



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIAGREGANTE PLAQUETARIO DE UN NUEVO
ESTRÓGENO SUBSTITUIDO EN LA POSICIÓN 17- β (N[3-
HIDROXIESTRA1:3:5(10)-TRIEEN-17 β -IL]-4-(2-AMINOETIL)-FENOL. (TIRAME)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ROBERTO MARÍN OCAMPO

MÉXICO, D.F, AÑO 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Rosalinda Velázquez Salgado

VOCAL: Natividad García Escamilla

SECRETARIO: Aurora de la Peña Díaz

1^{er} SUPLENTE: Laura Carmona Salazar

2^o SUPLENTE: Araceli Mendieta Rergis

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: LABORATORIO DE TROMBOSIS Y FIBRINOLÍISIS, INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ, EN LA CIUDAD DE MÉXICO, D.F.

ASESOR DEL TEMA: AURORA DE LA PEÑA DÍAZ

SUPERVISOR TÉCNICO: MIRTHALA FLORES GARCÍA

SUSTENTANTE: ROBERTO MARÍN OCAMPO

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	5
	a. Hemostasia.....	5
	b. Fisiología plaquetaria.....	11
	c. Fases de activación de la plaqueta.....	18
	d. Técnicas para medir la función plaquetaria.....	20
	e. Estrógenos.....	26
	f. El efecto protector de los estrógenos en el sistema cardiovascular.....	31
	g. Estrógenos y trombosis.....	32
II.	JUSTIFICACIÓN.....	33
III.	HIPÓTESIS.....	34
IV.	OBJETIVO GENERAL.....	34
V.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
	a. Equipo.....	34
	b. Material adicional.....	35
	c. Reactivos.....	35
	d. Condiciones preanalíticas.....	36
	e. Obtención de la muestra.....	36
	f. Agregación plaquetaria.....	36
	g. Método de impedancia.....	37
VII.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	39
VIII.	RESULTADOS.....	40
	a. Determinación de la activación plaquetaria.....	40
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	44
X.	CONCLUSIONES.....	45
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	45
XII.	APÉNDICE.....	53

ABREVIATURAS

μ : Micras

μ L: Microlitros

ADP: Adenosin difosfato

AINES: Antinflamatorios no esteroideos

ALT : Agregometría plaquetaria por la transmisión de la luz

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

CAPM: Cininógeno de alto peso molecular

COX: Ciclooxygenasa

DAG: Diacilglicerol

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DS: Desviación estándar

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

ERE: Elementos de respuesta a estrógenos

fL: femtolitro

FOS: Proteína codificada en humanos para el el gen fos

FP4: factor plaquetario 4

FT: Factor tisular

GP: Glicoproteína

IC 50: Concentración inhibitoria 50%

ICAM-4: Molécula de adhesión intercelular 4

IP3: Trifosfato de inositol

IVFT: Inhibidor fisiológico de la vía del factor tisular

M: Molaridad

MYC: Gen de la familia de protoongenes

PAF: Factor de activación plaquetaria

PAI: Inhibidor del activador del plasminógeno

PDGF: factor de crecimiento producido por las plaquetas

PGI₂: Prostaciclina I₂

PK-C: Proteincinasa C

PPP: Plasma pobre en plaquetas

PRP: Plasma rico en plaquetas

TAFI: Inhibidor fibrinolítico dependiente de la trombina

TG- β : Factor de crecimiento transformante β

TXA2: Tromboxano A2

vWF: factor de von Willebrand

I. INTRODUCCIÓN

El siguiente trabajo de tesis pretende resaltar la importancia de contar con medicamentos a base de estrógenos que no incrementen los eventos trombóticos, como se reporta en pacientes que emplean fármacos anticonceptivos o de reemplazo hormonal, ya que al reducir la actividad de las plaquetas se convierte en un mecanismo que disminuye la formación de coágulos y podría ser una alternativa terapéutica en estos casos.

Por lo que en este trabajo se justificará el papel de las plaquetas en la hemostasia, así como una breve descripción de los estrógenos.

El objetivo principal es evaluar mediante pruebas de agregación plaquetaria e impedancia al compuesto estrogénico 17- β (N[3-hidroxiestra-1:3:5(10)-trien-17 β -il]-4-(2-aminoetil)-fenol (Tirame).

a) Hemostasia

La hemostasia es un sistema biológico de defensa, donde intervienen múltiples elementos celulares y plasmáticos para obturar lesiones y mantener la sangre líquida en los vasos sanguíneos. Cuando hay una lesión en el endotelio vascular se inicia una serie de mecanismos para formar un tapón plaquetario y posteriormente la formación de un coágulo de fibrina insoluble.¹ Las características de la coagulación sanguínea requieren que las reacciones sean localizadas, amplificadas, reguladas, autolimitadas y transitorias en el tiempo.²

La coagulación sanguínea consiste en una serie de reacciones que finalizan con la formación de trombina, enzima proteolítica con la capacidad de transformar fibrinógeno a fibrina.

En la actualidad se conoce la importancia que tienen las superficies de las células (plaquetas, células endoteliales, fibroblastos y monocitos) en la coagulación sanguínea.

Las plaquetas poseen dos papeles básicos en la hemostasia normal:

- 1) Proporcionar los factores de la coagulación que no estén en plasma normal.
- 2) Facilitar una superficie para el ensamblaje de los complejos enzima/cofactor y su interacción con los sustratos para formar el coágulo de fibrina.

En esta interacción dinámica entre proteínas y células se genera un mecanismo de amplificación, con el objeto de formar el coágulo de fibrina y detener la extravasación de la sangre. Además este mecanismo de amplificación es controlado por un sistema fisiológico de regulación antitrombótica que involucra la participación de diversas proteínas con funciones complejas y específicas como: proteína C, proteína S, cofactor II de la heparina y más recientemente descritos, el inhibidor fisiológico de la vía del factor tisular (IVFT), la proteína Z, el inhibidor fibrinolítico dependiente de la trombina (TAFI) y las anexinas. Además de la importante participación del sistema de fibrinólisis cuya función es la de regular la formación de la fibrina.^{2,3}

En términos generales la hemostasia, se divide en las siguientes fases: fase vascular, hemostasia primaria, fase plasmática de la coagulación, regulación antitrombótica y sistema fibrinolítico.⁴

1. Fase vascular: Cuando un vaso sanguíneo se encuentra lesionado se inicia el mecanismo hemostático, es decir la vasoconstricción. La pared del vaso sanguíneo está constituida por tres capas concéntricas de un tejido llamado túnica.

El endotelio vascular está ubicado en una situación estratégica que puede funcionar como receptor, transmisor de señales metabólicas y lleva a cabo estas funciones:

- Apoptosis
 - Transferencia de sustancias metabólicas entre la sangre circulante y los tejidos
 - Metaboliza mediadores que regulan la interacción entre la pared vascular y los componentes de la sangre, por ejemplo el factor VIII/vW, la fibronectina, la colágena, los proteoglicanos y mediadores lábiles del tono vascular
 - Impide la formación de coágulo.
 - Integra los procesos vasculares de reparación como la migración y proliferación celular
 - Participa en la inmunidad celular.^{5,6}
2. Hemostasia primaria: Consiste en la interacción de la plaqueta con el vaso sanguíneo. Las plaquetas activadas se adhieren al endotelio, liberan de sus gránulos intracelulares agonistas que reclutan más plaquetas y forman un agregado plaquetario.⁷
3. Fase plasmática de la coagulación: Participan los factores de coagulación y elementos celulares. Esta fase se caracteriza por la formación del coágulo de fibrina. El proceso se inicia con la conversión del fibrinógeno a fibrina por la acción de la trombina, formándose monómeros de fibrina.¹

Existen diferentes modelos de coagulación sanguínea, hasta hace una década estuvo vigente el que divide a la coagulación en dos vías: la vía intrínseca y vía extrínseca.

En 1964 dos grupos concluyeron que la coagulación es un proceso enzimático en cascada. Cada factor de coagulación se transforma de proenzimas a enzimas activas, lo cual proporciona un carácter autocatalítico del proceso de manera limitada.

La vía intrínseca inicia la coagulación con el daño vascular y la interacción de superficies cargadas negativamente con tres proteínas plasmáticas: FXII, PK y CAPM y, la vía extrínseca que consiste de FVIIA Y FT, el último de origen extrínseco a la circulación sanguínea. Ambas vías de la coagulación convergen en la vía común y la activación al FX, que junto con el FVa convierte a la protrombina en trombina.⁸ (Figura 1).

Este modelo tiene vigencia para interpretar las pruebas de coagulación en el laboratorio de hemostasia, aunque fisiológicamente no ocurren los eventos como lo plantea el modelo.

Actualmente se emplea un modelo celular en el que se plantea que las reacciones ocurren simultáneamente sobre una superficie, que puede ser fosfolípidos celulares principalmente de plaquetas o sobre la fibrina.⁹

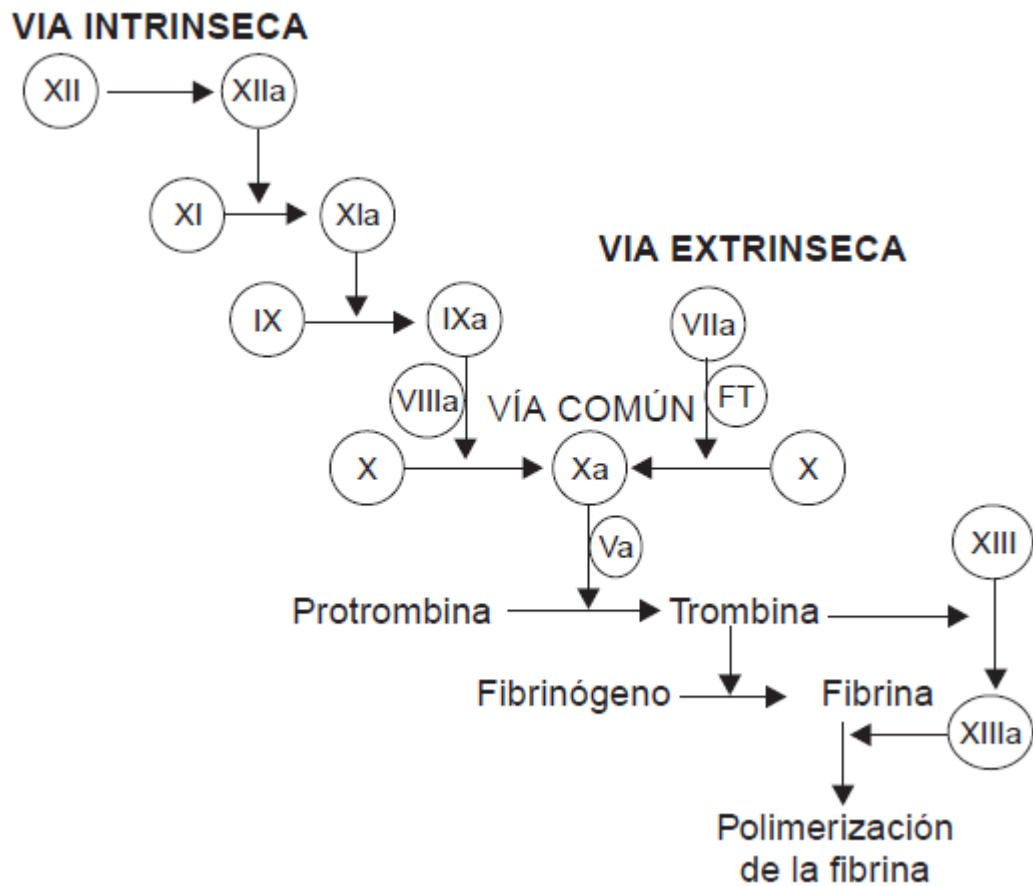


Figura 1. Modelo de coagulación vía intrínseca y vía extrínseca, que desencadenan en una vía común X para poder formar fibrina.²

Tabla 1. Factores de la coagulación sanguínea

Factor	Sinónimo
Factor I	Fibrinógeno
Factor II	Protrombina
Factor III	Factor hístico, factor tisular
Factor IV	Calcio
Factor V	Proacelerina, factor lábil
Factor VI	No asignado
Factor VII	Proconvertina, autoprotrombina I
Factor VIII	Factor antihemofílico A, globulina antihemofílica
Factor IX	Factor Christmas, componente trombiplástico del plasma, autoprotrombina II, factor antihemofílico B
Factor X	Factor de Stuart-Prower, trombocinasa, autoprotrombina
Factor XI	
Factor XII	Antecedentes tromboplástico del plasma
Factor XIII	Factor de Hageman
Precalicreína	Factor estabilizante de fibrina, protransglutamidasa, fibrinasa
Cinínógeno de alto peso molecular	Factor de Fletcher Factor de Fitzgerald- Williams-Flajauc

En la tabla 1, se muestra la nomenclatura internacional de los factores de coagulación y características generales. ⁸

4. Regulación antitrombótica: Se encarga de regular la hemostasia con varios mecanismos que limitan la fase plasmática de coagulación y permiten un balance procoagulante-anticoagulante.

5. Sistema fibrinolítico: Este sistema tiene como objetivo la disolución del coágulo por medio de una enzima proteolítica llamada plasmina y la restauración del endotelio vascular para restablecer el flujo sanguíneo.¹⁰

b) Fisiología plaquetaria

Las plaquetas provienen de los megacariocitos de la médula ósea (Figura 2)¹¹ a través de un proceso endomitótico, más que por duplicación celular directa.¹² Las plaquetas no tienen ADN genómico y son células anucleadas, discoides, planas, ligeramente convexas y circulan libremente en la sangre.¹³

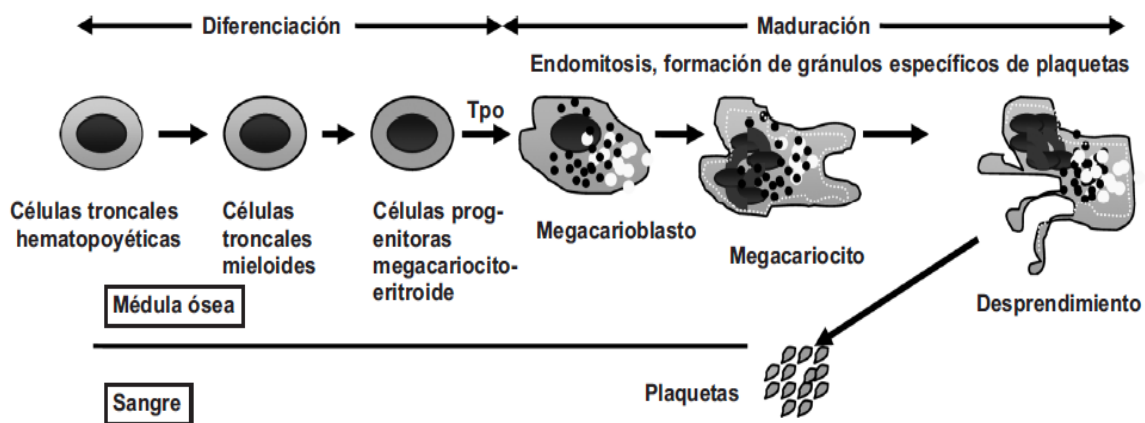


Figura 2. Proceso del origen celular de las plaquetas.¹⁴

Cuentan con un diámetro promedio de 2 a 4 μ , un grosor de 0.6 a 1.3 μ , un tiempo de vida aproximado de 8 a 10 días.¹⁵ Los valores de referencia en sangre periférica oscila entre 150-400 x 10⁹/L y un volumen medio de 7-11 fL.¹⁶ Después que las plaquetas han perdido sus funciones son eliminadas por el sistema retículoendotelial en el bazo y el hígado.¹⁷

Su forma y tamaño pequeño permite que las plaquetas sean colocadas hacia los bordes de los vasos sanguíneos, ubicadas en una posición óptima para la vigilancia constante de la integridad vascular. Junto a los eritrocitos y leucocitos constituyen

los elementos formes de la sangre, poseen algunas propiedades comunes a otras células y otras que las distinguen y caracterizan. A continuación se describen los organelos que forman parte de la plaqueta.

1. Membrana

La membrana de las plaquetas tiene una bicapa lipoproteína con glicoproteínas (GP) que funcionan como receptores de los agonistas fisiológicos (ADP, TXA₂, trombina, epinefrina, colágeno), proteínas adhesivas fibrinógeno, fibronectina, laminina, trombospondina, vitronectina, factor de von Willebrand (vWF) y para los ligandos fibrosos como el colágeno, además de poseer enzimas importantes para el funcionamiento celular. Es responsable de la interacción de la célula con el medio circulante a través de receptores entre las que figuran las integrinas, las cuales se caracterizan por enlazarse a proteínas que tiene la secuencia arginina-glicina-asparatato (RGD): fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, factor de von Willebrand y colágeno. Las integrinas más estudiadas han sido GPIIb/IIIa y la GPIb/IX.

La GPIIb/IIIa ocupa una gran proporción de la superficie plaquetaria. La mayor parte de esta glicoproteína es extracelular y dispone de dos segmentos transmembrana y dos cortos segmentos citoplasmáticos formados por los extremos C terminales. En la plaqueta en reposo se halla en forma de monómero, ya que la asociación de las subunidades requiere calcio extracelular que se enlaza a la subunidad IIb.

La GP Ib/IX es un heterodímero formado por la asociación de las GP Ib y IX. Tiene regiones extracelulares que garantizan la interacción con los ligandos vWF y trombina.¹⁸

Tabla 2. Componentes de la membrana externa y el contenido de los gránulos

Integrina	Ligando	Gránulos alfa	Gránulos densos
GPIIb/IIIa	fibrinógeno	Factor plaquetario 4 (PF4)	ATP
	vWF	b tromboglobulina (bTG)	ADP
	vitronectina	Factor de crecimiento (PDGF)	Calcio
	trombospondín	Fibrinógeno	Magnesio
GPIbIX	vWF	vWF	5 HT (Serotonina)
GPIaIIa	colágeno	Trombospondín	Epinefrina
GPIV	trombospondín	Fibronectina	Norepinefrina
GPVI	colágeno	P Selectina	Dopamina
GPIcIIa	fibronectina	Colagenasa	
		Elastasa	
		Inhibidores de proteasas	

Tomada de (García M y Col)¹⁸

2. Glucocálix

Es el componente de las plaquetas que está en contacto directo con el plasma circulante. Contiene mucopolisacáridos ácidos, glicoproteínas y ATPasa contráctil.

Es la estructura con las que se adhiere las plaquetas. Presenta una gran avidéz por proteínas externas y por lo tanto intervienen en la recepción de estímulos que ponen en marcha la activación de las plaquetas.¹⁹

3. Citosol

En el citosol de la plaqueta, se encuentra un sistema de fibras en varios estados de polimerización, el cual concede la forma no discoide de la

plaqueta no alterada y también tiene un sistema contráctil que permite el cambio de la plaqueta en la agregación plaquetaria.¹⁷

4. Sistema canalicular abierto

El sistema canalicular abierto está formado por canales ramificados, permite el acceso a las sustancias plasmáticas al interior de la plaqueta y un canal de salida para los productos plaquetarios. A través de este sistema se transportan las GPIIb/IIIa y la GPIb hacia los gránulos α .¹⁸

5. Microtúbulos

Los microtúbulos se encuentran dispuestos en posición circular, son los responsables en darle la forma discoide. La activación da un cambio a una forma esférica. En el cambio de forma los microtúbulos no se destruyen y pueden reaparecen si la plaqueta regresa a su forma original discoide. También participan los filamentos submembranosos.

En los gránulos se almacena diferentes enzimas, proteínas, factores de crecimiento y factores de coagulación, que permiten el cambio de forma de las plaquetas, para que se adhieran al endotelio y pierdan el arreglo de la membrana plasmática.¹⁸

6. Gránulos alfa

Son los más numerosos (50 a 80 por plaqueta) y más grandes.²⁰ Contienen el factor plaquetario 4 (FP4) que es una quimiocina de la familia CXC y la β tromboglobulina, son proteínas específicas de las plaquetas y pueden emplearse como marcadores de la activación plaquetaria, la β tromboglobulina es la encargada de bloquear la producción de prostaciclina (PGI₂) por las células endoteliales y favorece el crecimiento del trombo, el

factor de crecimiento de las plaquetas que también proviene de los gránulos α , promueven la proliferación de las células del músculo liso vascular.²¹

También se encuentran moléculas adhesivas como el fibrinógeno, el factor de von Willebrand (vWF), fibronectina y trombospondina; y los factores V y VII 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 el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) y α_2 - antiplasmina, que regulan la fibrinólisis.

7. Cuerpos densos

Las plaquetas contienen aproximadamente por término medio de 3 a 8 organelos electrodensos, con 20 a 30nm de diámetro. Los gránulos densos contienen altas concentraciones de serotonina, que es tomada del plasma por un transportador de membrana plasmática y atrapada posteriormente en los cuerpos densos. También contiene gran cantidad de adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), calcio y fosforo, los cuales refuerzan la agregación plaquetaria y las reacciones de coagulación.²¹

8. Peroxisomas

Son los organelos más pequeño de la plaqueta se caracteriza por contener catalasa, se les atribuye el metabolismo lipídico, especialmente en la síntesis del plasminogeno y pueden participar en la síntesis del factor activador plaquetario (FAP).²²

9. Lisosomas

Las plaquetas poseen gránulos que contienen hidrolasas ácidas. Entre las enzimas que se considera que origina a los lisosomas plaquetarios se

encuentran β -glucuronidasa, catepsina, arilsulfatasa, β -hexosaminidasa, β -galactosidasa, endoglucosidasa, β -glicerorofosfatasa, elastasa y colagensa. Cuando las plaquetas secretan el contenido lisosomal se libera más lenta e incompletamente, el contenido de los gránulos α y de los cuerpos densos. Por lo que se requiere potentes inductores de la activación para la liberación de los lisosomas.¹⁸

10. Mitocondrias

Las plaquetas tienen aproximadamente 7 mitocondrias²³ y están implicadas en el metabolismo de la energía oxidativa. Sin embargo, aún no está claro cuánto contribuyen para llevar a cabo la producción de energía. 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 plaquetaria excede al de los eritrocitos y del músculo esquelético.^{24, 25}

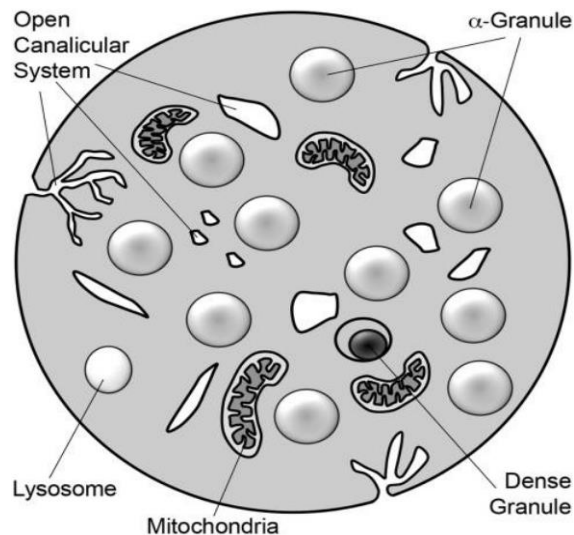


Figura 3. Diagrama esquemático de la plaqueta. La plaqueta es una célula discoide que contiene gránulos α , gránulos densos, lisosomas y mitocondrias.

(Tomado de Jennifer L y col)²⁶

Tabla 3. Contenido de los gránulos plaquetarios

Gránulos densos
Adenosina difosfato (ADP), serotonina, calcio, fosfatos
Gránulos α
Proteínas no presentes en el plasma: Factor plaquetario 4, factor de crecimiento producido por las plaquetas (PDGF), beta-tromboglobulina Proteínas presentes en el plasma: fibrinógeno, factor de von Willebrand (vWF), fibronectina, Factor plaquetario 5
Lisosomas
Hidrolasas ácidas, catepsina D y E
Peroxisomas
Catalasas

Funciones principales de las plaquetas cuando se presenta un daño vascular:

- Conservación de la integridad vascular mediante la reparación por sellado de defectos menores en el endotelio.
- Interrupción inicial de la hemorragia mediante la formación del trombo plaquetario.
- Estabilización del tapón hemostático facilitando la formación de fibrina (activación procoagulante de la plaqueta; factor plaquetario 3).
- Aceleran la recuperación vascular al estimular la migración de las células endoteliales (retracción del coágulo).

El objetivo principal de las células endoteliales es coordinar la actividad hemostática.

c) Fases de activación de las plaquetas

La hemostasia primaria tiene como función principal formar un tapón plaquetario, cuando se detecta un daño en el endotelio vascular. Por lo que se requiere un proceso de transformación de las plaquetas para formar el tapón plaquetario: 1) adhesión, 2) activación, 3) secreción y 4) agregación.

1. Adhesión

La adhesión de las plaquetas es el primer paso en la formación del tapón plaquetario.

Tras un daño en el vaso sanguíneo: las plaquetas se agrupan y se adhieren a través del factor de von Willebrand (fvW), el colágeno y la glicoproteína GPIb/IX de la superficie plaquetaria.²⁷

Este fenómeno es rápido, ya que transcurren de 1 a 2 segundos entre la ruptura del vaso y el comienzo de la adhesión de las plaquetas a los bordes del corte.²⁸

2. Activación y secreción plaquetaria

Después de la adhesión plaquetaria la activación plaquetaria puede iniciarse por diversos estímulos físicos o químicos.

Tabla 4. Factores de activación plaquetaria

Colágeno	Adenosina Difosfato (ADP)
Trombina	Adrenalina
Serotonina	Flujo hemodinámico
Factor de activación plaquetario (PAF)	

La mayoría de los agonistas de la activación plaquetaria actúan a través de una vía común el de la fosfolipasa C. A nivel de la membrana plaquetaria el complejo agonista/receptor activa a las proteínas G (en las subfamilias Gq y Gi), lo que

estimula al sistema fosfolipasa C induciendo la formación de dos mensajeros: inositol trifosfato (IP3) y el diacilglicerol (DAG). El IP3 permite la movilización del calcio de las membranas del sistema tubular denso plaquetario hacia el citosol; mientras que el DAG activa a la proteincinasa C (PK-C).

Cuando la plaqueta se activa ocurren los siguientes fenómenos:

- La plaqueta se contrae y cambia de forma
 - Secreta el contenido de sus gránulos
 - Activa el receptor IIb/IIIa con el cual una plaqueta activada se une a otra plaqueta activa generando la agregación plaquetaria
 - Cambios en la orientación de los fosfolípidos de la membrana
1. La contracción plaquetaria: el calcio se libera en presencia de calmodulina, activa la cinasa de la miosina, fosforilando así a la miosina, que es la única forma para que la miosina se una a la actina, lo que se denomina trombostenina. Esta reacción determina la contracción de la plaqueta, transformándola de su forma discoidea (plaqueta inactiva) en una con presencia de protrusiones citoplasmáticas o pseudópodos (plaqueta activada).
 2. El calcio y la proteincinasa c (PK-C), actúan en forma sinérgica para promover la degranulación plaquetaria. Los gránulos densos que contienen ADP, mediador que interviene en los fenómenos de hemostasia como un potente inductor de la agregación plaquetaria; el ADP promueve a que el calcio facilite la activación del receptor GP IIb/IIIa de la membrana, paso importante para la agregación plaquetaria y en segundo lugar el ADP ejerce un efecto de activación de otras plaquetas, promoviendo una cascada de activación de plaquetas, denominada a esta reacción de reclutamiento. TX A2 amplifica el proceso de degranulación y liberación de ADP.

3. El receptor GP IIb/IIIa: este receptor interactúa con el fibrinógeno del plasma o con el factor de von Willebrand inmovilizado, actuando el fibrinógeno como puente a otro receptor GP IIb/IIIa de otra plaqueta activada.
4. Las plaquetas exponen los fosfolípidos de su membrana con carga negativa, que ofrecen una superficie catalítica para las reacciones de los factores de la coagulación que se anclan en este sitio. Esta función se conoce como actividad procoagulante de la plaqueta.^{29,30}

4. Agregación plaquetaria

Después de que las plaquetas se activan, el tapón hemostático continúa en una fase conocida como agregación. Las plaquetas se agregan unas con otras a través del receptor del fibrinógeno o GP IIb/IIIa.

La agregación se produce en dos fases: primaria y secundaria. Durante la agregación primaria las plaquetas se adhieren laxamente entre sí, ante un estímulo débil, esta agregación es reversible.

La agregación secundaria por su parte, tarda más tiempo e inicia cuando las plaquetas sintetizan tromboxano A₂ y liberan su propio ADP y otras moléculas que se encuentran almacenadas en los gránulos.^{15,18}

d) Técnicas para medir la función plaquetaria

El estudio de la función plaquetaria se remonta a más de 100 años, cuando las plaquetas solo se identificaron como células circulantes de características únicas con participación en la hemostasia y la trombosis. Sin embargo, a pesar de esta descripción temprana en el siglo XX sólo se disponía del conteo manual de plaquetas, con la observación de su morfología en el frotis de sangre periférica y el tiempo de sangrado.

Uno de los principales problemas en el estudio de la función plaquetaria era la dificultad para simular la hemostasia *in vitro*, ya que las plaquetas son sensibles a la manipulación. La mejor comprensión de la fisiología de la hemostasia y la coagulación, facilitó el desarrollo de un método de medición objetiva y de mayor exactitud de las plaquetas: la agregación plaquetaria.³¹

Actualmente existen una variedad de métodos con los que se evalúa la actividad plaquetaria, cada una de estas metodologías tiene ventajas, desventajas y limitantes. En este trabajo se utilizó el método óptico en plasma rico en plaquetas y el método de impedancia en sangre total.

Agregometría plaquetaria

Born y O'Brien son considerados los padres de la agregometría plaquetaria por la transmisión de la luz (ALT), esta prueba es considerada el estándar de oro. La cual permite cuantificar la agregación plaquetaria e identificar la hipo- hiperactividad, que se presenta en condiciones patológicas.³²

Este método se emplea para evaluar el estudio de pacientes que tienen hemorragia por trombocitopatía, también para monitorear a pacientes con trombosis y evaluar el efecto de los fármacos antiplaquetarios.

Agregación plaquetaria en plasma rico en plaquetas (PRP) por el método óptico.

La agregación plaquetaria se determina a través de un agregómetro, el cual mide el paso de luz entre el plasma rico en plaquetas (PRP) y el plasma pobre en plaquetas (PPP). La transmitancia es directamente proporcional al número de plaquetas que se activan y se agregan.³³

Para obtener el (PRP) es necesario aislar las plaquetas del resto del plasma por medio de una centrifugación. Para el caso de la obtención del (PPP), el remanente de células se recentrífuga a una velocidad y a un tiempo mayor. Posteriormente se induce la agregación plaquetaria con un agente agonista como es: ADP, colágena, epinefrina o ácido araquidónico. El agregómetro está acoplado a un sistema computarizado, el cual obtiene un resultado en forma de curva, así como el tiempo de latencia y el porcentaje máximo de respuesta. Figura 4.

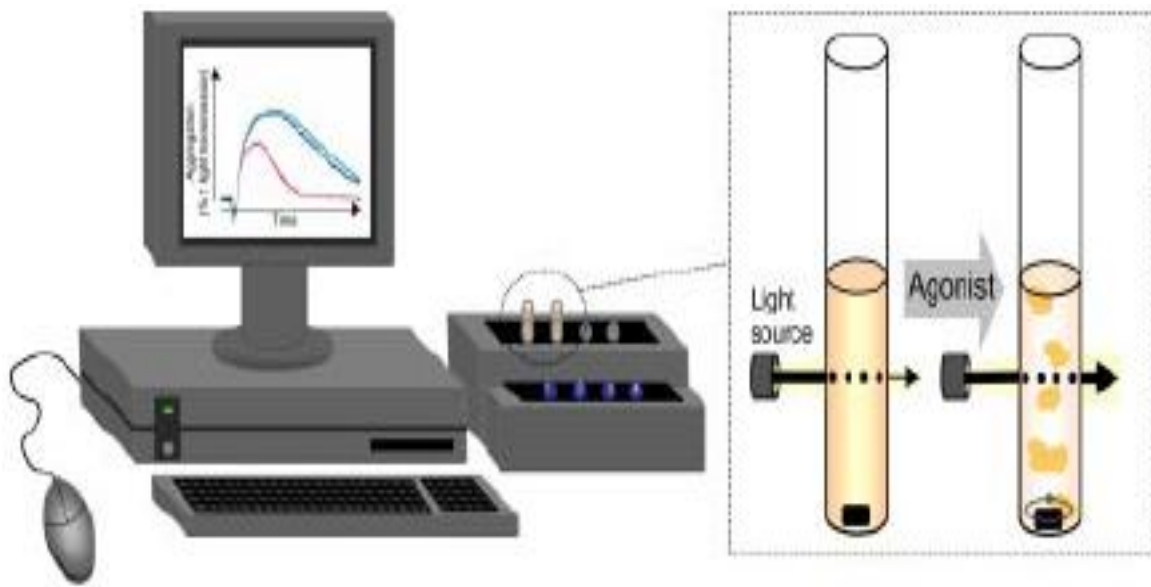


Figura 4. Modelo tradicional de agregómetro³⁴

Las curvas de agregación plaquetaria proporcionan la rapidez de respuesta, cada fragmento de la curva proporciona información de las plaquetas, como es el caso del cambio de forma la generación de pseudópodos y la secreción del contenido de los gránulos. Cada agonista presenta características específicas en su gráfico, ya que interactúa con receptores específicos de la plaqueta.

La agregometría por la transmisión de la luz permite el empleo de múltiples agonistas los cuales proporcionando información de las diferentes vías de señalización.

Agregación inducida con ADP

Del agregómetro se obtiene una curva bifásica de las que se puede identificar dos comportamientos: la agregación primaria y la secundaria.

Durante la primera fase se pueden observar leves variaciones de la densidad óptica, se asocia a discretos flujos de calcio en plaquetas que incrementan su volumen y obstruyen por periodos muy breves el paso de luz. La segunda fase es promovida directamente por el agonista (ADP), es más notable el cambio ya que la plaqueta secreta el contenido de los gránulos. Al liberarse al medio sustancias proagregantes (ADP, serotonina, Ca^{2+}), la densidad óptica disminuye por la formación de agregados plaquetarios que permiten un mejor paso de luz, a través del plasma rico y pobre en plaquetas.

Existen otras sustancias agregantes como el colágeno, la epinefrina, la trombina y la ristocetina, que son utilizadas para identificar trastornos en la fisiología de las plaquetas. Para estimular las plaquetas se pueden emplear diferentes concentraciones del agente agonista. Cuando se emplean las concentraciones óptimas, las curvas de agregación son muy similares. Las plaquetas en estado basal pueden ser estimuladas por agonistas por lo que producen complejos como el IIb/IIIa que actúan como el receptor del fibrinógeno, esto permite la interacción con otras plaquetas.³⁵

Generalmente se obtiene una curva bifásica, empleando concentraciones bajas de ADP y epinefrina. Por otro lado, empleando agonistas, en bajas concentraciones como es el caso de ADP, trombina y colágeno se obtiene una curva unimodal, por lo que no permite distinguir la agregación primaria de la secundaria

Agregometría en sangre total. Método de impedancia

Esta técnica fue descrita en 1980 por Cardinal,³⁶ la cual cuantifica la agregación plaquetaria mediante la impedancia (oposición de la corriente alterna entre dos electrodos). La técnica consiste en tener dos electrodos que van adaptados al agregómetro en el cual se aplica una corriente eléctrica a la muestra de sangre anticoagulada. La adición del agente agonista estimula la agregación plaquetaria. Las plaquetas adheridas al electrodo interrumpen la conducción entre los electrodos. Este método no requiere un procesamiento de la muestra y nos permite analizar muestras ictéricas o lipémicas. Sin embargo, se requiere una gran cantidad de muestra (1 mL), personal calificado y estandarización de la técnica.

Tabla 5. Resumen de las pruebas de función plaquetaria más comunes

Principio de la prueba	Nombre de la prueba	Metodología	Ventajas	Desventajas
Agregometría	Transmisión de luz Agregometría	Cambio en la absorbancia de luz	Estándar de oro Amplia experiencia Empleo de muchos agonistas	Preparación de la muestra requerida Experiencia del operador No fisiológica No cizallamiento Gran volumen de la muestra
	Sangre total Agregometría	Empleo de la impedancia inducida con el agonista	Ensayo en sangre total Muchos agonista disponibles Opción de luminiscencia	Preparación de la muestra No fisiológica Bajo cizallamiento Gran volumen de muestra
	Multiplate, sangre total agregación	Como el anterior	Ensayo en sangre total Pequeño volumen de muestra Cubetas desechables	No fisiológica Bajo cizallamiento No luminiscencia
	Verifynow	Cambio de la transmisión de la luz añadiendo TRAP/ADP/AA	Prueba de point-of-care Ensayo de sangre total	Cartuchos múltiples requeridos para el seguimiento dual antiplaquetaria

			Pequeño volumen de muestra de sangre 3 ensayos disponibles	Costoso
	Plateletworks	Reducción del número de plaquetas con los agonistas (ADP y colágeno)	Prueba de point-of-care Rápido Ensayo en sangre total Pequeño volumen de sangre	Prueba indirecta Debe analizarse dentro de los 10 minutos después de la extracción de la muestra sanguínea Escasos datos disponibles
	Thrombovision(T) guide	Cambio de transmisión de luz sangre con plaquetas	Prueba de point-of-care Rápido Ensayo en sangre total Pequeño volumen de sangre	No hay datos disponibles No se encuentra en el mercado
Cizalla inducida Plaqueta Agregometría	PFA-100	Tiempo de formación del tapón plaquetaria con alto cillamiento y agonista(colágeno, ADP, epinefrina)	Prueba de point-of-care Rápido Prueba de la reactividad Ensayo de alta cizallura Ensayo de sangre total Pequeño volumen de muestra de sangre	Debe establecerse valores de referencia Dependiendo vWF/HCT No es adecuado para el monitoreo de tratamiento antiplaquetario
	Impact R	Medidas de gran esfuerzo induciendo la adhesión de plaquetas/agregación a superficie	Ensayo de alto cizalladura Pequeño volumen de muestra Versión automatizada de punto y cuidado ya está disponible	No es adecuado para el seguimiento antiplaquetario
Citometria de flujo	Activación plaquetaria marcadores	Cuantificación de la activación plaquetaria Marcadores de fluorescencia	Exacto Pequeño volumen de muestra Amplia variedad de ensayos disponibles	Costoso Técnicos especializados Preparación de la muestra

	VASP Index Medidas VASP Fosforilación Relación desfosforilación	Específica para P2Y12 Pequeño volumen de muestra		
Medición de Tromboxano	Serum TxB2	Suero ligado a enzimas inmunoensayo	Específico COX1	No es una agregación específica No fiable Preparación de la muestra
	Aspirin Works	Urinaria unida a enzimas inmunoensayo de orinas 11 deshidrotroboxano B12	Específica COX-1 TxA2 metabolito estable	No plaquetaria específica Afectado por estado inflamatorios o disfunción renal ensayo indirecto
Tromboelastografía	TEG/ROTEM	Mide la formación de coágulos	Prueba de point-of-care Prueba fisiológica Refleja la reactividad de la sangre total	No plaquetaria específica Variabilidad en el resultado No es útil para el monitoreo de tratamiento antiplaquetario
	Teg platelet mopping	Formación del coagulo inducida por ADP/AA, contribuye a la formación de fibrina o trombina	Prueba de poin-of-care Correlaciones con ALT	No plaquetaria específica Los escasos datos disponibles

(Tomada del Mylotte D y col.)³⁶

En la tabla anterior se muestran las técnicas empleadas actualmente para evaluar la agregación plaquetaria, cada una de ellas tiene particularidades, algunas se deben emplear de acuerdo al tipo de paciente y padecimiento.

e) Estrógenos

El empleo de estrógenos con fines de terapia de remplazo hormonal y anticoncepción se muestran en la siguiente tabla, en la cual se observa que el uso de estos fármacos provocan diferentes efectos adversos como es el caso de la trombosis.³⁷

Tabla 6. Fármacos usados para fines anticonceptivos y terapia de remplazo hormonal

Fármaco	Indicaciones	Farmacodinamia	Farmacocinética	Efectos adversos
Estradiol	TRH Hipogonadismo Osteoporosis Cáncer prostático inoperable	Estrógeno natural, el más potente de los estrógenos. Se une a los receptores de estrógenos y estimula la transcripción genética específica. Inhiben la secreción de FSH e impiden la ovulación	O Es metabolizado rápidamente a estrona (metabolizado de primer paso) IM Valerianato, absorción continua por varios días liberando estradiol	<i>Frecuentes:</i> Nausea, anorexia, dolor abdominal, congestión mamaria, edema. <i>Poco frecuentes:</i> Cambio de sangrado vaginal, Hipertensión Hiperplasia endometrial
Estriol	TRH	Metabolito del estradiol con menor actividad	O	Trombosis vascular Migraña
Etinilestradiol	TRH anticoncepción (combinado con progestágenos) Hipogonadismo Infertilidad Dismenorrea	Estrógeno sintético similar al estradiol	O Sufre menor metabolismo hepático que el estradiol. Excreción por orina	Contraindicaciones Hipersensibilidad Embarazo Cáncer (útero, endometrio, ovarios y mama) Alteraciones
Mestranol	Anticoncepción (combinado con progestágenos)TRH	Derivado metilado del etinil estradiol	O Se metaboliza a etinilestradiol	cardiovasculares o cerebrovasculares de tipo tromboflebitis o
Estrógenos conjugados	TRH Osteoporosis	Estrógenos equinos. Esteres sulfatados de los estrógenos equinos equilina, equilenina y estrona	O, V, IM	anteriores de estas condiciones. Sangrado vaginal de origen desconocido

Tibolona	TRH Osteoporosis	Posee actividad estrogénica progestágena y androgénica débil, reduce los niveles de la FSH y la LD.	O	Insuficiencia hepática grave Pueden potenciar la toxicidad de los anticoagulantes; reducir el efecto de los antidiabéticos. La eficiencia de la tibolona se reduce por la inducción enzimática de: rifampicina, carbamazepina, hidantoína, barbitúricos y su toxicidad puede potenciarse por inhibidores enzimáticos como isoniazida. Pueden aumentar los efectos de anticoagulantes orales.
Dietilestilbestrol	Cáncer de próstata	Estrógeno sintético no esteroidal	O	Las anteriores.
Vía de administración: Oral= oral; IM=intramuscular; T=transdérmica; V=vaginal; TRH=terapia de remplazo hormonal				

(Tomada de Nicandro y col)³⁷

Tabla 7. Aplicación clínica de los estrógenos

Aplicaciones clínicas de estrógenos	
Deficiencia de estrógenos	Hipogonadismo primario o insuficiencia ovárica primaria (Síndrome de Turner). Desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y aceleración del crecimiento lineal.
Mujeres adultas con amenorrea primaria	Inducen un ciclo artificial.
Anticoncepción	Solos o administrados junto con progestágenos.
Terapia de reemplazo hormonal (TRH)	Menopausia o después de ovariectomía Evitan: Bochornos, sequedad vaginal, (vaginitis senil, atrófica asociada con infecciones), conservan la masa ósea. La TRH reduce el riesgo de cardiopatía coronaria y menor incidencia o inicio más tardío de la enfermedad de Alzheimer aunque otros estudios no lo han corroborado.
Cáncer de próstata	En el carcinoma con metástasis, el dietilestilbestrol en dosis altas mejora el estado general y frena la evolución del carcinoma, mediante la inhibición de la liberación de LHRH hipotalámica, que reduce la LH, disminuyendo la síntesis de testosterona en testículos y la síntesis de ADN en las células prostáticas.

(Tabla tomada de Nicardo y col) ³⁷

Mecanismo de acción genómico

Las hormas esteroides se difunden a través de la membrana plasmática celular, se distribuyen en el citoplasma y en el núcleo en las células blanco de: útero, glándula mamaria, hipófisis anterior, hipotálamo, hueso e hígado, donde interaccionan en sitios de unión con alta especificidad y afinidad que se encuentran presentes en los receptores intracelulares para la unión de la hormona-receptor.

Los estrógenos actúan a través de receptores citoplasmáticos que modulan la transcripción de genes específicos. Existen dos receptores RE α y RE β cuyos genes se localizan en el brazo largo del cromosoma 6 (6q24-q27) y 14(14q21-22).

Los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) son secuencias palindrómicas de 13 pares de bases localizadas en la región reguladora de los genes blancos.

La unión de los receptores citoplasmáticos con (ERE), incrementan la transcripción basal de los genes blanco. En lo general, ambos receptores tienen una estructura similar con un dominio C altamente conservado un dominio E moderadamente, pero una considerable variabilidad en el dominio A/B.

Ambos receptores tienen afinidad equivalente al dominio E₂, su afinidad por otros ligantes es distinta y su localización en órganos blancos también. El papel de cada receptor aún se encuentra en estudio. Los estrógenos regulan directamente a ciertos genes como el que codifica para el receptor de progesterona. También inducen la transcripción que, a su vez regulan un amplio número de genes maestros como FOS y MYC, que codifican para factores de transcripción que a su vez regulan un amplio número de genes. Esto explica la diversidad de efectos de los estrógenos también conocidos como efectos pleiotrópicos y la inducción de genes que no tienen elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en su región reguladora.

Mecanismos no genómicos

Los receptores intracelulares clásicos en algunos de los efectos de los estrógenos, se caracterizan por producir respuestas rápidas mediadas por receptores de la membrana celular y se han descrito como mecanismos no genómicos.

Existen numerosos ejemplos de estas respuestas; una de ellas es la vasodilatación aguda que induce al dominio E₂ en músculo liso vascular señalado previamente.

En los últimos años se ha documentado que pulsos breves de estrógenos, pueden inducir en milisegundos diversas cascadas de señalización. Esto sugiere que existen en la membrana receptores para estrógenos que activan diferentes cinasas como PKA, PKC, P13K y otras.

En el sistema nervioso central se ha descrito un receptor metabotrópico acoplado a proteína G_q que es activado por estrógenos. Las acciones iniciadas desde la membrana pueden potenciar los efectos sobre la transcripción mediada a través de los REs.³⁷

f) El efecto protector de los estrógenos en el sistema cardiovascular

Se ha demostrado que el uso de estrógenos en mujeres ejerce un efecto protector en el sistema cardiovascular. Este efecto protector disminuye cuando los ovarios dejan de producir estrógenos, durante la menopausia o la extirpación de los mismos en mujeres premenopáusicas.

El efecto protector que ejercen los estrógenos endógenos se explica a continuación:

Los efectos vasodilatadores, modulan la síntesis de factores como prostaciclina, endotelina-1 (ET-1) y óxido nítrico (NO) en las células endoteliales de los vasos sanguíneos aumentando la regeneración del endotelio ante el daño ocasionado por la placa aterosclerótica.

Las acciones relajantes directas del dominio E₂, sobre los receptores presentes en la membrana celular de músculo liso vascular modulan la función de los canales iónicos de calcio y potasio.

Así como efecto modulador sobre la coagulación sanguínea: en la sensibilidad, adhesión y cuenta plaquetaria, los factores de la coagulación, anticoagulantes sanguíneos y el sistema fibrinolítico.

g) Estrógenos y trombosis

Los estrógenos solos o en combinación con progestágenos son utilizados en todo el mundo por mujeres sanas, jóvenes y habitualmente sin ninguna patología por su efecto anticonceptivo.

Otro propósito del empleo de este tipo de fármacos es en el tratamiento de reemplazo hormonal (THR) de la menopausia, para suprimir los síntomas por la carencia de estrógenos.

Sin embargo, este tipo de tratamientos no obstante que son benéficos, tienen efectos adversos. Investigaciones recientes destacan la relación entre el uso de estrógenos y el riesgo de trombosis venosa en pacientes^{38,39,40}.

En un protocolo, se trabajaron con 2, 763 mujeres menopáusicas; aquellas que tuvieron su último periodo menstrual más allá de los 52 años, tenían un riesgo 3.6 veces mayor de presentar una trombosis venosas que las que no tenían esa característica⁴¹.

Por otra parte, está demostrado que el uso de estrógenos altera varios mecanismos hemostáticos y por ello genera un estado protrombotico⁴², disminuyen la actividad de antitrombina y el flujo venoso produciendo cambios en la actividad plaquetaria y aumenta la coagulabilidad.⁴³

II. JUSTIFICACIÓN

El empleo de estrógenos con fines anticonceptivos y terapia de reemplazo hormonal en la mujer incrementa el riesgo trombótico. Por lo que actualmente diversos grupos de investigación, buscan una alternativa para encontrar un compuesto que conserve el efecto estrogenico y no favorezca la trombosis.⁴⁴

Las enfermedades cardiovasculares constituyen una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial.⁴⁵

La Organización Mundial de la Salud, señala que la prevalencia de mortalidad en nuestro país se ha incrementado a 87 mil por año.

Debido a que la incidencia de las enfermedades cardiovasculares es mayor en hombres que en mujeres y que dicha incidencia se iguala después de la menopausia, se asume que los estrógenos endógenos tienen efecto protector en el sistema cardiovascular.^{46, 47} Sin embargo, hay numerosos reportes que señalan que el tratamiento con estrógenos incrementa el riesgo de trombosis.^{48, 49} Y a pesar de que se ha intentado evitar este riesgo con diferentes estrategias, como disminuir la dosis de tratamiento y utilizándolo en combinación con progestágenos, entre otras, el riesgo de trombosis sigue presentándose⁵⁰. Por lo tanto, diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de diseñar y sintetizar nuevas moléculas que pueden utilizarse como terapia hormonal segura.^{51, 52}

Por otro lado, las plaquetas son células que tienen un papel importante tanto en la hemostasia como en la trombosis, su actividad está asociada con el progreso de las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, la inflamación y la metástasis de células de cáncer.

III. HIPÓTESIS

El Tirame inhibe la agregación plaquetaria en plaquetas aisladas y en sangre total.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del amino-estrógeno substituido en la posición 17- β N[3-hidroxiestra1:3:5(10)-trien-17 β -il]-4-(2-aminoetil)-fenol (Tirame) sobre la actividad de las plaquetas.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener una curva dosis respuesta (0.5-500 μ M) de Tirame en plasma rico en plaquetas y en sangre total empleando colágeno 4 μ g/mL como agente agonista.
- Obtener una curva dosis respuesta (0.5-500 μ M) de Tirame en plasma rico en plaquetas y en sangre total empleando epinefrina 10 μ M como agente agonista.
- Comparar los resultados obtenidos con los diferentes agonistas.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

a) Equipo

- Agregómetro chrono-log
- Centrifuga Beckman Coulter
- Contador de plaquetas

b) Material adicional

- Cubetas silicónizadas
- Barras magnéticas
- Micropipeta 1-10 μ L

- Micropipeta 100-1000 μL
- Tubos con sistema de vacío con citrato de sodio

c) Reactivos

- El compuesto estrógeno sustituido en la posición 17- β Fig 5. (N[3-Hidroxiestra 1:3:5(10)-trien-17 β -il]-4-(2-aminoetil)-fenol. (Tirame)

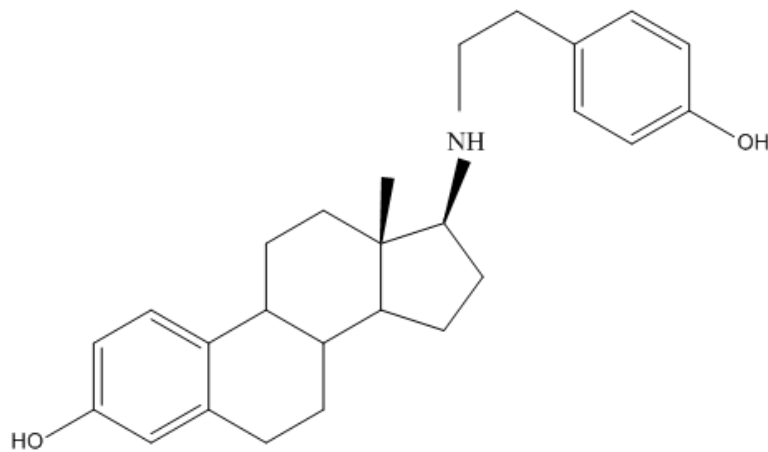


Figura 5. Estructura química de Tirame

- Colágeno
- Epinefrina
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Cloruro de sodio 0.9 %

d) Condiciones preanalíticas

Para llevar a cabo la prueba de agregometria es necesario que el paciente se encuentre en ayuno y no haya consumido ningún AINES o bien un fármaco con actividad antiagregante.

Los plasmas lipémicos y hemolizados no se procesaron, ya que interfieren en la prueba provocando que no se permita el paso de luz y por lo tanto afecte al resultado de la agregación plaquetaria.

e) *Obtención de muestra*

Se obtuvieron 88 muestras sanguíneas en tubos con sistema de vacío con citrato de sodio 0.104 M como anticoagulante, que fueron obtenidas de donadores aparentemente sanos del banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, a través de una punción venosa en la vena antecubital.

Previamente se les solicito su autorización para que una pequeña muestra de su sangre (5mL) se utilizara para fines de investigación APÉNDICE 1. Los donadores se encontraban en ayuno, no ingirieron fármacos que interfirieran en el estudio, como es el caso de: AINES, aspirina, antidepresivos y antihipertensivos.

Procedimiento

De las 88 muestras sanguíneas, se ocuparon 44 muestras para el método óptico y 44 muestras para método de impedancia. Se realizo un pool de 4 donadores para la realización de cada método.

El compuesto fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) 5 %, el cual se utilizó como control. El resultado de agregación plaquetaria que se obtuvo con el grupo control, se consideró como el 100 % de respuesta de la agregación. Para medir la agregación plaquetaria, se empleo el equipo Lumi-agregometro de la marca Cronolog. Se realizó una curva respuesta (0.5-500 μ M). La agregación plaquetaria fue inducida con epinefrina 10 μ M y colágeno 4 μ g/mL.

f) *Agregación plaquetaria*

Fundamento del ensayo:

La agregación plaquetaria se estimula a través de un agente agonista. El agregómetro hace pasar un haz de luz a través del plasma PRP, provocando un cambio en el paso de luz. Cuando las plaquetas se agregan permiten el paso de luz libremente en las cubetas con plasma. El equipo registra el cambio de luz y se obtiene una curva en el equipo de cómputo.

Procedimiento:

Las muestras obtenidas se centrifugaron a 1000 rpm por 3 minutos y se obtuvo el plasma rico en plaquetas (PRP), el remanente de células rojas se recentrifugo a 3500 rpm por 20 minutos para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP). Se ajustó la cuenta a $250 \times 10^3 \mu\text{L/plaquetas}$, con el plasma rico en plaquetas y el plasma pobre en plaquetas.

Previamente incubadas las muestras por 5 min a 37 °C en el lumi-agregómetro, se indujo la agregación plaquetaria con epinefrina 10 μM y colágena 4 $\mu\text{g/mL}$, las muestras fueron analizadas de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 5. Agentes agonistas y concentraciones de Tirame para la agregación plaquetaria.

Tirame μM	
Epinefrina 10 μM	Colágena 4 $\mu\text{g/mL}$
DMSO	DMSO
500	500
50	50

5	5
0.5	0.5

g) Método de impedancia

Fundamento del ensayo:

Consiste en usar un electrodo para determinar la resistencia eléctrica o bien la impedancia entre los dos sensores eléctricos que conforman el electrodo. El cambio de impedancia se despliega en una curva de agregación en función del tiempo.

Procedimiento:

La muestra de sangre (1:2) con cloruro de sodio 0.9 %. Previamente incubadas por 5 min a 37 °C las muestras en el Lumi- agregómetro, se le adaptaron los electrodos y se indujo la agregación plaquetaria con epinefrina 10 µM y colágena 4 µg/mL, las muestras fueron analizadas de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 6. Agentes agonistas y concentraciones de Tirame para la impedancia.

Tirame µM	
Epinefrina 10 µM	Colágena 4 µg/mL
DMSO	DMSO
500	500
50	50
5	5

0.5	0.5
-----	-----

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los datos fueron analizados por la prueba paramétrica ANOVA y se empleó un post- Dunnet. Los resultados se presentan con el promedio \pm SD. El valor de $P \leq 0.05$, es considerado estadísticamente significativo. Los cálculos se realizaron empleando el software GraphPad, versión 5.0.

VIII. RESULTADOS

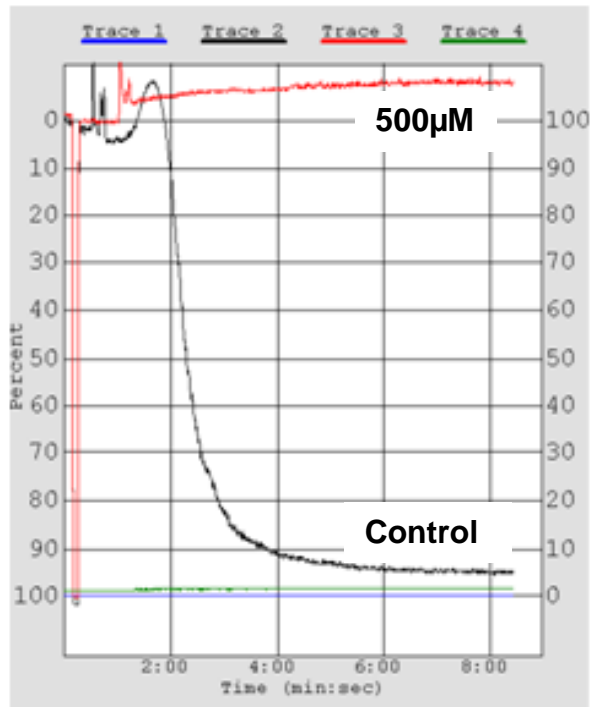


Figura 6. Trazo representativo de agregación plaquetaria tratado con Tirame 17 β aminoestrógeno

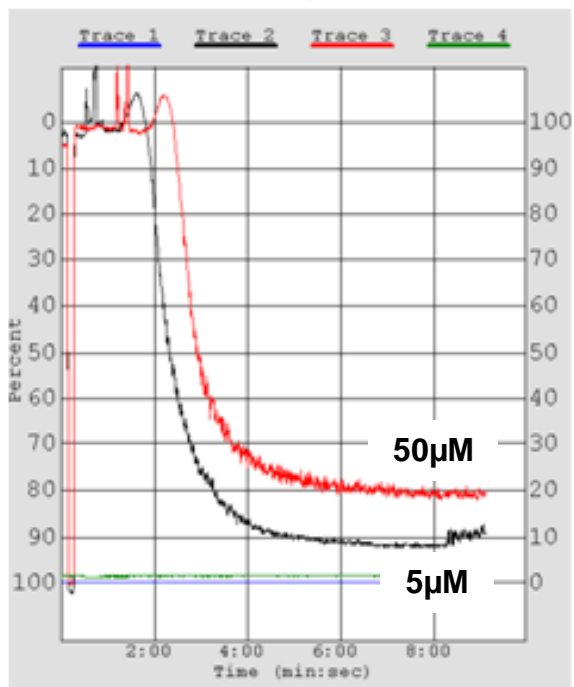


Figura 7. Trazo representativo de agregación plaquetaria tratado con Tirame 17 β aminoestrógeno

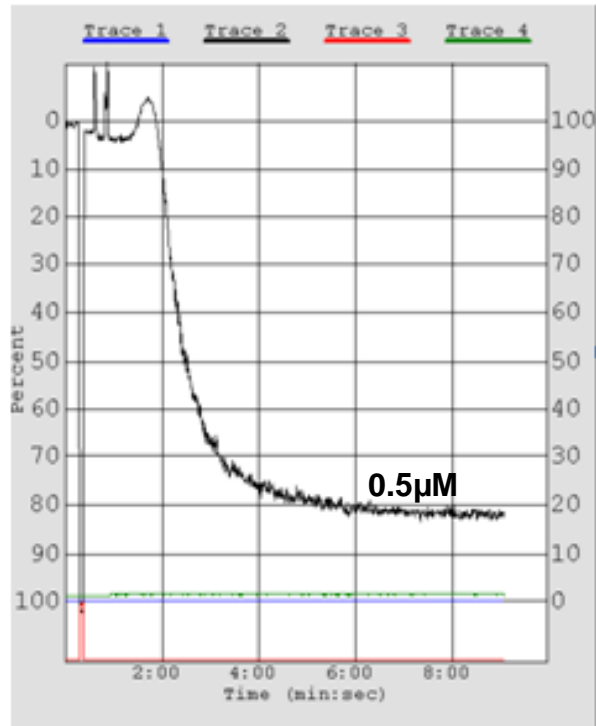
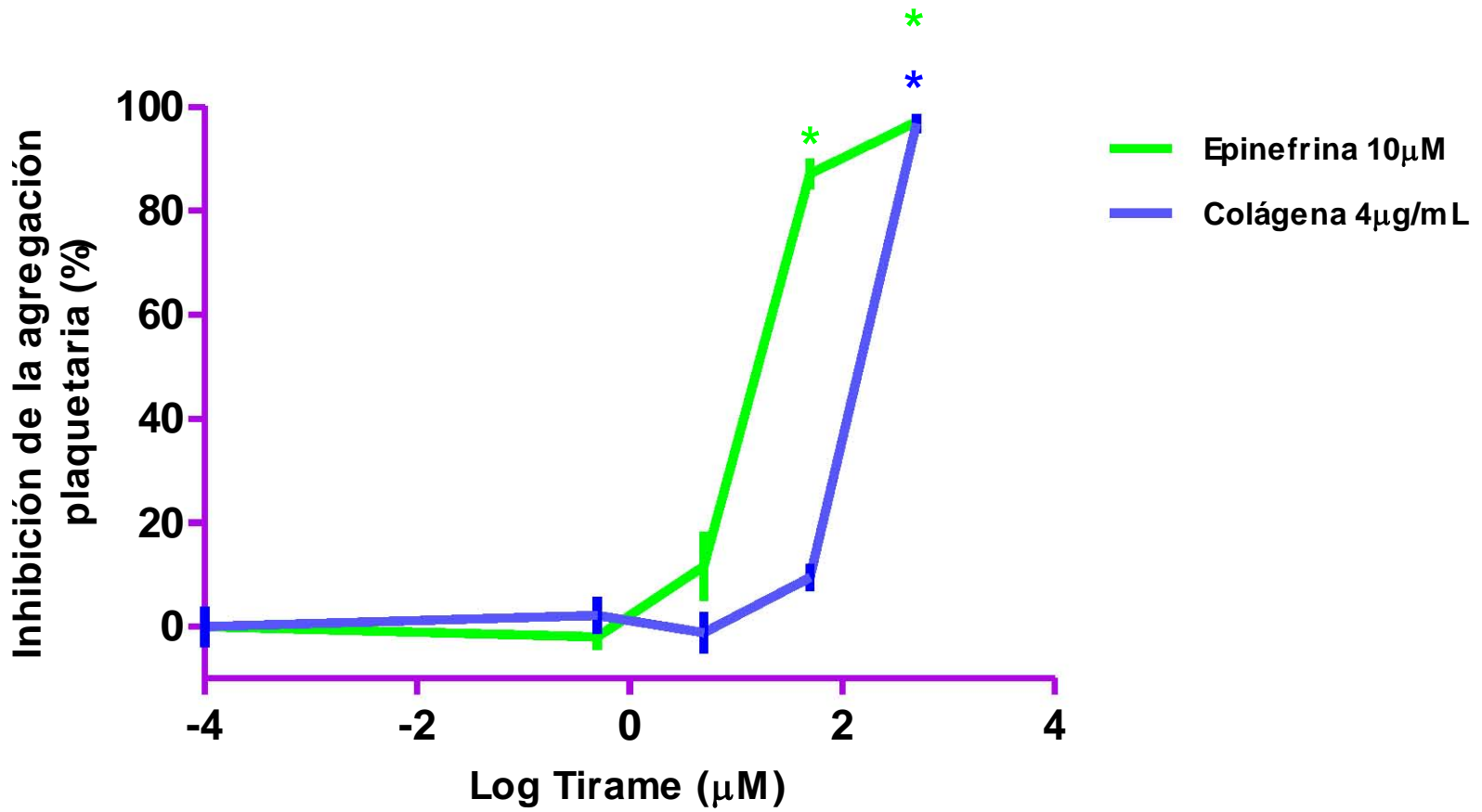


Figura 8. Trazo representativo de agregación plaquetaria tratado con Tirame 17 β aminoestrógeno

GRÁFICA 1. En el gráfico se observan los resultados obtenidos de inhibición de la agregación plaquetaria (%) inducida por epinefrina y colágeno con el método óptico. Promedio \pm D.E. Prisma 0.5, ANOVA, Dunnet *P \leq 0.05 fue considerado

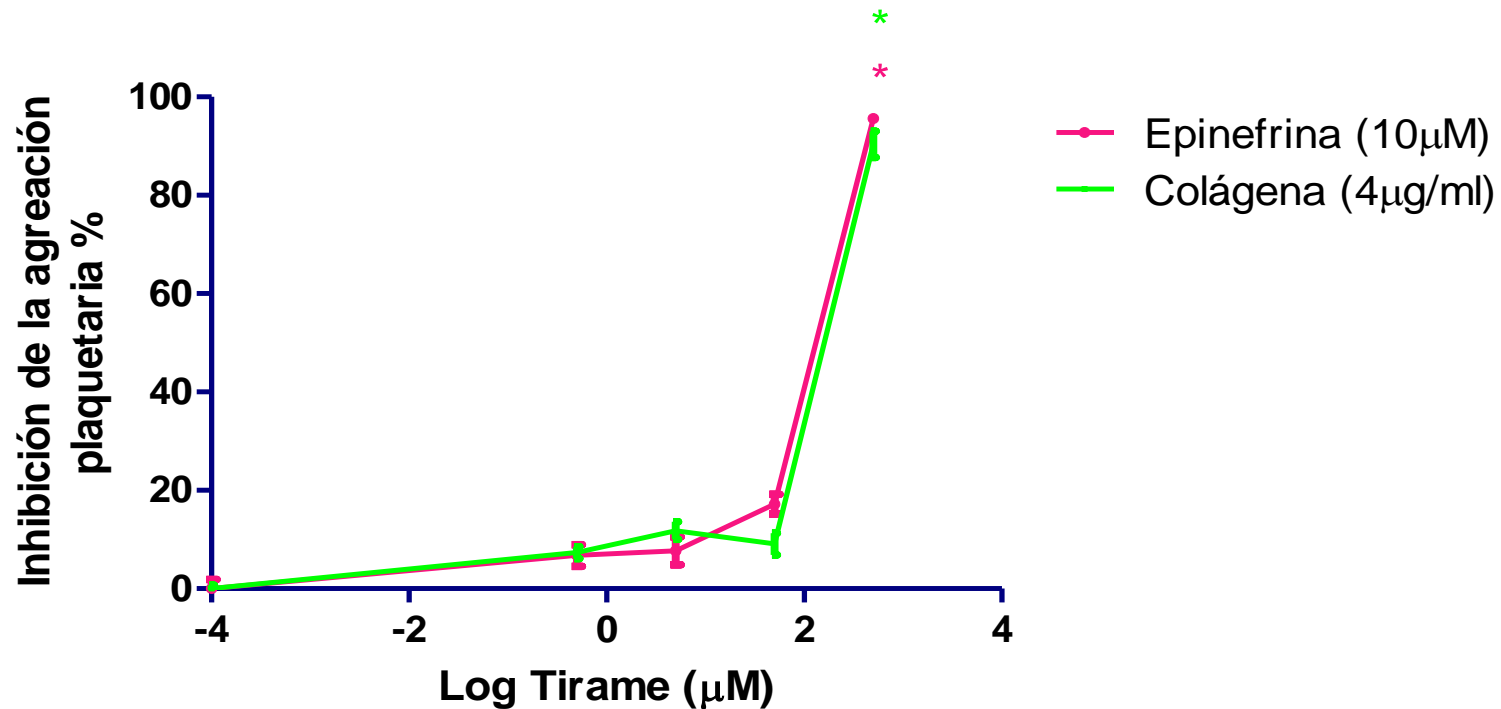
**Inhibición de la agregación plaquetaria (%)
estimulado con epinefrina 10 μ M y colágena 4 μ g/mL**



estadísticamente significativo.

Método de impedancia

Inhibición de la agregación plaquetaria (%) estimulado con epinefrina 10 μ M y colágena 4 μ g/ml



GRÁFICA 2. En el gráfico se observan los resultados obtenidos de inhibición de la agregación plaquetaria (%) inducida por epinefrina y colágeno con el método impedancia. Promedio \pm D.E. Prisma 0.5, ANOVA, Dunnet *P \leq 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La gráfica 1 muestra la curva dosis-respuesta del efecto inhibidor plaquetario de Tirame determinado por el método óptico. Empleando epinefrina y colágena como agentes inductores. Las concentraciones inhibitoras 50 (CI_{50}) son de 17.01 μM y 148.47 μM respectivamente.

La gráfica 2 muestra la curva dosis-respuesta del efecto inhibidor plaquetario de Tirame determinado por el método de impedancia. Empleando epinefrina y colágena como agentes inductores. Las concentraciones inhibitoras 50 (CI_{50}) son de 121.93 μM y 148.56 μM respectivamente.

El utilizar los dos métodos para determinar la inhibición de la agregación plaquetaria nos proporciona información complementaria. El método óptico considera la actividad exclusiva de las plaquetas, en cambio con el método de sangre total, permite observar el efecto que tienen con otras células presentes como los eritrocitos y los linfocitos. Estudios morfológicos de la cinética de la formación del trombo indican la presencia de plaquetas mezcladas con eritrocitos, neutrófilos, monocitos y fibrina. Anteriormente, la presencia de estas células se consideró un proceso pasivo. Sin embargo, hoy se tiene evidencia que existe una comunicación entre las diferentes células, donde la estimulación específica de cada una de ellas: el contacto célula- célula y/o vía productos liberados, sintetizados o presentes en gránulos intracelulares pueden modificar el desarrollo y la reversibilidad del trombo en formación.

Diferentes estudios indican que los procesos adhesivos entre plaquetas y los eritrocitos, pueden tener un potencial interés en la hemostasia y la trombosis. En este sentido, se ha demostrado que la proteína ICAM-4 del eritrocito se une a la glicoproteína $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ de la plaqueta activada. Utilizando sistemas de perfusión y condiciones de flujo *in vivo*, se comprobó la adhesión de las plaquetas a los eritrocitos. Diferentes autores coinciden que los eritrocitos incrementan la activación del receptor y la exposición de P-selectina de las plaquetas durante el proceso de activación.⁵³

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos decir que las plaquetas aisladas tanto como cuando se encuentran en conjunto con otras células, no afectan la acción de la inhibición plaquetaria del compuesto Tirame en estas situaciones.

Las figuras 6, 7 y 8 son ejemplos de los resultados obtenidos directamente del Lumi-agregometro, en el que se muestra la inhibición de la agregación plaquetaria de una manera dependiente de la concentración. En estas figuras se muestra el efecto del control y así como las diferentes concentraciones empleadas de Tirame (Control y 500, 50, 5 y 0.5 μM Tirame).

Se observa que en el control y las concentraciones 50, 5, 0.5 μM , su efecto de agregación es muy similar entre 80 y 90%. En los resultados obtenidos solo se observa una meseta o bien la segunda ola de agregación que corresponde a la liberación del contenido de los gránulos, sustancias proagulantes como ADP, serotonina y calcio, este estado de la agregación plaquetaria es irreversible.

En el control se obtiene la respuesta máxima del sistema; empleando la concentración 500 μM Tirame inhibe por completo la respuesta, en el resultado mostrado se obtuvo un 0 % de agregación.

Es importante mencionar que empleando el ADP como agente agonista, también inhibe la agregación plaquetaria empleando la concentración de 500 μM y se obtiene (CI_{50}) con el método óptico de 121.89 μM y (IC_{50}) con el método de sangre total de 81.28 μM . Estos resultados experimentales ya se habían determinado previamente en el laboratorio por otros investigadores.

X. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que el Tirame inhibe la agregación plaquetaria con ambos agonistas con la concentración más alta 500 μM . El compuesto podría ser de utilidad para contar con un estrógeno que disminuya la coagulación de la sangre y así atenuar el posible efecto adverso de trombosis.

Se recomienda determinar el efecto antiagregante plaquetario y comprobar que efectivamente el compuesto sea capaz de evitar la formación de un trombo en un animal integro (ratón).

XI.BIBLIOGRAFIA

¹ Martínez Murillo C. Conceptos generales de la Hemostasia. En: Martínez Murillo C, editor. Hemostasia, Trombosis y Laboratorio de Coagulación. 1a. Edición. México: Health Business Group, 2011:1-3.

² Quintana González S. Actualidades de la hemostasia. Gac Méd Méx 2002;138:(1) 45-59

³ Majluf Cruz A. Mecanismo Hemostático. En: Ruíz Argüelles G.J., editor. Fundamentos de Hematología. 4a. Edición. México: Médica Panamericana, 2009; 229-233.

⁴ 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: Médica panamericana, 2008: 501-512.

⁵ Larson L. Hemostasia Primaria. Hematología Clínica. 1 a. edición. México: Manual Moderno, 1991: 367-379.

⁶ Ruiz Reyes, A. Ruiz Arguelles. Fundamentos de interpretación clínica de los exámenes de laboratorio. 2ª. Edición. México: Médica Panamericana, 2010: 55-57.

⁷Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M et al. New fundamentals in hemostasis. Physiol Rev. 2013; 93(1):327-58.

⁸ Martínez Murillo C. Coagulación y Modelo Celular. En: Martínez Murillo, editor. Hemostasia, Trombosis y Laboratorio de Coagulación. 1a. Edición. México: Health Business Group., 2011: 25-27

⁹ Karpatkin S, Langer R. Biochemical energetic of stimulated platelet plug formation: effect of thrombin, adenosine diphosphate, and epinephrine on intra-extracellular adenine kinetics. *J Clin Inves* 1968;47:2158-2168

¹⁰ Collen D. Role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodeling. *Hematology* 2001:1-9.

¹¹ Bishop-Bailey D. The platelet as a model system for the acute actions of nuclear receptors. *Steroids* 2010; 75(8-9)570-75

¹² Cordova Víctor, Vargas Pablo, Vega Cesar et al. Agregometría plaquetaria: el estudio de agregación de las plaquetas y la disfunción plaquetaria. *Med Int Mex* 2011;27(1):58-74

¹³ Malara A, Balduini A. Blood platelet production and morphology. *Thromb Res.* 2012 Mar;129(3):241-4

¹⁴ Sharathkumar A, Shapiro D. Trastornos de la función plaquetaria. *Federación Mundial de Hemofilia.* 2008; 9

¹⁵ Domínguez GV, Ambriz FR. Bioquímica y Fisiología plaquetaria 2001; 2:117-127

¹⁶ Failace R. Plaquetograma. En: Failace, editor. *Hemograma: Manual de interpretación.* 5 a Edición. Brasil 2011:309.

¹⁷ George J. Platelets. *Lancet.* 2000; 29;355(9214):1531-9.

¹⁸ García M, Coma C. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc* 2000;1(2):132-41

¹⁹ Carrasco M, García E, Rubio C. Fisiología plaquetaria. En: Carrasco M, García E, Rubio C, eds. Ciencias de la Salud, Hematología 2, Hemostasia, Banco de Sangre, Control de Calidad. 1a. Edición. España: Paraninfo,1998: 14.

²⁰ Parise V, Smyth S, Collier S. Morfología, bioquímica y función de las plaquetas. En Williams. Hematología Tomo II. España: Marbán, 2005:1361.

²¹ Fabella F. Hematología. En: Cuellar A, Fabella F, eds. Fundamento de Medicina, Hematología. 6ª. Edición. Colombia: Corporación para Investigaciones Biológica, 2004: 207-208.

²² Parise V, Smyth S, Collier S. Morfología, bioquímica y función de las plaquetas. En Williams. Hematología Tomo II. España: Marbán, 2005:1360.

²³ Parise V, Smyth S, Collier S. Morfología, bioquímica y función de las plaquetas. En Williams. Hematología Tomo II. España: Marbán, 2005:1360.

²⁴ 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

²⁵ Leclair S. Megacariopoyesis Rodak B. Hematología. Fundamentos y aplicaciones clínicas. 2ª Ed. Buenos Aires. Medicina Panamericana. 2005, p 145-148

²⁶ Jennifer L. Fitch-Tewfik, Robert Flaumenhaft. Platelet Granule Exocytosis: A Comparison with Chromaffin Cells Front Endocrinol (Lausanne) 2013; 4: 77.

²⁷ Brass F. The molecular basis of platelet activation. En: Hofman R, Benz E, Statti S, et al, eds Hematology: Basic Principles and Practice. 4 a. Edición. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005:1793-1803.

²⁸ Carrasco M, García E, Rubio C. Fisiología plaquetaria. En: Carrasco M, García E, Rubio C, eds. Ciencias de la Salud, Hematología 2, Hemostasia, Banco de Sangre, Control de Calidad. 1a. Edición. España: Paraninfo, 1998: 21.

²⁹ Walsh P. Platelet Coagulation-Protein Interactions Seminars in Trombosis and Hemostasis 2004,30(4):461-471

³⁰ Ruiz Em. Antiagregantes Plaquetarios. Revista Peruana de Cardiología. Vol. XXXII. N°1. 2006

³¹ Cordova Víctor, Vargas Pablo, Vega Cesar, et al. Agregometría plaquetaria: el estudio de agregación de las plaquetas y la disfunción plaquetaria. Med Int Mex 2011;27(1):58-74

³² Breddin HK, Harder S. The value of platelet function test. Vasa. 2003 AUG;32(3):123-9.

³³ Vargas RAG, Hernández HD y Villa MR. Evolución de la función plaquetaria con agregometría. Hemostasia y trombosis. 2010; 3(2): 29-38

³⁴ Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. Blood. 2007 Jun 15;109(12):5087-95.

³⁵ Nieto Camacho Raúl. Principios Universales de la Hematología. Capítulo 4. Chronolab. Primera edición. 2004. Pp 320-321

36 Mylotte D, Foley D, Kenny D. Platelet function testing: methods of assessment and clinical utility. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2011 Jan;9(1):14-24.

37 Lemini Guzmán C, Jiménez Orozco A, Canchola Martínez E. Estrógenos. En: Campos Sepúlveda AE, Jiménez Orozco FA, Rojas Ramírez JA, eds. *Farmacología Médica*. 1ª . Edición. México:Panamericana, 2008: 410

38 James AH. Contraceptive transdermal patches or vaginal rings were associated with increased venous thrombosis. *Ann Intern Med* 2012;157(8):JC4-10.

39 Andrews J. Hormonal contraceptives with ethinyl estradiol were associated with increased thrombotic stroke and MI. *Ann Intern Med* 2012;157(8):JC4-9.

40 Rott H. Thrombotic risks of oral contraceptives. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2012;24(4):235-40.

41 Eischer L, Eichinger S, Kyrle P. The risk of recurrence in women with venous thromboembolism while using estrogens: a prospective cohort study. *J Thromb Haemost* 2014; 12(5):635-40.

42 Kroll M, Schafer A. Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood*. 1989; Sep; 74:1181-1194

43 Alsasua A. Hormonas sexuales y anticonceptivos. *Actualidad en Farmacología y Terapéutica* 2011:9(1)

44 Królik M, Milnerowicz H. The effect of using estrogens in the light of scientific research. *Adv Clin Exp Med*. 2012 Jul-Aug;21(4):535-43.

⁴⁵ www.inegi.com "Estadística"

⁴⁶ Byshevskii A, Karpoval IA, Solovév, et al. The effect of estrogens and progestagens on biochemical components of hemostasis platelets, continuous intravascular coagulation and tolerance to thrombin: correction of their effect of antioxidants. *Biomed Khim.* 2012;58(4):429-37.

⁴⁷ Abadilla K, Antonino MJ, Bailon O, et al. Platelet reactivity and thrombogenicity in postmenopausal women. *Menopause.* 2013;20(1):57-63.

⁴⁸ Rott H. Contraception, venous thrombosis and biological plausibility. *Minerva Med.* 2013 Apr;104(2):161-7.

⁴⁹ Rott H. Thrombotic risks of oral contraceptives. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2012 Aug;24(4):235-40

⁵⁰ Blondon M, Floyd JS, Hwang M. Lower Risk of Cardiovascular Events Postmenopausal Women Taking Oral Estradiol Compared With Oral Conjugated Equine Estrogens. *JAMA Intern Med.* 2013 Sep 30. doi: 10.1001

⁵¹ De la Peña A, Flores M, Hernández M. Platelet aggregation in whole blood, a new approach for understanding the antiplatelet effect of N- (3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17b-yl) butylamine (buame). *Proc West Pharmacol Soc.* 2009;52:50-3.

⁵² Alvarado V, De la Peña, Gómez V, et al. The antithrombotic effect of the aminoestrogen prolame (N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17B-YL)-3-hydroxypropylamine) is linked to an increase in nitric oxide production by platelets and endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2010 Jan;208(1):62-8.

⁵³ Latorre A, Madrid I, Moscardó A et al. Modulación de la función plaquetaria por los eritrocitos. Implicaciones farmacológicas.

XII. APÉNDICE

Método óptico

(Tyrame) mM	Epinefrina 10mM			Colágena 4mg/mL	
	\bar{X}	DS	N	\bar{X}	DS
500	97.09	1.3	11	96.76	1.8
50	87.06	3	11	9.42	2.6
5	11.6	6.6	11	-1.14	3.9
0.5	-1.93	2.5	11	2.14	3.5
0.0001	1E-04	3.7	11	1E-04	3.9

Método de impedancia

Tyrame (mM)	Epinefrina (10mM)			Colágena (4mM)	
	\bar{X}	DS	N	\bar{X}	DS
500	95.63	1.2	11	90.4	8.8
50	17.22	6.6	11	9.11	7.3
5	7.67	9.4	11	11.83	5.9
0.5	6.77	7.4	11	7.36	4
0.0001	1E-04	6.2	11	1E-04	2.2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____

**Declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio titulado:
EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIAGREGANTE PLAQUETARIO DE UN
NUEVO ESTRÓGENO SUBSTITUIDO EN LA POSICIÓN 17- β (N[3-
HIDROXIESTRA1:3:5(10)-TRIEN-17 β -IL]-4-(2-AMINOETIL)-FENOL. (TIRAME)**

El estudio consiste en una toma de muestra de sangre venosa, lo cual no representa un riesgo agregado para mi persona. Los propósitos del estudio son identificar la actividad sobre las plaquetas de nuevos estrógenos, estos compuestos no favorecen la trombosis como lo hacen los demás estrógenos conocidos. El contar con estos posibles medicamentos permitirá que los enfermos que lo requieran puedan recibir estrógenos y no tengan trombosis como efecto colateral o adverso y beneficiar a pacientes con nuevos tratamientos.

Puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en el estudio.

Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme del presente estudio en el momento que así lo desee. En caso de que decidiera no participar, la atención que como paciente recibo en esta Institución no se verá afectada.

FIRMA

TESTIGO

TESTIGO

Fecha:

La carta de consentimiento informado de este trabajo de tesis fue elaborado para un control interno entre en área de investigación y el banco de banco de sangre

del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. Por lo que no se elaboró conforme a lo señalado en la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, del expediente clínico.