

ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Revisión bibliográfica	4
3.1. Hemostasia	4
3.2. Micropartículas (MPs)	8
3.3. Inmunidad innata	13
3.4. Receptores <i>Toll like</i> (TLRs)	13
3.5. Infección bacteriana	19
3.5.1. Bacterias	19
3.6. Infección bacteriana, activación plaquetaria y micropartículas	20
3.7. Frutas y hortalizas con efecto antitrombótico	24
4. Objetivos	28
5. Materiales y métodos	29
5.1. Preparación de extractos	29
5.1.1. Extracción metanólica	29
5.1.2. Preparación de las soluciones estándares de extracto	30
5.2. Compuestos	30
5.3. Agonistas plaquetarios	31
5.4. Lipopolisacárido	31
5.5. Obtención muestra para plasma rico en plaquetas (PRP)	32
5.6. Obtención muestra plaquetas lavadas	33
5.7. Estandarización generación de PDMPs y detección en citómetro de flujo	36
5.7.1. Estimulación PRP y obtención PDMPs	36
5.7.2. Caracterización PDMPs por citometría de flujo	36
5.8. Estimulación plaquetas lavadas y generación de PDMPs	37
5.9. Estimulación plaquetas lavadas mediada por TLR4	38

5.10. Inhibición mediante extracto o compuesto de generación PDMPs mediada por TLR4	38
5.11. Análisis por citometría de flujo de PDMPs	39
5.11.1. Marcaje con anticuerpos	39
5.11.2. Análisis en citómetro de flujo	40
5.12. Análisis estadístico	41
6. Resultados	42
6.1. Caracterización Micropartículas derivadas de plaquetas (PDMPs) por citometría de flujo	42
6.2. Estandarización detección y generación PDMPs	45
6.3. Estudio generación PDMPs <i>in vivo</i> mediada por el receptor de tipo <i>toll-4</i>	67
6.4. Efecto inhibitorio de extractos en generación PDMPs mediada por el receptor de tipo <i>toll-4</i>	79
6.5. Efecto inhibitorio de compuestos bioactivos en generación PDMPs mediada por el receptor de tipo <i>toll-4</i>	97
7. Discusión	117
8. Conclusión	128
9. Bibliografía	130

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cascada de coagulación	7
Figura 2. Posible mecanismo responsable de la formación de liberación de micropartículas	9
Figura 3. Efectos producidos por MPs sobre células endoteliales	11
Figura 4. Vía de señalización TLR y modulación de moléculas efectora	16
Figura 5. Mecanismos generales de patogenicidad bacteriana	19
Figura 6. Activación y agregación plaquetaria inducida por bacterias	21
Figura 7. Mecanismo involucrado en mediación de activación plaquetaria por TLR4	22
Figura 8. Obtención plaquetas lavadas	35
Figura 9. Coagulómetro RAL Clot-1 (automático).	37
Figura 10. Citómetro de flujo Accuri C6 BD Science	40
Figura 11. Caracterización micropartículas derivadas de plaquetas	43
Figura 12. Porcentaje PDMPs positivas a marcaje	44
Figura 13. Estandarización detección PDMPs	46
Figura 14. PDMPs basales de plasma rico en plaquetas	48
Figura 15. PDMPs generadas en PRP estimulando durante 30 minutos con trombina	50
Figura 16. PDMPs generadas en PRP estimulando durante 60 minutos con trombina	52
Figura 17. Porcentaje generación de PDMPs en PRP según tiempo de estimulación	54

Figura 18.	PDMPs basales en plaquetas lavadas	56
Figura 19.	PDMPs generadas en plaquetas lavadas estimulando durante 15 minutos con trombina	58
Figura 20.	PDMPs generadas en plaquetas lavadas estimulando durante 30 minutos con trombina	60
Figura 21.	PDMPs generadas en plaquetas lavadas estimulando durante 60 minutos con trombina	62
Figura 22.	PDMPs generadas en plaquetas lavadas estimulando durante 120 minutos con trombina	64
Figura 23.	Porcentaje de generación de PDMPs en plaquetas lavadas según tiempo de estimulación	66
Figura 24.	Generación espontánea de PDMPs en plaquetas lavadas	68
Figura 25.	PDMPs generadas en plaquetas lavadas estimuladas con ADP 4 μ M	70
Figura 26.	PDMPs generadas en plaquetas lavadas estimuladas con ADP 1 μ M	72
Figura 27.	PDMPs generadas en plaquetas lavadas estimuladas con LPS 9 μ g/mL	74
Figura 28.	PDMPs generadas en plaquetas lavadas estimuladas con ADP 1 μ M + LPS 9 μ g/mL	76
Figura 29.	Porcentaje de generación de PDMPs en plaquetas lavadas según estimulación	78
Figura 30.	Porcentaje de viabilidad celular de extractos metanólicos mediante Azul de Tripan	90
Figura 31.	Porcentaje de viabilidad celular de extractos metanólicos mediante MTT	82
Figura 32.	Efecto inhibitorio de generación de PDMPs de frutilla	84
Figura 33.	Gráfico efecto inhibitorio de generación de PDMPs de frutilla	85
Figura 34.	Efecto inhibitorio de generación de PDMPs de tomate	87

Figura 35.	Gráfico efecto inhibitorio de generación de PDMPs de tomate	88
Figura 36.	Efecto inhibitorio de generación de PDMPs de arándano	90
Figura 37.	Gráfico efecto inhibitorio de generación de PDMPs de arándano	91
Figura 38.	Efecto inhibitorio de generación de PDMPs de calafate	93
Figura 39.	Gráfico efecto inhibitorio de generación de PDMPs de calafate	94
Figura 40.	Porcentaje de generación PDMPs según extractos metanólicos	96
Figura 41.	Porcentaje de viabilidad celular mediante Azul de Tripan según compuesto bioactivo	98
Figura 42.	Porcentaje de viabilidad celular mediante MTT según compuesto bioactivo	99
Figura 43.	Efecto inhibitorio de generación de PDMPs de guanosina	101
Figura 44.	Gráfico efecto inhibitorio de generación de PDMPs de guanosina	102
Figura 45.	Efecto inhibitorio de generación de PDMPs de ácido ferúlico	104
Figura 46.	Gráfico efecto inhibitorio de generación de PDMPs de ácido ferúlico	105
Figura 47.	Efecto inhibitorio de generación de PDMPs de ácido cafeico	107
Figura 48.	Gráfico efecto inhibitorio de generación de PDMPs de ácido cafeico	108
Figura 49.	Efecto inhibitorio de generación de PDMPs de AMP	110
Figura 50.	Gráfico efecto inhibitorio de generación de PDMPs de AMP	111
Figura 51.	Efecto inhibitorio de generación de PDMPs de ácido cumarínico	113
Figura 52.	Gráfico efecto inhibitorio de generación de PDMPs de ácido cumarínico	114
Figura 53.	Porcentaje de generación PDMPs según compuesto bioactivo	116

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Receptores de tipo <i>toll</i> y sus ligando	14