

La proteína de punta S1 del SARS-CoV-2 induce fibrina (ógeno) resistente a la fibrinólisis: implicaciones para la formación de microcoágulos en COVID-19

Biosci Rep (2021) 41 (8): BSR20210611.

<https://doi.org/10.1042/BSR20210611>

Historial del artículo

- **Pantalla dividida**
- Icono Vistas **Puntos de vista**
- **PDF**
- Compartir icono **Cuota**
- Citar icono **Citar**
- **Obtener permisos**

Resumen

La infección inducida por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-Cov-2), causante de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), se caracteriza por patologías clínicas sin precedentes. Una de las patologías más importantes, es la hipercoagulación y los microcoágulos en los pulmones de los pacientes. Aquí estudiamos el efecto de la subunidad S1 aislada de la proteína de punta del SARS-CoV-2 como potencial inflamagen *sui generis*. Usando microscopía electrónica de barrido y de fluorescencia, así como espectrometría de masas, investigamos el potencial de este inflamagen para interactuar con las plaquetas y la fibrina (gen) directamente para causar la hipercoagulación de la sangre. Usando plasma pobre en plaquetas (PPP), mostramos que la proteína de pico puede interferir con el flujo sanguíneo. La espectrometría de masas también mostró que cuando se agrega la proteína de punta S1 a la PPP sana, se producen cambios estructurales en la fibrina β y γ , el complemento 3 y la protrombina. Estas proteínas eran sustancialmente resistentes a la tripsinización, en presencia de la proteína de pico S1. Aquí sugerimos que, en parte, la presencia de proteína espiga en circulación puede contribuir a la hipercoagulación en pacientes positivos para COVID-19 y puede causar un deterioro sustancial de la fibrinólisis. Tal deterioro lítico puede resultar en los microcoágulos grandes persistentes que hemos observado aquí y anteriormente en muestras de plasma de pacientes con COVID-19. Esta observación puede tener una relevancia clínica importante en el tratamiento de la hipercoagulabilidad en pacientes con COVID-19.

Palabras clave:

[COVID-19](#), [microscopía electrónica](#), [fibrina\(ógeno\)](#), [microscopía de fluorescencia](#), [microcoágulo](#), [proteína de punta Sa](#)

Asignaturas:

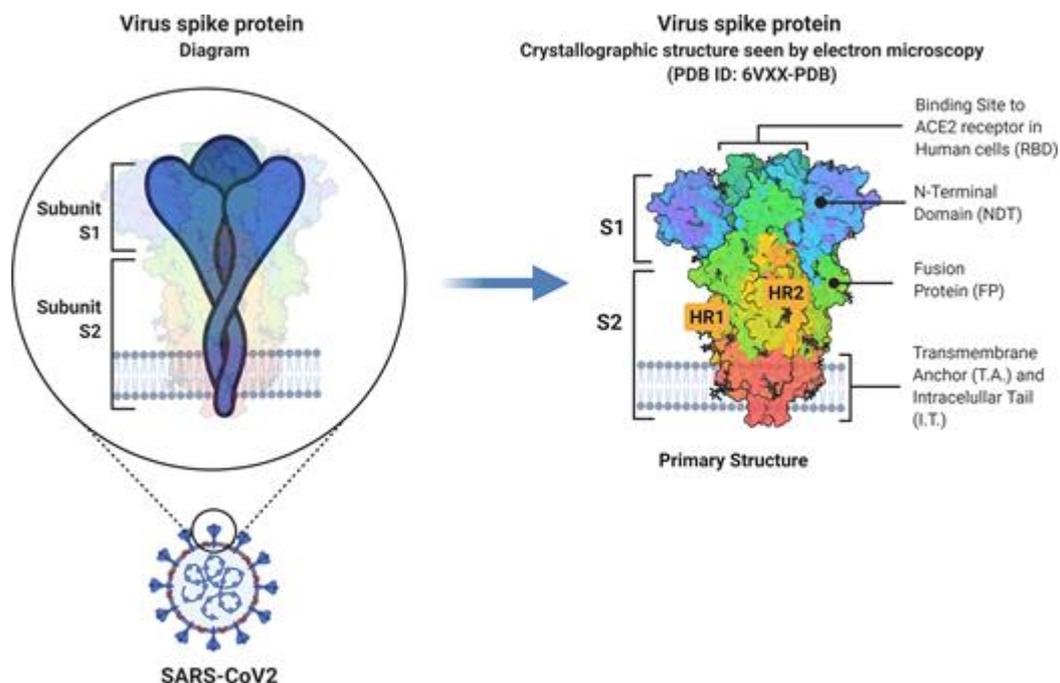
[Diagnóstico y biomarcadores](#), [Inmunología e inflamación](#), [Interacciones moleculares](#), [Virología](#)

Introducción

La infección inducida por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-Cov-2), causante de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), se caracteriza por patologías clínicas sin precedentes. Las características vasculares fenotípicas están fuertemente asociadas con diversas coagulopatías que pueden provocar sangrado y trombocitopenia o hipercoagulación y trombosis [[1](#) , [2](#)]. Varios biomarcadores de coagulación inflamatoria circulantes y desregulados, que incluyen fibrina (ógeno), dímero D, selectina P y factor de von Willebrand (VWF), proteína C reactiva (PCR) y varias citocinas, se unen directamente a los receptores endoteliales. Por lo tanto, las endotelopatías son una característica clínica clave de la afección [[3](#) , [4](#)]. Durante la progresión de las diversas etapas de la COVID-19, es probable que los marcadores de replicación viral, así como el agotamiento del FVW y el fibrinógeno con niveles elevados de dímero D y niveles desregulados de selectina P, seguidos de una tormenta de citoquinas, sean indicativos de un mal pronóstico [[5-8](#)]. Este mal pronóstico empeora aún más junto con un depósito sustancial de microcoágulos en los pulmones [[9-11](#)]. El plasma de los pacientes con COVID-19 también contiene una carga masiva de coágulos de amiloide preformados [[5](#)], y también hay numerosos informes de daño a los eritrocitos [[12-14](#)], plaquetas y desregulación de biomarcadores inflamatorios [[5-8](#)].

La virulencia del patógeno está íntimamente ligada a sus proteínas de membrana. Una de esas proteínas, que se encuentra en el virus COVID-19, es la proteína espiga, que es una glicoproteína de membrana. Las proteínas de pico son los factores clave para la unión del virus a las células diana, ya que se unen a los receptores de superficie convertidores de angiotensina 2 (ACE2) [[15](#)]. Spike proteínas son proteínas de fusión viral de clase I [[16](#)]. Están presentes como homotrímeros que sobresalen en la superficie viral y median la entrada del virus en las células huésped diana [[17](#)]. Una proteína espiga singular tiene un tamaño de entre 180 y 200 kDa y contiene un extremo N extracelular, un dominio transmembrana fijado en la membrana del virus y un segmento C-terminal intracelular corto [[16](#) , [18](#)]. Las proteínas Spike están cubiertas con moléculas de polisacáridos que sirven como camuflaje. Esto ayuda a evadir la vigilancia del sistema inmunitario del huésped durante la entrada [[18](#)]. La subunidad S1 es responsable de la unión del receptor [[19](#)], con la subunidad 2 (S2), una subunidad carboxilo terminal, responsable de la fusión y entrada viral [[20](#)] (ver [Figura 1](#)).

Figura 1



VER GRANDEDESCARGAR DIAPOSITIVA

Representación esquemática de la glicoproteína Spike del SARS-CoV-2

Adaptado de [21]. Abreviaturas: HR1, repetición de heptada 1; HR2, heptada repetir 2; S1, subunidad 1; S2, subunidad 2. Esta imagen fue creada con BioRender (<https://biorender.com/>).

La unión al receptor es sin duda responsable de las patologías mediadas por células, pero no explica por sí misma las coagulopatías. Sin embargo, la proteína Spike puede eliminarse y se ha detectado en varios órganos, incluido el tracto urinario [22]. Las proteínas S1 también pueden cruzar la barrera hematoencefálica [23]. Las partículas S1 libres también pueden desempeñar un papel en la patogenia de la enfermedad [24 , 25]. La proteína de pico libre puede liberarse potencialmente debido a la "disparo" espontáneo de los trímeros de proteína S en la superficie de los viriones, y las células infectadas liberan partículas S1 que contienen el dominio de unión al receptor libre [24]. Aquí estudiamos el efecto de la subunidad S1 aislada de la proteína del pico del SARS-CoV-2 como un posible inflamagen *sui generis* proinflamatorio . Investigamos el potencial de este inflamagen para interactuar directamente con las plaquetas y el fibrin(ogen) para causar cambios en la proteína del fibrin(ogen) e hipercoagulación de la sangre. También determinamos si la proteína espiga puede interferir con el flujo sanguíneo, comparando muestras de plasma pobre en plaquetas (PPP) sanas sin tratamiento previo, con y sin proteína espiga añadida, con muestras de PPP de pacientes positivos para COVID-19 (antes del tratamiento). Concluimos que la proteína espiga puede tener efectos patológicos directamente, sin ser absorbida por las células. Esto proporciona más evidencia de que atacarlo directamente, ya sea a través de vacunas o anticuerpos, es probable que tenga un beneficio terapéutico.

Materiales y métodos

Ejemplos de datos demográficos y consideraciones

Se recogió sangre de voluntarios sanos ($n = 11$; 3 hombres y 8 mujeres; edad media: $43,4 \pm 11,7$ años) para servir como controles. Las personas que fuman, que fueron diagnosticadas con enfermedades cardiovasculares, trastornos de la coagulación (coagulopatías) y/o cualquier condición inflamatoria conocida (por ejemplo, diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), artritis reumatoide, tuberculosis, asma, etc.) no podían servir como voluntarios de control. . Además, el embarazo, la lactancia, la terapia hormonal, el uso de anticonceptivos orales y/o el uso de anticoagulantes también fueron factores que resultaron en la exclusión. Fumar fue excluido ya que se ha demostrado que afecta la coagulación, la fibrinólisis y el proceso hemostático [26]. El análisis de microfluidos incluyó un análisis preliminar utilizando muestras de PPP de dos pacientes positivos para COVID-19, el día del primer diagnóstico y antes de administrar cualquier tratamiento. Ambos pacientes fueron diagnosticados con síntomas de COVID-19 de moderados a graves (1 hombre y 1 mujer, edad media: $78,5 \pm 7,7$ años).

Toma de muestras de sangre

Un flebotomista calificado o un médico extrajeron la sangre de los voluntarios (control) a través de una venopunción, siguiendo el protocolo estéril estándar. Las muestras de sangre se almacenaron en dos o tres tubos de citrato de sodio (3,2 %) de 4,5 ml (BD Vacutainer®, 369714). Después de varias inversiones suaves, los tubos de citrato recogidos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante un mínimo de 30 min para permitir la amalgamación adecuada del anticoagulante antes de comenzar la preparación de la muestra. La sangre completa (WB) se centrifugó a $3000 \times g$ durante 15 min a temperatura ambiente para aislar los eritrocitos. El sobrenadante, es decir, PPP, se recogió y almacenó en tubos Eppendorf de 1,5 ml a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, hasta que se necesitó para los experimentos.

Preparación de proteína de pico

La subunidad S1 de la proteína Spike del SARS-CoV-2 (2019-nCoV), mFcTag, se adquirió de Sino Biological (Beijing, China) (número de catálogo 40591-V05H1) y se preparó con agua bidestilada, siguiendo las instrucciones proporcionadas. Se añadió un total de 400 μl de diluyente (agua libre de endotoxinas) a los 100 μg de proteína adicional para crear una solución madre (A) de $0,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Esta solución madre se diluyó en soluciones de trabajo. Para determinar la concentración de proteína de punta necesaria para dar como resultado una concentración significativa, pero lo suficientemente alta como para causar efectos fisiológicos en las propiedades viscoelásticas de la sangre, se evaluaron diferentes concentraciones de proteína de punta en PPP con microscopía de fluorescencia. Una muestra de sangre de control saludable se separó en cuatro tubos Eppendorf de 1,5 ml con diferentes concentraciones de exposición final de proteína de punta en el PPP de 100, 50, 10 y 1 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Las muestras de PPP se incubaron con las diversas concentraciones de proteína de pico durante 30 min a temperatura ambiente.

Microscopía de fluorescencia de fibrinógeno purificado y PPP con y sin trombina

Verificación de concentración

Para verificar qué concentración de proteína de punta será efectiva, se colocaron 5 μl de PPP expuestos a las concentraciones de proteína de punta variables en un portaobjetos de vidrio, después de haber sido expuestos al colorante amiloide fluorescente, tioflavina T (ThT) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) durante 30 min a temperatura ambiente. La concentración final de ThT en todas las muestras preparadas fue de 0,005 mM. Después de la evaluación de las muestras, con las distintas concentraciones de proteína de pico, se encontró que la concentración de exposición final de 1 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ fue suficiente y se usó para el resto del estudio.

Proteína amiloide y coagulación anómala en muestras de PPP

Para estudiar la coagulación anómala espontánea de fibrin(ogen), en las muestras de PPP sanas ingenuas, y en presencia de proteína de pico, se usaron 5 μl de PPP expuestos a 1 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (concentraciones finales) de proteína de pico en un vaso. portaobjetos y cubierto con un cubreobjetos. Esto se hizo después de exponerlo al colorante amiloide fluorescente, ThT (concentración final: 0,005 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) durante 30 minutos a temperatura ambiente. También se prepararon coágulos de fibrina PPP, con y sin proteína espiga y tras la exposición a ThT, añadiendo 2,5 μl de trombina (7 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$, Servicio Nacional de Sangre de Sudáfrica) a 5 μl de PPP y se colocó en un portaobjetos de vidrio y se cubrió con un cubreobjetos. La longitud de onda de excitación para ThT se fijó en 450–488 nm y la emisión en 499–529 nm y las muestras procesadas se observaron utilizando un microscopio fluorescente Zeiss Axio Observer 7 con un objetivo Plan-Apochromat 63 \times /1.4 Oil DIC M27 (Carl Zeiss Microscopy, Munich, Alemania).

Las imágenes de microscopía de fluorescencia de PPP saludables con y sin proteína de punta se analizaron utilizando Fiji® (Java 1.6_0 24 [64 bits]) para representar numéricamente las imágenes. El área total de partículas fluorescentes o coagulación anómala (identificada por el colorante amiloide, ThT) [27–29] se determinó utilizando un algoritmo de umbralización en Fiji®. En primer lugar, las imágenes se ajustaron a escala en Fiji® de acuerdo con la ampliación de la lente utilizada en el microscopio fluorescente, seguido de la selección del valor de umbral apropiado para considerar la mayor parte del primer plano y descartar la mayor parte posible del fondo de la imagen. Para optimizar la cantidad de imágenes umbralizadas, se escribió un programa en Java para analizar simultáneamente un grupo de imágenes (ver Material complementario). Se calculó el porcentaje total de coágulos anómalos en cada imagen y se calculó el promedio de todas las imágenes por muestra. Estos valores medios se utilizaron para el análisis estadístico.

Modelo de coágulo de fibrina (ógeno) purificado

Para determinar si la proteína espiga causa cambios en el fibrinógeno purificado, nuestro modelo de coágulo de fibrina purificada de elección fue el fibrinógeno fluorescente conjugado con Alexa Fluor™ 488 (Thermo Fisher, F13191). Se preparó una concentración final de fibrinógeno de 2 mg.ml^{-1} en agua libre de endotoxinas y se expuso a 1 ng.ml^{-1} (concentraciones finales) de proteína espiga durante 30 min a temperatura ambiente. Se colocó un total de 5 μl del fibrinógeno purificado en un portaobjetos de vidrio, con 2,5 μl de trombina. La longitud de onda de excitación para nuestro modelo de fibrinógeno fluorescente se fijó en 450–488 nm y la emisión en 499–529 nm y las muestras procesadas se observaron utilizando un microscopio fluorescente Zeiss Axio Observer 7 con un objetivo Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27 (Microscopía Carl Zeiss, Munich, Alemania).

WB (hematocrito)

El hematocrito se expuso a una concentración de exposición final de 1 ng.ml^{-1} de proteína de punta. El marcador fluorescente CD62P (selectina P de la superficie de las plaquetas) se añadió al hematocrito para estudiar la activación de las plaquetas. CD62P se encuentra en la membrana de las plaquetas y luego se transloca a la superficie de la membrana de las plaquetas. La translocación ocurre después de que la P-selectina plaquetaria se libera de los gránulos celulares durante la activación plaquetaria [5 , 7]. Se añadió un total de 4 μl de CD62P (conjugado con PE) (IM1759U, Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) a 20 μl de WB (sin tratar o incubados con proteína de pico). El hematocrito expuesto al marcador se incubó durante 30 min (protegido de la luz) a temperatura ambiente. La longitud de onda de excitación del CD62P fue de 540 a 570 nm y la de emisión de 577 a 607 nm. Las muestras procesadas también se observaron utilizando un microscopio fluorescente Zeiss Axio Observer 7 con un objetivo Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27 (Carl Zeiss Microscopy, Munich, Alemania).

Microscopía electrónica de barrido de muestras de WB

Se usó microscopía electrónica de barrido (SEM) para ver muestras sanas de WB, con y sin la adición de proteína de punta. Se colocó un total de 10 μl de WB en un cubreobjetos de vidrio y se preparó de acuerdo con los métodos de preparación SEM publicados anteriormente [30 , 31], comenzando con pasos de lavado en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH = 7,4) (Thermo Fisher Scientific, 11594516) durante 20 min. La fijación se realizó cubriendo los portaobjetos con formaldehído (FA) al 4 % durante 30 min, y luego lavándolos en PBS tres veces. Para cada lavado, el PBS debe dejarse durante 3 minutos antes de retirarlo y lavarlo nuevamente. Tetróxido de osmio (OsO_4) (Sigma–Aldrich, 75632) durante 15 min y los portaobjetos se lavaron en PBS tres veces con 3 min cada una una vez más. El siguiente paso fue deshidratar en serie los portaobjetos con etanol, seguido de un paso de secado con hexametildisilazano (HMDS) (Sigma–Aldrich, 379212). Las muestras se montaron en portaobjetos de vidrio y se recubrieron con carbón. Los

portaobjetos se observaron en un Zeiss MERLIN FE-SEM con el detector InLens a 1 kV (Carl Zeiss Microscopy, Munich, Alemania).

microfluidos

El análisis de microfluidos se realizó utilizando PPP sano y muestras de PPP agrupadas sanas (tres muestras de PPP agrupadas), con y sin proteína de pico, y dos muestras de PPP de COVID-19. Se usaron muestras agrupadas debido al volumen requerido para este experimento.

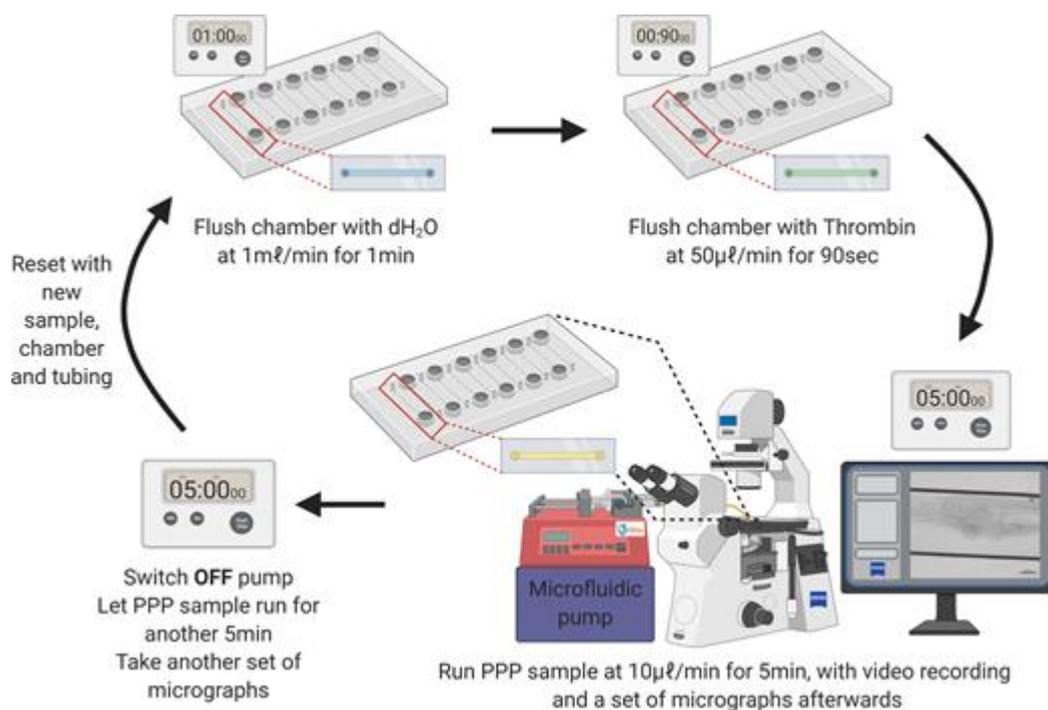
Hardware

Se utilizó una configuración de microfluidos para simular e investigar el crecimiento de coágulos en condiciones de flujo. Se usó una bomba de jeringa microfluidica Cellix (Cellix Ltd, Dublín, Irlanda) para impulsar el flujo a través de los biochips Cellix Vena8 Fluoro+ (Cellix Ltd, Dublín, Irlanda), que constaban de ocho canales de flujo microfluidicos rectos cada uno, a los caudales especificados en el párrafo siguiente. Un solo microcanal tenía un ancho de $400\ \mu\text{m}$ y una altura de $100\ \mu\text{m}$ (diámetro equivalente a $207\ \mu\text{m}$) y una longitud de 2,8 cm. Las dimensiones del microcanal estaban en el mismo orden de magnitud que las de algunos vasos de la microvasculatura, es decir, por debajo de $300\ \mu\text{m}$ [32]. Para observar la evolución del coágulo en tiempo real, los biochips se colocaron bajo el microscopio fluorescente Zeiss Axio Observer 7 con un objetivo de 10x/0,25 (Carl Zeiss Microscopy, Munich, Alemania).

Condiciones de flujo

Se usó un nuevo canal de flujo para cada corrida. El canal se enjuagó con agua destilada a un caudal de $1\ \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 1 min. Después de 5 min, se infundió trombina a través del microcanal a un caudal de $50\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 90 s (**Figura 2**). Se dejó reposar el canal otros 5 min y luego se infundió la muestra (control, control con espiga o COVID-19) a un caudal de $10\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 5 min, con grabación en vídeo del canal (**Figura 2**). Luego se detuvo el flujo después de 5 min y se tomó un conjunto de micrografías a través del canal. Luego, la muestra se dejó durante otros 5 minutos, para ver si se producían cambios adicionales (**Figura 2**). Este caudal se corresponde con una velocidad de cizallamiento, $\gamma \approx 250\ \text{s}^{-1}$ y un número de Reynolds, $Re \leq 1$. Uno de los principales desafíos al intentar lograr velocidades de cizallamiento y un número de Reynolds constantes fue la variabilidad de la viscosidad de una muestra a otra. Además, se sabe que la sangre que fluye a través de los microvasos se comporta de una manera no newtoniana, lo que se suma a las complejidades de la viscosidad variable dentro de una sola muestra. Para lograr la estandarización entre muestras, se utilizó un caudal constante.

Figura 2



[VER GRANDEDESCARGAR DIAPOSITIVA](#)

Protocolo experimental para el crecimiento de coágulos en un sistema de microfluidos

proteómica

Se analizaron cuatro muestras de PPP sanas antes y después de la adición de la proteína de pica. Las muestras se diluyeron en bicarbonato de amonio 10 mM a 1 mg.ml⁻¹. Se añadió un total de 1 µg de tripsina (New England Biosystems) al plasma para una proporción de enzima a sustrato de 1:50. No se realizó reducción ni alquilación.

Cromatografía líquida

Dionex nano RSLC

La cromatografía líquida se realizó en un Thermo Scientific Ultimate 3000 RSLC equipado con una columna trampa C₁₈ de 5 mm × 300 µm (Thermo Scientific) y un CSH de 25 cm × 75 µm, 1,7 µm de tamaño de partícula C₁₈ columna (Waters) columna analítica. El sistema solvente empleado fue el de carga: 2% acetonitrilo:agua; 0,1% AF; Disolvente A: 2% de acetonitrilo: agua; 0,1% FA y Disolvente B: 100% acetonitrilo:agua. Las muestras se cargaron en la columna trampa usando solvente de carga a una velocidad de flujo de 2 µl/min desde un muestreador automático de temperatura controlada ajustado a 7°C. La carga se realizó durante 5 minutos antes de que la muestra se eluyera en la columna analítica. El caudal se fijó en 300 nl/min y el gradiente se generó de la siguiente manera: 5,0–30 % B durante 60 min y 30–50 % B durante 60–80 min. La cromatografía se realizó a 45°C y el flujo de salida se entregó al espectrómetro de masas.

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas se realizó utilizando un espectrómetro de masas Thermo Scientific Fusion equipado con una fuente de ionización Nanospray Flex. Muestras de plasma, antes y después de la adición de proteína adicional (1 ng.ml^{-1} concentración de exposición final), cuatro de nuestras muestras de control se analizaron con este método. La muestra se introdujo a través de un emisor nano-bore de acero inoxidable. Los datos se recopilaron en modo positivo con un voltaje de pulverización establecido en 1,8 kV y un capilar de transferencia de iones establecido en $275 \text{ }^\circ\text{C}$. Los espectros se calibraron internamente utilizando iones de polisiloxano en $m/z = 445,12003$. Los escaneos MS1 se realizaron utilizando el detector orbitrap configurado a una resolución de 120000 en el rango de escaneo 375–1500 con el objetivo AGC en $4 \text{ E}5$ y un tiempo de inyección máximo de 50 ms. Los datos se adquirieron en modo perfil. Las adquisiciones de MS2 se realizaron utilizando la selección de precursores monoisotópicos para iones con cargas de +2 a +7 con tolerancia de error establecida en $\pm 10 \text{ ppm}$. Los iones precursores se excluyeron de la fragmentación una vez durante un período de 60 s. Los iones precursores se seleccionaron para la fragmentación en modo HCD utilizando el analizador de masas de cuadrupolo con energía HCD ajustada al 30 %. Los iones de fragmentos se detectaron en el analizador de masas Orbitrap ajustado a una resolución de 30000. El objetivo de AGC se fijó en $5 \text{ E}4$ y el tiempo máximo de inyección en 100 ms. Los datos fueron adquiridos en modo centroide.

análisis estadístico

Análisis de datos: muestras de plasma

Los análisis estadísticos de los datos generados se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (versión 9.0.0). La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Para el análisis de datos entre dos grupos, pruebas t pareadas (para comparaciones estadísticas por pares entre datos de grupos de control no tratados y tratados) y t no pareada se realizaron pruebas (para comparaciones estadísticas no pareadas) para evaluar la significancia estadística de los datos paramétricos, mientras que la prueba de Mann-Whitney se utilizó para probar la significancia estadística en datos no paramétricos y la prueba de Wilcoxon se usó para la significancia en datos paramétricos emparejados. Al comparar tres o más grupos experimentales, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis (datos no paramétricos) o la prueba ANOVA de una vía (datos paramétricos) para probar la significancia estadística. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0,05. Los datos paramétricos se presentaron como media y desviación estándar (DE), mientras que los datos no paramétricos se presentaron como mediana y rango intercuartílico (RIC).

Análisis de datos del espectrómetro de masas

Los archivos sin procesar generados por el espectrómetro de masas se importaron a Proteome Discoverer v1.4 (Thermo Scientific) y se procesaron con los algoritmos Sequest y Amanda. La interrogación de la base de datos se realizó contra la base de datos 2019-nCOVpFASTA1. Se permitió la escisión semi-tríptica con dos escisiones perdidas. La tolerancia de masa del precursor se fijó en 10 ppm y la tolerancia de masa del fragmento se fijó en 0,02 Da. Se permitieron como modificaciones dinámicas la desamidación (NQ), la oxidación (M). La validación de péptidos se realizó utilizando el nodo de validación Target-Decoy PSM. Los resultados de la búsqueda se importaron a Scaffold Q+ para su posterior validación (www.proteomesoftware.com) y pruebas estadísticas. Se realizó una prueba *t* en los conjuntos de datos y se utilizó el método cuantitativo emPAI para comparar los conjuntos de datos.

Material complementario y datos en bruto

Se puede acceder a todo el material complementario y los datos sin procesar aquí: <https://1drv.ms/u/s!AgoCOmY3bkKHisg5J0nb6wqsBzzWAQ?e=lmObMy>

Resultados

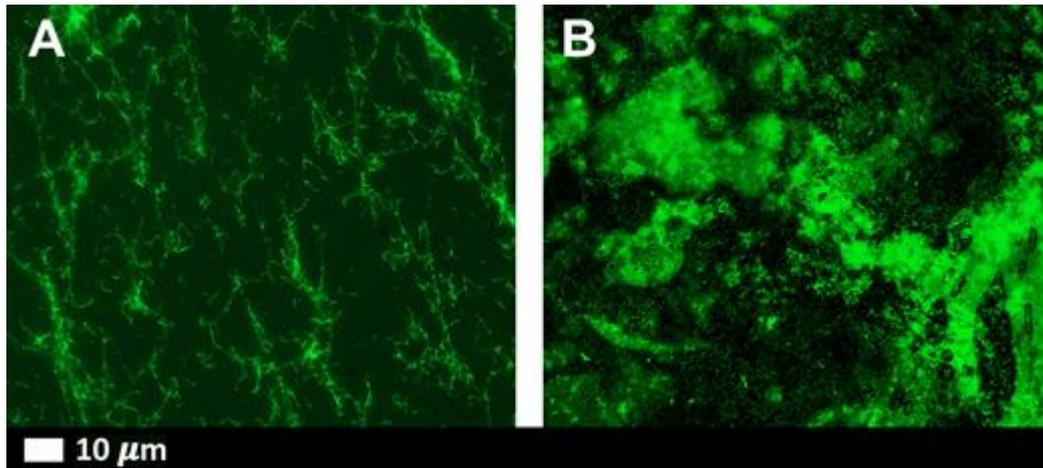
Microscopía de fluorescencia de fibrinógeno purificado y PPP

Se utilizó microscopía de fluorescencia para visualizar las señales de amiloide fluorescente en coágulos anómalos formados espontáneamente, presentes en un modelo de fibrinógeno fluorescente y también en PPP sano con y sin proteína de punta. Como investigación preliminar, se incubaron PPP de un solo control sano durante 30 minutos con concentraciones variables de proteína de pico, seguido de 30 minutos de incubación con ThT y, por último, preparación para la visualización. Se encontró que las concentraciones de exposición final de 1 ng.ml⁻¹ fueron suficientes y se usaron para el resto del estudio (consulte los datos sin procesar complementarios para ver las micrografías de otras concentraciones de exposición).

La Figura 3 A,B muestra micrografías representativas de fibrinógeno fluorescente purificado (Alexa Fluor™488) con trombina añadida y después de la exposición a 1 ng.ml⁻¹ de proteína de punta. Se formó un coágulo de fibrina más denso en presencia de proteína espiga (**Figura 3** B). En PPP, con y sin trombina, la señal ThT fluorescente verde indica áreas de formación de depósitos de amiloide. Se sabe que ThT se une a áreas hidrofóbicas abiertas en las proteínas y estas son de naturaleza amiloide [**27** , **33–35**]. **Figura 4** A,D muestra micrografías representativas de un frotis de PPP sano, con y sin trombina, y con ThT añadida donde se observa una ligera coagulación anómala. Por el contrario, cuando se añade proteína espiga a la PPP, con y sin trombina, se observó un aumento importante de los depósitos coágulos anómalos densos, de naturaleza amiloide (denominados depósitos de amiloide) (**Figura 4** B,D). Se aplicó un algoritmo de umbralización a las micrografías (con y sin trombina) utilizando Fiji® que se utilizó para calcular el área total de depósitos de amiloide en cada micrografía (en total, se analizaron 320 micrografías). Usando este método, se calculó el porcentaje total promedio

de depósitos de amiloide por grupo (PPP sana sin tratamiento previo, PPP sin tratamiento previo + trombina y PPP incubada con 1 ng.ml^{-1} proteína espiga, con y sin trombina añadida) (ver [Tabla 1](#)). Como era de esperar, no hubo diferencias significativas entre el % de área de depósitos de amiloide de PPP sana con y sin trombina. Sin embargo, hubo un aumento significativo en el % de área de depósitos de amiloide en PPP antes y después de añadir proteína de pico, tanto en frotis de PPP como en coágulos de fibrina (donde se añadió trombina).

figura 3

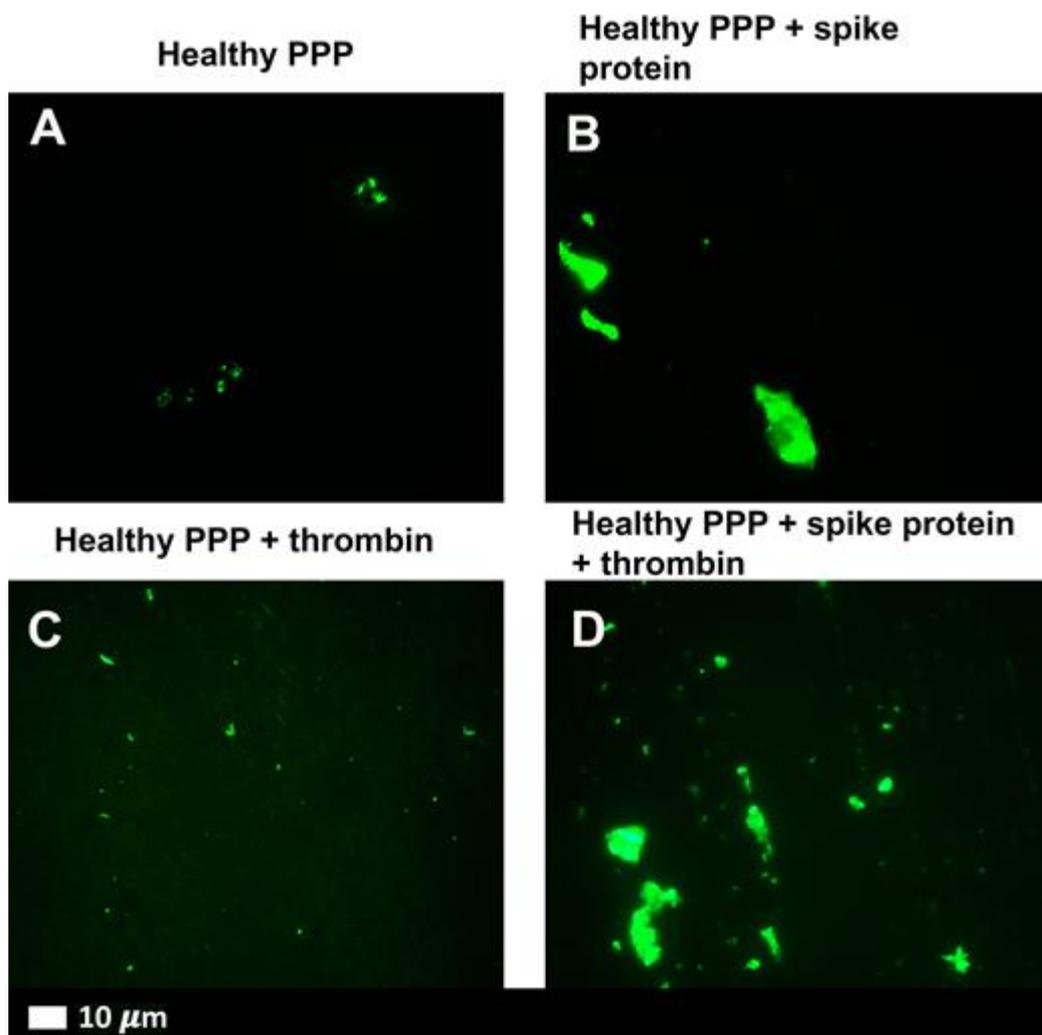


[VER GRANDEDESCARGAR DIAPOSITIVA](#)

Micrografías de fluorescencia representativas de fibrinógeno fluorescente purificado (Alexa Fluor™ 88) (tenga en cuenta que no se agregó ThT) con trombina agregada para formar coágulos de fibrina extensos

(**A**) fibrinógeno fluorescente con trombina; (**B**) fibrinógeno fluorescente con proteína de punta añadida (concentración de exposición final 1 ng.ml^{-1}) y trombina.

Figura 4



VER GRANDEDESCARGAR DIAPOSITIVA

Micrografías de fluorescencia representativas de PPP de individuos sanos después de la adición de ThT (señal fluorescente verde)

(A) Frotis de PPP. (B) PPP con proteína espiga. (C) PPP con trombina para crear un extenso coágulo de fibrina. (D) PPP expuesto a la proteína de pico seguido de la adición de trombina. La concentración final de proteína de pico fue de 1 ng.ml^{-1} .

tabla 1

PPP sana ingenua frente a PPP sana ingenua + trombina añadida ($n = 10$)	
P (prueba de Wilcoxon, datos no paramétricos emparejados expresados como mediana [Q1 - Q3])	0.2
Mediana de muestras sanas ingenuas	0,3 % [0,1–0,8]
Mediana de muestras de control vírgenes (+ trombina)	0,9 % [0,3–1,5]
PPP sana sin tratamiento previo + proteína espiga (1 ng.ml^{-1}) frente a PPP sana + proteína espiga (1 ng.ml^{-1}) + trombina añadida) ($n = 10$)	
P (datos normalmente distribuidos; prueba t pareada)	0.3
Porcentaje medio de amiloide de muestras sanas + pico	1,9% ($\pm 1,2\%$)
Porcentaje medio de amiloide de muestras sanas + espiga (+ Trombina)	2,4% ($\pm 1,3\%$)
PPP saludable sin tratamiento previo versus PPP saludable + proteína de pico (1 ng.ml^{-1}) ($n = 10$)	
P (prueba de Wilcoxon, datos no paramétricos emparejados expresados como mediana [Q1 - Q3])	0,004 (*)
Mediana de muestras sanas	0,3 % [0,1–0,8]

Mediana de muestras sanas + pico	1,9 % [1,2–2,4]
PPP sana sin tratamiento previo + trombina añadida frente a PPP sana + proteína de pico (1 ng.ml ⁻¹) + trombina añadida) (n = 10)	
P (datos normalmente distribuidos; prueba t pareada)	0,0036 (*)
Porcentaje medio de amiloide de las muestras de control (+ Trombina)	0,9 % (±0,6 %)
Porcentaje medio de amiloide de las muestras de control + pico (+ trombina)	2,4% (1,3%)

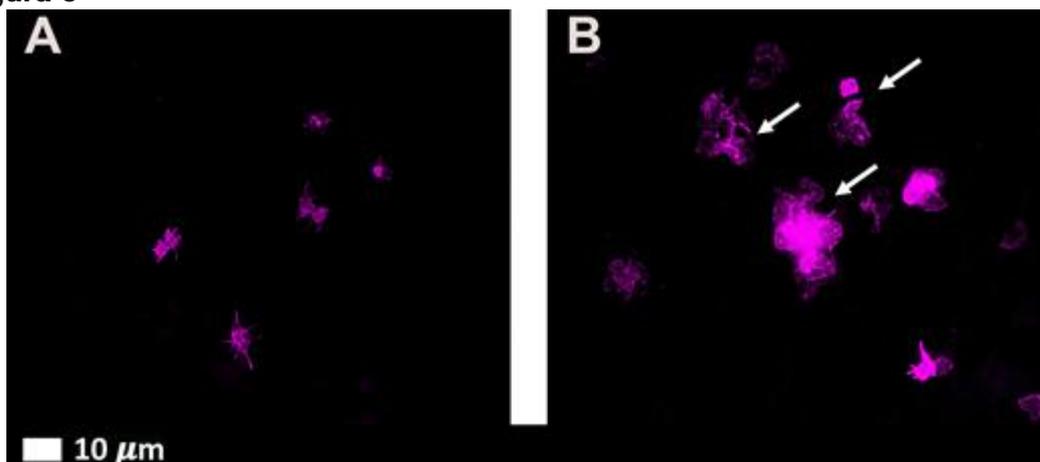
Porcentaje de área amiloide promedio en PPP con y sin proteína espiga y con y sin trombina

La significación estadística se estableció en $P < 0,05$. (* = $P < 0,01$). Los datos se representan como media \pm SD o mediana [Q1 - Q3].

Actividad plaquetaria

Se usó microscopía de fluorescencia para visualizar la activación plaquetaria en hematocrito sano ingenuo y hematocrito incubado con proteína de punta (1 ng.ml⁻¹ de concentración final). Las muestras se incubaron con el marcador de plaquetas, CD62P-PE. [La Figura 5A](#) muestra plaquetas representativas de muestras de control ingenuas, mientras que la [Figura 5B](#) muestra micrografías después de la incubación de la proteína de pico. La proteína espiga provocó un aumento en la hiperactivación plaquetaria (flechas B de la [Figura 5](#)).

Figura 5



[VER GRANDEDESCARGAR DIAPOSITIVA](#)

Micrografías de microscopía de fluorescencia de plaquetas, antes y después de la exposición a la proteína de punta

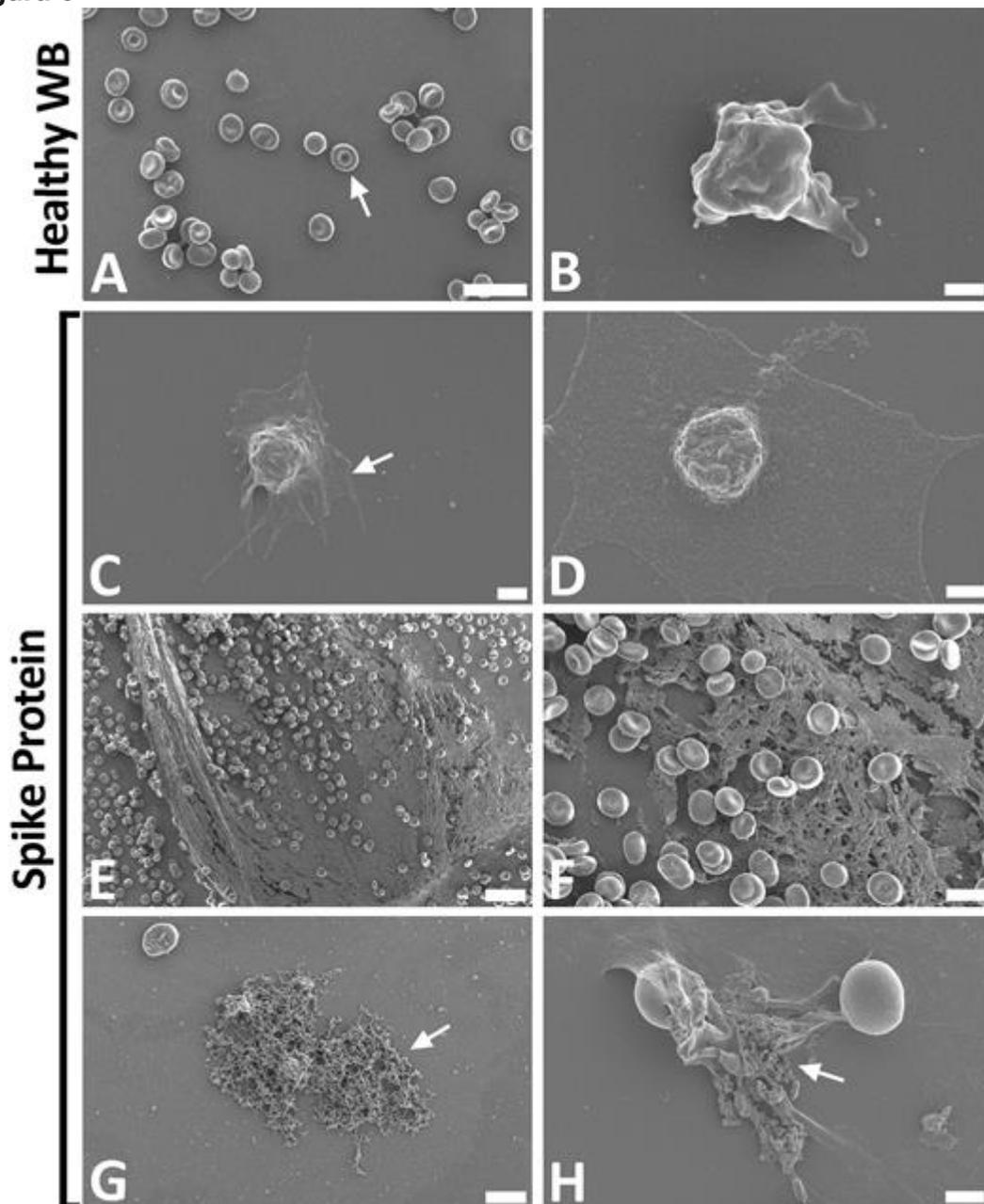
(A) Plaquetas representativas de hematocrito incubadas con marcador fluorescente, CD62P-PE. (B) Micrografías representativas que muestran plaquetas activadas después de la exposición a la proteína de punta. Las flechas blancas apuntan a plaquetas activadas hiperactivadas. Las flechas blancas muestran plaquetas hiperactivadas agrupándose.

SEM de WB

Se usó SEM para evaluar la ultraestructura de eritrocitos y plaquetas después del tratamiento con proteína de punta (1 ng.ml⁻¹ de concentración final). [La Figura 6](#) A, B muestra micrografías de muestras sanas de WB, mientras que la [Figura 6](#) C–H muestra micrografías de WB después de la incubación con proteína de pico. La mayoría de los eritrocitos de controles sanos no tratados

eran normocíticos (de forma regular) [**Figura 6** A (flecha)], y presentaban formas discoides características, superficies de membrana regulares y lisas. Se observa una ligera activación plaquetaria debido a la activación por contacto (**Figura 6**B). La WB incubada con proteína de punta mostró aglutinación de eritrocitos, a pesar de la concentración muy baja de proteína de punta. Se observó un aumento en la hiperactivación plaquetaria, la expansión de la membrana (**Figura 6** C, D) y la formación de micropartículas derivadas de plaquetas debido a la exposición a la proteína de punta. La formación de depósitos de fibrina(ógeno) espontáneos y anómalos con naturaleza amiloide, fueron prominentes en todas las muestras incubadas con proteína espiga, sin la adición de trombina [**Figura 6** E-H (flechas)].

Figura 6



[VER GRANDEDESCARGAR DIAPOSITIVA](#)

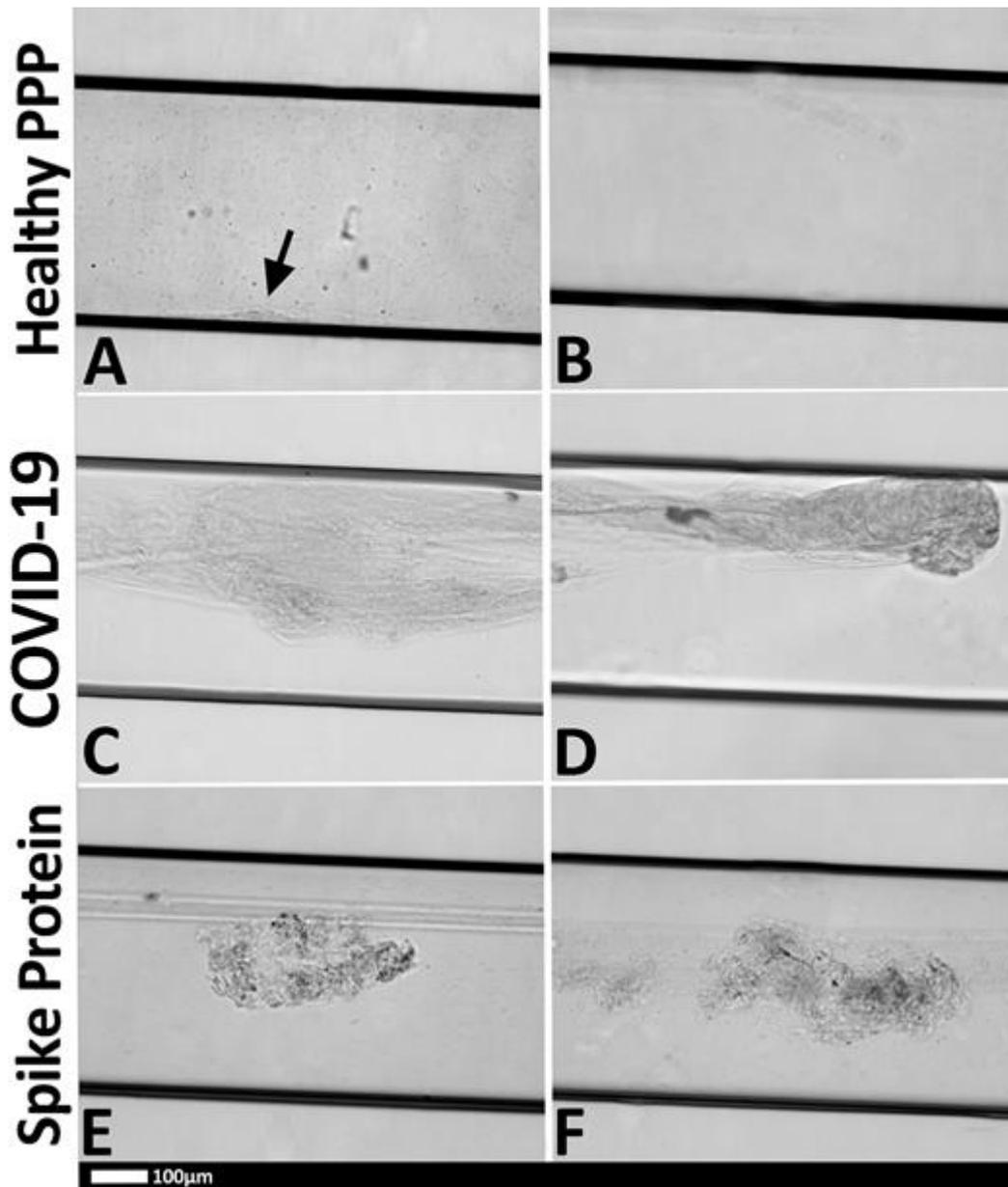
Muestra de sangre completa de voluntarios sanos, antes y después de la exposición a la proteína de pico

(A–H) Micrografías electrónicas de barrido representativas de WB de control saludable, con y sin proteína de punta. (A,B) Frotis de WB sanos, con una flecha que indica una ultraestructura de eritrocitos normal. (C–H) WB sana expuesta a proteína de punta (1 ng.ml^{-1} de concentración final), con (C,D) indicando las plaquetas activadas (flecha), (E,F) mostrando la red de fibrina formada espontáneamente y (G ,H) los depósitos anómalos que son de naturaleza amiloide (flechas) (barras de escala: (E) $20 \mu\text{m}$; (A) $10 \mu\text{m}$; (F,G) $5 \mu\text{m}$; (H) $2 \mu\text{m}$; (C) $1 \mu\text{m}$; (B, D) 500 nm).

microfluidos

La Figura 7 muestra los coágulos que se formaron en las cámaras de flujo después de 5 min de iniciar el experimento. El PPP saludable formó un pequeño coágulo a lo largo de la superficie inferior del canal, como se ve en la **Figura 7 A**. En el plasma saludable, la formación de coágulos fue un proceso relativamente lento y gradual, lo que resultó en la formación de un coágulo modesto (consulte el video complementario S1 de PPP saludable).). Los coágulos formados en PPP sanos eran relativamente pequeños y se limitaban a las paredes del canal de flujo. El coágulo tenía capas ordenadas que no interrumpían el flujo a través del centro del canal. Como era de esperar, la formación de coágulos también fue menos frecuente que con las otras muestras (**Figura 7 B**). El PPP con proteína espiga añadida mostró una combinación de un coágulo laminar fibroso y una masa coagulada desordenada (**Figura 7E,F**) (ver PPP saludable suplementario con proteína de pico añadida video S2). El PPP de COVID-19 muestra coágulos desordenados que cubren la mayor parte del canal y, a menudo, sobresalen hacia el centro del canal de flujo e interrumpen el flujo (**Figura 7 C, D**). En la PPP de COVID-19, la reacción entre la trombina y la PPP ocurrió rápidamente, lo que resultó en grandes coágulos después de aproximadamente 90 s (consulte el video S3 de PPP de pacientes con COVID-19 agrupados complementarios). Curiosamente, estos coágulos no se propagaron mucho después del estallido inicial, lo que indica que la mayor parte de la trombina se consumió en un corto período de tiempo. Los coágulos también se formaron con el PPP con la adición de la proteína de pico, pero no tan disruptivos como los coágulos de PPP COVID-19.

Figura 7



[VER GRANDESCARGAR DIAPOSITIVA](#)

Micrografías representativas de coágulos de PPP en las cámaras microfluídicas (las líneas horizontales negras son los contornos de las cámaras) que estaban recubiertas con trombina

(A) Coágulo de PPP saludable, con formación de un pequeño coágulo (flecha), con (B) ningún coágulo formado en la muestra de PPP saludable. (C,D) ejemplos de coágulos de muestras de PPP de COVID-19 y (E , F) coágulos de PPP sanos con proteína de punta. Flecha negra = pequeño coágulo formado en la muestra de control; flechas rojas grandes coágulos en la muestra de COVID-19.

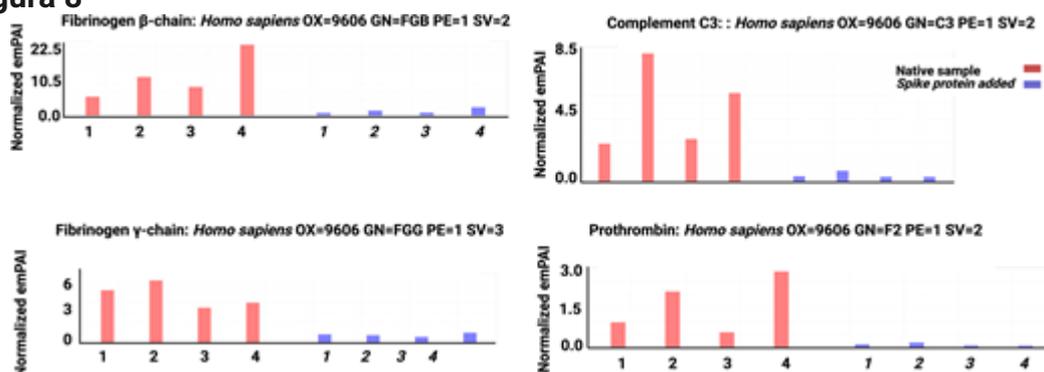
Una observación interesante fue que los coágulos de PPP sanos podían desprenderse fácilmente lavando el canal de flujo con agua a una velocidad de $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ($0,42 \text{ ms}^{-1}$). De manera similar, los coágulos de PPP sanos con proteína de pico añadida podrían desalojarse de manera similar. Los coágulos de COVID-19, por el contrario, no pudieron ser desplazados ni desalojados y permanecieron intactos, incluso con la fuerza del flujo de agua a alta velocidad

en un pequeño canal de flujo. Esta observación fue consistente para todas las muestras de COVID-19.

Análisis de espectrometría de masas

La **Figura 8** muestra los resultados del análisis de espectrometría de masas. La espectrometría de masas mostró que cuando se agrega proteína de punta a PPP saludable, se producen cambios estructurales en la fibrina β y γ , el complemento 3 y la protrombina. Estas proteínas fueron sustancialmente resistentes a la tripsinización, en presencia de proteína de punta (para obtener datos de secuencia, consulte los archivos complementarios).

Figura 8



[VER GRANDEDESCARGAR DIAPOSITIVA](#)

Espectrometría de masas que muestra PPP de cuatro muestras con y sin proteína de pico añadida

La proteína espiga da como resultado cambios estructurales en la fibrina β y γ (gen), el complemento 3 y la protrombina.

Discusión

En este análisis de laboratorio, proporcionamos evidencia de que la proteína espiga desempeña un papel importante en la hipercoagulabilidad observada en pacientes con COVID-19. Provoca una coagulación anómala tanto en el fibrinógeno fluorescente purificado como en la PPP de individuos sanos, en los que se demostró que la naturaleza de los coágulos era amiloide (ThT como nuestro colorante de amiloide de elección). Una observación interesante fue que estos depósitos densos se observaron tanto en frotis expuestos a la proteína de pico como cuando se añadió trombina. La adición de trombina hace que el fibrinógeno purificado (Alexa Fluor™ 488) se polimerice en redes de fibrina. Por lo general, estas redes son similares a una red (**Figura 3 A**). En presencia de proteína espiga, la estructura cambió para formar depósitos de coágulos densos (**Figura 3B**). Estos depósitos se observaron en nuestro modelo de fibrina(ógeno) fluorescente y PPP de individuos sanos expuestos a la proteína de punta. En PPP sanas expuestas a proteína espiga, seguida de incubación con ThT, hubo un aumento significativo de coágulos anómalos de naturaleza amiloide, (**Figura 4 D**), en comparación con las PPP sanas. En el documento actual, no analizamos muestras de sangre ni la propensión a la coagulación de PPP de otras cohortes de pacientes, por ejemplo, aquellos con

neumonía bacteriana u otras enfermedades virales agudas. Sin embargo, nuestro grupo (y otros) han estudiado previamente sangre de pacientes con VIH, donde se observó una hipercoagulación significativa en esta cohorte de pacientes [36–39]. También, recientemente, informamos hipercoagulación significativa en pacientes que sufren de COVID/PASC prolongado [40]. La proteína Spike también causó cambios ultraestructurales importantes en WB (como se ve con SEM), donde se observó hiperactivación de plaquetas (**Figura 6** C, D). También se observó un aumento en la red de fibrina formada espontáneamente, así como la formación anómala de coágulos en las micrografías SEM (**Figura 6** E–H). Curiosamente, se observó una extensa formación espontánea de redes de fibrina, sin la adición de trombina. Esto está en línea con los resultados que se publicaron recientemente, donde mostramos una ultraestructura similar en frotis de sangre de pacientes positivos para COVID-19. En estos pacientes, también se observaron hiperactivación plaquetaria, coagulación anómala con señal amiloide y formación espontánea de fibras de fibrina [6 , 7].

Con el sistema de flujo de microfluidos, se formaron coágulos, al infundir todo el microcanal con trombina, simulando así un estado de hipercoagulabilidad, donde el daño endotelial era extenso. Dado que el canal de flujo estaba hecho completamente de plástico y carecía de células endoteliales, el componente principal que se investigaba era la propia PPP (principalmente proteína fibrinógena), que, en el caso de las muestras de COVID-19, puede haber contenido efectos posteriores. de unos cambios endoteliales que darían lugar al estado de hipercoagulabilidad característico de la enfermedad. La configuración de flujo utilizada en el presente estudio no pudo explicar directamente los cambios endoteliales, pero no obstante demostró que COVID-19 también produce cambios en el perfil de coagulación de la PPP.

Los coágulos que se observaron en el PPP sano con proteína de punta añadida fueron de particular interés ya que demostraron un puente entre los coágulos de PPP sanos y los coágulos de COVID-19. Como se describe en la sección "Resultados", los coágulos de PPP saludables eran relativamente pequeños y ordenados, mientras que los coágulos de PPP de COVID-19 eran masas grandes y desordenadas que se formaron rápidamente e interrumpieron el flujo de PPP en el canal. Los coágulos de PPP sanos con proteína espiga añadida eran una combinación de los dos, demostrando áreas de coágulos agrupados desordenadamente, que coexistían con coágulos de PPP fibrosos laminares (que eran más grandes que los coágulos de PPP sanos). Este estado intermedio puede surgir de una serie de factores, incluida la interacción de otros actores biológicos que estaban ausentes en la configuración del flujo y el tiempo de exposición a la proteína de pico.

Una de las diferencias obvias, que se observó inadvertidamente al tratar de limpiar los canales con un flujo de agua de alta velocidad (es decir, por medios mecánicos), fue la facilidad de PPP saludable y PPP saludable con disolución de coágulos de proteína de punta añadida. Sin embargo, hubo un fracaso total para desalojar o perturbar los coágulos de PPP de COVID-19 de los canales. Dado que la lisis y disolución del coágulo es una interacción compleja entre factores bioquímicos y biofísicos, la investigación de los efectos de diferentes agentes terapéuticos podría dilucidar este fenómeno [41].]. El

protocolo de flujo utilizado en este estudio sería una plataforma útil para probar diferentes tratamientos para su aplicación clínica. Otra limitación de esta exploración es el uso de PPP para investigar la formación de coágulos a una escala apropiada para la microvasculatura. Si bien el protocolo permite el estudio de microcoágulos de fibrina, que son de interés en COVID-19, excluye la influencia de los glóbulos rojos, que se sabe que influyen en gran medida en el comportamiento del flujo sanguíneo no newtoniano a esa escala [42]. La imprecisión del régimen de flujo que surge de esta exclusión y de la variabilidad de la viscosidad introduce error en los resultados. No obstante, la inclusión del flujo en una escala espacial adecuada nos ha permitido observar la formación de coágulos de PPP de COVID-19 en el espacio y el tiempo, en condiciones dinámicas, y ha brindado información que de otro modo resultaría difícil de obtener.

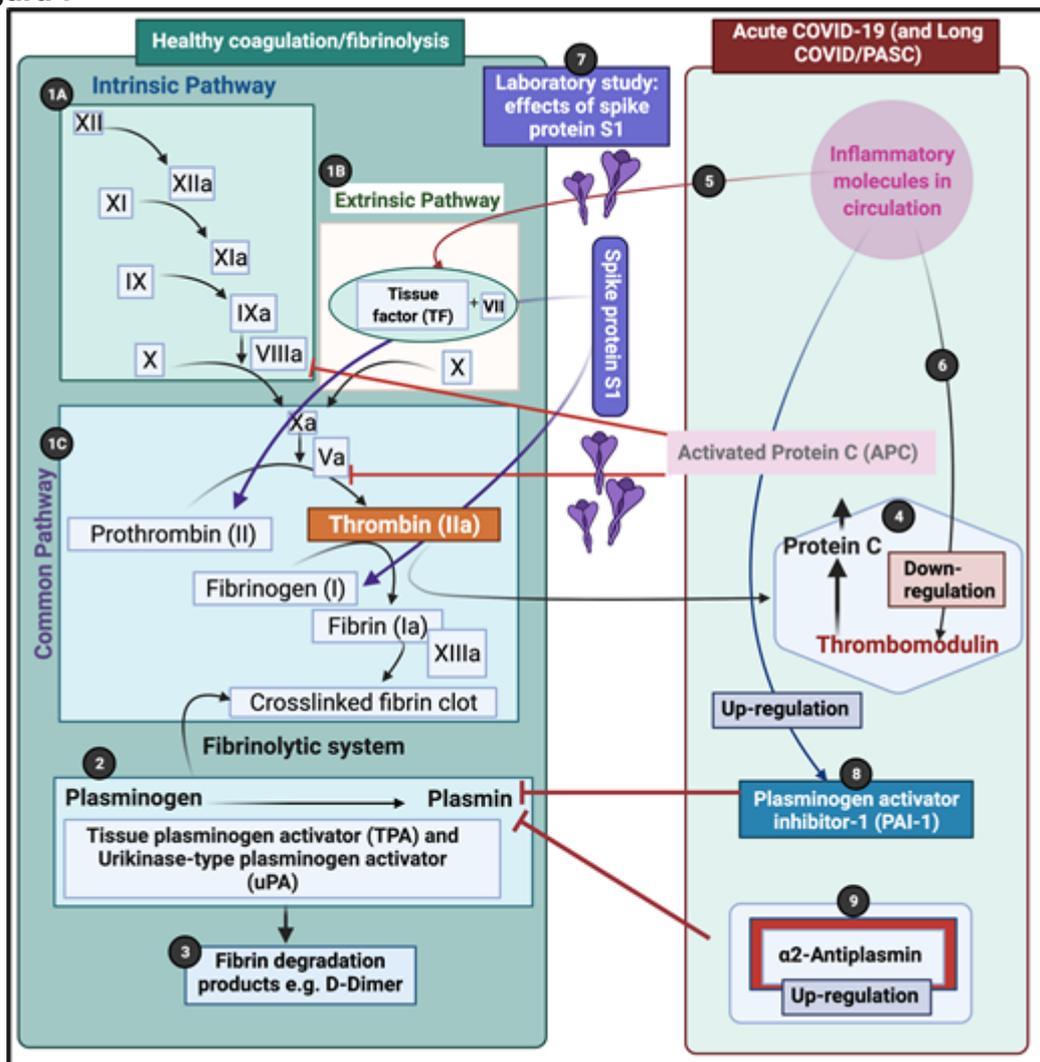
Otra vía de exploración incluiría examinar la estabilidad y eliminación del coágulo en otros pacientes con respuestas inflamatorias agudas derivadas de infecciones agudas. Longstaff y colaboradores encontraron una mayor resistencia fibrinolítica en afecciones inflamatorias derivadas de una infección aguda [43]. Sería beneficioso examinar este fenómeno en nuestra configuración de microfluidos.

Dado que los microcoágulos pueden bloquear los microcapilares y, por lo tanto, inhibir el intercambio de oxígeno, recientemente también estudiamos muestras de plasma, utilizando resultados proteómicos de Long COVID/PASC, T2DM, con COVID-19 agudo y comparamos los resultados con muestras de plasma de individuos sanos. Curiosamente, el plasma de T2DM y de individuos sanos se digirieron por completo de inmediato después de un primer paso de tripsinización; sin embargo, quedaron microcoágulos persistentes en las muestras de plasma de Long COVID/PASC y de muestras agudas de COVID-19, que aún contenían grandes depósitos anómalos (amiloide) (microcoágulos) [40]. Después de una segunda tripsinización, se solubilizaron los depósitos persistentes de gránulos. Detectamos varias moléculas inflamatorias que aumentan sustancialmente tanto en el sobrenadante como atrapadas en los depósitos de gránulos solubilizados de COVID-19 agudo y Long COVID/PASC, en comparación con el volumen equivalente de líquido completamente digerido de las muestras de control y T2DM [40]. De particular interés fue un aumento sustancial en α (2) -antiplasmina (α 2AP), varias cadenas de fibrinógeno en microcoágulos digeridos tanto con COVID-19 agudo como con COVID-19 largo/PASC. Una comparación entre el plasma sano y los coágulos solubilizados agudos de COVID-19 también mostró un aumento significativo en la cadena A del factor XIII de la coagulación, el componente C7 del complemento VWF y la PCR [40].

En el estudio actual, la espectrometría de masas confirmó que la proteína espiga provoca cambios estructurales en la fibrina(ogeno) β y γ , el complemento 3 y la protrombina. Estas proteínas se vuelven menos resistentes a la tripsinización y cambian la conformación, de tal manera que hay una diferencia significativa en la estructura del péptido antes y después de la adición de la proteína de pico. Los resultados actuales, por lo tanto, confirman los resultados que hemos encontrado en nuestro reciente análisis de proteómica [40].

Nuestros datos recientes sugieren que hay un aumento en la (2)-antiplasmina dentro de los microcoágulos tanto de la COVID-19 aguda como de la larga, y también observamos la fisiopatología en las cadenas de fibrinógeno. En el presente artículo, pudimos inducir la patología de la cadena de fibrinógeno, después de agregar proteína de punta al plasma sano. Para dar como resultado un aumento de moléculas como $\alpha 2$ -antiplasmina y VWF (y otras), en pacientes con COVID-19 agudo y también en aquellos con COVID/PASC prolongado, se deben activar muchas vías fisiológicas. Consulte la **Figura 9** (ajustada de [40 , 44-46]) para ver una representación visual de la vía de coagulación y dónde puede verse afectada por S1.

Figura 9



[VER GRANDEDESCARGAR DIAPOSITIVA](#)

Diagrama de coagulación simplificado que representa procesos saludables y patológicos

(1A) Las vías intrínseca y (1B) extrínseca convergen en la vía común (1C). Estas vías conducen a la conversión de fibrinógeno soluble en fibrina insoluble, catalizada por trombina. (2) El activador tisular del plasminógeno (tPA) o el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) convierte el plasminógeno en plasmina. Un sistema fibrinolítico saludable regula la vía de la coagulación y ayuda a la lisis exitosa del coágulo de fibrina insoluble. (3) La

plasmina escinde la fibrina en productos de degradación de fibrina (FDP), incluido el dímero D. (4) La proteína C y la trombomodulina regulan la coagulación: la trombina se une a su receptor, la trombomodulina, lo que da como resultado la proteína C activada (APC). Luego, APC inhibe tanto a Va como a VIIIa. (5) Las moléculas inflamatorias desreguladas pueden interferir con la expresión del factor tisular (TF). (6) Las moléculas inflamatorias desreguladas también pueden regular a la baja la trombomodulina, lo que da como resultado una hipercoagulación, ya que las actividades de Va y VIIIa no se modulan lo suficiente. (7) En nuestro estudio de laboratorio, agregamos la proteína Spike S1 al plasma sano. La fisiopatología se observó en las cadenas de protrombina y fibrinógeno. (8) Las moléculas inflamatorias desreguladas en circulación pueden inhibir el sistema fibrinolítico a través de la regulación positiva del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1). La regulación positiva de PAI-I interfiere con la función de tPA y, en última instancia, da como resultado un sistema de coagulación desregulado. (9) α 2AP inhibe la plasmina y, en última instancia, evitará que se produzca suficiente fibrinólisis. (Figura creada con Biorender.com).

Conclusión

La microscopía electrónica de barrido y de fluorescencia reveló masas amiloide y anómalas grandes y densas en WB y PPP de individuos sanos en los que se añadió proteína de punta a las muestras. La espectrometría de masas confirmó que cuando se agrega proteína de pico a PPP, interactúa con las proteínas plasmáticas, lo que da como resultado fibrina (ógeno), protrombina y otras proteínas vinculadas a la coagulación, para volverse sustancialmente resistentes a la tripsinización, lo que da como resultado menos fragmentos. El análisis de flujo confirmó que los microcoágulos pueden afectar el flujo sanguíneo. Aquí sugerimos que, en parte, la presencia de la proteína espiga S1 en circulación puede contribuir a la hipercoagulación en pacientes positivos para COVID-19 y puede causar un deterioro grave de la fibrinólisis. Los efectos de S2 también podrían ser relevantes y también deberían investigarse en el futuro. [47-52](#)]. Varios resultados de autopsias también han confirmado microtrombos en todo el pulmón y asociados con la dilatación del ventrículo derecho del corazón. Recientemente, Ackermann y colaboradores informaron que el análisis histológico de los vasos pulmonares en pacientes con COVID-19 muestra una trombosis generalizada con microangiopatía [[4](#)]. Los autores también demostraron que los microtrombos alveolocapilares eran nueve veces más frecuentes en pacientes con COVID-19 que en pacientes con influenza ($P < 0,001$). Por lo tanto, el deterioro fibrinolítico puede ser la causa directa de los grandes microcoágulos que hemos observado aquí en SEM y microscopía de fluorescencia, y anteriormente en muestras de plasma de pacientes con COVID-19 [[6](#) , [7](#)]. Por lo tanto, las patologías de la coagulación en la infección aguda por COVID-19 podrían beneficiarse de seguir un régimen de terapia anticoagulante continua para apoyar la función del sistema fibrinolítico [[40](#)].

Disponibilidad de datos

Se puede acceder a todo el material complementario y los datos sin procesar aquí: <https://1drv.ms/u/s!AgoCOmY3bkKHsg5J0nb6wqsBzzWAQ?e=XAsc7w>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses asociados con el manuscrito.

Fondos

Este trabajo fue apoyado por la Fundación Novo Nordisk [número de subvención NNF10CC1016517 (a Douglas B. Kell)].

Acceso abierto

El acceso abierto para este artículo fue posible gracias a la participación de la Universidad de Liverpool en un programa piloto integral de *lectura y publicación* con Portland Press y la Sociedad Bioquímica en virtud de un acuerdo transformador con JISC.

Contribución del autor CRediT

Lize M. Grobbelaar: análisis formal, visualización, escritura: borrador original. **Chantelle Venter:** Curación de datos, Administración de proyectos. **Mare Vlok:** Software, Análisis formal, Investigación. **Malebogo Ngoepe:** Metodología. **Gert Jacobus Laubscher:** Redacción: revisión y edición. **Petrus Johannes Lourens:** Redacción: revisión y edición. **Janami Steenkamp:** administración de proyectos, redacción: revisión y edición. **Douglas B Kell:** Redacción: revisión y edición. **Eteresia Pretoria:** Conceptualización, Recursos, Análisis formal, Supervisión, Obtención de fondos, Validación, Investigación, Visualización, Metodología, Administración de proyectos, Redacción—revisión y edición.

Aprobación de ética

La autorización ética para el estudio se obtuvo del Comité de Ética de Investigación en Salud (HREC) de la Universidad de Stellenbosch (Sudáfrica) (referencia: N19/03/043, ID del proyecto: 9521). Los objetivos experimentales, los riesgos y los detalles se explicaron a los voluntarios tanto verbalmente como por texto y se obtuvo el consentimiento informado antes de la extracción de sangre. Se mantuvo el estricto cumplimiento de las pautas y principios éticos de la Declaración de Helsinki, las Pautas sudafricanas para las buenas prácticas clínicas y las Pautas éticas para la investigación del Consejo de Investigación Médica durante la duración del estudio y para todos los protocolos de investigación.

Consentimiento para Publicación

Todos los autores aprobaron la presentación del artículo.

abreviaturas

COVID-19	enfermedad del coronavirus 2019
PCR	Proteína C-reactiva
FA	formaldehído
PBS	solución salina tamponada con fosfato
PPA	plasma pobre en plaquetas
SARS-CoV-2	síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2
SEM	microscopía electrónica de barrido
THT	Tioflavina T
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
VWF	Factor von Willebrand
WB	Sangre pura

References

1. Gupta A., Madhavan M.V., Sehgal K., Nair N., Mahajan S., Sehrawat T.S. et al. (2020) Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat. Med.* 26, 1017–1032
<https://doi.org/10.1038/s41591-020-0968-3>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
2. Perico L., Benigni A., Casiraghi F., Ng L.F.P., Renia L. and Remuzzi G. (2021) Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat. Rev. Nephrol.* 17, 46–64
<https://doi.org/10.1038/s41581-020-00357-4>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
3. Goshua G., Pine A.B., Meizlish M.L., Chang C.H., Zhang H., Bahel P. et al. (2020) Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet Haematol.* e575–e582 [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(20\)30216-7](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(20)30216-7)[PubMed]
[Google Scholar](#)
4. Ackermann M., Verleden S.E., Kuehnel M., Haverich A., Welte T., Laenger F. et al. (2020) Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 383, 120–128 <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2015432>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
5. Grobler C., Maphumulo S.C., Grobbelaar L.M., Bredenkamp J.C., Laubscher G.J., Lourens P.J. et al. (2020) Covid-19: The rollercoaster of fibrin(ogen), D-dimer, von Willebrand Factor, P-selectin and their interactions with endothelial cells, platelets and erythrocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5168
<https://doi.org/10.3390/ijms21145168>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#)
6. Pretorius E., Venter C., Laubscher G.J., Lourens P.J., Steenkamp J. and Kell D.B. (2020) Prevalence of readily detected amyloid blood clots in 'unclotted' Type 2 diabetes mellitus and COVID-19 plasma: a preliminary report. *Cardiovasc. Diabetol.* 19, 193
<https://doi.org/10.1186/s12933-020-01165-7>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
7. Venter C., Bezuidenhout J.A., Laubscher G.J., Lourens P.J., Steenkamp J., Kell D.B. et al. (2020) Erythrocyte, platelet, serum ferritin, and P-selectin pathophysiology implicated in severe hypercoagulation and vascular complications in COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 8234
<https://doi.org/10.3390/ijms21218234>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#)

8. Roberts I., Muelas M.W., Taylor J.M., Davison A.S., Xu Y., Grixti J.M. et al. (2020) Untargeted metabolomics of COVID-19 patient serum reveals potential prognostic markers of both severity and outcome. *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.12.09.20246389>
[Google Scholar](#)
9. Renzi S., Landoni G., Zangrillo A. and Ciceri F. (2020) MicroCLOTS pathophysiology in COVID 19. *Korean J. Intern. Med.* <https://doi.org/10.3904/kjim.2020.336>[PubMed]
[Google Scholar](#)
10. Ciceri F., Beretta L., Scandroglio A.M., Colombo S., Landoni G., Ruggeri A. et al. (2020) Microvascular COVID-19 lung vessels obstructive thromboinflammatory syndrome (MicroCLOTS): an atypical acute respiratory distress syndrome working hypothesis. *Crit. Care Resusc.* 22, 95–97 [PubMed]
[Google Scholar](#) [PubMed](#)
11. Bobrova L., Kozlovskaya N., Korotchaeva Y., Bobkova I., Kamyshova E. and Moiseev S. (2020) Microvascular COVID-19 lung vessels obstructive thromboinflammatory syndrome (MicroCLOTS): a new variant of thrombotic microangiopathy? *Crit. Care Resusc.* 22, 284[PubMed]
[Google Scholar](#) [PubMed](#)
12. Lam L.M., Murphy S.J., Kuri-Cervantes L., Weisman A.R., Ittner C.A.G., Reilly J.P. et al. (2020) Erythrocytes reveal complement activation in patients with COVID-19. *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.05.20.20104398>
[Google Scholar](#)
13. Berzuini A., Bianco C., Paccapelo C., Bertolini F., Gregato G., Cattaneo A. et al. (2020) Red cell-bound antibodies and transfusion requirements in hospitalized patients with COVID-19. *Blood* 136, 766–768 <https://doi.org/10.1182/blood.2020006695>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
14. Akhter N., Ahmad S., Alzahrani F.A., Dar S.A., Wahid M., Haque S. et al. (2020) Impact of COVID-19 on the cerebrovascular system and the prevention of RBC lysis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 24, 10267–10278 [PubMed]
[Google Scholar](#) [PubMed](#)
15. Bergmann C.C. and Silverman R.H. (2020) COVID-19: coronavirus replication, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Cleve. Clin. J. Med.* 87, 321–327 <https://doi.org/10.3949/ccjm.87a.20047>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)

16. Kawase M., Kataoka M., Shirato K. and Matsuyama S. (2019) Biochemical analysis of coronavirus spike glycoprotein conformational intermediates during membrane fusion. *J. Virol.* 93, e00785–19 <https://doi.org/10.1128/JVI.00785-19>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
17. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T. and Veerler D. (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* 181, 281.e286–292.e286 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#)
18. Zhang C., Zheng W., Huang X., Bell E.W., Zhou X. and Zhang Y. (2020) Protein structure and sequence re-analysis of 2019-nCoV genome does not indicate snakes as its intermediate host or the unique similarity between its spike protein insertions and HIV-1. *bioRxiv* 19, 1351–1360 <https://doi.org/10.1101/2020.02.04.933135>
[Google Scholar](#)
19. Watanabe Y., Allen J.D., Wrapp D., McLellan J.S. and Crispin M. (2020) Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science* 369, 330–333 <https://doi.org/10.1126/science.abb9983> [PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
20. Flores-Alanis A., Sandner-Miranda L., Delgado G., Cravioto A. and Morales-Espinosa R. (2020) The receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein is the result of an ancestral recombination between the bat-CoV RaTG13 and the pangolin-CoV MP789. *BMC Res. Notes* 13, 398 <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05242-8>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
21. Duan L., Zheng Q., Zhang H., Niu Y., Lou Y. and Wang H. (2020) The SARS-CoV-2 spike glycoprotein biosynthesis, structure, function, and antigenicity: implications for the design of spike-based vaccine immunogens. *Front. Immunol.* 11, 576622 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.576622>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
22. George S., Pal A.C., Gagnon J., Timalisina S., Singh P., Vydyam P. et al. (2021) Evidence for SARS-CoV-2 spike protein in the urine of COVID-19 patients. *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.01.27.21250637>
[Google Scholar](#)
23. Rhea E.M., Logsdon A.F., Hansen K.M., Williams L.M., Reed M.J., Baumann K.K. et al. (2021) The S1 protein of SARS-CoV-2 crosses the blood–brain barrier in mice. *Nat. Neurosci.* 24, 368–378 <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00771-8>[PubMed]

24. Letarov A.V., Babenko V.V. and Kulikov E.E. (2020) Free SARS-CoV-2 spike protein S1 particles may play a role in the pathogenesis of COVID-19 infection. *Biochemistry (Moscow)* 86, 257–261
<https://doi.org/10.1134/S0006297921030032>
[Google Scholar](#) [Crossref](#)
25. Buzhdygan T.P., DeOre B.J., Baldwin-Leclair A., McGary H., Razmpour R., Galie P.A. et al. (2020) The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in vitro models of the human blood–brain barrier. *bioRxiv*[[PubMed](#)]
[Google Scholar](#)
26. Pretorius E., Oberholzer H.M., van der Spuy W.J. and Meiring J.H. (2010) Smoking and coagulation: the sticky fibrin phenomenon. *Ultrastruct. Pathol.* 34, 236–239
<https://doi.org/10.3109/01913121003743716>[[PubMed](#)]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
27. Kell D.B. and Pretorius E. (2017) Proteins behaving badly. Substoichiometric molecular control and amplification of the initiation and nature of amyloid fibril formation: lessons from and for blood clotting. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 123, 16–41 <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.08.006>
[[PubMed](#)]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
28. Pretorius E., Bester J., Mbotwa S., Robinson C. and Kell D.B. (2016) Acute induction of anomalous blood clotting by molecular amplification of highly substoichiometric levels of bacterial lipopolysaccharide. *J. R. Soc. Interface* 13, 20160539[[PubMed](#)], PMC5046953
<https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0539>
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
29. Pretorius E., Vermeulen N., Bester J., Lipinski B. and Kell D.B. (2013) A novel method for assessing the role of iron and its functional chelation in fibrin fibril formation: the use of scanning electron microscopy. *Toxicol. Mech. Methods* 23, 352–359
<https://doi.org/10.3109/15376516.2012.762082>[[PubMed](#)]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
30. Pretorius E. (2013) The adaptability of red blood cells. *Cardiovasc. Diabetol.* 12, 63
<https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-63>[[PubMed](#)]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)

31. Pretorius E., Vermeulen N., Bester J. and Lipinski B. (2013) Novel use of scanning electron microscopy for detection of iron-induced morphological changes in human blood. *Microsc. Res. Tech.* 76, 268–271 <https://doi.org/10.1002/jemt.22163>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
32. Jacob M., Chappell D. and Becker B.F. (2016) Regulation of blood flow and volume exchange across the microcirculation. *Crit. Care* 20, 319 <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1485-0>
[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
33. Adams B., Nunes J.M., Page M.J., Roberts T., Carr J., Nell T.A. et al. (2019) Parkinson's disease: a systemic inflammatory disease accompanied by bacterial inflammagens. *Front. Aging Neurosci.* 11, 210 <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00210>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
34. de Waal G.M., Engelbrecht L., Davis T., de Villiers W.J.S., Kell D.B. and Pretorius E. (2018) Correlative light-electron microscopy detects lipopolysaccharide and its association with fibrin fibres in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and Type 2 diabetes mellitus. *Sci. Rep.* 8, 16798 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35009-y>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
35. Page M.J., Thomson G.J.A., Nunes J.M., Engelbrecht A.M., Nell T.A., de Villiers W.J.S. et al. (2019) Serum amyloid A binds to fibrin(ogen), promoting fibrin amyloid formation. *Sci. Rep.* 9, 3102 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39056-x>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
36. Jackson B.S., Nunes Goncalves J. and Pretorius E. (2020) Comparison of pathological clotting using haematological, functional and morphological investigations in HIV-positive and HIV-negative patients with deep vein thrombosis. *Retrovirology* 17, 14 <https://doi.org/10.1186/s12977-020-00523-3>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
37. Jackson B.S. and Pretorius E. (2019) Pathological clotting and deep vein thrombosis in patients with HIV. *Semin. Thromb. Hemost.* 45, 132–140 <https://doi.org/10.1055/s-0038-1676374>
[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)

38. Teer E., Joseph D.E., Driescher N., Nell T.A., Dominick L., Midgley N. et al. (2019) HIV and cardiovascular diseases risk: exploring the interplay between T-cell activation, coagulation, monocyte subsets, and lipid subclass alterations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 316, H1146–H1157 <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00797.2018>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
39. Green S.A., Smith M., Hasley R.B., Stephany D., Harned A., Nagashima K. et al. (2015) Activated platelet-T-cell conjugates in peripheral blood of patients with HIV infection: coupling coagulation/inflammation and T cells. *AIDS* 29, 1297–1308
<https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000701>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
40. Pretorius E., Vlok M., Venter C., Bezuidenhout J.A., Laubscher G.J., Steenkamp J. et al. (2021) Persistent clotting protein pathology in Long COVID/post-acute sequelae of COVID-19 (PASC) is accompanied by increased levels of antiplasmin. *medRxiv*
<https://doi.org/10.1101/2021.05.21.21257578>
[Google Scholar](#)
41. Hudson N.E. (2017) Biophysical mechanisms mediating fibrin fiber lysis. *Biomed Res. Int.* 2017, 2748340 <https://doi.org/10.1155/2017/2748340>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
42. McHedlishvili G. (1998) Disturbed blood flow structuring as critical factor of hemorheological disorders in microcirculation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 19, 315–325 [PubMed]
[Google Scholar](#) [PubMed](#)
43. Longstaff C., Varjú I., Sótonyi P., Szabó L., Krumrey M., Hoell A. et al. (2013) Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J. Biol. Chem.* 288, 6946–6956 <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.404301>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
44. Kell D.B. and Pretorius E. (2015) The simultaneous occurrence of both hypercoagulability and hypofibrinolysis in blood and serum during systemic inflammation, and the roles of iron and fibrin(ogen). *Integr. Biol. (Camb.)* 7, 24–52 <https://doi.org/10.1039/c4ib00173g>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
45. de Waal G.M., de Villiers W.J. and Pretorius E. (2021) The link between bacterial inflammagens, leaky gut syndrome and colorectal cancer. *Curr. Med. Chem.*
<https://doi.org/10.2174/0929867328666210219142737>[PubMed]
[Google Scholar](#)

46. Miszta A., Huskens D., Donkervoort D., Roberts M.J.M., Wolberg A.S. and de Laat B. (2021) Assessing plasmin generation in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2758
<https://doi.org/10.3390/ijms22052758>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
47. Giannis D., Ziogas I.A. and Gianni P. (2020) Coagulation disorders in coronavirus infected patients: COVID-19, SARS-CoV-1, MERS-CoV and lessons from the past. *J. Clin. Virol.* 127, 104362
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104362>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
48. Kollias A., Kyriakoulis K.G., Dimakakos E., Poulakou G., Stergiou G.S. and Syrigos K. (2020) Thromboembolic risk and anticoagulant therapy in COVID-19 patients: emerging evidence and call for action. *Br. J. Haematol.* 189, 846–847 <https://doi.org/10.1111/bjh.16727>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
49. Middeldorp S., Coppens M., van Haaps T.F., Foppen M., Vlaar A.P., Müller M.C.A. et al. (2020) Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. *J. Thromb. Haemost.* 18, 1995–2002 <https://doi.org/10.1111/jth.14888>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
50. Miesbach W. and Makris M. (2020) COVID-19: coagulopathy, risk of thrombosis, and the rationale for anticoagulation. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 26, 1076029620938149,
<https://doi.org/10.1177/1076029620938149>
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
51. Levi M., Thachil J., Iba T. and Levy J.H. (2020) Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol.* 7, e438–e440
[https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(20\)30145-9](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(20)30145-9)[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
52. Liu P.P., Blet A., Smyth D. and Li H. (2020) The science underlying COVID-19: implications for the cardiovascular system. *Circulation* 142, 68–78
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047549>[PubMed]
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)

© 2021 El(los) autor(es).

Este es un artículo de acceso abierto publicado por Portland Press Limited en nombre de Biochemical Society y distribuido bajo [Creative Commons Attribution License 4.0 \(CC BY\)](#). El acceso abierto para este artículo fue posible gracias a la participación de la Universidad de Liverpool en un programa piloto integral de *lectura y publicación* con Portland Press y la Sociedad Bioquímica en virtud de un acuerdo transformador con JISC.