (residues 181–352) with a terminal C-tag was synthesized by GeneArt and cloned into a pHLsec vector after removing the C-terminal His tag. The production and purification of DENV NS1 proteins and domains (full, wing, and the mutant) were carried out as described previously.<sup>21</sup> Briefly, pHLsec DENV NS1 plasmid (500  $\mu\text{g}$ ) was transfected into HEK-293T cells using polyethyleneimine (PEI) in roller bottles under standard cell culture conditions. Five days after transfection, media containing the secreted protein was filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  disposable filters and purified by Ni Sepharose affinity chromatography (HisTrap™, GE Healthcare), using the Äkta Start chromatography system, and eluted with 500 mM imidazole and buffer-exchanged using a dialysis cassette in 1xPBS. DENV NS1  $\beta$ -ladder was produced similarly and purified by a C-tag column (CaptureSelect™, Thermo Scientific). The secreted proteins were assessed by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), Coomassie staining and western blot (WB) using a His monoclonal antibody (mAb; 1:2000) or C-tag mAb (1:2000). To characterize DENV NS1 protein further, WB was carried out using a biotinylated polyclonal DENV NS1 protein antibody (GeneTex, GTX124280-02) at 1:2000 dilution following manufacturer's instruction. This DENV NS1 antibody targeted the central region of DENV NS1 protein, but the exact sequence was proprietary by the manufacturer.

## 2.2 | Blood sample collection

For *in vitro* experiments, whole human blood was obtained from healthy volunteers by venipuncture after signing the informed consent form. Considerable care was devoted to select individuals who would be appropriate to be considered healthy. Donors were individuals within normal range body mass index that were not taking any kind of medication, did not exhibit any abnormal findings on routine blood chemistry and hematological tests such as complete blood cell count and erythrocyte sedimentation rate, and had normal platelet count and mean platelet volume. Before experiments, sera samples from donors were screened for IgG and IgM antibodies against DENV NS1 and only those testing negative were selected. Blood was obtained by clean venipuncture and the first tube (3 ml) of blood was discarded to ensure the accuracy of platelet testing. Samples were collected in vacutainer tubes with 3.2% (0.109 mol/l) sodium citrate solution as anticoagulant (Becton Dickinson) and processed within 4 h after collection.

## 2.3 | Platelet isolation

Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifuging the blood samples at 100 g for 10 min at 21–23°C with no break. Then, the supernatant was carefully collected with a wide-bore pipette from the top third of the centrifuged blood to avoid disrupting the buffy coat and resuspended in Tyrode's buffer pH of 7.4 to maintain the integrity of the platelets and it was left to rest for 20 min before its analysis by flow cytometry.

## 2.4 | Platelet stimulation with NS1 DENV and viral proteins domains

The isolated platelets were adjusted to a concentration of  $1 \times 10^7$ /ml in plasma. They were incubated directly with NS1 full length,  $\beta$ -ladder, wing, and NS1 mutant on a concentration scale of 1  $\mu$ g/ml to 20  $\mu$ g/ml for a minimum of 10 min to a maximum of 240 min at a temperature of 37°C. Platelet activation was confirmed by expressing the heterodimeric complex  $\alpha$ IIb $\beta$ III (PAC1-FITC) and P-selectin (CD62-PE) by flow cytometry.

## 2.5 | Flow cytometry assays

Platelets were selected according to their size (FS) and complexity (SS). The expression of CD41 conjugated with PE/Cy7 (BioLegend Cat. No-303718) was used as a marker of identity. Expression of the heterodimeric complex  $\alpha$ IIb $\beta$ III-PAC-1-FITC (BioLegend Cat. 362804) and P-selectin CD62-PE (BioLegend Cat. 304906) were used as platelet activation markers. The following isotype controls were used: PE/Cy7 Mouse IgG1 (Biolegend Cat. 400126), FITC Mouse IgM (Biolegend Cat. 401606), PE Mouse IgG1 (Biolegend

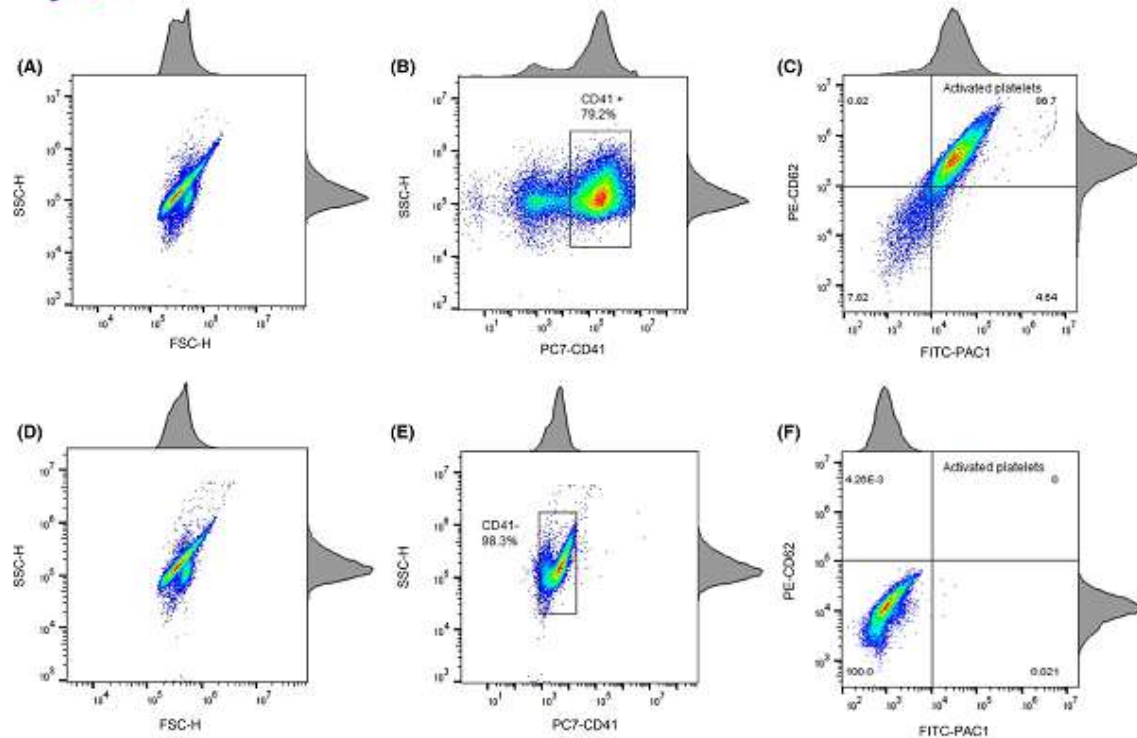
Cat. 400112). Positive platelet activation patterns were performed using agonists directed against different platelet receptors: ADP 20  $\mu$ M, collagen 0.19 mg/mL and EPI 100  $\mu$ M (Chrono-log). The percentage of fluorescence was analyzed using the flow cytometric equipment (CytoFLEX, Beckman Coulter Life Sciences). Data was analyzed with FlowJo software (Tree Star).

## 2.6 | Strategy to obtain platelet activation positive control

To identify different degrees of platelet activity, the PRP of healthy donors was stimulated with three different platelet agonists: ADP 20  $\mu$ M, collagen 0.19 mg/ml, and epinephrine (EPI) 100  $\mu$ M. After acquisition, platelets were analyzed on scatter plots according to size and complexity. Once the area was delimited, the positive population was selected for the expression of the CD41 marker. Platelet activation was confirmed by expression of the heterodimeric complex  $\alpha$ IIb $\beta$ III (IIb/IIIa) complex PAC1-FITC and P-selectin CD62-PE on the cell surface (Figure 1) Stimulated platelet-rich plasma (PRP) suspension was acquired in the cytometer and platelet population was selected by size and complexity (Figure 1A), the expression of CD41-PE/Cy7 was considered a marker of platelet identity and the positive population was selected (Figure 1B). Platelet activation was determined by double positivity expression of  $\alpha$ IIb $\beta$ III-FITC and CD62-PE (Figure 1C). Unstimulated PRP was used as a negative control and platelet population was selected by size and complexity (Figure 1D). The area of negativity to CD41-PE/Cy7 was determined (Figure 1E). The double negative population to  $\alpha$ IIb $\beta$ III-FITC and CD62-PE were determined as inactive platelets (Figure 1F). Significantly higher expression of P-selectin and  $\alpha$ IIb $\beta$ III complex was observed in platelets that were stimulated with agonists ADP, collagen, and EPI (Figure 2A and B) compared to unstimulated platelets (Figure 2C and D). This identification and platelet activity analysis were used as a control during all subsequent experiments. All experiments were performed a minimum of five times.

## 2.7 | Light transmission aggregation assays

Whole blood was obtained from healthy donors in tubes with sodium citrate (3.2%). PRP was obtained under conditions described above and incubated for 1 h with DENV proteins. Platelet-poor plasma (PPP) was separated by centrifugation at 2500 g for 15 min and used as a blank. Subsequently, 0.5 ml of the PRP previously incubated with the DENV proteins and 0.5 ml of unstimulated PRP were placed in the cuvette of the aggregometer containing a siliconized magnetic bar, at a constant temperature of 37°C for a minimum of 5 min; the results were compared against positive controls (PRP + ADP 20  $\mu$ M, PRP + collagen 0.19 mg/ml, PRP + EPI 100  $\mu$ M). To investigate whether the addition of platelet agonists could improve platelet aggregation in PRP incubated with dengue viral proteins; suboptimal doses of ADP (2.5  $\mu$ M), EPI (10  $\mu$ M) and collagen



**FIGURE 1** Flow cytometry strategy to identify activated platelets. (A) Stimulated platelet-rich plasma (PRP) suspension was acquired in the cytometer and platelet population was selected by size and complexity. (B) The expression of CD41-PE/Cy7 was considered a marker of platelet identity and the positive population was selected. (C) Platelet activation was determined by double positivity expression of  $\alpha$ IIb $\beta$ III-FITC and CD62-PE. (D) Unstimulated PRP was used as a negative control and platelet population was selected by size and complexity. (E) The area of negativity to CD41-PE/Cy7 was determined. (F) The double negative population to  $\alpha$ IIb $\beta$ III-FITC and CD62-PE were determined as inactive platelets

(2.0  $\mu$ M) were added. Light transmission was measured on a Chrono-log 560ca aggregometer (Chrono-log). All data were analyzed with AGGRO/LINK@8 software.

## 2.8 | Statement of ethics

All the studies with healthy donors were approved by the ethics committee of the Faculty of Medical and Biological Sciences "Dr. Ignacio Chávez" of the UMSNH and the General Hospital "Dr. Miguel Silva"; registration number 17-CI-16053153. Morelia, Mexico.

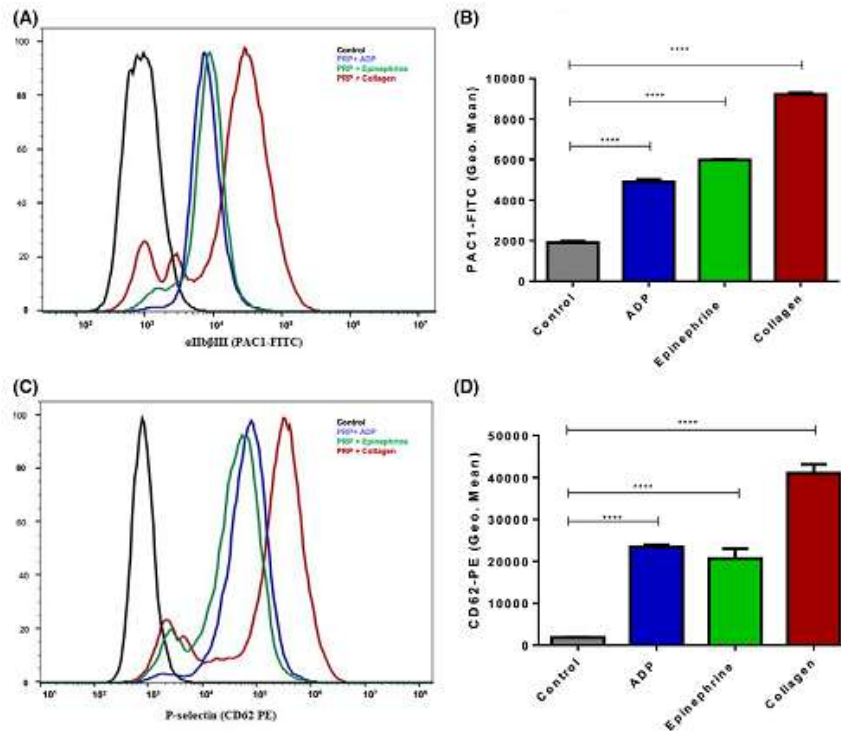
## 2.9 | Statistical analysis

The Mann-Whitney U test was used to compare non-parametric data. For parametric data, an unpaired Student's t test was performed, and data were reported as mean and standard deviation. *P* values <.05 were considered statistically significant in all cases. The data were analyzed by GraphPad Prism software for windows version 6.00.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Production and purification of DENV NS1 full-length protein and domains

DENV NS1 expression plasmids were designed to encode full NS1 or domains ( $\beta$ -ladder, wing, NS1 mutant) and cloned into the pHLSec expression vectors to produce DENV NS1 proteins with a C-terminal His tag with the exception of DENV NS1  $\beta$ -ladder, which had a C-terminal C-tag as shown in Figure 3A. These constructs were used to transfect HEK293T cells and secreted proteins were purified by affinity chromatography and analyzed by SDS-PAGE Coomassie staining and WB using a His tag mAb or a C-tag mAb or DENV NS1 antibody (Figure 3B-E). SDS-PAGE gel showed the expected-sized bands of NS1 and its domains (Figure 3B). NS1  $\beta$ -ladder protein had a single band ~25 kDa with highest purity. Full-length NS1 protein showed an expected band around ~50 kDa while NS1 mutant had a band ~45 kDa corresponding to slightly smaller molecular mass due to  $\beta$ -roll domain deletion. In addition, full-length NS1 showed additional bands around ~30 kDa and 25 kDa, which may correspond to the NS1  $\beta$ -ladder-His and NS1



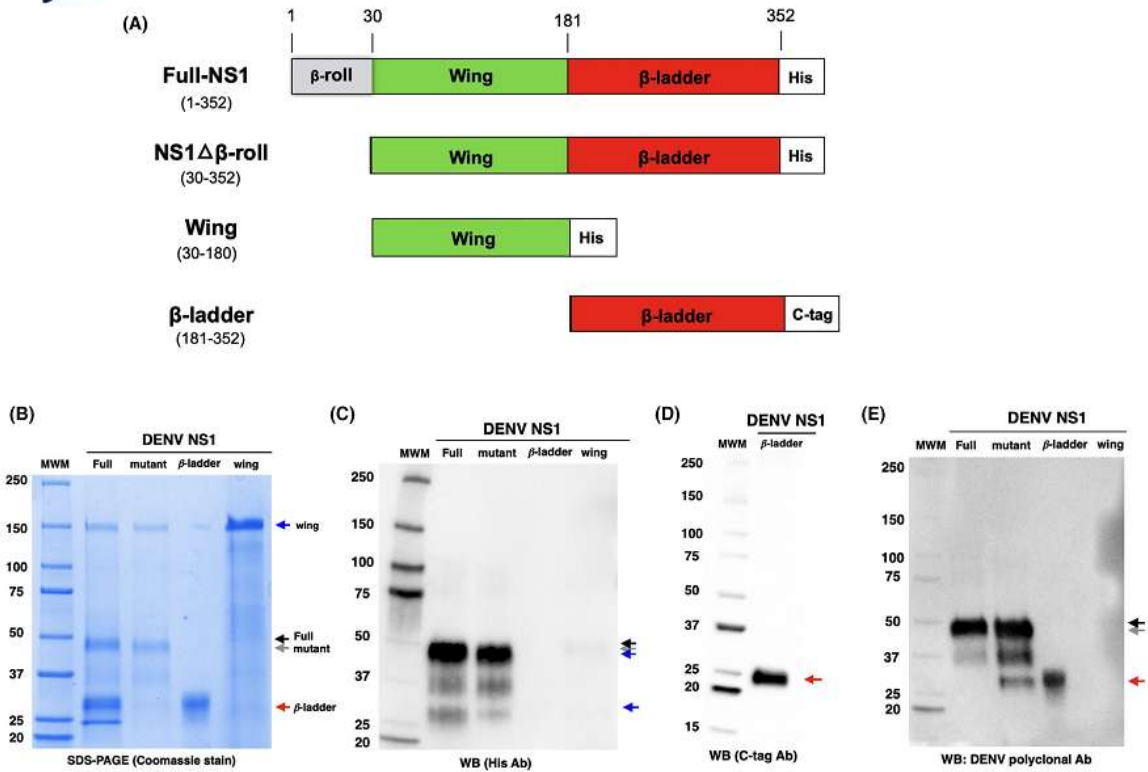
**FIGURE 2** Detection of platelet activation with different agonists. Platelets were incubated with ADP 20  $\mu$ M, collagen 0.19 mg/ml, and epinephrine 100  $\mu$ M; in order to establish positive activation patterns. (A and B) Average fluorescence percentage of the  $\alpha$ IIb $\beta$ III PAC1-FITC complex in platelets stimulated with agonists and unstimulated platelets. (C and D) The expression of the average percentage of CD62 P-selectin fluorescence in platelets with and without stimulation was determined. The results show collagen as the agonist that caused the most potent platelet activation. Statistical analysis was performed using Student's t-test

$\beta$ -roll-wing, respectively, formed following autocleavage by host cell protease. NS1 wing protein showed an intense band  $\sim$ 150 kDa likely due to its multimeric state in addition to a very faint band  $\sim$ 30 kDa that corresponds to monomeric form of NS1 wing. WB analysis of DENV NS1 proteins (full and mutant) showed expected molecular masses at  $\sim$ 50 kDa with the NS1 mutant having slightly smaller molecular mass due to  $\beta$ -roll domain deletion (Figure 3C). Similar to SDS-PAGE, WB of DENV NS1 (full) showed faint bands around  $\sim$ 30 kDa that may correspond to NS1  $\beta$ -ladder-His. NS1 wing showed faint bands  $\sim$ 25 kDa and  $\sim$ 50 kDa on Figure 3C corresponding to monomeric and dimeric forms, respectively, and these bands are seen more clearly on Figure S2 in supporting information at higher exposure. The band  $\sim$ 150 kDa shown at SDS-PAGE of DENV NS1 wing was not detected on WB and this may be due to the His epitope masking. No band was seen for DENV NS1  $\beta$ -ladder as it does not have a His tag. On the other hand, WB carried out using a C-tag mAb showed a band  $\sim$ 25 kDa that corresponds to the expected size of DENV NS1  $\beta$ -ladder (Figure 3D). In order to characterize purified DENV NS1 proteins further, WB was carried out using a polyclonal DENV NS1 protein antibody that targets the central region of DENV NS1 (Figure 3E). WB showed expected molecular sizes at  $\sim$ 50 kDa,  $\sim$ 45 kDa, and  $\sim$ 25 kDa, which correspond

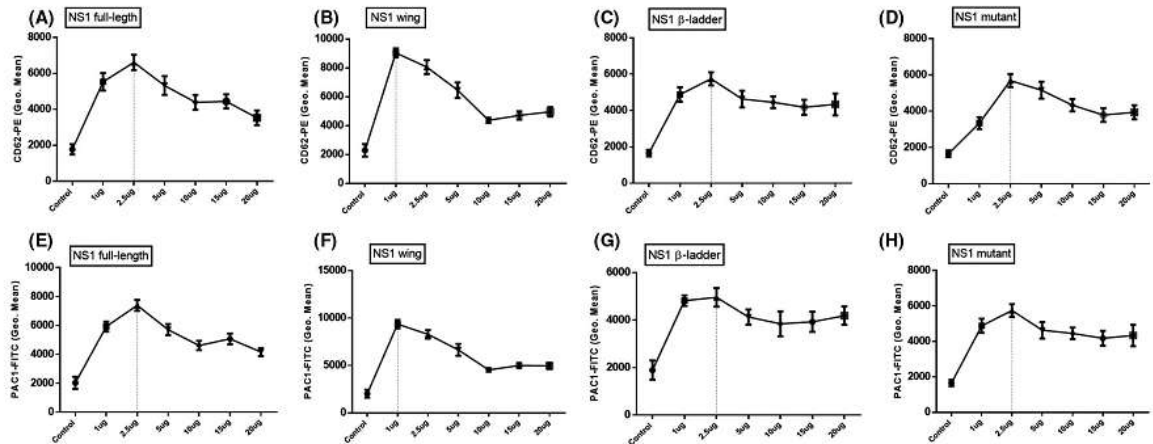
to full-length NS1, mutant, and  $\beta$ -ladder proteins, respectively. No clear band was seen for NS1 wing on WB and this may be due to this antibody binding toward the  $\beta$ -ladder region of the NS1 only.

### 3.2 | DENV NS1 protein and domains induced platelet activation

We evaluated the ability of full-length NS1 and its separate domains to activate platelets. Platelets were incubated for 60 min at 37°C with NS1  $\beta$ -ladder, NS1 wing, and NS1 mutant at different concentrations. Fluorescence expression of platelet activation markers when incubated with the NS1 full-length DENV NS1 full-length are shown in Figure 4 (A and E). Individual domains fluorescence expression of platelet activation markers is shown in Figure 4. The full-length NS1 was able to induce the maximum expression of P-selectin (CD62) and  $\alpha$ IIb $\beta$ III (PAC1-FITC) at a concentration of 2.5  $\mu$ g/ml for 60 min, which was significantly higher than the negative control (Figure S1 in supporting information). To evaluate the ability of the NS1 domains to activate platelets, we incubated isolated platelets with NS1  $\beta$ -ladder (Figure 4C, G), NS1 mutant (Figure 4D, H), and NS1 wing (Figure 4B, F) for 60 min at different concentrations. We



**FIGURE 3** Design and characterisation of dengue virus (DENV) non-structural protein 1 (NS1) protein and domains. (A) Design of NS1 protein and domains. (B) Coomassie stained sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel of purified DENV NS1 proteins and domains (NS1 full-length, mutant,  $\beta$ -ladder, and wing). (C) Western blot of the purified DENV NS1 protein and domains using anti-His antibody. (D) Western blot of purified NS1  $\beta$ -ladder protein using a C-tag monoclonal antibody. (E) Western blot of the purified DENV NS1 protein and domains using a polyclonal NS1 antibody. For SDS-PAGE, 1  $\mu$ g of purified NS1 proteins was loaded to each lane while 0.5  $\mu$ g of NS1 proteins was loaded per lane for western blot



**FIGURE 4** Platelet stimulation with non-structural protein 1 (NS1) full-length and domains. Platelets were incubated for 60 min at 37°C with NS1  $\beta$ -ladder, NS1 wing, and NS1 mutant at different concentrations. (A and E) Fluorescence expression of platelet activation markers when incubated with the NS1 full-length. (B and F) Wing domain fluorescence expression of activation markers. (C and G)  $\beta$ -ladder fluorescence expression of platelet activation markers. (D and H) NS1 mutant fluorescence expression of platelet activation markers. Percent fluorescence of  $\alpha$ IIb $\beta$ III-PAC1 and CD62 P-selectin were analyzed by flow cytometry

observed a similar behavior in the expression of platelet activation markers when stimulated with 2.5  $\mu\text{g/ml}$  for 60 min for  $\beta$ -ladder domain and NS1 mutant. Interestingly, the wing domain was able to activate platelets at a lower concentration (1  $\mu\text{g/ml}$  for 60 min; Figure 4F). Finally, we compared the expression results of P-selectin (CD62) and  $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$  (PAC1-FITC) of all versions of NS1 at a concentration of 2.5  $\mu\text{g/ml}$  against a negative control. The negative control was treated under the same conditions as the experimental groups, but without the stimulation of the viral proteins. The results indicate that NS1 wing is the domain that generates a higher expression of platelet activation markers, even higher than NS1 full-length. These results are shown in Figure 5A and B.

### 3.3 | NS1 full-length promotes platelet aggregation in the presence of low doses of platelet agonists

Once we determined the ability of dengue viral proteins to induce the expression of activation markers on the surface of platelets, we investigated their ability to trigger platelet aggregation. We performed aggregation tests using NS1 full-length from a concentration of 2.5  $\mu\text{g/ml}$  to 50  $\mu\text{g/ml}$ , which has been reported in patients with severe dengue symptoms.<sup>18</sup> The conditions of platelet stimulation with viral protein were the same as those used for the flow cytometry assays, and we compared the results with a positive aggregation control, using ADP 20  $\mu\text{M}$  as an agonist. Our results indicate that the protein by itself was not able to induce the formation of platelet aggregates even at a high concentration of the whole protein (Figure 6A). However, the results obtained by flow cytometry showed that platelets were activated by viral proteins, so based on this and the results published by Chao et al.,<sup>9</sup> we decided to investigate whether the addition of platelet agonists in doses below the activation threshold could improve platelet aggregation. PRP was incubated with the full-length NS1 protein (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) and after 1 h low doses of ADP (2.5  $\mu\text{M}$ ), collagen (2.0  $\mu\text{M}$ ), and EPI (10  $\mu\text{M}$ ) were added in separate assays. Negative control was PRP to which the same dose of agonists was also added but without the stimulus of full-length NS1. The results showed platelet aggregation for samples that had previous incubation with full-length NS1 (6C). PRP that was stimulated with ADP (2.5  $\mu\text{M}$ )/DENV NS1 achieved an aggregation percentage above 80% (6D), while collagen (2.0  $\mu\text{M}$ )/DENV NS1 achieved 89% (6E), and finally EPI (10  $\mu\text{M}$ )/DENV NS1 resulted in an aggregation percentage of 79%. These results showed that DENV NS1 full can induce stable platelet aggregation if small doses of agonists are added as a secondary stimulus (Figure 6B).

### 3.4 | Platelet aggregation capacity stimulated by NS1 wing, NS1 $\beta$ -ladder, and NS1 mutant

Like the full-length DENV NS1, the individual viral domains were also unable to induce platelet aggregate formation by themselves. Its

ability to induce platelet aggregation was evaluated in the presence of low doses of agonists, using the same concentrations and conditions that were used for full-length NS1. Unlike NS1 full-length, the protein domains NS1 wing, NS  $\beta$ -ladder, and NS1 mutant failed to induce an aggregation response in the presence of ADP and collagen (Figure 7B, C, E, F, H, I). However, when a low dose of EPI was used as an agonist secondary to incubation with the protein individual domains, the formation of stable platelet aggregates was observed (Figure 7A, D, G, J).

## 4 | DISCUSSION

Thrombocytopenia is a very common manifestation of dengue disease. Increased platelet clearance may occur in dengue infection as a consequence of platelet activation; however, the pathogenesis of DENV infection, the mechanisms of severe dengue hemorrhagic symptoms, and the relationship to platelets is not fully understood.<sup>9,20,21</sup> In this study, we produced recombinant NS1 as a full-length protein and three individual sub-domains:  $\beta$ -ladder, wing, and NS1 protein with deletion of  $\beta$ -roll (NS1 mutant). These proteins have been successfully used for seroprevalence studies. Different from some other studies, our NS1 proteins were produced in a mammalian expression system based on HEK293, a human embryonic kidney cell line.<sup>24</sup> Protein expression in mammalian systems ensures post-translational modifications such as N-glycosylation<sup>25</sup> that are not present in prokaryotic produced proteins and are important to maintain the stability of dimers and hexamers secreted into circulation, as well as for their interaction with host cells.

Regarding the interaction of our viral proteins with platelets, we used PRP from healthy donors that were seronegative for endemic arbovirus (dengue, chikungunya, and Zika). Flow cytometry analysis indicated that the DENV NS1 full protein, the wing domain, the  $\beta$ -ladder domain, and NS1 mutant domain were all able to induce expression of both the P-selectin receptor and the  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  complex on platelet surfaces. The  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  complex is the most recognized marker of platelet activation and is tightly regulated through a process termed "inside-out signalling." The expression of  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  on platelet membrane allows interaction with its various ligands: fibrinogen, von Willebrand factor, vitronectin, and fibronectin, which conversely induces "outside-in" signals across platelet membrane that allow  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  clustering during platelet aggregation. Ligand binding to  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  and integrin clustering mediate cellular responses leading to cell spreading, granule secretion of proteins, and mediators leading to further platelet activation and aggregation as well to interaction and activation of endothelial and immune cells.<sup>26</sup> It has previously been hypothesized that thrombocytopenia and hemorrhagic manifestations may be due to platelet apoptosis and/or consumption of platelets after being activated during the DENV infection process.<sup>27</sup> Our results indicate that NS1 and their domains actively participate in dengue immunopathogenesis by inducing platelet activation,

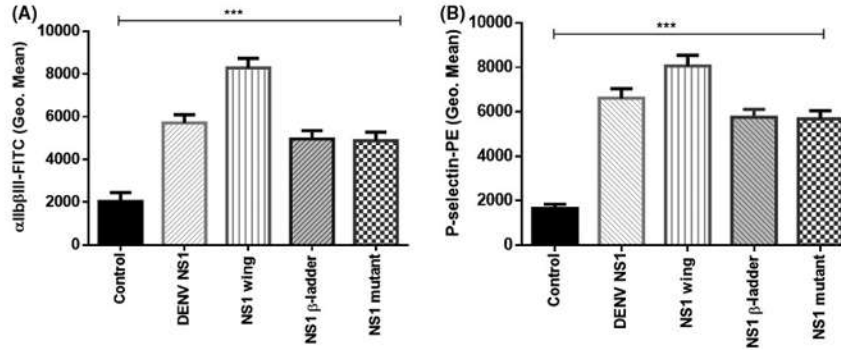


FIGURE 5 Comparison of activation markers P-selectin (CD62) and  $\alpha$ IIb $\beta$ III (PAC1-FITC) using a dose of 2.5  $\mu$ g/ml of the different viral proteins: DENV NS1 and the viral domains NS1 wing, NS1  $\beta$ -ladder and NS1 mutant. (A) Expression of  $\alpha$ IIb $\beta$ III (PAC1-FITC). (B) P-selectin (CD62) expression upon stimulation with the different viral proteins, in all cases results were compared against a negative control

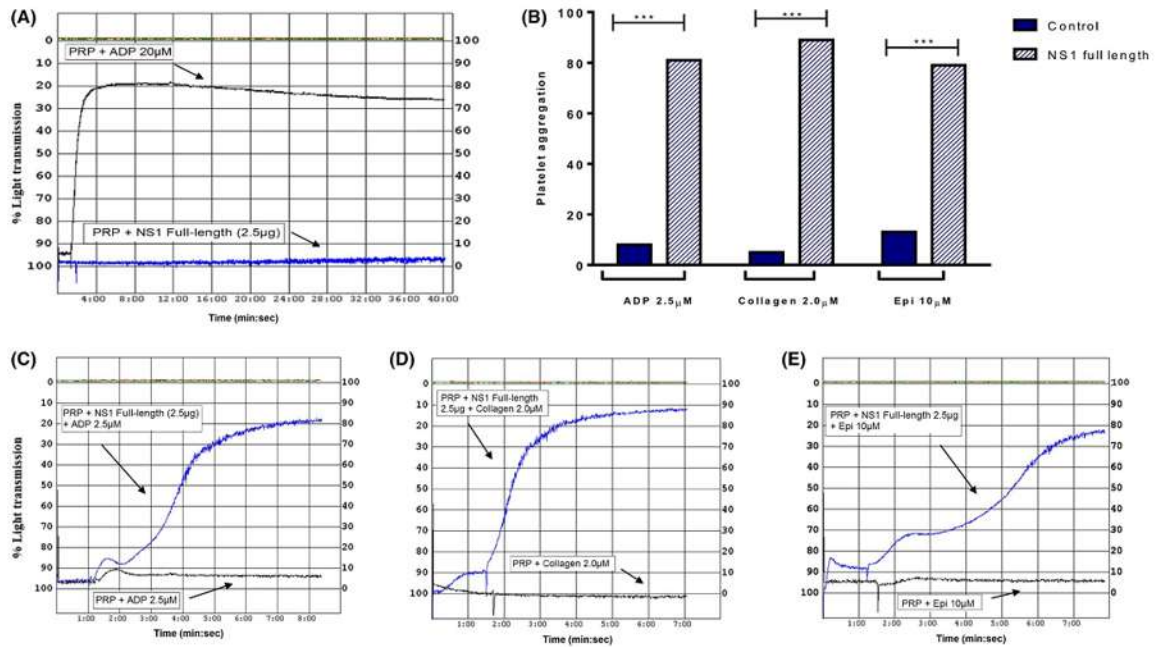
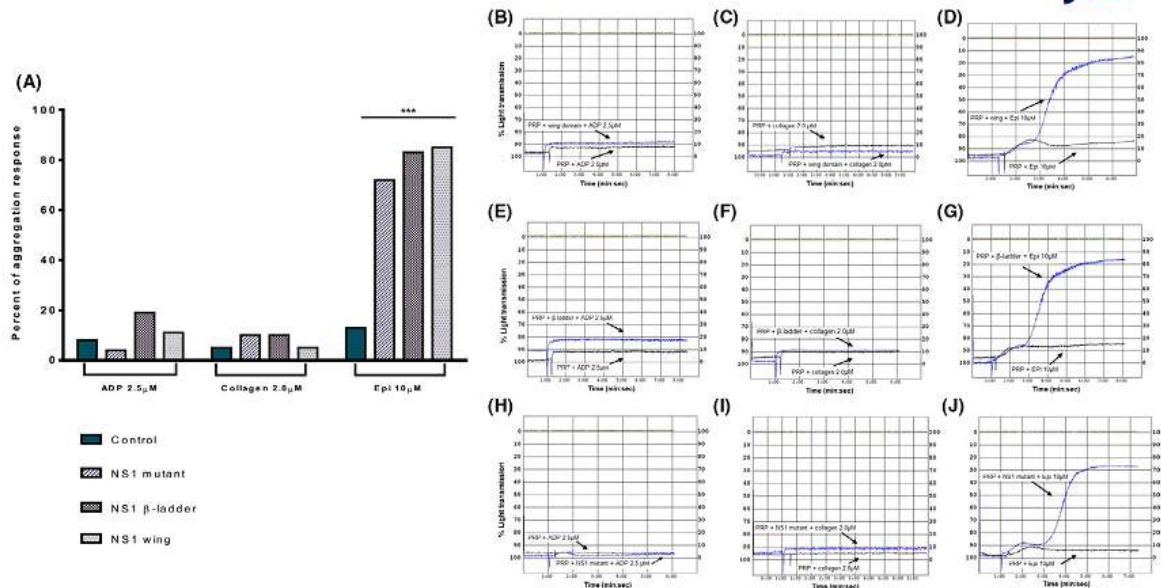


FIGURE 6 Determination of the aggregation capacity of platelets in response to non-structural protein 1 (NS1) full-length. (A) Platelet-rich plasma (PRP) was incubated with the NS1 full-length (2.5  $\mu$ g/ml) protein for 1 h, and was compared to a positive control stimulated with a dose of 20  $\mu$ M ADP. The formation of platelet aggregates in the PRP incubated with the protein was not observed. (B) DENV NS1 full can induce stable platelet aggregation if small doses of agonists are added as a secondary stimulus. (C) A dose of ADP (2.5  $\mu$ M) was added to the PRP incubated with 2.5  $\mu$ g/ml of NS1 full-length and compared to a negative control (PRP + ADP 2.5  $\mu$ M). (D and E) Assays using low doses of collagen (2.0  $\mu$ M) and epinephrine (10  $\mu$ M) were performed on PRP previously incubated with NS1 full-length (2.5  $\mu$ g/ml). Platelet agonists at minimal doses were able to induce a percentage of aggregation greater than 75% in samples previously incubated with viral proteins

expression of platelet membrane procoagulant glycoproteins, and aggregation, contributing to the development of the proinflammatory microenvironment found in severe dengue. According to platelet physiology, platelet activation is followed by platelet degranulation and release of mediators, inflammatory cytokines,

and coagulation factors that lead to amplification of inflammation, platelet aggregation, and microthrombi formation. Further studies on platelet supernatants are needed to address if DENV NS1 protein is capable of inducing degranulation and secretion of platelet mediators.



**FIGURE 7** Assessment of platelet aggregation capacity in response to dengue virus (DENV) non-structural protein 1 and (NS1) domains. Platelet-rich plasma (PRP) was incubated with different DENV NS1 protein domains. (A) Epinephrine (EPI) at minimal doses was able to improve platelet aggregation in PRP previously incubated with the viral domains. The formation of aggregates with ADP and collagen was not observed. (B–D) Percentage of platelet aggregation in response to stimulation with the NS1 wing domain. (E–G) Percentage of platelet aggregation in response to stimulation with the  $\beta$ -ladder domain. (H–J), Percentage of platelet aggregation in response to stimulation with the mutant NS1 domain. A minimal dose of ADP, collagen, and EPI was used as secondary agonists in all trials

Addressing the individual DENV NS1 domains, interestingly, it was the NS1 wing domain that produced the highest expression of both P-selectin and  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 on the platelet surface. It is known by crystallographic studies that the wing domain is composed of hydrophobic amino acids, which gives them a positive characteristic of association with the cell membrane in addition to presenting a disordered loop, which is an antigenic site exposed to the contact surface.<sup>18,28</sup> In addition, there is evidence that antibodies directed against the NS1 wing domain acted as protectors against DENV infection in mice and were inversely correlated with the severity of the disease.<sup>20</sup> This could explain why platelets that were incubated with the wing domain expressed a higher percentage of activation markers than the other domains of NS1.

Previous studies have shown the ability of the NS1 protein to induce platelet aggregation in the presence of low doses of ADP.<sup>9</sup> Our aggregation results concur with those from Chao et al.,<sup>9</sup> which show that NS1 full-length alone was not able to induce platelet aggregates; however, NS1 full-length protein induces a state of cellular hyperreactivity in which platelets can aggregate when a dose below the threshold of ADP is added. These studies evaluated platelet aggregation response with a single agonist: ADP;<sup>9</sup> therefore, we decided to study stimulation with other known platelet agonists: collagen and EPI, because stimulation of other receptors on platelets could bring new insights to platelet activation pathways. DENV NS1 full protein was able to achieve platelet aggregation in the presence

of low doses of ADP, collagen, and EPI; however, individual domains failed to induce platelet aggregates in the presence of ADP or collagen. Conversely, a robust aggregation response was obtained for all three individual domains in the presence of a minimal dose of EPI and the results were comparable to full-length NS1. EPI is a weak agonist that promotes platelet activation via  $\alpha$ -2 adrenergic receptors coupled to G $\alpha$  proteins on the platelet surface and can induce fibrinogen receptor exposure.<sup>29</sup> In a recently published study it was shown that EPI was able to restore aggregation in platelets inhibited with ticagrelor and induced stable aggregation through inhibition of the cAMP pathway and activation of the PI3K pathway,<sup>30</sup> which could explain the platelet aggregation that we observe with the viral domains.<sup>31</sup>

Our results show that the NS1 dengue protein must be in complete length and conformation to induce platelet activation; furthermore, that wing, the most immunogenic domain of the protein and presumably the one that interacts with the cell membrane, is the only one that can also induce activation by itself. This highlights the importance of the interactions between the protein and its recognition receptors on platelet surfaces in the pathogenesis of dengue virus. The fact that our results seem to indicate that the wing domain alone is capable of inducing a greater expression of platelet activation markers and also platelet aggregation appears to confirm that NS1 wing could be an interesting target to block the platelet-activating effects of DENV.

The three structural domains of NS1 had been proposed to play different roles in membrane association, replication complex assembly, and immune system evasion. It had also been proposed that the NS1 wing domain could be actively participating in the RLR (RIG-I, retinoic acid-inducible gene I-like receptor) mediated innate immune response according to structural analysis, although this has not yet been demonstrated. As the most consistent results correspond to those obtained with the full DENV NS1 protein, it seems to indicate that the presence of the  $\beta$ -roll domain is essential to induce a stable platelet response because it allows the formation of dimeric and hexameric structures.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the UMSNH-CIC and Innovate UK (project 971557). N. García-Larragoiti and A. Cano-Méndez are recipients of CONACYT-Mexico fellowships for post-graduate students. YCK is the recipient of the NIHR Oxford Biomedical Research Centre Small Grant. The sponsors of this study are public or non-profit organizations that support science in general and had no role in gathering, analyzing, or interpreting the data.

#### CONFLICTS OF INTEREST

All authors declare no conflicts of interest.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.E. Viveros-Sandoval designed the research; M.E. Viveros-Sandoval, A. Reyes-Sandoval, and M.S. Vázquez-Garcidueñas conceived and designed the experiments; N. García-Larragoiti, Y.C. Kim, and C. López-Camacho performed the design, production, and purification of recombinant proteins; Y.C. Kim carried out SDS-PAGE and WB of recombinant proteins; N. García-Larragoiti and A. Cano-Méndez performed flow cytometry experiments and data analysis; S. López-Castaneda participated in research design, ethical approvals, project management, and contributed sera and plasma samples. N. García-Larragoiti, D. Hernández-Hernández, and A.G. Vargas-Ruiz designed and performed platelet aggregation experiments; M.E. Viveros-Sandoval and N. García-Larragoiti performed data analysis; N. García-Larragoiti wrote the original manuscript and M.E. Viveros-Sandoval, A. Reyes-Sandoval, M.S. Vázquez-Garcidueñas, and Y.C. Kim reviewed and edited the manuscript.

#### ORCID

Martha E. Viveros-Sandoval  <https://orcid.org/0000-0002-2801-643X>

#### REFERENCES

- Yeaman MR. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(6):426-437.
- Gaertner F, Ahmad Z, Rosenberger G, et al. Migrating platelets are mechano-scavengers that collect and bundle bacteria. *Cell*. 2017;171(6):1368-1382.e23.
- Koupenova M, Vitseva O, MacKay CR, et al. Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis. *Blood*. 2014;124(5):791-802.
- Parker ZF, Rux AH, Riblett AM, et al. Platelet factor 4 inhibits and enhances HIV-1 infection in a concentration-dependent manner by modulating viral attachment. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2016;32(7):705-717.
- Ojha A, Nandi D, Batra H, et al. Platelet activation determines the severity of thrombocytopenia in dengue infection. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-10. <https://doi.org/10.1038/srep41697>.
- Hottz ED, Lopes JF, Freitas C, et al. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood*. 2013;122(20):3405-3415.
- Berthet J, Damien P, Hamzeh-cognasse H, et al. Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin Immunol*. 2012;145(3):189-200.
- Assinger A. Platelets and infection—an emerging role of platelets in viral infection. *Front Immunol*. 2014;5:10-12.
- Chao C-H, Wu W-C, Lai Y-C, et al. Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4, leading to thrombocytopenia and hemorrhage. *PLoS Pathog*. 2019;15(4):1-26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007625>.
- Deressa T, Damtie D, Workneh M, Genetu M, Melku M. Anemia and thrombocytopenia in the cohort of HIV-infected adults in northwest Ethiopia: a facility-based cross-sectional study. *Electron J Int Fed Clin Chem Lab Med*. 2018;29(1):36-47.
- Mourão MPG, Lacerda MVG, Macedo VO, Santos JB. Thrombocytopenia in patients with dengue virus infection in the Brazilian Amazon. *Platelets*. 2007;18(8):605-612.
- Kim JK, Jeon JS, Kim JW, Kim GY. Correlation between abnormal platelet count and respiratory viral infection in patients from Cheonan, Korea. *J Clin Lab Anal*. 2016;30(3):185-189.
- Stanaway JD, Shepard DS, Undurraga EA, et al. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(6):712-723.
- Guo C, Zhou Z, Wen Z, et al. Global epidemiology of dengue outbreaks in 1990–2015: a systematic review and meta-analysis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:1-11.
- Reyes-sandoval A, Ludert JE. The dual role of the antibody response against the flavivirus non-structural protein 1 (NS1) in protection and immuno-pathogenesis. *Front Immunol*. 2019;10:1-6.
- Akey DL, Brown WC, Jose J, et al. Structure-guide insights on the role of NS1 in flavivirus infection. *Bioessays*. 2015;37:489-494.
- Yacoub S, Lam PK, Vu LHM, et al. Association of microvascular function and endothelial biomarkers with clinical outcome in dengue: An observational study. *J Infect Dis*. 2016;214(5):697-706.
- Akey ADL, Brown WC, Dutta S, Konwerski J, Jose J. Flavivirus NS1 crystal structures reveal a surface for membrane association and regions of interaction with the immune system. *Science*. 2014;343(6173):1-31.
- Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol*. 2002;40(2):376-381.
- Lai YC, Chuang YC, Liu CC, et al. Antibodies against modified NS1 wing domain peptide protect against dengue virus infection. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-15.
- Modhiran N, Watterson D, Muller DA, et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci Transl Med*. 2015;7(304):304ra142. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3863>.

22. Thiemmecca S, Tamdet C, Punyadee N, et al. Secreted NS1 protects dengue virus from mannose-binding lectin-mediated neutralization. *J Immunol*. 2016;197(10):4053-4065.
23. Chen J, Ng MML, Chu JJH. Activation of TLR2 and TLR6 by dengue NS1 protein and its implications in the immunopathogenesis of dengue virus infection. *PLoS Pathog*. 2015;11(7):1-34.
24. Kim YC, García-Larragoiti N, Lopez-Camacho C, Viveros-Sandoval ME, Reyes-Sandoval A. Production and purification of Zika virus NS1 glycoprotein in HEK293 cells. In: *Zika Virus: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Vol 2142; 2020:93-102.
25. Kim YC, López-Camacho C, García-Larragoiti N, et al. Development of an E2 ELISA methodology to assess Chikungunya Seroprevalence in patients from an endemic region of Mexico. *Viruses*. 2019;11(5):407. <https://doi.org/10.3390/v11050407>.
26. Huang J, Li X, Shi X, et al. Platelet integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ : signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. *J. Hematol. Oncol*. 2019;12(1):1-22.
27. Krishnamurti C, Peat RA, Cutting MA, Rothwell SW. Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66(4):435-441.
28. Edeling MA, Diamond MS, Fremont DH. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(11):4285-4290.
29. Hayes C, Kitahara S, Tcherniantchouk O. Decreased threshold of aggregation to low-dose epinephrine is evidence of platelet hyperaggregability in patients with thrombosis. *Hematol Rep*. 2014;6(3):45-50.
30. Martin AC, Zlotnik D, Bonete GP, et al. Epinephrine restores platelet functions inhibited by ticagrelor: a mechanistic approach. *Eur J Pharmacol*. 2020;866:172798.
31. Seyoum M, Enawgaw B, Melku M. Human blood platelets and viruses: defense mechanism and role in the removal of viral pathogens. *Thromb J*. 2018;16(1):4-9.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** García-Larragoiti N, Kim YC, López-Camacho C, et al. Platelet activation and aggregation response to dengue virus nonstructural protein 1 and domains. *J Thromb Haemost*. 2021;00:1-11. <https://doi.org/10.1111/jth.15431>

## **CAPITULO III**

*Respuesta trombo-inflamatoria en pacientes con virus de Dengue*

## 1. Introducción

El virus del dengue (DENV) es un miembro de la familia Flaviviridae y del género Flavivirus. Es la infección por arbovirus más prevalente en todo el mundo con aproximadamente 50 a 100 millones de infecciones reportadas anualmente (OMS) (Sutherland et al., 2016). DENV se transmite a los humanos a través de los mosquitos vectores *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti* (Guzman, Gubler, Izquierdo, Martinez, & Halstead, 2016). Estos vectores se encuentran principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo con su región geográfica en expansión (Van Kleef et al., 2010), exponiendo potencialmente al 40% de la población mundial a la infección por dengue (OMS). Hay cuatro serotipos de DV antigénicamente distintos pero estrechamente relacionados (DV1–4) (Halstead, 1988). Tras la infección primaria con uno de los serotipos, los síntomas suelen variar de subclínicos a dengue autolimitado. Tras la infección secundaria con un serotipo heterólogo, los anticuerpos de reactividad cruzada del serotipo desarrollados durante la infección primaria aumentan el riesgo de desarrollar fiebre hemorrágica del dengue (DHF) o síndrome de shock del dengue (DSS) en un proceso denominado mejora dependiente de anticuerpos (ADE) (Halstead y O. Rourke, 1977). Durante la ADE, los anticuerpos subneutralizantes mejoran la infección de las células portadoras del receptor Fc, lo que provoca un aumento de la viremia y una tormenta de citocinas posterior que se cree que contribuye a la manifestación de una enfermedad grave (Zapata, Cox, & Salvato, 2014). El virus del dengue tiene un genoma de ARN de 11 kb, de sentido positivo, monocatenario con un único marco de lectura abierto. Es un virus envuelto y, al liberarse en el citoplasma, el genoma sirve como ARNm y se traduce directamente en una sola poliproteína. Se escinde postraduccionalmente por proteasas virales y del huésped en tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete no estructurales (NS) (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5). La proteína no estructural 1 del dengue (NS1) es una glicoproteína de 46 kD que existe dentro de la célula infectada, asociada a la superficie celular y secretada en el torrente sanguíneo (Flamand et al., 1999, Winkler et al., 1989). Tras la traducción, el flavivirus NS1 se traslada a la luz del RE donde se dimeriza y se cree que desempeña un papel estructural en el complejo de replicación del virus al interactuar con NS4B (Youn et al., 2012). Los estudios también muestran que NS1 juega un papel vital en la replicación viral de cadena negativa temprana (Lindenbach y Rice, 1997, Lindenbach y

Rice, 1999, Mackenzie et al., 1996). Sin embargo, el mecanismo exacto del papel de NS1 en la replicación viral sigue siendo difícil de determinar. DV NS1 se secreta como un oligómero, que sirve como un inmunógeno principal durante la fase aguda de la infección que conduce a una fuerte respuesta humoral anti-NS1. El DV NS1 secretado se ha implicado con funciones tanto protectoras como inmunopatogénicas. Inicialmente se identificó como una proteína fijadora del complemento en la sangre (Chambers et al., 1990). Estudios recientes muestran que NS1 conduce a la activación del complemento y contribuye al daño de las células endoteliales (Kurosu et al., 2007), mientras que otros estudios informan que NS1 previene la activación del complemento, lo que sirve como una estrategia de evasión inmunitaria que protege a las partículas DV de la lisis mediada por el complemento.

### **1.1 Características clínicas de la enfermedad del dengue**

Después de un período de incubación de 2 a 7 días, la infección por DENV puede tener una amplia gama de resultados, con ~75 % de las infecciones que conducen a una enfermedad asintomática o inaparente (Guo et al., 2017). La mayoría de los pacientes sintomáticos padecen dengue clásico (DF), una enfermedad autolimitada pero debilitante caracterizada por fiebre alta; dolor muscular, articular y óseo; y erupción. Sin embargo, algunos pacientes progresan a una enfermedad grave, denominada inicialmente fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de shock del dengue (DHF/DSS), caracterizada por fuga vascular, trombocitopenia y hemorragia, lo que puede provocar shock e insuficiencia orgánica (11). La viremia alcanza su punto máximo en la fase aguda temprana (días 1 a 4), mientras que la fuga vascular y el shock ocurren durante la fase crítica (días 4 a 6). En 2009, para facilitar el manejo clínico, la Organización Mundial de la Salud introdujo un nuevo esquema de clasificación de la gravedad de la enfermedad que consta de dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave (12).

### **1.2 Patogenia mediada por citoquinas**

Se cree que las citoquinas inflamatorias juegan un papel importante en la patogenia del dengue grave. Se ha planteado la hipótesis de que la producción desregulada de citoquinas es un mecanismo de fuga vascular en DHF/DSS, y varias citoquinas, incluidas TNF- $\alpha$ , IL-

10, IL-6 e IFN- $\gamma$ , se han propuesto como posibles predictores de la gravedad de la enfermedad. 92–96). En estudios en humanos, los niveles de TNF- $\alpha$  se elevaron en los casos de DHF/DSS (Reyes-sandoval & Ludert, 2019) y los niveles de IL-6 se elevaron en pacientes con dengue fatal en comparación con los sobrevivientes de enfermedad grave o leve (97, 98). En un modelo de ratón, la administración intravenosa de DENV2 NS1 resultó en niveles significativamente más altos de TNF- $\alpha$  e IL-6 en la sangre 3 días después de la inyección en comparación con la inyección de la proteína de control ovoalbúmina, lo que respalda el papel de NS1 en la inducción de la secreción de citocinas inflamatorias que pueden contribuir a la fuga vascular durante la enfermedad grave

## **2. Material y métodos**

### **2.1 Obtención de la muestra**

Se realizó toma de muestra de sangre periférica mediante venopunción de antebrazo con sistema Vacutainer® de recolección al vacío, técnica mínimamente invasiva. Las muestras fueron 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 obtuvieron 2 muestras, una muestra anticoagulada con citrato de sodio al 3.2% utilizada para la obtención de plasma rico en plaquetas (PRP) y plasma pobre en plaquetas (PPP). Para los ensayos de determinación de citocinas se obtuvo sangre humana completa de todos los pacientes mediante venopunción limpia después de firmar el formulario de consentimiento informado. La sangre para las muestras de plasma se recogió en tubos vacutainer que contenían citrato de sodio al 3,2% (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) Y se procesó dentro de las 2 h posteriores a la recogida. El suero y el plasma se obtuvieron por centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se conservaron a -70 C hasta su uso para la evaluación de biomarcadores.

### **2.2 Aislamiento de plaquetas**

El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo centrifugando las muestras de sangre venosa a 100 xg durante 10 min a 21-23 °C, el sobrenadante se recogió cuidadosamente con una pipeta

de calibre ancho del tercio superior de la sangre centrifugada. El PRP obtenido se resuspendió en tampón de Tyrode a pH 7,4 para mantener la integridad de las plaquetas y se dejó reposar durante 20 min antes de su análisis por citometría de flujo.

### **2.3 Ensayos de determinación de citocinas**

El ensayo LEGENDplex™ de BioLegend es un inmunoensayo basados en perlas que utilizan el mismo principio básico que los inmunoensayos tipo sándwich. Las perlas se diferencian por tamaño e intensidades de fluorescencia interna. Cada conjunto de perlas se conjuga con un anticuerpo específico en su superficie y sirve como perlas de captura para ese analito en particular. Cuando un panel seleccionado de perlas de captura se mezcla e incuba con las muestras a analizar, cada analito se unirá a sus perlas de captura específicas. Después del lavado, se agrega un cóctel de anticuerpos de detección biotinilados, y cada anticuerpo de detección en el cóctel se unirá a su analito específico unido en las perlas de captura, formando así un sándwich. Posteriormente se agrega estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE), que se unirá a los anticuerpos de detección biotinilados, proporcionando intensidades de señal fluorescente en proporción a la cantidad de analitos unidos. Dado que las perlas se diferencian por tamaño e intensidad de fluorescencia interna en un citómetro de flujo, se pueden segregar poblaciones específicas de analito y cuantificar la señal fluorescente de PE. La concentración de un analito particular se determina usando una curva estándar generada en el mismo ensayo.

### **2.4 Plan de análisis estadístico**

Las variables sociodemográficas y categóricas se expresan en frecuencias y porcentajes. Las variables continuas se expresan utilizando valores de media, desviación estándar, mediana, mínimo y máximo. Los resultados obtenidos se expresaron en medias estándar y desviaciones. Se utilizó la prueba de Shapiro Wilk para la prueba de normalidad. Se utilizó un análisis de varianza para evaluar las diferencias entre grupos y se evaluaron comparaciones múltiples mediante la prueba de ANOVA. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ . Para el análisis se utilizó el software GraphPad 6.0 (San Diego, CA)

## 2.5 Aspectos éticos

En la fase que involucra el uso de muestras biológicas humanas del presente estudio, se respetaron 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 atentó en contra de la integridad física y moral de los individuos que participaron en él; prevaleció 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 33 reglamento ya mencionado, el presente estudio fue 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 actuó bajo la supervisión de las autoridades sanitarias competentes y contó con los recursos humanos y materiales necesarios que van a garantizar el bienestar del paciente que decida participar en la investigación. Se respetaron 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 fueron 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. Todos los estudios con donantes sanos fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la UMSNH

y del Hospital General “ Dr. Miguel Silva ”; número de registro 17-CI-16053153. Morelia, México.

### 3. Resultados

#### 3.1 Evaluación de la actividad plaquetaria en pacientes con diagnóstico positivo a DENV en estado agudo.

Para la tercera fase del estudio, que corresponde a la fase clínica se reclutaron un total de 25 participantes con diagnóstico serológico confirmado de DENV. Las características clínicas y demográficas se resumen en la tabla 1.

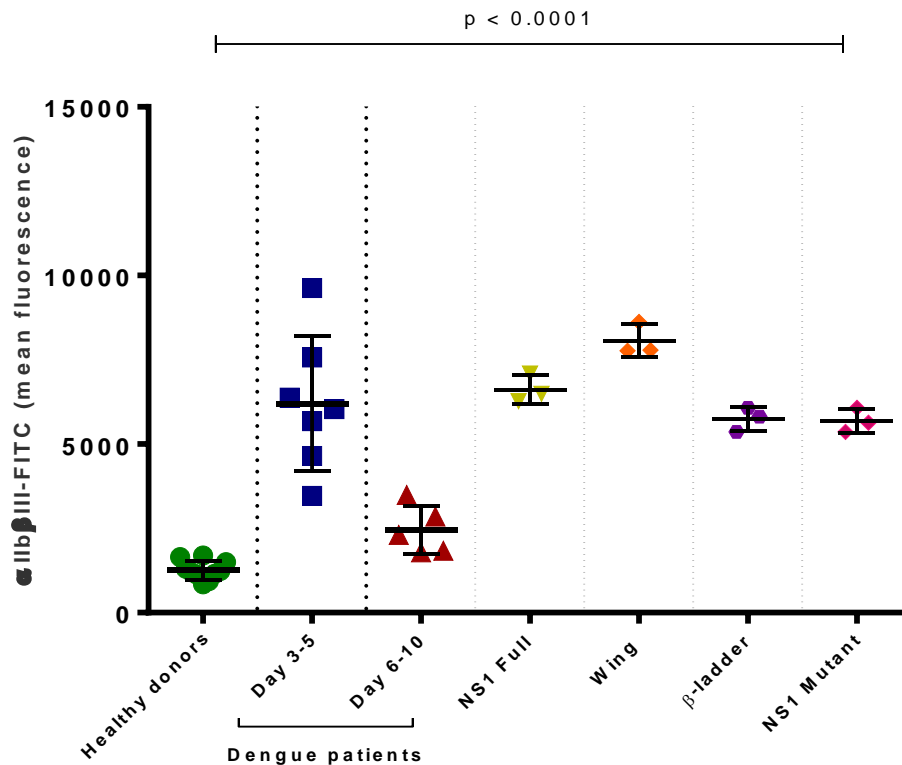
**Tabla 1. Características clínicas y demográficas de la población de estudio**

Variable	Controles	Pacientes con diagnóstico positivo de DENV		Valor de p
		3-5 días	6-10 días	
Edad (años, media ±SD)	41.40 + 14.9	39.40 + 11.9	36.80 + 12.3	0.154
Genero (%)				
Masculino	45%	32%	40%	NA
Femenino	55%	16%	12%	NA
WBC (x10 <sup>9</sup> /L, media + SD)	6.14 ± 1.1	2.6 ± 1.8	4.1 ± 1.4	0.015
Hb (g/dL media + SD)	14.52 + 2.1	14.38 ± 0.85	11.20 ± 2.5	0.276
Plaquetas ( x10 <sup>9</sup> /L media + SD)	322.1 ± 53.39	140.7 ± 43.10	212.7 ± 21.70	< 0.0001
VPM (fL media + SD)	8.30 + 1.3	10.05 + 1.3	10.45 + 0.79	

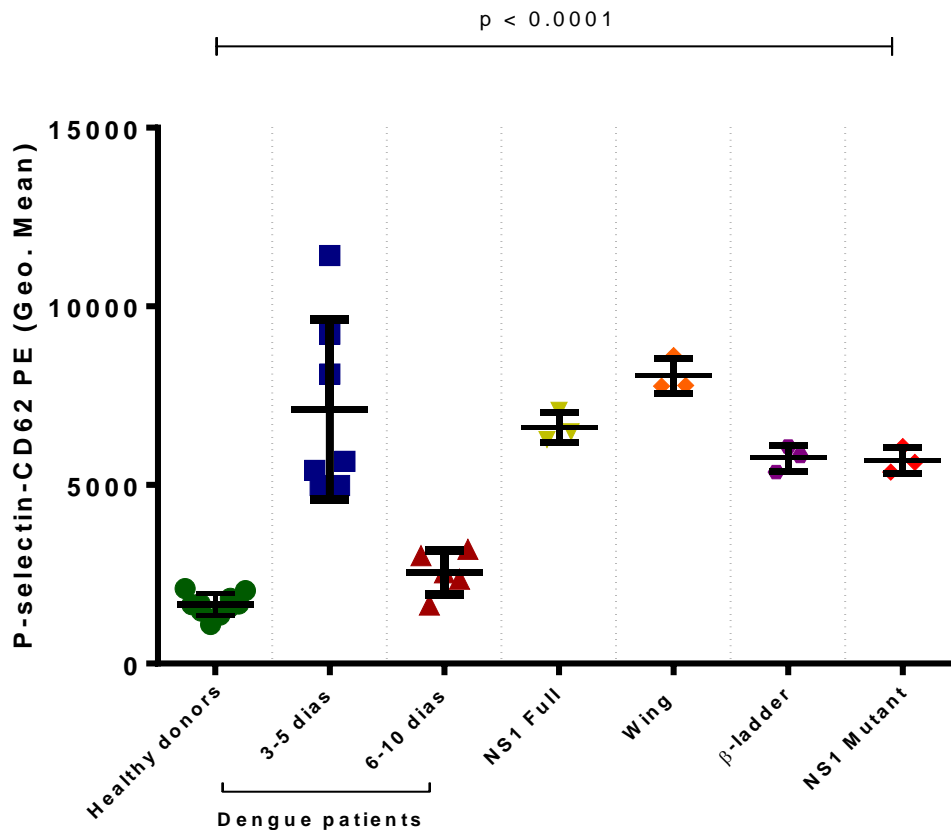
Datos expresados en media + SD y porcentajes (%)

Con el objetivo de comparar la actividad plaquetaria en pacientes con diagnóstico positivo a Dengue, se compararon 12 casos. Una vez confirmados se analizaron mediante citometría de

flujo siguiendo el mismo protocolo usado para evaluar activación plaquetaria mencionado anteriormente. Se clasificaron a los pacientes por los días de evolución al momento de la toma de muestra, los cuales se distribuyeron de la siguiente manera: grupo de 3-5 días de evolución 7 participantes, grupo 6-10 días de evolución 5 participantes, grupo control 10 voluntarios sanos con resultado negativo por serología a DENV. Los porcentajes de expresión del complejo  $\alpha$ IIb $\beta$ III (PAC1-FITC) y P-selectina (CD62-PE) de los pacientes y grupo control fueron comparados contra un pool de plaquetas de voluntarios sanos las cuales fueron estimuladas con las diferentes proteínas virales (NS1 Full, NS1 wing, NS1 mutante y NS1  $\beta$ -ladder) en ensayos por triplicado. Los resultados se muestran en la figura 1 y 2.



**Figura 1. Comparación en los porcentajes de fluorescencia de  $\alpha$ IIb $\beta$ III-FITC en pacientes con diagnóstico de dengue y plaquetas estimuladas con las proteínas virales.** Los pacientes con diagnóstico positivo a DENV fueron clasificados de acuerdo a los días de evolución de la enfermedad. Se estimularon plaquetas de donadores con las diferentes proteínas virales y comparar con los casos in-vivo. Todos los resultados fueron contrastados contra un grupo control.



**Figura 2. Comparación en los porcentajes de fluorescencia de P-selctina-CD62 PE en pacientes con diagnóstico de dengue y plaquetas estimuladas con las proteínas virales.** Los pacientes con diagnostico positivo a DENV fueron clasificados de acuerdo a los días de evolución de la enfermedad. Se estimularon plaquetas de donadores con las diferentes proteínas virales y comparar con los casos in-vivo. Todos los resultados fueron contrastados contra un grupo control.

### 3.2 Evaluación de la citocinas en pacientes con diagnostico positivo a dengue.

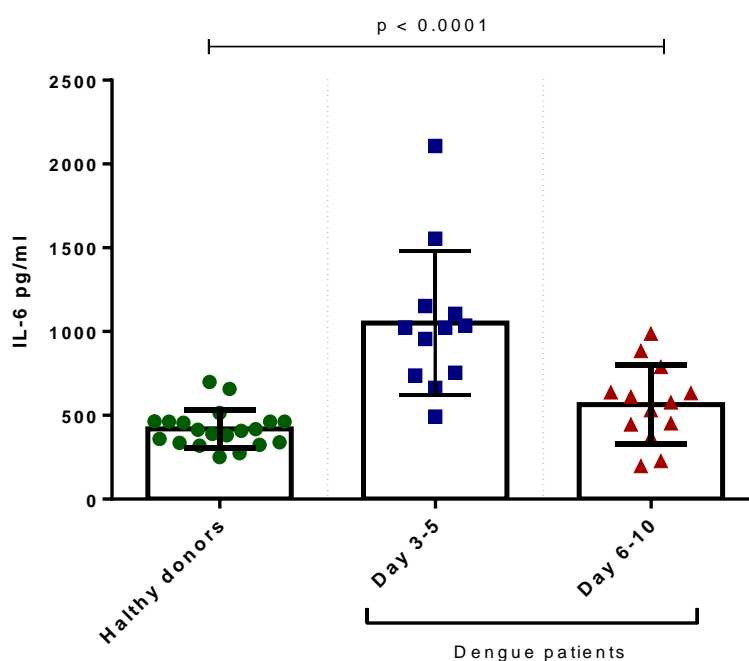
Los pacientes con dengue muestran síntomas febriles durante el pico de viremia, que aparecen durante el tiempo en que el virus y la proteína NS1 de DENV se liberan a la circulación. Una de las complicaciones más comunes en los pacientes con dengue es la respuesta inflamatoria que desencadena daño endotelial y activación plaquetaria en pacientes enfermos lo que sugiere que en las manifestaciones de enfermedad grave por el virus de dengue, los componentes de la respuesta inmunitaria del huésped, incluidas las células, los

complementos de citocinas y otros mediadores celulares, pueden servir como biomarcadores de enfermedades graves. Por este motivo, se evaluaron concentraciones de citocinas circulantes: IL-6 e IL-8 como citocinas inflamatorias, biomarcadores protrombóticos: dímero D, PAI-1 y citocinas de adhesión P-selectina, PSGL-1 y Factor tisular en muestras de plasma de pacientes infectados con DENV y un grupo de donantes sanos. Para todas las comparaciones el grupo de pacientes con diagnóstico positivo a DENV fue dividido de acuerdo a los días de evolución de la enfermedad, los resultados se expresan en media  $\pm$  SD y se consideró significativo un valor de  $p$  menor a 0.05.

### 3.4 Evaluación de citocinas inflamatorias en pacientes con dengue.

#### 3.4.1 IL-6.

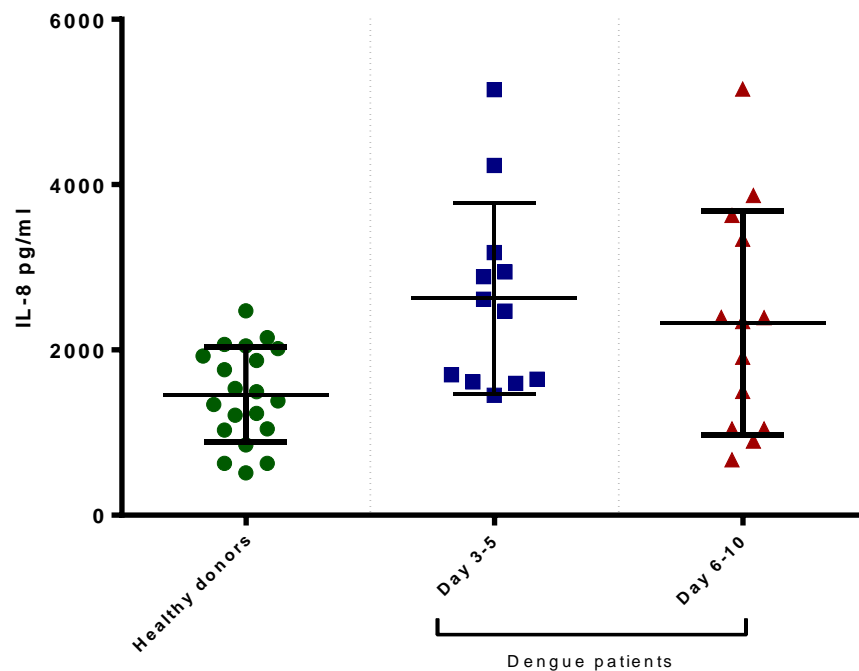
Los resultados obtenidos mostraron una mayor concentración de IL-6 en el grupo de dengue agudo con evolución temprana (3-5 días)  $1051 \pm 430.9$  pg/ml en comparación al grupo con evolución tardía (6-10 días)  $565 \pm 234.1$  pg/ml, y al grupo de donadores sanos  $419.5 \pm 112.8$  pg/ml. Los resultados se muestran en la figura 3.



**Figura 3. Comparación de las concentraciones plasmáticas de IL-6 en pacientes con DENV de acuerdo a los días de evolución.** El grupo de donantes sanos y el grupo de dengue con evolución de 6-10 días mostraron concentraciones de IL-6 similares. Los niveles plasmáticos de IL-6 aumentaron en el grupo de dengue con evolución temprana (3-5 días) (ANOVA  $p < 0,001$ ).

### 3.4.2 IL-8.

Los resultados obtenidos mostraron una ligera elevación en la concentración de IL-8 en el grupo de dengue agudo con evolución temprana (3-5 días)  $2623 \pm 1157$  pg/ml en comparación al grupo con evolución tardía (6-10 días)  $2322 \pm 1355$  pg/ml, y al grupo de donadores sanos  $1460 \pm 569.7$  pg/ml. Los resultados se muestran en la figura 4.



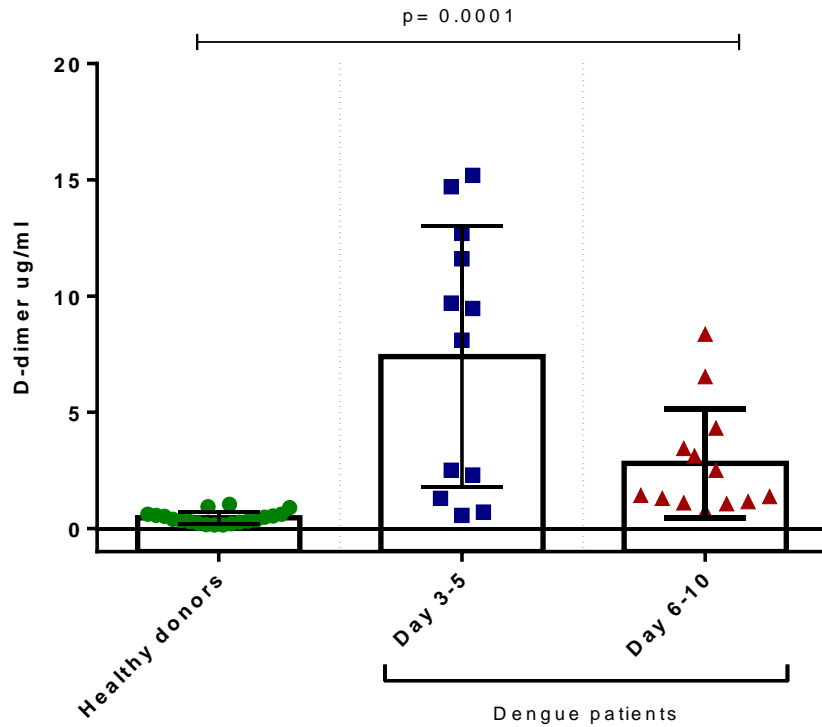
**Figura 4. Comparación de las concentraciones plasmáticas de IL-8 en pacientes con DENV de acuerdo a los días de evolución.** Los grupos de mostraron concentraciones de IL-6 similares. Los

niveles plasmáticos de IL-8 similares los cuales estaban incrementados en comparación con el grupo control. (ANOVA  $p < 0,006$ ).

### **3.5 Evaluación de marcadores trombóticos en pacientes con dengue.**

#### **3.5.1 Dímero-D**

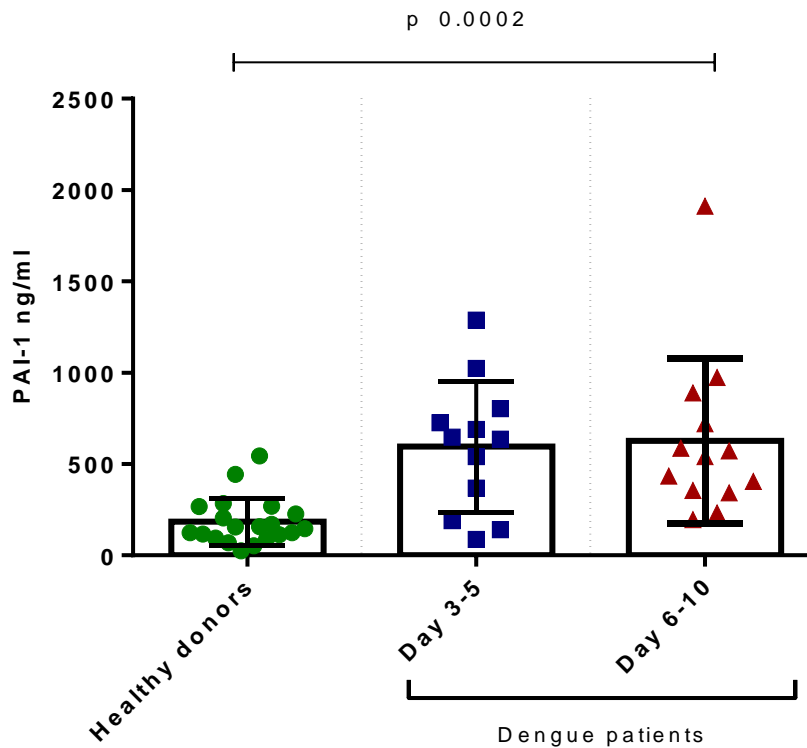
El sello distintivo de la progresión al dengue grave es el aumento de la permeabilidad vascular. Si no se atiende puede volverse lo suficientemente grave como para causar un compromiso circulatorio y shock, así como anomalías de la coagulación debido a la pérdida de plaquetas y factores de coagulación en el tercer espacio. Esto generalmente no causa cuadros de hemorragia importante, pero cuando se asocia con shock por enfermedad grave, la hipoxia y otras patologías a menudo conduce a coagulación intravascular diseminada y falla orgánica múltiple. El dengue hemorrágico, resulta en una combinación de trombocitopenia asociada con la prolongación tanto del TP como del TTPA que invariablemente se asocia con un aumento en los productos de degradación de la fibrina (FDP) y el dímero D. Nuestros resultados mostraron un incremento en los niveles plasmáticos de Dímero-D en el grupo de evolución temprana (3-5 días)  $7.40 \pm 5.63 \mu\text{g/ml}$  y en el grupo de evolución tardía (6-10 días)  $2.80 \pm 2.35 \mu\text{g/ml}$  al compararlos contra el grupo de voluntarios sanos  $0.45 \pm 0.26 \mu\text{g/ml}$ . Los resultados se muestran en la figura 5.



**Figura 5. Comparación de las concentraciones plasmáticas de dímero DENV según la evolución de la enfermedad.** Se observa un aumento en las concentraciones plasmáticas de dímero D en pacientes infectados con DENV. En grupo de evolución temprana (3-5 días) mostró concentraciones superiores al grupo de evolución tardía (6-10 días) y el grupo control. (ANOVA  $p < 0.0001$ )

### 3.5.2 PAI-1

La actividad del sistema fibrinolítico está regulada, entre otros, por el inhibidor del activador del plasminógeno tipo I (PAI-1), cuyos niveles pueden aumentar considerablemente durante las reacciones de fase aguda de una infección. Los resultados que obtuvimos muestran un aumento significativo en los grupos de pacientes con infección por DENV. El grupo de infección temprana (3-5 días) con  $594.8 \pm 359.3$  ng/ml y el grupo con infección tardía (6-10 días)  $627.6 \pm 451.3$  ng/ml en comparación al grupo de donadores sanos que presento una concentración de  $183.7 \pm 129.1$  ng/ml. Los resultados se muestran en la figura 6.

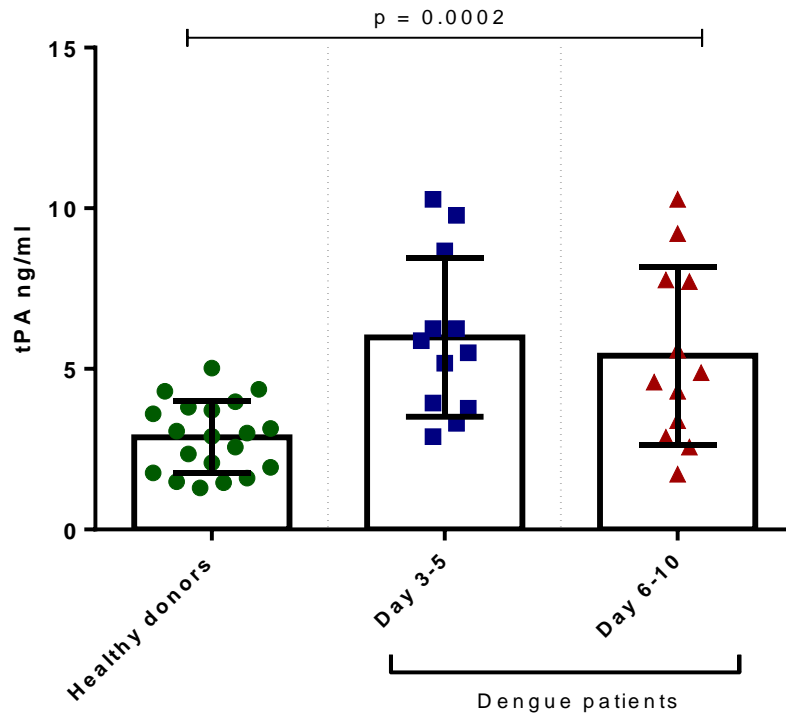


**Figura 6. Concentraciones plasmáticas de PAI-1 en pacientes con DENV.** Las concentraciones plasmáticas de PAI-1 aumentaron significativamente en pacientes con infección por DENV. Los resultados se compararon con un grupo de donantes sanos (ANOVA p 0.0002).

### 3.6 Activador tisular del plasminógeno.

Las células endoteliales pueden sintetizar y secretar varias moléculas diferentes relacionadas con la regulación de la hemostasia, incluido el activador del plasminógeno tisular (tPA) y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI), que son muy importantes en el control de la fibrinólisis. El tPA puede activar el plasminógeno a plasmina que se encarga de degradar a la fibrina. Es bien sabido que la regulación controlada de la biosíntesis de tPA y PAI-1 en las células endoteliales es muy importante para asegurar el mantenimiento adecuado de la hemostasia. Por lo cual se evaluaron las concentraciones de tPA en pacientes con infección por DENV de acuerdo al periodo de evolución. Al igual que en PAI-1 se encontraron valores

incrementados en los grupos de infección por dengue: grupo 3-5 días de evolución  $5.97 \pm 2.46$  ng/ml y grupo 6-10 de evolución  $5.40 \pm 2.75$  ng/ml en comparación al grupo control  $2.87 \pm 1.11$  ng/ml. Los resultados se observan en la figura 7.



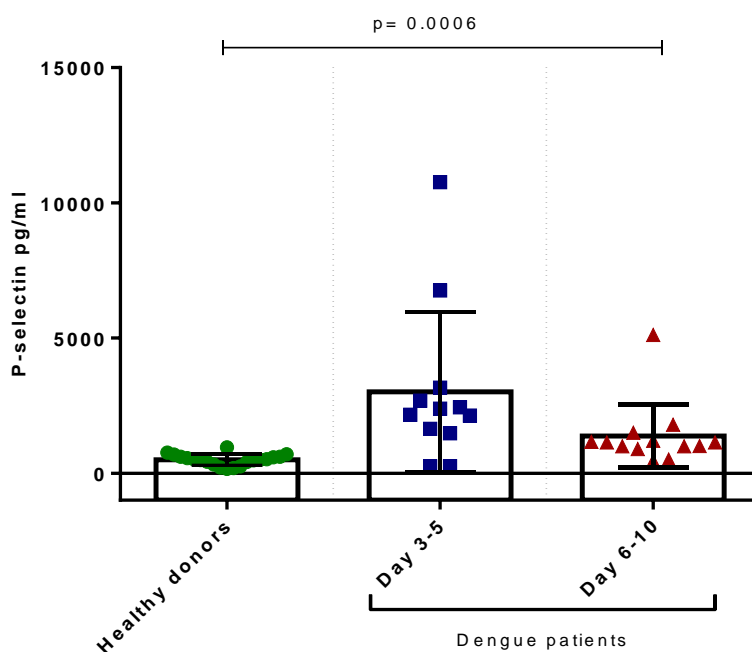
**Figura 7. Concentraciones plasmáticas de tPA en pacientes con DENV.** Las concentraciones plasmáticas de tPA aumentaron significativamente en pacientes con infección por DENV. Los resultados se compararon con un grupo de donantes sanos (ANOVA p 0.0002).

### 3.7 Evaluación de moléculas de adhesión en pacientes con dengue.

#### 3.7.1 P-Selectina

Las moléculas de adhesión que expresan las plaquetas, incluida la P-selectina, facilitan las interacciones de estas células con muchos efectores celulares. Se evaluaron las concentraciones de P-selectina plasmática en los pacientes con diagnóstico de DENV, en ambos grupos encontramos concentraciones elevadas (grupo 3-5 días:  $3011 \pm 2953$  pg/ml,

grupo 6-10 días:  $1378 \pm 1175$  pg/ml) en comparación al grupo control ( $496.2 \pm 204$  ng/ml). Los resultados se muestran en la figura 8.

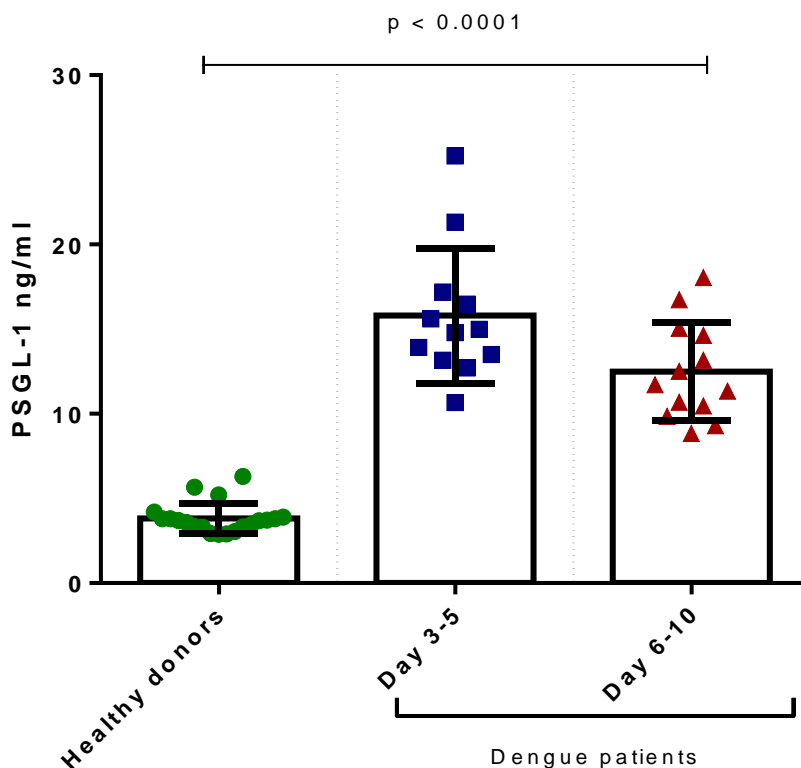


**Figura 8. Concentraciones plasmáticas de P-selectina en pacientes con DENV.** Las concentraciones plasmáticas de P-selectina aumentaron significativamente en pacientes con infección por DENV. Los resultados se compararon con un grupo de donantes sanos (ANOVA  $p = 0.0006$ ).

### 3.7.2 PSGL-1

Uno de los constituyentes de los gránulos alfa, que es expresado en la superficie de las plaquetas activadas, es la P-selectina, una molécula de adhesión que interacciona con la glicoproteína ligando de P-selectina (PSGL-1) expresado por las células inmunes. Esto media la adhesión de plaquetas activadas a monocitos, neutrófilos y linfocitos, formando complejos leucocitos-plaquetas que promueven el rodado y detención de los leucocitos sobre la superficie de las plaquetas adherentes causando la inflamación vascular. La interacción de la P-selectina plaquetaria con PSGL-1 es crucial para la activación del endotelio. Los resultados

que observamos confirman que los pacientes con infección por el virus de dengue expresan una mayor concentración plasmática de PSGL-1: grupo 3-5 días  $15.80 \pm 3.98$  ng/ml, grupo 6-10 días  $12.48 \pm 2.89$  ng/ml en comparación al grupo de donadores sanos que expresan concentraciones de:  $3.82 \pm 0.90$  ng/ml. Los resultados se observan en la figura 9.

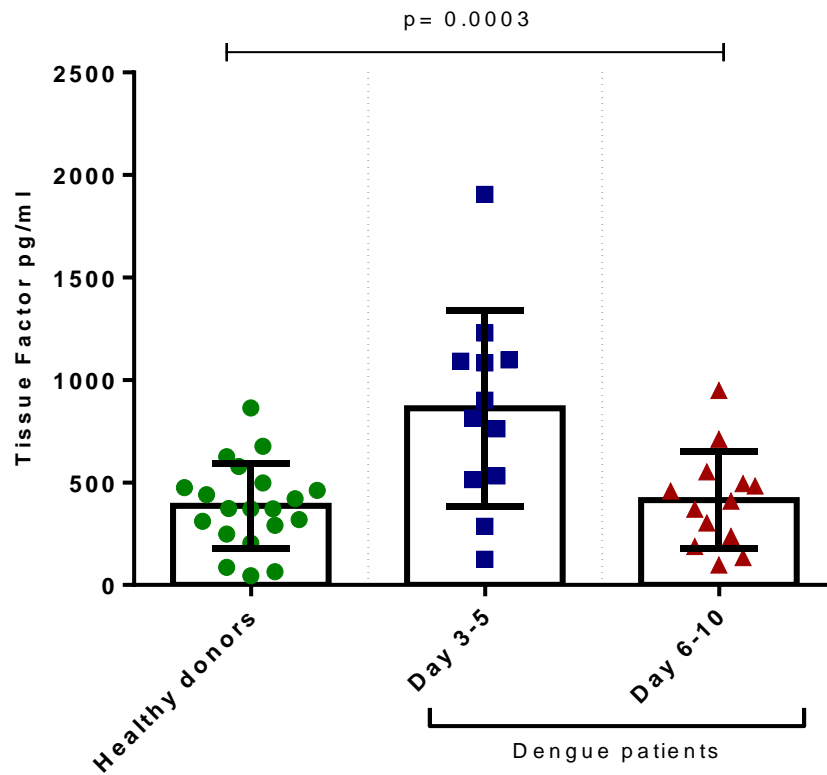


**Figura 9. Concentraciones plasmáticas de PSGL-1 en pacientes con DENV.** Las concentraciones plasmáticas de PSGL-1 aumentaron significativamente en pacientes con infección por DENV. Los resultados se compararon con un grupo de donantes sanos (ANOVA  $p < 0.0001$ ).

### 3.7.3 Factor tisular

Varias infecciones por virus activan la cascada de la coagulación mediante la inducción de la expresión del factor tisular (TF) en las células diana. Por tal motivo se evaluaron los niveles plasmáticos del TF en pacientes con infección por DENV. El grupo de infección temprana mostró concentraciones más elevadas de TF ( $862.0 \pm 476.8$  pg/ml) a diferencia del grupo de

evolución tardía ( $414.3 \pm 238.5$  pg/ml) que presentó concentraciones similares a las del grupo de donadores sanos ( $386.4 \pm 207.5$  pg/ml), los resultados se muestran en la figura 10.



**Figura 10. Comparación de las concentraciones plasmáticas de dímero Factor Tisular según la evolución de la enfermedad.** Se observa un aumento en las concentraciones plasmáticas de TF en pacientes infectados con DENV. En grupo de evolución temprana (3-5 días) mostró concentraciones superiores al grupo de evolución tardía (6-10 días) y el grupo control. (ANOVA  $p = 0.0003$ )

#### 4. Discusión

Se ha demostrado que las plaquetas son células clave involucradas en la inmunorregulación de la enfermedad del dengue, ya que la activación plaquetaria no solo lleva a cabo mediante interacciones directas con los virus. Los mecanismos de defensa del huésped en respuesta a infecciones virales también pueden conducir a la activación plaquetaria. Por ejemplo, muchas infecciones virales provocan inflamación sistémica, que a su vez desencadena la activación de las plaquetas y reduce la vida útil de las mismas. Los casos de dengue severo muestran características particulares como tormenta de citocinas, alteraciones hematológicas y disfunción endotelial (Daisy Vanitha John, 2015). Estos biomarcadores propios de la respuesta inmunológica del hospedero pueden servir como indicadores de severidad de la enfermedad (Green Sharon, 2006).

Diferentes estirpes celulares se activan en la infección por el virus del dengue; sin embargo, su función en la respuesta contra el patógeno in vivo no es del todo clara. La actividad de las plaquetas y su participación en la respuesta inmunológica se ha abordado previamente. En nuestro estudio confirmamos que la expresión de  $\alpha$ IIb $\beta$ III y P-selectina en la superficie de las plaquetas se encontraba en mayor proporción en el grupo de pacientes que presentaban un cuadro de infección temprana por DENV (infección aguda) en contrastarse con pacientes que se encontraban entre los días 6 a 10 posteriores al inicio de síntomas y los donadores sanos. La comparación también se llevó a cabo contra plaquetas de donadores estimuladas con las proteínas virales NS1 full, NS1 wing, NS1 mutante y NS1  $\beta$ -ladder, los resultados mostraron una expresión similar de los porcentajes de los marcadores de activación al compararlos contra el grupo con infección aguda, lo cual correlaciona con la presencia de la proteína NS1 en circulación, la cual se puede detectar a partir del primer día de la aparición de los síntomas de la enfermedad y durante los primeros 5 días después del inicio de los síntomas, posteriormente, NS1 disminuye gradualmente (Malavige & Ogg, 2017) .

La activación plaquetaria en personas infectadas por el virus de dengue, confirma nuestros ensayos in vitro y la participan de estas células en la respuesta contra el virus (Trugilho 2017). La activación plaquetaria conlleva a la apoptosis y posterior aclaramiento de estas células por parte de células especializadas. Este proceso puede estar asociado a la trombocitopenia observada en pacientes con infección por dengue los primeros días de la infección, periodo

en el cual el proceso inflamatorio es más fuerte (Sridhar, Sunil Kumar, Rau, & Rau, 2017), nuestros resultados muestran disminución en el número de plaquetas en los primeros 5 días de la infección, que se normalizan a valores normales conforme el paciente se va recuperando, estos datos correlacionan con los reportados por Ojha A y cols, donde determinaron la severidad de la trombocitopenia en pacientes con dengue de acuerdo a los días de evolución de la enfermedad (Ojha et al., 2017).

La activación de células dendríticas y macrófagos, principales dianas del dengue, estimula la liberación de citocinas inflamatorias como la IL-6 e IL-8 que funcionan como moléculas quimioatrayentes (human dendritic cells). La activación de linfocitos T resulta en la producción de IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 entre otras, contribuyendo a esta tormenta de citocinas (t cells responses 2006) que contribuye a una activación plaquetaria indirecta. En nuestro estudio encontramos concentraciones plasmáticas elevadas de IL-6 e IL-8 en pacientes que cursaban los primeros días de la infección con DENV. Las IL-6 e IL-8 son citocinas multifuncionales que actúa sobre diferentes células diana para inducir una variedad de respuestas biológicas que involucran la regulación inmune y la transducción de señales [19]. Nuestro estudio indica que los niveles de IL-6 en plasma correlacionan con la progresión clínica de la enfermedad. Los resultados mostraron que el nivel de expresión de IL-6 en pacientes con dengue agudo dentro de los primeros 3-5 días de la infección fue significativamente más alto que en pacientes con un cuadro tardío de dengue y controles sanos, también observamos niveles incrementados de IL-8 en los primeros días de la infección por dengue, comparados contra aquellos que cursaban con una infección tardía y el grupo control, lo anterior indica que el proceso inflamatorio tiene un pico dentro de los primeros 5 días de iniciados los síntomas en la enfermedad por el virus de dengue, lo que correlaciona con el tiempo que se encuentra en circulación la proteína NS1 de DENV y los marcadores inflamatorios comienzan a disminuir en plasma una vez que la proteína viral también lo hace, lo que podría explicar por qué la trombocitopenia e hiper reactividad plaquetaria se ve con mayor frecuencia dentro de los primeros días de evolución de la enfermedad.

P-selectina es una glicoproteína almacenada en los  $\alpha$ -gránulos de plaquetas que se transloca a la superficie y se libera en suspensión durante la activación plaquetaria. Es la principal

molécula de adhesión responsable de la interacción de las plaquetas con los monocitos, y se han detectado agregados de monocitos plaquetarios circulantes en pacientes con dengue. Observamos concentraciones plasmáticas de la glicoproteína P-selectina y de su receptor PSGL-1 elevadas en ambos grupos de estudio al compararse el grupo control. Elevaciones en las concentraciones de P-selectina y la fracción soluble de su ligando, reflejan un estado inmunológico activo y altas concentraciones correlacionan con un estado grave de la infección. Además, indican un estado de hiper activación plaquetaria y confirman la participación de estas células en la respuesta inflamatoria y hemostática (Huang 2019).

A la par de la tormenta de citocinas y el estado exacerbado inflamatorio, los estados graves de la enfermedad cursan con alteraciones hematológicas, disrupciones de la hemostasia y de los procesos fibrinolíticos. Nuestros resultados muestran concentraciones de Factor tisular (FT) elevado en ambos grupos de acuerdo al tiempo de evolución de la enfermedad. La expresión de FT en plasma se considera como un marcador de activación y lesión endotelial lo cual es una marcada característica de la gravedad de la infección por virus de dengue (Gulati, 2016). Los monocitos activados también son capaces de expresar factor tisular y se ha reportado su relación en pacientes con dengue severo (Deazeredo 2010).

De acuerdo a los resultados obtenidos es posible observar una desregulación del estado fibrinolítico en pacientes que cursaban con infección activa por el virus de dengue, las concentraciones plasmáticas elevadas del activador del plasminógeno tisular (tPA) y del inhibidor del activador del plasminógeno tisular (PAI-1) confirman alteraciones hemostáticas y lesión endotelial que se pueden asociar el estado de gravedad de los pacientes, así como con posibles complicaciones en el curso de la enfermedad. Previamente otros grupos han reportado alteraciones similares, donde reportan niveles de PAI-1 y tPA elevados en pacientes con fiebre hemorrágica (Huang Y. 2003), estados fibrinolíticos alterados pueden converger en la aparición de productos de degradación de fibrina, los cuales indican un estado de coagulación activo en respuesta a la lesión endotelial y hemorrágica observada en la infección por virus de dengue.

El dengue hemorrágico se asocia con un aumento de la permeabilidad vascular, trombocitopenia y pérdida de factores de coagulación lo cual puede provocar un proceso

hemorrágico inicial debido a la trombocitopenia y posteriormente coagulación intravascular diseminada (CID) como un evento terminal. Un marcador sensible de CID temprano es la presencia de dímero D (DD) en la circulación. Observamos elevación en las concentraciones de Dímero-D en ambos pacientes con dengue independientemente del tiempo de evolución al ser comparados con el grupo control, la presencia de dímero D (DD) indica la activación del sistema de coagulación resultante de la destrucción de la fibrina y refleja la formación de coágulos y su lisis. La detección de DD en la etapa febril de la infección por dengue puede ser beneficiosa para predecir el curso clínico de la enfermedad y ayudar a los médicos a predecir la gravedad de la infección por dengue antes de que los pacientes progresen a una etapa grave.

## **5. Conclusión.**

Los resultados obtenidos en la expresión de citocinas inflamatorias y trombóticas en pacientes infectados con DENV observamos una mayor expresión durante la fase aguda, lo que concuerda con el tiempo de circulación de la proteína NS1 en el organismo, por otro lado los resultados in vitro son similares a los que observamos en pacientes en fase aguda. Los niveles incrementados de citocinas inflamatorias y pro trombóticas al inicio de la infección pueden ser marcadores de pronóstico para la progresión a Dengue grave y parecen desempeñar un papel en la patogénesis de la enfermedad.

## **6. Referencias**

- Akey, A. D. L., Brown, W. C., Dutta, S., Konwerski, J., & Jose, J. (2014). Flavivirus NS1 crystal structures reveal a surface for membrane association and regions of interaction with the immune system. *Science*, *343*(6173), 1–31.  
<https://doi.org/10.1126/science.1247749>.Flavivirus
- Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., & Flamand, M. (2002).

- Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 376–381. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.02.376-381.2002>
- Azeredo, E. L. De, Monteiro, R. Q., & Pinto, L. M. (2015). Thrombocytopenia in Dengue : Interrelationship between Virus and the Imbalance between Coagulation and Fibrinolysis and Inflammatory Mediators, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/313842>
- Calvert, J. K., Helbig, K. J., Dimasi, D., Cockshell, M., Beard, M. R., Pitson, S. M., ... Carr, J. M. (2015). Dengue Virus Infection of Primary Endothelial Cells in Endothelial Cells Function and Is Restricted by Interferon-Stimulated Responses, 00(00), 1–12. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0195>
- Chabert, A., Hamzeh-cognasse, H., Pozzetto, B., Cognasse, F., Schattner, M., Gomez, R. M., & Garraud, O. (2015). Human platelets and their capacity of binding viruses : meaning and challenges ? *BMC Immunology*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0092-1>
- Chao, C., Wu, W., Lai, Y., & Tsai, P. (2019). Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4 , leading to thrombocytopenia and hemorrhage, 1–26.
- Conde, J. N., Silva, E. M., Barbosa, A. S., & Mohana-Borges, R. (2017). The complement system in flavivirus infections. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00213>
- Danon, D., Jerushalmy, Z., & De Vries, A. (1959). Incorporation of influenza virus in human blood platelets in vitro. Electron microscopical observation. *Virology*, 9, 719–722.
- Edeling, M. A., Diamond, M. S., & Fremont, D. H. (2014). Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(11), 4285–4290. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322036111>
- Guo, C., Zhou, Z., Wen, Z., Liu, Y., Zeng, C., Xiao, D., ... Yang, G. (2017). Global

- epidemiology of dengue outbreaks in 1990–2015: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(JUL), 1–11.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00317>
- Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 1–26.  
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., ... Pelegrino, J. L. (2010). Dengue : a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12), S7–S16. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2460>
- 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>
- Hayes, C., Kitahara, S., & Tcherniantchouk, O. (2014). Decreased threshold of aggregation to low-dose epinephrine is evidence of platelet hyperaggregability in patients with thrombosis. *Hematology Reports*, 6(3), 45–50. <https://doi.org/10.4081/hr.2014.5326>
- Hottz, E. D., Lopes, J. F., Freitas, C., Valls-de-Souza, R., Oliveira, M. F., Bozza, M. T., ... Bozza, P. T. (2013). Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-in fl ammasome activation. *Blood*, 122(20), 3405–3415.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-504449.F.A.B.>
- Huang, J., Li, X., Shi, X., Zhu, M., Wang, J., Huang, S., ... Jin, J. (2019). Platelet integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ : Signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. *Journal of Hematology and Oncology*, 12(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0709-6>
- Kim, Y. C., López-Camacho, C., Garcia-Larragoiti, N., Cano-Mendez, A., Hernandez-Flores, K. G., Domínguez-Alemán, C. A., ... Reyes-Sandoval, A. (2019). Development of an E2 ELISA methodology to assess chikungunya seroprevalence in patients from an endemic region of Mexico. *Viruses*, 11(5).  
<https://doi.org/10.3390/v11050407>
- Krishnamurti, C., Peat, R. A., Cutting, M. A., & Rothwell, S. W. (2002). Platelet adhesion

- to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(4), 435–441. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.435>
- Lai, Y. C., Chuang, Y. C., Liu, C. C., Ho, T. S., Lin, Y. S., Anderson, R., & Yeh, T. M. (2017). Antibodies Against Modified NS1 Wing Domain Peptide Protect Against Dengue Virus Infection. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07308-3>
- López, A., & Macaya, C. (2013). Plaqueta : fisiología de la activación y la inhibición. *Revista Española de Cardiología*, 13, 2–7.
- Malavige, G. N., & Ogg, G. S. (2017). Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology*, 151(3), 261–269. <https://doi.org/10.1111/imm.12748>
- Martin, A. C., Zlotnik, D., Bonete, G. P., Baron, E., Decouture, B., Belleville-Rolland, T., ... Bachelot-Loza, C. (2020). Epinephrine restores platelet functions inhibited by ticagrelor: A mechanistic approach. *European Journal of Pharmacology*, 866, 172798. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172798>
- Modhiran, N., Watterson, D., Blumenthal, A., Baxter, A. G., Young, P. R., & Stacey, K. J. (2017). Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. *Immunology and Cell Biology*, (December 2016), 1–5. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.5>
- Modhiran, N., Watterson, D., Muller, D. A., Panetta, A. K., Sester, D. P., Liu, L., ... Young, P. R. (2015). Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Science*, 7(304).
- Mourão, M. P. G., Lacerda, M. V. G., Macedo, V. O., & Santos, J. B. (2007). Thrombocytopenia in patients with dengue virus infection in the Brazilian Amazon. *Platelets*, 18(8), 605–612. <https://doi.org/10.1080/09537100701426604>
- Ojha, A., Nandi, D., Batra, H., Singhal, R., Annarapu, G. K., Bhattacharyya, S., ... Guchhait, P. (2017). Platelet activation determines the severity of thrombocytopenia in dengue infection. *Scientific Reports*, 7(December 2016), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep41697>

- Rastogi, M., Sharma, N., & Singh, S. K. (2016). Flavivirus NS1 : a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal*, *13*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>
- Reyes-sandoval, A., & Ludert, J. E. (2019). The Dual Role of the Antibody Response Against the Flavivirus Non-structural Protein 1 ( NS1 ) in Protection and, *10*(July), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01651>
- 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>
- Simon, A. Y., Sutherland, M. R., & Pryzdial, E. L. G. (n.d.). Dengue virus binding and replication by platelets.
- Simon, A. Y., Sutherland, M. R., & Pryzdial, E. L. G. (2015). Dengue virus binding and replication by platelets. *Blood*, *126*(3), 378–385. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-598029>.The
- Sridhar, A., Sunil Kumar, B. M., Rau, A., & Rau, A. T. K. (2017). A Correlation of the Platelet Count with D-Dimer Levels as an Indicator for Component Therapy in Children with Dengue Hemorrhagic Fever. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. <https://doi.org/10.1007/s12288-016-0686-7>
- Sutherland, M. R., Simon, A. Y., Serrano, K., Schubert, P., Acker, J. P., & Pryzdial, E. L. G. (2016). Dengue virus persists and replicates during storage of platelet and red blood cell units. *Transfusion*, *56*(5), 1129–1137. <https://doi.org/10.1111/trf.13454>
- Yeaman, M. R. (2014). Platelets : at the nexus of antimicrobial defence. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(6), 426–437. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3269>
- Yen, L.-C., Liao, J.-T., Lee, H.-J., Chou, W.-Y., Chen, C.-W., Lin, Y.-L., & Liao, C.-L. (2016). The C-Terminus of the Core beta-Ladder domain in Japanese Encephalitis Virus Nonstructural Protein 1 Is Flexible for Accommodation of Heterologous Epitope Fusion. *Journal of Virology*, *90*(3), 1178–1189. <https://doi.org/10.1128/JVI.02057-15>
- Young Chan Kim, Cesar Lopez-Camacho, Nallely Garcia-Larragoiti, Martha Eva Viveros-Sandoval, A. R. S. (2020). Production and Purification of Zika Virus NS1 Glycoprotein in HEK293 Cells. In *Zika Virus: Methods and Proto cols, Methods in*

*Molecular Biology* (pp. 93–102). <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0581-3>

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).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002858>

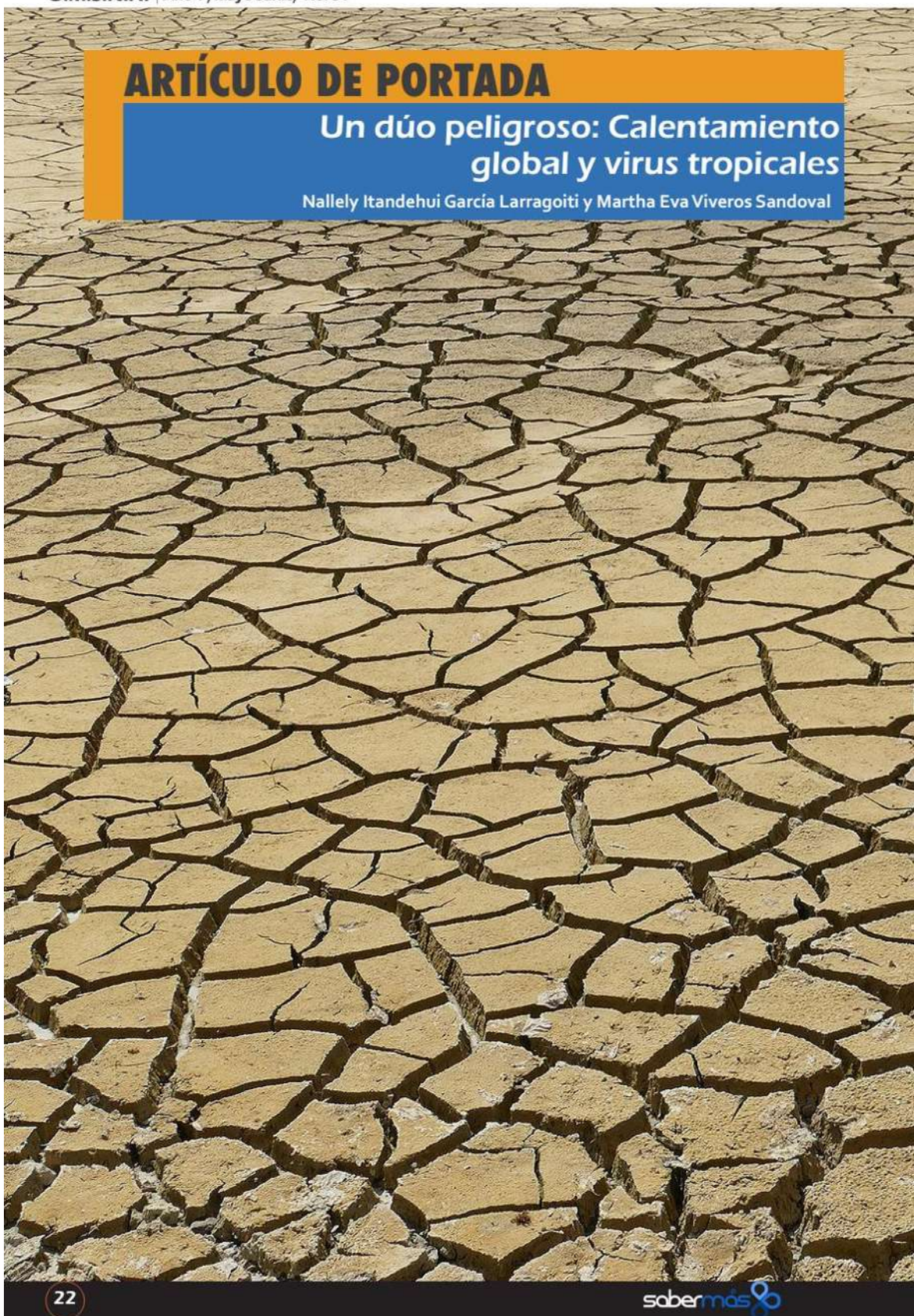
## CAPITULO IV

*Un dúo peligroso: Calentamiento global y virus tropicales*

## ARTÍCULO DE PORTADA

### Un dúo peligroso: Calentamiento global y virus tropicales

Nallely Itandehui García Larragoiti y Martha Eva Viveros Sandoval



**E**n los últimos años se han hecho evidentes los efectos del **calentamiento global**, pero sus consecuencias van mucho más allá del hecho de que el comportamiento meteorológico atípico sea más recurrente o que las alteraciones en el medio ambiente sean más palpables. El fenómeno del calentamiento global está modificando el comportamiento de distintas especies, su distribución geográfica e incluso su código genético. Mientras la mayoría padecemos los estragos del aumento de la temperatura, para algunas especies, como es el **caso de algunos virus, resulta especialmente favorecedor** permitiéndoles expandirse a regiones más altas o con condiciones climatológicas extremas.

#### **Pero, primero entendamos ¿Qué es el cambio climático?**

Hasta hace algunas décadas, el cambio climático era un tema que se discutía únicamente en foros científicos y laboratorios especializados; no obstante, hoy en día se ha convertido en un **tema cotidiano** que acapara portadas de periódicos, programas en televisión y sobre todo en redes sociales. Es motivo de elaboración de acuerdos internacionales para aminorar sus efectos y también de discusiones acaloradas entre mandatarios, científicos y activistas, se convirtió en un tema de moda del que muchos opinan **pero realmente pocos conocen**.

La organización Greenpeace define a el cambio climático como la mayor amenaza medioam-

biental a la que se enfrenta la humanidad, mientras que la Organización Mundial de la Salud (OMS), la describe como una serie de alteraciones que influye en los determinantes sociales y medioambientales de la salud.

La evidencia científica reporta un aumento en la temperatura media mundial de 1.1 °C desde la época preindustrial, y en los peores escenarios, la temperatura podría aumentar hasta **4.8 °C para final de este siglo**.

A pesar de esto, es importante recordar que el cambio climático no se refiere solo a un aumento en las temperaturas medias globales y sus efectos sobre las precipitaciones pluviales —fenómenos meteorológicos extremos como tormentas y huracanes, que son importantes tanto para el ser humano como para las actividades que realiza como las agrícolas—, sino que también tiene **repercusiones en la salud**. Es precisamente este último punto el tema del presente artículo, en el que describimos cómo el cambio climático influye en las enfermedades transmitidas por vectores o enfermedades tropicales.

#### **Enfermedades tropicales, sus vectores y el cambio climático**

Las enfermedades transmitidas por vectores o enfermedades tropicales representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas, y **provocan cada año más de setenta mil muertes**. Estas enfermedades están estrechamente relacio-



[https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/styles/normalresponsive/public/viralinfection-mosquitoes-cover-pic.jpg?itok=\\_Elt3Vak](https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/styles/normalresponsive/public/viralinfection-mosquitoes-cover-pic.jpg?itok=_Elt3Vak)



nadas con variaciones en la temperatura, de hecho, a la mayoría de ellas se les conoce como **enfermedades tropicales**, y como su nombre lo indica, un clima tropical trae consigo un aumento de los vectores que las transmiten.

Según la OMS, **los vectores son organismos vivos** capaces de transmitir enfermedades infecciosas entre personas, o de animales a personas. Muchos de esos vectores son **insectos hematófagos**, es decir, que ingieren los microorganismos patógenos como parásitos, bacterias o virus, junto con la sangre de un portador infectado y posteriormente los transfieren a un nuevo portador al alimentarse de su sangre.

Los mosquitos son los vectores de enfermedades mejor conocidos, y aunque cueste creerlo, son **asesinos implacables**. De hecho, se encuentran clasificados entre los animales más letales del mundo, debido a que pueden infectarse con virus peligrosos u otros organismos y transmitirlos a través de una picadura. Se sabe que los mosquitos que transmiten estas enfermedades son extremadamente sensibles a la temperatura, y que su ciclo de

vida y reproducción dependen de diversos factores como la lluvia, la posición geográfica e incluso la urbanización.

Hoy en día se sabe que existen cientos de virus que se transmiten por picaduras de mosquitos, de los cuales unos treinta son conocidos por causar enfermedades en seres humanos. Entre todos ellos, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son los mosquitos más importantes como vectores de enfermedades tropicales.

#### ***Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* ¿Qué hacemos con ellos?**

Estas dos especies de mosquitos son los responsables de transmitir enfermedades virales infecciosas como Dengue, Zika, Chikungunya y Fiebre amarilla, las cuales causan millones de muertes anuales en todo el mundo. El aumento en la prevalencia de estas enfermedades en numerosas regiones del planeta, constituye ejemplo claro de asociación entre el cambio climático y sus efectos sobre la salud humana.

La **expansión de estos dos vectores** a zonas geográficas cada vez más al norte, está ocasionando una creciente preocupación y las predicciones a futuro hechas por modelos matemáticos no son alentadoras, ya que se estima que para 2030 y 2050, ambas especies se establecerán en nuevos hábitats y expandirán sus nichos ecológicos a medida que cambia el clima, lo cual originará un aumento exponencial en el número de infecciones y muertes causadas por estos virus. Se cree que la mitad de la población mundial estará expuesta a infecciones por estos virus en los próximos años.

#### ¿Los virus se pueden adaptar?

Cuando hablamos de adaptación o de cómo afecta el clima a estas enfermedades transmitidas por vectores, generalmente se hace referencia al mosquito que porta al virus; sin embargo, la **coevolución** entre los mosquitos y los virus debe ser analizada como un producto de diversos procesos fisiológicos.

Los virus son **organismos intracelulares** altamente desarrollados y eficientes, contienen un genoma de ARN o ADN que está protegido por una membrana proteica. Su propagación depende de las células que infecta ya que los virus son acelulares y carecen de la compleja maquinaria metabólica y biosintética de las células eucariotas o procariotas.



Por estas características, se ha discutido por mucho tiempo si los virus son seres vivos o no. A pesar de que no cumplen en el sentido estricto de la palabra con los cuatro postulados de la teoría celular para ser considerados "vivos", los virus están presentes en casi cualquier lugar del mundo y coexisten con todos los seres vivos.

Estos organismos han sido capaces de desarrollar interacciones duraderas y de gran éxito con sus anfitriones. **Tienen estrategias especializadas** dirigidas a maximizar la tasa de invasión, pueden seleccionar al hospedador de acuerdo a características que le permitan ampliar su ciclo de vida y la fertilidad. También hay evidencia de que una vez dentro del organismo hospedador, los virus utilizan métodos especializados para facilitar su replicación y evadir respuestas antivirales específicas que faciliten la transmisión confiable a la progenie.

Además, las características genómicas de los virus les permiten cambiar a través del tiempo; no obstante, esto no implica necesariamente el surgimiento de nuevas especies, sino mutaciones que pueden dar lugar a cambios en el comportamiento del virus.

En condiciones normales, la mayoría de estas variantes permanecen silenciadas o se expresan en frecuencias muy bajas, siempre y cuando el ambiente del que dependen siga siendo constante. Si estas condiciones se modifican, como sucede con el cambio climático, estas variantes comienzan a expresarse y a sustituir al genoma original.

**La variante del virus** que mejor se adapte a las nuevas condiciones se convertirá en la especie dominante y desplazará a su antecesora.

### ¿Qué podemos hacer al respecto?

En cualquier caso, está claro que el mundo está cambiando, que el cambio climático es una realidad y que es necesario entender la variabilidad de los virus, la interacción entre los vectores que los transmiten y su relación con las nuevas condiciones climatológicas.

El uso de energías renovables es una de las alternativas para **aminorar los efectos del cambio**

**climático**, así como prescindir de los combustibles contaminantes y sobre todo, fomentar una cultura de cuidado al medio ambiente. La tarea que tenemos por delante no será fácil, pero la amenaza latente de seres sumamente adaptables como los virus, los convierte en un factor más que se añade al grave problema entre los muchos retos que implica el cambio climático, una razón más para intentar frenarlo.



**Nallely Itandehui García Larragoiti**, es Estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina

Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.  
[garcia\\_larragoiti@hotmail.com](mailto:garcia_larragoiti@hotmail.com)



**Martha Eva Viveros Sandoval**, Profesora e Investigadora Titular del Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular en 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.  
[marthaevaviveros@yahoo.com.mx](mailto:marthaevaviveros@yahoo.com.mx)



Cavicchioli R., Ripple W.J., Timmis K.N. et al. (2019). Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, 17:569-586.  
<https://www.nature.com/articles/s41579-019-0222-5#citeas>

National Geographic en Español. (2007). El cambio climático precipita el aumento del dengue.

<https://www.ngenespanol.com/fotografia/cambio-climatico-precipita-aumento-del-dengue/>

OMS. (2003). Cambio climático y salud humana - Riesgos y respuestas, 38 p.  
<https://www.who.int/globalchange/publications/en/Spanishsummary.pdf?ua=1>

## 6. DISCUSIÓN GENERAL

La trombocitopenia es una manifestación muy común de la enfermedad por el virus de dengue. Puede producirse en la infección como consecuencia de la activación plaquetaria, sin embargo, la patogenia de la infección por el virus del dengue y su relación con las plaquetas no está por completo dilucidada (Mourão, Lacerda, Macedo, & Santos, 2007). En este estudio, producimos NS1 recombinante y los subdominios NS1  $\beta$ -ladder y NS1 wing, así como la proteína NS1 con la eliminación de  $\beta$ -roll (mutante NS1). Estas proteínas se han utilizado con éxito para estudios de seroprevalencia. A diferencia de otros estudios, nuestras proteínas NS1 se produjeron en un sistema de expresión de mamíferos basado en HEK293, una línea celular de riñón embrionario humano (Young Chan Kim, Cesar Lopez-Camacho, Arturo Reyes-Sandoval 2020). La expresión de proteínas en los sistemas de mamíferos asegura que estén presentes las modificaciones postraduccionales como la N-glicosilación (Kim et al., 2019) que no están presentes en las proteínas producidas por procariontes. En cuanto a la interacción de nuestras proteínas virales con las plaquetas, utilizamos plasma rico en plaquetas de donantes sanos seronegativos para arbovirus endémicos (dengue, chikungunya y Zika). El análisis de citometría de flujo indicó que la proteína DENV NS1, el dominio de wing, el dominio de  $\beta$ -ladder y la proteína NS1 mutante fueron capaces de inducir la expresión del receptor de P-selectina y el complejo heterodimérico  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 en la superficie de las plaquetas. El complejo  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 es el marcador más reconocido de activación plaquetaria y está estrictamente regulado mediante un proceso denominado "señalización expresión de adentro hacia afuera". La expresión de  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 en la membrana plaquetaria permite la interacción con sus diversos ligandos: fibrinógeno, factor von Willebrand, vitronectina y fibronectina, que a la inversa induce señales "de afuera hacia adentro" a través de la membrana plaquetaria lo que permiten la agrupación del complejo  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 durante la agregación plaquetaria. La unión del ligando a  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 y la agrupación de integrinas median las respuestas celulares que conducen a la propagación celular, la secreción granular de proteínas y mediadores que conducen a una mayor activación y agregación plaquetaria, así como a la interacción y activación de células endoteliales e inmunes (Huang et al., 2019). Anteriormente se había planteado la hipótesis de que la trombocitopenia puede deberse al consumo de plaquetas después de ser activadas durante el proceso de infección por DENV

(Krishnamurti, Peat, Cutting, & Rothwell, 2002). Estos resultados indican que la proteína NS1 y sus dominios participan activamente en la inmunopatogénesis del dengue al contribuir a la activación plaquetaria y al desarrollo del microambiente proinflamatorio en las manifestaciones graves de la infección por DENV. Curiosamente, fue el dominio NS1 wing el que produjo la mayor expresión de P-selectina como  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  en la superficie de las plaquetas. Se sabe por estudios cristalográficos que el dominio NS1 wing está compuesto por aminoácidos hidrófobos, lo que les confiere una característica positiva de asociación con la membrana celular además de presentar un bucle desordenado, que es un sitio antigénico expuesto a la superficie de contacto (Edeling et al., 2014). Además, hay pruebas de que los anticuerpos dirigidos contra el dominio NS1 wing actuaron como protectores contra la infección por DENV en ratones y se correlacionaron inversamente con la gravedad de la enfermedad (Lai et al., 2017). Esto podría explicar por qué las plaquetas que se incubaron con el dominio del wing expresaron un porcentaje más alto de marcadores de activación que las otras versiones de NS1. Estudios anteriores demostraron la capacidad de la proteína NS1 para inducir la agregación plaquetaria en presencia de dosis bajas de ADP. Nuestros resultados de agregación coinciden con los de Chao et al, (2019) que muestran que la proteína NS1 completa por sí sola no fue capaz de inducir la formación de agregados plaquetarios, sin embargo, induce un estado de hiperreactividad celular donde las plaquetas pueden agregarse cuando ADP se añade a una dosis por debajo del umbral necesario para producir una activación plaquetaria. Estudios anteriores evaluarón la respuesta de agregación plaquetaria usando un solo agonista: ADP (Chao, Wu, Lai, & Tsai, 2019), por lo que decidimos utilizar dosis mínimas de otros 2 agonistas plaquetarios conocidos: colágeno y EPI, ya que la estimulación de otros receptores en las plaquetas podría aportar nuevos conocimientos sobre las vías de activación plaquetaria en respuesta a DENV. Los resultados fueron similares a los obtenidos con el agonista ADP y la proteína NS1 completa, en presencia de dosis mínimas colágeno y EPI fueron capaces de inducir la formación de agregados plaquetarios. También se evaluó la capacidad de los dominios proteicos para inducir agregación plaquetaria. Sin embargo, a diferencia de la proteína NS1 completa, los dominios individuales no lograron inducir la formación de agregados de plaquetas en presencia de ADP o colágeno. Sin embargo, se obtuvo una respuesta de agregación robusta para los tres dominios individuales en presencia de una dosis mínima de EPI y los resultados fueron comparables a la agregación

observada en respuesta a NS1 completa. EPI es un agonista débil que promueve la activación plaquetaria a través de receptores adrenérgicos  $\alpha$ -2 acoplados a proteínas Gz en la superficie plaquetaria y puede inducir la exposición del receptor de fibrinógeno (Hayes, Kitahara, & Tcherniantchouk, 2014). En un estudio publicado recientemente se demostró que EPI fue capaz de restaurar la capacidad de agregación en plaquetas inhibidas con ticagrelor e indujo una agregación estable a través de la inhibición de la vía cAMP y la activación de la vía PI3K (Martin et al., 2020), lo que podría explicar la agregación plaquetaria que observamos con el dominio viral. Las plaquetas se activan y participan en la defensa inmune innata al detectar la presencia de patógenos o señales inflamatorias a través de inmunoglobulinas, complementos y receptores tipo TLR, secretando el contenido de sus gránulos, que atraen a otras células, potenciando la respuesta inmune y culminando con la formación de agregados de plaquetas (Chabert et al., 2015). Nuestros resultados muestran que la proteína NS1 DENV debe de estar en una conformación completa para lograr inducir la activación plaquetaria de forma estable; además, podemos decir que NS1 wing es el dominio más inmunogénico de la proteína y presumiblemente el que interactúa con la membrana celular ya que también puede inducir la activación por sí misma, no así los otros dos dominios conformacionales, ni la versión mutante. Esto resalta la importancia de las interacciones entre la proteína y sus receptores de reconocimiento en la superficie de las plaquetas en la patogenia del virus del dengue. El hecho de que nuestros resultados parezcan indicar que el dominio del wing por sí solo es capaz de inducir la activación plaquetaria e incluso la agregación plaquetaria, lo convierte en un objetivo muy interesante para el tratamiento del desarrollo de una vacuna. Sin embargo, los resultados más consistentes corresponden a los obtenidos con la proteína DENV NS1 completa. Se ha propuesto que los tres dominios estructurales de NS1 desempeñan diferentes funciones en la asociación de membranas, el ensamblaje del complejo de replicación y la evasión del sistema inmunológico. También se ha propuesto que el dominio del NS1 wing podría participar activamente en la respuesta inmune innata mediada por RLR según los análisis estructurales, aunque esto aún no se ha demostrado. En este estudio analizamos su participación en las plaquetas y su capacidad para inducir activación y agregación. Todo parece indicar que la presencia del dominio  $\beta$ -roll es fundamental para inducir una respuesta plaquetaria estable ya que permite la formación de estructuras diméricas y hexámicas; esto se observó en los resultados consistentes de activación y

agregación por lo que nuestros resultados parecen confirmar que el NS1 wing podría ser un objetivo interesante para bloquear la actividad de NS1 de DENV.

Se ha demostrado que las plaquetas son células clave involucradas en la inmunorregulación de la enfermedad del dengue, ya que la activación plaquetaria no solo lleva a cabo mediante interacciones directas con los virus. Los mecanismos de defensa del huésped en respuesta a infecciones virales también pueden conducir a la activación plaquetaria. Por ejemplo, muchas infecciones virales provocan inflamación sistémica, que a su vez desencadena la activación de las plaquetas y reduce la vida útil de las mismas. Los casos de dengue severo muestran características particulares como tormenta de citocinas, alteraciones hematológicas y disfunción endotelial (Daisy Vanitha John, 2015). Estos biomarcadores propios de la respuesta inmunológica del hospedero pueden servir como indicadores de severidad de la enfermedad (Green Sharon, 2006).

Diferentes estirpes celulares se activan en la infección por el virus del dengue; sin embargo, su función en la respuesta contra el patógeno in vivo no es del todo clara. La actividad de las plaquetas y su participación en la respuesta inmunológica se ha abordado previamente. En nuestro estudio confirmamos que la expresión de  $\alpha$ IIB $\beta$ III y P-selectina en la superficie de las plaquetas se encontraba en mayor proporción en el grupo de pacientes que presentaban un cuadro de infección temprana por DENV (infección aguda) en contrastarse con pacientes que se encontraban entre los días 6 a 10 posteriores al inicio de síntomas y los donadores sanos. La comparación también se llevó a cabo contra plaquetas de donadores estimuladas con las proteínas virales NS1 full, NS1 wing, NS1 mutante y NS1  $\beta$ -ladder, los resultados mostraron una expresión similar de los porcentajes de los marcadores de activación al compararlos contra el grupo con infección aguda, lo cual correlaciona con la presencia de la proteína NS1 en circulación, la cual se puede detectar a partir del primer día de la aparición de los síntomas de la enfermedad y durante los primeros 5 días después del inicio de los síntomas, posteriormente, NS1 disminuye gradualmente (Malavige & Ogg, 2017) .

La activación plaquetaria en personas infectadas por el virus de dengue, confirma nuestros ensayos in vitro y la participan de estas células en la respuesta contra el virus (Trugilho 2017). La activación plaquetaria conlleva a la apoptosis y posterior aclaramiento de estas células por parte de células especializadas. Este proceso puede estar asociado a la trombocitopenia

observada en pacientes con infección por dengue los primeros días de la infección, periodo en el cual el proceso inflamatorio es más fuerte (Sridhar et al., 2017), nuestros resultados muestran disminución en el número de plaquetas en los primeros 5 días de la infección, que se normalizan a valores normales conforme el paciente se va recuperando, estos datos correlacionan con los reportados por Ojha A y cols, donde determinaron la severidad de la trombocitopenia en pacientes con dengue de acuerdo a los días de evolución de la enfermedad (Ojha et al., 2017).

La activación de células dendríticas y macrófagos, principales dianas del dengue, estimula la liberación de citocinas inflamatorias como la IL-6 e IL-8 que funcionan como moléculas quimioatrayentes (human dendritic cells). La activación de linfocitos T resulta en la producción de IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 entre otras, contribuyendo a esta tormenta de citocinas (t cells responses 2006) que contribuye a una activación plaquetaria indirecta. En nuestro estudio encontramos concentraciones plasmáticas elevadas de IL-6 e IL-8 en pacientes que cursaban los primeros días de la infección con DENV. Las IL-6 e IL-8 son citocinas multifuncionales que actúa sobre diferentes células diana para inducir una variedad de respuestas biológicas que involucran la regulación inmune y la transducción de señales [19]. Nuestro estudio indica que los niveles de IL-6 en plasma correlacionan con la progresión clínica de la enfermedad. Los resultados mostraron que el nivel de expresión de IL-6 en pacientes con dengue agudo dentro de los primeros 3-5 días de la infección fue significativamente más alto que en pacientes con un cuadro tardío de dengue y controles sanos, también observamos niveles incrementados de IL-8 en los primeros días de la infección por dengue, comparados contra aquellos que cursaban con una infección tardía y el grupo control, lo anterior indica que el proceso inflamatorio tiene un pico dentro de los primeros 5 días de iniciados los síntomas en la enfermedad por el virus de dengue, lo que correlaciona con el tiempo que se encuentra en circulación la proteína NS1 de DENV y los marcadores inflamatorios comienzan a disminuir en plasma una vez que la proteína viral también lo hace, lo que podría explicar por qué la trombocitopenia e hiper reactividad plaquetaria se ve con mayor frecuencia dentro de los primeros días de evolución de la enfermedad.

P-selectina es una glicoproteína almacenada en los  $\alpha$ -gránulos de plaquetas que se transloca a la superficie y se libera en suspensión durante la activación plaquetaria. Es la principal molécula de adhesión responsable de la interacción de las plaquetas con los monocitos, y se han detectado agregados de monocitos plaquetarios circulantes en pacientes con dengue. Observamos concentraciones plasmáticas de la glicoproteína P-selectina y de su receptor PSGL-1 elevadas en ambos grupos de estudio al compararse el grupo control. Elevaciones en las concentraciones de P-selectina y la fracción soluble de su ligando, reflejan un estado inmunológico activo y altas concentraciones correlacionan con un estado grave de la infección. Además, indican un estado de hiper activación plaquetaria y confirman la participación de estas células en la respuesta inflamatoria y hemostática (Huang 2019).

A la par de la tormenta de citocinas y el estado exacerbado inflamatorio, los estados graves de la enfermedad cursan con alteraciones hematológicas, disrupciones de la hemostasia y de los procesos fibrinolíticos. Nuestros resultados muestran concentraciones de Factor tisular (FT) elevado en ambos grupos de acuerdo al tiempo de evolución de la enfermedad. La expresión de FT en plasma se considera como un marcador de activación y lesión endotelial lo cual es una marcada característica de la gravedad de la infección por virus de dengue (Gulati, 2016). Los monocitos activados también son capaces de expresar factor tisular y se ha reportado su relación en pacientes con dengue severo (Deazeredo 2010).

De acuerdo a los resultados obtenidos es posible observar una desregulación del estado fibrinolítico en pacientes que cursaban con infección activa por el virus de dengue, las concentraciones plasmáticas elevadas del activador del plasminógeno tisular (tPA) y del inhibidor del activador del plasminógeno tisular (PAI-1) confirman alteraciones hemostáticas y lesión endotelial que se pueden asociar el estado de gravedad de los pacientes, así como con posibles complicaciones en el curso de la enfermedad. Previamente otros grupos han reportado alteraciones similares, donde reportan niveles de PAI-1 y tPA elevados en pacientes con fiebre hemorrágica (Huang Y. 2003), estados fibrinolíticos alterados pueden converger en la aparición de productos de degradación de fibrina, los cuales indican un estado de coagulación activo en respuesta a la lesión endotelial y hemorrágica observada en la infección por virus de dengue.

El dengue hemorrágico se asocia con un aumento de la permeabilidad vascular, trombocitopenia y pérdida de factores de coagulación lo cual puede provocar un proceso hemorrágico inicial debido a la trombocitopenia y posteriormente coagulación intravascular diseminada (CID) como un evento terminal. Un marcador sensible de CID temprano es la presencia de dímero D (DD) en la circulación. Observamos elevación en las concentraciones de Dímero-D en ambos pacientes con dengue independientemente del tiempo de evolución al ser comparados con el grupo control, la presencia de dímero D (DD) indica la activación del sistema de coagulación resultante de la destrucción de la fibrina y refleja la formación de coágulos y su lisis. La detección de DD en la etapa febril de la infección por dengue puede ser beneficiosa para predecir el curso clínico de la enfermedad y ayudar a los médicos a predecir la gravedad de la infección por dengue antes de que los pacientes progresen a una etapa grave.

## 7. CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que la proteína NS1 de dengue debe tener una conformación completa para lograr inducir la activación plaquetaria; además, el dominio de Wing, fue el más inmunogénico de la proteína y presumiblemente el que interactúa con la membrana celular, es el único de los dominios que logra inducir una mayor activación plaquetaria. Esto destaca la importancia de las interacciones entre la proteína y sus receptores de reconocimiento en la superficie de las plaquetas en la patogenia del virus del dengue. El hecho de que nuestros resultados parezcan indicar que el dominio de wing por sí solo es capaz de inducir una mayor expresión de marcadores de activación plaquetaria parece confirmar que el ala de NS1 podría ser un objetivo interesante para bloquear los efectos activadores de plaquetas del DENV. Se ha propuesto que los tres dominios estructurales de NS1 desempeñan diferentes funciones en la asociación de membranas, el ensamblaje del complejo de replicación y la evasión del sistema inmunitario. También se había propuesto que el dominio del wing podría participar activamente en la respuesta inmunitaria innata mediada por RLR (RIG-I, gen I inducible por ácido retinoico) según el análisis estructural, aunque esto aún no se ha demostrado. Como los resultados más consistentes corresponden a los obtenidos con la proteína NS1 de DENV completa, parece indicar que la presencia del dominio  $\beta$ -roll es fundamental para inducir una respuesta plaquetaria estable porque permite la formación de estructuras diméricas y hexámicas. En cuanto a los resultados obtenidos en la expresión de citocinas inflamatorias y trombóticas en pacientes infectados con DENV observamos una mayor expresión durante la fase aguda, lo que concuerda con el tiempo de circulación de la proteína NS1 en el organismo, por otro lado los resultados in vitro son similares a los que observamos en pacientes en fase aguda. Los niveles incrementados de citocinas inflamatorias y pro trombóticas al inicio de la infección pueden ser marcadores de pronóstico para la progresión a Dengue grave y parecen desempeñar un papel en la patogénesis de la enfermedad.

## 8. REFERENCIAS

- Akey, A. D. L., Brown, W. C., Dutta, S., Konwerski, J., & Jose, J. (2014). Flavivirus NS1 crystal structures reveal a surface for membrane association and regions of interaction with the immune system. *Science*, *343*(6173), 1–31.  
<https://doi.org/10.1126/science.1247749>.Flavivirus
- Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., & Flamand, M. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(2), 376–381. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.02.376-381.2002>
- Azeredo, E. L. De, Monteiro, R. Q., & Pinto, L. M. (2015). Thrombocytopenia in Dengue : Interrelationship between Virus and the Imbalance between Coagulation and Fibrinolysis and Inflammatory Mediators, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/313842>
- Calvert, J. K., Helbig, K. J., Dimasi, D., Cockshell, M., Beard, M. R., Pitson, S. M., ... Carr, J. M. (2015). Dengue Virus Infection of Primary Endothelial Cells in Endothelial Cells Function and Is Restricted by Interferon-Stimulated Responses, *00*(00), 1–12.  
<https://doi.org/10.1089/jir.2014.0195>
- Chabert, A., Hamzeh-cognasse, H., Pozzetto, B., Cognasse, F., Schattner, M., Gomez, R. M., & Garraud, O. (2015). Human platelets and their capacity of binding viruses : meaning and challenges ? *BMC Immunology*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0092-1>
- Chao, C., Wu, W., Lai, Y., & Tsai, P. (2019). Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4 , leading to thrombocytopenia and hemorrhage, 1–26.
- Conde, J. N., Silva, E. M., Barbosa, A. S., & Mohana-Borges, R. (2017). The complement system in flavivirus infections. *Frontiers in Microbiology*, *8*(FEB), 1–7.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00213>

- Danon, D., Jerushalmy, Z., & De Vries, A. (1959). Incorporation of influenza virus in human blood platelets in vitro. Electron microscopical observation. *Virology*, 9, 719–722.
- Edeling, M. A., Diamond, M. S., & Fremont, D. H. (2014). Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(11), 4285–4290. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322036111>
- Guo, C., Zhou, Z., Wen, Z., Liu, Y., Zeng, C., Xiao, D., ... Yang, G. (2017). Global epidemiology of dengue outbreaks in 1990–2015: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(JUL), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00317>
- Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 1–26. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., ... Pelegrino, J. L. (2010). Dengue : a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12), S7–S16. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2460>
- 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>
- Hayes, C., Kitahara, S., & Tcherniantchouk, O. (2014). Decreased threshold of aggregation to low-dose epinephrine is evidence of platelet hyperaggregability in patients with thrombosis. *Hematology Reports*, 6(3), 45–50. <https://doi.org/10.4081/hr.2014.5326>
- Hottz, E. D., Lopes, J. F., Freitas, C., Valls-de-Souza, R., Oliveira, M. F., Bozza, M. T., ... Bozza, P. T. (2013). Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-in fl ammasome activation. *Blood*, 122(20), 3405–3415. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-504449.F.A.B.>
- Huang, J., Li, X., Shi, X., Zhu, M., Wang, J., Huang, S., ... Jin, J. (2019). Platelet integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ : Signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. *Journal of*

*Hematology and Oncology*, 12(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0709-6>

Kim, Y. C., López-Camacho, C., Garcia-Larragoiti, N., Cano-Mendez, A., Hernandez-Flores, K. G., Domínguez-Alemán, C. A., ... Reyes-Sandoval, A. (2019). Development of an E2 ELISA methodology to assess chikungunya seroprevalence in patients from an endemic region of Mexico. *Viruses*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/v11050407>

Krishnamurti, C., Peat, R. A., Cutting, M. A., & Rothwell, S. W. (2002). Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(4), 435–441. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.435>

Lai, Y. C., Chuang, Y. C., Liu, C. C., Ho, T. S., Lin, Y. S., Anderson, R., & Yeh, T. M. (2017). Antibodies Against Modified NS1 Wing Domain Peptide Protect Against Dengue Virus Infection. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07308-3>

López, A., & Macaya, C. (2013). Plaqueta : fisiología de la activación y la inhibición. *Revista Española de Cardiología*, 13, 2–7.

Malavige, G. N., & Ogg, G. S. (2017). Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology*, 151(3), 261–269. <https://doi.org/10.1111/imm.12748>

Martin, A. C., Zlotnik, D., Bonete, G. P., Baron, E., Decouture, B., Belleville-Rolland, T., ... Bachelot-Loza, C. (2020). Epinephrine restores platelet functions inhibited by ticagrelor: A mechanistic approach. *European Journal of Pharmacology*, 866, 172798. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172798>

Modhiran, N., Watterson, D., Blumenthal, A., Baxter, A. G., Young, P. R., & Stacey, K. J. (2017). Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. *Immunology and Cell Biology*, (December 2016), 1–5. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.5>


Modhiran, N., Watterson, D., Muller, D. A., Panetta, A. K., Sester, D. P., Liu, L., ... Young, P. R. (2015). Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Science*, 7(304).

- Mourão, M. P. G., Lacerda, M. V. G., Macedo, V. O., & Santos, J. B. (2007). Thrombocytopenia in patients with dengue virus infection in the Brazilian Amazon. *Platelets*, *18*(8), 605–612. <https://doi.org/10.1080/09537100701426604>
- Ojha, A., Nandi, D., Batra, H., Singhal, R., Annarapu, G. K., Bhattacharyya, S., ... Guchhait, P. (2017). Platelet activation determines the severity of thrombocytopenia in dengue infection. *Scientific Reports*, *7*(December 2016), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep41697>
- Rastogi, M., Sharma, N., & Singh, S. K. (2016). Flavivirus NS1 : a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal*, *13*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>
- Reyes-sandoval, A., & Ludert, J. E. (2019). The Dual Role of the Antibody Response Against the Flavivirus Non-structural Protein 1 ( NS1 ) in Protection and, *10*(July), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01651>
- 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>
- Simon, A. Y., Sutherland, M. R., & Pryzdial, E. L. G. (n.d.). Dengue virus binding and replication by platelets.
- Simon, A. Y., Sutherland, M. R., & Pryzdial, E. L. G. (2015). Dengue virus binding and replication by platelets. *Blood*, *126*(3), 378–385. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-598029>.The
- Sridhar, A., Sunil Kumar, B. M., Rau, A., & Rau, A. T. K. (2017). A Correlation of the Platelet Count with D-Dimer Levels as an Indicator for Component Therapy in Children with Dengue Hemorrhagic Fever. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. <https://doi.org/10.1007/s12288-016-0686-7>
- Sutherland, M. R., Simon, A. Y., Serrano, K., Schubert, P., Acker, J. P., & Pryzdial, E. L. G. (2016). Dengue virus persists and replicates during storage of platelet and red blood cell units. *Transfusion*, *56*(5), 1129–1137. <https://doi.org/10.1111/trf.13454>
- Yeaman, M. R. (2014). Platelets : at the nexus of antimicrobial defence. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(6), 426–437. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3269>

- Yen, L.-C., Liao, J.-T., Lee, H.-J., Chou, W.-Y., Chen, C.-W., Lin, Y.-L., & Liao, C.-L. (2016). The C-Terminus of the Core beta-Ladder domain in Japanese Encephalitis Virus Nonstructural Protein 1 Is Flexible for Accommodation of Heterologous Epitope Fusion. *Journal of Virology*, *90*(3), 1178–1189. <https://doi.org/10.1128/JVI.02057-15>
- Young Chan Kim, Cesar Lopez-Camacho, Nallely Garcia-Larragoiti, Martha Eva Viveros-Sandoval, A. R. S. (2020). Production and Purification of Zika Virus NS1 Glycoprotein in HEK293 Cells. In *Zika Virus: Methods and Proto cols, Methods in Molecular Biology* (pp. 93–102). <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0581-3>
- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002858>

## 9. ANEXOS

### 9.1 Oficio de autorización del proyecto

  
Gobierno del Estado  
de Michoacán de Ocampo

Dependencia: SECRETARÍA DE SALUD DE MICHOACÁN  
Sub-dependencia: HOSPITAL GENERAL "DR. MIGUEL SILVA"  
Oficina: COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN E INVESTIGACIÓN  
No. de oficio: 5009/175/19  
Expediente:  
Asunto:

**AUTORIZACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**

"2019, AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR, EMILIANO ZAPATA"

Morelia, Michoacán, 29 de octubre del 2019.


**C. DRA. SANDRA EDITH LÓPEZ CASTAÑEDA**  
**INVESTIGADORA PRINCIPAL**  
**P R E S E N T E.**


Por este conducto le informamos, 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 el Comité de Investigación con número de Registro 17-CI-16053153 con fecha de expedición 11 de noviembre del 2017 del Hospital General "Dr. Miguel Silva", una vez revisadas las observaciones que se hicieran en sesión extraordinaria del 14 de octubre del presente a su protocolo de investigación número 481/01/19 titulado: " ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR MEDIADA POR PLAQUETAS A LA PROTEINA VIRAL NO ESTRUCTURAL 1 (NS1) DE DENGUE". Ha sido **AUTORIZADO**.


No omitimos mencionarle que deberá presentar a estos comités los resultados del informe final de su proyecto de investigación de acuerdo a la norma oficial mexicana que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos y a la Guía Nacional Para la Integración y funcionamiento de los comités de Ética en Investigación.

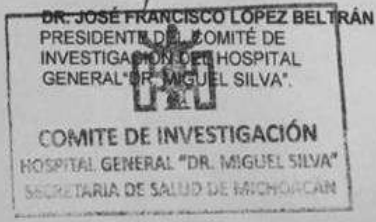
Sin más por el momento, le enviamos un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

  
**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".

  
C.p. Minutario  
**COMITE DE ÉTICA EN  
INVESTIGACIÓN**  
HOSPITAL GENERAL "DR. MIGUEL SILVA"  
SECRETARÍA DE SALUD DE MICHOACÁN

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

Michoacán #EstáenTi

## 9.2 Carta de consentimiento informado.

### Carta de consentimiento informado.

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

##### UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

CARTA DE **CONSENTIMIENTO INFORMADO** PARA PARTICIPAR EN EL PROTOCOLO DE ESTUDIO: Estudio epidemiológico de incidencia y prevalencia de enfermedades causadas por los arbovirus Zika, Dengue y Chikungunya.

**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 incidencia y prevalencia real 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 muestra de sangre para medir los niveles de células inmunológicas y anticuerpos específicos contra Dengue, Chikungunya y Zika. Sus muestras serán utilizadas en diferentes estudios de laboratorio por los investigadores que participan en este estudio.

**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 de la unidad de investigación y el paciente no pagará por los estudios paraclínicos propios del proyecto de investigación.

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**