



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ACTIVIDAD ANTIPLAQUETARIA DE CLORO-
ACILHIDROQUINONA (HQM5BCI)**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN
TECNOLOGÍA MÉDICA**

AUTOR: FRANCO VALENZUELA HERNANDEZ

PROFESOR GUIA: DR. TM. EDUARDO FUENTES QUINTEROS

TALCA-CHILE

2020

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

DEDICATORIA

*A mi familia, amigos y amigas, y a cada persona que ha contribuido
en mi desarrollo como persona durante el trayecto de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Gracias al profesor Dr. TM. Eduardo Fuentes por su ayuda en esta investigación. Al profesional TM. Diego Méndez por su apoyo durante este periodo y gracias a ANID/CONICYT, FONDECYT N° 1180427 por el financiamiento. Y por sobre todo a mis compañeros y compañeras que me han ayudado a lo largo de esta carrera.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS.....	1
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	3
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
MARCO TEÓRICO.....	7
1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.....	7
2. TROMBOSIS.....	9
3. PLAQUETAS.....	10
4. ACTIVACIÓN PLAQUETARIA.....	15
5. AGREGACIÓN PLAQUETARIA.....	17
6. ANTICOAGULANTES Y ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS.....	18
6.1 ANTICOAGULANTES PLAQUETARIOS.....	18
6.2 ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS.....	19
7. TERAPIA ANTIPLAQUETARIA.....	22
8. NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIPLAQUETARIA.....	31
9. CITOMETRÍA DE FLUJO Y MARCADORES DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA.....	33
HIPÓTESIS.....	38
OBJETIVO GENERAL.....	38
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	38
MATERIALES Y METODOS.....	39
BUFFER TYRODES SIN CALCIO AJUSTADO A Ph 7,4.....	39
PROTOCOLO AGREGACION CON PLAQUETAS LAVADAS.....	40
PROTOCOLO ANEXINA V.....	41

PROTOCOLO MEDICION ERO EN PLAQUETAS LAVADAS CON SONDA DIHYDROETHIDIUM.....	41
PROTOCOLO CD62 Y CD63.....	42
RESULTADOS.....	44
INHIBICIÓN DE AGREGACION PLAQUETAR POR HQM5BCl.....	44
NIVELES DE ERO EN PRESENCIA DE HQM5BCl.....	45
NIVELES DE ANEXINA V EN PRESENCIA DE HQM5BCl.....	46
EXPRESIÓN DE P-SELECTINA EN PRESENCIA DE HQM5BCl.....	47
EXPRESIÓN DE CD63 EN PRESENCIA DE HQM5BCl.....	48
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIÓN.....	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

1. CONTENIDO DE LOS GRANULOS ALFA EN LA PLAQUETA.....13
2. RECOMENDACIONES DE ANTIPLAQUETARIOS EN PRACT. CLINCA.....29

FIGURAS

1. MORTALIDAD POR ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES SEGÚN GRUPO DE EDAD EN CHILE.....8
2. INICIO DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA.....18
3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIPLAQUETARIOS.....22
4. ESTRUCTURA DEL ÁCIDO SALICILICO.....25
5. REPRESENTACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS QUÍMICAS CON ACTIVIDAD ANTI TROMBÓTICA.....33
6. INHIBICIÓN DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PRESENCIA DE HQM5BCl.....44
7. NIVELES DE ERO EN PRESENCIA DE HQM5BCl.....45
8. NIVELES DE ANEXINA V EN PRESENCIA DE H1M5BCl46
9. EXPRESIÓN DE P-SELECTINA EN PRESENCIA DE HQM5BCl.....47
10. EXPRESIÓN DE CD63 EN PRESENCIA DE HQM5BCl.....48

RESUMEN

La búsqueda de nuevos compuestos antiplaquetarios es de suma importancia debido a la gran cantidad de morbimortalidad que presentan las enfermedades cardiovasculares asociadas a diferentes linajes celulares, en este caso, las plaquetas. Las plaquetas son claves en la hemostasia y por lo cual, variaciones en este componente sanguíneo pueden provocar diferentes afecciones dependiendo de a qué nivel se esté afectando. En esta investigación experimental se trabajó con plaquetas lavadas las cuales se activaron con colágeno y TRAP, potentes activadores plaquetarios usados a menudo para posteriormente comprobar la eficiencia de HQM5BCl como un nuevo antiagregante plaquetario. Para esto se utilizaron mediciones como la expresión de p-selectina, CD63, niveles de ERO (Especies reactivas de oxígeno) y anexina V en la superficie celular mediante citometría de flujo y una sonda Dihydroethidium (para las especies reactivas de oxígeno). De estos estudios se extrajo que la HQM5BCl logró disminuir el cincuenta por ciento de la agregación plaquetaria a una concentración de $6 \pm 3 \mu\text{M}$ pero no da cuenta de su mecanismo de acción. En cuanto a la generación de ERO se puede decir que el HQM5BCl genera ERO y por tanto su actividad antiplaquetaria no estaría relacionada a la disminución de la producción de ERO. Con los estudios relacionados a la anexina V se vio que la disminución de agregación plaquetaria no era por pérdida de funcionalidad de la plaqueta para que no llega a formarse el agregado plaquetar in vitro. Mientras que con respecto a los niveles de p-selectina y CD63 se vio una disminución en su expresión. Se necesitarían más estudios para comprobar el mecanismo de acción de este compuesto, sin embargo, se puede apreciar que tiene potencial como antiagregante plaquetario in vitro.

Palabras claves: Antiagregante plaquetario, HQM5BCl, TRAP, citometría de flujo, p-selectina.

INTRODUCCIÓN

La hemostasia del cuerpo se puede entender como el equilibrio de los procesos hemorrágicos y trombóticos de la sangre, cumple dos funciones principales: 1) mantener la sangre en un estado líquido, fluido que permita la circulación en los vasos sanguíneos; 2) suprimir la salida de sangre desde el espacio intravascular a través de un vaso lesionado (con pérdida de la continuidad) (1). Los procesos hemorrágicos pueden ser a causa de diversos factores como, por ejemplo, enfermedades hereditarias, en donde haya pérdida de función total o parcial de mantener la hemostasia o afecciones en las plaquetas que son cumplen roles importantes dentro del ser humano.

En la actualidad, las enfermedades crónicas no transmisibles, representan la principal causa de morbilidad a nivel mundial, siendo las enfermedades cardiovasculares las más prevalentes (29.83% de las muertes en el mundo). En Chile, se estima que también el 30% de las muertes, son provocadas por estas enfermedades, principalmente cardiopatía coronaria y accidente cerebrovascular; ambas, patologías directamente influenciadas por factores de riesgo prevenibles y modificables, tales como: Hipertensión Arterial Crónica (HTA), Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2), Dislipidemias, Tabaquismo, Obesidad y Sedentarismo.(2)

Estos factores de riesgo contribuyen al desarrollo de aterosclerosis arterial, que corresponde a una inflamación crónica que predispone a la lesión endotelial en vasos del corazón, cerebro y otros tejidos, siendo un factor de muerte prematura. Las plaquetas juegan un rol principal en los eventos cardiovasculares, debido a que cuando se activan se

adhieren y agregan en el sitio de la rotura de la placa aterosclerótica o erosión de las células endoteliales, estimulando la formación de trombos que impiden el correcto flujo sanguíneo, generando isquemia en tejidos u órganos.(3)

La elevada tasa de enfermedades cardiovasculares en Chile y el mundo es un problema que se debe combatir, por lo cual es necesario dilucidar los mecanismos implicados en los eventos trombóticos, a través del estudio de la función plaquetaria; siendo un campo importante de investigación la caracterización de los mecanismos que conducen y promueven su activación. Además de buscar nuevas moléculas con efecto antiplaquetario, para así desarrollar nuevas estrategias y disminuir la formación de trombos patológicos y la probabilidad de sufrir un evento cardiovascular

El compuesto utilizado en esta investigación es la cloro-acilhidroquinona HQM5BCl, donde se evaluó su efecto inhibitorio sobre plaquetas lavadas, mediante los ensayos de agregación plaquetaria y citometría de flujo.

MARCO TEÓRICO

1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.

Las enfermedades cardiovasculares están yendo progresivamente en aumento en la población mundial debido a diversas causas, como la mala alimentación, la poca educación acerca de los riesgos y jornadas laborales no aptas para mantener una vida saludable. Se definen según la OMS como un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos pudiendo clasificarse en: hipertensión arterial, cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, insuficiencia cardíaca, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita y miocardiopatías; son la principal causa de defunción en el mundo, calculándose que en el año 2012 murieron 17,5 millones de personas por enfermedades cardiovasculares lo cual representa el 30% de las muertes en el mundo. El 80% corresponde a países de ingresos bajos y medios, y de acá al 2030 se estima que casi 23,6 millones de personas morirán por alguna enfermedad cardiovascular, principalmente por cardiopatías y accidentes cerebrovasculares previéndose que sigan siendo la principal causa de muerte en el mundo (4,5).

Chile está en una situación alarmante en relación a las enfermedades cardiovasculares, por lo que el Ministerio de Salud ha establecido diversas medidas de control de estas enfermedades como mejorar el control de la diabetes mellitus tipo 2 y la hipertensión arterial además de la incorporación de las garantías explícitas de salud (GES), que favorecen la pesquisa oportuna, el acceso a los servicios de salud y la entrega de medicamentos (6), esto sin embargo, es la clara muestra que el sistema está enfocando su esfuerzo en donde no debe, pues la prevención es la clave en este tipo de enfermedades, una dieta balanceada, un estilo de vida no sedentario e incluso medidas que hagan los trabajos

más activos son clave, todo se puede resumir en educación a la población. Es importante tomarle el peso epidemiológicamente hablando debido a que son enfermedades ligadas a determinantes sociales como se mencionó anteriormente y normalmente cubre una gran parte de la población de estratos sociales bajos debido a la falta de conocimientos, un estudio realizado por la Universidad del Desarrollo con colaboración del SOCHICAR y SOCHEG concluye que en nuestro país es necesario realizar cursos o programas de educación y actualización de los médicos debido a que se encontró que uno de los principales problemas que afectan a las mujeres chilenas son las enfermedades cardiovasculares y los médicos tenían una baja percepción de esto como una causa (7). La diabetes mellitus tipo 2 ha experimentado un explosivo aumento en su frecuencia y en Chile nos encontramos con un proceso de cambio demográfico y de estilo de vida que ostentamos con las tasas de prevalencia de diabetes mellitus y obesidad más altas del continente. La importancia de padecer esta enfermedad es que su carga de morbilidad y mortalidad, encontrándose que es la principal causa de insuficiencia renal, ceguera y amputaciones de extremidades inferiores en Chile causando que su manejo consuma el 10,2% del presupuesto en salud de Chile. El riesgo de morir de una enfermedad cardiovascular llega a duplicarse al padecer diabetes mellitus 2 (8,9).

Gráfico II-3 Mortalidad por enfermedades cardiovasculares según grupo de edad, Chile 2011

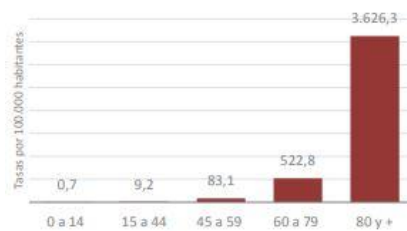
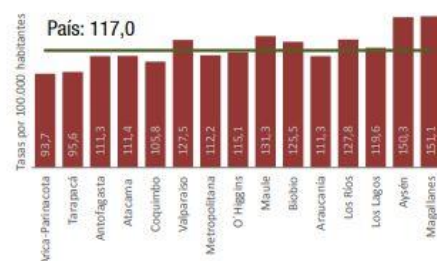


Gráfico II-4 Mortalidad por enfermedades cardiovasculares según Región, Chile 2011 (Tasas ajustadas por edad)



Fuente: Elaboración propia en base a INE – MINSAL, Chile, 2015.



Figura 1: Mortalidad por enfermedades cardiovasculares según grupo de edad en Chile. Tomado de la base de datos de CEPS, UDD. (INE – MINSAL, 2015) (9).

2. Trombosis

La trombosis es un fenómeno vascular atribuible a diversas causas clínicas, se explica como la formación de un coágulo (bloqueo parcial o completo) dentro de los vasos sanguíneos, ya sean venosos o arteriales, lo que limita el flujo de sangre y da como resultado secuelas clínicas como dolor, edema, sensación de pesadez, aumento de calor si es en una extremidad e incluso infartos. La capacidad de la sangre de fluir libremente depende de la homeostasis entre las células sanguíneas (incluidas las plaquetas), las proteínas plasmáticas, los factores de coagulación, los factores inflamatorios y las citoquinas, y el revestimiento endotelial dentro de las arterias y venas. Cuando ocurre un desequilibrio en este proceso fisiológico puede haber un mayor riesgo de sufrir trombosis que de hemorragia (10).

La trombosis se puede clasificar dentro de dos grandes grupos dependiendo de su etiología, está el trombo venoso y el trombo arterial. Su diferencia radica en el lugar en que se formó, si se habla de trombosis arterial esta puede provocar, por ejemplo, que la sangre no llegue a un órgano como ocurre en el caso de un infarto al miocardio debido a coágulos que se forman en arterias coronarias y por consecuencia los músculos cardiacos se priven de oxígeno siendo más peligrosas que las venosas (11). En el caso de que se forme un trombo en la vena hablamos de trombosis venosa, aparece más a menudo en las venas de las piernas y de la pelvis, la mayoría de las veces son incluso visibles, acá se impide que la sangre vuelva al corazón desde los órganos y debido a su importancia clínica también se pueden diferenciar en trombosis venosas superficiales y trombosis venosas profundas (siendo esta más peligrosa) (12).

3. Plaquetas

Las plaquetas son formadas a partir del proceso llamado megacariopoyesis que comienza en la médula ósea haciendo madurar la célula progenitora conocida como megacariocito, una vez maduro, el megacariocito al entrar en contacto con la célula endotelial de la sinusoide vascular de la médula ósea emite largas prolongaciones citoplasmáticas, denominadas proplaquetas, que posteriormente se fragmentarán en plaquetas (13,14).

La hemostasia primaria está protagonizada por plaquetas. Es conocido que las plaquetas son células anucleadas que se originan de la fragmentación del citoplasma de megacariocitos maduros (15) en la fase final de la megacariocitopoyesis, una vez alcanzada la ploidía definitiva, se produce la maduración del citoplasma megacariocítica dando lugar a su liberación posterior. Pueden desempeñar su función en la hemostasia gracias a que están dotadas de una extraordinaria capacidad de responder a estímulos. Este hecho está soportado por su compleja organización estructural.

Las plaquetas circulan en forma de lente biconvexa (lenticular), se encuentran en una concentración que oscila entre 150 a 400 células x $10^9/L$ y tienen un tamaño de 0,5 a 2,5 μm . el volumen plaquetario medio fluctúa entre 7 a 9 fL. La ultraestructura plaquetaria se puede subdividir en tres partes topográficas relacionadas con su función: a) membrana plaquetaria (intra y extracelular), b) gránulos y organelos intracitoplasmáticos (secreción plaquetaria) y c) citoesqueleto (proteínas motoras) (16).

La principal función de las plaquetas es mantener la integridad vascular y frenar el sangrado. Para el desarrollo de esta función su membrana juega un rol de contacto, asegurando la adhesión a los componentes del subendotelio expuesto y luego favoreciendo la agregación y formación del trombo plaquetario. La plaqueta está rodeada por una membrana plasmática que se extiende a través de múltiples ramificaciones del sistema canalicular conectado a la superficie. Las invaginaciones de la membrana plaquetaria dan origen a un sistema de canales y canalículos que forman una extensa dentro del volumen citoplasmático en donde tienen una presencia mínima de proteínas pero contienen cadenas glicosiladas constituyendo un bloqueo del sistema canalicular conectado a la superficie (16).

Mediante microscopia electrónica se ha analizado la distribución y funcionalidad de las glicoproteínas en la superficie y a nivel intracelular, donde las más relevantes son:

- a) El receptor de adhesión formado por un complejo de tres glicoproteínas (Ib, IX y V) es el receptor de unión de la superficie plaquetaria al subendotelio, mediante el factor de von Willebrand (FVW) y la trombina. Este complejo además es el más importante a nivel de adhesión, la inmunomarcación de los tres componentes indica su presencia sobre toda la superficie de las plaquetas en reposo, ocasionalmente en el sistema canalicular y existe un cinco a diez por ciento del total de marcación con el FVW en las membranas granulares. La conexión con la actina se produce a través de la proteína de unión a la actina (ABP).
- b) La glicoproteína VI es el receptor para colágeno más importante y está comprometido en eventos tempranos de la función plaquetaria y participa en la activación y agregación inducida por colágeno.
- c) El principal receptor para la agregación plaquetaria es el complejo glicoproteína IIb/IIIa, su función es unir al fibrinógeno y, en ciertas condiciones al FVW. Este se encuentra homogéneamente distribuido por la superficie. Así mismo se han encontrado depósitos de esta proteína en gránulos α sirviendo como pool interno para la incorporación y almacenamiento del fibrinógeno plasmático en los gránulos α .

- d) La glicoproteína IV está involucrada en adhesión y agregación plaquetaria. Es un receptor del colágeno tipo II y de trombopondina y participa en la transducción de señales. Se encuentra en la superficie plaquetaria, en el sistema canalicular y en la membrana de gránulos α .
- e) El complejo Ia/IIa une colágeno mientras que Ic/IIa une laminina y fibronectina.
- f) La molécula de adhesión endotelio-plaqueta y el CD9 son componentes del plasma, de las membranas del sistema canalicular y en menor proporción de la superficie de gránulos α . El CD9 actúa como receptor para fibronectina y podría estar comprometida en la funcionalidad del receptor para factores de crecimiento. La molécula de adhesión es una molécula asociada con el citoesqueleto de las plaquetas activadas y se expresa en células endoteliales (16).

El sistema tubular denso se origina a partir del retículo endoplasmático del megacariocito y está compuesto por canales ubicados cerca de las cisteínas del sistema canalicular cercano a la superficie. Contiene varias enzimas activas, tales como ATPasas y ciclooxigenasa 2. Las plaquetas contienen cuatro tipos de gránulos citoplasmáticos clasificados de acuerdo a su ultraestructura, densidad y contenido: los gránulos α , los densos, los lisosomas y los peroxisomas. Los gránulos α son los más prominentes y los que se encuentran en mayor número, se forman durante la maduración temprana de los megacariocitos y aparecen en la malla trans-golgi en forma de pequeñas vesículas y gránulos inmaduros que transitan a través de cuerpo multivesiculares hasta alcanzar su tamaño y densidad definitiva (16).

Los gránulos α contienen proteínas adhesivas, factores de crecimiento, inhibidores de proteasas, proteoglicanos e inmunoglobulinas como se ve en la tabla 1. La membrana contiene diferentes receptores por dentro de la membrana como la P-selectina, osteonectina y el GMP33 son específicos y están ausentes en la membrana plasmática cuando la plaqueta está en reposo. La P-selectina incluso se puede utilizar como un indicador de activación plaquetaria cuando se encuentra expresada en la superficie celular (17).

Tabla 1. Contenido de los gránulos α en la plaqueta. Extraído y adaptado de Plaquetas.(Bermejo, 2017)(16).

Categorías	Contenido en el granulo α	Funciones
Proteínas adhesivas	VWF + pro-péptido, Fg, Fn, Vn, TSP-1, TSP-2, laminina-8	Interacciones de contacto celular, hemostasia primaria y constituyentes de la matriz extracelular
Factores de la coagulación y sus inhibidores	Factor V/Va, factor XI, multimerina, proteína S, HMWK, proteasa, nexina-1 y -2, TFPI, inhibidor de proteína C, gas6	Generación de trombina, formación del coágulo y proliferación de la matriz extracelular
Factores fibrinolíticos y sus inhibidores	Plasminógeno, PAI-1, u-PA, α 2-antiplasmina, TAFI, α 2 - macroglobulina	Producción de plasmina y remodelación vascular
Proteasas y anti-proteasas	MMP-1, -2, -4, -9, ADAMTS13, ADAMS10, ADAMS17 (TACE), TIMPs 1-4, inhibidor plaquetario del FIX, C1 inhibidor, α 1 -anti-tripsina.	Angiogénesis, regulación de la coagulación y de mecanismos celulares
Factores de crecimiento y mitogénicos	PDGF (A, B y C), EGF, IGF-1, VEGF (A y C), bFGF (FGF-2), HGF, BMP-2, -4, -6, CTGF, SCUBE1, IGFBP3	Quimiotaxis, proliferación celular y angiogénesis
Quimioquinas, citoquinas y otros	TGF- β 1 y - β 2, IL-1, RANTES (CCL5), IL-8, MIP-1 α , MIP-2, GRO- α , MCP-1, MCP-3, PF4, β -TG, NAP-2, angiopoyetina-1, HMGB1, IL-6sR, endostatina, osteonectina, dickkopf-1, osteoprotegerina	Regulación de angiogénesis, quimiotaxis, interacción celular, remodelación vascular
Proteínas antimicrobianas	Trombocidinas, quinocidinas	Bactericida y fungicida
Glicoproteínas de membrana	α IIb β 3, avb3, GPIb, PECAM-1, constituyentes de la membrana plasmática, receptores para agonistas primarios, P-selectina, TLT-1, CD63, CD40L, TF, TRAIL, furina, cellubrevina, syntaxina-2, clatrina	Adhesión y agregación plaquetaria, endocitosis de proteínas, secreción, inflamación, generación de trombina, interacción plaqueta-leucocito y plaqueta pared vascular
Otras	4-sulfato de condroitina, albúmina, inmunoglobulinas G y M, precursor de amiloide b proteína, factor H de complemento, semaforin 3A.	Varias

Los lisosomas poseen una estructura homogénea y se encuentran en número reducido. La función durante la activación plaquetaria está dada por sus interacciones con la pared vascular y por la digestión de componentes de matriz subendotelial. Dentro de la plaqueta cumplen la función autofagia. Distintas glicoproteínas están presentes en la membrana lisosomal y son redistribuidas a la superficie después de la activación plaquetaria producida por estímulos fuertes como la trombina. Los microtúbulos están compuestos por moléculas de tubulina que son heterodímeros relacionados a dos polipéptidos globulares: alfa y beta tubulina y están asociados con proteínas motoras como la quinesina y la dineína. Su función está en mantener la forma de la plaqueta en reposo. Durante la activación aparecen en la membrana formando pseudópodos que aumentan la fricción de las plaquetas. Así mismo la malla de actina está relacionada con los cambios de forma de la plaqueta y el reordenamiento de los complejos Ib-IX-V y la formación de pseudópodos. La actina es el mayor componente del citoesqueleto y representa el 20% del contenido proteico plaquetario.(16).

El citoesqueleto plaquetario es un gel viscoelástico, responsable de mantener la estabilidad de la membrana, su forma discoide y los cambios morfológicos que estas experimentan una vez activadas. Entre las proteínas presentes en el citoesqueleto plaquetaria se encuentre, en una alta proporción, la actina que se entrecruza formando una malla con otras proteínas como la miosina, talina, proteína que se une a actina y vimentina entre otras. Poseen un sistema tubular denso (STD) que ayudan al movimiento de diferentes mensajes y proteínas de activación, además también cuentan con un sistema canalicular abierto que es el responsable de incorporar proteínas desde el exterior de la plaqueta y de liberar contenido de los gránulos que éste posee (18).

La membrana plaquetaria expresa otros tipos de receptores de activación que, pertenecen a la familia de receptores con 7 dominios hidrófobos transmembrana. Además, existe un dominio n-terminal extracelular que presenta uno o más sitios de unión al ligando y un

dominio c-terminal intracelular. Este último transduce señales de activación por distintos mecanismos (19).

4. Activación plaquetaria

Cuando la pared vascular es agredida, se contrae por mecanismos neuro humorales; a la vez y por la misma agresión, las plaquetas se ponen en contacto con el subendotelio, desencadenándose una serie de reacciones que culminan con la formación el tapón hemostático primario o tapón plaquetario. Estas reacciones se conocen como hemostasia primaria (adhesión de las plaquetas al subendotelio y agregación entre sí) (20).

En resumen, las acciones básicas que desarrollan las plaquetas en la hemostasia primaria son: adhesión: al subendotelio a través de la GPIb/IC donde actúa el factor de Von Willebrand como puente; liberación de contenido granular: se producen una serie de cambios bioquímicos encaminados a la liberación de los gránulos a través del tromboxano A_2 que activa la bomba de calcio, estimulando de esta manera el sistema contráctil con la consiguiente expulsión del contenido de los gránulos y finalmente la agregación entre las plaquetas, utilizando como puente el fibrinógeno y como nexo de unión la glicoproteína GPIIb/IIIa, este es el proceso estimulado por el contenido de los gránulos, por componentes subendoteliales o del entorno plaquetario y otras sustancias como la trombina o la adrenalina (20).

Una gran cantidad de sustancias o metabolitos puede actuar sobre plaquetas e inducir su activación (como el factor de activación plaquetaria, trombina, tromboxano (TXA₂),

fosfato de adenosina (ADP), epinefrina, vasopresina y serotonina) a través de sus respectivos receptores, pero todas lo hacen a merced de rutas de señalización intracelular que involucran un sistema de proteínas G acoplado a enzimas efectoras como las fosfolipasas A2 (PLA2) y C (PLC), adenilato y guanilato ciclasa (20).

Hasta ahora se han identificado nueve componentes diferentes de la familia de proteínas G en las plaquetas y, dependiendo del tipo de proteína G que participe en la señalización. Se puede activar o inhibir el efecto. Un ejemplo lo constituye la regulación por proteína G del adenilato ciclasa y por tanto de la producción de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Un incremento de las cantidades de AMPc bloquea la liberación de calcio en el STD e inhibe la función de la plaqueta. Este es el mecanismo que utilizan las prostaciclina del endotelio vascular sano para inhibir la activación plaquetaria (20).

La PLC actúa sobre el fosfatidil inositol 4,5 difosfato, generando 1,2 diacilglicerol e inositol 1,4,5 trifosfato (IP3). Este se une a receptores específicos en el sistema tubular denso y libera al citosol hasta el 40% del calcio almacenado promoviendo la activación de la miosina quinasa que fosforila la cadena ligera de la miosina, lo que aumenta la afinidad de los polímeros de miosina por la actina y provoca la contracción del citoesqueleto. A su vez, por la acción del calcio se activan las enzimas de la vía glucolítica con la subsecuente formación de ATP. El 1,2 diacilglicerol por su parte promueve la activación de los mecanismos dependientes de fosforilación, como la activación de la quinasa C. el DC es degradado por la diglicérido lipasa y entre otros compuestos se genera ácido araquidónico (AA), lo que no constituye la única fuente de obtención de AA en la plaqueta (20).

La fosfolipasa A2 (PLA2) genera ácido araquidónico (AA) a partir de los fosfolípidos de la membrana plaquetaria (fosfatidil colina y fosfatidil etanolamina). Este AA es

metabolizado en la vía oxidativa de la ciclooxygenasa hasta generar productos estables finales: prostaglandinas. Por efecto de la tromboxano sintetasa se forma un potente agente agregante plaquetario y vasoconstrictor: el tromboxano (TXA₂) (20).

5. Agregación plaquetaria

Cuando se lesiona el endotelio vascular, las plaquetas se ponen en contacto con la matriz subendotelial. Se inician las interacciones entre las proteínas adhesivas en la pared vascular (como el factor de Von Willebrand y colágeno) con los receptores de la membrana (complejos GP Ib/IX/V y la Ia/IIa) respectivamente como se ve en la figura 2 (21). La adhesión de la plaqueta al endotelio vascular, mediada también por la unión de la GPVI al colágeno subendotelial inicia los procesos de activación plaquetaria, que involucran cambios de conformación de muchas proteínas de membrana y expresión de estas en la membrana plaquetaria (20).

La GP IIb/IIIa, expone un sitio de fijación que interactúa con proteínas adhesivas, en especial con el fibrinógeno. Este fibrinógeno, que se encuentra en el microambiente plaquetario, propicia la formación de puentes plaqueta-plaqueta, estabilización por el calcio y la trombospondina, lo que garantiza la formación del trombo primario formado por plaquetas. La vía común y final de la agregación plaquetaria la constituye la activación de esta GP, que se ha convertido en el blanco de las investigaciones actuales en el uso de agentes antiagregantes (20).

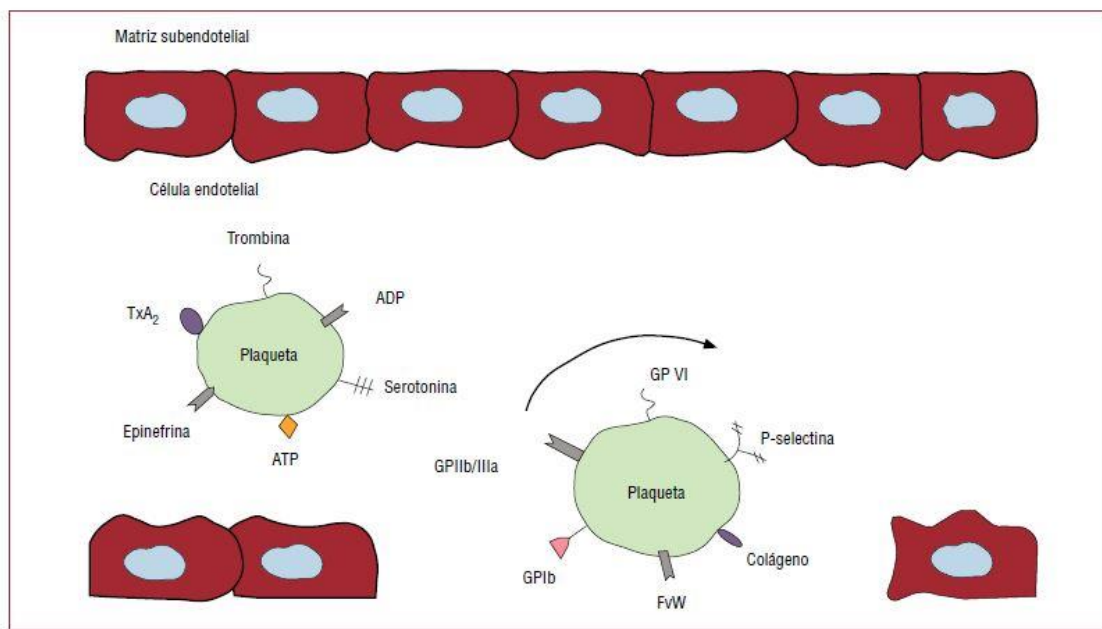


Figura 2: Inicio de agregación plaquetaria. Principales agonistas y proteínas de adhesión que en la plaqueta participan en el proceso de activación plaquetaria. ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina; FvW: factor de von Willebrand; GP: glucoproteína; TxA₂: tromboxano A₂. Tomado del artículo: Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. (López A. 2013) (21).

6. Anticoagulantes y antiagregantes plaquetarios

6.1 Anticoagulantes plaquetarios

Los anticoagulantes de la sangre son medicamentos que permiten retardar la coagulación de la sangre regulando la hemostasia secundaria, por lo cual, no se mencionaron en los estudios posteriores en el experimento in vitro, sin embargo, apuntan en la misma dirección clínica (disminuir el riesgo de una trombosis) por lo que se mencionaron para tener clara sus diferencias de acción y objetivos. Entre los ejemplos de anticoagulantes se encuentran los siguientes: heparina, Warfarina, dabigatran, apixaban, rivaroxabán y edoxaban. Los

anticoagulantes dificultan la formación de coágulos en el corazón, las venas y las arterias. También pueden impedir que coágulos existentes aumenten de tamaño (22).

Son de uso frecuente en la clínica y a su vez son un grupo de sustancias de distinta naturaleza que se pueden relacionar por su efecto biológico. Se pueden dividir en: Anticoagulantes de acción directa: aquellos que son capaces de inhibir la cascada de coagulación. Ejemplos: inhibidores directos de trombina como lo son la hirudina y el argatroban. Anticoagulantes de acción indirecta: son aquellos que mediante su interacción con otras proteínas o actuando en otras vías metabólicas, alteran el funcionamiento de la cascada de la coagulación, son ejemplos de estos inhibidores mediados por antitrombina III (heparina o fraccionada, heparinas de bajo peso molecular, danaparoides sódico); inhibidores de la síntesis de factores de coagulación (derivados del dicumarol) (23).

Pueden administrarse por vía parenteral (subcutánea o endovenosa) para inducir un estado hipo coagulante de forma rápida. En clínica esta ruta se usa habitualmente por cortos periodos de tiempo. Cuando se administran por vía oral el efecto anticoagulante, es de lenta instalación. En general, esta vía es utilizada para tratamientos de mantención (23).

6.2 Antiagregantes plaquetarios

Los llamados fármacos antiagregantes o antiplaquetarios son aquellos que inhiben los mecanismos de activación y agregación plaquetar. El sustrato morfológico de las enfermedades cardiovasculares es la placa aterosclerótica y en su etiopatogenia intervienen los llamados factores de riesgo cardiovascular como lo son: niveles de PAS (presión arterial

sistólica) y PAD (presión arterial diastólica), presión del pulso en ancianos, la edad, exposición al tabaco, dislipidemia, glicemia basal alterada, TTOG (test tolerancia oral a la glucosa) alterado, historia de ECV prematura en familiar de 1^{er} grado, obesidad abdominal e hipertensión arterial (20).

Los factores de riesgo cardiovascular producen en las células del endotelio vascular alteraciones endoteliales, lo que es conocido como “disfunción endotelial”, lo que provoca la acumulación y la exudación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), originando la infiltración de monocitos en el espacio subendotelial que captan lípidos, transformándose en células espumosas, estas desencadenan una respuesta inflamatoria y fibroproliferativa crónica que hace progresar las lesiones ateroscleróticas provocando los procesos de adhesión, activación y agregación de las plaquetas formando un trombo (20).

Los fármacos antiagregantes se pueden clasificar según a que nivel actúen en la formación del trombo. Existen los inhibidores de la agregación en donde podemos encontrar inhibidores de la enzima ciclooxigenasa (como el ácido acetilsalicílico y el trifluzal), inhibidores de la enzima tromboxano-sintasa y receptores de tromboxano (aunque no se ha podido confirmar su eficacia en el humano), inhibidores de receptores ADP como ticlopidina y clopidogrel, inhibidores de glucoproteínas IIB-IIIA que inhiben e receptor GP IIb/IIIa bloqueando la etapa final de la agregación plaquetaria como el abciximab, xemilofiban, orofiban y sibrafiban y por otro lado tenemos los inhibidores de la activación plaquetar que lo provocan es un aumento de AMP cíclico como el caso del dipiridamol (20).

Los mecanismos de acción y absorción de los fármacos son distintos por lo cual se hace imprescindible el conocimiento de estos (20).

- El ácido acetilsalicílico o AAS se absorbe en el estómago y en el intestino delgado transformándose en ácido salicílico. Su concentración plasmática máxima se alcanza a los 30 minutos y su vida media plasmática es de 20 minutos. Su mecanismo de acción es por inhibición de la COX-1 de las plaquetas de forma irreversible por lo cual solo se pueden generar nuevas plaquetas para revertir el efecto.
- El trifluzal tiene una estructura similar a la aspirina, su efecto es inhibir también la COX-1 bloqueando la formación de tromboxano, además inhiben la fosfodiesterasa y aumentan las concentraciones de AMP cíclico en las plaquetas y endotelio potenciando el efecto antiagregante.
- El clopidogrel y ticlopidina son derivados de las tienopiridina, inhiben la agregación plaquetaria inducida por el ADP y deben ser metabolizados por el hígado para ser activos. El metabolito activo se une al receptor del ADP (P2Y₁₂) de la membrana plaquetaria de forma irreversible durante toda la vida de la plaqueta.
- El dipiridamol es una pirimidopirimidina que inhibe la receptación de adenosín en las plaquetas, células endoteliales y eritrocitos provocando un incremento de este y la inhibición de la agregación plaquetaria además de tener propiedades vasodilatadoras.
- El Cilostazol produce inhibición en la fosfodiesterasa III siendo un antiagregante y vasodilatador.
- El Prasugrel es una tienopiridina que se activa en el hígado, su efecto antiagregante es por bloqueo irreversible del receptor P2Y₁₂.
- El ticagrelor es una ciclopeniltriazolopirimidina que inhibe de manera directa y reversible al receptor P2Y₁₂.
- El cangrelor es análogo de ATP siendo inhibidor reversible del receptor P2Y₁₂ su administración es intravenosa.
- El elinogrel es un inhibidor del P2Y₁₂ directo y reversible, vía oral o intravenosa. En estudios de fase II.
- El picotamida es un inhibidor del tromboxano A₂ (TXA₂) y de los receptores del TXA₂ sintetasa además de tener efectos de disminución en el tono vascular y reducir la proliferación de células musculares lisas.

- Inhibidores de la glucoproteína IIB-IIIa; inhiben el receptor GP IIb/IIIa bloqueando la etapa final de la agregación plaquetaria. Además, se une al receptor de vitronectina en plaquetas y células endoteliales. Estos son: lamifiban y tirofiban (20).

Figura 14. Mecanismo de acción de los antiagregantes.

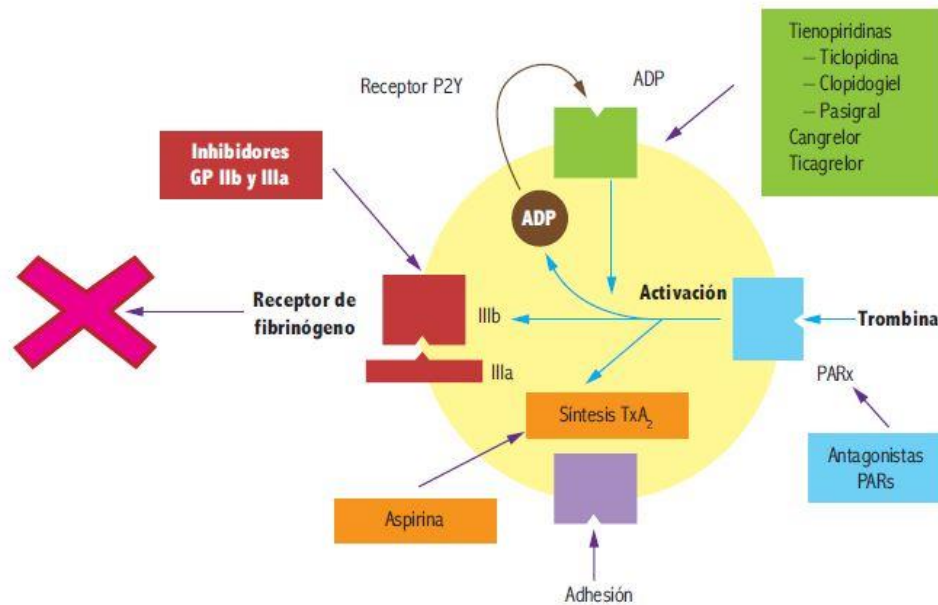


Figura 3: Mecanismos de acción de los anti agregantes plaquetarios. Tomado de Tratamiento de antiagregantes y anticoagulantes. (Polo-Garcia J, 2011) (20).

7. Terapia antiplaquetaria

Con la llegada de los antiplaquetarios se dio un gran avance en el tratamiento de los eventos trombóticos revolucionando la manera de tratar los infartos y los accidentes cerebrovasculares. Con combinaciones entre antiplaquetarios se puede potenciar el efecto antitrombótico mejorando los resultados y la reversión de los eventos, sin embargo, puede

tener efectos secundarios como el sangrado por lo cual se debe tener siempre consciente que medicamentos se están recomendado y al paciente al cual van dirigidos. Aproximadamente existen alrededor de 20 fármacos antiplaquetarios, teniendo ejemplos de administración tanto orales como intravenosos como el tirofiban, abciximab y la eptibatida (24).

En la actualidad el valor de una medida preventiva o terapéutica puede aceptarse si se demuestra su beneficio de forma inequívoca mediante estudios clínicos bien diseñados, prospectivos y aleatorios permitiéndole a campos clínicos tener guías que les permitan saber cómo y que usar ante circunstancias clínicas similares. Gracias a estos múltiples estudios se pueden crear conclusiones de los tratamientos trombolíticos, antitrombóticos, así como de la antiagregación plaquetaria (25).

Los efectos antiplaquetarios han jugado un papel relevante en el tratamiento de síndromes coronarios agudos, los accidentes cerebrales y la enfermedad arterioesclerótica de miembros inferiores, sobre todo en la última década y es gracias a su utilización que se han revertido eventos trombóticos sin secuelas para los pacientes dando así la posibilidad de una revascularización efectiva. Las lesiones ateroscleróticas abarcan principalmente la capa media, la capa endotelial de la arteria y es en el lumen arterial donde se desencadena todo el fenómeno trombótico. El endotelio vascular cuenta con un sistema anticoagulante y anti agregante que incluye varias sustancias como: la proteína C, la proteína S, la antitrombina III, el sulfato de heparán, el óxido nítrico, las prostaciclina, el CD39 y la ectonucleo peptidasa entre otras (24).

La aspirina: interfiere con la síntesis de prostaglandinas, ejerciendo su efecto antiplaquetario a través de la inhibición irreversible de la ciclooxigenasa-1 a dosis bajas

mientras que a dosis elevadas es un inhibidor no selectivo de Cox. El principio activo es el ácido acetilsalicílico (24). Es uno de los compuestos mas comunes y utilizados y su estructura se ve en la figura 4 (26).

El efecto terapéutico de la aspirina es dosis dependiente, este factor es muy importante porque el efecto antitrombótico se obtiene administrando la dosis de 75 a 100mg, esta dosis se utiliza para prevención de trombosis coronaria y en dosis elevadas de 500 a 100mg tienen efecto antiinflamatorio, analgésico, anti proliferativo y antipirético. Utilizada también en embarazadas que cursan con preeclampsia para reducir la morbimortalidad. Su vida media es de 20 minutos pero el efecto antitrombótico se mantiene hasta 48 horas después de administrar la dosis (24).

El efecto de la aspirina se puede medir con la prueba de tiempo de sangre, observándose una prolongación de esta, es importante enfatizar que si el paciente toma aspirina con cubierta entérica el efecto se denostara en 3 a 6 horas después de la administración, aunque se puede obtener un efecto más rápido si se mastica la aspirina. (24). La duración del efecto antiplaquetario oscila entre 4 a 10 días que es el promedio de vida de las plaquetas. Las indicaciones de aspirina son para: Angina estable, síndrome coronario agudo, en caso de intervencionismo coronario agudo, en prevención primaria y secundaria de paciente con riesgo vascular. La dosis antiplaquetaria es de 75 a 100mg y los niveles en el plasma aparecen entre los 5 y 30 minutos teniendo un máximo de concentración a los 30 minutos y prologándose por 2 horas. La eliminación del compuesto es de 15 a 20 minutos, pero la inhibición plaquetaria persiste hasta 7 días. Los pacientes tratados con aspirina tienen una reducción de riesgo de complicaciones cardiovasculares de un 25% independientemente de cual fuera el territorio vascular involucrado (cerebral, miocárdico o vascular periférico) (24).

Tiene contraindicaciones como en pacientes con úlceras gástricas o duodenales, gastritis aguda o crónica, alergia a la aspirina, trastornos de coagulación que cursen con sangrado como la hemofilia y accidente vasculares hemorrágicos, en general, cualquier estado que el sangramiento sea un síntoma y que la aspirina conlleve a un cuadro más grave. Si el paciente es menor de 16 años y cursa con un cuadro viral no se recomienda administrar ante la posibilidad de desarrollar un síndrome de Reye (24).

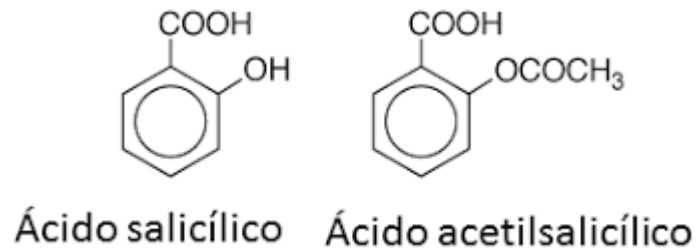


Figura 4: Estructura del ácido salicílico. Tomado de Intoxicación aguda por Ácido Acetil Salicílico. Parte 1: farmacología y fisiopatología. (Jara, RC 2016) (26).

La velocidad de absorción del AAS está determinada por múltiples factores como la forma de administración, su dosis, tasa de desintegración-disolución, el pH de la superficie mucosa y el tiempo de vaciado gástrico. A dosis terapéuticas es rápidamente absorbido tomando entre 15-30 minutos de su ingesta su detección en la sangre y su mantenimiento en ella. La absorción se puede retrasar por la coingestión de agentes que puedan disminuir el vaciamiento gástrico y motilidad intestinal, también por la presencia de comida y dentro de otros posibles determinantes encontramos anticolinérgicos, narcóticos, bloqueadores gangliolíticos etc. (26).

Se distribuye a los tejidos por un proceso pasivo y depende de las concentraciones séricas del fármaco, los niveles de albumina y de la competencia con otras drogas por los sitios de unión a proteínas. Su transportador es la albumina, aunque en pacientes hipoalbuminémicos

se encontrara en mayor proporción en el plasma. El AAS es absorbido como tal, pero una porción es hidrolizada y entra a circulación como ácido salicílico. El AAS restante es hidrolizado en plasma, hígado y eritrocitos. Si eliminación es principalmente por vía renal y su vida media varía dependiendo de la concentración plasmática y pH urinario. Aproximadamente un 75% es eliminado como ácido salicílico, un 10% como ácido salicílico, otro 10% como glucuronido fenólico salicílico, un 5% como glucorónido acílico y menos de 1% como ácido genticónico (26).

El clopidogrel es un antiplaquetario que pertenece al grupo de los tienopiridina. Es un profármaco que actúa mediante la inhibición irreversible de un receptor P2Y₁₂, el cual inhibe la agregación plaquetaria y la unión de plaquetas por medio de la fibrina. Al bloquearse este receptor impide la activación de la vía de la glicoproteína IIb/IIIa. La respuesta de este fármaco se determina genéticamente. Las tabletas tienen una presentación de 75 y 300mg y su inhibición plaquetaria puede ser demostrada 2 horas después de su administración, pero, como su efecto se requiere de manera inmediata se necesita administrar dosis de carga de 300 a 600mg. La carga de 600mg inhibe casi por completo la agregación plaquetaria desde unas 2 horas, mientras que una carga de 300mg necesita de 24 a 48 horas para obtener el mismo grado de inhibición plaquetaria. (24)

Las indicaciones del clopidogrel son similares a la aspirina, se usa en la prevención de eventos isquémicos y en tratamientos de estos. Las principales interacciones medicamentosas del clopidogrel es con los inhibidores de bomba de protones (como el omeprazol, esomeprazol) y otros fármacos como la cimetidina, el etravirine debido a la inhibición de la CYP2C19. (24). Su efecto adverso principal también es el sangrado y ya que su efecto se prolonga por 7 días hay que suspender su tratamiento ante una pronta cirugía o bypass para evitar el exceso de sangrado.

El trifluzal es un derivado de los salicilatos, pero no de la aspirina, su mecanismo de acción se realiza mediante la inhibición del tromboxano A2 bloqueando irreversiblemente la enzima ciclooxigenasa 1. No altera la prostaciclina vascular que tiene efecto anticoagulante. Su dosis es de 300mg por día y este medicamento no debe usarse en pacientes alérgicos a los AINES, con historial de reacciones broncoespasmo, asma, rinitis alérgica y está contraindicado en pacientes con ulcera péptica y gastritis. Se utiliza mayormente en profilaxis de trombosis coronaria y cerebral (24).

Cilostazol es un derivado de 2-oxoquinolone que tiene 5 propiedades benéficas como lo son: vasodilatador, antiplaquetario, tiene propiedades anti proliferativas que reducen las células del musculo liso y la hiperplasia de las células endoteliales. Su presentación es en tabletas de 50 y 100mg y se indica en pacientes con enfermedades vasculares periféricas. Su metabolismo es en el hígado por el citocromo p450 y tiene interacciones medicamentosas con antibióticos como macrólidos, anti fúngicos, calcio antagonistas e inhibidores de bomba de protones.(24).

Ticagrelor o brilinta es un antiplaquetario que ejerce este efecto por la inhibición del receptor P2Y12 y no requiere de activación metabólica. Se utiliza como alternativa para el tratamiento de síndrome coronario agudo y sobre todo para pacientes que tienen resistencia al clopidogrel. La inhibición plaquetaria con el ticagrelor es reversible por lo cual tiene ciertas desventajas, al suspender el medicamento se dé un efecto rebote que puede desencadenar en una trombosis, también, es que tiene que ser administrado 2 veces al día debido a que posee una vida media corta y además, se debe exceder la dosis de 100mg de aspirina en los pacientes que toman ticagrelor porque aumenta el riesgo de sangrado. Su ventaja radica en que a las 2,5 horas se logra una inhibición plaquetaria mayor que con el clopidogrel siendo indicado para tratamiento y prevención de eventos trombóticos cardiovasculares. (24).

Los principales efectos adversos son la disnea, dolores de cabeza, bradicardias y pausas sinusales por lo que al prescribirse se debe tener especial cuidado con los pacientes que ya tienen bradicardia especialmente debido a que el medicamento disminuye la frecuencia cardiaca. El ticagrelor es metabolizado a nivel hepático en el citocromo CYP3A. su dosificación es en una carga de 2 tabletas de 90mg cada una y se continua con 90mg 2 veces al día. Concomitantemente se utiliza con una dosis de carga de 325mg de aspirina y la dosis de mantenimiento de 81mg de aspirina (24).

Su mecanismo de acción ejerce su efecto antiplaquetario a través de la inhibición reversible del receptor de la plaqueta P2Y12. Su mayor efecto antiplaquetario ocurre a las 1,5 horas de administrado y sus principales interacciones medicamentosas se dan con sustancias que se metabolizan a nivel del citocromo CYP3A4 como los itraconazoles o las estatinas, principalmente la simvastatina, claritromicina y los calcio antagonistas. Sus contraindicaciones son la evidencia de sangrado intra craneano o sangrado activo a cualquier nivel, no debe prescribirse a pacientes con enfermedad hepática severa, en embarazo ni lactancia y tampoco a niños. La suspensión de este medicamento debe realizarse por lo menos 5 días antes de una cirugía. Puede administrarse concomitantemente con heparina, heparinas de bajo peso moléculas, inhibidores de las glicoproteínas IIb/IIIa, inhibidores de bomba, con los inhibidores de angiotensina y con beta bloqueador, pero con precaución (24).

El Prasugrel también es una tienopiridina lo que conlleva a ser un inhibidor de la activación y agregación plaquetaria en el receptor de P2Y12 ADP y su indicación es en pacientes con síndrome coronario agudo o pacientes que van a ser sometidos a angioplastia con colocación del stent. Este medicamento ha demostrado que en pacientes con síndrome coronario agudo y en intervenciones coronarias existe una reducción de eventos isquémicos, menor trombosis del stent, pero mayor riesgo de sangrado. Su efecto es mejor al ser comparado con el clopidogrel sin embargo se observó que existen tres grupos de

mayor riesgo de sangrado con este medicamento como lo son: pacientes mayores a 75 años, con peso menor a 60 kg y en aquellos que habían sufrido un accidente vascular cerebral previo (24).

Este fármaco tiene una vida media de 7 horas con un pico de absorción a los 30 minutos, el efecto antiplaquetario es de 7 a 10 días. Su presentación viene en tabletas de 10mg y contienen lactosa por lo cual se debe realizar la pesquisa del paciente y saber si es intolerante o alérgico a este azúcar. En caso de necesitar una cirugía el tratamiento se debe suspender 7 días previos antes para evitar el sangrado. Para su prescripción se recomienda una dosis de carga de 60mg y luego se continua con 10 mg por día. En pacientes con peso menor de 60 kg se recomienda una dosis de 5 mg/día, este medicamento no se recomienda en pacientes con úlceras, gastritis ni con antecedentes de sangrado intra craneano o pacientes mayores a 75 años. Dentro de los posibles eventos adversos se encuentra la purpura trombocitopénica trombótica (24).

Tabla 2. Recomendaciones de antiplaquetarios en la práctica clínica. Extraído y adaptado de Manejo practico de agentes antiplaquetarios y terapia puente.(Xavier DI, 2017) (27).

Clopidogrel
- Tratamiento SCA (con y sin elevación ST).
- Pacientes con SCA susceptibles de intervencionismo coronario y con riesgo hemorrágico elevado.
- Suspender al menos 5 días antes de circulación extracorpórea (CEC) o cirugía mayor.

Prasugrel
- SCA con elevación ST e intervencionismo coronario.
- Eventos isquémicos con clopidogrel.
- Contraindicado en: <ul style="list-style-type: none">➤ Paciente con antecedentes de ictus o accidente isquémico transitorio (AIT).➤ Edad mayor a 75 años.➤ Peso menor a 60 kg.
- Suspender al menos 7 días antes de CEC o cirugía mayor.

Ticagrelor

- Tratamiento médico o intervencionista de SCA con anatomía coronaria no definida.
 - Pacientes en los que no se puede diferir cirugía de revascularización urgente.
 - Terapia puente en pacientes que reciben clopidogrel o Prasugrel requiere terapia antiplaquetaria previa cirugía.
 - Evitar en pacientes con EPOC y arritmias.
 - Suspender al menos 3 días antes de CEC o cirugía mayor
-

Inhibidores IIb/IIIa

- No se indican de manera sistémica.
 - Su indicación debe surgir de los hallazgos angiográficos o vinculados a la ATC.
-

Los antiagregantes de prevención primaria se utilizan en pacientes sin enfermedad cardiovascular previa y aunque su beneficio no ha sido demostrado en pacientes sanos cabe recalcar que su uso en pacientes con afecciones ha reducido el riesgo de ictus isquémico (en mujeres) y en hombres los infartos al miocardio. La recomendación para hombres entre 45 y 79 años es la fomentación de uso de AAS cuando el beneficio potencial sobre a enfermedad supere al riesgo de HGI, en mujeres de entre 56 y 79 años se utiliza el mismo criterio y para hombres y mujeres bajo el rango de edad anteriormente mencionado o se fomenta el uso de AAS en prevención de IAM. Para hombres y mujeres mayores a 80 años tampoco existe una recomendación específica. La asociación americana de diabetes recomienda el uso de AAS en dosis bajas (75 a 162 mg al día) para la prevención primaria de cuadros cardiovasculares en pacientes diabéticos mayores de 40 años y para pacientes de entre 30 y 40 años asociado a algún otro factor de riesgo cardiovascular (20).

Los antiagregantes que se utilizan en la prevención secundaria son más amplios y específicos debido a que se utilizan en pacientes que han tenido una enfermedad cardiovascular por lo que se objetivo es evitar la recurrencia y reducir la mortalidad de dicha enfermedad por lo que sus indicaciones de fármacos dependerán del cuadro a prevenir.

- Para pacientes con una angina estable se recomienda el uso de AAS con clopidogrel como alternativa.

- Para los pacientes con síndromes coronarios agudos sin elevación del segmento ST (SCASEST) se recomienda el uso de AAS, sin embargo, durante los primeros meses se puede utilizar una combinación de clopidogrel + AAS para mejorar su efectividad.
- Para un infarto agudo al miocardio previo se utiliza AAS como medicamento principal y clopidogrel como alternativa.
- Para un AVC isquémico agudo también se utiliza AAS y si es una AVC previo se puede contar también con clopidogrel como alternativa (20).

El manejo de la antiagregación plaquetaria en los síndromes coronarios agudos está bien documentado en las guías de las distintas sociedades científicas. La aspirina continúa siendo una droga fundamental en las distintas estrategias de tratamiento junto con el beneficio de otros agentes como los inhibidores de la P2Y₁₂, ya sea clopidogrel, ticagrelor y Prasugrel. En cuanto a la terapia de puente hay varias estrategias, desde usar drogas de menor vida media como el ticagrelor hasta el uso de inhibidores de GP IIb/IIIa en casos de alto riesgo de trombosis. En los cuadros cerebro vasculares, la aspirina se usa en la mayoría de las indicaciones y los nuevos antiplaquetarios se están evaluando en distintos cuadros. En la arteriopatía periférica el arsenal terapéutico es menor. El estudio de nuevas drogas es importante para el manejo de terapias antiplaquetarias (27).

8. Nuevos compuestos con actividad antiplaquetaria

La búsqueda de nuevos fármacos y compuestos para inhibir la actividad plaquetaria se realiza intensamente en distintos estudios y con diferentes objetivos. Algunos de estos es la

búsqueda de tratamientos específicos para pacientes que requieran un fármaco especial, por ejemplo, los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) tienen tendencias hemorrágicas y trombóticas debido a la disfunción plaquetaria y a una alteración plaqueta-subendotelio por lo que la indicación de antiagregantes o anticoagulantes ante la aparición de fibrilación auricular (FA) es compleja debido a que se difieren en su farmacocinética renal. Ésta es la arritmia cardíaca crónica más frecuente y el tromboembolismo con la ictus isquémico son las complicaciones más importante (28).

La utilización de fármacos ya existentes y la creación de nuevos también es muy factible de estudiar. Se ha demostrado el vínculo entre la disfunción mitocondrial y los trastornos asociados a las plaquetas, por lo tanto, una intervención dirigida a las mitocondrias puede ser explorado en el diseño de nuevos compuestos con potencial terapéutico. Las investigaciones sobre la función de la mitocondria en estos casos han permitido identificar moléculas desde fuentes naturales, sintéticas y algunos fármacos aprobados por la FDA (como la metformina y estatinas) actúan sobre las mitocondrias de las plaquetas inhibiendo la respiración mitocondrial y su actividad antioxidante. Estos compuestos, por tanto, previenen la disfunción mitocondrial, la activación plaquetaria y la hiperpolarización mitocondrial previniendo la trombosis venosa y arterial sin riesgo de sangrado. La función de las mitocondrias de las plaquetas está relacionado al riesgo trombótico que se produce con la quimioterapia y la irradiación inducida que producen trombocitopenia. Por esto es importante el diseño de nuevas investigaciones con foco hacia las mitocondrias y su daño oxidativo hacia las plaquetas en órganos metabólicamente activos (29).

Existen estudios que realizan hallazgos de estructuras químicas capaces de inhibir la agregación plaquetaria incluso cuando se les agregan potentes estimuladores de formación de tampón plaquetar como lo es el colágeno o el trap-6. En este caso particular se evidencia que el uso de orto-carbonyl hydroquinones puede inducir una inhibición de la agregación plaquetar en un estudio in vitro. Modificaciones sobre el anillo, en este caso, sustituciones de gema-dietil/metilo y la adición del tercer anillo de armazón incluyen en el valor de S.I y

la potencia inhibitoria respectivamente. Un derivado de la hidroquinona ortocarbonilbicclica tenía selectividad hacia la agregación plaquetaria dependiente de la señalización inducida por colágeno y un derivado de gema-dietilo de triciclo era un agente dual que inhibía la agregación plaquetaria estimulada por colágeno y TRAP-6. Concluyen que estos hallazgos pueden usarse para un desarrollo de nuevos fármacos en enfermedades de trombosis relacionadas con plaquetas (30).

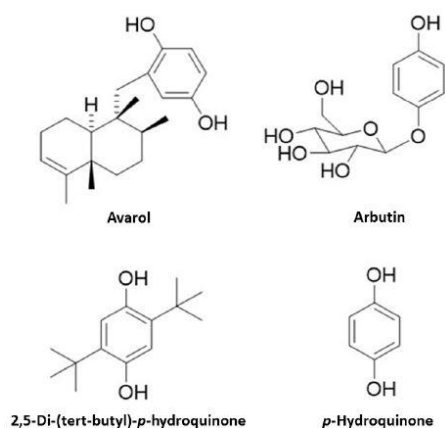


Figura 5: Representación de las estructuras químicas con actividad antitrombótica.

Tomado de Synthesis of antiplatelet ortho-carbonyl hydroquinones with differential action on platelet aggregation stimulated by collagen or TRAP-6. (Méndez Diego, 2020).(30)

9. Citometría de flujo y marcadores de activación plaquetaria

La citometría de flujo es una técnica de análisis que permite identificar a diferentes poblaciones celulares simultáneamente, así como obtener gran información de ellas dependiendo de las proteínas que se expresen y los marcadores que se utilicen. Se utiliza

para investigación y para análisis clínico ya que resulta útil y específico a la hora de identificar compuestos marcados específicamente. Un citómetro de flujo se encuentra compuesto por tres principales sistemas, el de fluidos, el óptico, y el electrónico (31).

El sistema de fluidos tiene como función alinear y transportar a las células dentro de una cámara de flujo hacia el haz de luz; por tanto, es necesario que la muestra se encuentre suspendida en un fluido. Para lograrlo, se aplica una propiedad hidrodinámica, que consiste en la inyección de la muestra en el centro de una corriente de fluido envolvente, el cual puede ser agua o un buffer de fosfatos. Lo anterior se logra porque la presión de la muestra es mayor que la presión del líquido envolvente. Gracias a este sistema, las células pueden ser alineadas en “fila india”, y de esta manera se asegura que el haz de luz incida sobre una célula a la vez (31).

El sistema óptico está compuesto por láseres y filtros, que se encargan de iluminar a las células y dirigir las señales resultantes hacia los detectores apropiados. Las células, al ser incididas por el láser, tendrán la capacidad de dispersar la luz de acuerdo con su tamaño y su granularidad. En caso de que la luz se disperse frontalmente, se obtendrá un parámetro denominado FSC (forward scatter), que indica el tamaño de la célula. Por tal motivo, aquellas células marcadas con fluorocromos serán excitadas por el láser y la luz será dirigida hacia un detector, el cual recibirá la longitud de onda emitida por la excitación del fluorocromo. Gracias a este sistema, se puede conocer el tamaño y la granularidad de la célula, así como las proteínas que se expresan (marcadores), permitiendo así la identificación de diferentes tipos celulares. A medida que el citómetro posea más detectores, mayor será su capacidad para identificar poblaciones celulares (31).

Una vez que la señal luminosa es generada cuando el haz de luz incide en la célula, ésta debe traducirse en señales electrónicas. El sistema electrónico consta de sensores luminosos como fotodiodos y fotomultiplicadores, que tienen la finalidad de convertir los fotones en electrones y éstos, a su vez, en corriente eléctrica. De este modo, la señal eléctrica es recibida por la computadora y traducida en gráficos e histogramas. Los resultados obtenidos pueden ser representados mediante diferentes estilos, desde una gráfica de puntos hasta una figura tridimensional; la clave se centra en seleccionar los gráficos que reflejen los resultados con precisión y sin generar confusiones (31).

El marcaje celular con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos representa un paso crucial para la identificación de subtipos celulares mediante el uso de la técnica de citometría de flujo. Los anticuerpos monoclonales permiten detectar y “etiquetar” poblaciones específicas de células. Esta tecnología consiste en la creación de un anticuerpo que sea capaz de unirse a una estructura específica (antígeno), mismo que se expresa en el tipo celular que se requiere identificar. Adicionalmente, este anticuerpo debe contener una unión covalente a un fluorocromo, que emitirá luz fluorescente cuando sea excitado por el láser, de este modo, la célula se “tiñe” y facilitará la identificación de las células que se unieron al anticuerpo o marcador (31).

Hoy en día se cuenta con una gran cantidad de anticuerpos acoplados a fluorocromos que, cuando son excitados, emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda. Por ejemplo, algunas moléculas emitirán luz verde, naranja, azul, roja o amarilla, dependiendo del fluorocromo seleccionado. Ello permitirá estudiar diversas poblaciones celulares a la vez. Es importante mencionar que, dependiendo del modelo de citómetro de flujo que se utilice, será la cantidad de colores que se puedan leer simultáneamente (31).

La p-selectina, expresada en plaquetas y células endoteliales, fue conocida como proteína de membrana granular (GMP-140) o proteína de activación plaquetaria dependiente de la membrana externa granular (PADGEM). Se sintetiza en células endoteliales y plaquetas permitiendo la unión de leucocitos, principalmente, neutrófilos y monocitos a estas células. Posteriormente se almacena en los cuerpos e Weibel-palade de las células endoteliales y en la cubierta de gránulos alfa y gránulos densos de las plaquetas inactivadas y desde estos lugares es trasladada a la superficie células por estímulo de mediadores inflamatorios como la trombina, histamina y leucotrieno C4 por lo que funciona como un marcador a la hora de querer conocer en que momento la plaqueta se encuentra activada ya que quedara expuesta en la membrana de la célula al liberarse los gránulos alfa (32). Para la investigación por citometría de flujo se utilizan anticuerpos para la p-selectina, como el anti-human CD62-ACP (33).

CD63 fue una de las primeras proteínas encontradas para la identificación de plaquetas activadas, es también conocida como glicoproteína 40 (Pltgp40). Esta establecido que también es un componente de las membranas de los endosomas y lisosomas tardíos, conocido como lysosome-associated membrane protein 3 (LAMP-3), está ampliamente expresado en diferentes tipos de leucocitos y células epiteliales, pero no en eritrocitos. Cuando hay estimulación de la célula esta molécula se moviliza hacia la superficie celular involucrándose en procesos inmunológicos, de crecimiento, migración, transducción, hospedador-patógeno interacciones, fagocitosis y cáncer. Existen anticuerpos como el COS3A que se utilizan para las investigaciones debido a que son marcadores de esta proteína y son fácilmente utilizables, se pueden crear en laboratorios o se pueden adquirir comercialmente. Los anticuerpos que se utilizan normalmente ya vienen conjugados con un fluorocromo que al unírsele a su antígeno emitirá fluorescencia que permitirá la lectura (34,35).

Existen otros marcadores para la activación plaquetar como CD69, GPIIb/IIIa [PAC-1], PF4, CD40L, integrinas como beta 1 y 3, proteínas moduladoras de respuestas inmunes como antígenos VLA-2, receptores de colágeno, proteínas de unión, entre otras. La mayoría son liberadas desde los distintos gránulos que se encuentran dentro de las plaquetas por lo cual, al activarse se pueden medir en el espacio extramedular por inmunofluorescencia, citometría o ELISA dependiendo del estudio. Como se dijo anteriormente las plaquetas están envueltas en distintos procesos por lo que las vías de activación y sus biomarcadores pueden abrir nuevas posibilidades diagnosticas en el seguimiento de enfermedades y el descubrimiento de fármacos (36).

La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} de 35-36 kDa que tiene una alta afinidad por la PS y se une a las células con PS expuesta. La anexina V puede conjugarse con fluorocromos que incluyen FITC. Tiene una elevada afinidad por la fosfatidilserina (molécula que se transloca al exterior de la membrana en plaquetas en apoptosis) (37).

HIPÓTESIS

El compuesto cloro-acilhidroquinona (HQM5BCl) inhibe la agregación y activación plaquetaria.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la inhibición de la agregación y activación plaquetaria del compuesto cloro-acilhidroquinona (HQM5BCl).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.** Determinar la actividad antiagregante plaquetaria del compuesto cloro-acilhidroquinona (HQM5BCl) en plaqueta estimuladas con PMA.
- 2.** Determinar la inhibición de la activación plaquetaria (con P-selectina y CD63) del compuesto cloro-acilhidroquinona (HQM5BCl).
- 3.** Estudiar el mecanismo antiplaquetario del compuesto cloro-acilhidroquinona (HQM5BCl) (midiendo ERO y anexina).

MATERIALES Y METODOS

Buffer Tyrodes sin calcio (Buffer lavado de plaquetas) ajustado a pH 7,4.

Utilizado para resuspender las plaquetas, tiene características como ser un medio apto para mantener células debido a que tiene un pH igual al fisiológico, iones y sales haciéndole isotónica al igual que el líquido intersticial por lo que se utiliza para experimentos fisiológicos. Su objetivo sería sustituir al plasma y mantener viables las plaquetas por hasta 3 horas.

Cuadro de protocolo de elaboración de buffer Tyrodes.

Reactivo	PM	Concentración final (mM)	Volumen agua des.	mmol/50 ml	Gramos	
NaCl	58,4	134	50	6,7	0,3912	
NaHCO ₃	84	12	50	0,6	0,0504	
KCl	74,55	2.9	50	0,145	0,0108	
Na ₂ HPO ₄	141,9	0.34	50	0,017	0,0024	
MgCl ₂ x 6H ₂ O	95,21	1	50	0,05	0,0102	
Glucosa	180,156	5	50	0,25	0,0450	
Buffer Hepes	-	10	50	0,5	0	500 µL

Protocolo agregación con plaquetas lavadas

- Extraer sangre venosa con anticoagulante ACD. Proporción Sangre: ACD; 4: 1.
- Centrifugar la sangre por 10 minutos a 1200 rpm para obtener PRP (utilizar la centrifuga sin freno ni acelerador).
- Extraer PRP y centrifugar en microcentrífuga por 8 minutos a 3000 rpm a 4°C.
- Re suspender pellet de plaquetas en TAF (buffer Tyrodes sin calcio): ACD; 9:1.
- Centrifugar en microcentrífuga por 8 minutos a 3000 rpm a 4°C.
- Re suspender pellet de plaquetas en TAF sin calcio, manteniendo en hielo.
- Ajustar la concentración a 250.000-300.000 plaquetas/uL aproximadamente.

Reacción de agregación:

- Control: 484 uL de plaquetas + 1 uL DMSO (0,2%) + 10 uL de CaCl₂ (2 mM). Preincubar 5 minutos a 37°C.
- Ensayo: 480 uL de plaquetas + 1 uL compuesto en estudio + 10 uL de CaCl₂ (2 mM). Preincubar 5 minutos a 37°C.

Iniciar la agregación con el agonista:

- 5 uL de PMA 10 uM (phorbol 12-myristate 13-acetate). Concentración final en la cubeta 100 nM.

Un control normal de agregación debe ser entre 60-80%.

Este protocolo también aplica para otros agonistas. Iniciando la reacción con los siguientes volúmenes y concentraciones:

- 3,3 uL de TRAP-6 (5 uM).
- 5 uL de Colágeno (1 ug/ml).

Protocolo Anexina V

Se utilizan plaquetas lavadas al igual que el protocolo anteriormente mencionado.

Condiciones de estudio:

- 1. Anexina Basal: 485 uL de plaquetas + 1 uL DMSO + 10 uL de CaCl₂ (2 mM).
- 2. Anexina full: 480 uL de plaquetas + 1 uL DMSO + 10 uL de CaCl₂ (2 mM) + 3,3 uL de TRAP-6 (5 uM) + 5 uL de Colágeno (1 ug/ml).
- 3. Compuesto: 480 uL de plaquetas + 1 uL compuesto en la concentración deseada + 5 uL de CaCl₂ (1 mM).

Incubar todas las condiciones de estudio 5 minutos a 37 ° C en termo bloque.

Tomar alícuota de 50 uL de cada condición y diluir con 150 uL de buffer de anexina 1x (ver inserto). Homogeneizar e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

Tomar alícuota de 30 uL de cada tubo anterior y marcar con 1 uL del anticuerpo Anexina V FITC, en oscuridad.

Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Diluir cada condición con 100 uL de TAF y leer en citómetro de flujo (FL1).

Protocolo medición ERO en plaquetas con la sonda Dihydroethidium

- Utilizar protocolo para obtención de plaquetas lavadas.
- Ajustar la concentración a 50.000 plaquetas/uL aproximadamente y adicionar CaCl₂ (2 mM).
- Marcar en oscuridad la suspensión de plaquetas, adicionando la sonda de ROS Dihydroethidium en dilución 1:1000 (10 uM).

Realizar las condiciones de estudio:

- Control ROS basal: 499 uL suspensión de plaquetas + 1 uL DMSO (0,2%).
- Control inductor ROS: 482 uL suspensión de plaquetas + 8 uL Antimicina A (20 uM).
- Compuesto: 499 uL suspensión de plaquetas + 1 uL compuesto.

Incubar durante 30 minutos a 37° C en termo bloque en oscuridad

Leer mediante Citometría de flujo en FL2.

Protocolo CD62 y CD63

- Utilizar protocolo para la obtención de plaquetas lavadas como el protocolo anterior.

Condiciones de estudio:

- 1. Basal: 489 uL de plaquetas + 1 uL DMSO + 10 uL de CaCl₂ (2 mM).
- 2. Activado: 486 uL de plaquetas + 1 uL DMSO + 10 uL de CaCl₂ (2 mM) + 3,3 uL de TRAP-6 (5 uM).
- 3. Compuesto: 486 uL de plaquetas + 1 uL compuesto en la concentración deseada + 10 uL de CaCl₂ (2 mM). Preincubar 10 minutos a temperatura ambiente y luego adicionar el agonista.

*El volumen final de las reacciones siempre debe ser 500 uL.

Iniciar la reacción con el agonista (condiciones 2 y 3):

- 3,3 uL de TRAP-6 (5 uM).

Incubar todas las condiciones de estudio 5 minutos a 37 ° C en termo bloque.

Tomar alícuota de 30 uL de cada condición de estudio y marcar en oscuridad con 2 uL de anticuerpo (CD62 o CD63) según la variable a evaluar:

- CD62 PE: P-selectina.
- CD63 PE: marcador de secreción de gránulos.

Diluir el tubo marcado con 200 uL de TAF sin calcio y leer en citómetro de flujo (FL2).

RESULTADOS

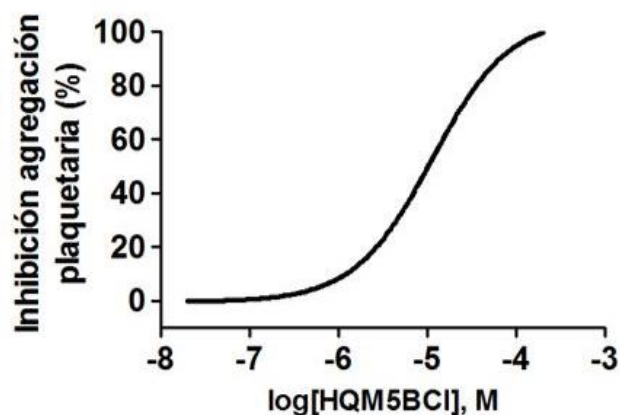


Figura 6: El compuesto HQM5BCL inhibió la agregación plaquetaria inducido por PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate). IC50 de inhibición: 6 ± 3 .

El PMA es un potente activador de la Proteína quinasa C (PKC). Cuando PKC se activa, induce la secreción de gránulos en las plaquetas, síntesis de tromboxano, activación de la glicoproteína IIb/IIIa y consecuentemente la agregación de las plaquetas. Se observa que el compuesto HQM5BCL genera una disminución en el porcentaje de agregación plaquetaria, con un valor de IC50 6 ± 3 μ M, es decir, a esa concentración promedio inhibe en un 50% la agregación de las plaquetas inducida por PMA.

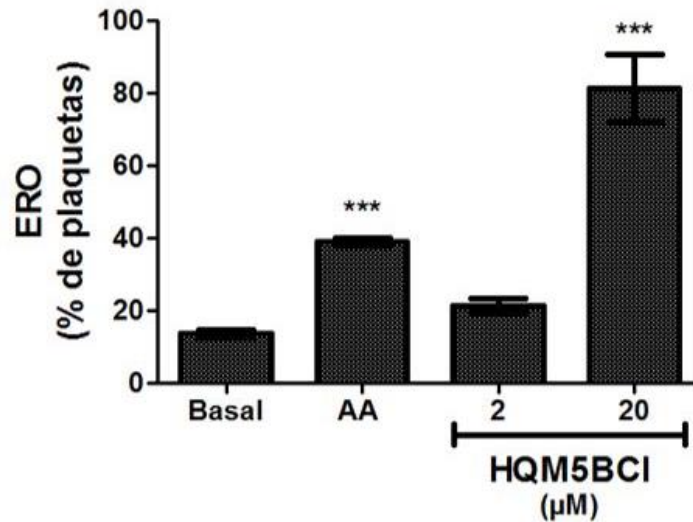


Figura 7: El compuesto HQM5BCI aumenta los niveles de especies reactivas del oxígeno. Las barras corresponden a la media \pm SEM. *** $p < 0.001$ vs. control basal (DMSO 0.2%).

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos de la medición de ERO. De izquierda a derecha tenemos 4 mediciones: el basal, que se obtuvo con las plaquetas lavadas adicionando el DMSO, con antimicina A en el segundo lugar, con 2 μM del compuesto y con 20 μM del mismo en el tercer y cuarto lugar respectivamente. Con la sonda Dihydroethidium (DHE) y mediante citometría de flujo, se evaluaron los niveles de ERO intracelular. Como control positivo de aumento de ERO, se utilizó Antimicina A. En la figura 7, se observa que Antimicina A produjo un aumento significativo del % de ERO en las plaquetas, al comparar con el control normal. Del mismo modo, se muestra que el compuesto HQM5BL en la concentración 20 μM , genera un aumento significativo del % de ERO en las plaquetas.

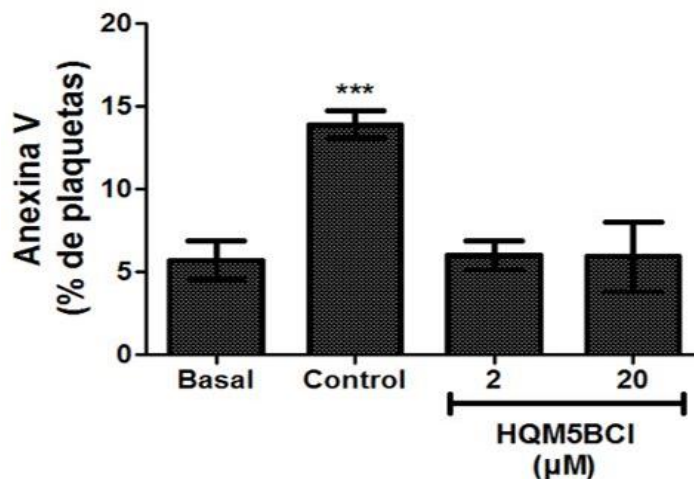


Figura 8: el compuesto HQM5BCI no afecta los niveles de anexina V. Las barras corresponden a la media \pm SEM. *** $p < 0.001$ vs. control basal (DMSO 0se.2%).

En la figura 8 se exponen el porcentaje de plaquetas positivas para anexina V. de izquierda a derecha tenemos la medición de anexina V basal la cual se midió con plaquetas adicionando DMSO y calcio, luego esta el control positivo al cual se le adiciono trap y colageno como potentes activadores de agregacion promoviendo la activacion y posterior exposicion de la anexina V en la membrana, luego se ven los resultados de utilizar el compuesto con 2 concentraciones distintas (2 y 20 uM respectivamente). Cuando se activan mecanismos apoptóticos en las células, se pierde la asimetria de fosfolipidos en la membrana, lo cual genera exposicion de fosfatidilserina (PS). La anexina V es una proteína con una elevada afinidad por la PS. La anexina V se conjuga con fluorocromos para evidenciar su union a PS. Además, la exposicion de PS en plaquetas junto con ser marcador de apoptosis es marcador de activacion, pues actúa como sitio de union de algunos factores de la coagulacion (actividad procoagulante). Esto quiere decir que el compuesto no induce la apoptosis de la plaqueta y tampoco una activacion de ésta al no haber diferencias significativas entre la midicon basal y las mediciones con diferentes concentraciones del compuesto.

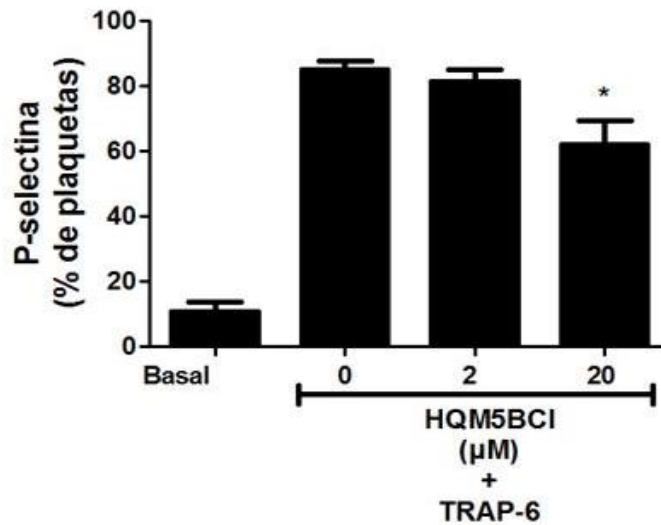


Figura 9: El compuesto HQM5BCI inhibió la expresión de P-selectina. Las barras corresponden a la media \pm SEM. ##### $p < 0.0001$ vs. control basal (DMSO 0.2%). * $p < 0.05$ vs. Control activado (TRAP-6).

En la figura 9 se muestra el porcentaje de plaquetas positivas para P-selectina mediante citometría de flujo. P-selectina se encuentra en la membrana de los gránulos alfa de las plaquetas. Cuando hay una activación de las plaquetas, se genera la secreción de gránulos, por lo cual P-selectina se moviliza hacia la membrana plaquetaria, siendo uno de los marcadores de activación más utilizados en investigación, a través del uso de anticuerpos. Mediante citometría de flujo, se evaluó el % de P-selectina en las plaquetas. Se observa que la estimulación con TRAP-6 genera un aumento significativo del % de P-selectina al comparar con el control basal. El compuesto HQM5BCL 20 μ M, disminuyó significativamente el % de P-selectina en las plaquetas, al comparar con el control positivo TRAP-6

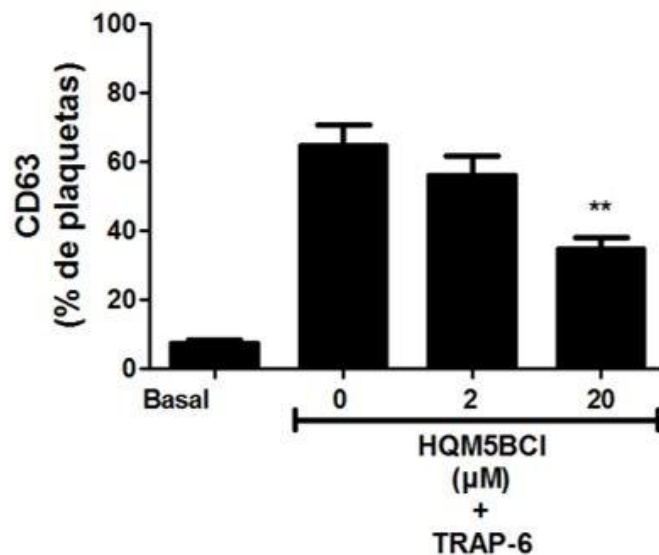


Figura 10: El compuesto HQM5BCL inhibió la expresión de CD63 (marcador de activación plaquetaria). Las barras corresponden a la media \pm SEM. ##### $p < 0.0001$ vs. control basal (DMSO 0.2%). ** $p < 0.01$ vs. Control activado (TRAP-6).

En la figura 10 se evidencia la cantidad de CD63 como marcador de activación plaquetaria. CD63 es una proteína que se encuentra al interior de los gránulos densos de las plaquetas y se utiliza como marcador de activación plaquetaria. También se observa que la estimulación con TRAP-6 genera un aumento significativo del porcentaje CD63 en las plaquetas, al comparar con el control basal. El compuesto HQM5BCL 20 μ M, disminuyó significativamente el % de CD63 en las plaquetas, al comprar con el control positivo TRAP-6.

DISCUSIÓN

Las plaquetas lavadas se usan en investigaciones para abordar diferentes temas, en este caso fue el estudio de la agregación plaquetaria y la medición de diferentes parámetros, lo cual puede ser visto en otros estudios de similares características evidenciando que es útil y tiene resultados satisfactorios (38,39). Esto es importante debido a que ayuda a corroborar la información entregada y deja bases para próximos estudios que se vayan a realizar.

Para iniciar los eventos experimentales se requieren distintas variantes que se aclimatan en el laboratorio. Por ejemplo, en este caso se utiliza PMA para activar las plaquetas, este es un fuerte activador de la proteína quinasa C debido a que fosforila dos serotoninas terminales (el 11 y el 18) iniciándose el proceso de activación plaquetar y permitiendo medir su actividad. Esta proteína es de la familia de mayores reguladores de secreción granular, agregación, extensión y actividad procoagulante. Tiene muchos activadores para comenzar el proceso de activación plaquetar como fosfolipasas C, colágeno, glicoproteína VI específica, colágeno relacionado a péptidos entre otros (40). Resulta de vital importancia al realizar estos experimentos contar con un activador específico para contener un menor sesgo y una variable de datos al azar mantenida al mínimo. Se ha visto en otras publicaciones e investigaciones utilizar el PMA como activador (41,42).

La figura 6 representa dos variables, el porcentaje de la inhibición plaquetaria versus la concentración del compuesto en estudio, en este caso la HQM5BCl, éste compuesto logro disminuir el cincuenta por ciento de la agregación plaquetaria a una concentración de $6 \pm 3 \mu\text{M}$ después de haber utilizado un activador de la proteína quinasa C la que fosforila múltiples proteínas celulares en los residuos de serina/treonina dando lugar también a la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, la agregación y la secreción de los gránulos (43). Sin

embargo, resultados como estos no dan cuenta del mecanismo que utiliza el compuesto en estudio y el cual es de vital importancia conocer para generar conocimiento para posteriores investigaciones.

En la figura 7 se muestra el nivel de especies reactivas de oxígeno o ERO (ROS) con antimicina A, primero que nada, este compuesto es un inhibidor de la transferencia de electrones provocando un impedimento en el flujo de estos y, por tanto, de la síntesis de ATP. Específicamente, la antimicina A es un inhibidor del complejo III impidiendo el paso de electrones desde el citocromo b a la UQ.(44). Utilizando esta molécula tendremos un control positivo de aumento de ERO, debido a que cuando se bloquea el transporte de electrones en el complejo III mitocondrial, estos se filtran hacia la matriz mitocondrial y reaccionan con el oxígeno, formando anión superóxido y desencadenando la formación de ROS mitocondrial como peróxido de hidrógeno. Esto se ha visto estudiado en otras investigación en las que se necesita una limitación o restricción de la respiración celular como búsqueda de antitumorales sin embargo su uso está relacionado con lo que investigamos actualmente (45) e incluso hay investigaciones que evidencia que al utilizar este compuesto hay un aumento de ERO (46).

Las ERO están asociadas con la actividad de la agregación plaquetar porque posiblemente están relacionadas con la activación de la vía fosfatidil-inositol 3 quinasa. Otras vías también pueden favorecer la producción de ERO como la generación de lipooxigenasas y ciclooxigenasas, la conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa y todas las citocromo p450 mono oxigenasas que también generan ROS en las células endoteliales. Las óxido nítrico sintasas producen óxido nítrico que reacciona con el superóxido para producir radicales peroxinitrito (47). Estos no son inhibidores de la agregación plaquetaria lo que sugeriría que la generación de ERO por parte de las plaquetas no es al azar. Por lo que se puede decir que el HQM5BCl genera ERO y por tanto su actividad antiplaquetaria no estaría relacionada a la disminución de la producción de ERO.

En la figura 8, se utilizó como control positivo un potente activador de las plaquetas (combinación de dos agonistas, TRAP-6 y colágeno). Se observa que el control positivo aumenta significativamente la exposición de fosfatidilserina en las plaquetas (medido como % de anexina V) al compararlo con el estado basal. Existen estudios que relacionan la anexina V con una menor sobrevivencia de las plaquetas (48) pudiendo extrapolarse a lo que se investigó en este trabajo. La anexina V tiene una fuerte afinidad Ca^{2+} dependiente por los PS lo que puede ser utilizado como prueba para la detección de la apoptosis. Al conjugar la Anexina V con un fluorocromo puede identificar las células apoptóticas una vez que esta se ha unido a los residuos de PS expuestos en su superficie celular. Se observa que el compuesto HQM5BCL, en las concentraciones 2 y 20 μM , no presenta diferencias significativas respecto al control basal. Esto significa que no induce apoptosis ni tiene un efecto procoagulante sobre las plaquetas. Induciéndose que la disminución de agregación plaquetaria no era por pérdida de funcionalidad de la plaqueta.

La P selectina es una glicoproteína que se almacena en los gránulos alfa desde donde son llevados a la superficie por un estímulo de mediadores como la trombina, histamina, leucotrieno etc. (49) por lo que su expresión en la plaqueta conlleva a la agregación plaquetaria debido a que su función es permitir la adhesión a otras moléculas y células como ha sido corroborado con otros estudios y no solo en plaquetas humanas sino que también de animales (32,50,51), en estudios similares se puede comparar que incluso usando otros activadores lleva a la expresión de la proteína en la membrana de la plaqueta por lo cual es un buen marcador de activación plaquetaria. En la figura 9 se observó la expresión de p-selectina después de la estimulación con TRAP-6 y la agregación o no del compuesto en estudio, observándose que disminuyó considerablemente el porcentaje de p-selectina en la superficie celular de las plaquetas al compararse con el control positivo con TRAP-6. Esto podría significar que los gránulos alfa de las plaquetas no están siendo desplazados a la superficie u otro mecanismo, sin embargo, para poder comprobar exactamente esto se deben realizar estudios posteriores.

El CD63 es un marcador de activación plaquetaria debido a que es una proteína que se encuentra al interior de los gránulos densos de las plaquetas y que al encontrarse activada la plaqueta se puede encontrar en su superficie como lo expresan otros estudios estadísticos y clínicos (51–53). En la figura 10 al estimularse las plaquetas con TRAP-6 se generó un aumento significativo del porcentaje de este marcador en la membrana de la célula comparándolo con el control basal. El compuesto HQM5BCL disminuyó significativamente el porcentaje de CD63 en las plaquetas al compararlo con el control positivo estimulado con TRAP-6, esto si bien no es concluyente para expresar e informar que mecanismo de acción realiza la molécula en estudio se puede decir que demuestra un efecto inhibitorio sobre la activación y posterior agregación de las plaquetas estimuladas por TRAP-6 que como se observó es un potente estimulador y activador de las células encargadas de formar tapones en el cuerpo ante daño vascular.

CONCLUSIÓN

El compuesto inhibe la agregación estimulada por PMA con el valor de $IC_{50} 6 \pm 3 \mu M$. Esta inhibición se demuestra al medir los marcadores de activación por citometría de flujo (CD62 y CD63). Al mismo tiempo el compuesto HQM5BCL no induce apoptosis en las plaquetas, pero genera un aumento de las ERO intracelular.

La investigación sobre la agregación plaquetaria mediante la medición en la producción de ERO, el porcentaje de anexina V expresada en la membrana de la plaqueta, asimismo de p-selectina y CD63 dan cuenta que efectivamente el compuesto HQM5BCL inhibe la agregación plaquetaria, sin embargo, no se tendrían claros los mecanismos por los cuales produce este efecto debido a que se descartó la relación entre la producción de ERO y la agregación plaquetaria. Además, se evidencio que este compuesto no promueve la apoptosis in vitro. Se necesitan estudios posteriores para extraer más conocimientos sobre su posible mecanismo de acción, ya que en este trabajo se observó una disminución en la expresión de p-selectina y el CD63 en la membrana de la plaqueta por lo cual existe un cierto grado de inhibición como consecuencia de la interacción con el compuesto estudiado.

La Hipotesis en esta investigación se cumplió debido a que mediante el objetivo general que fue evaluar la inhibición de la agregación y activación del compuesto cloroacilhidroquinona se obtuvieron resultados positivos a la interrogante. En cuanto a los objetivos específicos, se puede decir que se logró determinar la actividad del compuesto en plaquetas estimulada con PMA y se evidencio la inhibición de la activación plaquetaria al medir la p-selectina y el CD63, sin embargo, los estudios para estudiar el mecanismo antiplaquetario no dan resultados concluyentes por lo cual se recomienda hacer una continuación sobre el mecanismo de acción del HQM5BCL.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Flores-Rivera OI, Meza-Márquez JM, Nava-López JA, Ramírez-Morales K. Fisiología de la coagulación. *Rev Mex Anestesiología*. 2014;37:S382–6.
2. Lanari A. Megacariocitopoyesis y trombopoyesis. 2017;21(7–9):1–3. Available from: <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/05-Vol 21-extra.pdf>
3. Sarre-Álvarez D, Cabrera-Jardines R, Rodríguez-Weber F, Díaz-Greene E. Atherosclerotic cardiovascular disease. Review of risk scales and cardiovascular age. *Med Interna Mex [Internet]*. 2018;34(6):910–23. Available from: <http://www.scielo.org.mx/pdf/mim/v34n6/0186-4866-mim-34-06-910.pdf>
4. Prasad MG, Crocker MJ. Acoustic Modelling of Automobile Exhaust Systems. *Proc - Natl Conf Noise Control Eng*. 1981;27:93–8.
5. Laura D, Guirola G, Carlos R, Farías B, Ponce P, Emilio J, et al. Tabaco: bases etiopatogénicas de la enfermedad aterosclerótica. 2020;45–52.
6. Vaidean GD. Epidemiología cardiovascular. *Netter Cardiol*. 2006;586–93.
7. Veliz Rojas L, Mendoza Parra S, Barriga OA. Factores que influyen en el control integral de las enfermedades cardiovasculares. *Benessere Rev Enfermería*. 2018;2(1):8–20.
8. FERNÁNDEZ M, PARRA M, CALLIGARIS S, PARADA V, OJEDA MJ, QUIROZ S, et al. Percepción en médicos del impacto de la enfermedad cardiovascular en la mortalidad femenina. *Rev Med Chil*. 2018;146(10):1167–9.
9. Gráfico II-3 Mortalidad por enfermedades cardiovasculares según grupo de edad , Chile 2011 Gráfico II-4 Mortalidad por enfermedades cardiovasculares según Región , Chile 2011. 2015;2011:2011.
10. Dávila Sinaí del Carmen R, Silahua Sandra G, Rocha Sonia Guadalupe B, Jurado Benjamín R, Zavala Arnulfo Hernán N, Jalisco G. Hemostasia y factores asociados a tendencia trombótica Hemostasis and factors associated with thrombotic tendency.

- Rev Mex Patol Clin Med Lab [Internet]. 2019;66(4):227–33. Available from: www.medigraphic.com/patologiaclinicawww.medigraphic.org.mx
11. Núñez-martínez ME, Martínez-murillo C, Simón-domínguez JI, Pizzuto-chávez J, Dra C, Elizabeth M. Trombosis asociada a síndrome de plaquetas pegajosas. 2015;(September).
 12. Pfadt E, Carlson DS. Trombosis venosa profunda aguda. Nurs (Ed española). 2011;29(10):7.
 13. Grimaldo-Gómez FA. Fisiología de la hemostasia. Rev Mex Anestesiol. 2017;40:S398–400.
 14. Ramírez-Cruz NE, Ilescas I, Gallegos B, Solorzano C, Pérez Y, Hernández Cruz P. El papel de las plaquetas en enfermedades autoinmunes. Rev Educ Bioquímica. 2017;34(2):49–58.
 15. Talavera YA, Hernández IM, Portilla CV. Activación plaquetaria: Aspectos básicos, participación en la enfermedad cerebrovascular y proyecciones terapéuticas. Rev Ecuatoriana Neurol. 2007;16(2):127–32.
 16. Bermejo E. Plaquetas Platelets. Hematología [Internet]. 2017;21:10–8. Available from: [http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/06-Vol 21-extra.pdf](http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/06-Vol%2021-extra.pdf)
 17. Hernández Juárez J, Gallegos B, Pérez Campos Mayoral E, Pérez Campos E, Pina S, Hernández Cruz P. Efecto de la hiperglucemia en la actividad plaquetaria. Rev Educ Bioquímica. 2017;36(2):55–64.
 18. Dra. María Fabiana Alberto. Agregometria. Dep Hemost y Trombos Inst Investig Hematológicas Acad Nac le Buenos Aires [Internet]. 2018;34(2):19. Available from: http://www.grupocaht.com/html/PresentacionesCongresoCAHT2010/29_10/05_Simposio_Plaquetas/04_Alberto_Agregometria.pdf
 19. Educacional IVC. Fisiología de la función plaquetaria. 2018;231–7.
 20. Polo-García J, Rodilla-Rodilla E. Terapia con antiagregantes y anticoagulantes [Internet]. Real Academia Nacional de Farmacia. 2011. 1–86 p. Available from: http://www.institutotomaspascualsanz.com/descargas/formacion/publi/Curso_RANF

_3.pdf

21. López A, Macaya C. Plaqueta : fisiología de la activación y la inhibición. 2013;13:2–7.
22. Piera M. ¿Qué son los anticoagulantes y los agentes antiplaquetarios? Med 21. 2012;
23. Trejo I. C. Anticoagulantes: Farmacología, mecanismos de acción y usos clínicos. Cuad Cirugía. 2004;18(1):83–90.
24. Chaves L. 2. Antiplaquetarios. Rev Costarric Cardiol [Internet]. 2012;14(1–2):21–5. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-41422012000100005
25. Fernández JP, San H, Dios J De, Clinica H, Costa B. Drogas antiplaquetarias de utilización en Síndrome Coronario Agudo. Rev Costarric Cardiol. 2019;21(1):41–3.
26. Jara RC, Jiménez IA, Zúñiga AV. Intoxicación aguda por ácido acetilsalicílico. Rev Clínica la Esc Med UCR – HSJD [Internet]. 2016;1(I):8. Available from: www.revistaclinicahsjd.ucr.ac.cr
27. DI X, Uba HDC. Manejo práctico de agentes antiplaquetarios y terapia puente. 2017;234–43.
28. Belmar Vega L, de Francisco ÁLM, Bada da Silva J, Galván Espinoza L, Fernández Fresnedo G. New oral anticoagulants in patients with chronic kidney disease. Nefrología [Internet]. 2017;37(3):244–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nefro.2017.04.013>
29. Fuentes E, Araya-Maturana R, Urra FA. Regulation of mitochondrial function as a promising target in platelet activation-related diseases. Free Radic Biol Med [Internet]. 2019;136(November 2018):172–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.007>
30. Méndez D, Urra FA, Millas-Vargas JP, Alarcón M, Rodríguez-Lavado J, Palomo I, et al. Synthesis of antiplatelet ortho-carbonyl hydroquinones with differential action on platelet aggregation stimulated by collagen or TRAP-6. Eur J Med Chem [Internet]. 2020;192:112187. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112187>

31. Pérez-Lara JC, Santiago-Cruz W, Romero-Ramírez H, Rodríguez-Alba JC. Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica. *Rev Médica la Univ Veracruzana*. 2018;18(2):41–52.
32. Mitsui C, Kajiwara K, Hayashi H, Ito J, Mita H, Ono E, et al. Platelet activation markers overexpressed specifically in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2016;137(2):400–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.05.041>
33. Abouzeid G. Universidad de Murcia. All rights Reserv IJES [Internet]. 2018;281(4):1–30. Available from: <http://nadir.uc3m.es/alejandro/phd/thesisFinal.pdf%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Universidad+de+murcia#0>
34. Wansook S, Mahasongkram K, Chruengkamlow N, Pata S, Kasinrerker W, Khunkaewla P. Anti-human CD63 monoclonal antibody COS3A upregulates monocyte-induced IL-10 excretion leading to diminution of CD3-mediated T cell response. *Mol Immunol* [Internet]. 2019;114(August):591–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.09.005>
35. De Goeij BECG, Vink T, Ten Napel H, Breij ECW, Satijn D, Wubbolts R, et al. Efficient payload delivery by a bispecific antibody-drug conjugate targeting HER2 and CD63. *Mol Cancer Ther*. 2016;15(11):2688–97.
36. Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers. *Biomed Res Int*. 2016;2016:10–5.
37. Pelusa H, Valdés M, Bearzotti M, Svetaz M, Daniele S, Sjober I. Anticuerpos anti-anexina V y otros marcadores de actividad antifosfolipídica en mujeres abortadoras recurrentes con enfermedades autoinmunes. *Rev Arg Reum*. 2012;23(2):16–24.
38. Signorello MG, Ravera S, Leoncini G. Lectin-induced oxidative stress in human platelets. *Redox Biol* [Internet]. 2020;32(January):101456. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101456>
39. Brodard J, Alberio L, Angelillo-Scherrer A, Nagler M. Accuracy of heparin-induced

- platelet aggregation test for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Res* [Internet]. 2020;185(August 2019):27–30. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.11.004>
40. Harper MT, Poole AW. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. *J Thromb Haemost*. 2010;8(3):454–62.
 41. Investigaci CDE, Del C. Función de C3G en la señalización plaquetaria utilizando modelos de ratón transgénicos. 2018;
 42. Kong F, Ye B, Cao J, Cai X, Lin L, Huang S, et al. Curcumin represses NLRP3 inflammasome activation via TLR4/MyD88/NF- κ B and P2X7R signaling in PMA-induced macrophages. *Front Pharmacol*. 2016;7(OCT):1–10.
 43. Carla P. Estudio de la biogénesis de HNO por plaquetas humanas. 2017; Available from: https://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO001610_Ivani
 44. Garc D. Tesis doctoral. 2016;2016(c).
 45. Una I, Para O, Antitumorales A, Parker JF. Miguel angel cordova delgado. 2014;
 46. Yuliana H, Salas E. La proteína DOR/TP53INP2 modula negativamente la mitofagia dependiente de Parkin.
 47. Sánchez EL. rAdIcALES LIBrES En EL cOnTrOL dE LA AGrEGAcIón pLAquETArIA. 2010;(591):85–8.
 48. Jia L, Fan J, Cui W, Liu S, Li N, Lau WB, et al. Endothelial Cell-Derived Microparticles from Patients with Obstructive Sleep Apnea Hypoxia Syndrome and Coronary Artery Disease Increase Aortic Endothelial Cell Dysfunction. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(6):2562–70.
 49. Catherina L, Guitian C, Elena D, González L. Citocinas y moléculas de adhesión en el proceso aterotrombótico. *Issn 2218-6719 Rnps 2252*. 2013;43–50.
 50. Zhao H, Cao G, Chen H, Li H, Zhou J. Evaluation of hemocompatibility and hemostasis of a biofloculant. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2017;159:712–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.054>
 51. Toyoda T, Isobe K, Tsujino T, Koyata Y, Ohyagi F, Watanabe T, et al. Direct

activation of platelets by addition of CaCl₂ leads coagulation of platelet-rich plasma. *Int J Implant Dent.* 2018;4(1).

52. Soma P, Swanepoel AC, du Plooy JN, Mqoco T, Pretorius E. Flow cytometric analysis of platelets type 2 diabetes mellitus reveals “angry” platelets. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15(1):1–7.
53. Koudouovoh-Tripp P, Hufner K, Egeter J, Kandler C, Giesinger JM, Sopper S, et al. Stress Enhances Proinflammatory Platelet Activity: the Impact of Acute and Chronic Mental Stress. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2020;63.