



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“EL EFECTO ANTITROMBÓTICO DEL AMINOESTRÓGENO
PROLAME (N-(3-HIDROXI-1,3,5(10)-ESTRATRIEN-17 β il)-3
HIDROXIPROPILAMINA) INCREMENTA LA PRODUCCIÓN
DE ÓXIDO NÍTRICO EN PLAQUETAS Y CÉLULAS ENDOTELIALES”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

MARÍA GEORGINA GONZÁLEZ ZÁRATE

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. AURORA DE LA PEÑA DÍAZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I.- INTRODUCCIÓN. Hemostasia.	1
1.1 Estrógenos y Trombosis .	13
1.2 Óxido Nítrico .	14
1.3 Vías de activación de las sintasas de NO .	18
1.4 Vías de inhibición de la síntesis de NO.	21
1.5 Mecanismos genómicos de la activación de eNOS por estrógenos.	22
1.6 Mecanismos no genómicos de la activación de eNOS por estrógenos.	24
1.7 Producción de NO en plaquetas. (Mecanismo no genómico).	27
1.8 Alcohol-aminoestrógenos.	32
II.JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	35
III. HIPÓTESIS	35
IV. OBJETIVO GENERAL	35
V. OBJETIVOS PARTICULARES	36
VI.- MATERIAL Y MÉTODOS.	37
Vla. Mantenimiento de la línea celular HMEC-1.	37
Vlb. Subcultivo de células endoteliales HMEC-1.	37

Vlc. Producción de óxido nítrico (NO) en células endoteliales HMEC-1 tratadas con Prolame	38
Vld. Prueba de viabilidad celular.	39
Vle. Producción de NO en plaquetas humanas tratadas con Prolame.	40
Vlf. Obtención de plasma rico en plaquetas (PRP) y prueba de agregación plaquetaria.	41
Vlg. Ensayo de agregación plaquetaria con suspensiones combinadas de células endoteliales HMEC-1 – tratadas con Prolame y plaquetas.	42
VIh. Cuantificación de metabolitos estables de NO en células HMEC-1.	43
Vli. Modelo de Trombosis	43
VIj. Determinación de NO en sangre total por el método de Espectroscopia de Resonancia Paramagnética (EPR).	44
VIk. Reacción en cadena de polimerasa por transcripción Reversa (RT-PCR).	45
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
VIII. RESULTADOS.	47
VIIIa. Cuantificación del complejo HbNO como equivalente a la producción de NO, por el método de Espectroscopia de Resonancia Paramagnética.	47
VIIIb. Efecto del Prolame, un 17 β aminoestrógeno sobre la producción de NO en células endoteliales HMEC-1 y en plaquetas.	48
VIIIc. Resultados de la Prueba de Viabilidad Celular.	53

VIII d. Inhibición de la agregación plaquetaria por suspensiones celulares endoteliales HMEC-1 tratadas con Prolame, un 17β aminoestrógeno.	53
VIII e. Cuantificación de metabolitos de NO por la técnica modificada de Griess.	56
VIII f. Expresión de eNOS en células endoteliales HMEC-1 tratadas con Prolame.	57
VIII g. Hallazgos histopatológicos en los ratones sometidos a un reto isquémico en un modelo de trombosis.	58
IX. DISCUSIÓN	63
X. CONCLUSIONES	67
XI. BIBLIOGRAFÍA	68
XII. ANEXOS	78

ABREVIATURAS.

(AC) Adenililciclase

(ACE-1) Elemento de Control Autoinhibitorio-1

(α_2 MG) α_2 Macroglobulina.

(ADN) Ácido Desoxirribonucleico.

(ADP) Adenosin Difosfato.

(ADP/TxA₂) Adenosin Difosfato/ Tromboxano A₂.

(AMP) Adenosín Monofosfato.

(AMPC) Adenosín Monofosfato cíclico.

(APC/PS) Proteína C Activada/ Proteína S.

(ARN) Ácido Ribonucleico.

(AT) Antitrombina.

(ATP) Adenosín Trifosfato.

(BH₄) Tetrahidrobiopterina.

(BSA) albúmina sérica bovina (por sus siglas en inglés “bovine serum albumin”).

(DAF-2) diacetato de Diamino Fluoresceína.

(DAG) Diacil Glicerol.

(DBD) dominio de unión al DNA (por sus siglas en inglés “DNA bind dominion”).

(DMSO) Dimetilsulfóxido.

(eNOS) sintasa de óxido nítrico endotelial (por sus siglas en inglés “endothelial nitric oxide synthase”).

(EPR) Espectroscopia de resonancia paramagnética del electrón (por sus siglas en inglés “electron paramagnetic resonance”).

(FC) Factor de Crecimiento

(FII) Factor II de la coagulación.

(FV) Factor V de la coagulación.

(FVII) Factor VII de la coagulación.

(FVIIa) Factor VII de la coagulación activado.

(FVIII) Factor VIII de la coagulación.

(FIX) Factor IX de la coagulación.

(FIXa) Factor IX de la coagulación activado.

(FX) Factor X de la coagulación.

(FXa) Factor X de la coagulación activado.

(FXI) Factor XI de la coagulación.

(FXIa) Factor XI de la coagulación activado.

(FXII) Factor XII de la coagulación.

(FXIIa) Factor XII de la coagulación activado.

(FXIII) Factor XIII de la coagulación.

(FXIIIa) Factor XIII de la coagulación activado.

(FAD) Flavin Adenin Dinucleótido.

(FDP) Productos de Degradación de la Fibrina.

(FLC β) Fosfolipasa C β .

(FMN) Flavin Mononucleótido.

(F1+2) Fragmento 1+2 de la Protrombina.

(FT) Factor Tisular.

(FvW) Factor de von Willebrand.

(GCs) Guanilato ciclasa soluble.

(GDP) Guanosín Difosfato.

(GDP $\alpha\beta\gamma$) Guanosín Difosfato y complejo de proteína G.

(GMPc) Guanosín Monofosfato Cíclico.

(Gplb) Glicoproteína Ib.

(Gp VI) Glicoproteína VI.

(GTP) Guanosín Trifosfato.

(GTPCH-1) Guanidintrifosfociclohidrolasa-1.

(HBS) solución buffer de HEPES (por sus siglas en inglés “solution buffer HEPES”).

(HEPES) N-[2-hidroxietil]piperacina-N’-[2-ácido etansulfónico).

(HMEC-1) Células Endoteliales de Microvasculatura Humana-1.

(iNOS) sintasa de óxido nítrico inducible (por sus siglas en inglés “inducible nitric oxide synthase”).

(IP₃) Inositol 1,4,5 Trifosfato.

(IP₃R) Receptor de Inositol 1,4,5 Trifosfato.

(IRAG) Sustrato de cinasa GMPc asociado a receptor IP₃.

(kDA) kilodaltones.

(L-arg) L-arginina

(L- cit) L-citrulina

(LBD) dominio de unión al ligando (por sus siglas en inglés ligand bind dominion”).

(L-NAME) Metil Ester de Nitro L-arginina.

(Mir) Miristoilación.

(MLCK) Cinasa de Cadena Ligera de Miosina.

(mNOS) sintasa de óxido nítrico macrofagal (por sus siglas en inglés “macrophagal nitric oxide synthase”).

(NADPH) Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato. (Forma reducida).

(NADP) Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato. (Forma oxidada).

(nNOS) Sintasa de óxido nítrico neuronal (por sus siglas en inglés “neuronal nitric oxide synthase”).

(NOSc) Sintasa de óxido nítrico citosólica

(NR) receptor nuclear (por sus siglas en inglés “nuclear receptor”).

(NSF) Proteína de Fusión Sensible a N-etilmaleimida.

(Palm) Palmitoilación.

(PDE-2) Fosfodiesterasa -2.

(PGI₂) prostaciclina.

(PIK₃) cinasa 3 de fosfatidil inositol.

(PIP₂) Fosfatidil Inositol 4, 5 bifosfato.

(PKA) Proteín cinasa A (por sus siglas en inglés “protein kinase A”).

(PKC) Proteín cinasa C (por sus siglas en inglés “protein kinase C”).

(PKG) Proteín cinasa G (por sus siglas en inglés “proteinkinase G”).

(PPP) plasma pobre en plaquetas.

(PRP) plasma rico en plaquetas.

(RI) Receptor Ionotrópico.

(RM) Receptor Metabotrópico.

(RT-PCR) reacción en cadena de polimerasa por transcripción reversa.

(Ser 1175) Serina 1175

(SERMS) Moduladores selectivos del receptor a estrógenos, (por sus siglas en inglés “selective estrogen receptor modulators”).

(SM) Segundos Mensajeros.

(SNAP) S-nitroso, N-acetilpenicilamina.

(TAT) Complejo Trombina Antitrombina.

(THR) Tratamiento de reemplazo hormonal, (por sus siglas en inglés “therapy hormone replacement”).

(Thr 495) Treonina 495

(TNF- α) Factor de necrosis tumoral alfa, (por sus siglas en inglés “tumoral necrosis factor”)

(TP) Tiempo de Protrombina

(t-PA) Activador tisular del Plasminógeno.

(TTPa) Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada.

(u-PA) Activador del plasminógeno tipo urocinasa.

(VASP) Fosfoproteína Estimuladora de Vasodilatador, (por sus siglas en inglés “vasodilator-stimulated phosphoprotein”).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cascada de la coagulación.	7
Figura 2. Modelo celular de la coagulación.	9
Figura 3. Sistema fibrinolítico.	12
Figura 4. Representación de eNOS.	16
Figura 5. Cofactores de eNOS.	18
Figura 6. Vías de activación de sintasa de NO	20
Figura 7. Representación de los mecanismos de las diferentes vías moleculares de acción de los receptores a estrógenos.	23
Figura 8. Activación de eNOS por estradiol.	26
Figura 9. Mecanismos de señalización de la activación de sintasa de NO (NOS) en la plaqueta.	28
Figura 10. Cascadas de señalización de NO en plaquetas.	29
Figura 11. Estructura del 17 β aminoestrógeno Prolame (N-(3-hidroxi-1, 3, 5(10)-estratrien-17 β il)-3 hidro- xipropilamina.	34
Figura12. Resultados de la cuantificación del complejo HbNO por el método de Espectroscopia de Resonancia Paramagnética (EPR).	47
Figura 13. A) Producción de NO por células endoteliales HMEC-1 incubadas con Prolame durante 24 horas. B) Producción de NO en plaquetas.	49

Figura 14. Efecto del inhibidor L-NAME y del antagonista ICI 182, 780 sobre la producción de NO.	52
Figura 15. A) Inhibición de la agregación plaquetaria por células endoteliales HMEC-1 tratadas con Prolame. B) Trazos de agregación plaquetaria.	55
Figura 16. Metabolitos estables de NO en células endoteliales HMEC-1 tratadas con Prolame y efecto del inhibidor L-NAME.	56
Figura 17. Efecto del tratamiento con Prolame sobre la expresión del RNAm de eNOS.	57
Figura 18. Secciones transversales de los hallazgos histopatoló- gicos en los ratones sometidos a un reto isquémico en un modelo de trombosis.	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prueba de Viabilidad Celular

53

RESUMEN

El uso de terapias de reemplazo hormonal durante la menopausia, asociado a factores de riesgo de tromboembolismo, puede incrementar la presencia de problemas de trombosis arterial o venosa, principalmente durante el primer año de su uso. En la búsqueda de encontrar nuevos compuestos, que no produzcan tales efectos, se inició el estudio de un compuesto que pertenece a la familia de aminoestrógenos sustituidos en la posición 17 β llamado prolame, el cual ha demostrado su efecto anticoagulante. Nosotros estudiamos el efecto del prolame sobre la producción de óxido nítrico en células endoteliales (CE) y plaquetas utilizando la técnica de citometría de flujo, medición de metabolitos de óxido nítrico por una técnica modificada del método de Griess, formación de complejos HbNO por espectroscopia de resonancia paramagnética, participación de receptores nucleares a estrógenos (ER) utilizando citometría de flujo y expresión de sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) por la técnica de RT-PCR. También estudiamos la inhibición de la agregación plaquetaria en suspensiones celulares endoteliales tratadas con prolame y plaquetas, así como la habilidad del prolame de prevenir la formación de un trombo en un modelo de trombosis *in vivo* en ratón. Nuestros resultados demuestran que el prolame induce producción de NO en células endoteliales, en plaquetas y en un modelo de ratón *in vivo*. La producción de NO es parcialmente atribuida a ER ya que eNOS se expresó solo un 37% en células endoteliales tratadas con prolame. La agregación plaquetaria inducida con 10 μ M de ADP se inhibe en un 60% con suspensiones de CE tratadas con prolame. Prolame reduce la formación de trombos en un modelo de trombosis *in vivo*. En conclusión el prolame puede ser probado como alternativa para reducir eventos tromboembólicos.

ABSTRACT

Women under hormone replacement therapy carry an increased risk venous thromboembolism (VTE), mostly during the first year. Despite great efforts devoted to hormone therapy research, VTE remains a major drawback of estrogenic therapy, and the search for new compounds continues. We have synthesized and evaluated prolame an aminoestrogen with anticoagulant properties. The aim of our work was to elucidate the anticoagulant mechanism of prolame. We studied the effects of prolame on nitric oxide (NO) synthesis in cultured endothelial cells and platelets using flow cytometry, on NO metabolites using a modified Griess method, on NO formation *in vivo* using electron paramagnetic resonance spectroscopy, on participation of nuclear estrogen receptors using flow cytometry, and on endothelial NO synthase (eNOS) mRNA expression using RT-PCR. We also studied the impact of prolame-treated endothelial cells (EC) on ADP-induced platelet aggregation, as well as the ability to prevent occlusive thrombi in an *in vivo* mice thrombosis model. Our results were: prolame induces NO production in ECs, platelets, and in a mouse model *in vivo*, the NO-elevating effect of prolame can only be partially attributed to the nuclear estrogen receptors (ERs) since endothelial nitric oxide synthase (e-NOS) is slightly induced (37%) in ECs treated with prolame, platelets become 60% less responsive to aggregation induced by 10 μ M ADP when in suspension with prolame-treated ECs, prolame reduce the formation of thrombi in an *in vivo* thrombosis model. Prolame could be tested alternative to other estrogens because of its reduced thromboembolic risk.

I. INTRODUCCIÓN

HEMOSTASIA.

La Hemostasia es un sistema biológico de defensa donde intervienen múltiples elementos, tanto celulares como plasmáticos para obturar lesiones y mantener la sangre líquida dentro de los vasos. Este sistema interacciona con otros sistemas biológicos del organismo que funcionan de manera integrada a nivel de la microvasculatura, en la inflamación con la generación de cininas, activación del complemento y en la respuesta inmune. La hemostasia se autolimita en espacio, tamaño y tiempo. La magnitud de la respuesta depende del estímulo nocivo y de las condiciones del endotelio el cual desempeña una función importante en la regulación de la hemostasia y trombosis, mediante sus funciones antiagregantes plaquetarias, anticoagulantes y fibrinolíticas. Desde el punto de vista práctico la hemostasia se divide en varias fases: fase vascular, hemostasia primaria (interacción vaso sanguíneo-plaquetas), hemostasia secundaria (proteínas plasmáticas de la coagulación), regulación antitrombótica y sistema fibrinolítico¹

Fase vascular.

Después de una lesión, los vasos dañados inician el mecanismo hemostático, constriñendo o estrechando la luz, por lo tanto el flujo de sangre al exterior se reduce. La vasoconstricción ocurre de inmediato y dura un corto periodo. La cantidad de sangre que sale del vaso depende de su tamaño y tipo, así como también de la eficiencia del mecanismo hemostático. La hemostasia es más eficaz

en vasos menores y capilares. Cuando los vasos grandes se dañan, la formación del tapón emplea más tiempo y puede ser insuficiente para detener la hemorragia. La presión se puede elevar mucho más en las arterias y el flujo ser tan rápido, que los coágulos no pueden formarse. La respuesta inmediata a un brusco estímulo nocivo es la vasoconstricción. La pared del vaso sanguíneo consta de tres capas concéntricas de tejido llamadas tunicas. La túnica íntima está compuesta por una sola capa de células endoteliales escamosas aplanadas que revisten la luz del vaso y al subendotelio o tejido conjuntivo subyacente. La túnica media (músculo liso), y la adventicia (tejido conectivo)².

Estructuralmente el endotelio vascular está situado en una posición anatómica estratégica formando una capa celular que sirve de interfase entre la sangre y los tejidos subyacentes. Esta situación le permite actuar como receptor y transmisor de señales y llevar a cabo funciones como: (1) Transferencia de sustancias metabólicas entre la sangre circulante y los tejidos circundantes. (2) Formar una barrera entre las células sanguíneas y las macromoléculas plasmáticas. (3) La síntesis o metabolismo de mediadores que regulan la interacción entre la pared vascular y los componentes de la sangre por ejemplo: factor VIII/vWF, la fibronectina, la colágena, los proteoglicanos y mediadores lábiles del tono vascular. (4) Mantener la resistencia a la formación del trombo. (5) Integrar los procesos vasculares de reparación, como migración y proliferación celular. (6) Participación en la inmunidad celular.³

Hemostasia primaria.

Las plaquetas son células especializadas anucleadas, que se originan en la médula ósea por fraccionamiento del citoplasma del megacariocito. Estas células circulan en la sangre en forma de disco y miden en promedio de 2 a 4 μ de diámetro y de 0.6 a 1.3 μ de grosor, y sirven como depósito para moléculas muy diversas que participan en la hemostasia. La cifra normal de plaquetas en la sangre oscila entre 140-440 x 10⁹/L. La supervivencia plaquetaria tiene un rango de 9-12 días y su destrucción se lleva principalmente en el bazo⁴. Las plaquetas contienen un número reducido de ribosomas y remanentes del Aparato de Golgi, también contienen una pequeña cantidad de RNAm, y se ha identificado la síntesis de nuevas proteínas por las plaquetas después de la activación por la trombina, requiriendo de la glicoproteína IIb/IIIa y glicoproteína Ia/IIa (α 2 β 1) para iniciar el proceso⁵. Las plaquetas son células demasiado sensibles que responden a estímulos que pueden ser diversos agonistas como trombina, ADP, colágena, epinefrina etc. que van a inducir un cambio en la forma de la plaqueta produciendo su activación y liberación de constituyentes de los granulos densos y alfa del citoplasma. Cuando el estímulo es leve la plaqueta forma pseudópodos que se retraen de forma espontánea. Un estímulo más intenso hace que las plaquetas se vuelvan adherentes de manera reversible sin pérdida de su forma discoidal. Si se aplica otro estímulo, se produce un cambio en la forma cambiando a esferas irregulares con pseudópodos y puede acompañarse por la contracción interna, que es ocasionada por un incremento en la concentración del calcio citoplásmico; esta contracción también es reversible. La expulsión del contenido granular almacenado requiere contracción interna. Los productos secretorios facilitan la

aglutinación de las plaquetas y conducen a la agregación irreversible para formar una masa plaquetaria fusionada e impermeable⁶. En el interior de las plaquetas se encuentran organelos citoplásmicos de reserva altamente relacionados con su función: 1) Los gránulos densos, gránulos pequeños con una zona central muy densa y un halo transparente. Cada plaqueta contiene aproximadamente 5 cuerpos densos, los cuales contienen un acervo de adenin nucleótidos (ATP y ADP) y guanidin nucleótidos (GTP y GDP), serotonina, Ca^{2+} , Mg^{2+} y fosfato inorgánico. La liberación de estos compuestos durante la fase de secreción constituye un mecanismo importante de retroalimentación positiva para la agregación plaquetaria. 2) Los gránulos alfa, son estructuras granulares grandes llenas de sustancias proteicas, como: el factor plaquetario 4 y la β tromboglobulina son proteínas específicas de las plaquetas y pueden emplearse como marcadores de la activación plaquetaria; moléculas adhesivas como fibrinógeno, factor de von Willebrand (fvW), fibronectina y trombospondina; y los factores V y VIII de la coagulación; factor de crecimiento producido por las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Ellos también contienen inhibidores de proteasas, tales como inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) y α_2 -antiplasmina, que regulan la fibrinólisis. 3) Las vesículas lisosómicas, que contienen fundamentalmente enzimas del tipo hidrolasas, fosfatasa ácida, β glucoronidasa, N-acetilglucosaminidasa, arilsulfatasa, catepsina y heparintinasa entre otras. 4) Los peroxisomas, caracterizados por la presencia de catalasa. 5) Otros organelos como mitocondrias y retículo endoplásmico que proveen parte de la energía necesaria para la contracción⁷. Las mitocondrias plaquetarias son capaces de llevar a cabo la β oxidación de los ácidos grasos, sin

embargo aún no está claro cuánto contribuyen a llevar a cabo la producción de energía⁸. Las plaquetas tienen depósitos regulares de glucógeno, el cual puede convertirse en glucosa 1-fosfato y también pueden tomar glucosa del medio que las rodea. Ambas fuentes pueden convertirse en glucosa 6-fosfato y entrar a la glucólisis. El índice de glucólisis plaquetario excede al de los eritrocitos y del músculo esquelético⁹.

Las plaquetas son esenciales para la hemostasia normal y realizan diversas funciones en respuesta al daño vascular, como:

- Conservación de la integridad vascular mediante la reparación por sellado de defectos menores del endotelio.
- Interrupción inicial de la hemorragia, mediante la formación del trombo plaquetario.
- Estabilización del tapón hemostático facilitando la formación de fibrina (actividad procoagulante de la plaqueta; factor 3 plaquetario).
- Aceleran la curación vascular al estimular la migración de las células endoteliales (retracción del coágulo)^{10, 11}.

La principal función de las plaquetas es “sellar” cualquier fuga sanguínea que pueda existir en la pared vascular, por lo que responden a la exposición del subendotelio, el cual normalmente no está en contacto con las plaquetas.

Fase plasmática o coagulación.

Las superficies celulares constituyen el ambiente natural donde se desarrollan las reacciones de la coagulación sanguínea. Para que se produzca una hemostasia eficaz deben cooperar diferentes tipos celulares. Las plaquetas suministran la superficie más eficiente para la generación de trombina, sin embargo carecen de factor tisular (FT), y por ello no pueden iniciar la coagulación. Otras células expresan el FT en su superficie, y algunas como los monocitos son capaces de ensamblar en su superficie al complejo activador del factor X y al complejo protrombinasa, por lo que para generar trombina de forma eficiente deben participar al menos 2 tipos celulares¹².

Existen varios modelos del sistema de la coagulación, el mejor conocido propone dos vías, la extrínseca y la intrínseca que convergen en la vía común (Figura 1). El modelo es útil para interpretar los resultados de las pruebas de coagulación que se realizan tanto con fines diagnósticos como de seguimiento farmacológico. Permite relacionar los resultados del tiempo de protrombina, el tiempo de tromboplastina parcial activado y el tiempo de trombina con, la actividad de los factores que participan en la vía extrínseca, intrínseca y común respectivamente¹³.

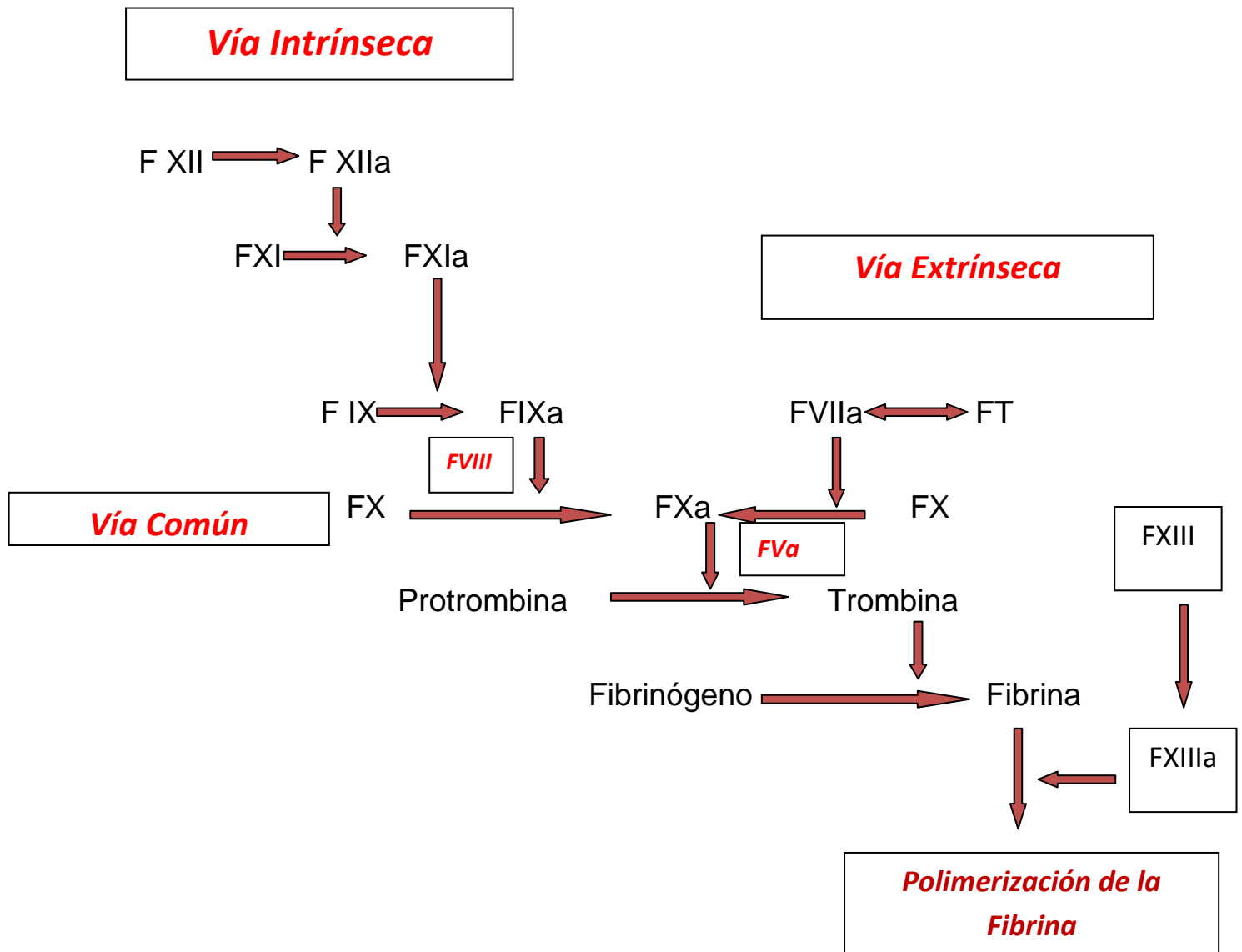


Figura 1. Cascada de la Coagulación. Se basa en dos vías separadas de la coagulación con la activación secuencial y enzimática de factores de coagulación, en un proceso catalítico y limitado sobre una superficie celular. *Abreviaturas:* FXII, Factor XII de la coagulación; FXIIa, Factor XII de la coagulación activado; FXI, Factor XI de la coagulación; FXIa, Factor XI de la coagulación activado; FIX, Factor IX de la coagulación; FIXa, Factor IX de la coagulación activado; FX, Factor X de la coagulación; FXa, Factor X de la coagulación activado; FVIIa, Factor VII de la coagulación activado; FT, Factor Tisular; FXIII, Factor XIII de la coagulación; FXIIIa, Factor XIII de la coagulación activado. Modificado de Quintana González S, Martínez Murillo C. Fisiología de la Hemostasia Secundaria. Hemostasia y Trombosis. 2ª edición, México: Prado, 2008: 59-95.

Este modelo sugiere una secuencia establecida de reacciones en donde se plantean diferentes estímulos para su inicio.

Actualmente se propone un modelo celular ⁹ que contempla también las características fisicoquímicas de la fase sólida sobre la que interactúan los factores de la coagulación¹⁴. El modelo se muestra en la Figura 2. El factor tisular (TF) facilita las reacciones iniciales que se propagan gracias a pequeñas cantidades formadas de FXa y FIIa. Las reacciones se amplifican eficientemente sobre la superficie celular porque los factores que se activan son inaccesibles a todos los inhibidores, lo que permite hacer eficiente la incorporación del factor Xa al complejo enzimático de la protrombina.

La actividad de la trombina sobre células endoteliales, plaquetas y en la hidrólisis parcial de los factores de la coagulación, permite que el mecanismo se multiplique hasta generar cantidades que aseguran el éxito de la función hemostática.

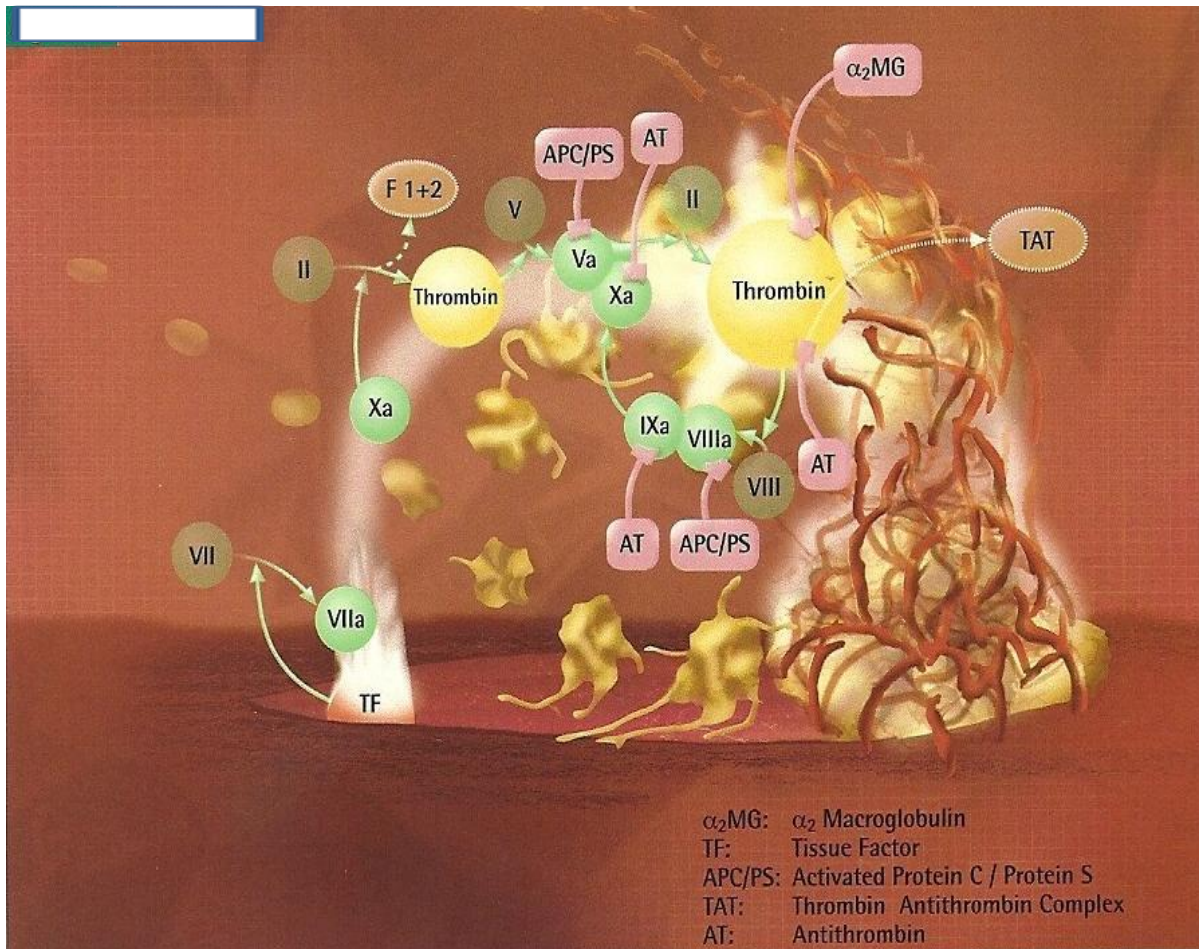


Figura 2. Modelo celular de la coagulación. En esta figura se muestra la interacción entre los factores de coagulación y los anticoagulantes fisiológicos como la antitrombina, proteína C, proteína S, inhibidores de trombina y factor Xa. *Abreviaturas:* VII, Factor VII de la coagulación; VIIa, Factor VII de la coagulación activado; TF, Factor Tisular; II, Factor II de la coagulación; Xa, Factor X de la coagulación activado; F1+2, Fragmento 1+2 de la protrombina; V, Factor V de la coagulación; Va, Factor V de la coagulación activado; Xa, Factor X de la coagulación activado; IXa, Factor IX de la coagulación activado; VIII, Factor VIII de la coagulación; VIIIa, Factor VIII de la coagulación activado; APC/PS, Proteína C Activada/Proteína S; AT, Antitrombina; α_2 MG, α_2 Macroglobulina; TAT, Complejo Trombina Antitrombina. Tomado de DADE BEHRING. Edición especial: HEMOSTASIA. Journal 2006; 3 (3):32-33.

La coagulación, resultante de la generación de trombina, no puede contemplarse como un mecanismo aislado, simultáneamente se inician mecanismos que dan un balance pro- anticoagulante al entorno y que regulan la inflamación.

La trombina no sólo tiene actividades pro-coagulantes; un mecanismo anticoagulante fisiológico muy importante se inicia al unirse con la trombomodulina (T-TM) que a su vez permite a la proteína C y a su cofactor la proteína S (vía anticoagulante de la proteína C) interrumpir la actividad de dos cofactores de la coagulación, el Va y el VIIIa¹¹.

Fibrinólisis: sistema plasminógeno-plasmina

In vivo, el coágulo se forma alrededor y dentro del grumo plaquetario, frecuentemente obtura los vasos lesionados; esto trombosa las áreas vasculares afectadas, las cuales requieren desarrollar vías vasculares colaterales, por ello la actividad fibrinolítica es fundamental ya que produce la *disolución del coágulo* o lisis del coágulo, lo cual se lleva a cabo por acción de una enzima proteolítica, la plasmina, que también circula en forma inactiva, como un zimógeno, el plasminógeno. El plasminógeno tiene la propiedad de precipitar dentro del coágulo, de tal manera que su acción lítica se efectúa desde el interior del coágulo y también de fuera hacia dentro por el plasminógeno del plasma. Para la transformación del plasminógeno en plasmina se requiere de la presencia de sustancias activadoras, por sus siglas en inglés, u-PA (urocinase type plasminogen activator) y el activador tisular del plasminógeno o t-PA por sus siglas en inglés (tissue type plasminogen activator).

Se ha demostrado que estas vías de activación tienen funciones diferentes: la activación del plasminógeno vía t-PA participa en la lisis de fibrina y en cambio el u-PA funciona primariamente en la migración celular y en la remodelación de los

tejidos^{15,16}. En la microvasculatura la actividad fibrinolítica puede ser tan eficiente que los vasos pequeños puedan quedar recanalizados en pocas horas y el estudio histológico posterior no detectarlos.

La formación de fibrina sobre el endotelio vascular estimula la liberación del t-PA, el cual interacciona con el plasminógeno circulante y forma un complejo ternario con la fibrina que da como producto la plasmina activa. La plasmina activa, degrada a la fibrina y da lugar a la aparición de productos solubles de fibrina. El complejo catalítico ternario fijo a la membrana celular no es accesible a la inhibición; pero cuando el t-PA y la plasmina se liberan a la circulación son rápidamente neutralizados por los inhibidores circulantes: el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-I) y la α_2 antiplasmina y a continuación son depurados en el hígado. La α_2 -macroglobulina es otra proteína capaz de inhibir plasmina pero su actividad es sólo del 10% de la que tiene la α_2 antiplasmina; es sintetizada por las células endoteliales y los macrófagos y se almacena en los gránulos alfa de las plaquetas^{17,18}

La urocinasa y la estreptocinasa no requieren de la presencia de fibrina para activar el plasminógeno y funcionan bien en la fase fluída; la calicreina, el factor XIa y el factor XIIa, también pueden activar al plasminógeno, pero su papel fisiológico es claramente menor que el de t-PA y sólo generan 15% de la plasmina activa¹⁹.

Las células endoteliales, plaquetas, monocitos, macrófagos y algunas células tumorales poseen en su membrana receptores para plasminógeno y sus activadores e inhibidores.

Una representación esquemática de los componentes del sistema fibrinolítico se presenta en la Figura 3.

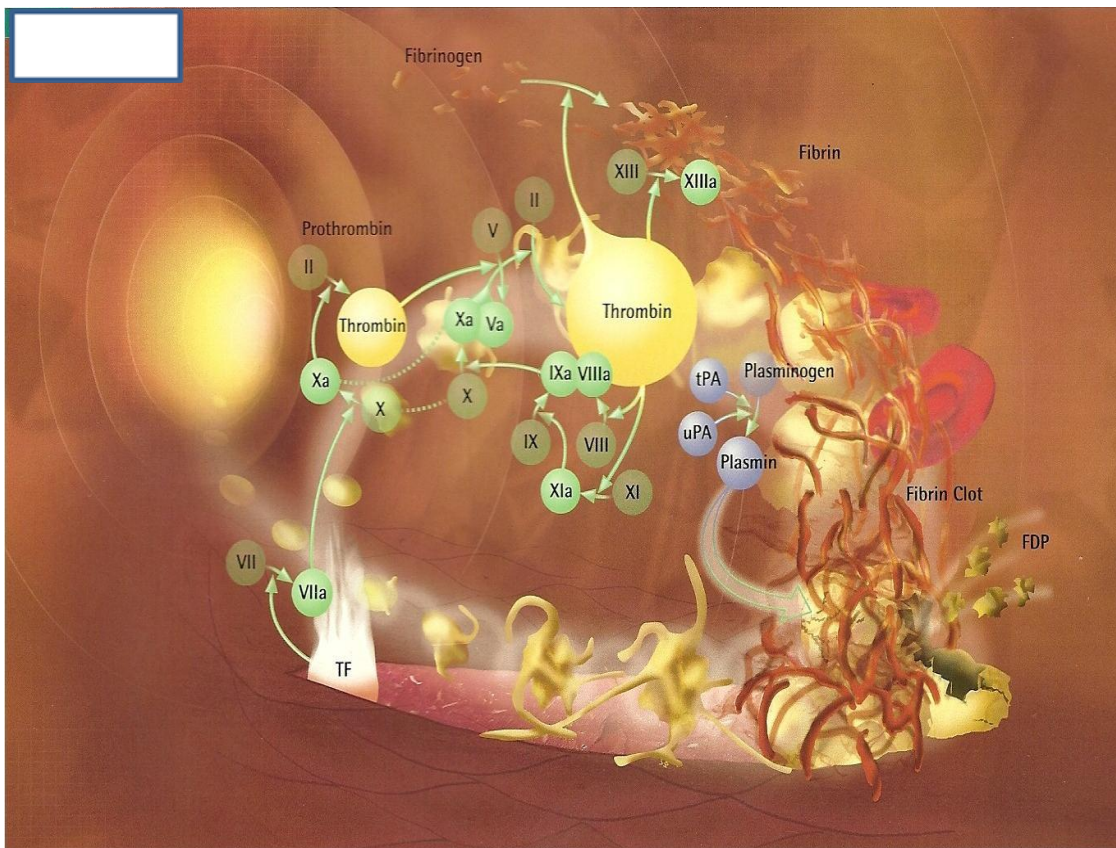


Figura 3. Sistema Fibrinolítico. En esta figura se muestra la mayor parte de los componentes implicados en la disolución de un coágulo de fibrina, activación del sistema fibrinolítico, así como los productos de degradación de la fibrina. *Abreviaturas:* VII, Factor VII de la coagulación; VIIa, Factor VII de la coagulación activado; TF, Factor Tisular; II, Factor II de la coagulación; X, Factor X de la coagulación; Xa, Factor X de la coagulación activado; V, Factor V de la coagulación; Va, Factor V de la coagulación activado; IX, Factor IX de la coagulación; IXa, Factor IX de la coagulación activado; VIII, Factor VIII de la coagulación; VIIIa, Factor VIII de la coagulación activado; XI, Factor XI de la coagulación; XIa, Factor XI de la coagulación activado; XIII, Factor XIII de la coagulación; XIIIa, Factor XIII de la coagulación activado; tPA, Activador tisular del Plasminógeno; uPA, Activador del Plasminógeno tipo urocinasa; FDP, Productos de Degradación de la Fibrina. Tomado de DADE BEHRING. Edición especial: HEMOSTASIA. Journal 2006; 3(3): 32-33.

I.1 Estrógenos y Trombosis.

Los estrógenos, solos o combinados con progestágenos son utilizados por millones de mujeres en todo el mundo, ya sea con propósitos de efectos anticonceptivos o para tratamiento de reemplazo hormonal (THR), para controlar las manifestaciones del síndrome premenopáusico, menopáusico y posmenopáusico como son: los síntomas vasomotores, la atrofia vulvo-vaginal y la prevención de osteoporosis²⁰. Sin embargo se sabe que este tipo de tratamientos, además de sus beneficios conllevan ciertos riesgos. Uno de los estudios más relevantes es el “Women’s Health Initiative (WHI)” del 2002²¹ en el que se estudiaban 16,608 mujeres, con 63.3 años de edad promedio quienes recibían tratamiento por vía oral con estrógenos conjugados (0.0625 mg/d), junto con acetato de medroxiprogesterona (2.5 mg/d); el estudio se tuvo que interrumpir después de 5.2 años de seguimiento debido a que en una cantidad importante de mujeres participantes los riesgos excedieron los beneficios; en 286 participantes se presentó enfermedad coronaria, otras 202 mujeres presentaron eventos vasculares cerebrales, 101 participantes sufrieron tromboembolia pulmonar y en 295 casos se manifestó cáncer de mama. Entre los beneficios más significativos se informó de reducción en la frecuencia de fracturas y cáncer colorectal. Estudios realizados en el “Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study” (HERS)²², y en el Women’s International Study of Long Duration Oestrogen after Menopause (WISDOM)²³ fueron diseñados para investigar el efecto del reemplazo hormonal en mujeres entre 45 a 69 años de edad. Se sabe que la administración de estrógenos exógenos, solos o en combinación con

progestágenos, puede incrementar el riesgo de desarrollar trombosis venosa o arterial, durante el primer año de tratamiento, principalmente en las mujeres que tienen algún factor de riesgo asociado, como es el caso de una mutación en el gen 20210A²⁴ que codifica para la protrombina y el factor V Leiden.²⁵

Por otra parte, se sabe que los estrógenos exógenos alteran varios de los mecanismos hemostáticos, y por ello generan un estado protrombótico²⁶; incrementan la concentración de algunos factores de la coagulación y podrían inducir hipercoagulabilidad. Entre el mecanismo que inclina el balance hemostático a la hipercoagulabilidad, se interpone la producción de óxido nítrico por los estrógenos, efecto que se considera protector.

I.2 Óxido Nítrico (NO).

El NO es un gas inorgánico relativamente estable, incoloro, soluble en agua y en lípidos; la presencia de un electrón no apareado en su último orbital, lo hace una molécula paramagnética muy activa, capaz de viajar a través de las membranas biológicas, donde fácilmente reacciona con los constituyentes membranales. El promedio de vida del NO es de 5 a 6 segundos. *In vivo* el NO es neutralizado fácil y rápidamente por la hemoglobina y el anión superóxido.^{27, 28} Cabe resaltar que por ser un gas altamente difusible el NO crea un campo de acción alrededor de la célula que le permite actuar no sólo en el citosol sino más allá de las membranas celulares e incluso en las células vecinas²⁹.

El NO se sintetiza a partir de una reacción de oxidación, entre L-arginina y oxígeno (O₂), mediante la sintasa de NO (NOS), enzima presente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos³⁰.

Se han identificado varias isoformas de NOS:

1. Sintasa de NO endotelial (eNOS), presente en plaquetas y células endoteliales.
2. Sintasa de NO neuronal (nNOS), presente en plaquetas, células β del páncreas, músculo, pulmones, estómago, células epiteliales del útero y células endoteliales de las arteriolas aferentes y eferentes.
3. Sintasa de NO macrofagal (mNOS) se encuentra en macrófagos, neutrófilos, células de Kúpffer y células de la macro y microglia^{31 32 33}.
4. Sintasa de NO inducible (iNOS).

Aún cuando todas las isoformas catalizan la misma reacción, varían en cuanto a su estructura, funcionalidad, algunas son constitutivas (cNOS) y otras inducibles (iNOS).

Al principio se estableció que sólo las isoformas constitutivas (eNOS) y (nNOS) eran dependientes de Ca^{2+} , mientras que iNOS era independiente de Ca^{2+} . Sin embargo, hoy en día se sabe que las tres isoformas requieren Ca^{2+} , pero eNOS y nNOS requieren Ca^{2+} en mayor cantidad, debido a que en su subdominio de unión FMN-calmodulina existe un elemento de control auto inhibitorio (ACE) de aproximadamente 50 aminoácidos que evita que la calmodulina se una a este sitio, a bajas concentraciones de Ca^{2+} intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se desestabiliza la unión de calmodulina. Un segundo elemento de control auto inhibitorio (ACE-2), presente en la región C-terminal, actúa como una barrera al impedir la unión a la calmodulina; en consecuencia, ACE-2 inactiva a la enzima, evitando la fosforilación de serinas [Ser 1179 (bovina) y Ser 1177 (humanas)]^{34,35,36}

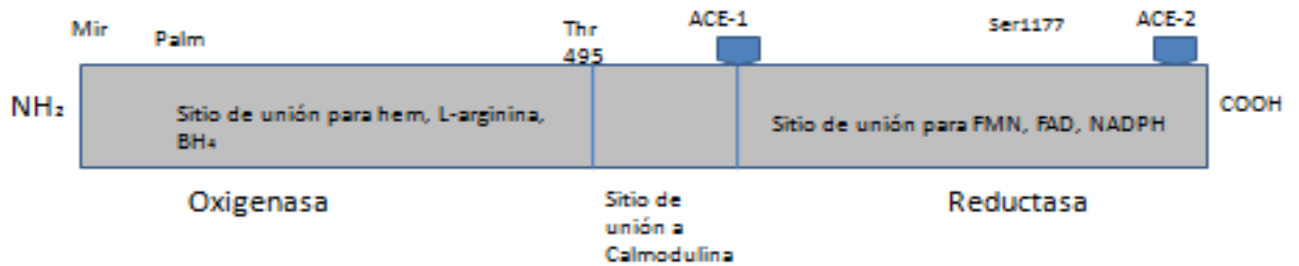


Figura 4. Representación de eNOS. Los dominios oxigenasa y reductasa se unen por el dominio de unión a calmodulina. Se muestran los sitios de miristoilación (Mir) y palmitoilación (Palm), así como elementos de control autoinhibitorio ACE-1 y 2. Thr495 y Ser1177 quienes se fosforilan y defosforilan y son probablemente el control regulador en la activación de eNOS. *Abreviaturas:* ACE-1, Elemento de Control Autoinhibitorio-1; ACE-2, Elemento de Control Autoinhibitorio-2; Thr 495, Treonina 495; Ser 1175, Serina 1175; Mir, Miristoilación; Palm, Palmitoilación; FMN, Flavin Mononucleótido; FAD, Flavin Adenina Dinucleótido; NADPH, Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (forma reducida); BH₄, Tetrahidrobiopterina. Modificado de Marletta MA. J Biol Chem 1993; 17: 12231-12234.

Cabe resaltar que estas enzimas constantemente generan pequeñas cantidades de NO y crean un nivel basal del mismo para la regulación de los procesos

fisiológicos. Las formas inducibles (iNOS) se manifiestan en las células después de su inducción por diferentes estímulos, entre ellas se encuentran las endotoxinas bacterianas y citocinas; se considera que casi todas las células de los organismos en condiciones patológicas son capaces de expresar NOS entre 6 y 8 horas después de la inducción, y esta enzima genera grandes cantidades de NO hasta 1000 veces más que las formas constitutivas.³⁷

En la síntesis de NO participan como cofactores importantes la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), flavin adenin dinucleótido (FAD), flavin mononucleótido (FMN), tetrahidrobiopterina (BH₄), calcio (Ca²⁺) y calmodulina²⁵, que permiten que se formen dímeros que son la forma activa de la enzima.

En las células, la NOS existe como dímero, cada subunidad está formada por tres dominios, uno es con actividad de reductasa, otro de unión a calmodulina y otro más con actividad de oxigenasa. El FAD es un aceptor de electrones primario que provienen desde NADPH; el FMN transporta electrones desde FAD al dominio oxigenasa donde interaccionan con el Fe⁺⁺ y BH₄, en el sitio activo, para catalizar la reacción de oxígeno con L-arginina, y generar citrulina y NO. El flujo de electrones a través del dominio reductasa requiere de la presencia de sitios de unión Ca²⁺/calmodulina (Fig 5.)³⁸.

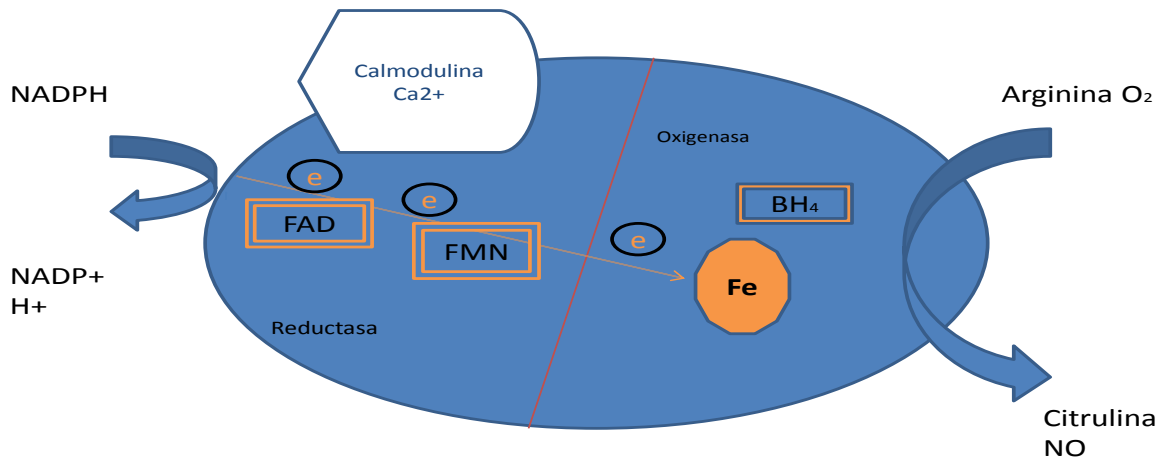


Figura 5. Cofactores de eNOS. Los electrones son donados por NADPH del dominio reductasa y procesados vía FAD y FMN al dominio oxigenasa. Ellos interactúan con el hierro del grupo hemo y BH₄ al sitio activo para catalizar la reacción de oxígeno con L-arginina para generar citrulina y óxido nítrico. El flujo de electrones a través del dominio reductasa requiere la presencia de calcio/calmodulina. *Abreviaturas:* NADPH, Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (forma reducida); NADP, Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (forma oxidada); FAD, Flavin Adenina Dinucleótido; FMN, Flavin Mononucleótido; BH₄, Tetrahidrobiopterina. Modificado de Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.

1.3 Vías de activación de las sintasas de NO.

La diferente localización de las isoformas de NOS (eNOS en membrana celular y nNOS, mNOS en citosol) determinan las diferentes vías de activación.²²

Vía de unión de mediadores a receptores ionotrópicos (IR): Cuando canales de iones en la membrana celular se abren y el Ca²⁺ entra al citosol desde el fluido extracelular, induce movilización de Ca²⁺ desde el retículo endoplásmico, creándose un complejo Ca²⁺/calmodulina que activa NOS.

Vía de activación a través de receptores metabotrópicos (MR): Receptores acoplados a proteína G. (Fig.6) Cuando GDP por la actividad del receptor se separa de la proteína G, GDP se intercambia por GTP. $GTP_{\alpha\beta\gamma}$ se separa en monómeros GTP_{α} y heterodímeros $\beta\gamma$, los cuales se difunden a través de la membrana e interaccionan con enzimas blanco como: adenil ciclasa, fosfolipasa A, fosfolipasa C β (FLA $_2$ y FLC β) y GMPc fosfodiesterasa. El sustrato de FLC β es el fosfatidil inositol Bisfosfato (PIP $_2$) que se encuentra en la membrana interna. La FLC β degrada PIP $_2$ a inositol trisfosfato IP $_3$ y diacilglicerol (DAG) (segundos mensajeros). El IP $_3$ con carga negativa es soluble en agua y transmite señales en el citosol. Este se une a un receptor específico sobre la membrana del retículo endoplásmico e induce liberación de Ca $^{2+}$ desde el retículo endoplásmico hasta el citosol (movilización de calcio)³⁹. El Ca $^{2+}$ se une a la calmodulina y de esta manera activa NOS.

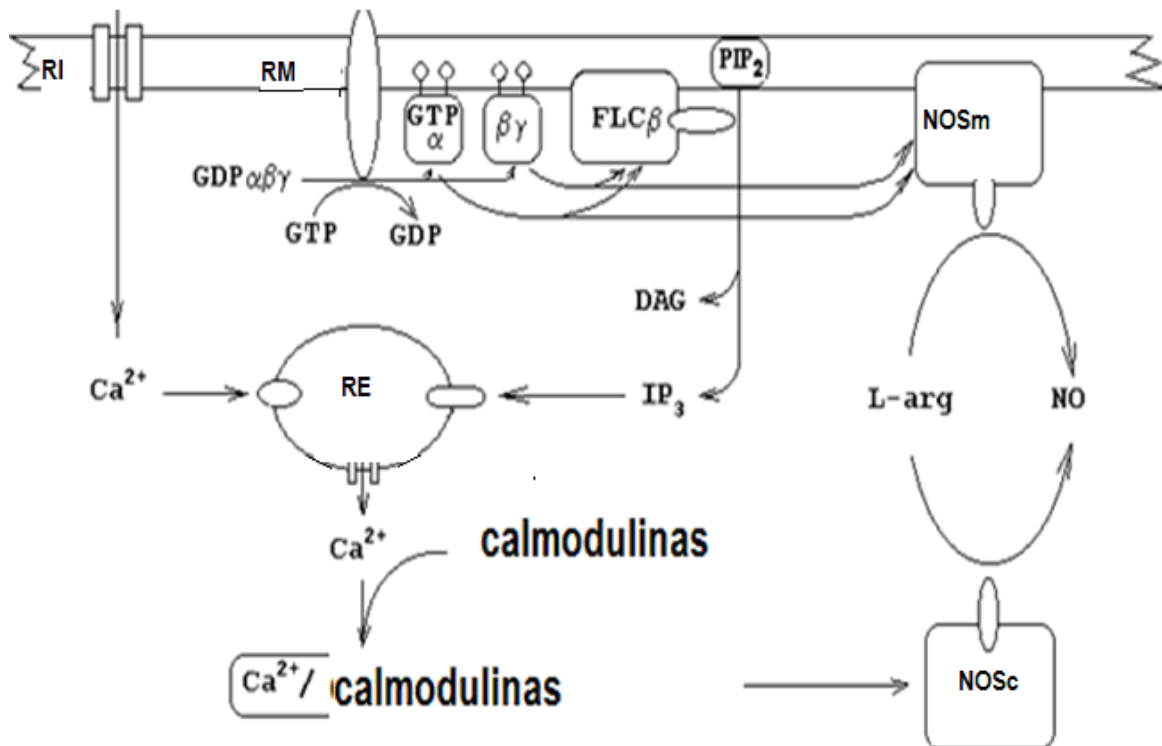


Figura 6. Vías de activación de sintasa de NO.— *Abreviaturas:* RI, Receptor Ionotrópico; RE, Retículo Endoplásmico; NOS_c, forma de NOS citosólica; RM, Receptor Metabotrópico; GDP_{αβγ}, Guanosín Difosfato y complejo de proteína G; GDP, Guanosín Difosfato; GTP, Guanosín Trifosfato; FLC_β, Fosfolipasa C_β; PIP₂, Fosfatidil Inositol 4,5-bifosfato; IP₃, Inositol 1,4,5 Trifosfato; DAG, Diacilglicerol; NOS_m, forma de NOS en membrana; L-arg, L-arginina; NO, Óxido Nítrico. Modificado de Knowles RG, Moncada S. *Biochem J* 1994; 298: 249-258.

La iNOS se activa por receptores con actividad cinasa de tirosina, los cuales a su vez pueden activarse entre otros factores⁴⁰, por endotoxinas bacterianas o péptidos de citocinas (interleucinas, factor de necrosis tumoral) los cuales regulan división celular, diferenciación y apoptosis.

1.4 Vías de inhibición de la síntesis de NO.

Existen algunas vías importantes de inhibición de NOS:

1. Inhibición de la formación de NO por derivados de la L-arginina. Este grupo está representado por N-monometil-L-arginina (L-MMA), NN-dimetil-L-arginina (L-ADMA), L-nitroarginina metil ester (L-NAME), compiten con la L-arginina por lo tanto inhiben la formación de NO. También se conocen inhibidores selectivos de iNOS, *L-canavanina*, *N-amino-L-arginina (L-NAA)*, *amidin-Niminoetil-L-ornitina (L-NIO)*, *amino guanidina*.
2. Inhibición de todas las flavin enzimas. El difenilenoiodonium (DPI), inhibe irreversiblemente todas las enzimas.
3. Inhibición competitiva de los receptores calmodulina. Antagonistas de la calmodulina (*trifluoperazina*, *clorpromazina*, *calmidazolium*). Inhibe a de todas las NOS dependientes de Ca^{2+} /calmodulina.
4. Los siguientes compuestos pueden inhibir la síntesis de BH₄ en sus diferentes etapas: Inhibición de la síntesis de tetrahidrobiopterina BH₄. 2,4-diamino-6-hidroxipirimidina (DAHD), inhibe GTP ciclohidrolasa-1, la cual inicia la síntesis de BH₄, metotrexate inhibe dihidropteridina reductasa y N-acetil-5-hidroxitriptamina inhibe sepiapterin reductasa, la cual participa en la conversión de sepiapterin a BH₄.

5. Glucocorticoides inhiben la expresión del gen iNOS en las células.
6. NO, inhibe por sí mismo NOS por autoregulación negativa. Esta inhibición se favorece ya el NO reacciona con el grupo hemo presente en la NOS.^{41,42}

1.5 Mecanismos genómicos de la activación de eNOS por estrógenos.

Los estrógenos se unen a receptores intracelulares y modulan la transcripción genética (DNA, RNAm y la síntesis de proteínas) después de la translocación esteroide-receptor dentro del núcleo.⁴³

El receptor a estrógenos, miembro de la familia de receptores nucleares utiliza un dominio altamente conservado de unión al DNA que interacciona con elementos de respuesta a estrógenos en el genoma e influye en la transcripción del gen. Estos efectos llamados “genómicos” fueron originalmente descritos para receptores nucleares. Diversas acciones se atribuyen a estos receptores, por su habilidad de adoptar múltiples estados dependiendo de la naturaleza de unión al ligando (Figura 7). Cada ligando puede inducir una diferente conformación del receptor, como consecuencia de los distintos coactivadores y coreceptores que son recluidos al complejo receptor-transcripción que dan lugar a efectos diferentes.⁴⁴

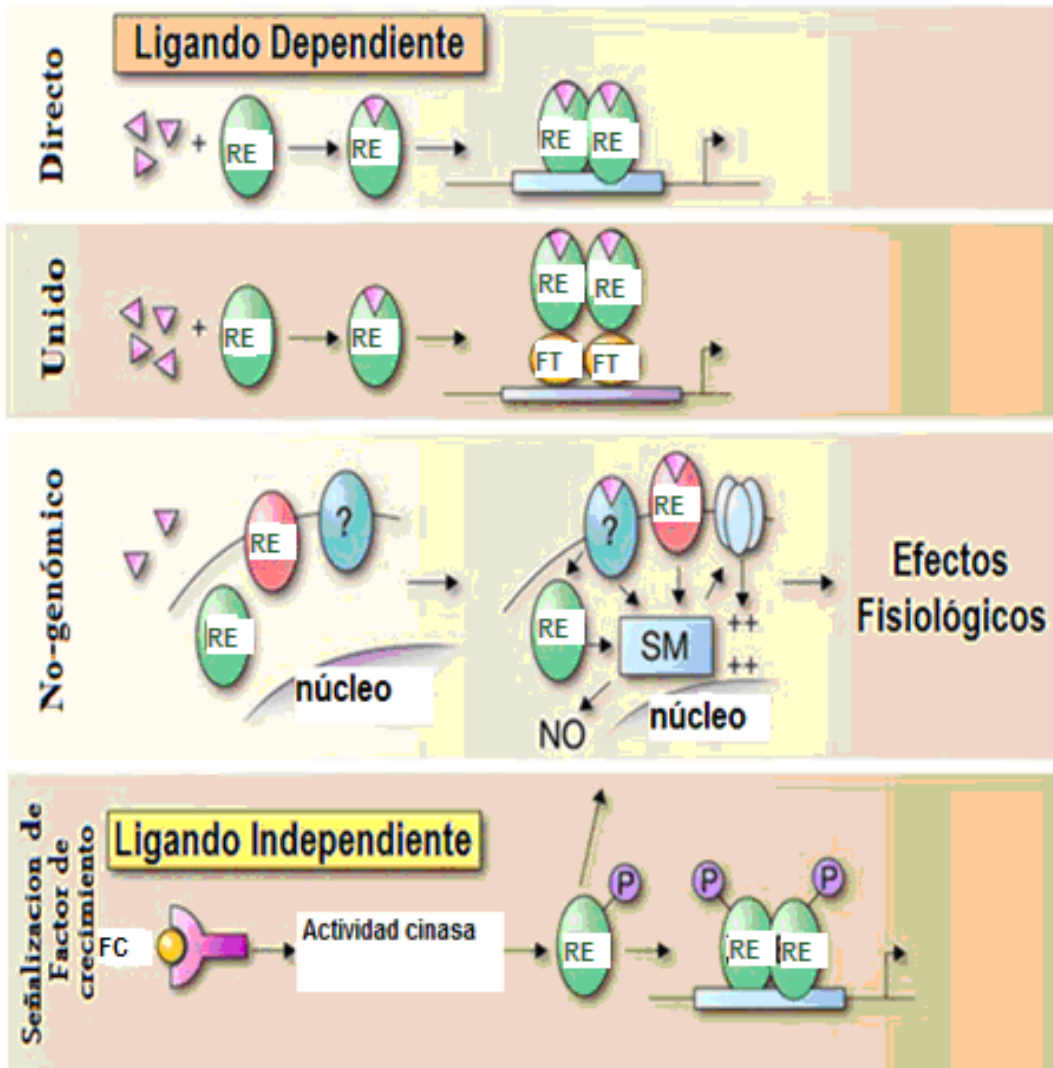


Figura 7. Representación de los mecanismos de las diferentes vías moleculares de acción de los receptores a estrógenos. Directa: vía clásica que comprende la activación por el ligando y unión directa al DNA a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) antes de la regulación del gen. Unido: vía de interacción proteína-proteína, con otros factores de transcripción después de la activación por el ligando y la regulación del gen es afectada por la unión indirecta al DNA. Un tercer mecanismo llamado no genómico con efectos rápidos. El ligando activa a un receptor posiblemente asociado a la membrana, el clásico receptor RE, o una isoforma de RE, o un distinto receptor⁴⁵ que activan una vía de señalización localizada en el citoplasma. La señalización en cascada es iniciada vía segundos mensajeros que influyen en la activación de canales iónicos o incrementan niveles de óxido nítrico en el citoplasma. Esto da como resultado rápidas respuestas fisiológicas sin involucrar la regulación del gen. Vía independiente del ligando: que comprende la activación a través de otras vías de señalización, como la señalización por factores de crecimiento, los cuales activan cinasas que van a fosforilar a los receptores a estrógenos provocando la activación de dichos receptores y su dimerización. *Abreviaturas:* RE, Receptor a Estrógenos; FT, Factor de Transcripción; SM, Segundos Mensajeros; FC, Factor de Crecimiento. Modificado de Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G,

Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. *Physiol Rev* 2007; 87: 905-931.

Los estrógenos tienen un marcado efecto sobre la vasculatura e incrementan la producción de (NO)⁴⁶. La isoforma endotelial sintasa de NO (eNOS) es la principal enzima que da origen a la síntesis de NO en la pared vascular⁴⁷.

Las primeras evidencias que demostraron que los estrógenos inducen la formación de NO en células endoteliales fueron:

Estudios reportados en 1995 demostraron que la capacidad de producir NO por células endoteliales de aorta se incrementa a las 8 horas posterior al tratamiento con estradiol (E₂) a concentraciones de aproximadamente 10nM⁴⁸. Trabajos adicionales en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) demostraron que el tamoxifen y el ICI 182,780 inhiben eNOS. Otros estudios realizados en células endoteliales de arteria pulmonar fetal bovina han demostrado que el E₂ induce incremento en la actividad enzimática de eNOS a concentraciones de E₂ 0.1nM y que estos cambios se acompañan por un incremento en los niveles de RNAm de eNOS⁴⁹. De acuerdo a estos reportes podemos mencionar que los estrógenos regulan la actividad de eNOS y la producción de NO por interacción con receptores específicos en la membrana plasmática de la célula endotelial por mecanismos genómicos.

1.6 Mecanismos no genómicos de la activación de eNOS por estrógenos.

En contraste a las acciones de los estrógenos regulados por mecanismos genómicos, los estrógenos también pueden producir efectos o acciones rápidas extranucleares que se han descrito también por hormonas esteroidales

incluyendo progesterona y aldosterona⁵⁰.

ER α en particular interacciona con caveolina-1, una proteína estructural de la caveola, lo que permite localizar al ER en la membrana plasmática de las células endoteliales⁵¹. A través de interacciones complejas con moléculas de señalización asociadas a membrana como proteínas G y tirosin cinasa c-Src, los receptores extranucleares de estrógenos ligados al estradiol (E₂) conducen a la activación de MAPK y PI3K. PI3K está formada por una subunidad reguladora p85 y una subunidad catalítica p110 (Fig. 8), la activación de PI3K cataliza la formación de mediadores lipídicos los cuales reclutan moléculas de señalización que contienen fosfatidil inositol (Ptd Ins) 3,4,5 P₃ ó cinasas de proteína Akt⁵². Uno de los principales blancos de esta cascada es la cinasa de proteína serina-treonina Akt/ cinasa de proteína B. La activación de Akt se traduce en la activación de eNOS, activación rápida de la isoforma endotelial eNOS³⁵, esto produce la fosforilación de eNOS en la Ser¹¹⁷⁷, e incrementa así la producción de NO.

Este mecanismo representa lo que se describe como efectos rápidos de los estrógenos para producir una respuesta de vasodilatación endotelial regulada por NO, efectos que se han demostrado *in vivo* e *in vitro*⁵³

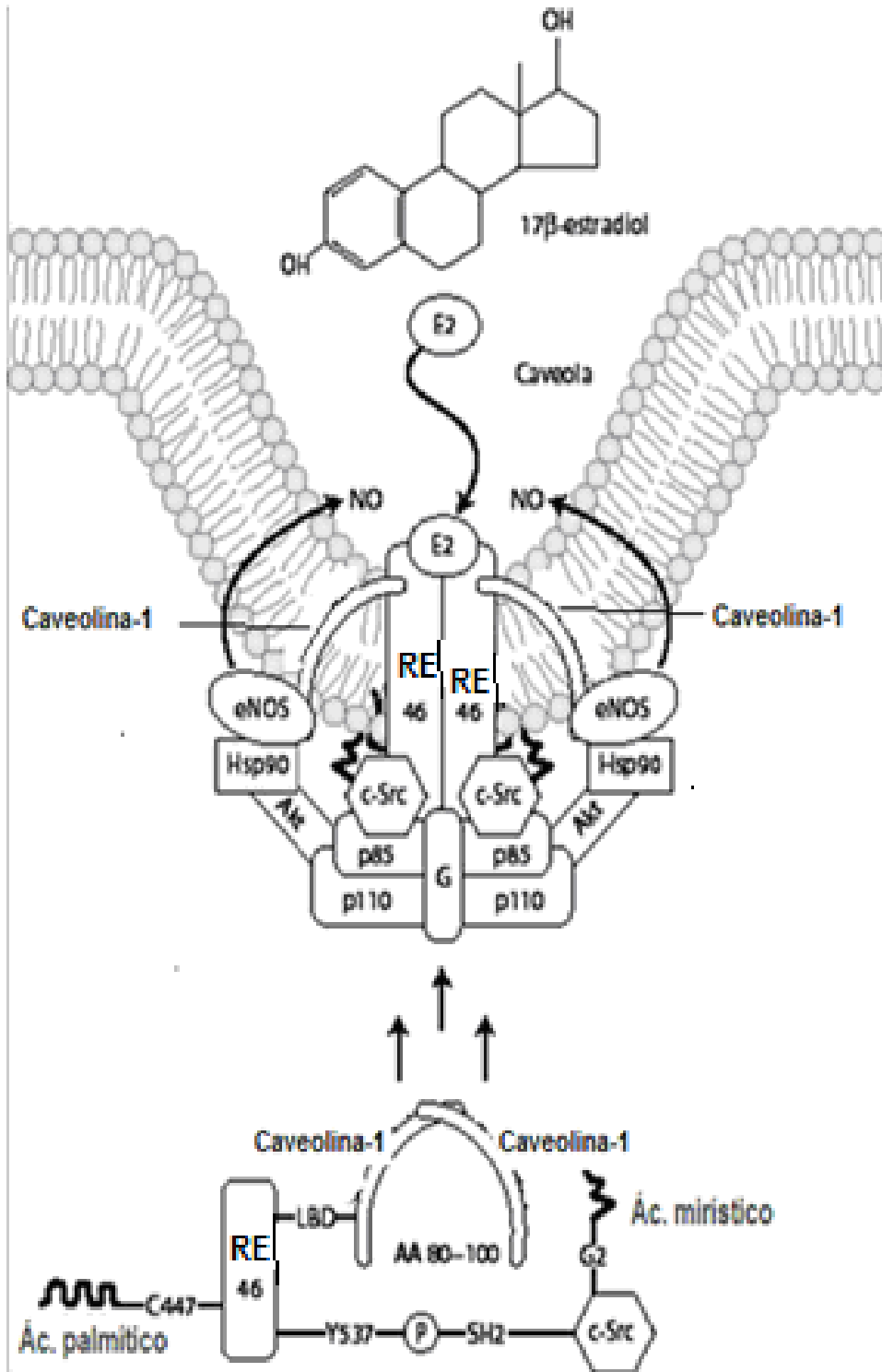


Figura 8. Activación de eNOS por estradiol. En la caveola de la membrana plasmática de células endoteliales. El RE (Receptor a Estrógenos) interacciona con moléculas características de la membrana como caveolina-1, palmitoilación y proteína de señalización c-Src. Modificado de Chambliss KL, Yuhanna IS, Mineo C, Liu P, German Z, Sherman TS, Mendelsohn ME, Anderson RG, Shaul PW. *Circ Res* 2000; 87: E44-E52

En algunos tipos celulares se ha demostrado que la actividad de los estrógenos en la membrana plasmática pueden potenciar su actividad en el núcleo. Tanto cascada de cinasas así como canales de calcio participan en esta potenciación transcripcional. El mecanismo puede ocurrir en paralelo o en serie, y la convergencia de los efectos de los estrógenos que se inician en la membrana pueden influir en la transcripción nuclear, incluyendo interacciones proteína-proteína, translocación de proteínas, y fosforilación de proteínas⁵⁴.

1.7 Producción de NO en plaquetas. (Mecanismo no genómico)

En sitios de daño vascular, las plaquetas se activan por varios agonistas como trombina, ADP, colágena y factor de von Willebrand (Fig 9). A pesar que diversos agonistas inducen activación plaquetaria por diferentes vías, éstas convergen en eventos de señalización común como la movilización de calcio, activación de NOS⁵⁵, y activación de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ que regula agregación plaquetaria⁵⁶. Una característica importante de la activación plaquetaria es la habilidad que tienen las plaquetas de amplificar señales por sí mismas por medio de la secreción de gránulos plaquetarios que contienen agonistas como ADP, serotonina, proteínas de adhesión, factor de von Willebrand y fibrinógeno⁵⁷. Estos agonistas amplifican y estabilizan la agregación plaquetaria.

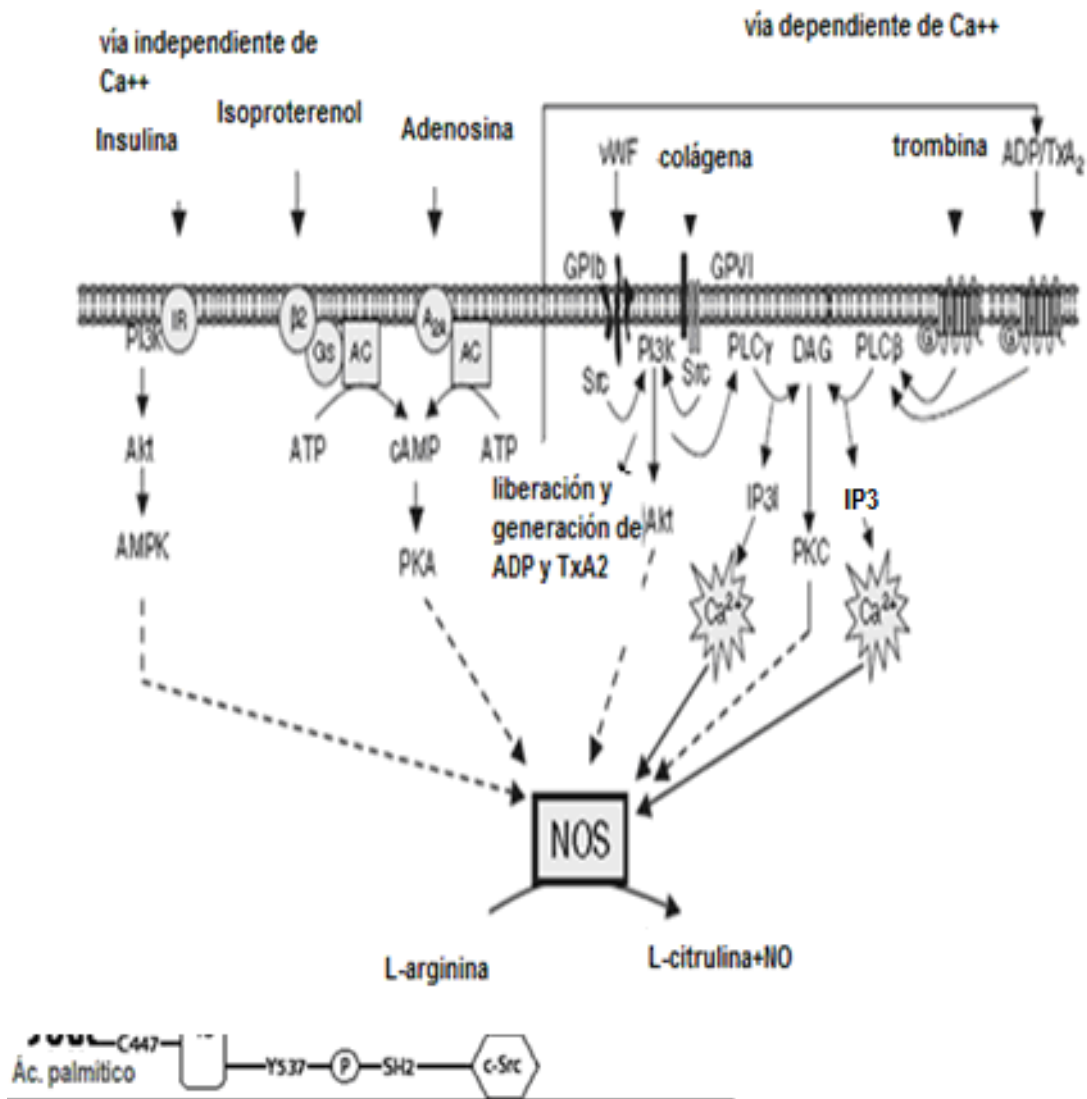


Fig.9 Mecanismos de señalización en la activación de sintasa de NO (NOS) en la plaqueta. La activación de sintasa de óxido nítrico en la plaqueta, es regulada a través de dos distintos mecanismos, dependiente e independiente de Ca^{++} . Los independientes de Ca^{++} , incluyen insulina, adenosina y agonistas β_2 adrenoreceptores. La activación de insulina orienta a la activación de PI3K el cual estimula AMPK y activa NOS. Los receptores acoplados a proteína G activan a la adenil ciclasa produciendo activación de NOS dependiente de PKA. Sin embargo la activación de NOS inducida por agonista es dependiente de Ca^{++} . Activación de NOS plaquetaria por agonistas como colágeno y Factor de von Willebrand (FvW) requiere de Src, PI3K y fosfolipasa C, los cuales orientan a la movilización de Ca^{++} intracelular y activación de NOS. La activación de las plaquetas por colágena y fvW produce la generación de TxA_2 y secreción de ADP, el cual es requerido para activar totalmente NOS. La síntesis de NO inducida por colágena pero no por FvW también requiere de proteína cinasa C (PKC). La trombina activa NOS plaquetaria por un mecanismo dependiente de Ca^{++} y PKC, sin requerir PI3K. *Abreviaturas:* PI3K, Fosfatidil Inositol 3 Cinasa; AMPK, Adenosín Monofosfato Proteín Cinasa; ATP, Adenosín Trifosfato; AC, Adenil

Ciclasa; cAMP, Adenosín Monofosfato cíclico; PKA, Proteín Cinasa A; PKC, Proteín Cinasa C; Gplb, Glicoproteína Ib; GpVI, Glicoproteína VI; vWF, Factor de von Willebrand; ADP/TxA₂, Adenosín Difosfato/Tromboxano A₂; PLC_γ, Fosfolipasa C_γ (por sus siglas en inglés "PhospholipaseC_γ"); PLC_β, Fosfolipasa C_β (por sus siglas en inglés "Phospholipase C_β"); DAG, Diacil Glicerol; IP3, Inositol 1,4,5 trifosfato. Modificado de Naseem KM, Riba R. J Thromb Haemost 2008; 6: 10-19.

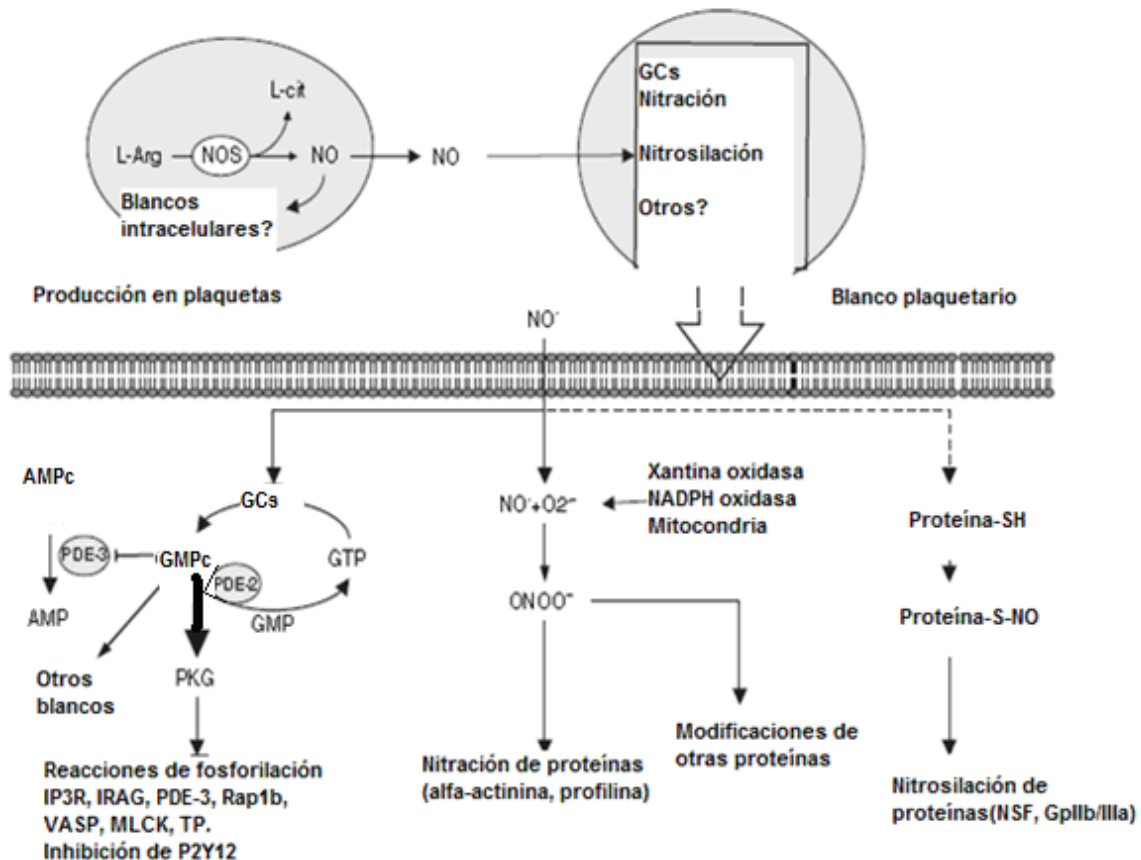


Fig 10. Cascadas de señalización de NO en plaquetas. El NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, por la óxido nítrico sintasa (NOS). Cada NO sintetizado es liberado de la célula donde puede interaccionar con otras plaquetas o actuar sobre blancos intracelulares. El principal blanco de NO es la guanilato ciclasa soluble (GCs), un receptor intracelular de NO, el cual activa la síntesis de GMPc desde GTP. GMPc regula la vía de AMPc por inhibición de PDE-3 y permite la acumulación de AMP y activación subsecuente de PKA. GMPc también se activa y une a PKG, el cual es el principal efector de la cascada de señalización de NO. Cada PKG activado fosforila un número de proteínas blanco como IP₃R, IRAG, PDE-5, VASP, MLCK, Rap1b y receptor TP. La cascada de señalización GMPc/PKG es regulada por P-DE2, la cual hidroliza GMPc. El NO también puede participar en mecanismos independientes de GMPc de regulación plaquetaria incluyendo nitración y nitrosilación de proteínas. El NO se combina con anión superóxido el cual se forma durante la activación plaquetaria, para producir peroxinitrito. El peroxinitrito es un potente agente nitrante, el cual reacciona con los anillos fenólicos de aminoácidos como es la tirosina. Frecuentemente solo la α-actina ha sido identificada como un blanco de nitración en respuesta a NO. Un segundo mecanismo de acción independiente de GMPc es a través de nitrosilación de proteína. Un derivado de NO, N₂O₃ reacciona con grupos tioles para formar nitrosotiol. Se ha demostrado que la nitrosilación de grupos tioles regula la función de las proteínas NSF y α_{IIb}β₃ sufren nitrosilación en respuesta a NO. *Abreviaturas:* NOS, sintasa de óxido nítrico; L-arg, L-arginina; L-cit, L-citruilina; GCs, Guanilato Ciclasa soluble; GTP, Guanosín Trifosfato; GMPc, Guanosín Monofosfato cíclico; AMP, Adenosín Monofosfato; AMPc, Adenosín Monofosfato cíclico;

PKG, Proteín Cinasa G; PDE-2, Fosfodiesterasa 2; PDE-3, Fosfodiesterasa 3; PDE-5, Fosfodiesterasa-5; IP₃R, Receptor de Inositol 1,4,5 Trifosfato; IRAG, Sustrato de Cinasa GMPc Asociado a Receptor IP₃; VASP, Fosfoproteína Estimuladora de Vasodilatador; MLCK, Cinasa de Cadena Ligera de Miosina; Rap 1b, proteína de bajo peso molecular unida a GTP asás; TP, receptor a TxA₂; NSF, proteína de Fusión Sensible a N-etilmaleimida; O₂^{•-}, anión superóxido; ONOO⁻, peroxinitrito; α_{IIb}β₃, Glicoproteína IIb/IIIa. Modificada de Naseem KM, Riba R. J Thromb Haemost 2008; 6: 10-19.

Sin embargo las plaquetas también requieren de un mecanismo de señalización negativa para evitar la activación en exceso. El exceso de la activación plaquetaria está controlado por mediadores derivados del endotelio, entre ellos destaca el óxido nítrico (NO), las prostaciclinas (PGI₂), y la enzima ADPasa CD39^{58,59}. El NO inhibe el reclutamiento de otras plaquetas como mecanismo regulador de la agregación plaquetaria. Existen reportes que el NO que sintetizan las plaquetas deriva de la eNOS, estudios realizados por RT-PCR identifican al RNAm de eNOS en la plaqueta⁶⁰, así como también existen datos que las plaquetas expresan constitutivamente iNOS⁶¹. Cabe mencionar que las plaquetas contienen sólo un número relativamente de ribosomas, remanentes del Aparato de Golgi y una pequeña cantidad de RNAm⁶². Trabajos realizados por Mehta⁶³ demuestran la presencia de RNAm de iNOS, el cual se expresa después de tratamientos con lipopolisacáridos, lo que hace posible que bajo condiciones de inflamación iNOS pueda ser inducida en plaquetas.

En 1977 se reportó que la agregación plaquetaria en respuesta a la colágena, se asocia con un incremento de GMPc, la presencia de una vía de señalización L-arginina/NO en plaquetas humanas (Fig.10) se confirmó en estudios realizados por Radomski et al⁶⁴ quien demostró que la acumulación de GMPc en respuesta a la colágena se incrementó con exceso de la L-arginina produciendo una reducción

en la agregación plaquetaria. Contrario al concepto anterior Stojanovic reportó que el NO sintetizado por la eNOS estimula a la guanilil ciclase e induce elevación de GMPc y activación de cinasa de proteína (PKG) dependiente de GMPc produciendo secreción de granulos plaquetarios y posteriormente agregación plaquetaria⁶⁵. Estos reportes muestran que la vía NO-GMPc-PKG presenta un efecto bifásico en la activación plaquetaria: un efecto estimulador a bajas concentraciones de NO y GMPc, y un efecto inhibitor cuando las plaquetas sintetizan altas concentraciones de NO y GMPc ^{44,66}. Por otro lado existen evidencias que PI3K participa de manera importante en los mecanismos de de agregación plaquetaria ⁶⁷, PI3K activa a Akt, la cual pertenece a la familia de proteínas cinasas intracelulares serina/treonina también llamadas protein cinasa B ⁶⁸. Hay tres isoformas de Akt: Akt-1, Akt-2 y Akt-3. Recientes estudios muestran que Akt-1 y Akt-2 son importantes en la activación plaquetaria inducida con bajas dosis de trombina, las que favorecen la formación de trombos in vivo ^{69, 70}. Aún y cuando se tienen reportes que Akt fosforila y activa NOS3 en células endoteliales⁷¹.

El 17 β estradiol se relaciona con la síntesis de NO en células endoteliales y plaquetas humanas, a través de la vía L-arginina/NO ⁷², por mecanismos no genómicos a través de un receptor sobre la membrana plaquetaria.

I.8 Alcohol-aminoestrógenos.

En el año de 1983, Fernández-G y cols., iniciaron en México la búsqueda de compuestos con actividad anticancerígena al sintetizar diamino estrógenos en forma de complejos con platino y paladio, con base en que el cis-platino había demostrado ser útil para el tratamiento del cáncer de testículo y la suposición de que su combinación con un estrógeno permitiría alcanzar un doble efecto benéfico para el tratamiento de la próstata. Sin embargo la gran dificultad para disolver los compuestos impidió realizar los estudios farmacológicos con ellos.

Sin embargo, sí fue posible hacer la evaluación farmacológica de los ligantes, que eran compuestos de naturaleza estrogénica sustituidos en la posición 17β . Se sintetizaron mediante una reacción química entre la estrona y la amina correspondiente, para formar una monoamina la cual se reduce con borohidruro de sodio en presencia de metanol. El compuesto obtenido se denominó prodiame (N-[3-hidroxiestra1:3:5 (10)-trien]- 17β -1,2-propilendiamina)⁷³ y mostró actividad anticoagulante *in vivo* en ratones macho de la cepa CD1, al ser administrado por vía subcutánea; tal efecto se prolongó durante varios días; sin embargo, mostró efectos colaterales indeseables en el sistema nervioso central como aumento en la actividad locomotora y efecto convulsivo⁷⁴. Estos resultados motivaron la búsqueda de otros estrógenos sustituidos en la posición 17β con un radical menos liposoluble que el presente en prodiame, con la intención de tratar de evitar el acceso al sistema nervioso central. El sustituyente seleccionado fue la 3-hidroxi-propilamina, con la que se obtuvo el compuesto nombrado prolame (N-(3-hidroxi-1,3,5 (10)-estratrien- 17β - il)-3- hidroxipropilamina), el cual es un

estrógeno con el grupo $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{OH}$ en la posición 17β ; al estudiarlo in vivo mostró sólo el efecto anticoagulante dosis-dependiente, cuyo efecto perdura hasta 4 días después de la administración por vía subcutánea tanto en ratones macho adultos CD-1 como en ratones hembra ovariectomizadas y en ratas Wistar machos adultos e infantes⁷⁵ Además mostró efecto de cornificación de las células vaginales en los ratones CD-1 hembras ovariectomizadas con duración menor que el producido por el 17β estradiol. Los autores concluyeron que la sustitución en la posición 17β , por el amino alcohol, incrementa el efecto anticoagulante y disminuye el efecto estrogénico respecto al 17β estradiol. Para el estudio del efecto de los 17β aminoestrógenos sobre la agregación plaquetaria *in vitro* se emplearon diferentes agonistas de agregación plaquetaria a concentraciones umbrales (ADP, $5\mu\text{M}$; epinefrina; $10\mu\text{M}$ y colágena, $10\mu\text{M}$). El prolame inhibió la agregación plaquetaria inducida por los agonistas mencionados. Así, se identificó que la actividad antiagregante plaquetaria dosis-dependiente es un efecto estrogénico no genómico que se induce en el prolame, pero no en 17β estradiol.

En otro estudio se compararon los efectos sobre los tiempos de coagulación en sangre total, producidos por los aminoestrógenos prolame, butolame, pentolame y estradiol, en ratas ovariectomizadas y en ratas macho; y se encontraron diferencias en latencia y duración del efecto, lo cual se atribuyó a las diferencias en biodisponibilidad⁷⁶.

Así mismo confirmaron que el efecto estrogénico de los amino estrógenos es dosis dependiente y de menor intensidad que el del estradiol; además que la

eficacia y la potencia anticoagulante de los amino estrógenos se relacionan con la longitud de la cadena de prolame (3), butolame (4), pentolame (5)⁷⁷. (Fig.11)

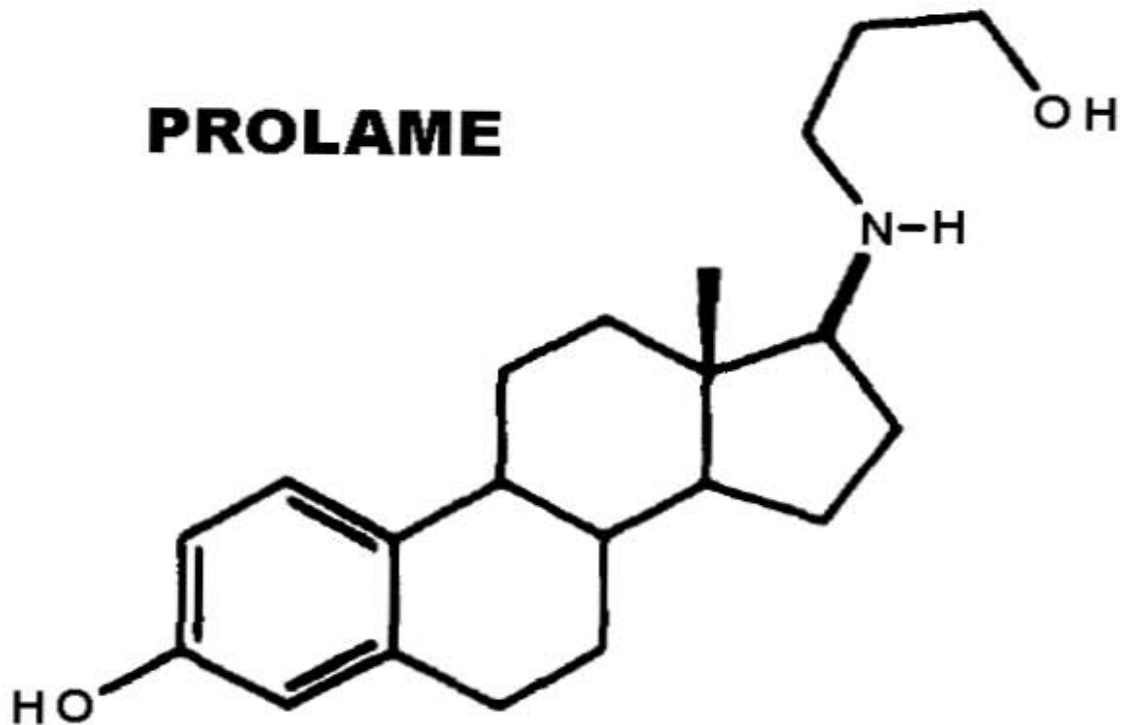


Figura 11. Estructura del 17 β aminoestrógeno, Prolame (N-(3-hidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17 β il)-3 hidroxipropilamina).

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Los antecedentes muestran sin lugar a duda el efecto anticoagulante del alcohol-aminoestrógeno Prolame; sin embargo, no establecen con claridad un mecanismo de acción. Por tanto, representa un reto el intentar explorar mecanismos de acción posibles.

III. HIPÓTESIS

El Prolame, incrementa la producción de óxido nítrico en las plaquetas y en las células endoteliales.

IV. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Objetivo General

Determinar la producción de óxido nítrico (NO) en las plaquetas y en las células endoteliales HMEC-1 tratadas con Prolame.

V. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Determinar el óxido nítrico (NO) en células endoteliales HMEC-1 tratadas.
2. Determinar el NO en plaquetas humanas tratadas.
3. Cuantificar los metabolitos de NO en células endoteliales HMEC-1 tratadas y no tratadas con Prolame.
4. Determinar la inhibición de la agregación plaquetaria en plaquetas humanas en contacto con suspensiones de células endoteliales HMEC-1 tratadas y no tratadas con Prolame.
5. Evaluar el efecto antitrombótico del Prolame en un modelo de trombosis *in vivo*.
6. Determinar la expresión de eNOS por RT-PCR en células endoteliales HMEC-1 tratadas con Prolame.
7. Cuantificar la producción de NO en sangre total por la técnica de EPR en un modelo *in vivo*.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

Via. Mantenimiento de la línea celular endotelial HMEC-1.

La HMEC-1 es la primera línea celular endotelial de microvasculatura que conserva las características morfológicas, fenotípicas y funcionales de las células endoteliales humanas normales de la microvasculatura y fue aislada a partir de prepucios humanos¹. Las HMEC-1 se mantuvieron en medio de cultivo MCDB-131 (*In vitro*, México) suplementado con glutamina (Gibco BRL) 200mM, factor de crecimiento endotelial (Sigma) 0.1mg/mL, hidrocortisona (Sigma) 1µg/mL, mezcla de antibiótico-antimicótico (Gibco BRL) (penicilina 1000 U/mL, estreptomina 100µg/mL, anfotericina 0.25 µg/mL) y suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL) al 10%. El medio de cultivo se cambió cada tercer día. Las células se mantuvieron a 37°C, con humedad relativa del 95% y una atmósfera de CO₂ al 7% hasta generar capas confluentes y obtenerlas en número suficiente.

Vib. Subcultivo de células endoteliales HMEC-1

Para su propagación, las células en confluencia se despegaron con una solución de 1% de tripsina-33% de EDTA (Sigma), incubándolas durante 2 a 3 minutos a 37°C. Las células disgregadas se recuperaron en tubos de centrifuga con 10mL de medio de cultivo MCDB-131 y se centrifugaron a 500 g durante 7 minutos. El botón celular se resuspendió con 3 mL de medio MCDB-131 suplementado [10% de SFB, 1% de solución de antibióticos, 200mM de glutamina, 1µg/mL de hidrocortisona, 0.1 mg/mL de factor de crecimiento endotelial]. Las células se sembraron en botellas de 75cm² y se mantuvieron a 37°C, con humedad relativa

del 95% y una atmósfera de CO₂ al 7%, hasta alcanzar confluencia, posteriormente se subcultivaron para obtener un número de células endoteliales suficiente. Para los ensayos las células endoteliales HMEC-1 se utilizaron en los pases 3 y 4.

Vlc. Producción de óxido nítrico (NO) en células endoteliales HMEC-1 tratadas con el Prolame.

En placas de 6 pozos, se sembraron aproximadamente 400,000 células por pozo hasta alcanzar confluencia, entre 50 y 80%; las capas celulares HMEC-1 se lavaron 3 veces con buffer A (Hepes 5mM; NaCl, 140mM; KCl, 5mM; CaCl₂, 1.29mM; MgCl₂, 1.20mM, pH=7.45), y fueron tratadas con prolame (0.033, 0.11, 3.3 y 11 μ M) en medio de cultivo MCDB-131, libre de rojo fenol durante 24 horas a 37°C con una humedad relativa del 95% y una atmósfera de CO₂ al 7%. Posteriormente las células se lavaron 3 veces con buffer A y se les adicionó el diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM) (Sigma) 10 μ M durante 1 hora, a 37°C. Se utilizó como control positivo el donador de NO, S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP) (Sigma) 3mM más DAF-FM 10 μ M bajo las mismas condiciones. Inmediatamente después las células se lavaron tres veces con buffer A y separadas con una solución de 1% de tripsina-33% de EDTA (Sigma). Las células se resuspendieron con 3mL de medio suplementado MCDB-131 libre de rojo fenol al 10% con CPSR-3 y se centrifugaron a 500 g, durante 7 minutos. Finalmente el botón celular se resuspendió en 1 mL de buffer A. La intensidad de la fluorescencia se determinó en un Citómetro de Flujo

(Becton Dickinson FACS Calibur, San José, CA, USA).

Vld. Prueba de viabilidad celular.

Par determinar si el Prolame afecta la viabilidad celular se utilizó la prueba de exclusión de azul tripano, para la cual se sembraron 5×10^4 células HMEC-1 por pozo, en placas de 6 pozos, y se les añadió 500 μ L de medio MCDB-131, sin rojo fenol, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 0.1mg/mL de factor de crecimiento endotelial, 10mM de glutamina y 1mg/mL de cortisona.

Las células se trataron con dos concentraciones de 17 β -estradiol (3.3 y 0.033 μ M) y con 4 concentraciones de Prolame (0.033, 0.11, 3.3 y 11 μ M). Como control negativo se usaron células sin tratamiento y como control positivo células tratadas con TNF- α (1.25ng/mL). Se dejaron en incubación a 37°C con una humedad relativa del 95% y una atmósfera de CO₂ al 7% durante 24 horas. Después, se retiró el medio y las células se despegaron con una solución de tripsina al 0.5% EDTA. Las células se recuperaron por centrifugación a 500 g durante 7 minutos, se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 5 mL de medio MCDB-131.

Las células se tiñeron con una solución de azul tripano al 0.04% y se observaron al microscopio en una cámara de Neubauer, se contaron las células teñidas (muertas) y las células sin teñir (vivas) en cuatro campos diferentes y se calculó el porcentaje de viabilidad con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad} = \{ \text{células vivas} \div (\text{células vivas} + \text{células muertas}) \} \times 100$$

Vle. Producción de NO en plaquetas humanas tratadas con Prolame.

La sangre se obtuvo por punción venosa en tubos de plástico, se mezcló suavemente con el anticoagulante (citrato de sodio al 3.8%) en relación 1 volumen de anticoagulante y 9 volúmenes de sangre. La muestra de sangre se centrifugó a 170 g durante 10 minutos; posteriormente, el plasma rico en plaquetas (PRP) se separó con pipetas de plástico, se transfirió a tubos de plástico y se le adicionó apirasa 2U/mL; inmediatamente después se centrifugó a 1000 g durante 12 minutos. El pellet de plaquetas obtenido se resuspendió en 1.5 mL de HBS (HEPES 10mM, NaCl 140mM, KCl 2.7mM, glucosa 5mM, BSA 1mg/mL), se volvió a centrifugar a 1000 g durante 12 minutos y se volvió a resuspender en 1.5mL de HBS.

20×10^6 plaquetas se resuspendieron en HBS sin BSA y se trataron con DAF-FM ($6 \mu\text{M}$) durante 30 minutos, inmediatamente después las plaquetas se trataron con Prolame (0.033, 0.11, 3.3 y $11 \mu\text{M}$) durante 30 minutos a 37°C en las mismas condiciones de oscuridad; al cabo de este tiempo se adicionó el agonista ADP $5 \mu\text{M}$, y se midió la intensidad de la fluorescencia a 515 nm con excitación de 495 nm, utilizando un Citómetro de Flujo Becton Dickinson FACS CALIBUR (San José, CA, USA).

Vlf. Obtención de plasma rico en plaquetas (PRP) y prueba de agregación plaquetaria.

La sangre se obtuvo de individuos donadores sanos que acudieron al Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

Se extrajo sangre venosa por punción con agujas de 19G½, sin dificultad por buen flujo sanguíneo. Se permitió drenar la sangre directamente a tubos que contenían citrato de sodio al 3.8% en relación 1 volumen de anticoagulante y 9 volúmenes de sangre, se mezcló suavemente. La muestra se centrifugó a 140g durante 4.5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se separó el PRP con pipetas de plástico y se transfirieron a tubos de polipropileno que permanecieron cerrados para evitar cambios en el pH del plasma. El resto de la sangre se centrifugó nuevamente durante 15 minutos a 4000 g, para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP) que se empleó para ajustar la cuenta de plaquetas y para emplearlo como blanco.

Prueba de Agregación Plaquetaria.

La agregometría plaquetaria turbidimétrica se analiza en un espectrofotómetro modificado llamado agregómetro, el cual estima el paso de luz entre el (PRP) y el plasma pobre en plaquetas (PPP). La transmitancia es directamente proporcional al número de plaquetas que se activan y agregan, y el porcentaje de transmitancia representa la medida de agregación plaquetaria. El agregómetro está acoplado a un equipo de transducción de señales que cuenta con un programa que analiza la información, la muestra se grafica en una curva y presenta el resultado de porcentaje máximo de respuesta.

Vlg. Ensayo de agregación plaquetaria con suspensiones combinadas de células endoteliales HMEC-1 tratadas con Prolame y plaquetas.

Estos ensayos se realizaron de acuerdo con el método ya descrito². En placas de 6 pozos se sembraron aproximadamente 350,000 células endoteliales HMEC-1 por pozo (500 μ L de suspensión celular más 2.5 mL de medio de cultivo) y cuando alcanzaron confluencia, las capas celulares se lavaron 3 veces con buffer A y se trataron con prolame (0.11, 3.3, 11, y 125 μ M) durante 24 horas a 37°C.

La concentración de 125 μ M como la más alta concentración para obtener la concentración inhibitoria 50. Posteriormente se realizaron otros 3 lavados con buffer A y las células fueron separadas con 2mL de solución de colagenasa tipo I 0.05%, EDTA 0.05%, y albúmina sérica bovina (ABS) 0.25%. Inmediatamente después se les adicionó un volumen igual de SFB y se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2mL de buffer A, manteniéndolas a temperatura ambiente, hasta un máximo de 1 hora.

Se preincubaron 80 μ L de PRP, aproximadamente 1×10^8 plaquetas en un agregómetro modelo 810 AGGRO/LINK CHRONOLOG (Hawertown, PA, USA), durante 3 minutos, a 37°C, en cuvetas siliconizadas con barras agitadoras. Se adicionaron 1×10^6 células endoteliales HMEC-1 tratadas con Prolame (250 μ L) y el volumen total se ajustó a 500 μ L con buffer A; después de 1 minuto se agregó el agonista ADP 5 μ M. El registro de la agregación plaquetaria se realizó durante

5 minutos; como blanco se utilizó el plasma pobre en plaquetas (PPP), y para corregir la absorción de luz se le adicionó igual cantidad de células que al PRP.

Vlh. Cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en células HMEC-1.

En placas de 6 pozos se sembraron 250,000 células endoteliales HMEC-1 por pozo hasta alcanzar confluencia; las monocapas de células se lavaron 3 veces con buffer A y se trataron con prolame 125 μ M durante 24 horas, a 37°C. El inhibidor de sintasa de NO, L-NAME, 100 μ M, se aplicó durante 15 minutos a 37°C; luego las células se lavaron 3 veces con el buffer A y se separaron con solución de colagenasa tipo I 0.05%-EDTA 0.05%-BSA 0.25%. Inmediatamente después las células se resuspendieron en 10% de SFB y se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos. Finalmente las células fueron resuspendidas en 2mL de buffer A y mantenidas a temperatura ambiente por no más de 1 hora. Los metabolitos de óxido nítrico se cuantificaron empleando el método ya descrito³.

Vli. Modelo de Trombosis.

El Prolame se administró en dosis de 10 y 100 mg/kg de peso, por vía subcutánea, 24 horas antes del experimento.

Se hizo una adaptación al modelo⁴ ; bajo condiciones asépticas, a ratones macho, cepa CD1, entre 30 y 40 g de peso. Se les anestesió con ketamina 50mg/kg, intramuscular, como un inductor, y fenobarbital 10mg/kg, intraperitoneal como anestésico de acción prolongada. En la arteria y vena femorales de la

extremidad derecha se realizaron dos ligaduras separadas por 0.7 cm, durante 2 horas, para provocar la oclusión vascular.

El segmento vascular entre las ligaduras, se extirpó y se fijó con formalina; luego el tejido fue deshidratado y cubierto con parafina; enseguida se hicieron cortes de 4 μ M de ancho y se tiñeron con eosina-hematoxilina. Los cortes se observaron con microscopía de luz y fueron analizados por dos patólogos.

Vlj. Determinación de óxido nítrico (NO) en sangre total por el método de Espectroscopia de Resonancia Paramagnética (EPR).

Los ratones de la cepa CD1 machos de 30 y 40 g de peso, en grupos de 7 cada uno, tratados durante 14 días con Prolame 2mg/100g de peso, por día, por vía subcutánea y con L-NAME 1g/L de agua por vía oral. Las muestras de sangre fueron obtenidas bajo anestesia general por punción cardiaca, y se les almacenó en nitrógeno líquido, hasta el momento de ser utilizadas.

La determinación de NO por EPR se realizó básicamente por el método de Tsuchiya et. al.⁵, al que se hicieron algunas modificaciones, asimismo, las condiciones del espectrómetro fueron las siguientes: campo 322.0 \pm 15 mT; poder 20 mW, frecuencia 9.12804 Ghz, modulación 0.063 mT, constante de tiempo 0.1s; amplitud 250, tiempo de barrido 240 s, acumulación 8 scans. La adquisición y manipulación del espectro fue realizado con el programa Jeol ES-PRIT.

Vlk. Reacción en cadena de polimerasa por transcripción reversa (RT-PCR).

Las células endoteliales HMEC-1, 1×10^6 , se sembraron en cajas Petri hasta alcanzar confluencia; enseguida se trataron con una dosis de prolame (0.033, 0.11 y $11 \mu\text{M}$) durante 24 horas, a 37°C y 7% de CO_2 ; el RNA total se extrajo con Trizol (Molecular Research Center INC.) y se resuspendió en una solución de dietil pirocarbonato; su concentración se determinó en un espectrómetro "18 Lambda" (Perkin Elmer, Germany) a 260 nm. Para realizar la transcripción reversa (RT), se mezclaron $1 \mu\text{g}$ de RNA con $1 \mu\text{L}$ de oligo DT, $4 \mu\text{L}$ de buffer 5x transcriptasa reversa y $10 \mu\text{L}$ de una solución en agua de dietil pirocarbonato; la mezcla se incubó, a 70°C , durante 10 minutos; después se le adicionaron $2 \mu\text{L}$ de ditiotreitól 0.1M, $0.25 \mu\text{L}$ de dNTP 100mM, y $1 \mu\text{L}$ (200U mL^{-1}) de transcriptasa reversa del virus de leucemia murina Moloney. La mezcla total de RT se incubó, a 42°C , durante 50 minutos y enseguida, a 70°C , durante 15 minutos más. El DNAC obtenido fue amplificado por PCR.

La secuencia para eNOS fue 5'-CCA GCT AGC CAA AGT CAC CAT-3' (río arriba) y 5'-GTC TCG GAG CCA TAC AGG ATT-3' (río abajo) como un producto amplificado de 350 pares de bases⁶. Las condiciones para PCR fueron: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, cambio a temperatura 55°C , durante 1 minuto, y extensión a 72°C durante 45 segundos. Se utilizó un Termociclador Px2 (Thermo Electron Corporation, USA). La β -actina una proteína constitutiva se utilizó como control interno; la primera secuencia fue 5'-TAC ATG GCT GGG GTG TTG AA-3' (río arriba) y 5'-AAG AGA GGC ATC CTC ACC CT-3' (río abajo) para un producto de amplificación de 230 pares de bases. Después de

35 ciclos, los productos de PCR fueron detectados por electroforesis sobre un gel de agarosa al 2%, teñido con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. La intensidad de las bandas fue determinada utilizando un transiluminador LabWorks Image Acquisition and Analysis Software (UVP Upland, CA, USA).

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO UTILIZADO.

Los experimentos se realizaron al menos 3 veces (diferentes muestras). Los resultados se analizaron mediante la prueba *t* pareada, utilizando el programa Graph Pad PRISM versión 4: 2003. Para considerar las diferencias estadísticamente significativas se fijó un valor de $p \leq 0.05$.

VIII. RESULTADOS.

VIIIa. Cuantificación del complejo HbNO como equivalente a la producción de NO, por el método de Espectroscopia de Resonancia Paramagnética (EPR).

El tratamiento crónico de los ratones, cepa CD1 con prolame durante dos semanas incrementó 47% la producción de NO respecto del grupo control; tal aumento fue proporcional a la concentración del complejo HBNO, medido por el método de EPR. La producción de NO en los ratones tratados con el inhibidor L-NAME fue 77% menor que el grupo tratado con prolame (Fig.12)

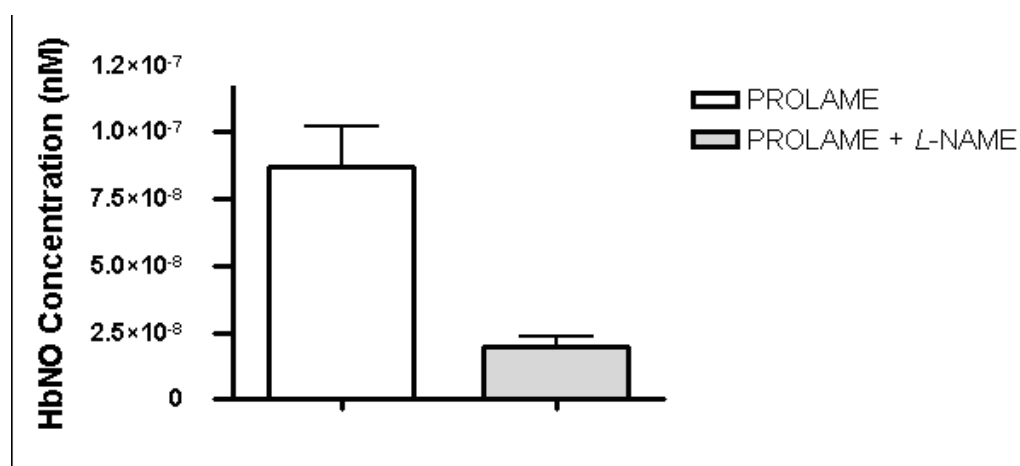
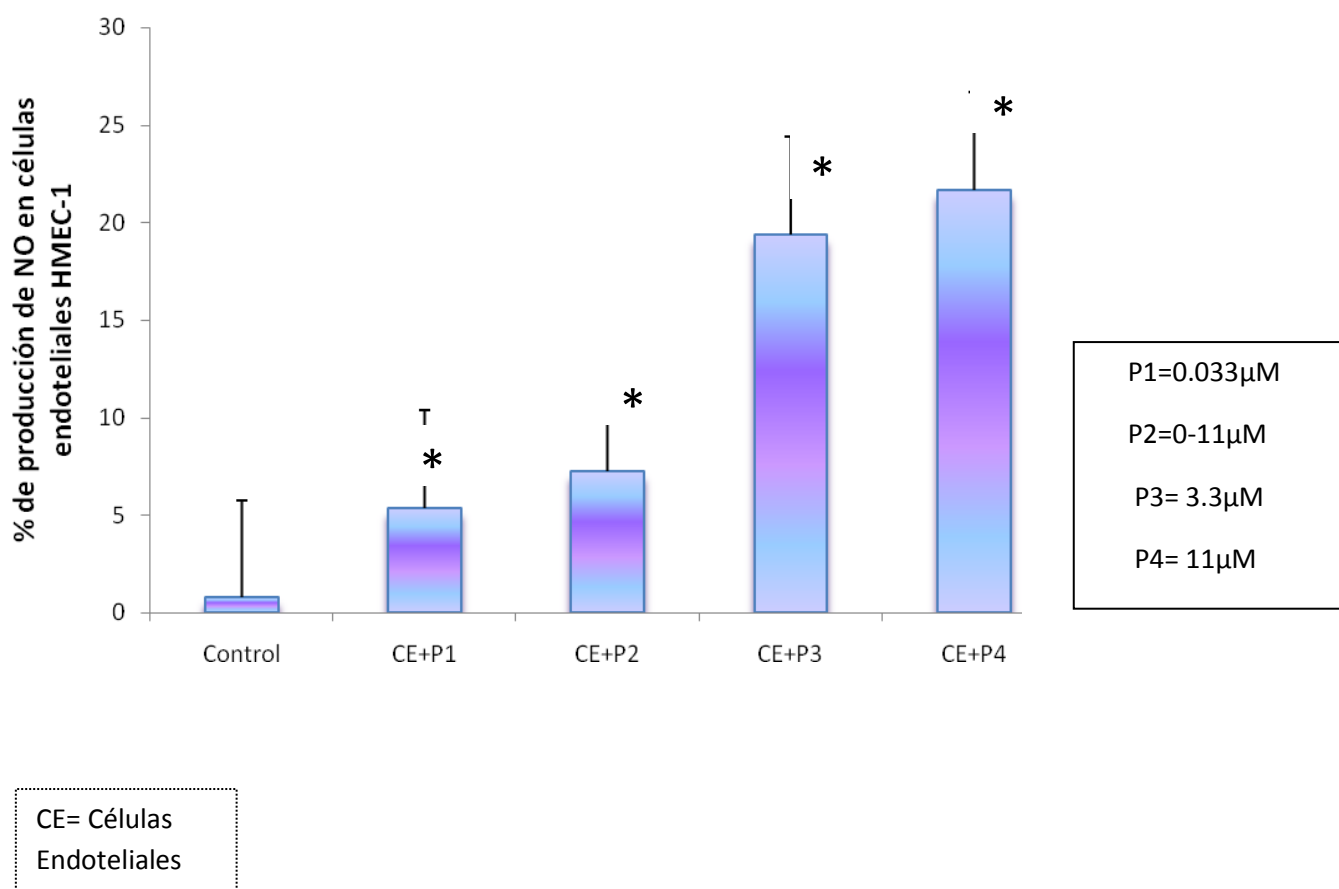


Figura 12. Resultados de la cuantificación del complejo HbNO por el método de Espectroscopia de Resonancia Paramagnética (EPR). Efecto del tratamiento crónico con Prolame y Prolame/L-NAME sobre el complejo HbNO en sangre total de ratones, determinado por EPR mediante un espectrómetro Jeol JES-TE300. Los valores son promedio \pm D.S. (* $p \leq 0.05$).

VIIIb. Efecto del Prolame, un 17β aminoestrógeno, sobre la producción de NO en células endoteliales HMEC-1 y en plaquetas.

El tratamiento de las células endoteliales HMEC-1 y de las plaquetas (Figura 13 A y B) con Prolame aumentó de manera dosis dependiente la producción de NO; y fue estadísticamente significativa. La determinación de NO se realizó por citometria de flujo; el incremento porcentual en la producción de NO por las células endoteliales fue de 96.5% con la concentración más alta de prolame y por las plaquetas 87% con respecto al control en ambos casos.

A)



B)

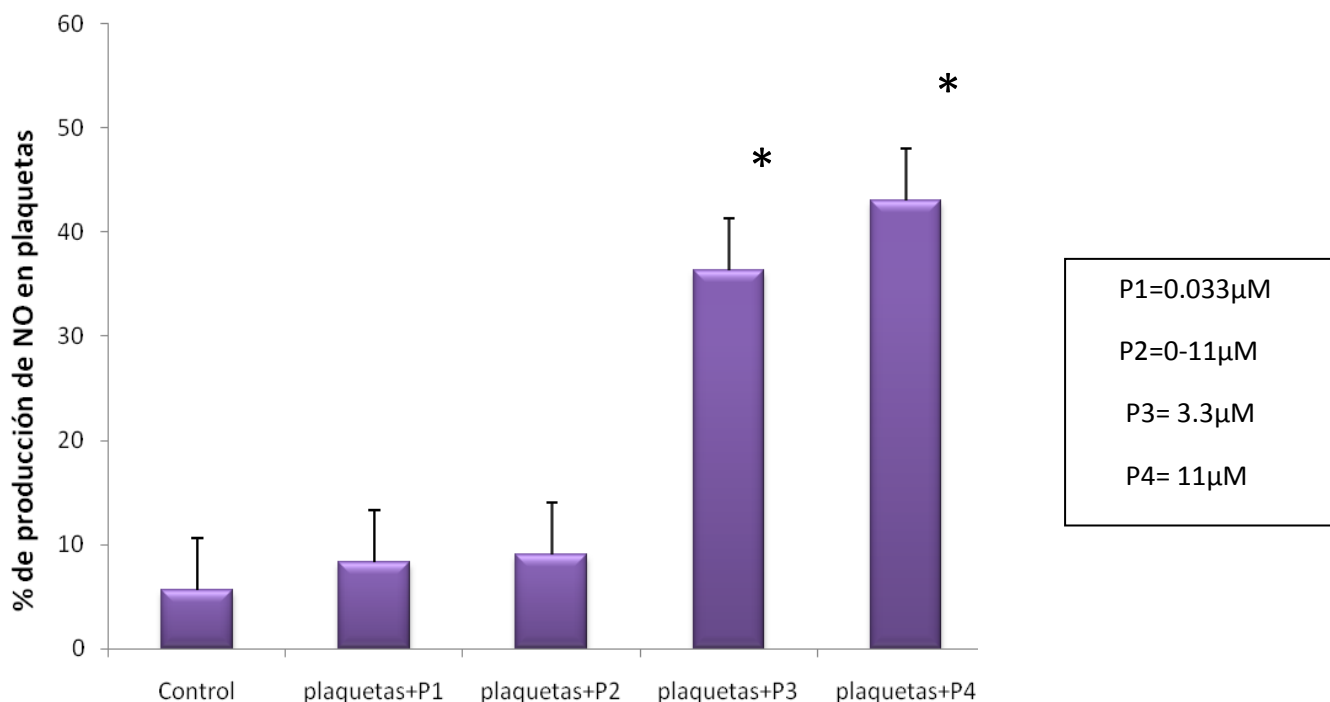
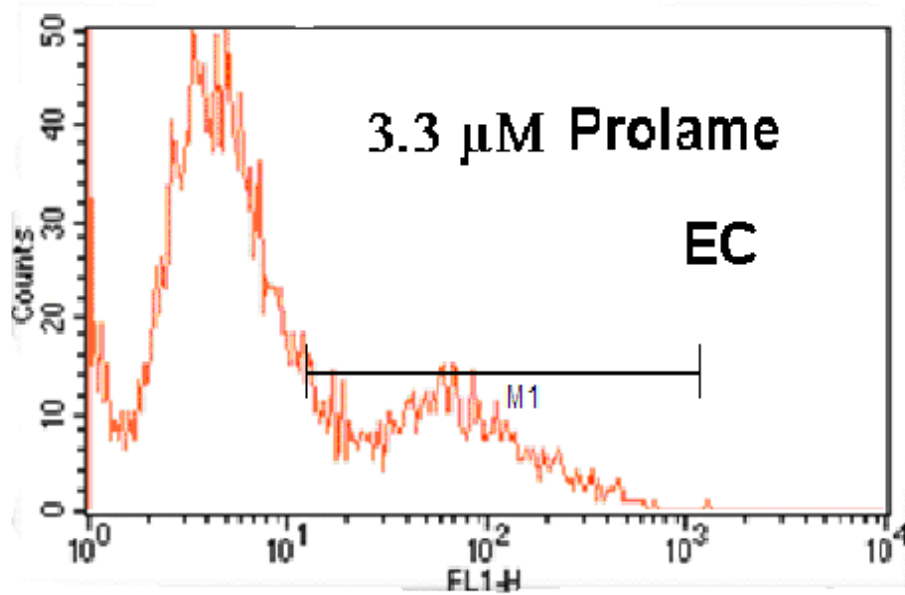


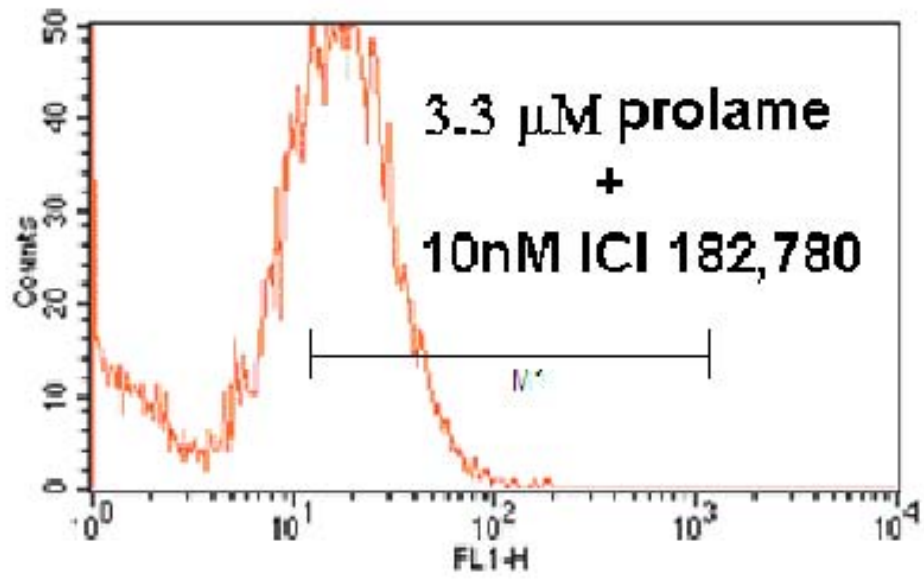
Figura 13. A) Producción de NO por células endoteliales HMEC-1 incubadas con Prolame durante 24 horas. El NO fue determinado por citometría de flujo, utilizando el diacetato de DAF-FM. Se incluyó además un control absoluto (células HMEC-1 sin tratamiento de Prolame). Todos los grupos se conformaron por 10,000 células). **B) Producción de NO en plaquetas.** Producción de NO por las plaquetas incubadas con prolame durante 30 minutos y activadas con 10 μ M de ADP durante 5 minutos. La determinación de NO se realizó utilizando DAF-FM. El grupo control incluyó las plaquetas sin tratamiento de Prolame. Todos los grupos se conformaron por 100,000 plaquetas. En A y en B, los datos muestran la media \pm D.S. ($p \leq 0.05$).

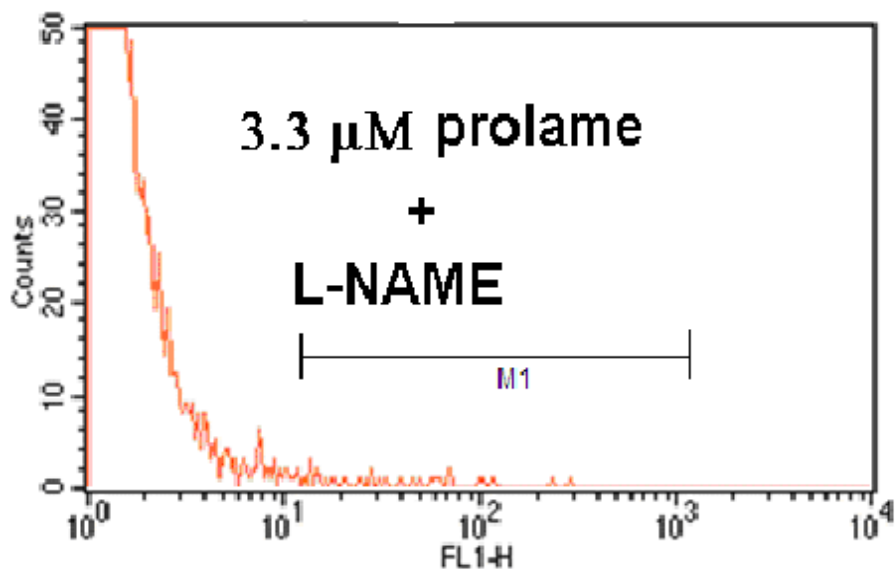
Para explicar la participación de mecanismos genómicos en tal incremento de NO, se indagó si la producción de NO, en las células endoteliales tratadas con prolame 3.3µM/24horas, se modifica en presencia de L-NAME, o de ICI 182,780, un antagonista específico del receptor nuclear de estrógeno (Fig. 14 A, B y C).

A)



B)





C)

Figura 14. Efecto del inhibidor L-NAME y del antagonista ICI 182,780 sobre la producción de NO.

A) Células HMEC-1 tratadas con prolame 3.3 μ M durante 24 horas. En el eje horizontal se representa la intensidad de fluorescencia emitida que es proporcional a las células que sintetizaron NO y en el eje vertical el número de células.

B) Células HMEC-1 incubadas con prolame 3.3 μ M y con el inhibidor del receptor nuclear de estrógenos ICI 182780 (10nM) durante 24 horas. Se puede observar una disminución en el número de células que sintetizaron NO.

C) Células HMEC-1 incubadas con prolame 3.3 μ M y con el inhibidor L-NAME. Se puede observar una disminución mayor en el número de células que sintetizaron NO.

VIIIc. Resultados de la Prueba de Viabilidad Celular.

Porcentaje de viabilidad.

Condición	1er. Ensayo	2°. ensayo	3°. ensayo	4°. Ensayo	Promedio± D.S.
Control	80%	93%	83%	92%	87±6.48
P 0.033µM	75%	100%	80%	93%	87±11.52
P 0.11µM	84%	89%	86%	87%	86±2.081
P 3.3µM	94%	100%	94%	80%	92±8.49
P 11µM	82%	90%	84%	86%	86±3.42

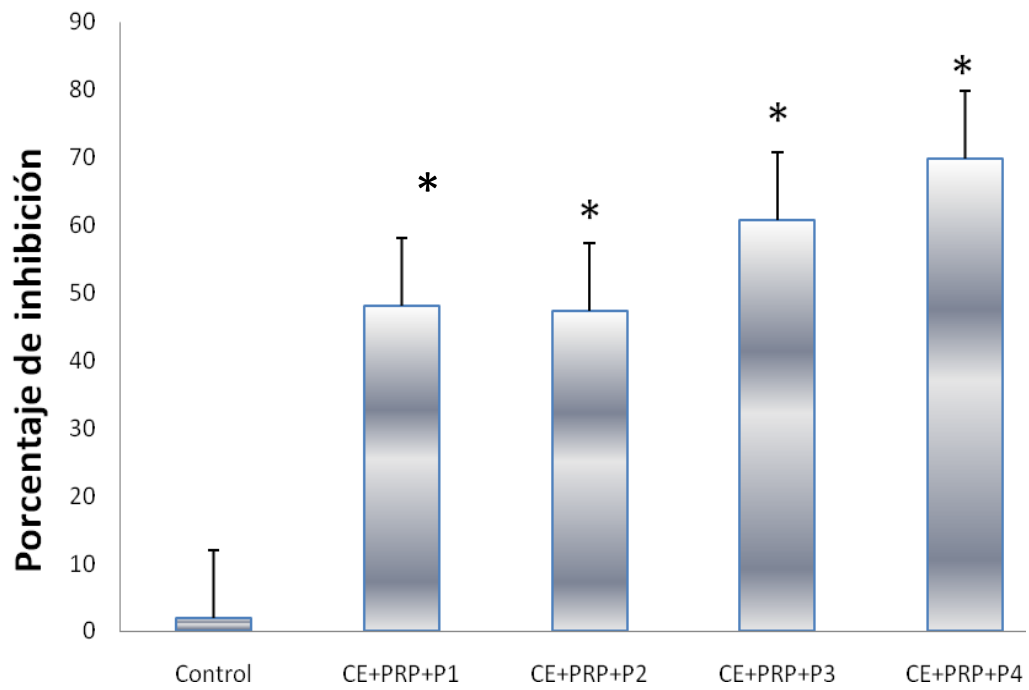
Tabla 1. Efecto de las diferentes concentraciones de prolame sobre los cultivos celulares endoteliales HMEC-1. Se puede observar que no hubo efecto de deterioro celular con cualquiera de las soluciones de prolame.

VIII d. Inhibición de la agregación plaquetaria por suspensiones celulares endoteliales HMEC-1 tratadas con Prolame un 17β aminoestrógeno.

La agregación plaquetaria se inhibió de manera dosis-dependiente en presencia de células endoteliales HMEC-1 tratadas con Prolame (Fig. 15 A). Si bien la dosis máxima del Prolame fue de 11µM, se utilizó una dosis de 125µM únicamente para obtener la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) que fue de 0.019 µM. El Prolame en dosis de 125µM inhibió en 60% la agregación plaquetaria inducida con ADP, se puede observar una primera ola de agregación reversible correspondiente a la liberación de iones Ca⁺⁺; sin embargo, no se produjo una segunda ola de agregación dependiente de secreción del contenido de los gránulos.

15A

Inhibición de la agregación plaquetaria



CE= Células Endoteliales
PRP= Plasma rico en plaquetas

P1= 0.11µM
P2= 3.3µM
P3= 11µM
P4= 125µM

15B

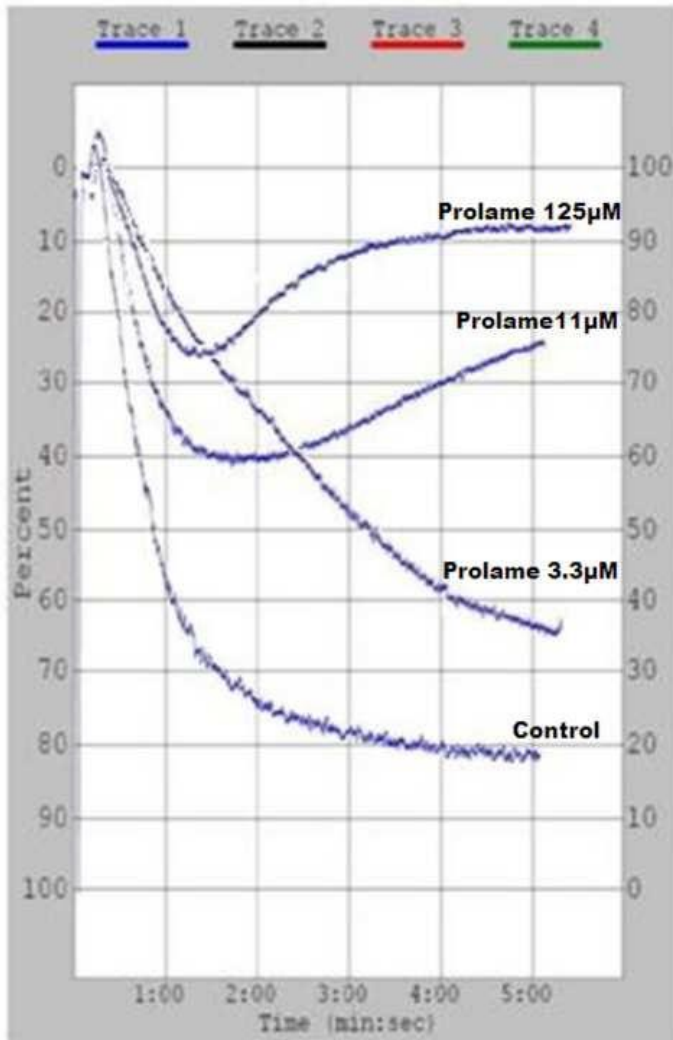


Figura15. A) Inhibición de la agregación plaquetaria por las células endoteliales tratadas con Prolame. Las células fueron tratadas con Prolame (0.1, 3.3, 11 y 125 μM), y la agregación plaquetaria fue inducida con el agonista ADP 10 μM. Los datos muestran valores promedio de inhibición de la agregación plaquetaria ± D.S de varios experimentos. $p \leq 0.05$. B) Trazos representativos de agregación plaquetaria.

VIII. Cuantificación de metabolitos estables de NO por la técnica modificada de Griess.

Las células endoteliales HMEC-1 (1×10^6) tratadas con prolame 125 μ M/ 24 horas) a 37°C, mostraron 1.65 veces de incremento en la producción de metabolitos estables de NO; experimentos similares con células tratadas con L-NAME 100 μ M por 15 minutos mostraron que L-NAME no disminuyó completamente la formación de NO; este efecto fue más evidente cuando las células fueron pretratadas con Prolame (Figura 16).

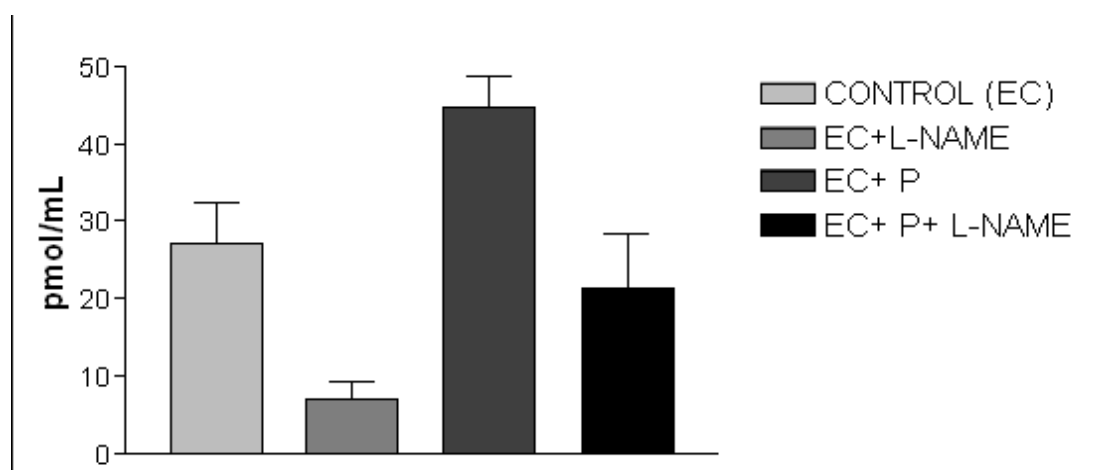


Figura 16. Metabolitos estables de NO en células endoteliales HMEC-1 tratadas con prolame y efecto del inhibidor L-NAME. Los metabolitos estables se cuantificaron por la técnica de Griess con absorbancias de 572 nm a 587 nm. Los datos muestran el promedio media \pm D.S de varios experimentos . ($p \leq 0.05$).

VIII f. Expresión de e-NOS en células endoteliales tratadas con Prolame.

El prolame no indujo significativamente la expresión de eNOS; sin embargo, cuando las células endoteliales HMEC-1 se trataron con 17β estradiol, la expresión de RNAm de eNOS se incrementó significativamente (control positivo). Cuando las células fueron tratadas con el aminoestrógeno prolame la producción se incrementó sólo 37% respecto al control positivo (Fig 17).

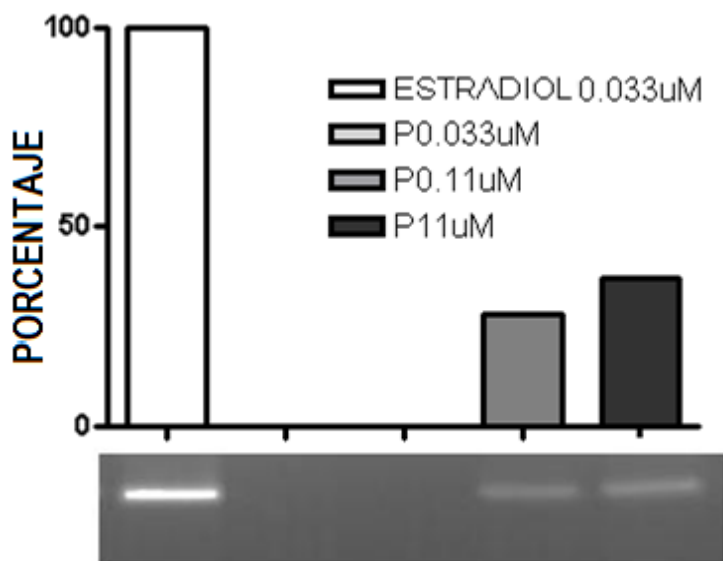
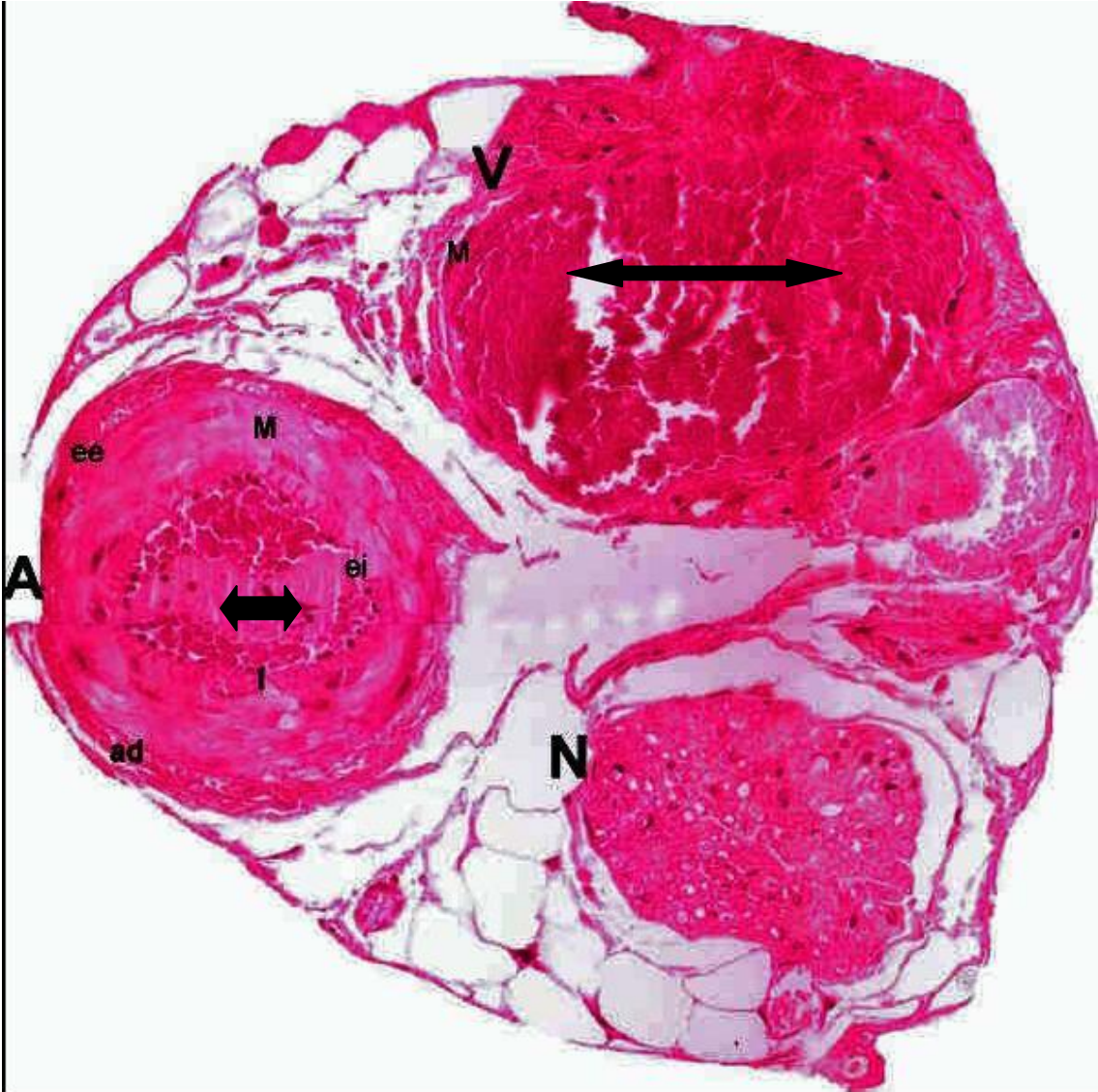


Figura 17. Efecto del tratamiento con Prolame sobre la expresión de RNAm de eNOS. Las células endoteliales HMEC-1 fueron tratadas con Prolame (0.033, 0.11 y 11 μ M) y Estradiol como control positivo. La expresión de eNOS fue significativamente más baja con prolame (11 μ M) que con estradiol: 175 vs 65 de absorbancia de DNAC.

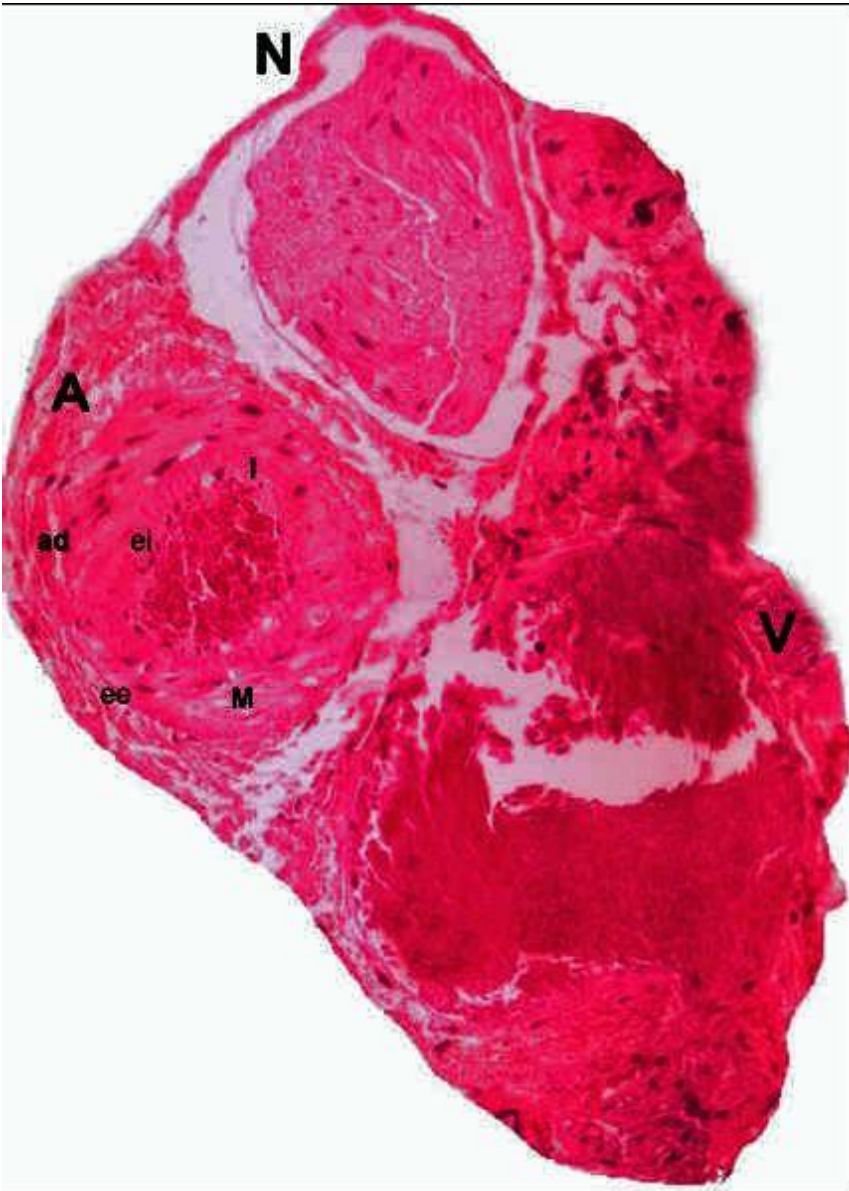
VIIIg. Hallazgos histopatológicos en los ratones sometidos a un reto isquémico en un modelo de trombosis.

En los ratones CD1 tratados con prolame (Figura 18A 18B y 18C) el estudio histopatológico mostró ausencia de trombos en la vena y arteria femorales; por tanto, es evidente el efecto antitrombótico producido por el aminoestrógeno, prolame.

Figura 18. Todas las figuras muestran la sección transversal del paquete vasculonervioso femoral de ratones machos cepa CD1.



18B



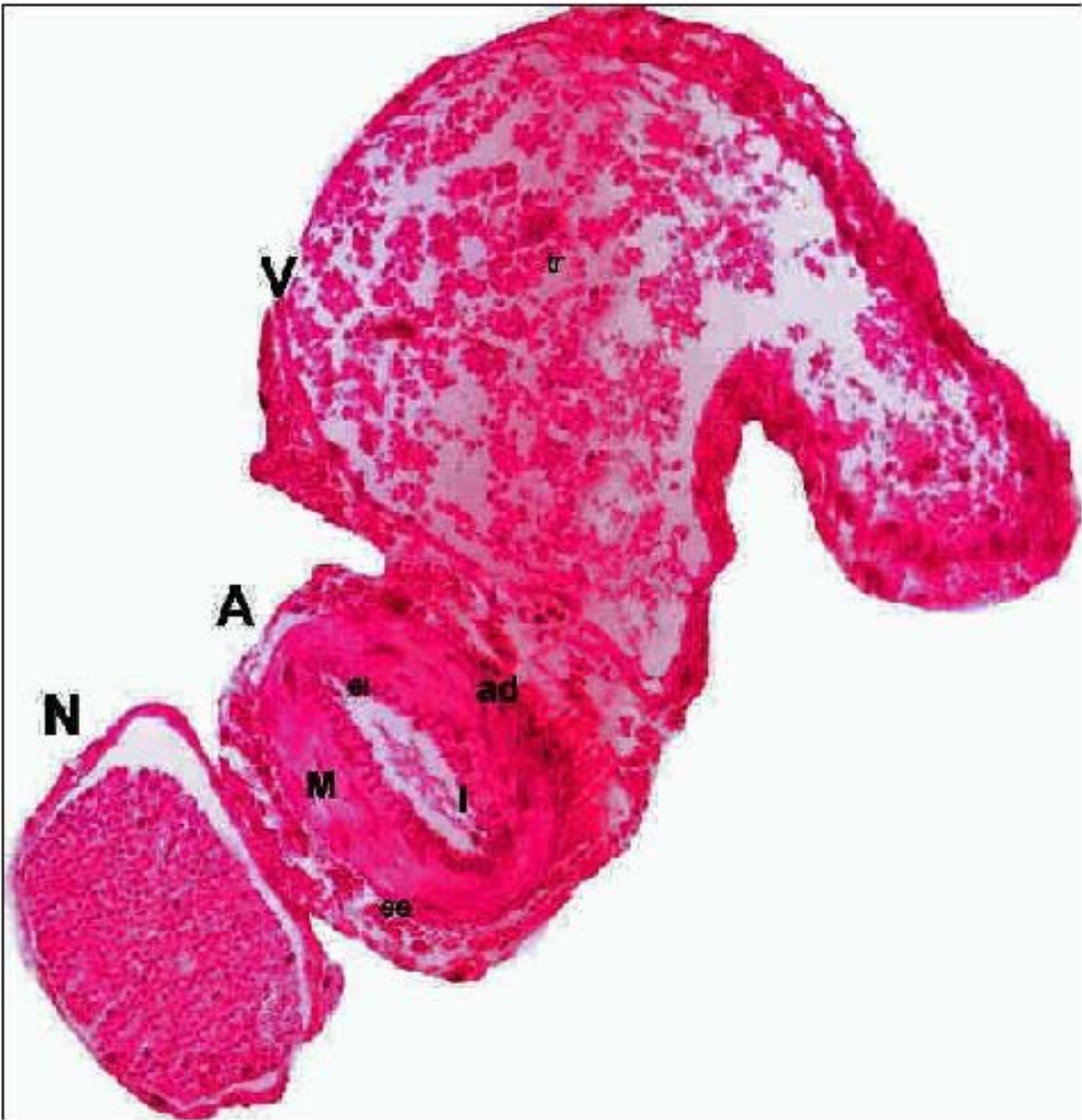


Figura 18. Secciones transversales de los hallazgos histopatológicos en los ratones sometidos a un reto isquémico en un modelo de trombosis.

- A) Sección transversal del paquete vasculo nervioso femoral de los ratones que recibieron el vehículo, de prolame DMSO, 24 horas antes de la inducción de un trombo que se realizó por medio de una técnica quirúrgica. En la figura se puede observar un trombo en la vena y otro fibrinohemático en la arteria femoral; en este la fibrina ocluye aproximadamente el 40% de la luz vascular. El porcentaje de obstrucción se obtuvo a partir del diámetro interno de la arteria que fue de $4,840\mu^2$ y el área del trombo que midió $2,098\mu^2$.
- B) Sección transversal del paquete vasculo nervioso femoral de los ratones que recibieron prolame 3mg/100g de peso corporal 24 horas antes de la inducción de un trombo por medio de una técnica quirúrgica. Se pueden observar trombos en la vena y arteria femorales.
- C) Sección transversal del paquete vasculo nervioso femoral de los ratones que recibieron prolame 10mg/100g de peso corporal, 24 horas antes de la inducción de un trombo por medio de una técnica quirúrgica. Se pueden observar los eritrocitos; la arteria femoral no muestra trombos. (A= arteria; V= vena; N= nervio; M= músculo; I= íntima; ad= adventicia; ei= interna/elastic. H& E stining, magnification 25X).

IX. DISCUSIÓN

El NO es un importante agente vasodilatador y a la vez un inhibidor de la agregación plaquetaria; respecto a esto aún se debate si quien regula la función plaquetaria es el NO derivado del endotelio vascular o el derivado de las plaquetas⁷, el cual se sabe tiene un rol bifásico en la agregación⁸ y la secreción plaquetaria (a bajas concentraciones la estimula y a altas concentraciones, la inhibe).

La NOS de las plaquetas se induce por diversos agonistas como ADP, colágena, trombina y factor de von Willebrand Fig.9. Estos agentes activan vías específicas las cuales convergen en Akt cinasas, un punto común para un mecanismo dual de activación enzimática (fosforilación y Ca^{++} dependiente)⁹. Se ha propuesto que el 17β estradiol estimula la liberación de NO por las células endoteliales humanas, al actuar sobre el receptor para los estrógenos, presente en la superficie celular¹⁰, y también sobre el receptor nuclear¹¹.

Nuestros resultados muestran que el prolame incrementa la producción de NO *in vitro* (Figs. 13 y 14) e *in vivo* (Fig. 12). En particular, es interesante observar que el efecto de inhibición de la agregación plaquetaria es mayor cuando las plaquetas se incubaron con células endoteliales tratadas con prolame, (Fig. 15A) ya que en estudios previos se había informado que el prolame, sin células endoteliales, sólo induce el efecto antiplaquetario en plasma rico en plaquetas, cuando se emplea a concentraciones elevadas como $400\mu\text{M}$ ¹².

En la figura 15B se muestran los trazos de agregación plaquetaria, en donde se muestra una inhibición de la agregación plaquetaria de una manera dosis dependiente, principalmente en la segunda ola de agregación que corresponde a la liberación o secreción del contenido de los gránulos, sustancias procoagulantes como ADP, serotonina y Ca^{2+} que amplifican el estímulo original y que es irreversible en el fenómeno de agregación plaquetaria¹³, esto sugiere que el NO que producen las células endoteliales HMEC-1 tratadas con Prolame sea el responsable de dicho efecto de inhibición de la agregación plaquetaria sumado al efecto sobre las plaquetas..

Los estrógenos producen efectos genómicos y no genómicos sobre células endoteliales, células del músculo liso y la matriz extracelular, efectos que son regulados a través de receptores a estrógenos (subtipos α o β) nucleares o unidos a la membrana¹⁴. Los efectos no genómicos, en respuesta a los estrógenos, no requieren de la transcripción de un gen, sino que bajo el estímulo de los estrógenos se activa la eNOS e incrementa la concentración de NO. En células endoteliales, los estrógenos inducen la activación rápida de eNOS por una vía de señalización c-Src/PI3/Akt¹⁵. Nuestros resultados sugieren que la capacidad de prolame para aumentar el óxido nítrico, no es sólo a través de la activación genómica de eNOS, ya que el inhibidor L-NAME sólo disminuyó parcialmente la producción de NO. (Fig.12 y 16).

Para evaluar la respuesta genómica del prolame, utilizamos un antagonista del receptor nuclear a estrógenos (ICI 182780), el cual produjo una ligera disminución en la producción de NO, quedando un remanente; ello indica que la producción de

NO por Prolame no se debe únicamente al incremento en la expresión de la eNOS como lo muestra los resultados del experimento de RTPCR (Fig. 17, iNOS también puede estimularse indirectamente por activadores como sesquiterpenos, flavonoides, chalconas y algunos esteroides, así como por moléculas que están asociadas con la actividad y expresión del gen GTP ciclohidrolasa 1 (GTPCH-1)¹⁶ .

La evidencia que proporcionamos en este trabajo señala que la producción de NO por células endoteliales y plaqueta regula la función plaquetaria, y así disminuya la generación de un trombo; sin embargo, no pudimos determinar si el efecto observado se debe a la presencia del prolame o a algún metabolito activo del mismo aminoestrógeno, ya que aún no se ha explorado la farmacocinética del compuesto.

Previamente hemos reportado el efecto anticoagulante del prolame en sangre total, persistente hasta 24 horas, dependiendo de la dosis ⁷⁶.

La administración del prolame a concentraciones altas no altera la viabilidad de las células endoteliales. Nosotros proponemos que la síntesis del NO inducida por el prolame, juega un papel importante en el efecto anticoagulante observado en nuestro modelo *in vivo*. En otros trabajos ya reportados se propone que el efecto anticoagulante del prolame es una consecuencia del incremento en la concentración plasmática de fibrinógenos de bajo peso molecular¹⁷ ; sin embargo, nuestros resultados actuales sugieren no atribuir el efecto anticoagulante a tal propuesta.

En resumen, hemos demostramos la habilidad de las plaquetas y de las células endoteliales de incrementar la síntesis de NO. El endotelio bajo el efecto del prolame adquiere un fenotipo antitrombótico. Nuestros datos sugieren que bajo el tratamiento con prolame el aumento en la producción de NO por células endoteliales y plaquetas, más su efecto anticoagulante, superan el efecto trombótico inducido en un modelo murino.

X.CONCLUSIONES.

- **El prolame incrementa la producción de NO en células endoteliales HMEC-1.**

- **El prolame incrementa la producción de NO en plaquetas.**

- **El efecto antiagregante plaquetario del prolame se incrementa en presencia de células endoteliales tratadas con el 17 β aminoestrógeno.**

- **El prolame incrementa la producción de NO en un modelo *in vivo*.**

- **El prolame confiere al endotelio un fenotipo antitrombótico, por su capacidad de inducir la producción de NO.**

XI. BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Bahena Vargas A, Baños de Mc Carthy G, de la Peña Díaz A, Velasco Velázquez MA. Fármacos que modifican la actividad hemostática. En: Campos Sepúlveda AE, Jiménez Orozco FA, Rojas Ramírez JA, eds. Farmacología Médica. 1a. Edición. México: Panamericana, 2008: 501-512.
- ² Larson L. Hemostasia Primaria. Hematología Clínica. 1ª. edición. México: Manual Moderno, 1991: 367-379.
- ³ Garlanda C, Dejana E: Heterogeneity of endothelial cells: specific markers. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1193 -1202.
- ⁴ Domínguez GV, Ambriz FR. Bioquímica y Fisiología Plaquetaria. *Revista de Hematología* 2001; 2: 117-127.
- ⁵ Pabla R, Weyrich AS, Dixon DA: Integrin- dependent control of translation: engagement of integrin α IIb β 3 regulates synthesis of proteins in activated human platelets. *J Cell Biol* 1999; 144: 175-184.
- ⁶ McKenzie SB. Hemostasia Primaria. En: Santos Pérez JA edit. Hematología Clínica. 2ª. Edición. México: Manual Moderno, 2000: 573-600.
- ⁷ Hawiger J. *Methods in Enzymology. Platelets: Receptors, Adhesion, Secretion.* Academic Press, Inc. 1989; 169: 112-122.
- ⁸ Akkerman JWN, Gorter G, Schrama L, Holmsen H: A novel technique for rapid determination of energy consumption in platelets: determination of different energy consumption associated with three secretory responses. *Biochem J* 1983; 210: 145-155.
- ⁹ Karpatkin S, Langer RM: Biochemical energetic of stimulated platelet plug formation : effect of thrombin, adenosine diphosphate, and epinephrine on intra- and extracellular adenine nucleotide kinetics. *J Clin Invest* 1968; 47: 2158-2168.
- ¹⁰ Kroll MH, Schafer AI. *Blood.* Journal of the American Society of Hematology 1989; 74: 1181-1194.
- ¹¹ Bello A. La Hemostasis. Hemorragia y Trombosis. 1ª. edición. México: Prado, 2009: 3-17.

-
- ¹² Roberts HR, Monroe DM, Oliver JA, Chang JY, Hoffman M. News concepts of blood coagulation. *Haemophilia* 1998; 4: 331-334.
- ¹³ MacFarlane RG. An enzyme cascade in blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964; 202: 498-499.
- ¹⁴ Monroe D, Hoffman M, Roberts H. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1381-1389.
- ¹⁵ Collen D. Role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodeling. *Hematology* 2001: 1-9.
- ¹⁶ Collen D, Lijnen HR. Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thrombosis & Hemostasis* 1995; 74: 167-171.
- ¹⁷ Loscalzo J. The macrophage and fibrinolysis. *Seminars in Thrombosis & Hemostasis* 1996; 22: 503-506.
- ¹⁸ Chung SI, Lee SY, Uchino R, Carmassi F. Factors that control extravascular fibrinolysis. *Seminars in thrombosis & Hemostasis* 1996; 22: 479-488.
- ¹⁹ Rankinen T, Vaisanen S, Penttila Y, Rauramaa R. Acute dynamic exercise increases fibrinolytic activity. *Thrombosis & Hemostasis* 1995; 73: 281-286.
- ²⁰ Constantine GD, Picar JH. Estrogens in postmenopausal women: recent insights. *Current Opinion in Pharmacology* 2003; 3: 626-634.
- ²¹ Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators: Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288: 321-333.
- ²² Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 1998; 280:605-613.
- ²³ Vickers MR, McLennan AH, Lawton B, Ford D, Martin J, Meredith SK, DeStavola BL, Rose S, Dowell A, Wilkes HC, Darbyshire JH, Meade TW and WISDOM group. Main morbidities recorded in the women's international study of long duration oestrogen after menopause (WISDOM): a randomized controlled trial of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *BMJ* 2007; 335:239-244.

²⁴ Martinelli I, Taioli E, Buciarelli P, Akhavan S, Manucci PM. Interaction between the G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 700-703.

²⁵ Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein resistance). *Blood* 1995; 85: 1504-1508.

²⁶ Rosendaal FR, Helmerhost FM, Vandenbroucke JP. Oral contraceptives hormone replacement therapy and thrombosis. *Thromb Haemost* 2001; 86: 112-123.

²⁷ Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-258.

²⁸ Roderberg AD, Chaet SM, Bass CR, Arkovitz SM, Garcia FV. Nitric oxide: An overview. *Am J Surgery* 1995; 170: 292-299.

²⁹ Gartwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 683-706.

³⁰ Arzumanyan V, Stankevicius E, Laukeviciene A, Kevelaitis E. Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cell. *Medicine* 2003; 39: 535-541.

³¹ Smidt HH, Warner TD, Ishii K, Sheng H, Murad F. Insulin secretion from β -pancreatic cells caused by L-arginine-derived nitric oxide. *Science* 1992; 258: 1376-1378.

³² Atz AM, Lefler AK, Fairbrother DL, Uber WE, Bradley SM. Sildenafil augments the effect of inhaled nitric oxide for postoperative pulmonary hypertensive crises. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 2002; 124: 628-629.

³³ Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268: 12231-12234.

³⁴ Nishida CR, Ortiz de Montellano PR. Autoinhibition of endothelial nitric oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *J Biol Chem* 1999; 274: 14692-14698.

³⁵ Lane P, Gross SS. Disabling a C-terminal autoinhibitory control element in endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylation provides a molecular explanation for activation of vascular NO synthesis by diverse physiological stimuli. *J Biol Chem* 2002; 277: 19087-19094.

³⁶ Moncada S, Higgs EA. Nitric Oxide and the Vascular Endothelium. *HEP* 2006; 42: 213-254.

³⁷ Sharpe MA, Ollosson R, Stewart VC, Clark JB. Oxidation of nitric oxide by oxomanganese-salen complexes: a new mechanism for cellular protection by superoxide dismutase/catalase mimetics. *Biochem J* 2002; 366: 97-107.

³⁸ Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.

³⁹ Stan Kevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen V. Fiziologinis azoto oksido, ir kitu endotelio išskiriamu faktoriu vaidmuo. (Physiological roles of nitric oxide and other endothelium-derived factors) *Medicina (Kaunas)* 2003; 39: 333-341.

⁴⁰ Miyazaki-Akita A, Hayashi T, Ding QF. 17beta-estradiol antagonizes the down-regulation of endothelial nitric-oxide synthase and GTP cyclohydrolase 1 by high

glucose: relevance to postmenopausal diabetic cardiovascular disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320: 591-598.

⁴¹ Stankevicius E, Martinez AC, Mulvany MJ, Simonsen U. Blunted acetylcholine relaxation and nitric oxide release in arteries from renal hypertensive rats. *J Hypertension* 2002;20:1571-1579.

⁴² Tiefenbacher CP, Am J. Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction? *Heart Circ Physiol* 2001; 6: H2484-H2488.

⁴³ Falkenstein E, Tillmann H C, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 513-556.

⁴⁴ Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007; 87: 905-931.

⁴⁵ Doolan CM, Harvey BJ. A G protein-coupled membrane receptor, distinct from the classical oestrogen receptor, transduces rapid effects of oestradiol on $[Ca^{2+}]_i$ in female rat distal colon. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 199: 87-103.

⁴⁶ Farhar MY, Lavigne MC, RamwellPW. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J* 1996; 10: 615-624.

⁴⁷ Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.

⁴⁸ Karamsetty MR, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 1995; 360: 291-293.

⁴⁹ MacRitchie AN, Jun SS, Chen Z, German Z, Yuhanna IS, Sherman TS, Shaul PW. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circ Res* 1997; 81: 355-362.

⁵⁰ Wehling M. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 365-393.

⁵¹ Chambliss KL, Yuhanna IS, Mineo C, Liu P, German Z, Sherman TS, Mendelsohn ME, Anderson RG, Shaul PW. Estrogen receptor α and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ Res* 2000; 87: E44-E52.

-
- ⁵² Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil D, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 2000; 407: 538-541.
- ⁵³ Li L, Hisamoto K, Kim KH, Haynes MP, Bauer PM, Sanjay A, Colling M, Baron E, Sessa WC, Bender JR. Variant estrogen receptor-c- Src molecular interdependence and c- Src structural requirements for endothelial NO synthase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 16468-16473.
- ⁵⁴ Vasudevan N, Pfaff DW. Membrane-initiated actions of estrogen in neuroendocrinology: emerging principles. *Endocr Rev* 2007; 28:1-19.
- ⁵⁵ Naseem KM, Riba R. Unresolved roles of platelet nitric oxide synthase. *J Thromb Haemost* 2008; 6:10-19.
- ⁵⁶ Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998; 91: 2645-2657.
- ⁵⁷ Reed GL, Fitzgerald ML, Polgar J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood* 2000; 96: 3334-3342.
- ⁵⁸ Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2: 1057-1058.
- ⁵⁹ Prónai L, Ichimori K, Nozaki H, Nakazawa H, Okino H, Carmichael AJ, Arroyo CM. Investigation of the existence and biological role of L-arginine/nitric oxide pathway in human platelets by spin trapping EPR. *Eur J Biochem* 1991; 202: 923-930.
- ⁶⁰ Sase K, Michel T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci* 1995; 57: 2049-2055.
- ⁶¹ Marjanovic JA, Stojanovic A, Brovkovich VM, Skidgel RA, Du X. Signaling-mediated Functional Activation of inducible Nitric-oxide Synthase and Its Role in Stimulating Platelet Activation. *J Biol Chem* 2008; 283: 28827-28834.
- ⁶² Ts'ao CH: Rough endoplasmic reticulum and ribosomes in blood platelet. *Scand J Haematol* 1971; 8: 134-140.
- ⁶³ Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 1995; 125: 370-377.
- ⁶⁴ Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5193-5197.

-
- ⁶⁵ Marjanovic JA, Li Z, Stojanovic A, Du X. Stimulatory roles of nitric oxide synthase 3 and guanylyl cyclase in platelet activation. *J Biol Chem* 2005; 280: 37430-37438.
- ⁶⁶ Li Z, Ajdic J, Eigenthaler M, Du X. A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans. *Blood* 2003; 101: 4423-4429.
- ⁶⁷ Li Z, Zhang G, Le Breton GC, Gao X, Malik AB, Du X. Two waves of platelet secretion induced by thromboxane A₂ receptor and a critical role for phosphoinositide 3-kinases. *J Biol Chem* 2003; 278: 30725-30731.
- ⁶⁸ Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signaling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 657-664.
- ⁶⁹ Woulfe D, Jiang H, Morgans A, Monks R, Birnbaum M, Brass LF. Defects in secretion, aggregation and thrombus formation in platelets from mice lacking Akt2. *J Clin Invest* 2004; 113: 441-450.
- ⁷⁰ Chen J, De S, Damron D, Chen WS, Hay N, Byzova TV. Impaired platelet response to thrombin and collagen in Akt-1 deficient mice. *Blood* 2004; 104: 1703-1710.
- ⁷¹ Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-1 dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399: 601-605.
- ⁷² Nakano Y, Oshima T, Matsura H, Kajiyama G, Kambe M. Effect of 17 β -Estradiol on Inhibition of Platelet Aggregation In Vitro is Mediated by an Increase in NO Synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 961-967.
- ⁷³ Fernández-G JM, Rubio-Arroyo MF, Rubio-Poo C, de la Peña A. Palladium (II) and Platinum (II) dichloro complexes containing diamine-estrone derivatives. *MONATSH CHEM* 1983; 114: 535.
- ⁷⁴ Rubio-Poo C, Mandoki JJ, Jaimez V, Mendoza-Patiño N, Alvarado C, Silva G, Zavala E, Fernandez Gonzalez JM, Rubio-Arroyo M. Prodiame: a new estrogen with sustained anticoagulant effect. *Proc West Pharmacol Soc.* 1983; 26: 111-113.
- ⁷⁵ Rubio-Poo C, Mandoki JJ, Mendoza Patiño N, Lemini C, de la Peña A, Cruz F, Zavala E, Silva G and García-Mondragón J. The anticoagulant effect of Prolame, N-(3-hidroxi-1,3,5 (10) estratrien-17 β -il)-3 hidroxipropilamina. *Steroids* 1985; 45: 159-169.

-
- ⁷⁶ Li C, Franco Y, Avila ME, Jaimez R. Contrasting effects of estradiol and 17 β aminoestrogens on blood clotting time in rats and mice. *Eur J Pharmacol.* 2002; 510: 235-239.
- ⁷⁷ Lemini C, Franco Y, Avila ME, Jaimez R. Estrogenic effects of 17 β aminoestrogens assessed in uteri of rats and mice. *Eur J Pharmacol* 2005; 510: 235-239.
- ⁷⁸ Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawlwy TJ. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 683-690.
- ⁷⁹ Marcus AJ, Safier LB, Hajjar KA, Ullman HL, Islam N, Broekman MJ, Eir AM. Inhibition of Platelet Function by an Aspirin-insensitive Endothelial Cell ADPase. *J Clin Invest* 1991;88:1690-1696.
- ⁸⁰ Tenorio-L FA, del Valle-M L, Pastelin-H G. Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en fluidos biológicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 2005; 36: 31-41.
- ⁸¹ Day SM, Reeve JL, Myers DD, Fay WP. Murine thrombosis models. *Thromb Haemost* 2004; 92: 486-494.
- ⁸² Tsuchiya K, Kirima K, Yoshizumi M, Tamaki T. New methods to evaluate endothelial function: Evaluation of endothelial function by hemoglobin-nitric oxide complex using electron paramagnetic resonant spectroscopy. *J Pharmacol Sci* 2003; 93: 417-422.
- ⁸³ Ferreiro CR, Chagas AC, Carvalho MH, Dantas AP, Scavone C, Souza LC, Buffolo E, da Luz PL. Expression of inducible nitric oxide synthase is increased in patients with heart failure due to ischemic disease. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1313-1320.
- ⁸⁴ Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest* 1997; 100: 350-356.
- ⁸⁵ Marjanovic JA, Li Z, Stojanovic A, Du X. Stimulatory roles of nitric-oxide synthase 3 and guanylyl ciclase in platelet activation. *J Biol Chem* 2005; 280: 37430-37438.
- ⁸⁶ Naseem KM, Riba R. Unresolved roles of platelet nitric oxide synthase. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 10-19.

⁸⁷ Guetta V, Quyyumi AA, Prasad A, Panza JA, Waclawiw M, Cannon RO 3rd. The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation* 1997; 96: 2795-2801.

⁸⁸ Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Kuzuya M, Satake S, Ishikawa T. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214: 847-855.

⁸⁹ De la Peña A, Baños G, Izaguirre R, Mandoki JJ, Fernández-G JM. Comparative effect of synthetic amino-estrogens with estradiol on platelet aggregation. *Steroids* 1993; 58: 407-409.

⁹⁰ Satya PK, James LD. P₂ receptor subtypes in the cardiovascular system. *Eur J Biochem* 1998; 336: 513-526.

⁹¹ Serock MR, Wells AK, Khalil RA. Modulators of vascular sex hormone receptors and their effects in estrogen-deficiency states associated with menopause. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.* 2008; 3: 165-186.

⁹² Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5930-5935.

⁹³ Mizayaki-Akita A, Hayashi T, Ding QF, Shiraishi H, Nomura T, Hattori. 17beta-estradiol antagonizes the down-regulation of endothelial nitric-oxide synthase and GTP cyclohydrolase 1 by high glucose: relevance to postmenopausal diabetic cardiovascular disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320: 591-598.

⁹⁴ García-Manzano A, González-Llaven J, Jaimez R, et al. Changes on hemostatic parameters induced by 17beta-estradiol, ethinylestradiol, and the 17beta-aminoestrogen pentolame in the male Wistar rat. *Steroids* 2002; 67: 1129-1135.

ANEXO.

Curva de Calibración de Nitratos

Curva patrón 1

[Nitrate](μM)	$\Delta\text{Abs 1}$	$\Delta\text{Abs 2}$	$\Delta\text{Abs 3}$	$\Delta\text{Abs Prom}$	Sx	Error Std	CV (%)	r	r ²	$\Delta\text{Abs} = (\text{Abs } 572 \text{ nm}) - (\text{Abs } 587 \text{ nm})$
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00000	0,00000	---	0,997470516	0,994947431	
5	0,0042	0,0043	0,0043	0,0043	0,00006	0,00003	1,4			
10	0,0062	0,0065	0,0065	0,0064	0,00017	0,00010	2,7			
20	0,0129	0,0129	0,0129	0,0129	0,00000	0,00000	0,0			
40	0,0233	0,0232	0,0232	0,0232	0,00006	0,00003	0,2			

Curva patrón 2

[Nitrate](μM)	$\Delta\text{Abs 1}$	$\Delta\text{Abs 2}$	$\Delta\text{Abs 3}$	$\Delta\text{Abs Prom}$	Sx	Error Std	CV (%)	r	r ²	$\Delta\text{Abs} = (\text{Abs } 572 \text{ nm}) - (\text{Abs } 587 \text{ nm})$
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00000	0,00000	---	0,998149319	0,996302064	
5	0,0038	0,0038	0,0037	0,0038	0,00006	0,00003	1,5			
10	0,0065	0,0065	0,0065	0,0065	0,00000	0,00000	0,0			
20	0,0135	0,0134	0,0134	0,0134	0,00006	0,00003	0,4			
40	0,0240	0,0241	0,0242	0,0241	0,00010	0,00006	0,4			

Curva patrón 3

[Nitrate](μM)	$\Delta\text{Abs 1}$	$\Delta\text{Abs 2}$	$\Delta\text{Abs 3}$	$\Delta\text{Abs Prom}$	Sx	Error Std	CV (%)	r	r ²	$\Delta\text{Abs} = (\text{Abs } 572 \text{ nm}) - (\text{Abs } 587 \text{ nm})$
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00000	0,00000	---	0,997389509	0,994785832	
5	0,0039	0,0039	0,0040	0,0039	0,00006	0,00003	1,5			
10	0,0068	0,0068	0,0067	0,0068	0,00010	0,00006	1,5			
20	0,0113	0,0112	0,0111	0,0112	0,00010	0,00006	0,9			
40	0,0244	0,0242	0,0242	0,0243	0,00012	0,00007	0,5			

Curva patrón promedio

[Nitrate](μM)	$\Delta\text{Abs Prom 1}$	$\Delta\text{Abs Prom 2}$	$\Delta\text{Abs Prom 3}$	$\Delta\text{Abs Prom P}$	Sx	Error Std	CV (%)	r	r ²	m	b
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00000	0,00000	---	0,999059102	0,998119089	0,000587	0,000595
5	0,0043	0,0038	0,0039	0,0040	0,00025	0,00015	6,4				
10	0,0064	0,0065	0,0068	0,0066	0,00021	0,00012	3,2				
20	0,0129	0,0134	0,0112	0,0125	0,00117	0,00067	9,3				
40	0,0232	0,0241	0,0243	0,0239	0,00055	0,00032	2,3				

$y = mx + b$

$[\text{NO}](\mu\text{M}) = (\Delta\text{Abs} - 0,000595) / (0,000587)$

Curva estándar de nitratos

[Nitrate](μM)	$\Delta\text{Abs Prom}$	Error Std
0	0,0000	0,00000
5	0,0040	0,00015
10	0,0066	0,00012
20	0,0125	0,00067
40	0,0239	0,00032

Cálculos de conversión por factores de disgregación de solvato

$[\text{NO}](\text{pmoles/mL}) = [\text{NO}](\mu\text{M}) \times \text{FD}$
 $\text{FD} = 45,971978 \text{ pmoles}/\mu\text{M}^1 \text{ mL}^{-1}$
 $\text{FD} = \left[\frac{[\text{V}^{5+}]}{[\text{V}^{5+}]} \times \frac{[\text{V}^{5+}]}{[\text{SNA}]} \right] \times \left[\frac{[\text{NO}]}{F_{\text{el}}}\right]_{\text{solvato}}$
 $\text{VM} = \text{Volumen de muestra problema (mL)}$
 $\text{VT} = \text{Volumen total de lectura (mL)}$
 $\text{VD} = \text{Volumen de reactivos (mL)}$
 $[\text{V}^{5+}] = \text{Concentración de vanadio (pmoles/mL)}$
 $[\text{SNA}] = \text{Concentración de sulfanilamida (pmoles/mL)}$
 $[\text{NED}] = \text{Concentración de naftiletildiamina (pmoles/mL)}$
 $[\text{NO}]_e = \text{NO equivalente en Red-Ox del solvato (pmoles/mL)}$
 $F_{\text{el}} = \text{Cte de electrosovolatación libre (eq/mL solvato)}[\mu\text{M}/\text{eq soluto}](e)$
 $[\text{NO}](\text{pmoles/mL}) = (\Delta\text{Abs}) / (47250 \text{ pmoles/mL})$

