



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE ATENCIÓN A LA SALUD
LICENCIATURA EN MEDICINA
INFORME DE SERVICIO SOCIAL

SEMIRAMIS STEPHANIA GARCÍA TREJO
2183068002

1/08/2024 – 31/07/2025

1 de agosto, 2025

ASESORES.

Dra. Aida Hándan Partida
No. Económico: 26343
Asesora Interna

Dra. Mirthala Flores García
No. Económico: 12363
Asesora Externa

Evaluación del efecto antitrombótico de 17- β aminoestrógenos

Planteamiento del problema

La trombosis es un proceso que afecta a la población mundial, por lo que el diseño de nuevos fármacos, con efecto estrogénico sin efectos secundarios, que beneficie a pacientes que se encuentren bajo tratamiento de terapia de reemplazo hormonal, en pacientes menopáusicas y en personas que solicitan cambio de sexo; como agentes anticonceptivos y antitrombóticos están en constante desarrollo e investigación.

Justificación

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte femenina en México, según cifras del INEGI, se registraron 47187 defunciones femeninas por ECV en México durante el año 2024, lo que representó el 34 % del total de fallecimientos de mujeres en ese momento. Dentro de los factores de riesgo se encuentran el tabaquismo, la obesidad, el uso de métodos anticonceptivos, antecedentes genéticos, e historia poblacional, por ello es relevante el implementar el desarrollo de nuevos fármacos que permitan un mejor pronóstico para las pacientes, así como una mejor calidad de vida.

Marco teórico

Nuestro grupo ha sintetizado estrógenos sustituidos en la posición 17- β del núcleo estrogénico, con efectos potencialmente antitrombóticos, ya que pueden disminuir la agregación plaquetaria e inducir la formación de microvesículas (MV s) derivadas de plaquetas, lo que podría contribuir a un menor riesgo del desarrollo de trombosis.

Los estrógenos exógenos se han utilizado como método anticonceptivo y terapia de reemplazo hormonal. Se ha establecido que los estrógenos incrementan el riesgo de trombosis venosa y arterial. Mientras que los estrógenos inducen un microambiente protrombótico a través de diversos efectos en las rutas hemostáticas, el mecanismo molecular exacto se desconoce (Abou-Ismaïl, et al. 2020).

Cabe señalar que los estrógenos exógenos presentes en los anticonceptivos tienen una estructura química diferente a la de los estrógenos naturales, y que su metabolismo y los efectos biológicos pueden diferir.

El cuerpo femenino produce naturalmente tres formas de estrógeno endógeno, que desempeñan diversas funciones fisiológicas. El 17 β estradiol (E2) es una hormona esteroide sintetizada a partir del colesterol. El E2 es la forma más potente de estrógeno producida por el ovario y presenta la mayor afinidad por los receptores de estrógeno. La estrona (E1) y el estriol (E3) son metabolitos menos potentes del E2 en la periferia. La aromatización de los anillos A de los precursores androgénicos (androstenediona o testosterona) también desempeña un papel importante en la producción de E1, E2 y E3. El E2 es la forma predominante de estrógeno en la mujer premenopáusica (Abou-Ismaïl, et al. 2020).

Receptores de estrógenos

El estrógeno media sus efectos principalmente a través de dos receptores nucleares: el receptor de estrógeno α (ER α), el ER β y un receptor acoplado a proteína G 30 (GPR30/GPER), recientemente identificado (Dupuis Marion, et al. 2019).

Entre la administración de estrógenos y los resultados transcripcionales aparentes, el lapso suele ser de horas a días. Sin embargo, además de estas acciones nucleares, también llamadas genómicas, del ER, se ha descubierto que los estrógenos inducen efectos rápidos que ocurren en cuestión de minutos tras su administración. Estos efectos están mediados por receptores asociados a la membrana plasmática, un proceso denominado: no genómico o señalización esteroidea iniciada por membrana o efectos extranucleares.

Los ER tienen diferentes distribuciones en los tejidos y sus efectos son distintos. Las plaquetas y sus precursores medulares, los megacariocitos (MK), expresan ER (Dupuis Marion 2019).

Se cree que los estrógenos son agentes vasoprotectores naturales. Se han detectado receptores de estrógeno en las células musculares lisas de las arterias coronarias y en las células endoteliales en diversos sitios. Los estrógenos causan vasodilatación a corto plazo al aumentar la formación y liberación de óxido nítrico y prostaciclina en las células endoteliales (Gruber Christian, et al 2002). Además de los mecanismos mencionados, los estrógenos modifican la producción de MVs.

Microvesículas

Las MVs que circulan en la sangre son pequeñas vesículas (con diámetro de entre 100 a 1000 nm) (Figura 1) derivadas de vesículas de membrana de células como plaquetas, células endoteliales y leucocitos. Cada vez hay más evidencia que respalda el concepto de que las microvesículas derivadas de plaquetas (PMVs), son las MV más abundantes en la circulación y, son importantes reguladores de la hemostasia, la inflamación y la angiogénesis. En comparación con individuos sanos, se ha observado un gran aumento de PMVs circulantes, especialmente en pacientes con enfermedades cardiovasculares (Zaldivia et al. 2017).

Se han observado posibles efectos regenerativos/reparadores de las vesículas extracelulares (VE) en el sistema cardiovascular, tanto en modelos de miocardiopatía inducida por quimioterapia postinfarto como no isquémica. Si bien la biodistribución (Figura 2) y la captación celular directa de las VE aún requieren mucha atención, los metaanálisis preclínicos indican que la administración de VE derivadas de células madre se asocia con mejoras en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, el acortamiento fraccional y una reducción del tamaño del infarto. Estos beneficios se observan, en gran medida, independientemente del tipo de célula madre, el momento de la inyección, la vía de administración, la dosis de administración o el período de seguimiento (Davidson et al. 2023).

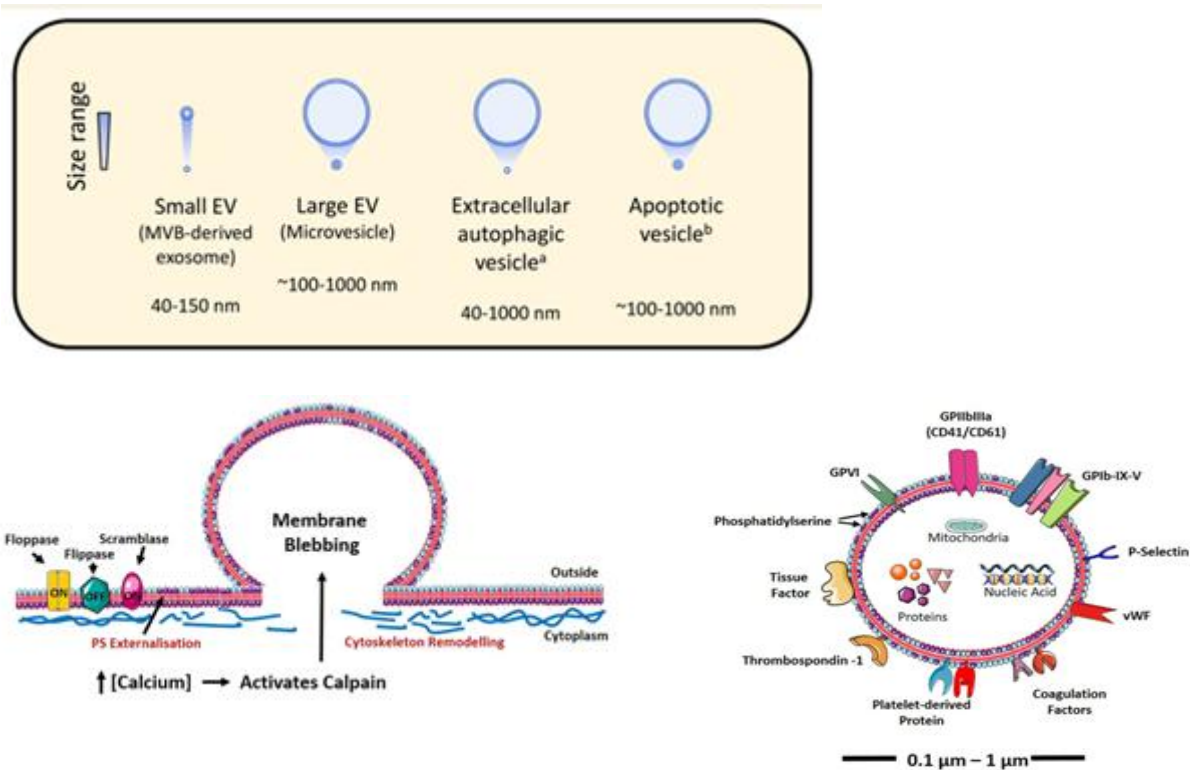


Figura 1. Formación de las MVs derivadas de plaquetas y sus características. (Modificado de Zaldívar et al. 2017).

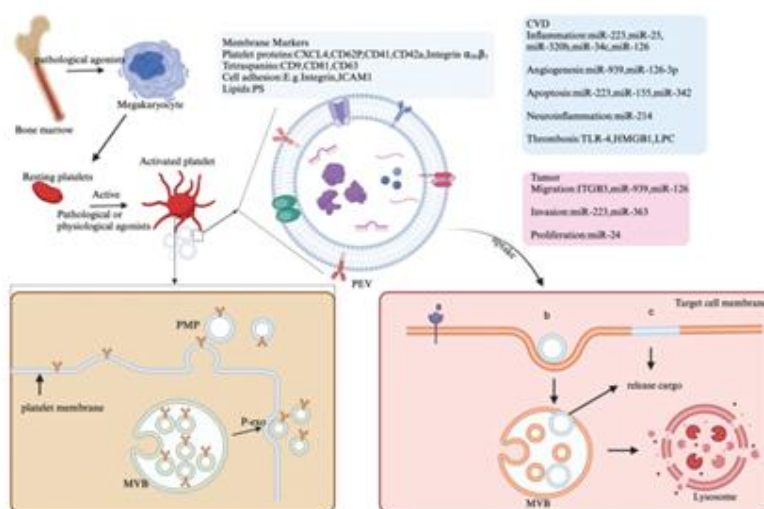


Figura 2. Biogénesis, destino y componentes de las MVs (Tomado de Xin, Xin. 2025).

Efecto de los estrógenos en la activación plaquetaria

Tras una lesión vascular, las plaquetas se adhieren primero transitoriamente al factor de von Willebrand (vWF) unido al colágeno a través de su receptor GP1b-V-IX y luego se adhieren firmemente a la matriz de colágeno mediante su receptor GPVI y la integrina $\alpha_2\beta_1$. Siguiendo esta vía de activación, las plaquetas secretan moléculas importantes, como ADP, serotonina, vWF y fibrinógeno, y sintetizan tromboxano A2 (TXA2). Esto permite el reclutamiento de plaquetas circulantes para formar el trombo mediante la

agregación plaquetaria mediante la unión del fibrinógeno a la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activada. Se han publicado resultados contradictorios sobre los efectos de la administración de estrógenos en la activación plaquetaria, en mujeres (Dupuis Marion, et al. 2020).

Varios estudios han demostrado una diferencia de género en las propiedades de las plaquetas, lo que sugiere un papel desempeñado por las hormonas sexuales. En las mujeres, se ha demostrado que muchas características de las plaquetas varían en función de la fase del ciclo menstrual. Tarantino y colaboradores han demostrado una fluctuación periódica en la adhesión plaquetaria al colágeno con un aspecto bifásico correlacionado con los niveles máximos de E2 plasmático. Además, se ha demostrado que las plaquetas tienen una mayor afinidad por el fibrinógeno durante la fase lútea del ciclo en comparación con la fase folicular. Asimismo, se ha encontrado un impacto de la menopausia en la activación plaquetaria, pero los resultados siguen siendo controversiales. Los niveles de GPIIb-IIIa activada y de P-selectina en mujeres posmenopáusicas fueron mayores que en mujeres premenopáusicas, pero Aldrighi y colaboradores sugirieron un menor estado de activación plaquetaria después de la menopausia. En otro estudio, no se observó ninguna diferencia (Dupuis, 2020).

Objetivo general

Determinar el efecto de Buolame y Dieoctad en hemostasia primaria y secundaria, así mismo, identificar el efecto de los 17β -aminoestrógenos en la generación de Mvs y el papel de éstas en la fibrinólisis.

Objetivos específicos

- 1) Identificar la concentración Efectiva 50 (CE50) a través de curvas dosis-respuesta de los aminoestrógenos empleando 3 diferentes concentraciones 5, 50 y 500 μM .
- 2) Determinar la actividad de los aminoestrógenos sobre la agregación plaquetaria en sangre total en plasma rico en plaquetas (PRP), inducida con: adenosin difosfato (ADP), epinefrina y colágeno, como agentes agonistas.
- 3) Determinar el efecto de los estrógenos substituidos en la posición 17β sobre la liberación del adenosin trifosfato (ATP) de las plaquetas, experimento *in vitro*, con ADP, colágeno y epinefrina como agentes agregantes.
- 4) Determinar la actividad antitrombótica (tamaño del coágulo), *in vitro*, de los estrógenos.
- 5) Determinar el efecto de los estrógenos substituidos en la posición 17β , *in vivo*, sobre la concentración de MVs.

Hipótesis

Los aminoestrógenos por sus características fisicoquímicas tendrán efectos en la agregación plaquetaria, producción de ATP, retracción de coágulo, y modificaciones en la formación de microvesículas.

Metodología.

Diseño del estudio: Prospectivo

Tipo de investigación. Experimental

Tipos de diseños. Transversal

Características del estudio.

a) Por la participación del investigador: ANALÍTICO

b) Por temporalidad del estudio: TRANSVERSAL

b) Por la lectura de los datos: RETROLECTIVO

d) Por el análisis de datos: ANALÍTICO

Población, criterios de inclusión, de exclusión

Todos los experimentos se realizarán *In vitro*, en muestras de plasma o sangre total humana. Las muestras anticoaguladas con citrato de sodio (0.109 M) se obtendrán de donadores, que asistan al Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INC), quienes cumplan con la NORMA Oficial Mexicana para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos (NOM-253-SSA1-2012) y firmen el consentimiento informado para permitir que una muestra de 2.7 mL de su donación se destine para llevar a cabo el estudio.

Criterios de inclusión:

Edad 18-65 años

Peso mínimo de 50 kg

Tener en términos generales buena salud

Cumplir con la NOM-253-SSA1-2012

Criterios de exclusión

Haber tenido cirugía alguna en los últimos 6 meses

Haberse realizado tatuaje, perforación o acupuntura en los últimos doce meses.

Haber padecido infecciones como hepatitis B o C, VIH-SIDA, enfermedad de chagas o sífilis.

Padecer epilepsia, tuberculosis o enfermedades graves del corazón.

Haber recibido trasplantes de órganos

Usar drogas intravenosas o inhaladas.

Mujeres en embarazo o lactando

Haber tomado analgésicos en los 5 días previos a donar

Haber ingerido bebidas alcohólicas en las últimas 48 horas.

El día de la donación: Presentar tos, resfriado, dolores de cabeza o de abdomen.

Tamaño de muestra

Se estimará considerando la diferencia de medias con base a los resultados de una publicación de nuestro grupo de investigación, Flores García M, et al., bajo los supuestos:

n: número de sujetos necesarios para cada grupo

Z α : valor de Z correspondiente al riesgo α fijado (0.05 habitualmente)

Z β : valor de Z correspondiente al riesgo β fijado (0.20 habitualmente)

S: Varianza de la distribución de la variable cuantitativa (desviación estándar)

Poder: 0.90

Tamaño de muestra estimado para cada concentración propuesta: n = 5. Se estudiarán 3 diferentes concentraciones más un grupo control, n total = 48 (para cada 17 β -aminoestrógeno). Considerando un estudio por duplicado e incluyendo 20% de posibles pérdidas. Si son 48 experimentos por cada aminoestrógeno y son 2 que se van a estudiar, entonces, se realizarán 96 ensayos por cada técnica estudiada.

Tabla 1. Número de muestras necesarias en función del método de estudio.

Método de estudio	Número de muestras sanguíneas por experimento	Número de muestras necesarias para el estudio
Impedancia	1	96
Luminiscencia	2	96
Actividad antitrombótica	1	96
Generación de MVs	2	96

Variables y definición operacional

Variables independientes

Los 17 beta aminoestrógenos

1. Dieoctad (N,N'-Bis[3-hidroxiestra 1:3:5(10)-trien-17 β -il]-1,8-octilendiamina).

2. Buolame (N[3-Hidroxiestra 1:3:5(10)-trien-17 β -il]-4-hidroxiutilamina).

Variables dependientes

Agregación plaquetaria: Se define como cinética de la agregación de las plaquetas, la cual se puede estimar a través de la turbidimetría (midiendo la turbidez o densidad óptica del plasma). Las pruebas se realizarán en un Lumiagregómetro óptico con registrador (Chrono-log. Whole Blood, Lumi-Agregometer) de 2 canales. El promedio del grupo control se considerará como el 100 % de la agregación plaquetaria.

ATP liberado de las plaquetas: Cantidad de ATP liberado de las plaquetas durante el proceso de degranulación.

Tamaño del coágulo: Agregación de componentes celulares que se forma cuando las plaquetas, proteínas y células se unen entre sí.

Concentración de microvesículas: Las Mvs son pequeñas vesículas circulantes (tamaño de 100-1000 nM), liberadas por el cambio de simetría de la membrana plasmática de diversos tipos de células en respuesta a la activación celular, apoptosis o necrosis. Se establecerán como la cantidad de Mvs presentes por unidad de volumen medido en mg/mL.

Definición operacional

Acorde a la tabla 2 las variables analizadas se definen operacionalmente en términos de unidad de medición.

Tabla 2. Definición de las variables del estudio.

Variable	Definición	Tipo de variable	Escala
Agregación plaquetaria	Porcentaje que se desplaza en el trazo gráfico de una curva (eje Y), desde el origen hasta que se define el acmé de la curva.	Cuantitativa continua	Porcentaje
ATP liberado de las plaquetas	Cantidad de ATP liberado de las plaquetas durante el proceso de degranulación.	Cuantitativa continua	nM
Concentración de MVs	Cantidad de MVs presentes por unidad de volumen.	Cuantitativa continua	mg/mL
Tamaño del coágulo	Agregación de componentes celulares que se forma cuando las plaquetas, proteínas y células se unen entre sí.	Cuantitativa continua	mg

Generación de plasmina	Presencia de plasmina que se identifica por la actividad de un cromógeno, el resultado se obtiene por la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a 405 nm. El resultado se interpola en una curva patrón de uPA y tPA respectivamente, medido en UI/mL.	Cuantitativa continua	UI/mL
------------------------	--	-----------------------	-------

Plan de análisis estadístico

Tabla 3. Metodología estadística que se seguirá en este protocolo.

Objetivos	Metodología Estadística
Describir los datos obtenidos	Se hará uso de la estadística descriptiva (desarrollo de pruebas de normalidad, medidas de tendencia central y medidas de dispersión.)
Realizar análisis de varianza (ANOVA) de una vía para analizar la diferencia entre grupo control y plaquetas tratadas con el aminoestrógeno Buolame y Dieoctad a diferentes concentraciones (5,50 y 500 μ M).	ANOVA de una vía con prueba pos hoc Dunnet para comprarar vs control y prueba Tukey para realizar comparación entre grupos.
Determinar si existe diferencia entre los diferentes grupos de estudio.	Para muestras con distribución normal se realizará prueba T, para aquellas muestras que no tengan distribución normal se realizará prueba U de Mann Whitney.

*P < 0.05 será considerado estadísticamente significativo. Se trabajará mediante el uso del programa estadístico GraphPad Prism Versión 8.

Material y métodos

Agregación plaquetaria

Las pruebas se realizaron en un Lumiagregómetro óptico con registrador (Chrono-log. Whole blood, Lumi- agregometer,) de 2 canales. La agregación se realizó a 37 °C y a 1200 rpm para simular la turbulencia sanguínea. Se centrifugaron las muestras para obtener plasma rico en plaquetas (PRP) durante 1 minuto a 1000 revoluciones por minuto (RPM) o 100 FG (Modelo de la centrifuga Premiere XC-2009). Se extrajo el PRP con micropipeta en un tubo falcon de 15 ml marcados con "PRP" y # pull. Se centrifugaron tubos a 3500 rpm (8960 FG) durante 20 minutos. Se extrajo el plasma pobre en plaquetas (PPP) con micropipeta y colocando en un tubo Falcon de 15 mL marcado con "PPP". Se recolectaron 500 microlitros de PRP en una alícuota y se cuantificaron. Se tomaron aproximadamente de 10 a 15 cubetas/celdas de vidrio siliconado (dependiendo el volumen obtenido de PRP). Se limpiaron las celdas con gasas y etanol, por cada tubo se usó una gasa para limpiar y secar a contraluz a manera de asegurarse de que no queden manchas. Se colocaron 500 uL de agua inyectable en 4 cubetas para calibrar. Se abrió el programa agrolink en la computadora. Se seleccionó "Run new" y "Calibración con agua". Se colocaron las celdas con agua en el canal de PRP y corremos el programa. Se dejaron correr 2 minutos. Se colocaron cubetas en canal de PPP y se presionó el botón de "Set baseline" durante 3 segundos hasta visualizar una imagen. La calibración es válida si el trazo queda entre 0-100 +-5 de variación máxima. La calibración se detiene cuando la línea x sea constante. Ya que se obtuvo el total de plaquetas, ajustamos a 250,000 plaquetas por mililitro con la fórmula de $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$. El resultado de la regla de proporción se le restaron los μL obtenidos de PRP y nos dió lo que tuvimos que agregar de PPP. Para comenzar una prueba, tomamos 500 μL de PPP y lo colocamos en cubetas limpias. En el monitor seleccionamos "Run new" y seleccionamos alguno de los agonistas (epinefrina, colágena, ADP) y el método que elaboramos por ejemplo "ADP+x reactivo y óptico", dependiendo lo que se quiera utilizar. Se tomó una cubeta de PRP y se incubó de 2-3 minutos. En esos minutos verificamos concentraciones, objetivos y corrimos el programa. Agregamos un magneto a una cubeta con PRP de forma lateral para no crear burbujas y dejar que se deslice al fondo. Colocar cubeta con PRP en el puerto correspondiente. Tomar el compuesto con micropipeta, limpiar la punta con una gasa e introducirlo a la cubeta. Resuspender el compuesto en la cubeta presionando 3 veces llegando hasta el 2do tope de la pipeta. Sacar pipeta, verificar que no haya quedado compuesto o plasma. Dejar correr el experimento hasta que la curva haga una meseta y parar la prueba. Cuantificar el resultado seleccionando el icono de dos flechas. Aparecerán líneas punteadas, acomodarlas del punto más alto y al punto más bajo de la curva, poner "ok" y luego seleccionar el siguiente icono de libreta y otra vez "ok", observar el resultado en porcentaje en la pantalla y compararlo con el inserto.

Los compuestos se disolvieron en DMSO. El promedio del grupo control se consideró como el 100 % de la agregación plaquetaria. Se utilizaron los compuestos Buolame y Dieoctad a una concentración 5,50 y 500 μM .

Método de impedancia. Un voltaje -en el rango de milivolts- se aplica al electrodo y el instrumento mide la resistencia eléctrica o impedancia generada. Para ello se insertó un

electrodo en una cubeta/celda con sangre diluida con solución salina grado fisiológico (0.9%) en una proporción 1:1. Durante un breve periodo de equilibrio, se forma una monocapa de plaquetas en las porciones expuestas de los cables, dando como resultado un valor de impedancia estable. Los compuestos o el control (DMSO), se adicionaron a la muestra. Inmediatamente después, un agente agregante (ADP 10 μ M, epinefrina 10 μ M o colágeno 2 μ g/ml) se adicionó a la cubeta y las plaquetas estimuladas se agregan a la monocapa de plaquetas en los cables sumergidos. La acumulación de plaquetas modifica la resistencia eléctrica al circuito, que se mide en Ohms (unidad de medida de la resistencia eléctrica). El cambio en impedancia se despliega en función del tiempo en el programa chrono-log aggro/link.

Método de luminiscencia. Este método permite medir simultáneamente la agregación plaquetaria, y la secreción de ATP de las plaquetas, mediante un sistema de luminiscencia, simultáneamente. El sistema de luminiscencia utiliza un tubo fotomultiplicador para medir la liberación de ATP. Brevemente, en una cubeta con plasma rico en plaquetas (PRP) ajustado a 250,000 plaquetas/ μ L se adicionó el compuesto Buolame o Dieoctad en tres concentraciones diferentes (5, 50 y 500 μ M) o el control (DMSO) e inmediatamente después el reactivo chrono-lume (luciferin-luciferasa) a la muestra, se incubo durante 2 min y adiciono el agente agonista (ADP 10 μ m o colágeno 2 μ g/ml). El equipo previamente se calibró con una solución estándar de 2 mM de ATP. El ATP se une con luciferin-luciferasa y genera un cambio de voltaje que se detecta por el PMT, la salida de voltaje es proporcional a la intensidad de luminiscencia de la muestra. El resultado corresponde al flujo de ATP y se expresa en nM. La agregación plaquetaria se medirá en porcentaje de transmisión de luz relativa entre el PRP y plasma pobre en plaquetas (PPP), durante 6 min y se registran las curvas de agregación plaquetaria en función del tiempo.

Análisis de retracción de coágulo en plaquetas lavadas

Se centrifugaron los tubos con sangre citratada durante 1 min a 1000 rpm para obtener PRP, se adicionó el amortiguador HEPES (10 mM NaCl, 140 mM HEPES; pH=7.4) al PRP recuperado, en relación 1:3. Se centrifugo durante 10 min a 800 G, se descartó el sobrenadante y se diluyo con amortiguador Tyrode a la mitad del volumen inicial del PRP. Se cuantificó y calculó el volumen de plaquetas que se adicionó a la cubeta, para un volumen final de 250 μ L y una concentración final de plaquetas de 350,000 plaquetas/ μ L. Se adicionó el compuesto, el amortiguador Tyrode y trombina (1UI/mL). Se pesan los tubos a las 3, 24 y 48 h.

Obtención de micropartículas

Se adicionaron los compuestos o el control a PRP. Posteriormente, se estimularon las plaquetas con ADP 10 μ M y colágeno 2 μ g/mL por 5 h a 37 °C en agitación constante, para inducir la formación de microvesículas derivadas de plaquetas (PMVs). Las MVs se aislaron mediante centrifugación diferencial. Brevemente, la muestra sanguínea citratada (0.105 M) se centrifugó dos veces (1500 G por 15 min y 13,000 G por 2 min) para obtener el PPP. Posteriormente, 500 μ L de muestra se centrifugo a 20,000 G por 90 min a 4 °C para obtener las MVs; las MVs se lavaron y se resuspendieron con amortiguador HEPES.

Cuantificación proteínas de MVS

Las MVs se sometieron a 5 ciclos de choque térmico (nitrógeno líquido – baño maría (37 °C)), por lapsos de 1 minuto, para lisar las membranas y poder estimar el contenido de proteínas empleando un espectrofotómetro (280 nm). Considerando que el 15 % del peso de las Mvs corresponde al contenido proteico y que una concentración de proteínas de 1 g/mL equivale a 8×10^5 MVs/mL. Empleando esta equivalencia, los resultados son comparables con los que se obtienen por el método de microscopía de fuerza atómica o por la dispersión dinámica de luz y son mayores en tres órdenes de magnitud a los obtenidos por citometría de flujo.

Resultados

Los resultados de este trabajo pertenecen a la Dra. Mirthala Flores García y la Dra. Aurora de la Peña Díaz, del Laboratorio de Trombosis y Fibrinólisis del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Agregación plaquetaria, método óptico.

Con base en el primer objetivo de investigación evaluamos la agregación plaquetaria mediante método óptico con los compuestos: Buolame y Dieoctad.

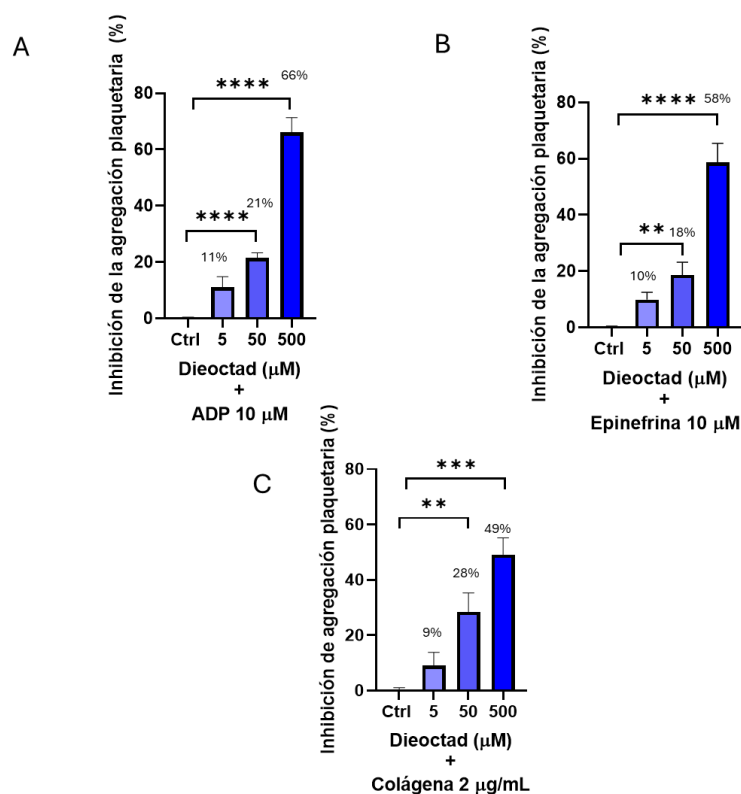


Figura 3. Efecto del Dieoctad sobre la agregación plaquetaria (%), determinada mediante método óptico, con tres diferentes agonistas (ADP 10 µM, epinefrina 10 µM y colágena 2 µg/mL). Se consideró un valor de *p < 0.05 como estadísticamente significativo. Los datos se analizaron

con las pruebas estadísticas Shapiro Wilk y ANOVA con Dunnet y se utilizó el Programa GraphPad Prism 8.0.1.

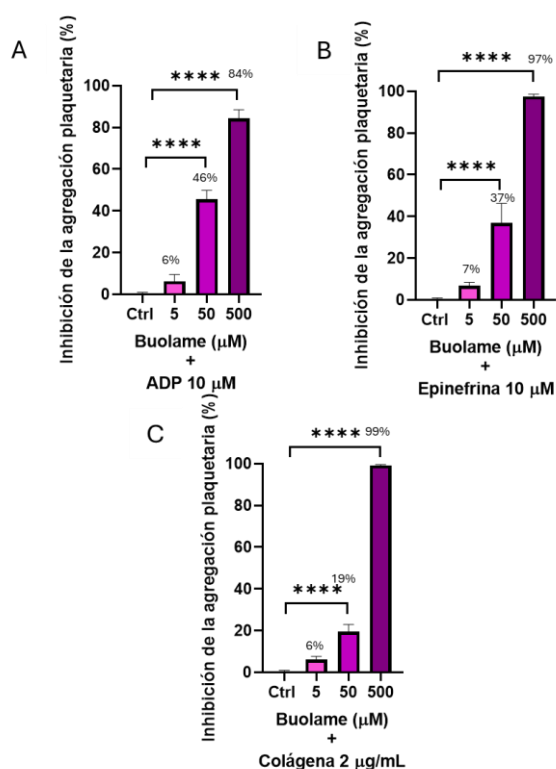


Figura 4. Efecto del Dieoctad sobre la agregación plaquetaria (%), determinada mediante método óptico, con tres diferentes agonistas (ADP, epinefrina y colágeno). Se consideró un valor de $*p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Los datos se analizaron con las pruebas estadísticas Shapiro Wilk y ANOVA con Dunnet y se utilizó el Programa GraphPad Prism 8.0.1.

Como muestran las figuras 3 y 4 hay un incremento en la inhibición de la agregación plaquetaria, la cual es dependiente de la concentración de ambos aminoestrógenos estudiados. A partir de los valores obtenidos de la inhibición de la agregación de este ensayo se obtuvo la concentración efectiva 50 de cada aminoestrógeno, con el modelo $\log(\text{inhibitor})$ vs normalized response del programa GraphPad Prism 8.0.1, la cual es 110 μM para Buolame y 400 μM para Dieoctad (Tabla 4).

Tabla 4. CE_{50} con el modelo $\log(\text{inhibitor})$ vs normalized response.

Variable	Aminoestrógeno	
	Buolame (μM)	Dieoctad (μM)
CE_{50}	110.0	400.0
Intervalo de confianza	74.7 - 158.5	188.6 - 747.0

Agregación plaquetaria, método de impedancia.

Se puede ver en la figura 5, que la inhibición de la agregación plaquetaria correlaciona con la concentración de los aminoestrógenos Buolame y Dieoctad, corroborando el resultado obtenido mediante el análisis por método óptico.

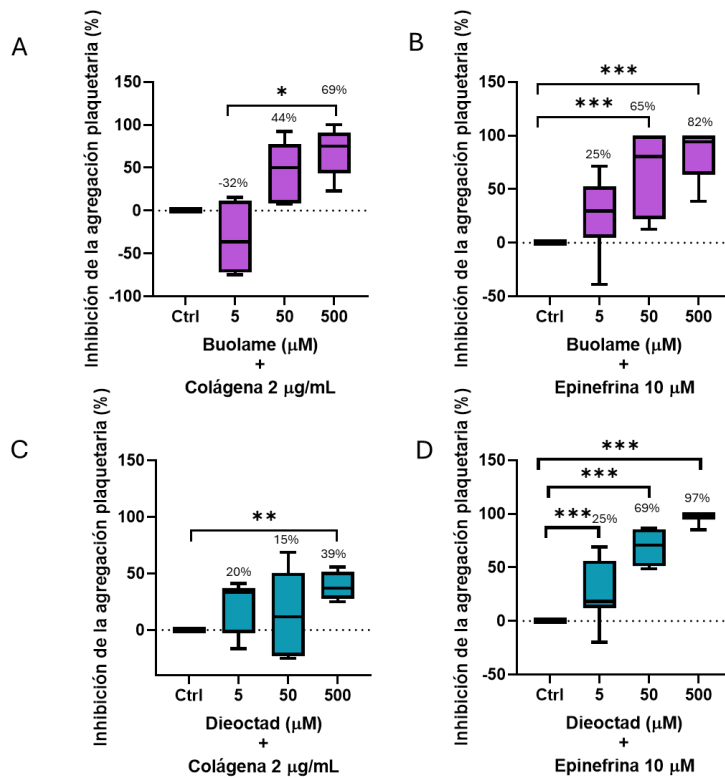


Figura 5. Efecto de los aminoestrógenos (Buolame y Dieoctad) sobre la agregación plaquetaria en sangre total, con colágena y/o epinefrina como agentes agonistas. Se consideró un valor de * $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Los datos se analizaron con las pruebas estadísticas Shapiro Wilk y ANOVA con prueba pos hoc Dunnet y se utilizó el programa GraphPad Prism 8.0.1.

Determinación del efecto de los aminoestrógenos sobre la liberación de ATP

Como se muestra en la figura 6, el aminoestrógeno Buolame inhibe significativamente la producción de ATP con los tres agonistas diferentes, mientras que con Dieoctad no se observan diferencias significativas con respecto al control.

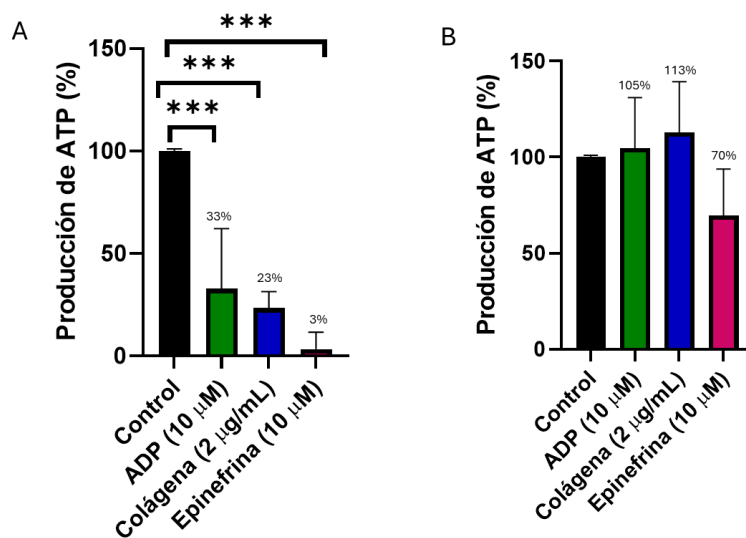


Figura 6. Efecto de la CE50 de los aminoestrógenos (A) Buolame y B) Dieoctad) sobre la concentración de ATP liberado de las plaquetas durante la agregación plaquetaria; usando tres agonistas (ADP, colágena y epinefrina) diferentes. Se consideró un valor de $*p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Los datos se analizaron con las pruebas estadísticas Shapiro Wilk y ANOVA con Dunnet y se utilizó el programa GraphPad Prism 8.0.1. LA CE50 se obtuvo de los resultados de agregación plaquetaria mediante método óptico.

Determinación de la actividad antitrombótica (retracción del coágulo)

Como se observa en la figura 7:

- A) A las 3h se puede observar una tendencia en el incremento del peso del coágulo bajo el tratamiento con Dieoctad y Buolame, lo que indica menor retracción del coágulo.

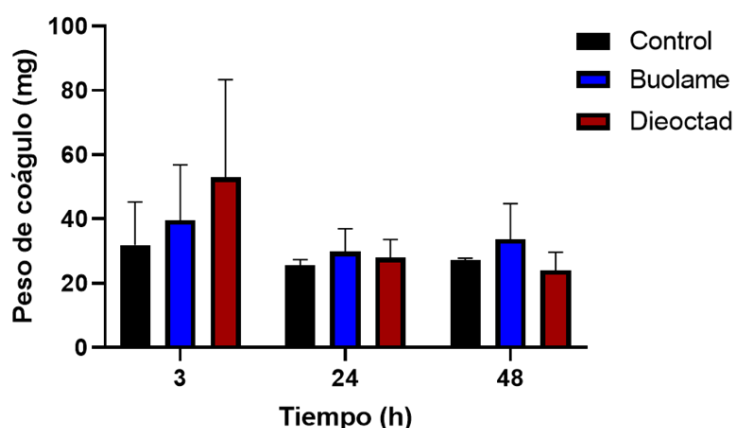


Figura 7. Peso del coágulo (mg) de plaquetas lavadas, tratadas con la CE50 de Buolame (110 μM) y Dieoctad (400 μM). Se consideró un valor de $*p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Los datos se analizaron con las pruebas estadísticas Shapiro Wilk y ANOVA de dos vías, se utilizó el programa GraphPad Prism 8.0.1.

Efecto de los aminoestrógenos sobre la generación de microvesículas de plaquetas

Podemos observar en la figura 8, que la concentración de MVs generadas por plaquetas estimuladas por los compuestos (a las tres concentraciones estudiadas), es similar al control.

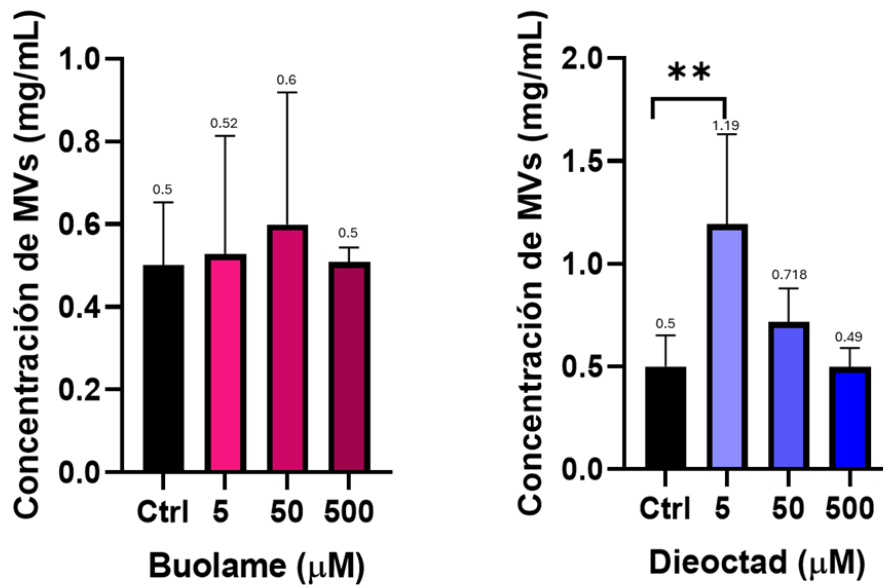


Figura 8. Efecto de los compuestos (Buolame y Dieoctad) sobre la concentración de microvesículas generadas por las plaquetas. Se consideró un valor de $*p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Los datos se analizaron con las pruebas estadísticas Shapiro Wilk y ANOVA con Dunnet y se utilizó el programa GraphPad Prism 8.0.1.

Conclusiones

El presente trabajo muestra que Buolame y Dieoctad poseen actividad antiagregante plaquetaria y que uno de los posibles mecanismos que utiliza el Buolame para lograr este efecto es la inhibición de la degranulación plaquetaria. Así mismo, los resultados muestran que la concentración de MVs generadas por las plaquetas estimuladas por los compuestos, es similar al control bajo tratamiento con Buolame, sin embargo, bajo tratamiento con Dieoctad hay un incremento en la producción de microvesículas. Estos resultados muestran que el Buolame y Dieoctad tienen un papel dual, lo que sugiere un potencial efecto protector frente a eventos trombóticos asociados al uso de estrógenos, posicionando a este compuesto como una posible molécula con perfil cardiovascular favorable.

Conclusiones del pasante sobre su servicio social

En relación con su formación como persona

El proceso de realización del servicio social en investigación, juega un papel fundamental para la ampliación del conocimiento, ya que desde una etapa temprana tenemos un acercamiento al diseño de protocolos de investigación, sin embargo, es importante recalcar que el desarrollo de protocolos de investigación se ve reflejado cuando tienes en tus propias manos un protocolo, en el que ya están involucrados pacientes y preguntas de investigación dirigidas a una problemática real como lo es el factor de riesgo que implica el consumo de medicamentos hormonales esteroides y más si dichos pacientes tienen comorbilidades o factores de riesgo adicionales. Puedo mencionar que el proceso de formación en un Instituto tiene el rigor necesario para poder desempeñarse de manera profesional en el futuro, ya que hay un compromiso mayor en el que desarrollas habilidades como el tener una visión más crítica

sobre un proceso biológico, la toma de decisiones es más rigurosa en donde se contempla la perspectiva de diversos investigadores, aprendes a trabajar de manera colaborativa y en equipo, así como el desarrollo de habilidades blandas, como lo es la escucha activa, empatía y solidaridad.

En relación con su formación profesional

El desarrollo del servicio social en investigación me ha permitido conocer investigadores en el ámbito hospitalario que desarrollan diversas líneas de investigación, lo que en un futuro contribuye a obtener de una manera más dinámica el proceso de aprendizaje, permite tener relaciones bilaterales con otros investigadores, y ampliar tu punto de vista sobre lo que implica desarrollarse como investigador en el futuro, y como futuro médico tratante siendo más objetivos, y permitiendo tener la posibilidad de poder generar redes de apoyo en el futuro, con la posibilidad de interconsultar a pacientes que necesitan un tratamiento más especializado y dirigido, es decir no separar la atención clínica de la investigación científica, obteniendo como resultado la investigación traslacional, que busca conectar la investigación básica con la práctica clínica para mejorar la salud humana.

En relación con su aportación a la comunidad

El hecho de tener la oportunidad de desarrollar nuevos fármacos en una época en la que ya es posible hablar de medicina personalizada en la que no siempre se priorizan los beneficios en comparación de los efectos adversos, ya que no siempre es posible tener un fármaco que tenga un blanco terapéutico dirigido que no implique el desarrollo de efectos secundarios. Con el desarrollo de estos nuevos aminoestrógenos se podrá disminuir en medida de lo posible los efectos adversos inducidos, y que sea un medicamento eficaz y seguro en aquellos pacientes que necesitan del uso de dichos fármacos, como lo son mujeres en proceso de menopausia o personas que se someten a terapia de reemplazo hormonal y mujeres que se encuentran bajo tratamiento de planificación familiar, sin la aparición de efectos adversos en dicha población. Ya que se sabe que la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular son las principales causas de mortalidad y discapacidad en las mujeres de la Región de las Américas. En México también es la principal causa de muerte con 47,187 defunciones durante enero a junio de 2024, lo que representa un 34% del total de fallecimientos femeninos. La labor de divulgación que también se me proporcionó durante mi formación me ha permitido tener una comunicación más efectiva con la población en general, para la promoción del conocimiento sobre los riesgos y beneficios que implican el uso de aminoestrógenos, los cuales son fármacos de temprano desarrollo con un gran potencial para uso en la población mexicana.

En relación con su institución educativa

La UAM, a través de la formación que nos transmite nos permite crear y desarrollar proyectos de investigación desde muy temprano inicio de la Licenciatura, así como el aprender a trabajar de manera colaborativa, con la ayuda de diversos especialistas, involucrados en una problemática social relevante, como lo es en este caso la muerte por enfermedades cardiovasculares inducida por el uso de fármacos que se utilizan como terapia de reemplazo

hormonal o métodos anticonceptivos, y como el diseño de nuevos aminoestrógenos con una sustitución en la posición 17 beta pueden inhibir esos efectos adversos. El entender que la problemática tiene diversos panoramas en donde es importante la participación de todo el personal de salud: médicos, enfermeros, químicos, psicólogos, biólogos y que cada uno de ellos puede proporcionar una solución desde su perspectiva, y para el bien de la población, el proceso de aprendizaje que tuve durante mi formación en Medicina en la UAM me ha permitido forjar un criterio más amplio, para poder tener alternativas ante diversos escenarios adversos. Así mismo, me ha permitido desempeñarme en varios ámbitos de la sociedad, y participar de manera proactiva a través del desarrollo de protocolos de investigación relevantes para el desarrollo de nuevas soluciones ante las problemáticas sociales.

Referencias

1. Abou-Ismaïl MY, Sridhar DC, Nayak L. Estrogen and thrombosis: A bench to bedside review. *Thrombosis Research*. 2020; 192:40–51.
2. Dupuis, Severin, Noirrit-Esclassan, Arnal, Payrastre, Valéra. Effects of Estrogens on Platelets and Megakaryocytes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019 25; 20(12):3111.
3. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and Actions of Estrogens. *New England Journal of Medicine*. 2002; 346(5):340–52.
4. Zaldivia MTK, McFadyen JD, Lim B, Wang X, Peter K. Platelet-Derived Microvesicles in Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2017; 4.
5. Xin X, Koenen RR. Assessing platelet-derived extracellular vesicles for potential as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2025 ; 1–12.
6. Aurora, Flores M, Valente-Acosta B, Quintanar-Trejo L, Hernández-Méndez C, Muñoz-Martínez S, et al. 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). *PubMed*. 2009; 52:50–3.
7. Dyszkiewicz-Korpanty AM, Frenkel EP, Ravindra Sarode. Approach to the Assessment of Platelet Function: Comparison between Optical-based Platelet-rich Plasma and Impedance-based Whole Blood Platelet Aggregation Methods. *Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis*. 2005; 11(1):25–35.
8. Mirthala Flores-García, Fernández-González JM, León-Martínez M, Simón Hernández-Ortega, Hernández-López JR, Reyes-Munguía D, et al. Tyrame [N-(3-hydroxy-1:3:5(10)-estratrien-17b-yl)-4-hydroxyphenethylamine], antithrombotic aminoestrogen that decreases microvesicle formation. *Gaceta Médica de México*. 2022 Jan 28;157(6).

9. Johansson T, Karlsson T, Bliuc D, Schmitz D, Ek WE, Alkistis Skalkidou, et al. Contemporary menopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease: Swedish nationwide register based emulated target trial. *BMJ* [Internet]. 2024 Nov 27.
10. Georgios Tsioulos, Dimitris Kounatidis, Vallianou NG, Aikaterini Poulaki, Evangelia Kotsi, Gerasimos Socrates Christodoulatos, et al. Lipoprotein(a) and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Where Do We Stand? *International journal of molecular sciences*. 2024; 25(6):3537–7.
11. Twomey L, G. Wallace R, M. Cummins P, Degryse B, Sheridan S, Harrison M, et al. Platelets: From Formation to Function. *Homeostasis - An Integrated Vision*. 2019 Jan 30.
12. Flores-García M, Fernández-G JM, León-Martínez M, Hernández-Ortega S, Pérez-Méndez O, Correa-Basurto J, et al. The structures and inhibitory effects of Buame [N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -yl)-butylamine] and Diebud [N,N'-bis-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -yl)-1,4-butanediamine] on platelet aggregation. *Steroids*. 2012; 77(5):512–20.
13. Gu Y, Han F, Xue M, Wang M, Huang Y. The benefits and risks of menopause hormone therapy for the cardiovascular system in postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis. *BMC Women's Health*. 2024; 24(1).