



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

LA CONCENTRACIÓN DE MICROPARTÍCULAS CIRCULANTES EN
POBLACIÓN GENERAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Arturo Leonel Mendoza Martínez



MÉXICO, CDMX

2016



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: Profesor: Natividad García Escamilla

VOCAL: Profesor: Araceli Mendieta Rergis

SECRETARIO: Profesor: Aurora de la Peña Díaz

1er. SUPLENTE: Profesor: Julio Cesar Martínez Álvarez

2° SUPLENTE: Profesor: Héctor Javier Pérez Cano

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ

DIRECTOR DE TESIS _____
AURORA DE LA PEÑA DÍAZ

SUPERVISOR TÉCNICO _____
MIRTHALA FLORES GARCÍA

SUSTENTANTE _____
ARTURO LEONEL MENDOZA MARTÍNEZ

Abreviaturas

a.a = aminoácidos

ADP = adenosín difosfato

AMPc = adenosinmonofosfato
cíclico

APS= persulfato de amonio

ATP = adenosín trifosfato

Ca²⁺ = calcio

CE = células endoteliales

EACA= ácido 6-aminocaproico

EDTA= ácido
etilendiaminotetraacético

INCICH = Instituto Nacional de
Cardiología Ignacio Chávez

Inhibidor del factor tisular = IFT

Mps = micropartículas

NO = óxido nítrico

PGI₂ = prostaglandina I₂

Plg = plasminógeno

PLQ = plaquetas

PMSF= fluoruro de
fenilmetilsulfonilo

PPP = plasma pobre en plaquetas

PRP = plasma rico en plaquetas

Fg = fibrinógeno

FS = fosfatidilserina

FT = factor tisular

FvW = factor de Von Willebrand

GMPc = guanosínmonofosfato
cíclico

GPIb = glucoroteína Ib

HEPES= 4-2-hidroxi-1-
piperazinil-etanosulfónico ácido

Residuos Gla = ácido gama-
carboxiglutámico

SDS = dodecilsulfato sódico

TEMED=N, N, N', N'-
tetrametiletildiamina

TP = tiempo de protrombina

t-PA = activador tisular de
plasminógeno

TTPa = tiempo de tromboplastina
parcial activado

TxA₂ = tromboxano A₂

u-PA = activador de plasminógeno
tipo urocinasa

Contenido

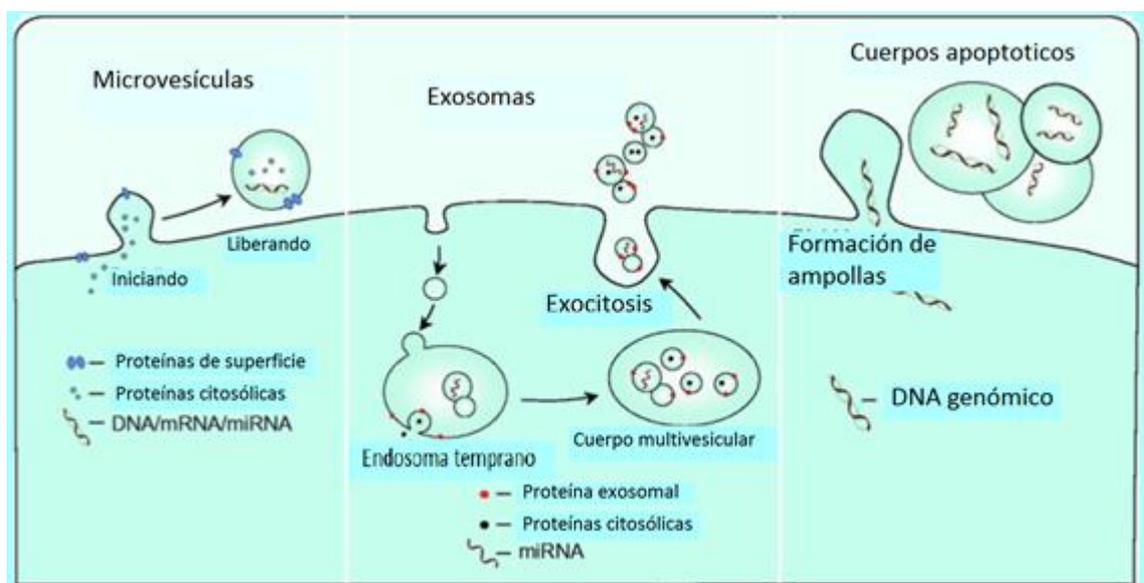
- Marco teórico	5
- Resumen	21
- Hipótesis	23
- Objetivo general	23
- Objetivos particulares	23
- Procedimiento experimental	24
- Resultados	29
- Análisis de resultados	35
- Conclusión	36
- Perspectivas	37
- Referencias	37

Marco teórico

En la sangre se encuentran gran variedad de elementos que permiten la actividad homeostática del organismo. Las vesículas extracelulares (VSE) surgen como un elemento que participa regulando una amplia gama de funciones.

Hay millones de VSE en la circulación de personas sanas, y su nivel puede aumentar en una variedad de patologías como el cáncer, inflamación, enfermedad cardiovascular, diabetes y preeclampsia, entre otras. Las vesículas extracelulares pueden dividirse en sub-grupos: los exosomas, Mps y cuerpos apoptóticos¹, como se observa en la Figura 1.

Figura 1. Grupos de VSE y sus diferencias



MODIFICADO DE: Lawson C, Vicencio JM. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. *J Endocrinol.* 2016; 228(2):R57-71²¹.

Los exosomas son vesículas intracelulares lumbinales (50 - 90 nm), procedentes de los endosomas, que se fusionan con la membrana plasmática de la célula y liberan su contenido a nivel paracelular y directamente en el torrente sanguíneo. Los cuerpos apoptóticos son más grandes que las Mps y que los exosomas. Éstos se caracterizan por externalizar fosfatidilserina (FS) ¹.

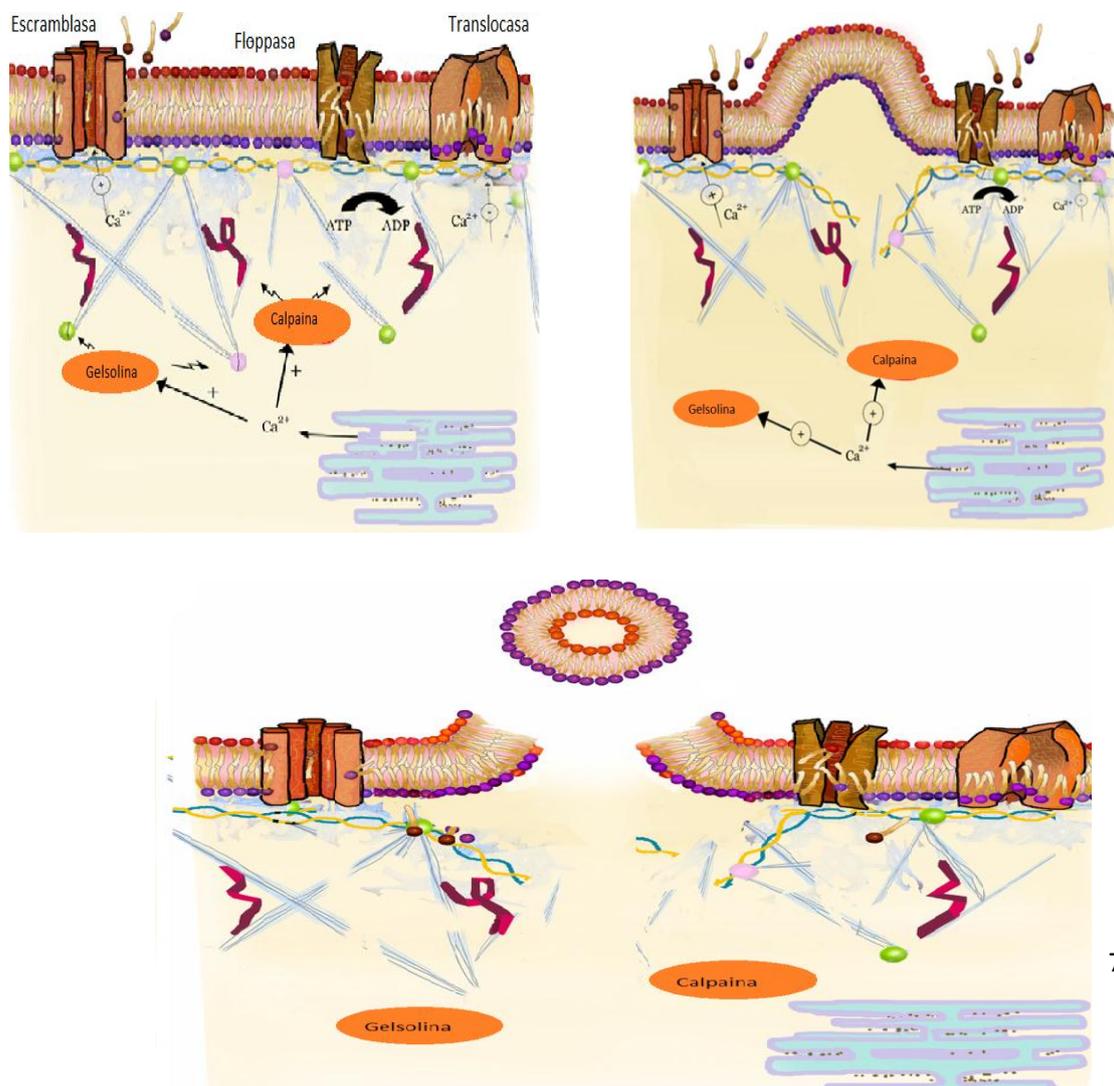
Las micropartículas que se encuentran contenidas en la sangre derivan de diferentes tipos celulares (plaquetas, monocitos, células endoteliales, etcétera). Éstas se forman por incisión proteolítica del citoesqueleto, su tamaño varia de 100 - 1000 nm de diámetro, siendo típicamente 200 nm ².

Las Mps participan en múltiples actividades fisiológicas, en particular en la regulación de la homeostasis vascular. Se ha propuesto que tienen un papel importante en la angiogénesis, la comunicación intercelular, la inflamación y la trombosis. Un aspecto relevante de las Mps es su capacidad de transportar moléculas bioactivas, proteínas y ácidos nucleicos (incluyendo mRNA y microRNA) de un sitio anatómico a otro, representando un vector directo de comunicación.

Las Mps se forman cuando se altera la distribución de la membrana plasmática, exponiendo así fosfatidilserina (FS) en el exterior de las Mps. En condiciones de reposo, la FS se encuentra casi exclusivamente en la cara interna de la membrana al igual que la fosfatidiletanolamina, mientras que la membrana externa esta enriquecida de fosfatidilcolina y esfingomielina ³. La pérdida de simetría de fosfolípidos surge durante la activación plaquetaria, la apoptosis y necrosis; esto resulta en la exposición de FS en la superficie celular externa.

Cinco enzimas se ven involucradas en la pérdida de la simetría de la membrana celular y en la formación de Mps; gelsolina (presente sólo en las plaquetas), aminofosfolipidotranslocasa, floppasa, escramblasa y calpaína. En condiciones normales estas enzimas mantienen un estado simétrico dinámico de la membrana. Por ejemplo: en la activación celular, el Ca^{2+} es liberado del retículo endoplásmico lo que conduce a la activación de calpaína y gelsolina. La calpaína escinde los filamentos largos de actina. La gelsolina rompe la tapa de actina de las proteínas. La elevada concentración de calcio activa también a la escramblasa e inactiva a la translocasa ⁴. En la figura 1 se observa la formación de Mps mencionándose las principales enzimas que participan en su formación.

Figura 2. Formación de Mps



(Tomado y modificado de Piccin A, G Willam, P Owen. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. Blood 2007, 21:157-171). En las imágenes se muestra la formación de Mps, con la participación de las enzimas responsables de la pérdida de la simetría de la membrana.

Es importante destacar que la presencia de FS aumenta significativamente la actividad procoagulante de Mps debido a que facilita el montaje de los componentes de la cascada de coagulación. Esto sucede gracias a la interacción electrostática entre los dominios GLA de las proteínas de la coagulación con la PS en la membrana. Las proteínas de la coagulación que contienen un dominio GLA son los factores VII (FVII), IX, X y la protrombina⁵.

Las micropartículas contienen tanto FS como FT (proteína procoagulante). El FT es el primer activador celular de la cascada de la coagulación; es una glicoproteína de superficie celular que se encuentra presente en la mayoría de las células no vasculares y tras un estímulo, son expresadas en la superficie de monocitos, neutrófilos y células endoteliales⁶. La PS en la superficie de Mps puede ser detectada mediante citometría de flujo.

Algunos investigadores han propuesto que las Mps en la sangre contienen FT en un estado de baja actividad para evitar una inadvertida activación de la cascada de la coagulación. Dicho estado de baja actividad podría ser debido a que los niveles de PS están por debajo del nivel óptimo para la plena actividad del FT⁴.

Actualmente el estudio de las Mps se ha dificultado debido al pequeño tamaño de las mismas, ya que no existe una técnica que pueda detectarlas de manera exacta. Sin embargo, existen métodos como la microscopía de fuerza atómica, la cual permite la observación de estructura de las Mps. La citometría de flujo es el método más comúnmente utilizado para analizar Mps, ya que es capaz de distinguir Mps de diferente origen celular. Desafortunadamente, esta técnica tiene limitaciones. La citometría de flujo no puede ser utilizada para detectar Mps menor de 300 nm de diámetro (dependiendo del umbral del equipo). Por otro lado, esta técnica permite la determinación de linaje celular utilizando anticuerpos de superficie de las Mps. Existen varios métodos, cada uno tiene diferentes limitaciones y hasta la fecha no existe ninguno que se considere óptimo⁷. Sin embargo, muchos investigadores consideran que determinar las Mps por ultracentrifugación evita el error de no medir las que tienen tamaño menor a 300 nm que quedarían fuera de la sensibilidad de la citometría de flujo, además de su bajo costo. En este proyecto se usó esta técnica para la determinación de Mps de las muestras. Utilizando una relación del investigador JM Freyssinet, la cual menciona que las Mps contienen 15 % de proteína (similar a las células eucarióticas). Los cálculos basados en el contenido de proteína Mps permiten estimación de que 1 mg/ml proteína corresponde a 8×10^5 Mps/ μ L de 0.25 μ m (de diámetro) o 1×10^5 Mps/ μ L (de 0.5 μ m de diámetro)⁶.

Las Mps participan en diferentes estados patológicos, su incremento se describe principalmente en los síndromes coronarios agudos, las neoplasias, la diabetes, el evento cerebrovascular isquémico y en la hipertensión arterial sistémica. Sin embargo, su ausencia también puede provocar manifestaciones

clínicas, como ocurre en el síndrome de Scott, que se manifiesta como trastornos hemorrágicos⁴.

En pacientes con cáncer, se han encontrado niveles altos de Mps procoagulantes y con ellos un mayor riesgo de trombosis. Es muy probable que el FT que contienen las Mps son un disparador para la trombogénesis⁴.

Por su contenido de FS las Mps proporcionan una superficie catalítica para promover el ensamblaje de los complejos de enzimas característicos de la cascada de coagulación⁸.

La hemostasia es un mecanismo estrictamente regulado que garantiza el mantenimiento del flujo sanguíneo en condiciones fisiológicas, también permite la rápida respuesta al daño tisular. Cuando el endotelio se daña, las plaquetas se activan, se adhieren simultáneamente y se activa lo que se conoce como coagulación, que culmina en la producción de fibrina y forma una malla sobre el tapón de plaquetas, sellando el sitio de la lesión⁹. Las células endoteliales (CE) que recubren la exposición de la pared vascular muestran propiedades antitrombóticas proporcionadas por múltiples factores como son: glicosaminoglicanos similares a la heparina con carga negativa, fosfolípidos neutros, síntesis y secreción de inhibidores de plaquetas, inhibidores de la coagulación y activadores de la fibrinólisis. En contraste, la capa subendotelial es altamente trombogénica y contiene colágeno, factor de von Willebrand (FvW) y otras proteínas como la laminina, trombospondina y vitronectina que están implicadas en la adhesión de plaquetas¹⁰.

El sistema de la coagulación junto a los mecanismos de retroalimentación de las plaquetas, asegura la eficacia hemostática, mientras

que el sistema fibrinolítico actúa como regulador del sistema, eliminando la fibrina que ya no es necesaria. La hemostasia depende del buen funcionamiento de estos sistemas, si existe un déficit en los factores de la coagulación o si el potencial fibrinolítico sobrepasa el de la coagulación, se produciría una hemorragia. Por el contrario, si el potencial de la coagulación sobrepasa al fibrinolítico o existe una disminución en los inhibidores de la coagulación, se producirá una trombosis ¹¹.

El proceso de la hemostasia se puede dividir en primario y secundario. En el proceso primario, las células endoteliales (CE) de los vasos sanguíneos que están en constante contacto con la sangre, secretan diversas sustancias, tales como el óxido nítrico (NO) y prostaglandina I₂ (PGI₂) que inhiben la agregación y la degranulación plaquetaria. Esto se logra mediante el aumento de niveles intraplaquetarios de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) y guanósínmonofosfato cíclico (GMPc) ¹².

El proceso primario tiene lugar a los pocos segundos de producirse el daño vascular y las plaquetas son el participante esencial de este caso. Las plaquetas son células anucleadas, discoides, con un diámetro de entre 0.5 a 3 µm, con un tiempo de vida media de 7 a 12 días, derivadas de los megacariocitos de la médula ósea. Internamente se componen de tres tipos de gránulos (alfa, densos y lisosomales), un rígido citoesqueleto de actina, mitocondrias y un sistema tubular denso que sirve como almacén de calcio (Ca²⁺) ⁴. Los gránulos alfa contienen: P-selectina, fibrinógeno, fibronectina, factor V (FV), FVIII, factor plaquetario IV, factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento tumoral-α. Los gránulos densos contienen:

adenosín trifosfato (ATP), adenosín difosfato (ADP), Ca^{2+} , serotonina, histamina y epinefrina ¹⁰.

La formación del tapón primario se desarrolla por la liberación de factor de von Willebrand (FvW) de los gránulos de Weibel-Palade. Este factor se une al colágeno de la superficie subendotelial. La pérdida de la capa de las CE, también conduce a la exposición de colágeno y factor tisular (FT) de las células que se exponen. El FvW liberado interactúa con el complejo de la glicoproteína Ib-IX-V (GPIb-IX-V) de las plaquetas y su dominio A1 para la inmovilización de las plaquetas. Esta adherencia es estable gracias a dos integrinas plaquetarias $\alpha 2\beta 1$ (GPIa-IIa) y GPIIb-IIIa que se unen directamente al colágeno expuesto. Estas tres glicoproteínas (GPIb-IX-V, $\alpha 2\beta 1$ y GP IIb/IIIa) conducen a la inmovilización de las plaquetas. Posteriormente se activa la integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$ que es sintetizada por las plaquetas y es el receptor del fibrinógeno (Fg). Todo ello culminando en la formación del tapón plaquetario. Finalmente, la membrana interna de la plaqueta cambia de orientación y externaliza la fosfatidilserina (FS), que actúa como una superficie procoagulante para la unión de factores de la coagulación ¹².

El tromboxano A2 (TxA2), el cual es producido por las plaquetas activas, proporciona un estímulo amplificador de la respuesta. El TxA2, así como el ADP, aumenta el agregado de plaquetas que conduce a la formación del tapón plaquetario que sella la lesión vascular temporalmente. El ADP también causa un cambio conformacional en los receptores GP IIb/IIIa presentes en la superficie de las plaquetas, causando así la degradación de fibrinógeno. La prostaciclina inhibe la agregación plaquetaria, por lo que el equilibrio entre

TxA2 y prostaciclina conduce a la agregación de plaquetas localizada, impidiendo la extensión del coágulo y manteniendo la permeabilidad de la luz del vaso ¹⁰.

El proceso secundario de la hemostasia es la generación de fibras de fibrina, es decir, darle una estabilidad al tapón primario. La formación de fibrina involucra diversos pasos enzimáticos que concluyen con la generación de trombina, que convierte el fibrinógeno en fibrina¹³.

A través de los años se ha intentado descubrir el mecanismo de la coagulación ¹⁴. En el año de 1904 Morawitz propuso un esquema de coagulación sanguínea y afirmó que los tejidos vasculares liberaban una tromboplastina tisular posterior a la lesión. Propuso también cuatro componentes esenciales para la coagulación: protrombina, FT, Ca²⁺ y tromboplastina. Descubrió la presencia de antitrombinas. Ya en los años 60 dos grupos de investigadores desarrollaron un modelo de coagulación donde se generaba una activación secuencial de los factores de coagulación, describiendo como resultado de la formación trombina. En este modelo las vías de coagulación fueron divididas en dos: intrínseca y extrínseca. Ambas convergen en una vía común ³. Este modelo de la cascada de la coagulación es de gran utilidad en el laboratorio para estudiar la coagulación sanguínea, ya que nos permite evaluar la funcionalidad tanto de la vía extrínseca (a través de la medición del tiempo de protrombina) como de la vía intrínseca (a través de la medición de tromboplastina parcial activada) ¹³.

La nomenclatura internacional de los factores plasmáticos de la coagulación se presenta utilizando los números romanos. El número se asignó

en el orden que fueron descubiertos; sin embargo, el factor VI (FVI) no ha sido asignado. Algunos factores no han sido numerados y conservan su nombre, como la precalicreína y su forma activa calicreína, y el cininógeno de alto peso molecular (CAPM). El sufijo “a” después del número romano, indica su forma activa. Para facilitar el estudio de los factores de la coagulación se clasificaron de acuerdo a sus propiedades generales: dependientes de vitamina K, no dependientes de vitamina K y cofactores.

Los factores que requieren de vitamina K para su síntesis completa son: FV, FVII, FIX y FX, así como las dos proteínas reguladoras: proteína C y proteína S. Todas contienen una estructura homóloga y contienen de 10 a 12 residuos Gla (ácido gama-carboxiglutámico) los cuales son carboxilados a ácido-carboxiglutámico; éstos son importantes para la unión del Ca^{2+} y para la interacción de las proteínas mencionadas con fosfolípidos plaquetarios (ambos procesos dependientes de vitamina K) ¹. Los factores no dependientes de vitamina K son: precalicreína, FXI, FXII y FXIII. En la tabla 1 se muestra la nomenclatura de las proteínas de la coagulación¹⁴.

Tabla 1. Nombre y número de factor de las proteínas que participan en la cascada de la coagulación.

	Factor Sinónimo	Vida media (horas)	Concentración plasmática (µg/mL)
Factor I	Fibrinógeno	72 - 120	2000 – 4000
Factor II	Protrombina	60 - 70	100 – 150
Factor V	Proacelerina, factor lábil	12 - 16	5 – 10
Factor VI	No asignado	-	-
Factor VII	Proconvertina, autoprotrombina I	3 – 6	0 – 5
Factor VIII	Factor antihemofílico A, globulina antihemofílica	8 - 12	0 - 1
Factor IX	Factor de Christmas, autoprotrombina II, factor antihemofílico B.	18 - 24	4 - 5
Factor X	Factor de Stuart-Prower, trombocinasa, autoprotrombina III.	30 - 40	8 - 10
Factor XI	Antecedente tromboplástico del plasma	52	5
Factor XII	Factor de Hageman	60	30
Factor XIII	Factor estabilizante de la fibrina, protransglutamidasa,	4 – 8	10
FT	Factor tisular		
Precalicroína	Factor de Fletcher	35	30 - 50
Cinínogeno de alto peso molecular	Factor de Fitzgerald-Williams-Flaujeauc	150	70 - 90

(Tomado y modificado de Martínez-Murillo C. Mecanismos de activación de la coagulación. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2006; 44 (Supl 2): 51-58).

Con base en los descubrimientos de los últimos años, el modelo de la cascada de la coagulación resulta inconsistente para la explicación de las vías fisiológicas de la hemostasia, por lo tanto, Hoffman y otros investigadores han propuesto un modelo denominado modelo celular de la coagulación. Este modelo se divide en tres diferentes etapas: iniciación, amplificación y propagación.

Iniciación. El vaso sanguíneo dañado contiene células que expresan FT, el cual entra en contacto con la sangre que contiene FVII. Al interaccionar estas dos moléculas, se activa el FVII (FVIIa); el complejo que se forma de FT-FVIIa conduce a la formación de protrombina que da como resultado la formación de trombina. Este proceso también da inicio a la activación de FIX¹². La trombina es una potente enzima serina proteasa, y su activación involucra una serie de reacciones entre las proteasas y los componentes celulares.

Amplificación. La trombina generada de la iniciación, se une a su receptor glucoproteína Ib (GP Ib; presente en la superficie de las plaquetas cercanas), esto provoca la escisión de la proteína proteasa activadora 1 (PAR-1), la cual se obtiene gracias a la activación y degranulación de las plaquetas. La trombina también activa directamente a los factores V, XI y VIII (liberándolo del FvW)¹².

Propagación. En esta fase todos los factores de la coagulación requeridos se encuentran activados en la superficie de las plaquetas. La primera etapa es el “complejo diezasa” (que consiste en FIXa, FVIIIa y Ca²⁺). El FXIa activa una

mayor cantidad de FIX en la superficie de las plaquetas con respecto al que se formó durante la iniciación. El FXa en la membrana de la plaqueta forma un complejo con FVa y Ca^{2+} , conocido como “complejo de protrombinasa”. Este complejo tiene mucha mayor avidez para la conversión de protrombina a trombina que conduce a una “explosión de trombina”. La explosión de trombina tiene varios roles en la formación de un coágulo estable. El primero es cortar los fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno para formar fibrina. Este proceso expone los sitios de reconocimiento permitiendo la polimerización de los filamentos de fibrina con trombina activada, lo que conduce a una mayor estabilidad del coágulo. La trombina también rompe el receptor PAR-4 de las plaquetas causando más degranulación y retracción del coágulo antes de quedar incorporado dentro de la estructura del coágulo en desarrollo ¹².

Resulta de suma importancia limitar la generación de trombina al sitio de lesión endotelial. El exceso de trombina generado en la circulación es inhibido por la antitrombina. La antitrombina es un importante inhibidor de serin proteasa que circula a una alta concentración en el plasma. De igual manera resulta con el inhibidor de la vía del factor tisular (IFT), el cual inhibe al factor VIIa que no se encuentra unido a las células liberadoras del FT o a las plaquetas activadas. Por otra parte, la trombina se autoregula al unirse a la trombomodulina para así activar a la proteína C, la cual impide la generación de nuevas moléculas de trombina al escindir irreversiblemente el factor Va y el factor VIIIa. Esta proteína requiere de un cofactor: la proteína S, que va a actuar aumentando la afinidad de la proteína C por la membrana celular. La proteína C inhibirá al factor Va en un endotelio no dañado, no así cuando se encuentre sobre una plaqueta activada. El complejo proteína C - proteína S

también inactiva a un importante inhibidor de la fibrinólisis, el inhibidor del activador de plasminógeno o t-PA1. La fibrinólisis es esencial para disolver el coágulo formado por el mecanismo hemostático ¹¹.

La fibrinólisis es el proceso a través del cual se disuelve el coágulo formado. El proceso asegura la localización adecuada de la formación de coágulo de fibrina y su posterior eliminación en la cicatrización de heridas. La principal enzima proteasa del sistema fibrinolítico es la plasmina, que es secretada por el hígado en la forma de plasminógeno inactivo. El plasminógeno es convertido en plasmina por dos activadores: el activador tisular de plasminógeno (t-PA) y activador de plasminógeno tipo urocinasa (u-PA). El t-PA es sintetizado y secretado por las células endoteliales; procesos inducidos por la protrombina, histamina, adrenalina, ejercicio y la oclusión venosa. El u-PA es sintetizado por las células endoteliales, macrófagos, células epiteliales renales y algunas células tumorales. Éste se secreta como zimógeno de una sola cadena (pro-uroquinasa) que requiere la activación por parte de la calicreína o la plasmina. Tanto plasminógeno como el t-PA son capaces de unirse a la fibrina a través de sitios de alta afinidad a la lisina, la cual forma parte de su estructura. Este proceso no sólo delimita la fibrinólisis, sino también aumenta la actividad catalítica de t-PA frente al plasminógeno. En la formación de plasmina hay un bucle de retroalimentación positiva en la que la plasmina actúa tanto con t-PA como con u-PA tornando a las cadenas dobles polipeptídicas más activas. La plasmina es capaz de hidrolizar una variedad de sustratos, como estos principales blancos de vida: fibrinógeno y la fibrina. Este proceso de degradación es secuencial, en el caso del fibrinógeno implica la eliminación de péptidos pequeños (fragmentos A, B y C). Esto

resulta en la formación del fragmento X, el cual sufre más específicamente un corte en el menor fragmento no-trombincoagulable Y, D y finalmente el fragmento E. La fibrina estable, gracias a la presencia del factor XIII es cortada por la plasmina en productos de fibrina degradada (PFD) y dímeros D ¹².

La inhibición de la fibrinólisis se produce a diferentes niveles. Por una parte, están los inhibidores de los activadores del plasminógeno: el principal inhibidor de la fibrinólisis in vivo es el inhibidor del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) que se sintetiza en el endotelio vascular y en el hígado ³. PAI-1 es una glicoproteína de 50 KDa que está conformada por 359 aminoácidos (a.a) y pertenece a la súper familia de las inhibidoras de serina proteasas. PAI-1 es el principal inhibidor de u-PA y t-PA. La interacción PAI-1 con u-PA provoca la inhibición de la actividad de proteasa de u-PA, por lo tanto, no transforma el plasminógeno en plasmina y se inhibe la fibrinólisis ¹².

Se ha descrito, también, otro mecanismo que regula negativamente la activación del plasminógeno y es la vía del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI). Es una enzima hepática que se encuentra en los gránulos de las plaquetas, forma parte de la familia no serpina. Para su activación, se requiere del complejo de trombina-trombomodulina y actúa mediante la eliminación de sitios de unión de lisina a fibrina de plasminógeno y t-PA que conduce a la inhibición de la fibrinólisis. Los residuos de los aminoácidos exhibidos en la superficie de la fibrina parcialmente degradada, sirven de anclaje al plasminógeno y al t-PA. Cuando el plasminógeno y el t-PA coinciden en la superficie del coágulo de fibrina, se produce la conversión del plasminógeno a plasmina. A este nivel el TAFI, una vez activado por la

trombina (TAFIa), es capaz de eliminar los residuos de lisina y arginina de la superficie de la fibrina, impidiendo la formación de plasmina.

Otro nivel que se regula la actividad proteolítica de la plasmina es por la acción de la α_2 -antiplasmina, su principal inhibidor fisiológico. Se trata de una enzima secretada por el hígado que pertenece a la gran familia de las inhibidoras de las proteasas ¹².

Los coágulos hemostáticos se localizan en la pared del vaso y no perjudican en gran medida el flujo sanguíneo en el vaso. En contraste, los coágulos trombóticos dan lugar a un deterioro de flujo sanguíneo e incluso la oclusión completa del vaso. Eventos trombóticos son comúnmente el resultado de una respuesta patológica a la lesión vascular, tales como ruptura de la placa aterosclerótica, la principal causa de trombosis arterial ².

Resumen

En la actualidad, el estudio de las micropartículas ha tomado gran relevancia, puesto que se han encontrado nuevas propiedades, funciones y usos.

Sin embargo, al encontrarse presentes estas Mps en el organismo, podrían ser un blanco terapéutico. Al momento, no existen valores de referencia de Mps en personas sanas, por ende, este trabajo, se enfocó en la cuantificación de micropartículas circulantes, en donadores de banco de sangre considerando que el interrogatorio médico que realizan antes de la donación, así como los resultados de pruebas serológicas, permitieron asumir que son personas sanas.

El estudio inicia con la extracción de la muestra de sangre periférica de las personas que acuden a donar al banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Estos donadores, cumplieron con los criterios descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos y el consentimiento para participar en el estudio.

Se analizaron 673 muestras de donadores de sangre, entre 18 y 64 años de edad. Se formaron dos grupos según el género (hombre y mujer) y tres categorías dependiendo de la edad como se aprecia en la Tabla 2. De cada muestra se obtuvieron las micropartículas mediante centrifugación diferencial. Las muestras se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se descongelaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, proceso que se repitió tres veces, para romper la membrana y permitir la lectura de proteínas presente en la muestra, en un espectrofotómetro a 280 nm. Esta

lectura es equivalente a 1 µg de proteína por mL, y para calcular el número de Mps presentes en la muestra en Mps/µL debe multiplicarse por 8×10^5 según las observaciones de JM FREYSSINET (Freyssinet J, Toti F. Membrane microparticle determination: at least seeing whats being sized!. J Thromb Haemost, 2009; 8: 311.314).

Se emplearon pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas dependiendo de la distribución de las variables.

Los resultados nos permitieron estimar que los hombres menores de 35 años presentan la cifra más alta de Mps. Sin embargo, en las mujeres mayores de 50 años se incrementa la cifra en relación a las menores de 35 años.

Además de las cifras también es importante considerar la actividad que puedan exhibir estas vesículas que se consideran como un vector de comunicación y que podrían alterar entre otros parámetros, la actividad hemostática de los individuos. Como perspectiva de este trabajo podría señalar el interés en estudiar la actividad protrombótica de las Mps en la población abierta. Por este motivo me introduje en la purificación de fibrinógeno y plasminógeno, materiales necesarios para el desarrollo de dos técnicas que exploran la actividad de las Mps en la coagulación y fibrinólisis.

Entre las diversas técnicas que pueden emplearse para este fin, en este trabajo identifique, sin ser el objetivo de la tesis, la actividad fibrinolítica de algunas muestras por el método de zimografía.

Hipótesis

Tanto la edad como el género modifican la concentración de micropartículas circulantes de personas sanas.

Objetivo general

Determinar la concentración de micropartículas circulantes en donadores de banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología e identificar, si la edad y/o el género son factores que modifican su concentración plasmática.

Objetivos particulares

1. Recolectar muestras de donadores del banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología
2. Extraer micropartículas de las muestras recolectadas, mediante centrifugación diferencial.
3. Cuantificar la concentración de proteína de micropartículas.
4. Analizar los datos obtenidos con el programa estadístico SPSS.
5. Extraer fibrinógeno, determinar su concentración y porcentaje de coagulabilidad de este para su utilización en pruebas posteriores.
6. Obtener plasminógeno para su utilización en pruebas posteriores.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se analizaron las muestras de sangre que provenían de 673 donadores que cumplieron con los criterios descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012 (Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos).

Este estudio se realizó de acuerdo a la Declaración de Helsinki ¹⁵.

- Obtención de plasma de personas que llegan a donar al banco de sangre.

Se tomaron 2 muestras de sangre mediante venopunción, en tubos con citrato de sodio al 3.2 % como anticoagulante a donadores que acuden al banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICh). Posteriormente, se centrifugaron a 940 gravedades (g) por 15 min y se separó el plasma del paquete globular, para después recentrifugarlo a 12000 g por 2 min. Seguido de esto, se realizaron alícuotas de 500 µL.

- Extracción de micropartículas

Se centrifugaron a 20000 g por 90 min a 4 °C. Posteriormente, se realizaron 2 lavados (bajo las mismas condiciones) con buffer Hepes (HEPES 10 mM y NaCl 0.14 M; pH = 7.4). Las Mps se resuspendieron en el mismo buffer y se congelaron a - 70 °C hasta su utilización.

- Cuantificación de Mps

Las Mps se sometieron a choque térmico durante 5 ciclos y se procesaron en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro para microplacas modelo EON, marca BioTek) a una longitud de onda de 280 nm. Con base en la relación del

investigador JM Freyssinet donde se menciona que las Mps contienen ~ 15 % de proteína (similar a las células eucarióticas), los cálculos simples basados en el contenido de proteína Mps permiten estimación de que 1 mg/mL proteína corresponde a 8×10^5 Mps/ μ L de 0.25 μ m de diámetro o 1×10^5 Mps/ μ L de 0.5 μ m de diámetro.

- Extracción de fibrinógeno (Método de Kazal)

(Kazal LA, Amsel S, Miller OP, Tocantins LM. The preparation and some properties of fibrinogen precipitated from human plasma by glycine. Proc Soc Exp Biol Med 1963; 113: 989-984.)

Se descongeló una bolsa de 400 mL de plasma a 37 °C, se le adicionó sulfato de bario (BaSO₄) 90 g/L por 1 h e inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, aprotinina 100 KUI/mL, EDTA 2 mM, EACA 2 mM y benzamidina 1 M). Se volvió a agregar BaSO₄, se centrifugó a 1200 g por 10 min y al sobrenadante (SN) se le agregaron inhibidores. Se adicionó glicina 165.15 g/L por 1 h y se centrifugó a 1200 g por 20 min, el botón obtenido se reconstituyó con amortiguador de citratos (Na₃C₆H₅O₇ 0.05 M y NaCl 0.5 M; pH 7.4) con inhibidores (EDTA 2 mM, aprotinina 10 KIU/mL, EACA 150 mM). Posteriormente, se volvió a precipitar con glicina, centrifugar y reconstituir en las mismas condiciones. Se adicionó sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) (144 g/L) por 2 h y se centrifugó a 1200 g por 20 min. El botón obtenido se disolvió en 1 mL de amortiguador de citratos y se dializó en buffer HEPES (NaCl 0.5mM y HEPES 0.002mM).¹⁶

- Determinación de concentración de fibrinógeno

Se realizó una dilución (1:20) con amortiguador de citratos y se leyó en un espectrofotómetro a 280 nm.

- Prueba de coagulabilidad del fibrinógeno

Se prepararon 5 muestras. Tubo 1: amortiguador para coagulabilidad (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 80 mM, tween 20 0.01 % y azida de sodio 0.01 %; pH = 7.4), tubo 2: Fg + amortiguador, tubo 3: amortiguador + trombina (5 UI/mL) y tubo 4: Fg + trombina. Las muestras se diluyeron 1:20 y se incubaron por 30 min a 37 °C. Posteriormente se centrifugaron a 1200 g por 10 min y se leyeron a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro. Los resultados obtenidos se introdujeron en la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de coagulabilidad:

$$\% \text{ de coagulabilidad} = 100 - \left[\frac{(Fg + trombina) - (trombina + amortiguador)}{(Fg + amortiguador)} \times 100 \right]$$

- Prueba de integridad de Fg. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS Page)

(Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 1970; 227: 680-685.)

Se realizó un gel de poliacrilamida al 8 % de gel separador y 4 % de gel concentrador. Utilizando una solución de acrilamida/bisacrilamida al 30 %, agua destilada, Tris 1.5 M, SDS 10 %, APS 10 % y TEMED 5%. Se trabajó con una concentración final de 2 mg/mL en condiciones reducidas (100 °C por 5 min). La electroforesis se realizó a 125 v hasta ¾ partes del gel separador, para así cambiarlo a 75 v. Se utilizó amortiguador de migración (Tris base 0.02 M,

glicina 0.19 M y SDS 0.003 M) posteriormente se realizó tinción durante 30 min con colorante (azul de coomasie, metanol 25 %, ácido acético 10 % y agua bidestilada 65 %) y se decoloró con solución que contiene metanol 25 %, ácido acético 10 % y agua bidestilada 65 % por 30 min ¹⁷.

- Obtención de Plasminógeno

(Deutch D, Mertz ET. Plasminogen purification from human plasma by affinity chromatography. Science 1970; 170: 1095-1096.)

Se descongeló el plasma a 37 °C. Por otro lado, se equilibró la columna de lisina-sepharosa 4B con amortiguador de alta fuerza iónica (fosfatos 50 mM, NaCl 0.5 M, EDTA 2 mM y trasylol 10 KIU/mL; pH = 7.4). Al plasma se le agregaron inhibidores de proteasas y se centrifugó a 2000 g a 4 °C por 15 min. Se filtró el sobrenadante y se dejó pasar por la columna de lisina-sepharosa 4B con una velocidad de flujo de 20 mL/h y se adicionó amortiguador de equilibrio hasta llegar a una densidad óptica = 0. Posteriormente, la columna se lavó con amortiguador A (fosfatos 50 mM, NaCl 80 mM; pH= 7.4) hasta que la absorbancia del líquido que sale de la columna sea igual a la del amortiguador. Posteriormente, se adicionó amortiguador A con inhibidores a la misma velocidad de flujo y se encuentran los picos correspondientes al Pg. El Pg se precipitó con (NH₄)₂SO₄ (0.32 g/mL) y se centrifugó a 12000 g por 20 min. Se resuspendió el precipitado en un volumen de 2 mL de amortiguador A. El volumen anterior se dejó pasar por la columna de shephadex G-25 con una velocidad de flujo de 20 mL/h. Las muestras recolectadas fueron homogeneizadas y se trataron con (NH₄)₂SO₄ (0.32 g/mL) por 4 h a 4 °C. Se centrifugó a 1200 g y el precipitado se resuspendió con amortiguador A. Se dializó esta solución en amortiguador A por 12 h a 4 °C y se guardó a -80 °C. ¹⁸

- Determinar la concentración.

Se diluyó el plasminógeno obtenido de la purificación a 1/20 con amortiguador A. Posteriormente se determinó la absorbancia a 280 nm. Utilizando su coeficiente de extinción molar (1.68), y los factores de dilución correctos, podemos determinar la concentración de nuestro plasminógeno.

- Detección funcional de contaminantes

Se empleó un agente cromogénico en una placa de PVC 25 μ L de plasminógeno a 400 nM más amortiguador A hasta tener un volumen de 50 μ L en cada pozo, esto se realizó por triplicado y se realizaron lecturas a 24 h, 48 h, y 72 h a una longitud de onda de 405 nm. La presencia de plasmina se hace evidente cuando existe desarrollo de color (amarillo) que se detecta por las lecturas en el espectrofotómetro.

Zimografía

Se realizó un gel de acrilamida/bisacrilamida al 8 %; utilizando una solución de acrilamida/bisacrilamida 30 %, agua destilada, Tris 1.5 M, SDS 10 %, APS 10 % y TEMED. Se trabajó con una concentración final de 100 mg/mL. La electroforesis se realizó a 125 v hasta $\frac{3}{4}$ partes del gel separador, para así cambiarlo a 75 v esto en un amortiguador de migración (Tris base 0.02 M, glicina 0.19 M y SDS 0.003 M).

El otro fue un gel de fibrinógeno-agar a 37 °C se preparó una solución de: Fg (20 mg/mL), trombina (10 UI/mL) amortiguador (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, azida de sodio 0.01 %; pH=7.4), la cual se mezcló

con agar (400 mg) se homogeneizo y coloco en un caja de plástico transparente, se dejó reposar 5 min y se guardó a 4 °C por 30 min.

El gel de poliacrilamida se colocó sobre el gel de fibrinógeno agar, se incubo a 37 °C y se tomaron fotos durante la incubación.

Resultados

Las variables paramétricas se expresan como promedios y desviación estándar.

La concentración de Mps se analizo con Kolmogorov-Smirnov, Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney; se reportaron con mediana (mínimo-máximo). Valor de *P \leq 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Programa IBM SPSS Statisticv21.

Se formaron los siguientes grupos de hombres y mujeres con los siguientes rangos de edad:

Tabla 2. Grupos de edad de los diferentes géneros de cada grupo.

Grupo	Mujeres	Hombres
Categoría 1	18-34 años	18-34 años
Categoría 2	35-49 años	35-49 años
Categoría 3	50- 64 años	50- 64 años

Tabla 3. Resultados de variables del estudio según el género.

Variable	Hombres (473)	Mujeres (200)	P
[] Mps x10⁴ (Mps/μL)	12 (0.08- 184)	9.6 (0.32 - 104)	0.027
Edad (edad)	49 (19 - 64)	46.5 (18 - 63)	NS
IMC (kg /m²)	28 (18.8 - 45.5)	27.6 (19 - 46.1)	NS
Glucosa (mg/dL)	93.5 (60 - 167)	96 (74 - 144)	NS
Hb (g/dL)	16.7 ± 1.1	14.7 (10.7 - 17.6)	NS
Hto (%)	49.8 ± 3.5	44.4 ± 3.2	NS
McV (fL)	90.2 (68.3 - 109)	89.4 (73.9 - 108)	NS
McH (pG)	30.4 (20.3 - 39)	29.8 (22 - 40.3)	NS
Plaquetas (x10⁹ Plq/L)	227 (69.8 - 482)	262.5 (126 - 455)	NS
VPM (μm³)	7.7 (4.2 - 16.7)	7.6 (4.6 - 13.9)	NS

Nota: [] Mps (concentración de micropartículas), IMC (índice de masa corporal), Hb (hemoglobina), Hto (hematocrito), McV (volumen corpuscular medio) McH (*Hemoglobina corpuscular media*), VPM (volumen plaquetario medio) y NS (no significativo).

Tabla 4. Resultados de variables por grupos de edad y género

Variable	Grupo 1 (18 - 34 años)		Grupo 2 (35 - 49 años)		Grupo 3 (50 - 64 años)	
	Mujeres (N = 24)	Hombres (N = 16)	Mujeres (N = 102)	Hombres (N = 235)	Mujeres (N = 74)	Hombres (N = 222)
[] Mps $\times 10^4$ (Mps/ μ L)	5.6 (0.64 - 35.84)	12.96 (0.72 - 71.76)	9.6 (0.32 - 72)	9.6 (0.08 - 136)	10.4 (0.32 - 104)	8 (0.32 - 190.8)
Edad (edad)	24.5 \pm 4.7	25.2 \pm 4.48	44 (35 - 49)	44 (36 - 49)	55 (50 - 63)	53 (50 - 64)
IMC (kg /m2)	25.9 \pm 2.9	26.5 \pm 3.9	28.7 (19 - 46.1)	28.9 \pm 3.8	27.8 \pm 4.6	28.1 \pm 3.1
Glucosa (mg/dl)	91 \pm 9.4	81.8 \pm 9.7	98.4 \pm 11.9	95 \pm 11.9	99 \pm 13.5	93 (60 - 167)
Hb (g/dL)	14.6 \pm 1.1	17 \pm 0.96	14.6 \pm 1.1	16.7 \pm 1	14.7 (10.8 - 17.5)	16.7 \pm 1.2
Hto (%)	44.5 \pm 3.5	51.8 \pm 4.29	44.1 \pm 3.2	49.5 \pm 3.4	44.7 \pm 3.1	49.9 \pm 3.6
McV (fL)	87.3 \pm 3.2	89.6 (86 - 99.8)	89.3 (73.9 - 108)	89.5 \pm 3.4	90.4 (77.6 - 97.2)	90.9 (72.2 - 109)
McH (pG)	28.7 \pm 1.4	29.9 \pm 1.4	29.7 (22 - 40.3)	30.1 (20.3 - 34)	30.1 \pm 1.9	30.9 (22.1 - 39)
Plaquetas ($\times 10^9$ Plq/L)	273.2 \pm 56.7	236.9 \pm 43.2	272.8 \pm 62.5	230.6 \pm 52.1	252.8 \pm 53.6	232.1 \pm 53.7
VPM (μ m ³)	8.1 \pm 1.4	9.13 \pm 2.1	7.6 (4.91 - 12.2)	8 (4.2 - 14.6)	7.5 (4.6 - 13.9)	7.6 (4.9 - 16.7)

Nota: [] Mps (concentración de micropartículas), IMC (índice de masa corporal), Hb (hemoglobina), Hto (hematocrito), McV (volumen corpuscular

medio) McH (*Hemoglobina corpuscular media*) y VPM (volumen plaquetario medio).

Tabla 5. Valor de P al comparar concentración de Mps, de las diferentes categorías, al emplearse un U de Mann- Whitney.

Categorías de comparación	Hombre P	Mujer P
1 vs 2	0.673	0.018
2 vs 3	0.013	0.975
3 vs 1	0.242	0.037

Imagen 1. Gel de acrilamida-bisacrilamida que representa las tres bandas de fibrinógeno.

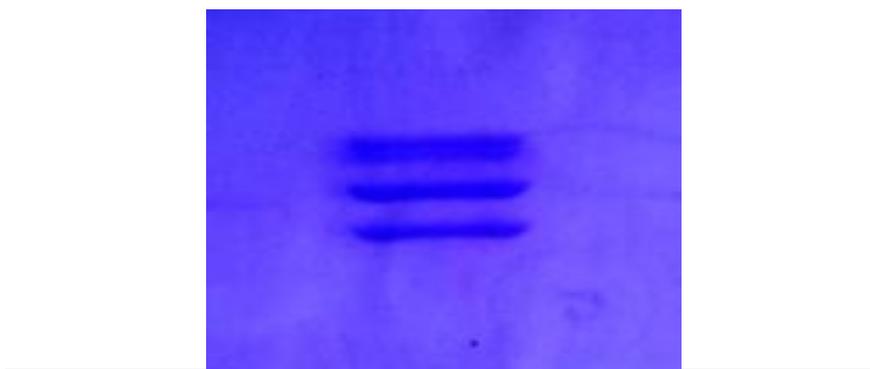


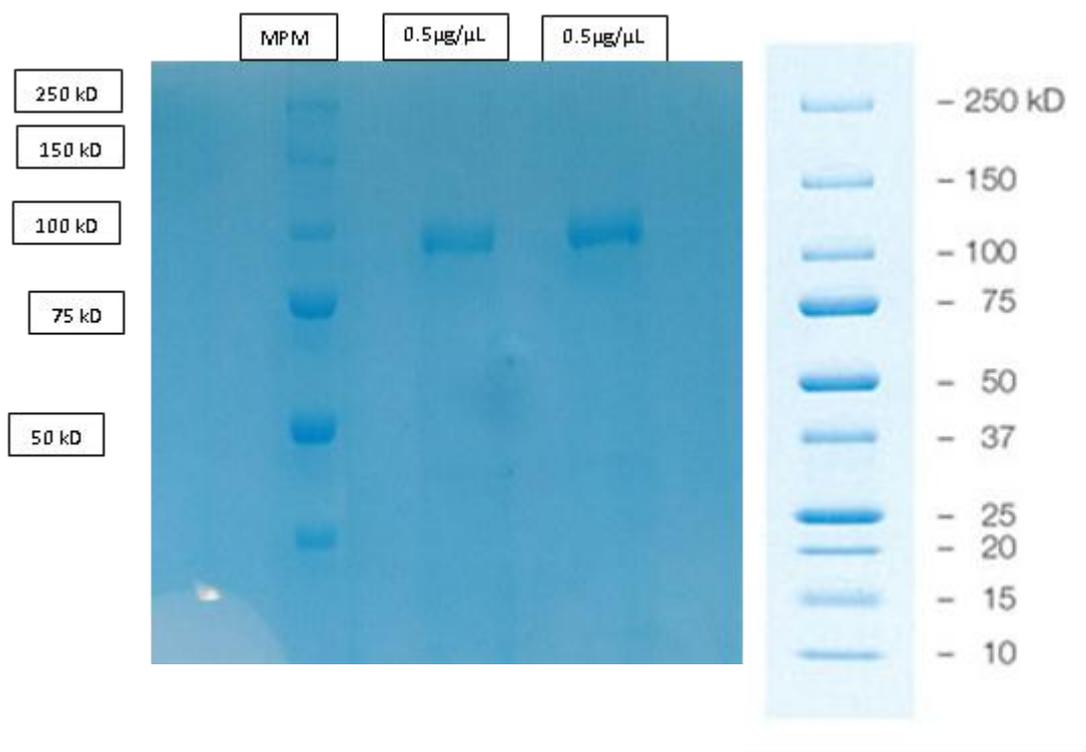
Tabla 6. Generalidades de fibrinógeno extraído en el laboratorio

Numero de fibrinógeno	Concentración (mg/mL)	Coagulabilidad (%)
1	12.06	100.9
2	7.49	103.4
3	16.72	101.0
4	9.05	104.3
5	8.43	99.8
6	9.28	95.7
7	8.78	101.3
8	6.60	102.6
9	9.80	99.6
10	7.37	101.8
11	7.24	101.0
12	7.97	101.0
13	21.69	213.2
14	7.30	218.5
15	7.34	362.8
16	7.28	101.2
17	7.52	97.1
18	7.55	99.0
19	7.39	93.3
20	7.32	100.9
21	6.85	103.2

Tabla 7. Concentración de los plasminógeno obtenidos en el laboratorio.

Numero de plasminógeno	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
1	392.1
2	471.0
3	440.5
4	312.5

Imagen 2. Gel de acrilamida-bisacrilamida. En el Carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en los otros dos carriles se muestra la banda que corresponde al plasminógeno



Análisis de resultados

En este estudio de corte transversal, en el que se incluyeron 673 donadores del banco de sangre, se obtuvieron las concentraciones circulantes de Mps.

Como se observa en la tabla 3, el valor de P es de 0.027, con grado de significancia, lo cual nos dice que existe una diferencia significativa entre la concentración de Mps de hombres y mujeres cuando se analizaron en conjunto.

Los hombres producen mayor cantidad de micropartículas que las mujeres en la sangre, esto lo muestra de igual manera Nielsen MH et al ¹⁹, el cual nos muestra que los hombres exhiben mayor concentración de Mps totales circulantes que las mujeres.

El número de individuos de este estudio permitió hacer cortes a diferentes edades, los hombres tienen mayor número de Mps en la juventud y van disminuyendo conforme incrementa la edad. Sin embargo, en las mujeres se aprecia el fenómeno contrario. En el año de 2009, Jayachandran et al, reportaron que con la disminución de niveles endógenos de 17β -estradiol, existe un aumento en la concentración de Mps totales en circulación, principalmente las que muestran fosfatidilserina en su superficie e incrementan la coagulación ²⁰.

Al realizarse un Prueba de distribución (Kolmogórov-Smirnov) se determinó una distribución no normal y posteriormente una prueba U de Mann-Whitney para la concentración de Mps entre cada una de las categorías. Al observar la tabla número 5, se percibe que existen diferencias significativas en tres distintos grupos.

En cuanto a la comparación de la categoría 2 vs 3 de hombres se muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.013$). En estos grupos de edad que van 34 - 49 años y de 50 - 64 años.

Por el contrario, en cuanto a las mujeres podemos ver que existe diferencia significativa en dos diferentes categorías (1vs2 y 3vs1). Estas diferencias se podrían deber a lo ya mencionado, que a medida que disminuye la producción de estrógenos aumenta la concentración de Mps. En el 2007 Toth B et al, dijeron que el aumento de Mps en mujeres podría estar regulado por el ciclo menstrual²¹.

Otros comentarios. En cuanto a las extracciones de proteínas, obtuve durante el desarrollo del trabajo un lote de fibrinógeno con una buena actividad procoagulante.

. Estas proteínas fueron extraídas con el fin de, a futuro, determinar la propiedad fibrinolítica y procoagulante de las Mps presente en los productos de banco de sangre de los donadores.

Las pruebas fibrinolíticas, se lograron llevar solo a la estandarización de la prueba. En el escrito de Lacroix R, et al en el 2012, nos muestra que las Mps contienen activadores del plasminógeno (u-PA y t-PA) que participan en la actividad fibrinolítica.

Conclusiones

Llegamos a la conclusión de que existe diferencia de concentración de Mps en donadores de banco de sangre, según el género. Existen también diferencias

de concentración de Mps dependiendo de la edad de los individuos que participaron en el estudio.

Perspectivas

Es interesante señalar que estudios futuros deberán confirmar que existe un balance pro- y anti- hemostático de las micropartículas y que la actividad fibrinolítica presente en ellas participa en el balance

Referencias

¹ Aharon A, Tzoran I. Extracellular vesicles in hematological disorders. Rambam Maimonides Med J 2014; 5(4):E0032.

² Owens ap 3rd, Mackman N. Tissue factor and thrombosis: the clot starts here Thromb Haemost 2010; 104(3):432-9.

³ Morel O, Jesel L, Freyssinet J M, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011; 31(1), 15-26.

⁴ Piccin A, G Willam, P Owen. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. Blood 2007; 21: 157–171.

⁵ Pérez PS, Marker Ph, Key Ns. Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: studies using a new digital flow cytometer. Cytometry Part A 2007; 71(1), 38-45.

⁶ Zwicker Ji, Liebman Ha, Neuberger D. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. Clin Cancer Res 2009; 15(22), 6830-40.

-
- ⁷ Freyssinet J, Toti F. Membrane microparticle determination: at least seeing what's being sized!. J Thromb Haemost 2009; 8: 311–314.
- ⁸ Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C. Membrane microparticles: two sides of the coin. Physiology (Bethesda) 2005; 20:22-7.
- ⁹ Norris A. Blood coagulation. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology 2003; 17(3):369-383.
- ¹⁰ Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. Indian J Anaesth 2014; 58(5):515-23.
- ¹¹ Menendez E. Visión moderna de la hemostasia: nuevo modelo de coagulación. Asociación Española de Biopatología Médica 201; 584-611.
- ¹² Batty P, Graham J. Haemostasis. Surgery (oxford) 2010; 28(11)530-535.
- ¹³ Triplett D. Coagulation and bleeding disorders: review and update, Clin Chem 2000; 46(8 PT 2):1260-9.
- ¹⁴ Martínez-Murillo C. Mecanismos de activación de la coagulación. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2006; 44 (Supl 2): 51-58.
- ¹⁵ Hellmann F, Verdi M, Schlemper BR Jr, Caponi S. 50th anniversary of the Declaration of Helsinki: the double standard was introduced. Arch Med Res 2014; 45(7):600-1.
- ¹⁶ Kazal LA, Amsel S, Miller OP, Tocantins LM. The preparation and some properties of fibrinogen precipitated from human plasma by glycine. Proc Soc Exp Biol Med 1963; 113: 989-984.

¹⁷ Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.

¹⁸ Deutch D, Mertz ET. Plasminogen purification from human plasma by affinity chromatography. Science 1970; 170: 1095-1096.

¹⁹ Nielsen MH, Beck-Nielsen H, Andersen MN, Handberg A. A flow cytometric method for characterization of circulating cell-derived microparticles in plasma. J Extracell Vesicles 2014 Feb 4;3. doi: 10.3402/jev.v3.20795. eCollection 2014.

²⁰ Jayachandran M, Litwiller RD, Owen WG, Miller VM. Circulating microparticles and endogenous estrogen in newly menopausal women. Climacteric 2009;12:177–84.

²¹ Toth B, Nikolajek K, Rank A, Nieuwland R, Lohse P. Gender-specific and menstrual cycle dependent differences in circulating microparticles. Platelets 2007;18(7):515-21.

²¹ Lawson C, Vicencio JM. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. J Endocrinol 2016; 228(2):R57-71.