



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

**ROL DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL COMO MECANISMO REGULADOR
DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA**

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

**AUTORA: JOCELYN KATHERINE RIQUELME NAVARRETE
PROFESOR GUIA: TM. DR. EDUARDO FUENTES QUINTEROS**

**TALCA-CHILE
2021**

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, 2022

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor guía Dr. TM Eduardo Fuentes, quien, a pesar de estar a kilómetros de distancia, supo orientarme y brindarme el apoyo que necesite para el desarrollo de esta memoria.

A todos quienes me apoyaron en el camino, todos los profesores que me formaron a lo largo de los años y me enseñaron valiosas lecciones que llevo siempre presente.

Agradecimiento especial a Coca-Cola, por mantenerme despierta durante las largas noches de estudio.

DEDICATORIA

A mis padres Silvia Navarrete y Manuel Riquelme, por ser quienes creen en mi incondicionalmente y me impulsan a dar lo mejor en la vida. A mi hermana Mariana, por enseñarme día a día que con esfuerzo y dedicación se puede hacer cualquier cosa. Finalmente, a toda mi familia y amigos, por su apoyo y confianza.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
3. OBJETIVOS	8
3.1 Objetivo general	8
3.2 Objetivos específicos.....	8
4. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA	9
5. MARCO TEÓRICO	10
5.1 Enfermedades cardiovasculares.....	10
5.2 Trombosis	11
5.2.1 Trombosis arterial	11
5.2.2 Trombosis venosa.....	12
5.3 Hemostasia	13
5.4 Precursores plaquetarios	14
5.5 Características morfológicas de las plaquetas	15
5.6 Función plaquetaria en hemostasia primaria	18
5.7 Función plaquetaria en procesos inmunes e inflamatorios	19
5.8 Mitocondrias	21
5.8.1 Estructura y función mitocondrial plaquetaria	21
5.9 Regulación mitocondrial plaquetaria	27
5.9.1 Regulación mediante Bcl-2	27
5.9.2 Regulación mediada por mitofagia	28
5.9.3 Regulación mediada por ROS	31
5.9.4 Regulación mediante mPTP y CypD.....	35
5.10 Compuestos farmacológicos que regulan la mitocondria plaquetaria.....	37
5.10.1 Compuestos derivados de fuentes naturales.....	37
5.10.2 Moléculas unidas a TTP+.....	39
5.10.3 Medicamentos aprobados por la FDA.....	41
5.11 Técnicas para evaluar la función mitocondrial	42

5.11.1 Seahorse: consumo de oxígeno.....	43
5.11.2 Potencial de membrana mitocondrial	45
5.11.3 Niveles de NADH (fluorescencia).....	48
5.11.4 Medición de ROS mitocondrial.....	50
5.11.5 Medición del poro de transición mitocondrial.....	52
5.11.6 Otras técnicas para evaluar función mitocondrial.....	52
6. CONCLUSIÓN.....	54
7. REFERENCIAS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Desencadenantes de la trombosis arterial (A) y venosa (B).	13
Figura 2. Estructura plaquetaria	17
Figura 3. Canales mitocondriales iónicos	26
Figura 4. Esquema representativo de las funciones de ROS al interior de la célula plaquetaria.	35
Figura 5. Gráfico ilustrativo de los niveles de OCR durante la prueba de estrés mitocondrial.....	44
Figura 6. Esquema de las principales utilidades de las sondas ocupadas para medir $\Delta\Psi_m$	48
Figura 7. Representación de las técnicas que miden la función mitocondrial.....	53

1. RESUMEN

En esta revisión bibliográfica se investigó sobre el rol que presentan las mitocondrias en la activación plaquetaria, puesto que las células plaquetarias se encuentran estrechamente relacionada con las enfermedades cardiovasculares y son parte fundamental de la formación de eventos trombóticos y coagulantes.

Entre las investigaciones de los últimos años se ha encontrado que la mitocondria regula la célula plaquetaria a través de diferentes estructuras proteicas y enzimáticas, tales como proteínas reguladoras de la familia de proteínas Bcl-2, donde se destaca el papel que presenta Bcl-XL y Bak en la determinación de la vida útil de las mitocondrias, por otro lado, Bcl-XL y Nix tienen un importante rol en los procesos de mitofagia; mientras que las enzimas NOX1 y NOX2 se encargan de regular los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS), un importante activador de las plaquetas, y también se destaca el rol del poro de transición de membrana mitocondrial y las ciclofilinas que regulan este poro, tanto en la externalización de fosfatidilserina (PS) como en la retención de fibrinógeno de alto nivel.

También se investigaron compuestos farmacológicos que tienen por objetivo la regulación de las mitocondrias a nivel plaquetario, los cuales se pueden agrupar en compuestos de origen natural, moléculas unidas a TTP+ y fármacos que se encuentran aprobados por la FDA. Por otro lado, se recopilaron las principales técnicas utilizadas para medir la actividad mitocondrial.

Palabras clave: Mitocondrias, Regulación plaquetaria, ROS, NOX1/NOX2, Hemostasia.

2. INTRODUCCIÓN

Actualmente una de las principales causa de muerte en el mundo son las enfermedades cardiovasculares, tanto a nivel mundial como nacional se ha visto un aumento en la incidencia de estas, donde la población más afectada principalmente es el adulto mayor, uno de los agentes celulares involucrados en las enfermedades cardiovasculares son las plaquetas, puesto que se ha demostrado que no solo participa en la hemostasia primaria, sino que tiene un rol en la respuesta inmune e inflamatoria. Conjunto a esto, se ha dejado ver una gran problemática, el déficit que existe en torno a la oferta farmacéutica de antiplaquetarios similares a los que actualmente se conocen como por ejemplo la Aspirina o el Clopidogrel, por lo que muchos investigadores han volcado sus recursos en torno a la búsqueda de distintos compuestos antitrombóticos, tanto de carácter sintético como natural que posea una efectividad igual o mayor a la de los fármacos que ya se encuentran disponibles en el mercado, que a su vez presente la capacidad de regular la acción plaquetaria, tenga viabilidad en la industria farmacéutica y sea segura para el tratamiento clínico de los pacientes.

Para la búsqueda de este tipo de compuestos se han estudiado e investigado diversas dianas celulares en sangre periférica, más específicamente a nivel plaquetario, las mitocondrias se han vuelto foco de diversos estudios en torno a su participación en el correcto funcionamiento plaquetario, debido a la falta de núcleo en la plaqueta y a la complejidad que presentan estos orgánulos, es uno de los sitios de acción que más se destaca, además se sabe que la desregulación mitocondrial es clave no solo en enfermedades cardiovasculares, sino también de enfermedades en las que se observa disfunción mitocondrial, tales como cáncer, diabetes, envejecimiento entre otras.

Es ahí donde radica la importancia de investigar el rol que presentan las mitocondrias a nivel plaquetario y como estas a través de distintos mecanismos se encuentran relacionadas con los procesos de activación plaquetaria.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general: Investigar el rol de la función mitocondrial en la regulación de la activación plaquetaria.

3.2. Objetivos específicos:

1. Identificar mecanismos de regulación plaquetaria.
2. Relacionar la función mitocondrial con la activación plaquetaria.

4. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA

Para la búsqueda de referencias de esta revisión se procedió a buscar en las bases de datos científicas Pubmed y Science direct, desde donde se recopilaron revisiones e investigaciones. Entre los criterios de selección utilizados fue el idioma, donde la totalidad de los artículos utilizados fueron de idioma inglés, otro criterio utilizado fue el año de publicación, en donde se seleccionó artículos posteriores a 1997.

Para la búsqueda de las enfermedades cardiovasculares se utilizaron las siguientes palabras claves: “Cardiovascular disease” y “coronary artery disease”. Para la búsqueda de información sobre trombosis se utilizó como palabras claves: “Thrombosis”, “Vein thrombosis” y “arterial thrombosis”. Para la búsqueda de estructura y función mitocondrial, y estructura y función plaquetaria se utilizó como palabras claves: “Hemostasis”, “Platelet structure”, “Platelet function”, “Mitochondrial structure” y “Mitochondrial function”. Para la búsqueda de información de sobre la función mitocondrial plaquetaria se utilizó: “Platelet mitochondrial function”, “Platelet mitochondrial dysfunction”, “Mechanisms of mitophagy”, “Mitochondrial ROS platelet regulation”, “NADPH oxidases in vascular pathology”, “Platelet activation NOX1 / NOX2” y “Platelets COAT”.

Para la búsqueda de información relacionada a los compuestos farmacológicos que regulan la función mitocondrial plaquetaria se utilizó como palabras claves: “Cyclosporin A”, “Salvianolic acid”, “Lipophilic Silamide derivatives and mitochondrial regulation”, “Xanthohumol and mitochondrial regulation”, “MitoQ”, “MitoTEMPO”, “Statins and platelets”, “Metformin and platelets”. Para la búsqueda de información relacionada a las técnicas para evaluar la función mitocondrial se utilizó como palabras claves: “Techniques to measure oxygen consumption”, “Seahorse oxygen consumption”, “Mitochondrial membrane potential assessment techniques”, “NADH fluorescence”, “Mitochondrial ROS measurement”, “MitoSox”, “Mitochondrial pore measurement”, “luciferin–luciferase assay”.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares se refieren a todas las enfermedades asociadas con el corazón y el sistema circulatorio. Estas enfermedades a veces son causadas por factores de riesgo modificables como la dieta, el ejercicio y otras elecciones de estilo de vida, mientras que en ciertas ocasiones son causadas por factores no modificables como la edad, el sexo, los antecedentes familiares y la predisposición genética a la enfermedad. Este tipo de enfermedades tienen efectos duraderos si no se tratan adecuadamente y se consideran una de las causas de muerte más importantes en todo el mundo. Las mayores tasas de mortalidad observadas en pacientes diabéticos se deben a un mayor riesgo de infarto de miocardio y accidente cerebrovascular (1, 2).

Las enfermedades de las arterias coronarias, el tipo más común de ECV, se refiere a la afección en la que los vasos circulatorios que suministran sangre oxigenada al corazón se estrechan. Esto ocurre debido al depósito de placa, que corresponde a una combinación de colesterol, macrófagos, calcio y tejido conectivo fibroso dentro de las arterias coronarias. Esta condición se conoce como aterosclerosis. Una vez que estas placas se rompen, se forman coágulos de sangre dentro de las arterias, lo que podría provocar un bloqueo parcial o completo del suministro de sangre a los músculos del corazón (1).

Se ha informado que las mitocondrias juegan un papel esencial en las estrategias terapéuticas para reducir el tamaño del infarto de miocardio y así prevenir la insuficiencia cardíaca en pacientes con cardiopatía isquémica. La disfunción a nivel mitocondrial puede conducir a una lesión aguda de la perfusión miocárdica seguida de un infarto agudo de miocardio (2).

El accidente cerebrovascular se produce por el bloqueo de la sangre oxigenada que llega al cerebro debido a una trombosis o una embolia, lo que provocaría daño cerebral. Existen tres tipos principales de causas de accidentes cerebrovasculares cardioembólicos, a saber, arritmia, trastornos de las válvulas y anomalías de la cámara y la pared cardíacas. Fuera de estas causas, la fibrilación auricular (tipo de arritmia) se considera una de las principales causas de los accidentes cerebrovasculares. La fibrilación auricular es una afección en la que la aurícula fibrila en lugar de contraerse por completo, crea un latido cardíaco irregular que genera una acumulación de sangre, lo que permite la formación de coágulos que pueden bloquear las arterias que suministran sangre al cerebro, desencadenando un derrame cerebral (1).

5.2 Trombosis

La trombosis (coagulación localizada de la sangre) puede ocurrir en la circulación arterial o venosa y tiene un impacto médico importante. La trombosis arterial aguda es la causa próxima de la mayoría de los casos de infarto de miocardio (ataque cardíaco) y de aproximadamente el 80% de los accidentes cerebrovasculares, en conjunto la causa de muerte más común en el mundo desarrollado, por otro lado, el tromboembolismo venoso es la tercera causa principal de muerte asociada a enfermedades cardiovasculares (3).

5.2.1 Trombosis Arterial

El desencadenante principal de la trombosis arterial es la rotura de una placa aterosclerótica que se desarrolla a través de la acumulación de depósitos de lípidos y macrófagos cargados de lípidos (células espumosas) en la pared arterial. Los trombos que se forman en las placas rotas son ricos en plaquetas, que son células anucleadas pequeñas producidas por megacariocitos en la médula ósea. Estas células en forma de disco circulan

en la sangre como centinelas de la integridad vascular y forman rápidamente un tapón hemostático primario en los sitios de lesión vascular (3).

Cuando se rompe una placa aterosclerótica, las plaquetas se reclutan rápidamente en el sitio, mediante la interacción de receptores específicos de la superficie celular de las plaquetas con el colágeno y el factor von Willebrand. Después de esta adhesión a la pared del vaso, la unión de plaquetas adicionales mediada por el receptor (denominada agregación plaquetaria) da como resultado un rápido crecimiento del trombo. Las plaquetas también se activan en esta etapa. Una vía importante de activación implica la escisión y, en consecuencia, la activación del receptor de plaquetas PAR1 (receptor 1 activado por proteasa; también conocido como receptor de trombina) por la proteasa trombina (también conocida como factor II), que es activada por la cascada de la coagulación sanguínea. Las plaquetas activadas luego liberan el contenido de los gránulos, que promueven aún más el reclutamiento, la adhesión, la agregación y la activación de las plaquetas (3).

5.2.2 Trombosis venosa

El tromboembolismo venoso (TEV) puede ocurrir potencialmente en cualquier sección del sistema venoso. Aunque las presentaciones clínicas más comunes involucran las venas profundas de los miembros inferiores y las arterias pulmonares, aunque también se diagnostica en el sistema venoso cerebral, en las venas abdominales y pélvicas, o en las venas retinianas, entre otros sitios. La embolia pulmonar es una complicación de la trombosis venosa profunda que puede ocurrir si parte del trombo se desprende, viaja a los pulmones y se aloja en una arteria pulmonar, lo que resulta en la interrupción del flujo sanguíneo (3, 4).

Los trombos que se forman en las venas son ricos en fibrina y glóbulos rojos atrapados y se denominan coágulos rojos, a diferencia de los trombos ricos en plaquetas que se forman en las arterias, que se denominan coágulos blancos (Figura 1). La trombosis venosa profunda

ocurre principalmente como resultado de cambios en la composición de la sangre que promueven la trombosis, cambios que reducen o anulan el flujo sanguíneo. Tanto los factores genéticos como los ambientales pueden aumentar el riesgo de tromboembolismo. En la enfermedad trombótica venosa hereditaria, puede haber un aumento de la actividad o abundancia de proteínas que promueven la coagulación y / o una disminución de la abundancia de proteínas que inhiben la coagulación (3).

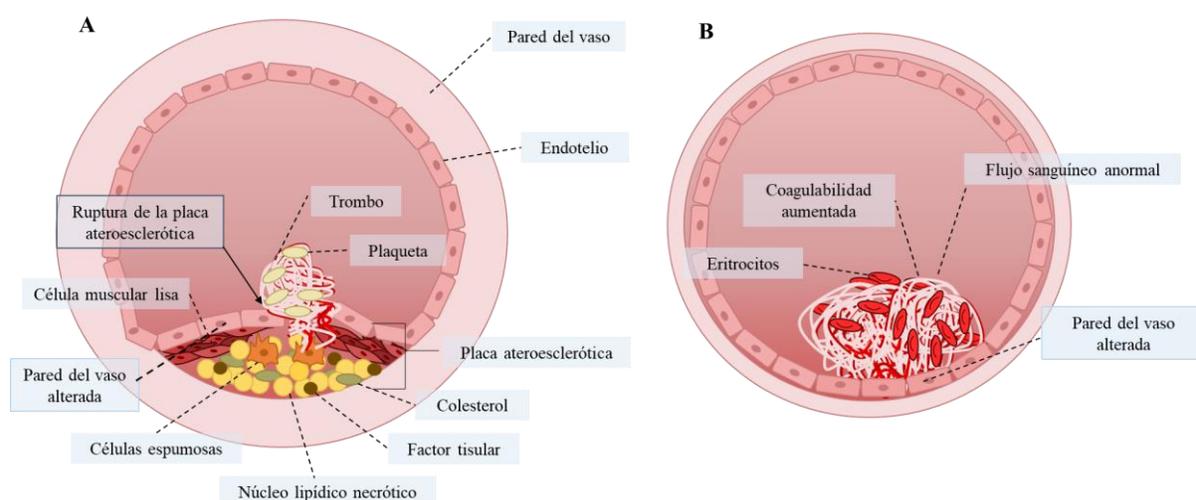


Figura 1. Desencadenantes de la trombosis arterial (A) y venosa (B). En la trombosis arterial el desencadenante principal es la rotura de la placa aterosclerótica, que conlleva una rotura del endotelio vascular, mientras que, en el caso de la trombosis venosa, el endotelio permanece intacto, pero se convierte en una superficie con propiedades procoagulantes. Fuente: Tomado y adaptado de Mackman, N. (2008) (3).

5.3 Hemostasia

La Hemostasia es el mecanismo que permite a un organismo cerrar los vasos sanguíneos dañados, mantener la sangre en un estado fluido y eliminar los coágulos sanguíneos después de la restauración de la integridad vascular. Aproximadamente hace 2.000 años Platón

describió la formación de fibras en la sangre al encontrarse fuera del cuerpo, además, de acuñar el término fibrina, nombre con el que actualmente se conoce a una de las proteínas claves en el proceso de coagulación, luego en el transcurso del siglo XIX se hicieron mayores descubrimientos sobre el mecanismo de la coagulación. Alrededor de 1865 Schultze descubrió las plaquetas y posteriormente en 1881 sus funciones en la hemostasia y la trombosis fueron aclaradas por Bizzozero (5, 6).

Las plaquetas son esenciales para la coagulación en la sangre y el mantenimiento de la hemostasia normal al prevenir la pérdida de sangre mediante la formación del tapón hemostático después de una lesión vascular, por el contrario, en condiciones patológicas como la aterosclerosis, las plaquetas participan en la trombosis arterial y venosa, puesto que la lesión vascular produce una activación plaquetaria hiperactiva, lo que aumenta la probabilidad de ocasionar una oclusión de los vasos conduciendo a infarto de miocardio y accidente cerebrovascular (7).

5.4 Precursores plaquetarios

Las células precursoras de las plaquetas se denominan megacariocitos (MK), de las cuales se forman a partir del citoplasma, los MK residen en la médula ósea, tienen un tamaño de 50-100 μm de diámetro, son aproximadamente el 0,01% de las células nucleadas de la médula ósea. Para el ensamble y liberación de las plaquetas, los MK se vuelven poliploides por endomitosis, es decir, se producen ciclos celulares incompletos repetidos en los que la mitosis se interrumpe en la anafase tardía con falla tanto de la cariocinesis como de la citocinesis, con el objetivo de generar la gran cantidad de síntesis de proteínas y lípidos necesaria para crear el IMS, un extenso complejo de cisternas y túbulos distribuidos por todo el citoplasma MK que es continuo con la membrana plasmática y que existe como un reservorio de membrana para la formación de proplaquetas; luego se someten a un proceso de maduración en el que la mayor parte del citoplasma se empaqueta en alrededor de 10 a 20 proplaquetas y el núcleo se extruye; las proplaquetas formadas inician como una protuberancia que se alarga,

adelgaza y ramifica con el tiempo, posteriormente las plaquetas se forman selectivamente en las puntas de las proplaquetas. A medida que se desarrollan las plaquetas, reciben su contenido de gránulos y orgánulos como corrientes de partículas individuales transportadas desde el cuerpo celular del MK (8, 9).

La formación de plaquetas se puede dividir en 2 fases, la primera fase de desarrollo y maduración del MK requiere días para completarse y utiliza factores específicos de MK. Durante este tiempo, se produce una proliferación nuclear masiva y aumento del tamaño citoplasmático del MK, al mismo tiempo que se llena de proteínas citoesqueléticas, gránulos específicos de plaquetas y suficiente membrana para completar el ensamblaje plaquetario. La segunda fase es relativamente rápida y requiere de unas horas para que se complete, en esta fase los MK generan plaquetas remodelando su citoplasma primero en proplaquetas y luego en preplaquetas, las cuales son sometidas a fisiones posteriores para finalmente generar plaquetas discoides (8).

5.5 Características morfológicas de las plaquetas

Las plaquetas son células anucleadas de 1.5–3 μm de diámetro, producidas por la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos en el hueso, médula y pulmones. Tienen una forma discoide en reposo y permanecen en circulación entre 7 a 10 días. Presentan una estructura formada por plasma, membrana y citoplasma. En el citoplasma de las plaquetas hay principalmente gránulos (alfa y densos), lisosomas y mitocondrias (10).

El responsable de mantener la morfología y permitir la funcionalidad de la célula plaquetaria es el citoesqueleto, en este se encuentran 3 estructuras de importancia, El esqueleto citoplasmático, el esqueleto de membrana y el anillo de microtúbulos. El esqueleto citoplasmático contiene una alta proporción de actina, la proteína más abundante en la plaqueta, en reposo esta actina se encuentra formando filamentos que tienen uniones cruzadas

con otras proteínas, lo que condiciona la formación de una malla tridimensional que funciona como un esqueleto celular, de esta manera, la actina se localiza en la zona de formación de pseudópodos, pudiendo unirse a la porción intramembranosa del complejo glicoproteico IIb-IIIa y promover líneas de tensión y favorecer la retracción del coágulo (11).

Por otro lado, el esqueleto de membrana está formado también por filamentos de actina y se encuentra ubicado inmediatamente por debajo de la membrana celular. Este sistema es el responsable de mantener la estabilidad de la membrana y capacita al complejo glicoproteico Ib-IX en su unión con el factor de von Willebrand, propiciando la adhesión de la plaqueta al subendotelio. Por último el anillo de microtúbulos está situado inmediatamente por debajo del esqueleto de la membrana y su función principal consiste en mantener la forma discoide de las plaquetas en estado basal y además centran los gránulos de la plaqueta cuando ésta es activada y su consecuente liberación por un proceso de exocitosis (11).

Las plaquetas presentan 3 tipos de gránulos, gránulos α , gránulos densos y lisosomas plaquetarios, los gránulos α son los más abundantes y hay alrededor de 50 a 80 gránulos α por plaqueta. El contenido de este tipo de granulo incluye glicoproteínas adhesivas como P-selectina, fibrinógeno y factor von Willebrand, factores de coagulación, factores mitogénicos, factores angiogénicos, inhibidores fibrinolíticos, inmunoglobulinas, proteínas específicas de membrana granular como P-selectina y CD63, y varias quimiocinas que incluyen PF4 (CXCL4) y RANTES (12).

Los gránulos densos almacenan una variedad de moléculas no proteicas hemostáticamente activas que se secretan durante la activación plaquetaria,(12) contienen más de 200 moléculas pequeñas que incluyen calcio, ATP, ADP, 5-HT y epinefrina. Siguiendo los pasos iniciales de activación plaquetaria, el gránulo denso se fusiona con la membrana plasmática de la plaqueta a través de complejos SNARE como VAMP8 y libera su contenido al espacio vascular extracelular (13). El tercer tipo de gránulos, los lisosomas plaquetarios, contienen Proteasas ácidas Carboxipeptidasas (A, B), catepsinas D, E, fosfatasa ácida, collagenasa,

Glicohidrolasas, Heparinasa, β - N - acetil - glucosaminidasa, β - glucuronidasa, β - glicerofosfatasa, β - galactosidasa, α - D - glucosidasa, α - L - fucosidasa, β - D - fucosidasa y proteínas catiónicas que tienen actividad bactericida (12, 14).

Las plaquetas normalmente contienen entre 5 y 8 mitocondrias, la mayoría de las cuales no deben verse comprometidas para que las plaquetas mantengan su función adecuada. En las plaquetas sanas, se ha demostrado que las mitocondrias sirven para una variedad de propósitos, desde el metabolismo, la activación, la producción de ATP hasta la regulación de los procesos celulares y la viabilidad (15). Todas las características morfológicas se pueden observar en la Figura 2.

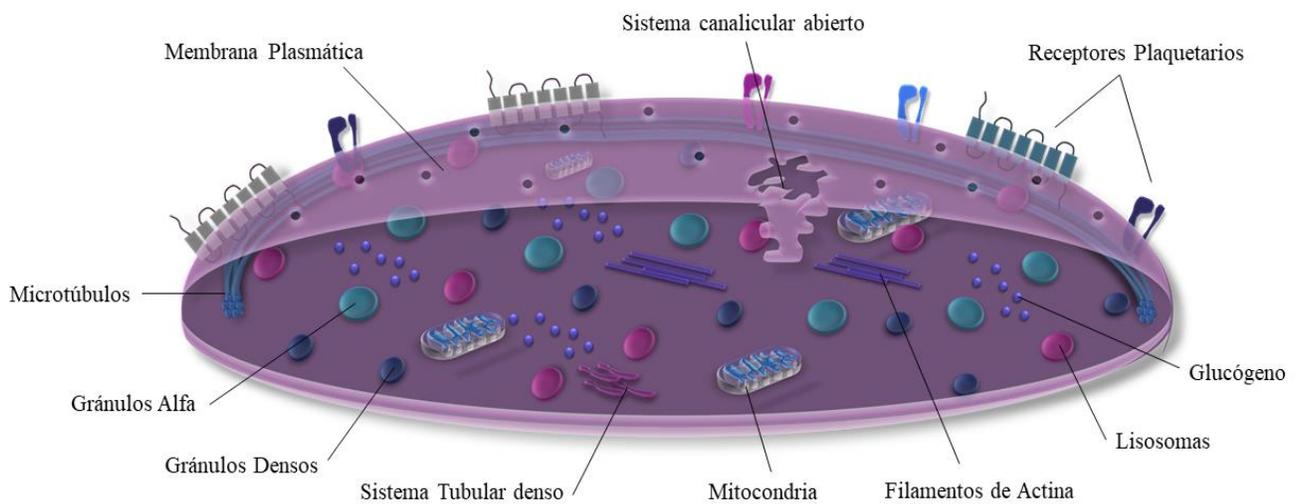


Figura 2. Estructura plaquetaria. La figura muestra la estructura morfológica de la plaqueta. Fuente: Elaboración propia Riquelme, J. (2021)

5.6 Función plaquetaria en hemostasia primaria

En la hemostasia primaria, las plaquetas se adhieren a la pared del vaso dañado en el lugar de la lesión. Este proceso se produce a través de múltiples cascadas de señalización y depende en gran medida de las glicoproteínas (GP) expresadas en la superficie de las plaquetas. La función inhibitoria del endotelio intacto, específicamente la producción de prostaciclina y óxido nítrico, así como la expresión de CD39, disminuye con el daño de los vasos y las proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno, se exponen a la circulación (16).

Las plaquetas pueden adherirse al endotelio o al tejido subendotelial a través de sus receptores de superficie GPIb / V / IX, GPIa / IIa y GPVI. Esto permite la unión directa al colágeno o la interacción con el factor von Willebrand subendotelial y circulante, lo que da como resultado la desaceleración y la adhesión de las plaquetas que antes fluían libremente (17). Esta fase de adhesión conduce a la activación plaquetaria, así como a una serie de cambios distintos fisiológicos y citoesqueléticos de las plaquetas, incluido un cambio de una forma discoide en reposo a un estado activado con numerosos pseudópodos (16).

El responsable del cambio de forma es el anillo de microtúbulos subyacente a la membrana plaquetaria, el cual se contrae y los filamentos de actina se cortan; a esta etapa le sigue una polimerización extensa de actina que forma múltiples filopodios. La fuerte adhesión plaquetaria requiere una conexión entre los filamentos citoesqueléticos y la matriz extracelular. Por lo tanto, la reorganización del citoesqueleto plaquetario se coordina simultáneamente con la formación de placas de adhesión, que unen la red de actina a la matriz extracelular (18).

Múltiples vías pueden conducir a la activación plaquetaria. Hay dos vías de activación principales en las plaquetas. GP Ib-IX-V, GP VI o el receptor 2 de tipo lectina de tipo C (CLEC-2) son todas glicoproteínas de membrana expresadas exclusivamente en plaquetas y

tienen vías de transducción de señales estrechamente relacionadas (19). Funcionan a través de motivos de activación inmunorreceptores basados en tirosina (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif* / ITAM) que se colocan en los dominios intracelulares del receptor o en una subunidad FcR γ asociada, desencadena la fosforilación de tirosina, la activación de α IIb β 3 y la secreción granular por las plaquetas (20). Se cree que el GPVI es el principal receptor de señalización implicado en la activación plaquetaria en el colágeno expuesto (12). Otros receptores de activación también pueden detectar marcadores solubles de daño, siendo los más importantes los receptores purinérgicos P2X1, P2Y1 y P2Y12, que detectan ADP y ATP liberados por células dañadas (19).

Después de la activación de la plaqueta, GPIIb / IIIa, que es el receptor con el mayor número de copias por plaqueta, estabiliza la formación de trombos proporcionando señales "de afuera hacia adentro" independientes de agonistas que dan como resultado la adhesión, propagación y retracción del coágulo de las plaquetas. Un mecanismo estrictamente regulado de modulación de la integrina dependiente de agonistas evita la activación y la señalización no deseadas. Similar, La señalización de afuera hacia adentro también está detalladamente regulada por reguladores tanto positivos como negativos. La molécula de adhesión de unión A (JAM-A) se fosforila rápidamente durante la activación plaquetaria por agonistas fisiológicos de una manera dependiente de la proteína quinasa C (21).

5.7 Función plaquetaria en procesos inmunes e inflamatorios.

Varios estudios han demostrado que las plaquetas afectan los procesos inflamatorios que van desde la aterosclerosis hasta las enfermedades infecciosas, lo que convierte a las plaquetas en el tipo de célula circulante más numerosa que tiene una función inmunitaria (22).

Las plaquetas también contribuyen a la inmunidad adaptativa al interactuar y activar las células dendríticas (DC) a través del eje CD40-CD154.(16) Las células T pueden activar las plaquetas a través de una interacción CD40L de células T / CD40 de plaquetas que conduce a la liberación de RANTES (regulador en activación de células T normales expresadas y secretadas, también conocido como CCL5) plaquetarias y un mayor reclutamiento de células T (22).

Las plaquetas humanas y de ratón expresan varios receptores *toll-like* (TLR), los TLR son sensores conservados que son fundamentales para la vigilancia microbiana y la regulación de las respuestas inflamatorias e inmunes. Su biología, señalización y reconocimiento de ligandos con motivos de patrones moleculares asociados a patógenos, daños y peligros se han estudiado y revisado ampliamente. La expresión de los TLR por las plaquetas proporciona una evidencia convincente de que estas células evolucionaron no solo como efectores principales de la hemostasia sino también como células inmunes (20). Entre los numerosos receptores que expresan los miembros de la familia TLR, se encuentran TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR8 y TLR9 (23).

Bajo ciertas condiciones infecciosas o estímulos inflamatorios, las plaquetas interactúan directamente con los leucocitos circulantes cambiando la expresión superficial de P-selectina o CD40. Las plaquetas P-selectina y CD40 son reconocidas por los leucocitos PSGL1 y CD154, respectivamente, lo que lleva a la formación de agregados plaquetas-leucocitos. Las plaquetas forman estos agregados predominantemente con los monocitos o neutrófilos circulantes, contribuyendo así a la respuesta inmune innata (16).

Los monocitos tienen funciones importantes en las enfermedades cardiovasculares crónicas, incluida la aterosclerosis, algunos de los primeros estudios de las interacciones de los monocitos con las plaquetas se centraron en la fagocitosis plaquetaria por los monocitos dentro de los trombos y especularon que esto podría contribuir al desarrollo de lesiones ateroscleróticas (22). La P-selectina también media en la formación de agregados plaquetas-

leucocitos cuando otras quimiocinas, incluidas SDF-1, RANTES, PF4 e IL-1 β , son secretadas simultáneamente por plaquetas activadas (23).

Las integrinas β 2 en la membrana plasmática de los polimorfonucleares que han sido activadas por señales de PSGL-1 y / o por señales paralelas de receptores acoplados a proteína G que reconocen quimiocinas o PAF pueden entonces unirse a fibrinógeno, plaquetas GP1b α , ICAM-2, JAM-3, y otros ligandos en plaquetas, mejorando la unión de P-selectina mediada por adhesión a PSGL-1(20).

PF4 también se localiza en lesiones ateroscleróticas y su expresión dentro de la lesión se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. Mecánicamente, el PF4 en presencia de TNF- α induce la exocitosis y la interacción firme de los neutrófilos con el endotelio al aumentar la inflamación de la lesión. La secreción conjunta de PF4 y RANTES puede promover sinérgicamente el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis. Por el contrario, el antagonismo de los receptores RANTES reduce significativamente el tamaño de las lesiones ateroscleróticas (23).

5.8 Mitocondrias

5.8.1 Estructura y función mitocondrial plaquetaria.

Las mitocondrias son los orgánulos citoplásmicos de doble membrana que contienen su genoma autorreplicante. Las mitocondrias realizan funciones bioquímicas clave esenciales para la homeostasis metabólica y son árbitros de la muerte y supervivencia celular. En eucariotas, las mitocondrias generan energía en forma de ATP a través del metabolismo oxidativo de los nutrientes mediante dos pasos principales, oxidación de NADH o FADH2 producida durante la glucólisis, ciclo de ácidos tricarboxílicos (*Tricarboxylic Acid Cycle* /

TCA) o β -oxidación de ácidos grasos y fosforilación oxidativa para generar ATP. Todos estos procesos están regulados por un complejo de factores de transcripción en las mitocondrias. Cada mitocondria contiene de 800 a 1000 copias de ADNmt, de aproximadamente 17 kb en forma circular, contiene 37 genes, 13 de los cuales codifican proteínas, mientras que 24 codifican ARNt y ARNr, las cuales se heredan por vía materna y se empaquetan en estructuras de nucleoproteínas de alto orden denominadas nucleoides (24, 25).

El ADN mitocondrial (ADNmt), al igual que el ADN nuclear, puede ser metilado por la maquinaria existente en el interior de las mitocondrias y puede mediar en el control de la expresión de genes mitocondriales. Las plaquetas carecen de núcleo y, por lo tanto, el genoma mitocondrial es el único material genético de estas células (25).

Su estructura consta de cuatro partes: la membrana externa mitocondrial (MEM), la membrana mitocondrial interna (MMI), el espacio intermembrana (IMS) y la matriz. Debido a los poros de transición bastante más grandes, las moléculas cruzan fácilmente la MEM a través de la difusión pasiva; sin embargo, el transporte de moléculas a través de MMI está muy regulado por transportadores altamente específicos (10).

La MEM encierra el orgánulo y es la puerta de entrada para el intercambio de una variedad de moléculas con su entorno inmediato. En cuanto a su composición, la MEM es bastante homogénea, y consta de alrededor de 1,0 a 1,5 μg de proteínas por μg de fosfolípidos. Fosfatidilcolina y las fosfatidiletanolamina son los constituyentes lipídicos más abundantes de la MEM, mientras que la cardiolipina fosfolípida de firma mitocondrial está presente en cantidades diminutas. La MEM se caracteriza por la presencia de un gran número de porinas, también conocidas como canales aniónicos dependientes de voltaje (*Voltage-dependent anion-selective channel* / VDAC). Estas proteínas formadoras de poros hacen que la membrana sea libremente permeable a todos los iones y moléculas de 5000 Dalton o menos (26).

Por otro lado, la MMI está compuesta por dos secciones principales, la membrana del límite interno (MLI) y la membrana de las crestas. Aquí, las crestas se definen como invaginaciones lamelares con bordes curvos formados a partir de la membrana mitocondrial interna y están conectadas a la membrana límite interna por las uniones de las crestas. Las uniones de las crestas representan la apertura de las crestas, por lo que el ancho es una medida de la distancia entre dos regiones opuestas de intersección entre las crestas e MLI (27).

Ambos compartimentos difieren en la composición proteica y la actividad funcional; OPA1 participa en la estabilización de la unión de las crestas y está interconectada con el sitio de contacto mitocondrial y el complejo organizador de crestas (complejo MICOS). De manera similar a OPA1, la captación de Ca^{2+} mitocondrial localizada en la membrana del límite interno (MLI) está involucrada en la estabilización de la unión de las crestas, el mantenimiento del potencial de MMI y la restricción del citocromo c a la luz de las crestas (28).

El complejo MICOS está compuesto por varias subunidades con mitofilina. Las proteínas MICOS están especialmente enriquecidas en las uniones de las crestas y forman sitios de contacto entre la MMI y entre la membrana MMI - MEM con proteínas como OPA1, translocasa de la membrana externa (*Translocase of the Outer Membrane* / TOM) y S-adenosilmetionina sintetasa para asegurar la biogénesis y estabilización de la unión de las crestas. La estructura de la unión de las crestas también restringe la F₀F₁-ATP sintasa y los complejos de la cadena respiratoria a la membrana de las crestas, lo que lleva a un compartimento cerrado de la luz de las crestas. Dado que el MEM es generalmente permeable debido al canal de aniones dependiente del voltaje (VDAC) la unión de las crestas parece formar una barrera de difusión para los protones, creando un espacio aislado para la actividad de F₀F₁-ATP sintasa y complejos de cadena respiratoria con gradientes laterales de pH (28).

La MEM es permeable en gran parte debido a VDAC, el cual permite el transporte de pequeños metabolitos e iones. Al contrario, la MMI presenta un transporte de iones muy

restringido. El bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana genera $\Delta\psi_m$, lo que aumenta la generación de ATP y regula la transferencia de iones a través de la MMI, la afluencia de K^+ está modulada por $\Delta\psi_m$ que desencadena la afluencia de K^+ a través de los canales de K^+ de dominio de dos poros (K2P) y por la producción de ATP mitocondrial que afecta a los canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}). a través de los canales de K^+ de dominio de dos poros (K2P) y por la producción de ATP mitocondrial que afecta a los canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}) (28).

Además, los niveles de Ca^{2+} mitocondrial aumentan la captación de K^+ mitocondrial al afectar la actividad de los canales de K^+ (KCa) activados por Ca^{2+} ; La extrusión de K^+ está asegurada por el transportador K^+ / H^+ (KHx); La homeostasis de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial también se encuentra altamente regulada; El uniportador de calcio mitocondrial (MCU) se controla estrictamente por varias proteínas, incluidos MICU1 y MICU2.

El nivel de Ca^{2+} mitocondrial se mantiene bajo control mediante un intercambio con otros iones, por ejemplo, el NCLX; Además, se ha propuesto que el LETM1 actúa como antiportador de Ca^{2+} / H^+ y / o K^+ / H^+ , en cualquiera de los casos influyendo en la afluencia y extrusión de Ca^{2+} tal como se esquematiza en la Figura 3(28, 29).

El control estricto de la homeostasis del Ca^{2+} es esencial, ya que la acumulación abrumadora de Ca^{2+} induce la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP) es un poro multiproteico no selectivo que se extiende por las membranas mitocondriales interna y externa. La formación del mPTP juega un papel fundamental en la regulación de algunas formas de muerte celular (28, 30).

Los complejos de la cadena respiratoria responsables de generar el gradiente de protones se encuentran ubicados en la superficie relativamente plana de las crestas, mientras que los

dímeros de ATP sintasa se ubican en el borde de la curva de las crestas y se alinean para formar cintas (31).

El modelo de plasticidad es hasta ahora la teoría más aceptada sobre la organización de la cadena respiratoria. En este modelo, la mayoría de CII, CIV y una proporción relevante de CIII son independientes y parecen moverse libremente en la membrana mitocondrial interna, mientras que la mayoría de CI es estabilizada por el dímero CIII, con o sin varias copias de CIV, y el super montaje de estos complejos es dinámico, con una cierta tasa de rotación. En consecuencia, es muy probable que la transferencia de electrones de CI a CIII se lleve a cabo mediante CoQ transportados dentro del supercomplejo I 1 III 2 IV_n, a pesar de que las CoQ que transportan electrones de CII parecen moverse libremente en la membrana (31).

Finalmente, el gradiente electroquímico transmembrana de H⁺ ($\Delta\mu_{H^+}$) creado por la oxidación del sustrato de la cadena respiratoria impulsa la síntesis de ATP por la ATP sintasa (32). El complejo F₀F₁-ATPasa funciona combinando dos motores rotativos con diferentes roles y estructuras. El dominio F₁ hidrófilo, formado por subunidades α 3, β 3, γ , δ y ϵ , sostiene la catálisis, es decir, sintetiza o hidroliza ATP mediante su hexámero globular α 3 β 3. El dominio F₀ hidrófobo, incrustado en la MMI y que aloja el canal H⁺, consta de una subunidad, las hélices α transmembrana de la subunidad b y las subunidades c que forman el anillo C (33).

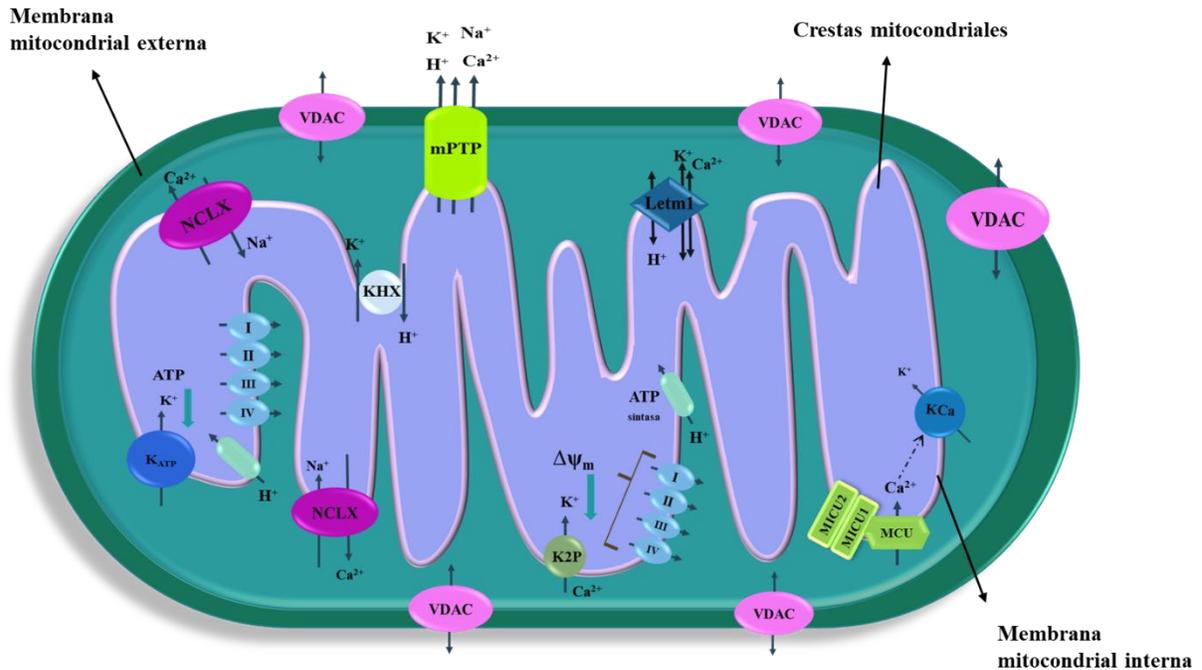


Figura 3. Canales mitocondriales iónicos. La figura esquematiza la estructura mitocondrial y los principales canales iónicos que presentan las mitocondrias. Fuente: Elaboración Propia Riquelme, J. (2021)

Las plaquetas tienen una mayor tasa de renovación de ATP que el músculo de mamíferos en reposo que contiene altos niveles de mitocondrias, lo que sugiere un papel esencial de las mitocondrias en la función plaquetaria (25), junto con los gránulos de glucógeno, las mitocondrias plaquetarias proporcionan energía que se necesita al menos indirectamente para la agregación plaquetaria y la secreción de moléculas procoagulantes (34). Además, las diferentes proteínas presentes en el interior de las mitocondrias son capaces de regular de diferentes formas la plaqueta desde su interior.

5.9 Regulación mitocondrial plaquetaria

La mitocondria se encuentra regulada por diferentes estructuras proteicas y enzimáticas, entre las proteínas reguladoras se encuentra la familia de proteínas Bcl-2, se destaca el papel que presenta Bcl-XL y Bak en la determinación de la vida útil de las mitocondrias, por otro lado, Bcl-XL y Nix tienen un importante rol en los procesos de mitofagia; mientras que las enzimas NOX1 y NOX2 se encargan de regular los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS), un importante activador de las plaquetas.

5.9.1 Regulación mediante Bcl-2

Las mitocondrias controlan la vida útil de las plaquetas a través de un mecanismo que involucra a la familia de proteínas Bcl-2, las que se encuentran divididas funcionalmente en proteínas pro y anti apoptóticas. Bax y Bak son moléculas proapoptóticas, las cuales al ser activadas provocan daños irreversibles en la membrana mitocondrial externa, provocando una permeabilización temprana de la MEM seguida de una interrupción posterior de la MMI, concomitante con la exposición a fosfatidil serina (PS), la formación de mPTP puede no estar involucrada y puede ocurrir una despolarización $\Delta\Psi_m$, además de liberación del citocromo C, además de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, donde desencadena la activación de la caspasa-9 (35-38).

Por otro lado, Bcl-XL, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-w, A1 y Bcl-b restringen a Bak y Bax. En respuesta al estrés celular, un tercer grupo de proteínas Bcl-2, las proteínas iniciadoras solo BH3 (Bim, Puma, Bad, Noxa, Bik, Hrk y Bmf), pueden inhibir las proteínas pro-supervivencia y contribuir tanto indirectamente como directamente a la activación de Bak y Bax. El equilibrio entre estas proteínas pro y antiapoptóticas de la vía intrínseca de la apoptosis varía según el tipo de célula (36-38).

Bcl-XL desempeña una función esencial de supervivencia en las plaquetas. Las plaquetas son un modelo único en términos de regulación de la duración de la vida porque en su mayoría dependen de solo dos miembros antagonistas de la familia Bcl-2, es decir, Bcl-XL para su supervivencia y Bak para su muerte (36).

Una de las hipótesis que se planteaba en torno a Bcl-XL y Bak, sobre la relación de un lapso de vida diferencial tomaba el nombre de “modelo de reloj molecular” dado que las plaquetas tienen una capacidad limitada para sintetizar nuevas proteínas, si Bcl-XL tiene una vida útil más corta que Bak, luego las moléculas de Bak eventualmente superan en número a Bcl-XL y se produce la apoptosis plaquetaria, la cual fue desechada en 2013 luego que se demostrase que las plaquetas envejecidas y jóvenes *in vivo* contienen la misma cantidad de Bcl-XL, por lo que ahora se estudian dos hipótesis sobre lo que desencadena la apoptosis plaquetaria *in vivo*, la primera es una activación directa de Bak por un factor desconocido mientras que la otra hipótesis es que la función de Bcl-XL se modifica en plaquetas envejecidas que pueden inducir una actividad inhibitoria disminuida sobre Bak (36).

5.9.2 Regulación mediada por mitofagia

La homeostasis mitocondrial se encuentra estrictamente regulada, esto para un aseguramiento de una cantidad y calidad óptima para mantener las diferentes funciones fisiológicas al interior de la célula, por lo que las mitocondrias deben ser sometidas a constantes ciclos de fisión y fusión, que proporciona un mecanismo para la reparación o eliminación de defectos mitocondriales. Las mitocondrias que presentan daños graves sin posibilidad de reparación son separadas de la red mitocondria mediante fisión mitocondrial y son eliminadas a través de autofagia mitocondrial o por apoptosis (39).

La mitofagia ocurre cuando las mitocondrias segregadas no retienen su potencial de membrana. Hasta ahora, se sabe que la mitofagia en células de mamíferos ocurre a través de

una vía PINK1 (quinasa putativa 1 inducida por PTEN), PARK2 (Parkina ubiquitina ligasa E3) o una vía dependiente del receptor de mitofagia (40).

PINK1 se importa a las mitocondrias sanas a través de la maquinaria de importación general, la translocasa de la membrana externa (TOM) y la translocasa de la membrana interna (TIM). Dentro de las mitocondrias, PINK1 sufre escisiones consecutivas por las proteasas mitocondriales que resultan en que PINK1 ya escindido se reexporte y posteriormente se degrade por la vía de la regla del extremo N a través del sistema Ub / proteasoma, obteniendo finalmente niveles bajos de PINK1 endógeno en mitocondrias sanas (41).

Para la importación de proteínas, incluida PINK1, en la mitocondria requiere un gradiente de protones activo y se inhibe con el daño mitocondrial (41) tras la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, PINK1 se estabiliza y se acumula en la membrana mitocondrial externa, lo que resulta en la fosforilación de PARK2 y el reclutamiento de receptores de autofagia. PARK2 fosforilada se activa para mediar en la ubiquitinación de varias proteínas de la membrana mitocondrial externa, lo que conduce a la fisión mitocondrial y la degradación autofágica de las mitocondrias dañadas (39).

El marcador de autofagosoma MAP1 de cadena ligera 3 (LC3) es una proteína similar a la ubiquitina que se une covalentemente a la fosfatidiletanolamina durante la biogénesis de la autofagosoma, lo que le permite integrarse y esculpir la membrana de aislamiento en crecimiento y participar en el reclutamiento de carga, los receptores de mitofagia que han conservado las regiones de interacción MAP1LC3 / LC3 (LIR) marcan las mitocondrias dañadas para el reclutamiento de la maquinaria de autofagia a través de la interacción directa con LC3 y otras proteínas ATG. FUNDC1 y Nix se han descrito como receptores de mitofagia en células de mamíferos (40, 42).

Nix pertenece a un subconjunto de proteínas mitocondriales proapoptóticas, dentro de la familia de proteínas Bcl-2, y se ha demostrado que se dirige directamente a las membranas mitocondriales para inducir cambios asociados a la apoptosis. Estructuralmente, Nix contiene un dominio PEST, un dominio BH3 y un dominio transmembrana (TM) C-terminal. In vivo, Nix homodimeriza o se asocia con otros miembros de Bcl-2 para formar heterodímeros (43).

Nix regula los niveles de proteína Bcl-XL, probablemente a través de la degradación autofágica; se ha reportado que la pérdida de Nix aumenta los niveles de proteína Bcl-XL en las plaquetas y esto, a su vez, puede resultar en la prolongación de la vida útil de las plaquetas. Esto fue concluido luego de un estudio en el cual se evaluó la actividad plaquetaria en plaquetas de ratones deficientes de Nix. La deficiencia de Nix provocó la acumulación de mitocondrias funcionalmente dañadas y producción excesiva de ROS mitocondrial en las plaquetas, lo que generó una alteración de la activación plaquetaria, un tiempo prolongado de sangrado de la cola de ratones y una trombosis arterial atenuada en el modelo de lesión arterial carotídea inducida por FeCl₃ (39).

Por otro lado, FUNDC1 es un receptor de mitofagia de mamíferos, que contiene 155 aminoácidos y que se encuentra localizada exclusivamente en mitocondrias, interactúa y recluta LC3 en las mitocondrias para la mitofagia. También se encontró que FUNDC1 está fosforilado en tirosina 18 (Y18) y serina 13 (S13) por SRC quinasa y CK2, respectivamente. La fosforilación evita la interacción entre FUNDC1 y LC3 para la mitofagia posterior en un sistema de mamíferos (40, 44).

FUNDC1 endógeno interactúa con DNM1L que es una molécula citosólica reclutada en las mitocondrias para la fisión mitocondrial, y con OPA1, una GTPasa que se localiza en la membrana interna y el espacio intermembrana y juega un papel esencial tanto en la fusión como en la fisión de la membrana interna mitocondrial, manteniendo la estructura de las crestas. En condiciones normales, FUNDC1 puede anclar OPA1 a través de su residuo de lisina cargado hacia la superficie interna de la membrana externa mitocondrial, sin embargo,

la interacción se reduce en condiciones de estrés mitocondrial, esto debido a que OPA1 se escinde o incluso se degrada, promoviendo así la fisión mitocondrial, que es necesaria para la mitofagia (40).

Se ha determinado que el estado de fosforilación de FUNDC1 puede regular la interacción con DNM1L o OPA1, lo que refleja el hallazgo de que el estado de fosforilación de FUNDC1 regula la mitofagia. Los estudios realizados sugieren la regulación recíproca de la fisión o fusión mitocondrial y la mitofagia y la señalización bidireccional a través de la doble membrana de la mitocondria para la fisión o fusión mitocondrial y la mitofagia (40).

5.9.3 Regulación mediada por ROS

Los radicales libres de oxígeno o, más generalmente, las especies reactivas del oxígeno (ROS), así como las especies reactivas del nitrógeno (RNS), son productos del metabolismo celular normal, la mayoría de las ROS intracelulares se derivan del anión superóxido formado principalmente por las mitocondrias. Entre las ROS, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno se consideran mensajeros críticos para iniciar cambios en los eventos de señalización celular (45, 46).

El equilibrio redox permite mantener la correcta funcionalidad de las funciones vitales celulares, cuando hay estrés oxidativo, es debido al desequilibrio en las características redox de algún entorno celular que puede ser el resultado de procesos bioquímicos que conducen a la producción de especies reactivas, exposición a agentes dañinos como contaminantes y radiaciones ambientales, o capacidades limitadas de sistemas antioxidantes endógenos (47).

Las ROS / RNS celulares más importantes incluyen moléculas basadas en oxígeno tanto radicales como no radicales, como anión superóxido ($O_2 \bullet^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2),

radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), ion hidroxilo (OH^-), así como moléculas a base de nitrógeno que incluyen óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), radical dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$) y peroxinitrito (ONOO^-)(48).

Las ROS intraplaquetarias o extraplaquetarias estimulan la activación plaquetaria mediante la regulación de: la función de los receptores plaquetarios, la biodisponibilidad de los agonistas o inhibidores plaquetarios, la formación de isoprostanos y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (48).

Tras la activación, la estimulación de los agonistas desencadena vías de señalización que dan como resultado la producción de ROS tanto por las NADPH oxidasas (NOX) como por las mitocondrias. El aumento de la producción de ROS endógenos, a su vez, altera la función de las mitocondrias y aumenta la activación plaquetaria en un bucle autoamplificador, lo que facilita la exposición de la fosfatidilserina (PS), el cual se encuentra cargado negativamente en la membrana plaquetaria, posibilitando la unión a los factores coagulantes VIII (FVIII), Va y Xa, donde proporciona una superficie fuertemente catalítica para el ensamblaje de protrombinasa y tenasa, desencadenando la generación de trombina en sangre (48, 49).

El papel fundamental de las ROS y las mitocondrias en la función plaquetaria ha surgido recientemente, regulando la activación, agregación y reclutamiento plaquetario, sintonizando varias vías de señalización celular; este aspecto es aún más relevante si se considera que las plaquetas son tanto fuente como diana de ROS (48).

A nivel mitocondrial el superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) se genera principalmente a nivel de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y puede convertirse en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la enzima superóxido dismutasa (SOD) o sufrir una dismutación espontánea. En presencia de iones de metales de transición, por ejemplo, iones de hierro y cobre, el H_2O_2 puede generar a través de la reacción de Fenton el radical hidroxilo altamente reactivo ($\text{HO}\bullet$).

Las especies reactivas también pueden ser producidas enzimáticamente por xantina oxidasa (XO), óxido nítrico sintasas desacopladas (NOS) y NADPH oxidasa (NOX) (47).

Por otro lado, la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa) (NOX), un complejo enzimático de la membrana celular, mediante este complejo, se pueden transportar electrones del NADPH a través de las membranas biológicas para reducir el oxígeno a superóxido ($O_2^{\bullet-}$). La familia de NOX se compone de siete isoformas diferentes que incluyen NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2; difieren en activación, composición de subunidades, localización y expresión (48).

Presenta una estructura compleja, puesto que consta de dos elementos unidos a la membrana (gp91 PHOX y p22 PHOX), tres componentes citosólicos (p67 PHOX , p47 PHOX y p40 PHOX) y una proteína G de bajo peso molecular (ya sea rac 2 o rac 1). La activación de la NOX está asociada y probablemente causada por la migración de los componentes citosólicos a la membrana celular, de modo que se pueda ensamblar la oxidasa completa (50).

Se sabe que tanto NOX1 como NOX2 se expresan en plaquetas y son fundamentales en la producción de ROS que se presenta posterior a la activación plaquetaria mediada tanto por el receptor acoplado a proteína G (GPCR) como por GPVI. Ambas isoformas son inactivas en las plaquetas en reposo y se activan al ser estimuladas por agonistas, formando un multicomplejo con varias subunidades citoplasmáticas reguladoras, considerándose responsables de la regulación de la respuesta plaquetaria. Sin embargo, se han obtenido resultados contradictorios en términos del papel diferencial de NOX1 y NOX2 en el receptor acoplado a proteína G (GPCR) o agregación y función plaquetaria dependiente de GPVI (48, 51).

La producción de ROS dependiente de NOX puede, a su vez, desencadenar una generación adicional de ROS por parte de las mitocondrias plaquetarias (Figura 4). Los sitios de unión de ubiquinona en el complejo I y III de la cadena transportadora de electrones se han identificado como las principales fuentes mitocondriales de ($O_2^{\bullet-}$), que luego puede convertirse en H_2O_2 por la superóxido dismutasa 2 (SOD2). La producción de ROS mitocondrial está regulada principalmente por el estado redox de la cadena transportadora de electrones y, por lo tanto, por el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (48).

Los productos de superóxido resultantes, peróxido de hidrógeno o peroxinitrito, activan el canal de potasio mitocondrial sensible al ATP (K_{ATP}), lo que lleva a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) con la formación subsiguiente de ROS mitocondrial (mtROS). Los mtROS facilitan la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP) el posterior escape de mtROS al citosol, donde provocan una mayor activación de PKC y NOX junto con un aumento del calcio intracelular (52). La formación sostenida de mPTP conduce a la interrupción del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$), y la despolarización de $\Delta\Psi_m$ se asocia con la exposición a PS tanto en plaquetas estimuladas por agonistas in vitro como en plaquetas que envejecen in vivo (35).

Se ha indicado que $ONOO^-$ puede reaccionar con residuos de tirosilo para formar 3- NO_2^- Tyr y con tioles para generar S-nitrosotioles, lo que reduce el efecto inhibidor del NO. Además, $ONOO^-$ puede actuar como sustrato para la peroxidasa COX, lo que lleva a la activación de la prostaglandina endoperóxido H sintasa y al aumento de la formación de prostaglandinas. Estas reacciones son importantes para la síntesis de tromboxano A2 derivado de plaquetas. Además, $ONOO^-$ derivado de plaquetas puede conducir a la producción de 8-iso-PGF_{2a} a partir del ácido araquidónico, mientras que 8-iso-PGF_{2a} puede aumentar la liberación de calcio de las reservas intracelulares, inducir cambios en la forma de las plaquetas y amplificar la agregación plaquetaria en respuesta a los agonistas. Además, es probable que $ONOO^-$ mejore la biodisponibilidad del difosfato de adenosina, aumentando así el reclutamiento adicional de plaquetas (53).

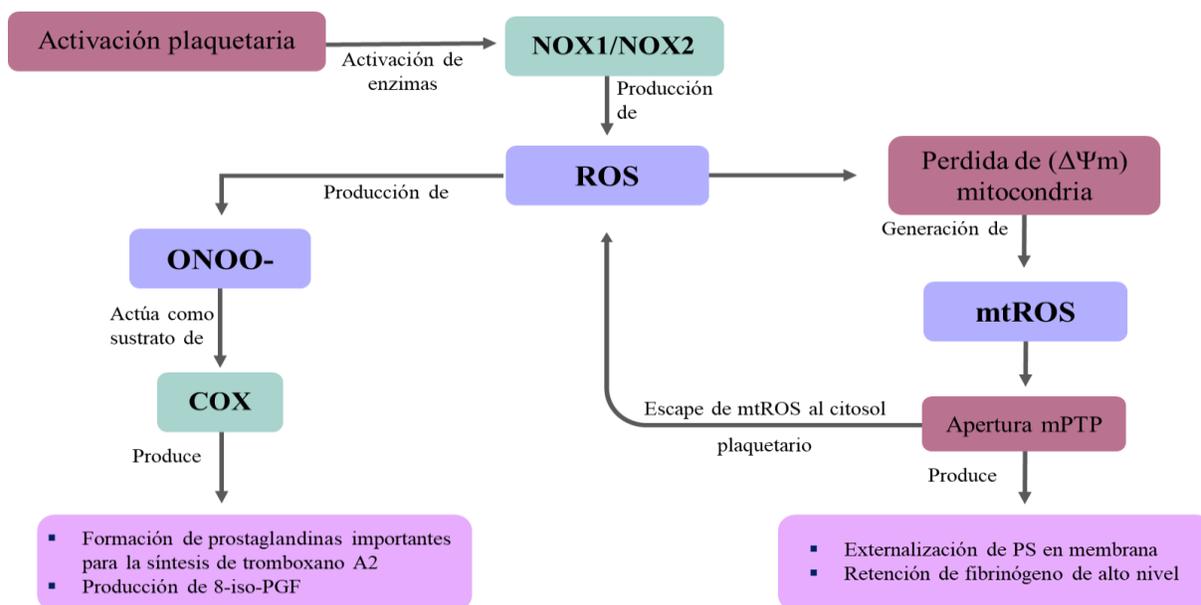


Figura 4. Esquema representativo de las funciones de ROS al interior de la célula plaquetaria. Fuente: Elaboración propia Riquelme, J. (2021)

5.9.4 Regulación mediante mPTP y CypD

Las plaquetas recubiertas son un subconjunto de plaquetas que resultan de la activación de agonistas dobles con colágeno y trombina. Estas células inusuales, anteriormente conocidas como plaquetas COAT, un acrónimo de los agonistas de colágeno y trombina utilizados en su formación (54). Se caracterizan por niveles altos y sostenidos de calcio libre intracelular, pérdida del potencial mitocondrial, recubrimiento de su superficie por proteínas de gránulos α pro-hemostáticos, regulación a la baja de GPIIb / IIIa activada (pérdida de su propiedad de agregación), y la expresión de PS para apoyar los complejos de protrombinasa y tenasa para el proceso de coagulación (55).

La formación de mPTP juega un papel clave en la regulación de la activación plaquetaria, induciendo la transición plaquetaria de un estado activado a uno altamente activado

(plaquetas procoagulantes) tipificado por vesiculación, externalización de fosfatidilserina (PS) de alto nivel y retención de fibrinógeno de alto nivel.(48) Luego de utilizar activadores (Óxido de fenilarsina y Diamida) de mPTP, se observó un marcado aumento de producción de plaquetas recubiertas, mientras que al usar inhibidores (Ciclosporina A, Coenzima Q y Ácido bongkrelico) de mPTP, se vio inhibida la producción de este tipo de plaquetas (54).

Un regulador importante de mPTP es la ciclofilina D (CypD), una peptidil-prolil cis-trans-isomerasa mitocondrial, es producto del gen *Ppif* y es una proteína de ~22 kDa con una secuencia de dirección mitocondrial que se escinde a medida que se importa a la matriz mitocondrial, creando un producto final de ~19 kDa. Fue nombrado, como todas las ciclofilinas, por su capacidad para unirse al fármaco ciclosporina A (CsA). CypD interactúa con la F1F0-ATP sintasa, el portador de fosfato (PiC) y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) todos los cuales se han propuesto como componentes potenciales del mPTP (56, 57).

El transporte de electrones por la cadena de transporte de electrones, el consumo de oxígeno por la citocromo oxidasa y el aceptor final de electrones están acoplados a la producción de ATP por la ATP sintasa. En las mitocondrias bien acopladas, los electrones no se transportan y el oxígeno no se consume a menos que esté presente ADP. El acoplamiento mitocondrial depende en gran medida de la permeabilidad del MMI. Si hay fugas a través del MMI (mitocondrias desacopladas), el gradiente electroquímico se disipa, lo que conduce a una producción de ATP menos eficiente (56).

En ausencia de CypD, varias respuestas de activación plaquetaria, incluida la externalización de fosfatidilserina, la retención de fibrinógeno de alto nivel, la modulación antigénica $\alpha_{IIb} \beta_3$, la formación de vesículas en la membrana, la actividad procoagulante y la relajación de la retracción del coagulo, se ven marcadamente afectadas; La localización de CypD en la matriz mitocondrial, junto con los efectos de la ausencia de CypD sobre la pérdida

dependiente de la activación de $\Delta\Psi_m$, apunta a un papel crítico de un evento mitocondrial en la regulación de la activación plaquetaria (30).

5.10 Compuestos farmacológicos que regulan la mitocondria plaquetaria

Dado que muchas moléculas potenciales de fármacos no exhiben adecuadamente un comportamiento selectivo con los sitios mitocondriales, interactuando con varios objetivos, solo una fracción de la concentración total está disponible para actuar sobre cada uno. En consecuencia, el tratamiento de los orígenes de los trastornos en las mitocondrias impone el desarrollo de estrategias de selección selectiva (10).

Las mitocondrias al encontrarse dentro de la célula plaquetaria, obliga a utilizar moléculas que cumplan con muchos requisitos fisicoquímicos para poder atravesar las membranas y poder llegar al objetivo. Entre los compuestos que presentan acción protectora contra la disfunción mitocondrial en plaquetas, se encuentran divididos entre: compuestos derivados de fuentes naturales, moléculas unidas a TPP⁺ y medicamentos aprobados por la FDA (10).

5.10.1 Compuestos derivados de fuentes naturales

a) Ciclosporina A

Ciclosporina A (CsA), un potente inhibidor de mPTP, suprime la apertura de los poros al inhibir la matriz ciclofilina D (CypD), evitando así los cambios conformacionales inducidos por CypD en las proteínas centrales de mPTP; se sabe desde hace mucho tiempo que la CsA desensibiliza la mPTP de la apertura temprana al impedir la interacción de Ca²⁺ con CypD (58). Sin embargo, CypD no es el único objetivo de CsA, en estudios recientes se ha reportado que CsA actúa principalmente a través de la unión a ciclofilina A (CypA) y la consiguiente

inhibición de la fosfoproteína fosfatasa 2B (calcineurina), donde se ha demostrado que CsA aumenta la adhesión y agregación plaquetaria inducida por estímulos leves (ADP) (59).

b) Acido Salvianólico

El ácido salvianólico es uno de los compuestos bioactivos de *S. miltiorrhiza* BGE extraído de la raíz de *S. miltiorrhiza*, comúnmente llamado "Danshen" en China (60). Se ha demostrado que el ácido salvianólico B (SAB) inhibe la agregación plaquetaria inducida por ADP y la adhesión plaquetaria al interactuar con el receptor de colágeno $\alpha 2\beta 1$ (61).

Hay estudios que señalan que SAB previene la disfunción mitocondrial y la fragmentación mitocondrial del daño oxidativo inducido por H₂O₂, mediante la regulación positiva de la mortalina, proteína anti-apoptótica que tiene como característica que su sobreexpresión protege contra la apoptosis al prevenir la acumulación de ROS redundantes en las mitocondrias (62).

Por otro lado, el ácido salvianólico A (SAA) inhibe la agregación plaquetaria inducida por colágeno, trombina, ADP e inducida por U46619, además se ha demostrado que inhibe de forma potente la adhesión plaquetaria en condiciones de flujo arterial. Los efectos inhibidores de plaquetas de SAA también se demostraron como reducción de la unión de fibrinógeno plaquetario y expresión de P-selectina, lo que condujo a una disminución de la agregación plaquetaria-leucocito. Además, SAA puede prevenir la toxicidad mitocondrial inducida por radicales de oxígeno en el corazón de rata e inhibir la generación de radicales libres en tejidos sometidos a estrés oxidativo (61).

c) Derivados lipofílicos de Silamida

Los derivados lipofílicos de silamida obtenidos por reacción de N-acetilcisteína (NAC) con 3- aminopropiltrimetilsilano y aminometiltrimetilsilano, protegen las plaquetas contra la apoptosis inducida por el estrés oxidativo. Inhiben significativamente los marcadores apoptóticos de plaquetas inducidos por la rotenona / H₂O₂, como aumento de los niveles de ROS, aumento de los niveles de Ca²⁺ intracelular, pérdida de $\Delta\Psi_m$, liberación de citocromo c mitocondrial al citosol, actividad de caspasa-9 y -3 y externalización de PS (63).

d) Xanthohumol

El xanthohumol (XN) es el principal flavonoide prenilado del *Humulus lupulus* (planta de lúpulo), XN ha demostrado generar disminución de la función adhesiva plaquetaria, disminución de P-selectina, disminución de la expresión de $\alpha IIb\beta 3$ y el calcio citosólico, además de afectar la actividad de la protrombinasa plaquetaria después de la administración de este. XN induce la expresión de Sirt1, lo que disminuye la sobrecarga de ROS, previene la disfunción mitocondrial y reduce el daño de la membrana asociado inducido por plaquetas activadas y la hiperpolarización mitocondrial. En ensayos de función mitocondrial diseñados para detectar cantidades de ADN mitocondrial (ADNmt) extracelular, se encontró que XN previene la liberación de ADNmt, que actúa como un factor de daño celular y posteriormente puede inducir la activación plaquetaria (64).

5.10.2 Moléculas unidas a TPP +

Para mejorar la entrada a las mitocondrias, los compuestos pueden modificarse mediante la unión al catión lipofílico de trifenilfosfonio (TPP) El TPP corresponde a un átomo de fósforo, cargado positivamente, unido a una gran superficie hidrófoba dada por tres grupos fenilo. Debido al $\Delta\Psi_m$ de 150-180 mV (negativo en el interior), la carga positiva de TPP se utiliza para mejorar sus ingresos y acumulación (concentración 500 veces mayor) dentro del matriz mitocondrial (65).

Según su funcionalidad, el TPP se ha empleado como un grupo dirigido a las mitocondrias para el suministro de agentes anticancerígenos, péptidos, ácidos nucleicos y compuestos antioxidantes a las mitocondrias (aislado, en células intactas y en organismos completos). Los antioxidantes basados en TPP son más efectivos que el compuesto antioxidante solo, a pesar de tener el mismo resto antioxidante, porque se acumulan dentro de la matriz mitocondrial y eliminan directamente la producción de ROS; entre estos compuestos unidos a TPP+ se encuentra MitoQ y MitoTEMPO (65).

a) MitoQ

La mitoquinona (MitoQ; 10- (4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il) deciltrifenilfosfonio) es la molécula pionera diseñada específicamente para disminuir el estrés oxidativo mitocondrial, este compuesto incluye un resto de ubiquinona adherido covalentemente a una cadena alifática terminal de 10 carbonos con un complejo de trifenilfosfonio (TPP +). Se ha demostrado que MitoQ disminuye la adhesión plaquetaria y disminuye la propagación del colágeno, y la expresión de P-selectina y CD63 en la superficie plaquetaria, además, inhibe la agregación plaquetaria inducida por colágeno, convulxina, péptido activador del receptor de trombina 6 (TRAP-6) y 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA). Como mecanismo antiplaquetario, MitoQ produce despolarización mitocondrial y disminución de la secreción de ATP, mientras que en plaquetas estimuladas con antimicina A y colágeno, MitoQ disminuye significativamente la producción de ROS (66).

b) MitoTEMPO

La Doxorubicina (DOX) es un agente quimioterapéutico altamente efectivo que se usa ampliamente para tratar una variedad de cánceres, sin embargo, su uso está limitado por algunos efectos secundarios, como cardiotoxicidad y trombocitopenia. DOX induce de

manera dependiente de la dosis la despolarización de $\Delta\Psi_m$, la exposición a PS, la translocación mitocondrial de Bax, la liberación de citocromo C y la activación de caspasa-3, lo que proporciona evidencia suficiente para indicar que DOX incurre en apoptosis plaquetaria intrínseca mediada por mitocondrias (67).

Se encontró que Mito-TEMPO, un antioxidante dirigido a las mitocondrias puede acumularse específicamente en la matriz mitocondrial 1000 veces debido a su carga positiva, inhibe significativamente la apoptosis de plaquetas inducida por DOX, incluida la disipación de $\Delta\Psi_m$, la exposición a PS, la activación de caspasa-3, la translocación mitocondrial de Bax y la liberación de citocromo C. Además, Mito-TEMPO también tiene la capacidad de inhibir parcialmente la eliminación de GPIIb α inducida por DOX (67, 68).

5.10.3 Medicamentos aprobados por la FDA

a) Metformina

La metformina, un sensibilizador a la insulina, puede mejorar la función vascular y varias anomalías fisiológicas relacionadas con la resistencia a la insulina con menos efectos secundarios informados en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Estudios han demostrado que la metformina reduce la liberación de ADNmt de las plaquetas activadas y suprime la disfunción mitocondrial mediante la inhibición del complejo I en la cadena transportadora de electrones (69).

Por otro lado, se demostró que los compuestos derivados de la metformina, 4-nitrobenzenosulfonamida y 2-nitrobenzenosulfonamida, poseen propiedades anticoagulantes, manifestadas por la formación prolongada de trombos dependientes de

plaquetas en condiciones semifisiológicas y una disminución de la liberación de vWF *in vitro* (70).

b) Estatinas

Los estatinas (inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa) son los fármacos más relevantes utilizados para reducir los niveles de colesterol sérico. Estudios han demostrado que la terapia con simvastatina, además de su efecto hipocolesterolémico, disminuye el estrés oxidativo, por otro lado se ha visto un aumento de los marcadores antiaterogénicos y antiinflamatorios; reduce la agregación plaquetaria a agonistas fisiológicos, y aumenta la sensibilidad de las plaquetas a los efectos antiagregantes de la aspirina (71).

Ratones tratados con atorvastatina mostraron un aumento de eNOS y factor plaquetario 4 regulado a la baja y beta tromboglobulina en las plaquetas, efectos que están ausentes en ratones knockout para la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). La fluvastatina actúa a través del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR α) y (PPAR- γ) para reducir la agregación plaquetaria en respuesta al ácido araquidónico y una agregación plaquetaria disminuida en comparación con la colestimida. La atorvastatina inhibió agudamente el reclutamiento de plaquetas, disminuyó Nox2, Rac1, proteína quinasa C, fosfolipasa plaquetaria A2 y tromboxano A2 mientras aumentaba los niveles de NO (72).

5.11 Técnicas para evaluar la función mitocondrial.

La medición de la función mitocondrial es preponderante para conocer el estado mitocondrial, ya sea bajo la investigación de ciencia básica como de ciencia aplicada. Entre las técnicas que se utilizan, se encuentra la medición de consumo de oxígeno, la medición

del potencial de membrana, niveles de NADH por fluorescencia, niveles de ROS mitocondrial, medición del poro de transición mitocondrial (mPTP) y la medición de ATP (Figura 7).

5.11.1 Seahorse: consumo de oxígeno

Una de las pruebas más informativas de la función mitocondrial es la cuantificación de la respiración celular, ya que refleja directamente el deterioro de la cadena de transporte de electrones y depende de muchas reacciones secuenciales desde la glucólisis hasta la fosforilación oxidativa. Uno de los últimos pasos de la respiración celular es la oxidación del citocromo c en el complejo IV, que reduce el oxígeno para formar agua; por tanto, las estimaciones de las tasas de consumo de oxígeno (OCR) expresadas en pmol / min permiten sacar conclusiones sobre la capacidad de sintetizar ATP y sobre la función mitocondrial (73).

Los analizadores Seahorse Bioscience XF tiene la capacidad de calcular las concentraciones de O₂ a partir de la fluorescencia en un formato de ensayo de microplacas. Permite mediciones simultáneas en tiempo real tanto de (OCR; un indicador de fosforilación oxidativa) como de la tasa de acidificación extracelular (ECAR; un indicador de glucólisis) en múltiples líneas y condiciones celulares, lo que reduce la cantidad de material de muestra requerido y aumenta el rendimiento (73).

Se utiliza oligomicina, Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), rotenona y antimicina A (Figura 5) para realizar la prueba de estrés mitocondrial, debido a que dichos compuestos facilitan la medición de la funcionalidad de la cadena respiratoria mitocondrial en organismos mediante la determinación de, por ejemplo, la producción de ATP, la fuga de protones, la respiración máxima, la capacidad respiratoria de reserva y la respiración no mitocondrial (74).

La oligomicina inhibe el complejo V (ATP sintasa) de la cadena transportadora de electrones, y la inyección de este compuesto muestra qué parte del OCR se debe a la síntesis de ATP. La inyección posterior del desacoplador FCCP, un protonóforo, permite que los protones se muevan hacia la matriz mitocondrial independientemente de la ATP sintasa. Para mantener el potencial de membrana, los protones se mueven de regreso al espacio intermembrana aumentando el flujo de electrones a través de la cadena transportadora de electrones hasta la velocidad máxima. Por tanto, la inyección de FCCP revela la capacidad respiratoria máxima (OCR máxima) de las células (75).

La proporción de OCR máxima en comparación con la OCR basal se conoce como capacidad respiratoria de reserva (*spare respiratory capacity / SRC*). SRC es la capacidad mitocondrial adicional disponible en una célula para producir energía en condiciones de mayor trabajo o estrés y se cree que es importante para la supervivencia y función celular a largo plazo. La rotenona y la antimicina A bloquean el Complejo I y III, respectivamente, inhibiendo así completamente la cadena transportadora de electrones y, como tal, cualquier consumo de oxígeno restante después de estos compuestos no es mitocondrial. La diferencia entre OCR después de oligomicina y OCR después de rotenona y antimicina A indica fuga de protones mitocondrial (75).

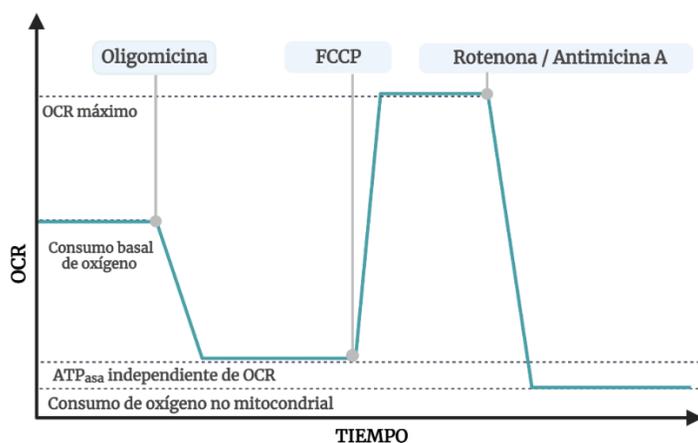


Figura 5. Gráfico ilustrativo de los niveles de OCR durante la prueba de estrés mitocondrial. Fuente: Tomada y adaptada de Yépez, V. 2018 (73)

5.11.2 Potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) es fundamental para mantener la función fisiológica de la cadena respiratoria para generar ATP (76). El $\Delta\Psi_m$ es un indicador sensible del estado energético de las mitocondrias y la célula, y puede usarse para evaluar la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, los sistemas de transporte electrogénico y la activación de la transición de la permeabilidad mitocondrial (77).

Varias sondas fluorescentes (JC-1, mito-MPI, Rodamina 123, DiOC₆, TMRM, TMRE) se pueden utilizar para determinar $\Delta\Psi_m$ en una variedad de tipos celulares. Casi todas las sondas de fluorescencia son de una sola longitud de onda de los indicadores, que aumentan o disminuyen su intensidad de fluorescencia proporcional a un estímulo que aumenta o disminuye los niveles de $\Delta\Psi_m$. Por lo tanto, es imprescindible para medir la intensidad de la fluorescencia de las sondas a nivel basal y después de la aplicación de un estímulo específico. Esto permite determinar el porcentaje de cambio en la intensidad de fluorescencia entre el nivel de referencia y un estímulo (76). La preferencia de una u otra sonda se encuentra marcada por sus características y por la utilidad que se le dará a la medición (Figura 6).

a) Sonda JC-1

La sonda catiónica lipofílica 5,5', 6,6' - tetracloro - 1,1', 3,3' Yoduro de 1'-tetraetilbencimidazolcarbocianina (JC-1) es una molécula que existe en forma monomérica, emitiendo a 527 nm después de la excitación a 490 nm. En presencia de un $\Delta\Psi$ alto, JC-1 forma los llamados agregados J que están asociados con un gran cambio en la emisión (590 nm) (58). Este método citofluorimétrico presenta las siguientes características: es tanto cualitativo como cuantitativo; permite la identificación de poblaciones con diferente contenido de mitocondrias; ya se ha utilizado para estudiar el comportamiento de estos

orgánulos en una variedad de condiciones, incluida la apoptosis y se ha validado aún más mediante el análisis de $\Delta\Psi_m$ a nivel de mitocondrias individuales (78).

El indicador mito-MPI es una versión modificada de JC-1 que presenta solubilidad en agua; el mito-MPI se acumula en las mitocondrias como agregados fluorescentes rojos (emisión a 590 nm). Cuando el potencial de membrana mitocondrial se despolariza, los agregados de m-MPI se convierten en monómeros fluorescentes verdes (emisión a 535 nm) y permanecen en el citoplasma. Por lo tanto, la proporción de fluorescencia rojo / verde se puede utilizar para determinar la función mitocondrial (79, 80).

b) Rodamina 123

La rodamina 123 (RH-123) es un colorante fluorescente de baja toxicidad para las mitocondrias y se utiliza para determinar la actividad mitocondrial. La naturaleza lipofílica de RH-123 le permite difundirse a través de la membrana mitocondrial en respuesta a gradientes de potencial y concentración, siendo la difusión trans-bicapa del tinte mucho más lenta que los cambios reales en $\Delta\psi_m$. Sin embargo, debido a que el RH-123 es menos lipofílico que otros colorantes catiónicos, perturba solo ligeramente el potencial de superficie de la membrana y tiene constantes cinéticas similares para la entrada y salida de la matriz mitocondrial (81, 82).

Los colorantes lipófilos como RH-123 se acumulan en la matriz mitocondrial impulsada por el gradiente eléctrico. Cuanto mayor sea el $\Delta\psi_m$, más RH-123 se incorpora a la matriz. En la fase acuosa, el RH-123 disperso tiene un pico de emisión a 525 nm, mientras que cuando está muy concentrado dentro de la matriz mitocondrial, el RH-123 muestra un corrimiento al rojo y una extinción de la fluorescencia (82).

c) DiOC₆

El yoduro de 3, 3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC₆) es un fluorocromo catiónico lipofílico, permite medir cambios en el potencial de membrana, funciona eficazmente en mitocondrias aisladas y se utiliza con mayor frecuencia para la citometría de flujo, sin embargo, presenta cierta toxicidad para la respiración mitocondrial, esto conjunto a las concentraciones ultrabajas (<1 nM) necesarias para medir con precisión $\Delta\psi_m$, limitan la utilidad de esta sonda frente a las demás (79, 80, 83).

d) TMRM

TMRM es un indicador fluorescente potenciométrico permeable a las células que se acumula en el interior de las mitocondrias con una carga muy negativa. Es importante la utilización de las bajas concentraciones (10-50 nM de rango) de TMRM para evitar la autoextinción de TMRM mitocondrial. Luego, la señal de fluorescencia de TMRM pueden ser directamente relacionados con la $\Delta\psi_m$ través de la membrana mitocondrial interna. Una pérdida del $\Delta\psi_m$ causa una fuga de la sonda TMRM desde el interior de la mitocondria resultando en una pérdida de intensidad de fluorescencia (76).

e) TMRE

TMRE (perclorato de éster etílico de tetrametilrodamina) es un colorante lipófilo catiónico, altamente fluorescente, TMRE emite una fluorescencia roja (excitación 568 nm, emisión 590–630 nm) que puede detectarse mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia y el nivel de fluorescencia de TMRE en las células teñidas se puede utilizar para determinar si las mitocondrias en una célula tienen un $\Delta\psi_m$ alto o bajo (84-86).

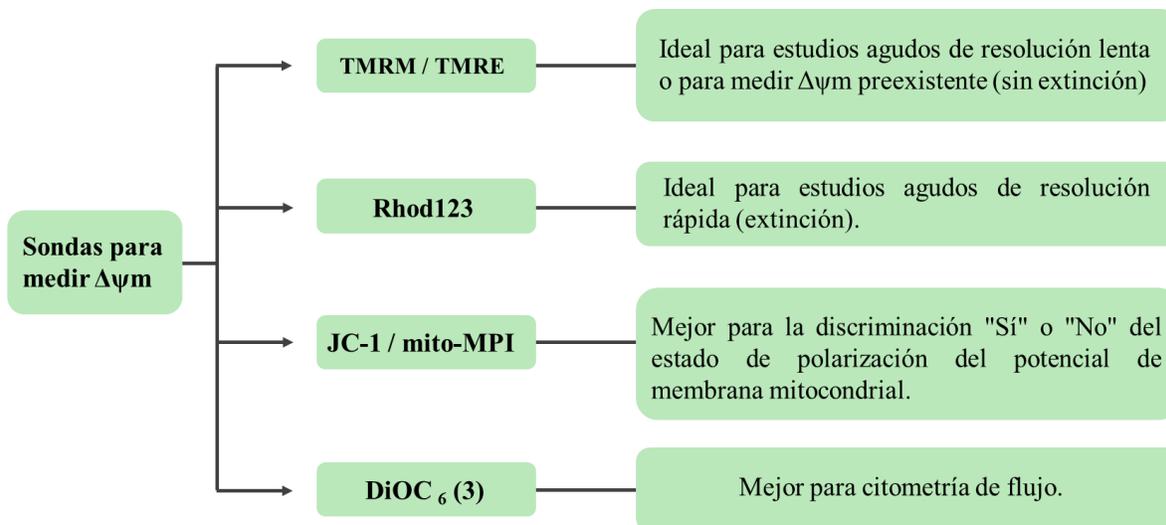


Figura 6. Esquema de las principales utilidades de las sondas ocupadas para medir $\Delta\Psi_m$. Fuente: Tomado y adaptado de Perry, S. (2011) (83).

5.11.3 Niveles de NADH (fluorescencia)

NADH (la forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina), coenzima que se encuentra en grandes cantidades en las mitocondrias (87). El NADH unido dentro de las mitocondrias y otros sustratos en la célula puede usarse directamente como un indicador de la respiración celular, ya que solo la forma reducida (NADH) emite fluorescencia a una longitud de onda de 460 nm (luz azul). Las diferencias espectrales entre NADH libre y unido son menores, aunque los nuevos métodos sensibles de análisis de datos pueden revelar estas pequeñas diferencias (88, 89).

Se han desarrollado biosensores basados en la permutación circular de proteínas fluorescentes (cpFPs). En las cpFP, los terminales N y C originales se fusionan y se crean nuevos terminales N y C para la inserción de proteínas sensoras. Esto hace que la fluorescencia de las cpFP sea muy sensible a los analitos. Esta unión específica a NADH hace que los biosensores NADH / NAD⁺ basados en cpFP sean mejores que los métodos

alternativos como el ensayo de ciclos enzimáticos, la cromatografía y la espectrometría de masas (90).

Estas sondas se pueden introducir genéticamente en células, orgánulos u organismos de interés, además producen un rendimiento cuántico de fluorescencia mucho mayor que la autofluorescencia NAD(P)H; por lo tanto, estos sensores mejoran significativamente la sensibilidad de los ensayos en comparación con las mediciones de fluorescencia NAD(P)H endógena, lo que los convierte en buenos agentes de imagen con potencial para monitorear procesos metabólicos en células vivas e *in vivo* (90, 91).

Las imágenes cuantitativas con biosensores fluorescentes codificados genéticamente utilizan principalmente el método de imágenes de excitación-radiométrica (90). Las imágenes de excitación radiométricas generalmente explotan las dos bandas de excitación de las proteínas fluorescentes, por ejemplo, las bandas alrededor de 405 nm (banda A) y 495 nm (banda B) para proteínas fluorescentes verdes (GFP) o 420 nm (banda A) y 500 nm (Banda B) para proteínas fluorescentes amarillas (YFP). Sin embargo, la intensidad de fluorescencia de los FP excitados en la banda B también es sensible a los niveles de pH ambientales. Por lo tanto, las respuestas de estos biosensores de excitación-radiométrica basados en cpFP a los analitos deben calibrarse simultáneamente mediante sensores de pH (90).

En general, estos sensores se construyen fusionando proteínas represoras Rex de unión a NADH bacterianas con proteínas fluorescentes permutadas cíclicamente (cpFP). Las proteínas Rex presentan sensibilidad a la unión de NADH, producto de esta unión se genera un cambio conformacional, por lo que al fusionar proteínas Rex con cpFP, la fluorescencia de este último responde a los cambios conformacionales inducidos por la unión de NADH, a diferencia de Peredox, basado en GFP, Frex y SoNar están basados en YFP (90, 92).

Frex tiene la capacidad de medir específicamente los niveles de NADH en un amplio rango dinámico, sin embargo, no adapta una estructura terciaria óptima en algunas células y su fluorescencia es sensible al pH. Los sensores Peredox son mucho más resistentes al pH y reflejan parcialmente la relación NAD^+/NADH más fisiológicamente relevante; sin embargo, tienen un rango dinámico limitado y su afinidad parece demasiado alta para ser útiles en condiciones fisiológicas (93).

La fluorescencia de SoNar es intrínsecamente radiométrica con dos longitudes de onda de excitación que tienen respuestas opuestas a NAD^+ y NADH, lo que permite la determinación cuantitativa de NAD^+ o NADH por separado, así como radiométricamente. Se ha visto que SoNar presenta un buen desempeño en estudios de imágenes *in vivo*, exhibiendo una fluorescencia intensa y la capacidad de detectar aumentos o disminuciones de NAD^+/NADH en condiciones fisiológicas normales (93).

5.11.4 Medición de ROS mitocondrial

La detección de ROS en sistemas biológicos requiere sondas que reaccionan muy rápidamente con ROS para competir con los antioxidantes y producir productos estables, que pueden cuantificarse, esto dado la alta reactividad, numerosos mecanismos de depuración y las bajas concentración, por otro lado, se requiere de gran especificidad, para así diferenciar la cuantificación de ROS mitocondrial del ROS citosólico (94).

Uno de los métodos es el uso de una nitrona cíclica, el N-óxido de 5-dietoxifosforil-5-metil-1-pirrolina (DEPMPO), el cual ha sido modificado mediante la adición de un grupo trifenilfosfonio, lo que promueve su absorción selectiva por las mitocondrias. Desafortunadamente, el conjugado de trifenilfosfonio de DEPMPO (mito-DEPMPO) también debe usarse a altas concentraciones (50 mM), lo que puede causar inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial debido a la acumulación de grandes cantidades

del catión lipofílico en la matriz mitocondrial y alteración del potencial de membrana mitocondrial (94).

Es debido a esto que se han desarrollado otros enfoques para detectar ROS en células intactas y mitocondrias; estos incluyen métodos de quimioluminiscencia como quimioluminiscencia mejorada con lucigenina, luminol, MCLA y coelenterazina; las cuales no son específicas para medir ROS mitocondrial (94).

Las sondas basadas en fluorescencia permiten la detección de ROS con una sensibilidad mayor; entre estas sondas se encuentra dihidroetidio (DHE), puede ser oxidado por especies reactivas, incluido el superóxido a etidio, que posteriormente se une al ADN para producir fluorescencia. Más recientemente, el derivado de dihidroetidio que lleva un resto catiónico de trifenilfosfonio, comúnmente conocido como MitoSOX Red o Mito-HE, o más frecuentemente llamado MitoSOX, el cual se ha sintetizado y se encuentra disponible de forma comercial (por ejemplo, Thermo Fisher, Waltham, MA USA). Esta sonda con carga positiva se acumula rápidamente en las mitocondrias y, como tal, puede usarse para detectar la producción de superóxido / ROS dentro de las mitocondrias mediante fluorometría, microscopía o citometría de flujo. De hecho, la obtención de imágenes de fluorescencia de las células o tejidos teñidos con DHE y MitoSOX se ha reivindicado como un ensayo selectivo para la producción de superóxido intracelular e intramitocondrial (95).

MitoSOX fue desarrollado conjugando ion trifenilfosfonio (TPP⁺), un catión lipofílico usado para acumular varias moléculas carga en la matriz mitocondrial altamente cargada negativamente, con dihidroetidio, una sonda existente usada para detectar superóxido celular. Cuando se oxida por superóxido, el dihidroetidio (también llamado hidroetidina) forma el producto de oxidación específico de superóxido 2-hidroxitidio, mientras que forma etidio y otros subproductos cuando se oxida por ROS distintos del superóxido. Los productos de oxidación de DHE y MitoSOX exhiben espectros de fluorescencia rojos, en gran parte superpuestos, cuyas intensidades se ven reforzadas por la presencia de ácidos nucleicos. La

acumulación de fluorescencia roja se utiliza como indicador de ROS sin especificar una especie en particular, mientras que la cuantificación de los productos de oxidación del 2-hidroxi-etidio o “mito” -2-hidroxi-etidio mediante cromatografía líquida de alta resolución es necesaria para medir específicamente el superóxido (96).

Sin embargo, se debe evitar alteraciones bioenergéticas cuando se usa MitoSOX para la cuantificación de ROS es absolutamente crítico no solo porque los cambios en el potencial de membrana influyen en la distribución del colorante, sino también porque la inhibición respiratoria y el desacoplamiento de ambos pueden afectar la tasa de generación de ROS (96).

5.11.5 Medición del poro de transición mitocondrial

El ensayo de *Swelling* o de hinchazón es un método que se utiliza para medir la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP), la técnica consiste en utilizar mitocondrias aisladas en una suspensión, a las que se les adiciona un inductor, generalmente Ca^{2+} , ya sea libre o como CaCl_2 ; la adición de calcio induce la apertura de mPTP, produciendo inflamación mitocondrial que modifica su volumen, el cambio en el volumen genera un aumento de turbidez y a su vez, una disminución de la dispersión de luz, que es medida a una absorbancia entre 520 a 540 nm (97-99).

5.11.6 Otras técnicas para evaluar función mitocondrial

La técnica más sensible y confiable para medir ATP en células vivas aisladas y en animales enteros se basa en la reacción bioluminiscente luciferin-luciferasa. La Luciferasa, una enzima que genera luz químicamente como subproducto de la oxidación del sustrato de moléculas pequeñas d-luciferina. La reacción catalizada por luciferasa en presencia de iones de magnesio implica la conversión de d-luciferin en oxyluciferina, produciendo un destello

de luz amarillo-verde proporcional a la cantidad de ATP presente, con una emisión máxima a 560 nm (100).

El ensayo de luciferin-luciferasa *in vitro* es un método relativamente simple que comprende la transfección celular y expresión de una sonda de luciferasa dirigida a un orgánulo dado y la detección de la luz amarillo-verde por un luminómetro (100). Cabe señalar que la señal registrada por un luminómetro es proporcional pero no igual al número de fotones emitidos por la muestra. La señal se presenta en unidades de luminiscencia relativa (RLU), su valor absoluto está determinado por los parámetros del instrumento en particular y puede diferir incluso para luminómetros del mismo modelo. La intensidad de la luz registrada en RLU es proporcional a la concentración de ATP en el rango lineal de ATP de 10 fM a 1 μ M (101).

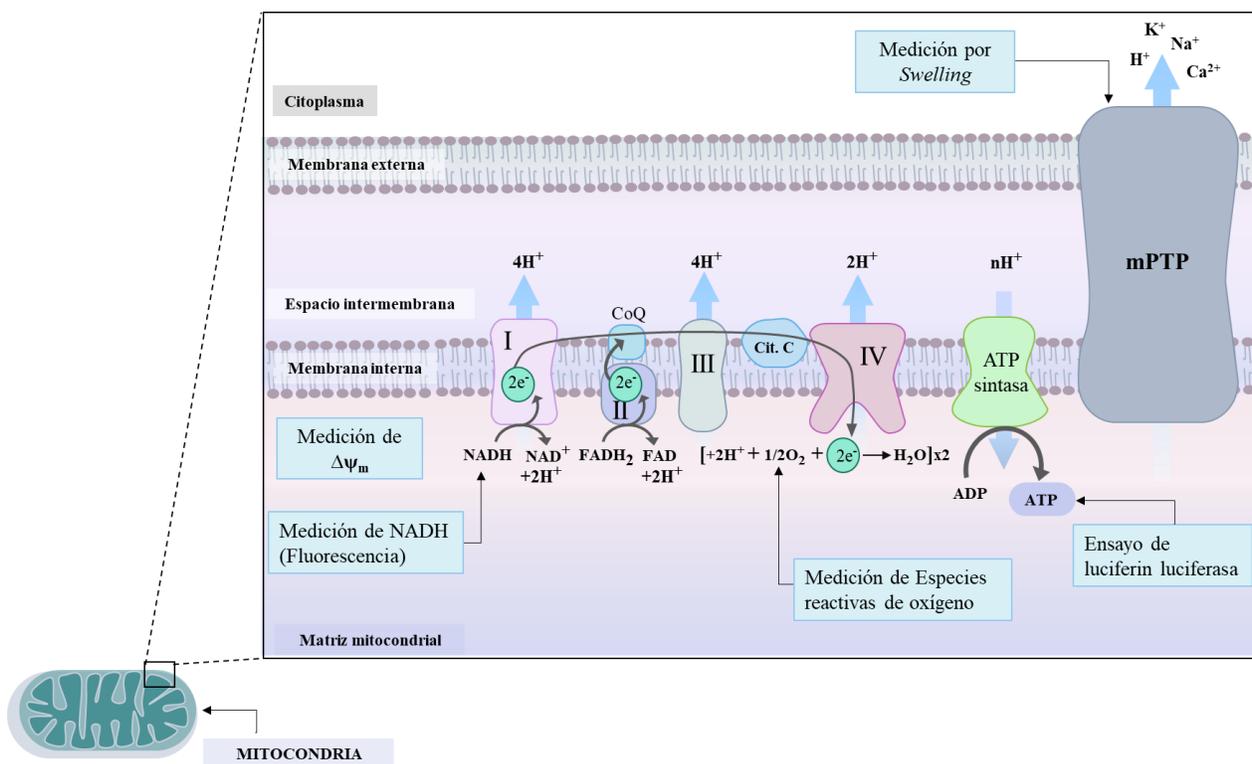


Figura 7. Representación de las técnicas que miden la función mitocondrial. La figura esquematiza la estructura mitocondrial y el objetivo que mide cada técnica al interior de la mitocondria. Fuente: Elaboración Propia Riquelme, J. (2021)

6. CONCLUSIÓN

La evidencia científica actual apunta a que las mitocondrias son importantes reguladoras de la activación plaquetaria, estas regulan varios aspectos dentro de la célula plaquetaria, como por ejemplo la vida útil de la plaqueta, la potenciación de la activación por mtROS, también se ha determinado que, frente a un déficit de proteínas reguladoras, tanto de mitofagia como de mPTP, se generan desregulaciones en la actividad plaquetaria.

Aunque aún faltan estudios que demuestren más a fondo el papel de las mitocondrias y que logren esclarecer los mecanismos de acción que actúan en la regulación de la actividad de la célula plaquetaria, la evidencia demuestra que muchas de estas vías de regulación mitocondrial son parte importante de los procesos de activación y agregación plaquetaria.

Al comprender de forma más profunda el rol de la mitocondria como mecanismo regulador de la activación plaquetaria, se puede tener una noción más clara de cómo nuevos compuestos farmacológicos que tienen como diana las mitocondrias plaquetarias contribuir como tratamiento antitrombótico.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Karunathilake SP, Ganegoda GU. Secondary Prevention of Cardiovascular Diseases and Application of Technology for Early Diagnosis. *BioMed research international*. 2018;2018:5767864-.
2. Pala R, Anju VT, Dyavaiah M, Busi S, Nauli SM. Nanoparticle-Mediated Drug Delivery for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *International journal of nanomedicine*. 2020;15:3741-69.
3. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*. 2008;451(7181):914-8.
4. Ageno W, Beyer-Westendorf J, Garcia DA, Lazo-Langner A, McBane RD, Paciaroni M. Guidance for the management of venous thrombosis in unusual sites. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2016;41(1):129-43.
5. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013;93(1):327-58.
6. Melchinger H, Jain K, Tyagi T, Hwa J. Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:153.
7. Yeung J, Li W, Holinstat M. Platelet Signaling and Disease: Targeted Therapy for Thrombosis and Other Related Diseases. *Pharmacological reviews*. 2018;70(3):526-48.
8. Machlus KR, Italiano JE, Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol*. 2013;201(6):785-96.
9. Guo T, Wang X, Qu Y, Yin Y, Jing T, Zhang Q. Megakaryopoiesis and platelet production: insight into hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Investig*. 2015;2:3.
10. Fuentes E, Araya-Maturana R, Urra FA. Regulation of mitochondrial function as a promising target in platelet activation-related diseases. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019;136:172-82.
11. Pérez Ruíz AO, Castillo Herrera JA, Gortazar González T, Alvarez Fornari M, Douglas Pedroso R, Díaz Rondón B. Participación plaquetaria en la hemostasia primaria. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 1997;16:150-5.
12. Yun S-H, Sim E-H, Goh R-Y, Park J-I, Han J-Y. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *BioMed research international*. 2016;2016:9060143-.
13. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer metastasis reviews*. 2017;36(2):195-8.
14. Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol*. 2013;35(3):254-61.
15. Melchinger H, Jain K, Tyagi T, Hwa J. Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2019;6:153-.

16. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circulation research*. 2018;122(2):337-51.
17. Margraf A, Nussbaum C, Sperandio M. Ontogeny of platelet function. *Blood advances*. 2019;3(4):692-703.
18. Sorrentino S, Studt J-D, Horev MB, Medalia O, Sapra KT. Toward correlating structure and mechanics of platelets. *Cell adhesion & migration*. 2016;10(5):568-75.
19. Li JL, Zarbock A, Hidalgo A. Platelets as autonomous drones for hemostatic and immune surveillance. *The Journal of experimental medicine*. 2017;214(8):2193-204.
20. Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Seminars in immunopathology*. 2012;34(1):5-30.
21. Koltai K, Kesmarky G, Feher G, Tibold A, Toth K. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(8):1803.
22. Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*. 2014;123(18):2759-67.
23. Manne BK, Xiang SC, Rondina MT. Platelet secretion in inflammatory and infectious diseases. *Platelets*. 2017;28(2):155-64.
24. Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(5):1066-77.
25. Baccarelli AA, Byun H-M. Platelet mitochondrial DNA methylation: a potential new marker of cardiovascular disease. *Clinical epigenetics*. 2015;7(1):44-.
26. Prasai K. Regulation of mitochondrial structure and function by protein import: A current review. *Pathophysiology*. 2017;24(3):107-22.
27. Baker N, Patel J, Khacho M. Linking mitochondrial dynamics, cristae remodeling and supercomplex formation: How mitochondrial structure can regulate bioenergetics. *Mitochondrion*. 2019;49:259-68.
28. Madreiter-Sokolowski CT, Ramadani-Muja J, Ziomek G, Burgstaller S, Bischof H, Koshenov Z, et al. Tracking intra- and inter-organelle signaling of mitochondria. *Febs j*. 2019;286(22):4378-401.
29. Patron M, Checchetto V, Raffaello A, Teardo E, Vecellio Reane D, Mantoan M, et al. MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Molecular cell*. 2014;53(5):726-37.
30. Jobe SM, Wilson KM, Leo L, Raimondi A, Molkentin JD, Lentz SR, et al. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood*. 2008;111(3):1257-65.
31. Guo R, Gu J, Zong S, Wu M, Yang M. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomedical Journal*. 2018;41(1):9-20.

32. Nesci S, Trombetti F, Ventrella V, Pagliarani A. From the Ca²⁺-activated F1FO-ATPase to the mitochondrial permeability transition pore: an overview. *Biochimie*. 2018;152:85-93.
33. Algieri C, Trombetti F, Pagliarani A, Ventrella V, Nesci S. Phenylglyoxal inhibition of the mitochondrial F1FO-ATPase activated by Mg²⁺ or by Ca²⁺ provides clues on the mitochondrial permeability transition pore. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2020;681:108258.
34. Barile CJ, Herrmann PC, Tyvoll DA, Collman JP, Decreau RA, Bull BS. Inhibiting platelet-stimulated blood coagulation by inhibition of mitochondrial respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(7):2539-43.
35. Reddy EC, Rand ML. Procoagulant Phosphatidylserine-Exposing Platelets in vitro and in vivo. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2020;7:15-.
36. Josefsson EC, Vainchenker W, James C. Regulation of Platelet Production and Life Span: Role of Bcl-xL and Potential Implications for Human Platelet Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(20):7591.
37. Vogler M, Hamali HA, Sun X-M, Bampton ETW, Dinsdale D, Snowden RT, et al. BCL2/BCL-XL inhibition induces apoptosis, disrupts cellular calcium homeostasis, and prevents platelet activation. *Blood*. 2011;117(26):7145-54.
38. Quach ME, Chen W, Li R. Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage. *Blood*. 2018;131(14):1512-21.
39. Zhang W, Ma Q, Siraj S, Ney PA, Liu J, Liao X, et al. Nix-mediated mitophagy regulates platelet activation and life span. *Blood advances*. 2019;3(15):2342-54.
40. Chen M, Chen Z, Wang Y, Tan Z, Zhu C, Li Y, et al. Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. *Autophagy*. 2016;12(4):689-702.
41. Truban D, Hou X, Caulfield TR, Fiesel FC, Springer W. PINK1, Parkin, and Mitochondrial Quality Control: What can we Learn about Parkinson's Disease Pathobiology? *Journal of Parkinson's disease*. 2017;7(1):13-29.
42. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011;12(1):9-14.
43. Aerbajinai W, Giattina M, Lee YT, Raffeld M, Miller JL. The proapoptotic factor Nix is coexpressed with Bcl-xL during terminal erythroid differentiation. *Blood*. 2003;102(2):712-7.
44. Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, Zheng Q, Song P, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol*. 2012;14(2):177-85.
45. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39(1):44-84.
46. Signorello MG, Ravera S, Leoncini G. Lectin-induced oxidative stress in human platelets. *Redox biology*. 2020;32:101456-.

47. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017:6501046-.
48. Masselli E, Pozzi G, Vaccarezza M, Mirandola P, Galli D, Vitale M, et al. ROS in Platelet Biology: Functional Aspects and Methodological Insights. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(14):4866.
49. Wu L-H, Chang S-C, Fu T-C, Huang C-H, Wang J-S. High-intensity Interval Training Improves Mitochondrial Function and Suppresses Thrombin Generation in Platelets undergoing Hypoxic Stress. *Scientific reports*. 2017;7(1):4191-.
50. Babior BM. NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*. 2004;16(1):42-7.
51. Wang X, Zhang S, Ding Y, Tong H, Xu X, Wei G, et al. p47phox deficiency impairs platelet function and protects mice against arterial and venous thrombosis. *Redox biology*. 2020;34:101569-.
52. Schulz E, Wenzel P, Münzel T, Daiber A. Mitochondrial redox signaling: Interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(2):308-24.
53. Chen S, Su Y, Wang J. ROS-mediated platelet generation: a microenvironment-dependent manner for megakaryocyte proliferation, differentiation, and maturation. *Cell death & disease*. 2013;4(7):e722-e.
54. Remenyi G, Szasz R, Friese P, Dale GL. Role of mitochondrial permeability transition pore in coated-platelet formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(2):467-71.
55. Aliotta A, Krüsi M, Bertaggia Calderara D, Zermatten MG, Gomez FJ, Batista Mesquita Sauvage AP, et al. Characterization of Procoagulant COAT Platelets in Patients with Glanzmann Thrombasthenia. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24).
56. Amanakis G, Murphy E. Cyclophilin D: An Integrator of Mitochondrial Function. *Frontiers in physiology*. 2020;11:595-.
57. Porter GA, Jr., Beutner G. Cyclophilin D, Somehow a Master Regulator of Mitochondrial Function. *Biomolecules*. 2018;8(4):176.
58. Mishra J, Davani AJ, Natarajan GK, Kwok W-M, Stowe DF, Camara AKS. Cyclosporin A Increases Mitochondrial Buffering of Calcium: An Additional Mechanism in Delaying Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening. *Cells*. 2019;8(9):1052.
59. Varjú I, Farkas VJ, Köhidai L, Szabó L, Farkas ÁZ, Polgár L, et al. Functional cyclophilin D moderates platelet adhesion, but enhances the lytic resistance of fibrin. *Scientific reports*. 2018;8(1):5366-.
60. Ho JH-C, Hong C-Y. Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection. *Journal of biomedical science*. 2011;18(1):30-.
61. Huang ZS, Zeng CL, Zhu LJ, Jiang L, Li N, Hu H. Salvianolic acid A inhibits platelet activation and arterial thrombosis via inhibition of phosphoinositide 3-kinase. *J Thromb Haemost*. 2010;8(6):1383-93.

62. Liu Y, Hu Y, E Q, Zuo J, Yang L, Liu W. Salvianolic acid B inhibits mitochondrial dysfunction by up-regulating mortalin. *Scientific reports*. 2017;7:43097-.
63. Paul M, Thushara RM, Jagadish S, Zakai UI, West R, Kemparaju K, et al. Novel sila-amide derivatives of N-acetylcysteine protects platelets from oxidative stress-induced apoptosis. *J Thromb Thrombolysis*. 2017;43(2):209-16.
64. Xin G, Wei Z, Ji C, Zheng H, Gu J, Ma L, et al. Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* prevents thrombosis without increased bleeding risk by inhibiting platelet activation and mtDNA release. *Free radical biology & medicine*. 2017;108:247-57.
65. Fuentes M, Araya-Maturana R, Palomo I, Fuentes E. Platelet mitochondrial dysfunction and mitochondria-targeted quinone-and hydroquinone-derivatives: Review on new strategy of antiplatelet activity. *Biochem Pharmacol*. 2018;156:215-22.
66. Méndez D, Arauna D, Fuentes F, Araya-Maturana R, Palomo I, Alarcón M, et al. Mitoquinone (MitoQ) Inhibits Platelet Activation Steps by Reducing ROS Levels. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17).
67. Wang Z, Wang J, Xie R, Liu R, Lu Y. Mitochondria-derived reactive oxygen species play an important role in Doxorubicin-induced platelet apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(5):11087-100.
68. Zhang J, Wang Q, Xu C, Lu Y, Hu H, Qin B, et al. MitoTEMPO Prevents Oxalate Induced Injury in NRK-52E Cells via Inhibiting Mitochondrial Dysfunction and Modulating Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:7528090.
69. Xin G, Wei Z, Ji C, Zheng H, Gu J, Ma L, et al. Metformin Uniquely Prevents Thrombosis by Inhibiting Platelet Activation and mtDNA Release. *Sci Rep*. 2016;6:36222.
70. Markowicz-Piasecka M, Huttunen KM, Sadkowska A, Sikora J. Pleiotropic Activity of Metformin and Its Sulfonamide Derivatives on Vascular and Platelet Haemostasis. *Molecules*. 2019;25(1).
71. Barale C, Frascaroli C, Senkeev R, Cavalot F, Russo I. Simvastatin Effects on Inflammation and Platelet Activation Markers in Hypercholesterolemia. *Biomed Res Int*. 2018;2018:6508709.
72. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2017;120(1):229-43.
73. Yépez VA, Kremer LS, Iuso A, Gusic M, Kopajtich R, Koňářiková E, et al. OCR-Stats: Robust estimation and statistical testing of mitochondrial respiration activities using Seahorse XF Analyzer. *PloS one*. 2018;13(7):e0199938-e.
74. Preez GD, Fourie H, Daneel M, Miller H, Höss S, Ricci C, et al. Oxygen consumption rate of *Caenorhabditis elegans* as a high-throughput endpoint of toxicity testing using the Seahorse XF(e)96 Extracellular Flux Analyzer. *Scientific reports*. 2020;10(1):4239-.
75. van der Windt GJW, Chang C-H, Pearce EL. Measuring Bioenergetics in T Cells Using a Seahorse Extracellular Flux Analyzer. *Current protocols in immunology*. 2016;113:3.16B.1-3.B.4.
76. Au - Joshi DC, Au - Bakowska JC. Determination of Mitochondrial Membrane Potential and Reactive Oxygen Species in Live Rat Cortical Neurons. *JoVE*. 2011(51):e2704.

77. Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Human Reproduction*. 2004;19(10):2267-76.
78. Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, Cossarizza A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Letters*. 1997;411(1):77-82.
79. Sakamuru S, Li X, Attene-Ramos MS, Huang R, Lu J, Shou L, et al. Application of a homogenous membrane potential assay to assess mitochondrial function. *Physiological genomics*. 2012;44(9):495-503.
80. Sakamuru S, Attene-Ramos MS, Xia M. Mitochondrial Membrane Potential Assay. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2016;1473:17-22.
81. Itoh H, Nishikawa S, Haraguchi T, Arikawa Y, Hiyama M, Iseri T, et al. Identification of rhodamine 123-positive stem cell subpopulations in canine hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Rep*. 2017;7(1):73-8.
82. Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, Lenaz G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1606(1-3):137-46.
83. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques*. 2011;50(2):98-115.
84. Crowley LC, Christensen ME, Waterhouse NJ. Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016(12).
85. Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*. 2002;47(4):236-42.
86. Barteneva NS, Ponomarev ED, Tsytsykova A, Armant M, Vorobjev IA. Mitochondrial staining allows robust elimination of apoptotic and damaged cells during cell sorting. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2014;62(4):265-75.
87. Asfour H, Wengrowski AM, Jaimes R, 3rd, Swift LM, Kay MW. NADH fluorescence imaging of isolated biventricular working rabbit hearts. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012(65):4115.
88. Wright BK, Andrews LM, Markham J, Jones MR, Stringari C, Digman MA, et al. NADH distribution in live progenitor stem cells by phasor-fluorescence lifetime image microscopy. *Biophysical journal*. 2012;103(1):L7-L9.
89. Bogaczewicz J, Tokarska K, Wozniacka A. Changes of NADH Fluorescence from the Skin of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *BioMed research international*. 2019;2019:5897487-.

90. Chang M, Li L, Hu H, Hu Q, Wang A, Cao X, et al. Using Fractional Intensities of Time-resolved Fluorescence to Sensitively Quantify NADH/NAD(+) with Genetically Encoded Fluorescent Biosensors. *Scientific reports*. 2017;7(1):4209-.
91. Zhao Y, Yang Y. Real-time and high-throughput analysis of mitochondrial metabolic states in living cells using genetically encoded NAD(+)/NADH sensors. *Free Radic Biol Med*. 2016;100:43-52.
92. Tejwani V, Schmitt FJ, Wilkening S, Zebger I, Horch M, Lenz O, et al. Investigation of the NADH/NAD(+) ratio in *Ralstonia eutropha* using the fluorescence reporter protein Peredox. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2017;1858(1):86-94.
93. Zhao Y, Hu Q, Cheng F, Su N, Wang A, Zou Y, et al. SoNar, a Highly Responsive NAD+/NADH Sensor, Allows High-Throughput Metabolic Screening of Anti-tumor Agents. *Cell metabolism*. 2015;21(5):777-89.
94. Dikalov SI, Harrison DG. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(2):372-82.
95. Kauffman ME, Kauffman MK, Traore K, Zhu H, Trush MA, Jia Z, et al. MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *Reactive oxygen species (Apex, NC)*. 2016;2(5):361-70.
96. Roelofs BA, Ge SX, Studlack PE, Polster BM. Low micromolar concentrations of the superoxide probe MitoSOX uncouple neural mitochondria and inhibit complex IV. *Free radical biology & medicine*. 2015;86:250-8.
97. Šileikytė J, Forte M. Shutting down the pore: The search for small molecule inhibitors of the mitochondrial permeability transition. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1857(8):1197-202.
98. Davidson SM, Foote K, Kunuthur S, Gosain R, Tan N, Tyser R, et al. Inhibition of NAADP signalling on reperfusion protects the heart by preventing lethal calcium oscillations via two-pore channel 1 and opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular research*. 2015;108(3):357-66.
99. Zhu H, Ding Y, Xu X, Li M, Fang Y, Gao B, et al. Prostaglandin E1 protects coronary microvascular function via the glycogen synthase kinase 3 β -mitochondrial permeability transition pore pathway in rat hearts subjected to sodium laurate-induced coronary microembolization. *American journal of translational research*. 2017;9(5):2520-34.
100. Morciano G, Sarti AC, Marchi S, Missiroli S, Falzoni S, Raffaghello L, et al. Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals. *Nature Protocols*. 2017;12(8):1542-62.
101. Lomakina GY, Modestova YA, Ugarova NN. Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry (Mosc)*. 2015;80(6):701-13.