



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE ATENCIÓN A LA SALUD

LICENCIATURA EN MEDICINA

“EFECTO ANTITROMBÓTICO DE 17β - AMINOESTRÓGENOS”

M.P.S.S PINEDA TORRES JORGE ANTONIO MATRICULA 2172032149
ASESOR INTERNO
DR ALEJANDRO ALONSO ALTAMIRANO
ASESORAS EXTERNAS
DRA AURORA DE LA PEÑA DIAZ
DRA MIRTHALA FLORES GARCIA

ENERO 2024.

INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO I	4
EFFECTO ANTITROMBÓTICO DE LOS 17β-AMINOESTRÓGENOS	5
1.1 Planteamiento del problema	5
1.2 Justificación	5
1.3 Marco teórico	5
1.4 Objetivo general	12
1.5 Objetivos específicos	12
1.6 Hipótesis	13
1.7 Metodología	13
1.7.1 Tipo de estudio	13
1.7.2 Población, criterios de inclusión, de exclusión	13
1.7.3 Variables	15
1.7.4 Material y métodos	15
1.8 Resultados: cuadros y gráficas	18
1.9 Análisis de resultados	21
1.10 Conclusiones de la investigación	23
1.11 Bibliografía	24

INTRODUCCIÓN

El proyecto de investigación se presenta como continuación de un proyecto previo que fue aceptado y autorizado tanto por la Facultad de Medicina de la UNAM (Efecto de mono y bis-amino-estrógenos sobre la hemostasia No. 044-2011) y por el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (No. 11-719) en el marco de un convenio de colaboración. Nuestro grupo de investigación se interesa por el estudio de los estados protrombóticos, proceso en el que participan las Mvs v también por el estudio de diversos aminoestrógenos. Compuestos derivados de la estrona que presentan un radical aminoalcohólico, -metilo o -carboxilo en la posición 17-β del anillo esteroide ¹ (Figura 4) que presentaron actividad antiagregante plaquetaria, ^{2,3} anticoagulante en sangre total ^{4,5,6,7} estrogénica, ⁸ antitrombótica, incrementan la producción de óxido nítrico (NO)⁹ y disminuyen tanto la liberación de ATP como del estrés oxidativo. Así mismo, registramos una patente en México del uso de un aminoestrógeno, Prolame, como vasodilatador y agente antitrombótico PATENTE 289370. Uso del N-(3-hidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17 β-il)- 3-hidroxipropilamina para la preparación de formulaciones farmacéuticas como protector del endotelio mediante su efecto simultáneo de vasodilatador e inhibidor de la formación de trombos. En este proyecto se estudiarán aminoestrógenos cuya fórmula general se representa en la Figura 1.

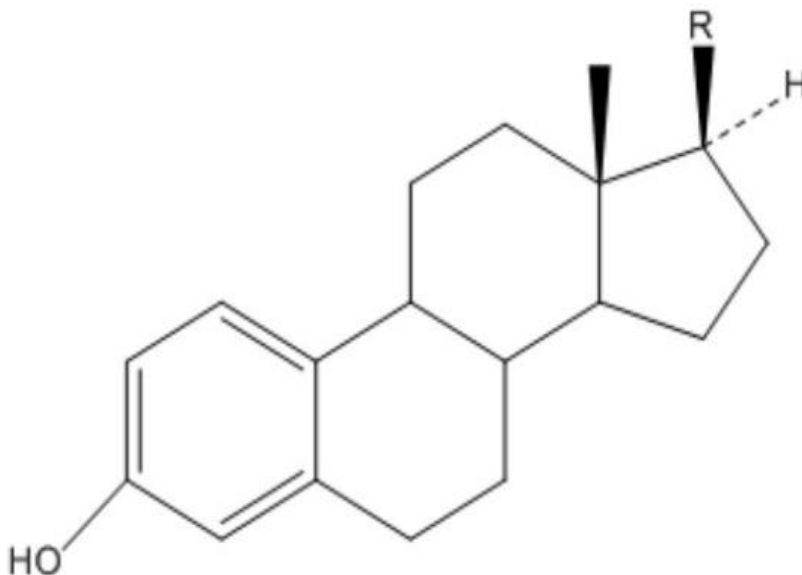


Figura 1. Estructura base de los 17β amino-estrógenos. Donde R es el radical. Los estrógenos se sintetizaron y caracterizaron en el Instituto de Química de la UNAM por el Dr. Juan Manuel Fernández González.

CAPÍTULO I

EFFECTO ANTITROMBÓTICO DE LOS 17 β -AMINOESTRÓGENOS

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La adquisición de nuevos estrógenos que eviten los efectos trombóticos que se observan con los estrógenos en uso, es relevante en el desarrollo de nuevos posibles anticonceptivos, ya que con ellos tendremos más posibilidad de tratamiento para los pacientes y así ofrecer más y mejores opciones.

1.2 JUSTIFICACION

Los estrógenos son indispensables por su empleo como anticonceptivos. Contar con nuevos estrógenos que eviten la trombosis tiene un interés importante. Los resultados permitirán dar una nueva orientación a los enfoques terapéuticos señalando la posibilidad de nuevos compuestos y blancos farmacológicos, así como a obtener más información sobre los mecanismos que conducen al desarrollo de la trombosis.

El marco teórico, objetivo, objetivos específicos, Material y Métodos, las definiciones de variables, emergen del proyecto de investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM (Evaluación del efecto antitrombótico de 17 β aminoestrógenos) No FM/DI/055/2022

1.3 MARCO TEÓRICO

Estrógenos y trombosis.

Los estrógenos son hormonas esteroideas que ayudan a regular algunas de las funciones en el cuerpo humano, estimulan el crecimiento, pueden aumentar la coagulación, disminuir el colesterol por acción directa en el hígado, ayudan a la producción de colágeno, ayudan a la expresión de caracteres sexuales como el crecimiento de mamas, liberan óxido nítrico entre otras funciones¹⁰. Por ahora la literatura sobre la relación de los estrógenos y las plaquetas es escasa, sin embargo se ha demostrado que la función plaquetaria puede variar según la fase menstrual en la que se encuentre la paciente¹¹.

La trombosis se puede definir como una condición en la que la sangre se coagula dentro de venas (si es en el sistema profundo se denominará trombosis venosa profunda) o arterias. La Triada de Virchow es, en esencia la principal causa de la trombosis, esta se compone de: Estasis (alteración del flujo

sanguíneo), lesión endotelial y estado de hipercoagulación¹². Se ha visto relación entre los estrógenos conjugados en el tratamiento de sustitución hormonal o anticonceptiva con el estado procoagulante y posteriormente trombosis, siendo la trombosis venosa profunda la más asociada con el tratamiento¹³.

Debido a que la enfermedad cardiovascular es menos recuente en el género femenino que en el masculino que la prevalencia se incrementa e iguala después de la menopausia, se asumió que los estrógenos tienen un efecto protector en el sistema cardiovascular. Se estima que actualmente aproximadamente 840 millones de mujeres en todo el mundo utilizan anticonceptivos orales, además de las mujeres que los utilizan como terapia de reemplazo hormonal durante la menopausia. Su uso se ha extendido por las personas transgénero. En el año 2000 se publicó el resultado del estudio "Women's Health Initiative"¹⁴, después de 5.2 años de seguimiento se interrumpió a causa de los efectos adversos que presentó el grupo que recibió estrógenos más progestágenos en comparación con el grupo que recibió un placebo. Presentaron enfermedad coronaria 286 participantes, la razón de momios e intervalos de confianza 95 (RM IC95) 1.29 (1.02-1.63); 202 participantes presentaron eventos vasculares cerebrales, RM IC95 1.41 (1.07-1.85); 101 participantes presentaron tromboembolia pulmonar, RM IC95 2.13 (1.39-3.25); 295 casos de cáncer de glándula mamaria RM IC95 1.26 (1-1.59). Estos resultados ponen de manifiesto que los eventos trombóticos se incrementan con el empleo de estrógenos¹⁵. Desde 1961 se informaron los primeros casos de tromboembolia pulmonar¹⁶, infarto cerebral¹⁷ e infarto al miocardio¹⁸. También existen antecedentes en personas del género masculino con infarto previo, con dosis elevadas (10 mg/día) se observó un efecto protector de los estrógenos, pero cuando se administran dosis menores (5 y 2.5 mg/día), la tendencia trombótica se elevó en lugar de disminuir¹⁹. De manera similar el uso de estrógenos en el tratamiento de cáncer prostático incrementa tanto los accidentes trombóticos arteriales como las hemorragias cerebrales²⁰. En los eventos trombóticos intervienen también otros factores como la edad, tabaquismo, dieta, hipertensión y sedentarismo^{21,22,23}. Debe señalarse 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. No se sabe con certeza si el efecto trombótico es consecuencia de compuesto oricina o de algunos de sus metabolitos que se forman rápidamente^{24,25,26,27}. Los mecanismos tanto protectores como trombofílicos de los estrógenos pueden incidir en las diferentes etapas hemostáticas, desde el endotelio vascular (promueven la producción de energía, disminución del estrés oxidativo, activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), incremento en la producción de óxido nítrico (NO), etc.), la hemostasia primaria (actividad plaquetaria), la fase plasmática de la coagulación (actividad de los factores), los mecanismos antitrombóticos y la fase fibrinolítica^{28, 29, 30, 31, 32}. Se han empleado diferentes estrategias de estudio que abarcan desde las pruebas de coagulación global, la resistencia a la proteína C y la generación de trombina. Además de los mecanismos mencionados, los estrógenos modifican la producción macropartículas o microvesículas (Mvs)³³. Microvesículas (Mvs). 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 y/o apoptosis. Los mecanismos de biogénesis y la liberación de las Mvs, incluyen la redistribución de los componentes de la membrana, pérdida de simetría de los fosfolípidos, pérdida de la estructura del citoesqueleto, con la formación de nano dominios y la presencia de fosfolípidos aniónicos que actúan como fuerzas de atracción en la membrana³⁴. Las Mvs se caracterizan por exponer sobre su superficie fosfolípidos, factor tisular (TF), entre otras moléculas, además de llevar la información (ácido desoxiribunocleico (RNA), microRNA, etc.) de la célula de origen a diversos tejidos distantes. Se observa una asociación entre la elevación de su concentración y diversos estados patológicos (como trombosis venosa), lo que asocia con efectos deletéreos de las células de la pared vascular. Por este motivo, actualmente se le considera mensajeros intercelulares que mantienen y/o inician la disfunción celular, además de inducir el estrés oxidativo, pero también son fuente que alimenta procesos fisiológicos normales como la hemostasia, lo que nos lleva a considerar que más importante que su número es considerar su procedencia o los elementos que portan en su estructura. Su empleo como biomarcadores cobra relevancia sobre todo porque pueden proteger del deterioro que se observa después de colectar muestras plasmáticas para el estudio de miRNAs, RNA, DNA, etc. En resumen, las Mvs son una población heterogénea de pequeñas vesículas en las que la membrana plasmática perdió la simetría y expone fosfolípidos con carga negativa, principalmente fosfatidilserina, que provienen de varias líneas celulares tras la activación o la apoptosis. Son muy variables en tamaño, composición y función. Figura 2

Se han detectado Mvs en diversos fluidos biológicos como la sangre periférica, orina y líquido ascítico, así como placa aterosclerótica, la mayoría de las Mvs proviene de las plaquetas y en menor número de los eritrocitos, granulocitos, monocitos y células endoteliales.

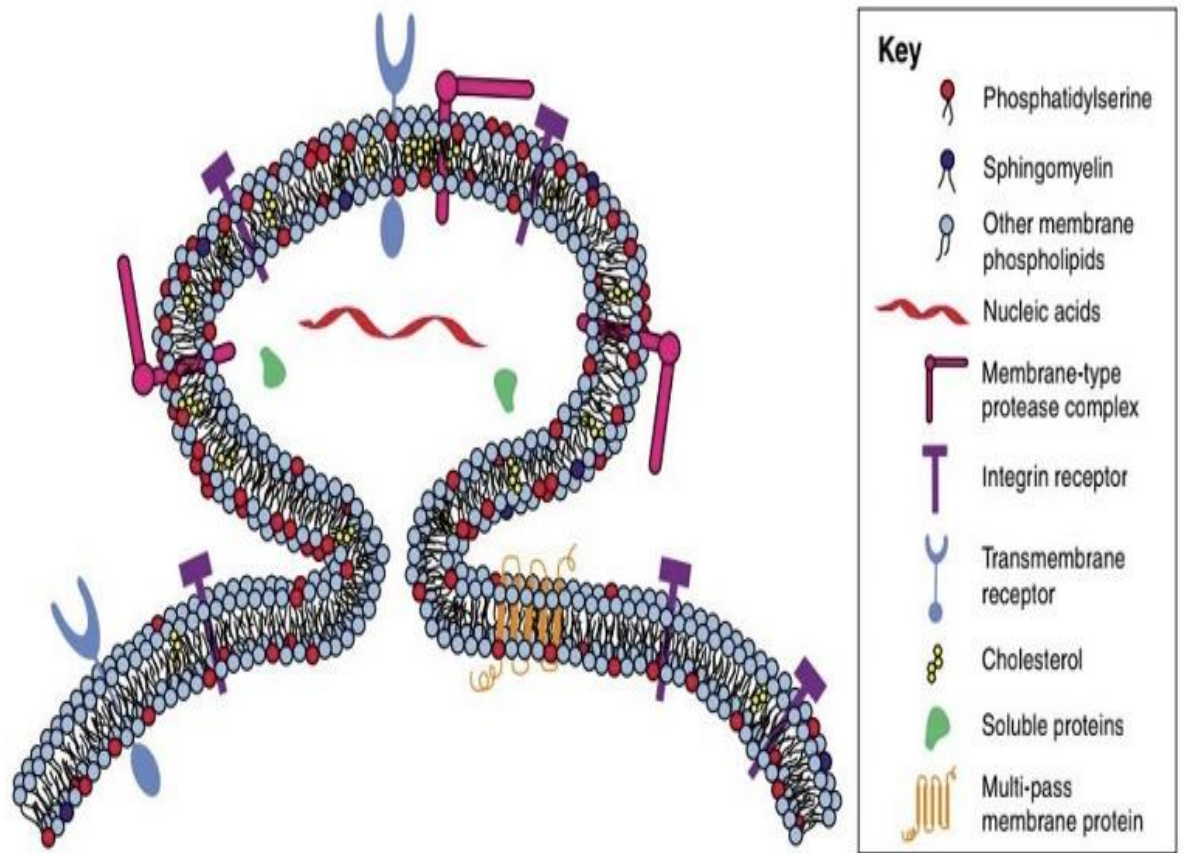


Figura 2. Tomada de Muralidharan-Chari V, et al. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* 2010; 123: 1603-11. La figura muestra un esquema representativo de las características que adquieren las MPs, la presencia de fosfatidilserina, así como de múltiples receptores en el lado externo de su membrana, y la presencia de información genética (ácidos nucleicos) y proteínas de la célula que les da origen.

Algunas circunstancias fisiopatológicas incrementan la formación de Mvs, por ejemplo, existe evidencia que la generación de especies reactivas de oxígeno en la aterosclerosis activa a los eritrocitos e incrementa la formación de Mvs que provienen de eritrocitos,³⁵ también pueden formarse a causa de trastornos metabólicos, infecciones o presencia de citocinas. Sin embargo, también se identifica su presencia con mecanismos que pueden adoptar múltiples funciones fisiológicas, por ejemplo, las Mvs que se forman a partir de células hepáticas portan enzimas que intervienen en el metabolismo de los medicamentos haciendo más eficiente y convirtiéndose en una fuente extra hepática de metabolismo.³⁶ Las Mvs ingresan a las células diana y comparten la información, proteínas intracelulares, segundos mensajeros y material genético, incluyendo miRNA. Al facilitar la transferencia horizontal de moléculas bioactivas, se propone que tienen un papel vital en la invasión tumoral, las metástasis, la coagulación

y la inflamación. También se conoce un papel fisiológico que genera un microambiente en el árbol vascular que mantiene una adecuada homeostasis en las funciones procoagulantes, anticoagulantes y fibrinolíticas.³⁷

Plaquetas.

En lo que concierne a la coagulación, la participación de las plaquetas es esencial, ya que permite que los factores de la coagulación tengan una concentración local adecuada; exponen a los fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina que se encuentra en el interior de la membrana plasmática de las plaquetas en reposo. Después de activarse las plaquetas, la fosfatidilserina y otros fosfolípidos aniónicos se trasladan a la superficie de la membrana y proporciona una superficie catalítica, donde los factores de coagulación vitamina K-dependientes pueden interactuar con cofactores para formar los complejos enzimáticos característicos, que culminan en la adecuada generación de trombina para asegurar una actividad hemostática eficaz. Cuando se desprenden fragmentos de la membrana, se organizan formando Mvs de manera que conserven sus propiedades procoagulantes, la que incluyen la presencia del TF, el cual inicia las principales reacciones de coagulación sanguínea. Se han identificado también Mvs que provienen de la placa aterosclerosa y se considera que tienen características diferentes a las Mvs que provienen de células plasmáticas, en particular en lo que se refiere a la presencia y actividad del TF^{38, 39} con un gran potencial procoagulante.⁴⁰ Por ejemplo, posterior a un evento coronario agudo participan movilizando células progenitoras para reparar el daño en el endotelio vascular.⁴¹ Sin embargo, algunas subpoblaciones tienen un efecto opuesto al reparador, ya que portan citocinas importantes para activar las diferentes vías de la inflamación⁴² y también podrían tener un papel en la disfunción vascular al disminuir la producción de óxido nítrico⁴³. Las Mvs liberadas por el endotelio podrían representar una ventaja para predecir el riesgo de la enfermedad coronaria frente a otros factores de riesgo tradicional⁴⁴ ya que existe un particular incremento en pacientes con enfermedad coronaria e insuficiencia cardíaca,⁴⁵ hecho que se explica por la presencia de TF y factores de la coagulación (Va y Xa) presentes en aquellas que provienen de las plaquetas durante un síndrome coronario agudo.⁴⁶ Aunque inicialmente se reconocía solamente sus propiedades procoagulantes, actualmente se contemplan como un sistema que puede aportar un balance procoagulante/fibrinolítico,⁴⁷ en el que participan de manera sobresaliente las Mvs que surgen a partir de células endoteliales o que inciden en el endotelio vascular, conservando la homeostasis celular y protegiendo a las células endoteliales de la lisis que induce el complejo del complemento C5b-9,⁴⁸ de la caspasa-3⁴⁹ y de los fosfolípidos oxidados.

Fibrinólisis.

La fibrinólisis se caracteriza por reacciones enzimáticas que generan plasmina, enzima proteolítica que elimina, entre otros sustratos la fibrina que se deposita en los vasos sanguíneos y borra el recuerdo de

todos los procesos coagulantes, devolviendo al endotelio vascular todas sus funciones fisiológicas. El proceso se lleva a cabo sobre una superficie sólida, la fibrina, que presenta sitios de alta afinidad para el plasminógeno (precursor de la plasmina). El plasminógeno que se une a estos sitios es sustrato del activador tipo tisular ((t-PA) por sus siglas en inglés tissue type plasminogen activator) para generar plasmina, que incrementa la eficiencia catalítica al exponer nuevos sitios de afinidad expandiendo el mecanismo. De manera relevante surge el concepto de que las Mvs que provienen de las células endoteliales, bajo el efecto del factor de TNFalfa, (por sus siglas en inglés tumoral necrosis factor alfa), proporcionan también una superficie capaz de interactuar con el plasminógeno (Figura 2) y permitir así su conversión en plasmina a través del activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA) y su receptor (uPAR). Esta capacidad de las Mvs para generar plasmina les otorga una función relevante profibrinolítica, en la migración celular, la angiogénesis, la difusión de las células malignas ⁵⁰ y la apoptosis. ^{51,52} Un ejemplo del papel dual de las Mvs lo aporta el hecho de que de las Mvs que provienen de las células endoteliales se incrementen en los pacientes con aterosclerosis subclínica y no así en los pacientes con aterosclerosis sintomática, sugiere que las Mvs tienen un papel protector bajo algunas circunstancias fisiopatológicas.

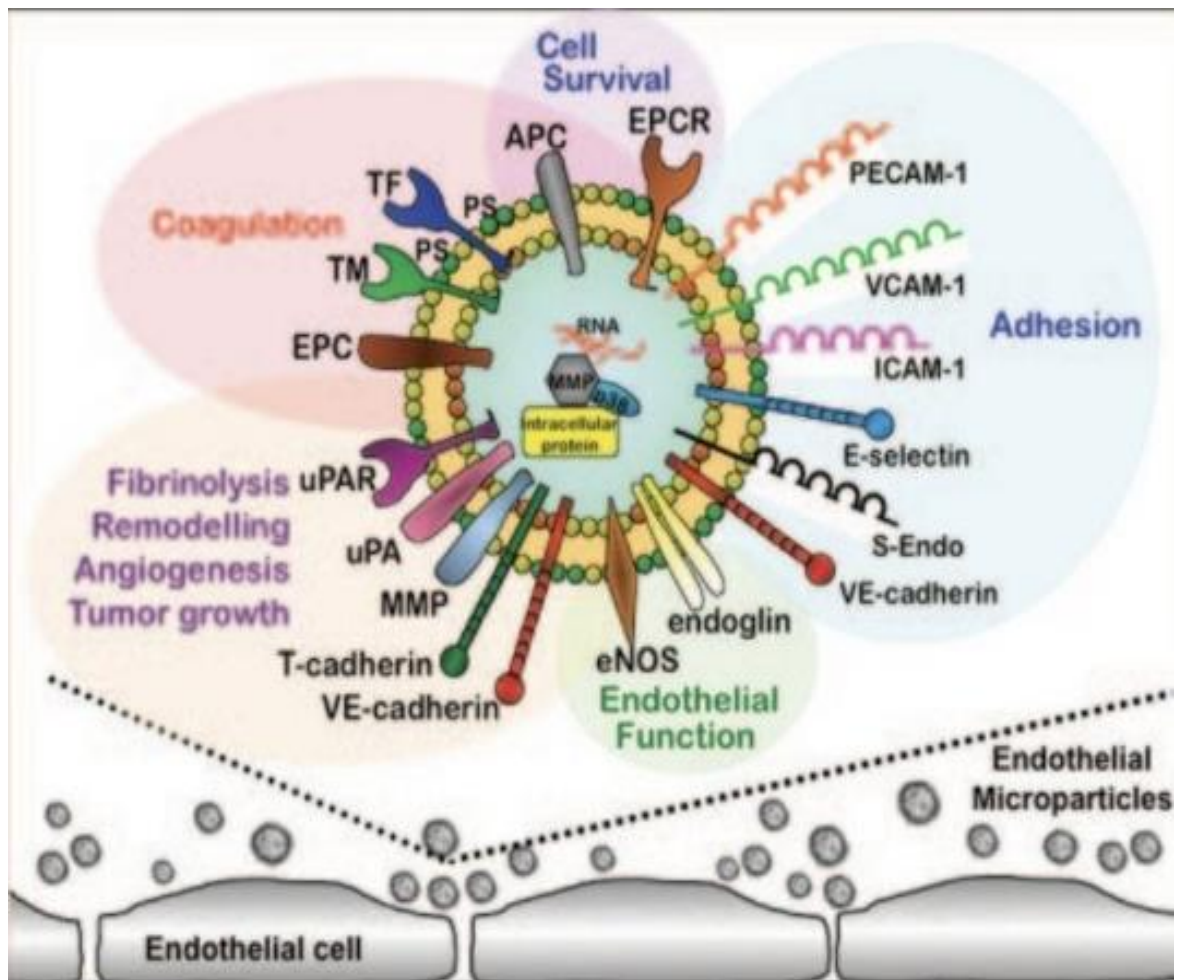


Figura 3. Tomada de Dignat-George F, et al. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31:27-33. Las Mvs poseen en su superficie múltiples receptores y moléculas que les permiten favorecer la coagulación, la anticoagulación, la adhesión celular, la función endotelial, la fibrinólisis, angiogénesis y crecimiento tumoral.

En los procesos inflamatorios, las Mvs que provienen de los leucocitos son capaces de inducir la expresión de genes que incrementan la producción de citocinas y moléculas de adhesión, en cultivos *in vitro* de células endoteliales y leucocitos,⁵³ pero también en este terreno se observa un doble papel ya que una subpoblación de Mvs que provienen de los leucocitos polimorfo nucleares con presencia de anexina-1 que les proporciona una actividad antiinflamatoria.⁵⁴

Aun cuando hasta el momento su estudio se ha centrado a esclarecer su presencia en diferentes patologías (Figura 3), se debe resaltar que también se encuentran presentes en individuos sanos, poniendo en relevancia su papel para conservar la integridad del organismo, conservando la homeostasis celular y promoviendo mecanismos de defensa

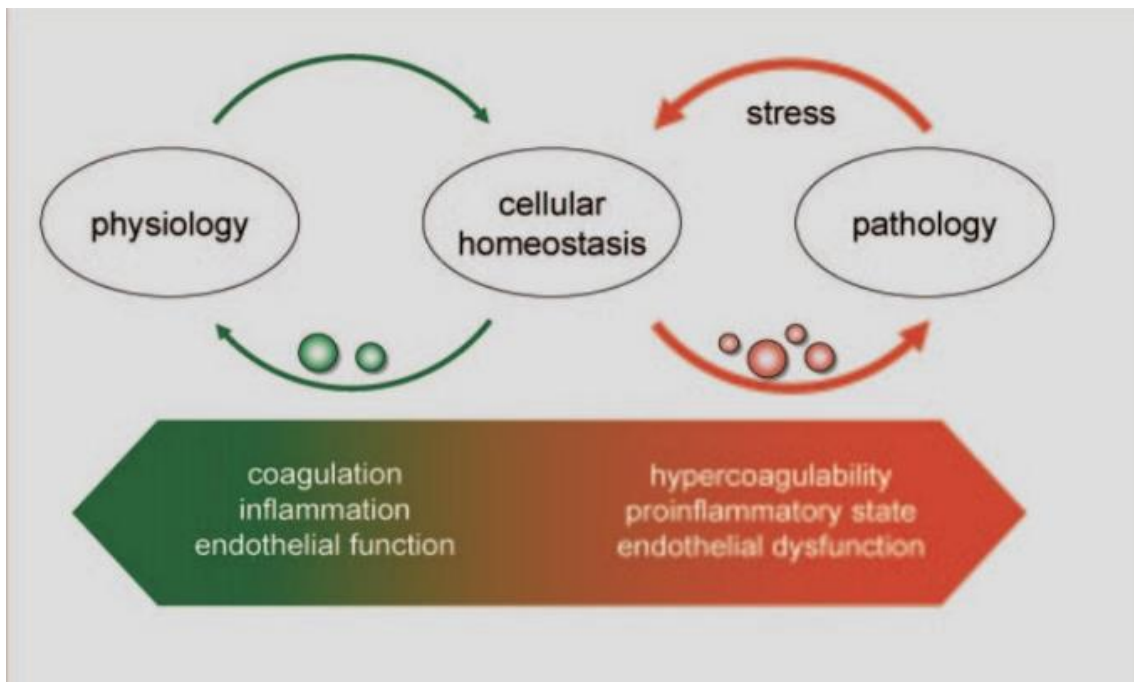


Figura 4. Tomada de Tushuizen M, et al. Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 4-9. En la imagen se muestra el mecanismo propuesto para regular la homeostasia de las células endoteliales en las que las Mvs

pueden mostrar un fenotipo que no favorece la inflamación o la coagulación y/o un fenotipo procoagulante, inflamatorio y alteraciones en la función endotelial.

Sin embargo, existen diferencias en las subpoblaciones que están presentes en individuos sanos y en los pacientes con enfermedades trombóticas, aterosclerosis, enfermedad vascular, sepsis, diabetes, hipertensión crónica y preeclampsia. ^{55, 56,57} Existen características diferentes entre las Mvs de individuos con angina estable o con síndromes coronarios agudos como el infarto al miocardio. ^{58,59} Se ha llegado a plantear también que su presencia contribuye a la magnitud del episodio por su capacidad de diseminar estímulos procoagulantes e inflamatorios. No obstante, también pueden favorecer un estado profibrinolítico que permita la perfusión espontánea de la arteria coronaria como ocurre en el 15 -20 % de los infartos al miocardio con elevación espontánea del segmento ST. ⁶⁰

La mayoría de las investigaciones han centrado su visión en la búsqueda de su actividad procoagulante, como factor de riesgo trombótico, en diversas situaciones clínicas. Sin embargo, considerando su actividad pro fibrinolítica su presencia es muy importante también tanto en la génesis como en el desenlace de las enfermedades cardiovasculares.

1.4 OBJETIVO GENERAL

- 1) Determinar el efecto de los 17 β -aminoestrógenos en hemostasia primaria y secundaria.
- 2) Identificar el efecto de los 17 β -aminoestrógenos en la generación de Mvs y el papel de éstas en la fibrinólisis.

1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar curva dosis-respuesta de los 17 β -ae (5, 50 y 500 uM) sobre la agregación plaquetaria en sangre total con ADP, epinefrina y colágeno, como agentes agonistas
- b) Realizar curva dosis-respuesta de los 17 β -ae (5, 50 y 500 uM) sobre la liberación del ATP de las plaquetas, con ADP y colágeno, como agentes agonistas.
- c) Determinar la concentración efectiva 50 (CE 50) de los 17 β -ae en agregación plaquetaria y liberación del ATP de las plaquetas.
- d) Determinar el efecto de los 17 β -ae sobre la actividad antitrombótica (tamaño del coágulo).

- e) Determinar el efecto de los 17β-ae sobre la generación de Mvs.
- f) Determinar el efecto de los 17β-ae sobre la generación de plasmina de las Mvs obtenidas previamente.

1.6 HIPÓTESIS

Los 17β-aminoestrógenos disminuyen la agregación plaquetaria, tamaño del coágulo y generación de Mvs en comparación con un grupo control. Los 17β-aminoestrógenos incrementan la fibrinólisis.

1.7 METODOLOGÍA

1.7.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizará un estudio transversal, observacional, comparativo que se analizará como casos y controles.

1.7.2 POBLACIÓN, CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Se estimará considerando la diferencia de medias ⁶¹ con base a los resultados de una publicación de nuestro grupo de investigación, Flores García M, et al., ⁶² bajo los supuestos:

$$n_c = n_e = \frac{2 * \left(Z_{\alpha} + Z_{\beta} \right)^2 * (1 - \rho) * S^2}{|M_{de} - M_{dc}|^2}$$

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.

Criterios de selección

Todos los experimentos se realizarán in vitro, en muestras de plasma o sangre total humana. Las muestras anticoaguladas con citrato de sodio (0.105 M) se obtendrán de donadores de sangre, de sexo masculino (para excluir la presencia de estrógenos naturales en las muestras de plasma), que asistan al banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología (INC) Ignacio Chávez, 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.

Reactivos

Adenosin de difosfato (ADP), colageno, epinefrina, Chrono-Lume (luciferin-luciferasa) y adenosin de trifosfato (ATP) se obtendrán de Chrono-PAR Corporation (Havertown, PluciferA, USA). El sulfoxido de dimetilo (DMSO) se comprará a Sigma–Aldrich Chemical Co. El resto de los reactivos será de la mayor pureza posible

1.7.3 VARIABLES Y DEFINICIÓN OPERATIVA

VARIABLE	TIPO	DEFINICIÓN	ESCALA
Agregación plaquetaria	Cuantitativa continua	Porcentaje que se desplaza en el trazo gráfico de una curva (eje de y), desde el origen hasta que se detiene el trazo (eje x).	Porcentaje
Concentración de Mvs	Cuantitativa continua	Cantidad de Mvs presentes por unidad de volumen.	mg/mL
Tamaño Coágulo	Cuantitativa continua	Masa que se forma cuando las plaquetas, proteínas y células de la sangre se unen entre sí.	mg
Generación de plasmina	Cuantitativa continua	Presencia de plasmina que se identifica por la actividad de un cromógeno, el resultado se obtiene por una lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a 450nm. El resultado se extrapola en una curva patrón.	ug/mL

1.7.4 MATERIALES Y MÉTODOS

AGREGACION PLAQUETARIA

Las pruebas se realizarán en un Lumiagregómetro óptico con registrador (Chrono-log. Whole Blood, Lumi- Agregometer, [Ca²⁺]) de 2 canales. La agregación se realizará a 37 °C y a 1200 rpm para simular la turbulencia sanguínea. Los compuestos se disolverán en DMSO. El promedio del grupo control se considerará como el 100 % de la agregación plaquetaria.

- 1) Método de Impedancia.** Se inserta un electrodo en una cubeta con sangre diluida con solución salina grado fisiológico (0.9%). Un voltaje -en el rango de milivolts- se aplica al electrodo y el instrumento mide la resistencia eléctrica o impedancia generada. 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 control (DMSO), se adicionarán a la muestra. Inmediatamente después, un agente agregante (ADP 10 µM, Epinefrina 10 10 µM o colágeno 2 µg/mL) se adicionará 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.

2) 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 (PMT) para medir la liberación de ATP. Brevemente, en una cubeta con plasma rico en plaquetas (PRP) ajustado a 250,000 plaquetas/ μ L se adicionará el 17 β -aminoestrógeno (5, 50 y 500 μ M) o el control (DMSO) e inmediatamente después el reactivo Chrono-Lume (luciferin-luciferasa) a la muestra, se incubará durante 2 min y adicionará el agente agonista (ADP 10 μ M o colágeno 2 μ g/mL). El equipo previamente se calibra 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 curvas de agregación plaquetaria en función del tiempo.

Micropartículas (Mvs)

Obtención de Mvs Brevemente, se adicionarán los 17 β -aminoestrogenos o DMSO en muestras de PRP. Posteriormente, se estimularán las plaquetas con ADP 10 μ M + Colágeno 2 μ g/mL por 5 h a 37°C en agitación constante, para inducir la formación de PLQMvs (Mvs provenientes de plaquetas).⁶³
Aislamiento de Mvs Se aislarán las micropartículas mediante centrifugación diferencial. Brevemente, la muestra sanguínea citratada (0.105 M) se centrifugará dos veces (1500 x g por 15 min y 13000 x g por 2 min) para obtener el PPP. Posteriormente, 500 μ L de muestra se centrifugará (20000 x g por 90 min a 4 °C), las Mvs se lavarán y serán resuspendidas con amortiguador HEPES (10 mM NaCl, 140 mM HEPES; pH 7.4).

Cuantificación de Mvs

Una porción de Mvs se someterán a 5 ciclos de choque térmico (nitrógeno líquido – baño maría (37 °C)), por lapsos de 1 min, para lisar su membrana 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 x 10⁵ Mvs/mL.⁶⁴ Empleando esta equivalencia, los resultados son comparables con los que se obtienen por el método de microscopia 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. El empleo de la citometría de flujo para determinar la concentración de Mvs es motivo de debate, ofrece la ventaja de no solo obtener la concentración sino también poder distinguir el origen celular de las diferentes Mvs, las dificultades técnicas que existen

respecto al límite de detección del método, se discuten en comités de expertos con la finalidad de llegar a consensos y permitir resultados comparativos entre diferentes grupos. Sin embargo, hasta que no exista un consenso, en este protocolo se obtendrán por ultracentrifugación.

Generación de plasmina ⁶⁵

En una placa de 96 pozos se depositará por duplicado para cada muestra (en 50 μ L): 2x10⁵ Mvs en suspensión en amortiguador HEPES (10 mM NaCl, 140 mM HEPES; pH 7.4) suplementado con albúmina bovina al 0.8% o blanco (amortiguador HEPES), 1 μ M de plasminógeno, 0.75 mM del sustrato cromogénico selectivo para la plasmina (metilmalonil)-hidroxipropil arginina, p-nitroanilina (CBS S0065, Stago, Francia) y se lee en un espectrofotómetro (modelo EON, marca Biotek) a 405 nm. La cinética se sigue durante 9 h a 37 °C, midiendo el cambio de absorbancia a 405 nm por la producción de p-nitroanilina que genera el cromógeno al liberarse del péptido por acción de la plasmina. El resultado se obtendrá interpolando el resultado obtenido de las muestras problema en una curva patrón de t-PA (0.2 – 2 UI/mL).

Análisis del tamaño de un coágulo ⁶⁶

A 0.5 mL de sangre total se le adicionará el 17 β -aminoestrogeno (5, 50, 500 μ M) o el control (DMSO), se dejará reposar 10 min a temperatura ambiente y se incubará 3 h en baño maría a 37 °C, para permitir la completa retracción del coágulo. Se eliminará el suero y se pesará el coágulo formado a las 3, 24 y 48 h. Los datos se expresarán en gramos (g) y el resultado del control se considerará como 100 % de retracción del coágulo. Asimismo, se tomarán fotos de los coágulos formados y se terminará el área del coágulo mediante la ayuda del programa Visionworks Análisis Software v8.20 (Analytik Jena GmbH+Co.KG, Germany).

Instrumentos o herramientas.

Lumi-Agregómetro (marca: Chrono-log; modelo: 560CA)

Espectrofotómetro (marca: Biotek; modelo: EON)

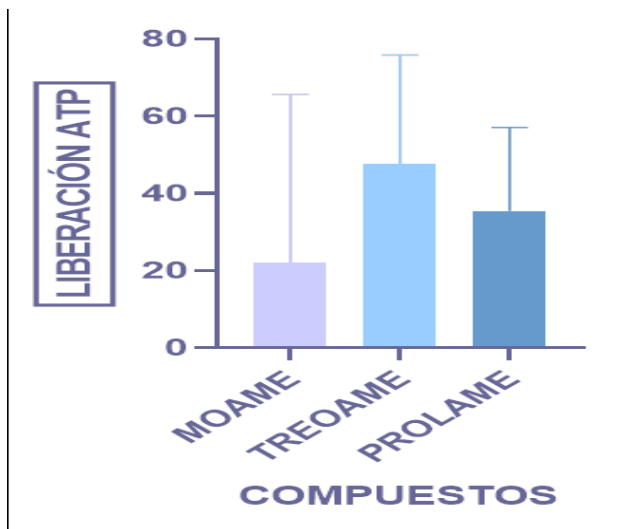
Balanza analítica (marca: ADAM; de 0.0001 a 120 g) Incubadora (marca: General Incubator LUZEREN; modelo: DHP9032)

Baño maría (marca: REVOLUCIONARY SCIENCE; modelo: Poly Probat)

Agitador (marca: Major Science; modelo: Rocking skaker;)

RESULTADOS.

GRÁFICA 1 Liberación de ATP % por compuesto



GRÁFICA 2 Agregación plaquetaria % por compuesto

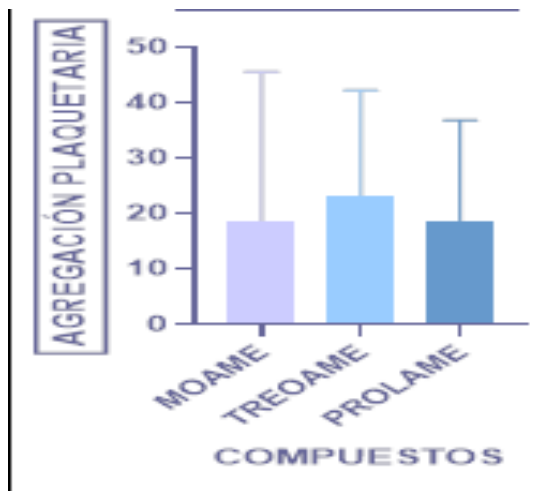
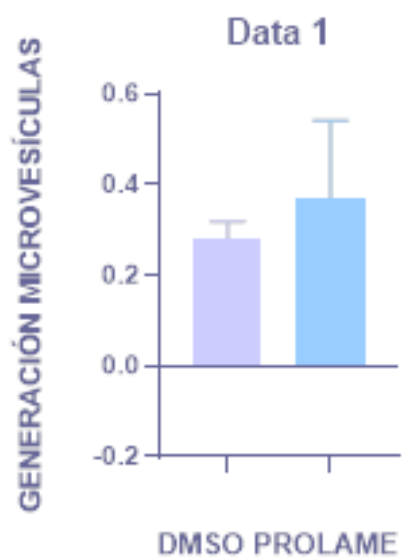


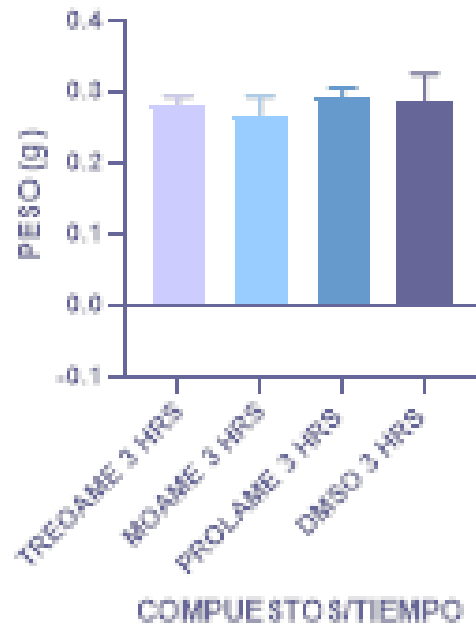
TABLA 1 Porcentaje de inhibición plaquetaria por compuesto medido por Impedancia

CONCENTRACIÓN (μM)	IMPEDANCIA	
	TREOAME	MOAME
	ADP	ADP
5	4.6 ± 4.4*	18.0 ± 11.2*
50	47.9 ± 15.8*	30.8 ± 16.1*
500	90.4 ± 9.3*	93.9 ± 7.9*

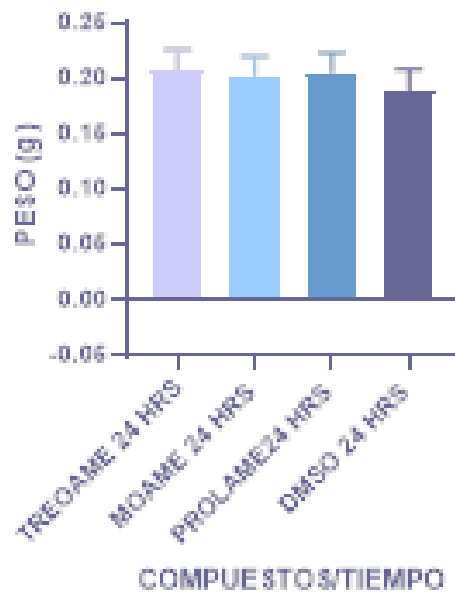
GRÁFICA 3 Generación de microvesículas comparando control vs compuesto



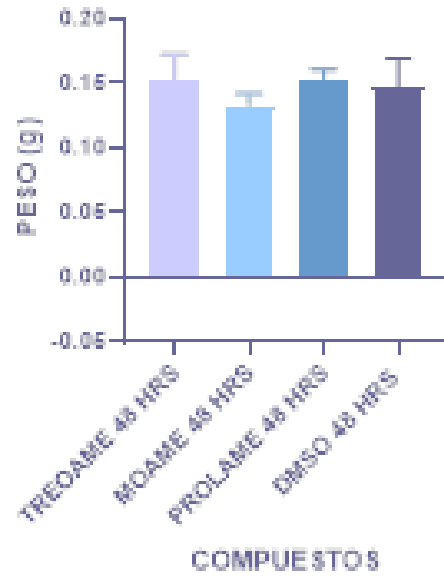
A) **Peso de coágulo a 3 hrs**



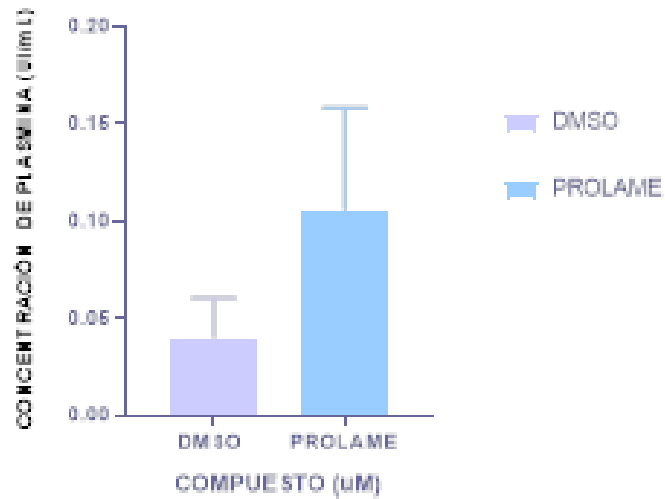
B) **Peso de coágulo a 24 hrs**



C) Peso de coágulo a 48 hrs



GRÁFICA 5 Generación de plasmina control vs compuesto



ANALISIS DE RESULTADOS

Gráfica 1. El efecto de los aminoestrógenos sobre la liberación de ATP. La segunda gráfica representa cuanta liberación de ATP se obtuvo con los aminoestrógenos utilizados (Moame, Treoame y Prolame). Los resultados de liberación de ATP tuvieron un valor de P de 0.037 mostrando a Prolame con menor liberación de ATP. Los datos se presentan como promedio \pm DE, de 8 experimentos diferentes. *P<0.05 se consideró estadísticamente significativo, ANOVA con Dunnet y regresión no lineal, GraphPad Prism v.8.

Gráfica 2. El efecto de los aminoestrógenos sobre la agregación plaquetaria. La primera gráfica representa cuanta agregación plaquetaria se obtuvo con los aminoestrógenos utilizados (Moame, Treoame y Prolame). Los resultados de agregación plaquetaria tuvieron un valor de P < 0.00001, mostrando al Prolame con mayor inhibición con respecto a los otros compuestos. Los datos se presentan como promedio \pm DE, de 8 experimentos diferentes. *P<0.05 se consideró estadísticamente significativo, ANOVA con Dunnet y regresión no lineal, GraphPad Prism v.8.

TABLA 1 Efecto de aminoestrógenos en impedancia expresan en porcentaje de inhibición. Los datos se muestran en Media \pm desviación estándar. Los resultados de la agregación medida con el método de impedancia, comparando Treoame y Moame, en donde podemos observar significancia en todas las muestras, sin embargo, Treoame con 6 veces más potencia sobre Moame. Se analizaron los datos con ANOVA y se compararon los resultados con la Prueba de Dunnet *P=<0.05.

Gráfica 3. El efecto del Prolame en generación de microvesículas. En esta gráfica se muestra la concentración de microvesículas generadas con el control DMSO y con el compuesto que se utilizó, en este caso "Prolame" en una concentración de 500 μ M, analizamos los datos con prueba de normalidad, en donde el valor de p >0.05 por lo que se analizó posteriormente como prueba no paramétrica con U-Mann Whitney con un valor de p >0.05.

Gráfica 4 Retracción de coágulo medido en gramos,, en la gráfica A se observan los pesos de la muestra sanguínea tratada con diferentes compuestos, Treoame, Moame, Prolame (500 Mm) y su control DMSO, de la que se formó el coágulo. Se observa diferencia significativa entre los grupos p< 0.05. En la Gráfica B se observa el peso de los coágulos tratados con Treoame, Moame y Prolame (500 Mm) y su control DMSO, medidos a las 24 hrs, en donde no se observa diferencia significativa con los tres compuestos, respecto a su control p < 0.05. en la gráfica B se observa el peso de los coágulos tratados con Treoame, Moame y Prolame (500 Mm) y su control DMSO, medido a las 48 hrs no se observa diferencia significativa en ninguno de los casos p< 0.05. Se analizaron los datos con ANOVA y posteriormente se hizo la comparación entre grupos con DUNNET.

GRÁFICA 6 Generación de plasmina. Se muestran los datos con mediana y error estándar. La gráfica muestra el resultado de la generación de plasmina, medido en UI/ml, comparando Prolame y el control DMSO, se ve diferencia significativa, aumenta 275% la generación de plasmina por la muestra tratada con Prolame, con respecto a DMSO p < 0.05. Los datos se analizaron por ANOVA.

CONCLUSIONES

Con los diferentes resultados obtenidos de las pruebas realizadas se puede concluir que:

- 1) En el método de luminiscencia, se observaron diferencias significativas entre los tres grupos al comparar la liberación de ATP de cada compuesto. Los resultados indican una disminución estadísticamente significativa en la liberación de ATP para los tres compuestos, siendo el Prolame el más eficaz al reducir la inhibición en comparación con Moame y Treoame. Estos hallazgos sugieren que los tres compuestos tienen un impacto significativo en la reducción de la liberación de ATP, especialmente el Prolame, evidenciando una disminución en la actividad plaquetaria a través de la reducción del contenido liberado de los gránulos densos. Como demuestra Yang Yang Ding y colaboradores (2023) en su ensayo con modelo animal, al inhibir el ATP plaquetario, se inhibe la actividad plaquetaria⁶⁷.
- 2) En relación con la agregación plaquetaria, se concluye que los tres compuestos reducen esta respuesta. Notablemente, el Prolame disminuye de forma más eficiente la agregación plaquetaria según el método óptico. Este efecto podría explicarse mediante los resultados de luminiscencia, sugiriendo que al inhibir la excreción del contenido de los gránulos densos, el Prolame ejerce una influencia más significativa, disminuyendo la actividad plaquetaria de manera más efectiva que Moame y Treoame. Estos hallazgos respaldan la comprensión de la capacidad de los compuestos para modular la respuesta plaquetaria y tienen implicaciones en el control de la agregación plaquetaria, respaldando lo encontrado por De la Peña A, Baños G, Izaguirre R, Mandoki JJ, Fernández JM (1993) en donde los resultados sugieren que el uso de prolame puede reducir la agregación plaquetaria de forma dosis dependiente⁶⁸.
- 3) En la tabla 1 se muestra el efecto de los compuestos Treoame y Moame, en el cual se puede observar que los compuestos, de acuerdo con la técnica de impedancia, tienen efecto inhibitorio en agregación plaquetaria, sin embargo, se observa que es dependiente de concentración, en este caso podemos inferir que este efecto inhibitorio se puede dar gracias al efecto cooperativo que tiene la agregación con otras células en la sangre, en este caso puede deberse al efecto cooperativo con los leucocitos. Asimismo, la Doctora Aurora de la Peña, en su estudio Agregación plaquetaria en sangre total, un nuevo enfoque para comprender el efecto antiplaquetario de la N-(3-hidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17b-il)butilamina (buame), ayuda a entender más este proceso, haciendo alusión al deterioro que tiene con Trombozono A2⁶⁹ y así dar sustento a nuestra conclusión, con este método podemos observar el efecto cooperativo entre otras células e incluso otros componentes sanguíneos o celulares.

- 4) En la gráfica 4 se observa el efecto sobre la producción de microvesículas de plaquetas tratadas con Prolame (500 μ M), colágeno (10mg/ml) y ADP 2 (mM). En este caso Pedro Schubert y colaboradores (2021) trataron plaquetas con rivoflabina, obteniendo mayor producción de microvesículas y observaron diferente cinética en las microvesículas de plaquetas tratadas vs las no tratadas⁷⁰. En este ensayo también aumentó la producción, las microvesículas tienen muchas propiedades, algunas pueden perjudicar al microambiente, otras pueden favorecer a este, por lo tanto, tendríamos que analizar las partículas para saber que propiedades tienen las microvesícula.

- 5) Se muestran 3 gráficas diferentes, son datos de retracción de coágulo se hizo la comparación de Moame, Treoame y Prolame, se pesaron los coágulos a las 3 hrs, 24 hrs, 48 hrs, se observó diferencia significativa a las 24 hrs, con respecto al control, en este caso esperamos que el coágulo sea de mayor tamaño y peso ya que se inhibe la agregación plaquetaria. Sin embargo, Tucker, K. L., Sage, T., & Gibbins, J. M. (2012). Mencionan que los ensayos para retracción de coágulo no debe durar más de 120 minutos⁷¹. Por lo cual deberíamos tomar en cuenta menos tiempo dentro del ensayo.

- 6) En la gráfica 6 se muestra la generación de plasmina medida en UI/ml, se tomaron plaquetas tratadas con Prolame y se muestra que se genera más plasmina con respecto al DMSO. Se puede observar la importancia que tiene el compuesto en la fibrinólisis. Plawinski, L., Cras, A., Hernández Lopez, J. R., de la Peña, A., Van der Heyden, A., Belle, C., Toti, F., & Anglés-Cano, E. (2023)⁷² Sugieren que las microvesículas almacenan efectores bioactivos, los cuales pueden ser procoagulantes o anticoagulantes, sin embargo también pueden ser profibrinolíticas, como es el caso de lo que encontramos con las microvesículas de plaquetas tratadas con Prolame.

En conjunto, estos hallazgos no solo proporcionan una visión más profunda de cómo estos compuestos afectan la respuesta plaquetaria, sino que también abren nuevas interrogantes para investigaciones futuras. La comprensión de estos mecanismos a nivel molecular puede ofrecer perspectivas valiosas para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a la regulación precisa de la actividad plaquetaria y la coagulación sanguínea.

La dificultad de realizar este ensayo fue el poco tiempo con el que se contaba y el exceso de técnicas que utilizamos, contando con pocas muestras y un limitado abastecimiento de compuestos. Sin embargo se siguen realizando ensayos con diferentes aminoestrógenos.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Fernández-G, J. M., Rubio-Arroyo, M. F., Rubio-Poo, C., & de la Peña, A. (1983). Palladium(II) and Platinum(II) Dichloro Complexes Containing Diamine-Estrone Derivatives. *Monatshefte für Chemie*, 114, 535-540.
- ² De la Peña, A., Baños, G., Isaguirre, R., Tobon-Cervantes, A., & Fernández-G, J. M. (1994). Comparative Effect of Three Synthetic Alkanolamino-Estrogens (Etolame, Buolame, and Pentolame) on Platelet Aggregation. *Medical Science Research*, 22, 119-120.
- ³ De la Peña, A., Baños, G., Izaguirre, R., Mandoki, J. J., & Fernández-G, J. M. (1993). Comparative Effect of Synthetic Amino-Estrogens with Estradiol on Platelet Aggregation. *Steroids*, 58, 407-409.
- ⁴ Fernández-G JM, Rubio-ArroyoMF, Soriano-García M, Toscano RA, Pérez-César MC, Rubio-Poo C, Mandoki JJ, De la Peña A, Lemini C, Mendoza-Patiño N, Cruz F. Synthesis and Molecular Structure of Prolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)estratrien-17beta-yl)-3-hydroxypropylamine. An amino-estrogen with prolonged anticoagulant and brief estrogenic effects. *Steroids* 1985; 45:151-7
- ⁵ Rubio-Poo, C., Mandoki, J. J., Mendoza-Patiño, N., Lemini, C., de la Peña, A., Cruz, F., Zavala, E., Silva, G., García-Mondragón, J., Fernández-G, J. M., Soriano-García, M., & Toscano, R. A. (1985). The anticoagulant effect of Prolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)estratrien-17beta-yl)-3-hydroxypropylamine, a novel amino-estrogen. *Steroids*, 45, 159-170.
- ⁶ Rubio-Poo, C., Lemini, C., García-Mondragón, J., de la Peña, A., Jayme, V., Mendoza-Patiño, N., Zavala, E., Silva, G., Blickenstaff, R. T., Fernández-G, J. M., & Mandoki, J. J. (1990). The anticoagulant effect of Hexolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10) estratrien-17B-yl)-6-hydroxyhexylamine, another amino-estrogen with prolonged anticoagulant effect. *Steroids*, 55(2), 83-86.
- ⁷ Mandoki, J. J., Rubio-Poo, C., Lemini, C., de la Peña, A., Fernández-G, J. M., García-Mondragón, J., Zavala, E., Silva, G., & Mendoza-Patiño, N. (1991). The effects of five 17 beta-amino-estrogens, Endiame, Etolame, Buame, Proacame, and Picae, on blood clotting time. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 34, 99-106.
- ⁸ De la Peña, A., López y López, L., Ibáñez, R., Rubio-Poo, C., & Mandoki, J. J. (1991). Comparative Effect of Prolame, a Synthetic Aminoestrogen, with Estradiol and Estrone on the Contractility of Isolated Rat Myometrium. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 34, 185-187.
- ⁹ González, G., Alvarado-Vásquez, N., Fernández-G, J. M., Cruz-Robles, D., Del Valle, L., Pinzón, E., Torres, I., Rodríguez, E., Zapata, E., Gómez-Vidales, V., Montaña, L. F., & De la Peña, A. (2010). 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*, 208, 62-68.
- ¹⁰ Biason-Lauber A, Lang-Muritano M. Estrógenos: dos receptores nucleares, múltiples posibilidades. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2022;554(111710):111710. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2022.111710>
- ¹¹ Dupuis, Severin, Noirrit-Esclassan, Arnal, Payrastre, Valéra. Effects of estrogens on platelets and megakaryocytes. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019;20(12):3111. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20123111>
- ¹² Kim KA, Choi SY, Kim R. Tratamiento endovascular para la trombosis venosa profunda de las extremidades inferiores: una descripción general. *Coreano J Radiol* [Internet]. 2021;22(6):931. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3348/kjr.2020.0675>
- ¹³ Dupuis, Severin, Noirrit-Esclassan, Arnal, Payrastre, Valéra. Effects of estrogens on platelets and megakaryocytes. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019;20(12):3111. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20123111>
- ¹⁴ Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. (2000). Risks and benefits of estrogen plus progesterone in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 228, 321-333.
- ¹⁵ Lidegaard, O., Lokkegaard, E., Svendsen, A. L., & Agger, C. (2009). Hormonal contraception and risk of venous thromboembolism: national follow-up study. *BMJ*, 339, b2890.
- ¹⁶ Jordan, W. M. (1961). Pulmonary embolism. *Lancet*, 1, 1146-1147.
- ¹⁷ Lorentz, I. (1962). Parietal lesions and Enavid. *BMJ*, 1, 1191.
- ¹⁸ Boyce, J., Fawcett, J. W., & Noall, E. W. P. (1963). Coronary thrombosis and Conovid. *Lancet*, 1, 111.

-
- ¹⁹ Rosendaal, F. R., Van Hylckama Ulieg, Tains, B. C., & Helmerhorst, M. (2003). Estrogens, progestagens and thrombosis. *J Thromb Haemost*, 1, 1371-1380
- ²⁰ Brändstedt, J., Wangefjord, S., Nodin, B., Eberhard, J., Jirström, K., & Manier, J. (2014). Associations of hormone replacement therapy and oral contraceptives with risk of colorectal cancer defined by clinicopathological factors, beta-catenin alterations, expression of cyclin D1, p53, and microsatellite-instability. *BMC Cancer*, 14, 371.
- ²¹ Holst, A. G., Jensen, G., & Prescott, E. (2010). Risk factors for venous thromboembolism: results from the Copenhagen City Heart Study. *Circulation*, 121(17), 1896-1903.
- ²² Matthan, J. R., Ooi, E. M., Van Horn, L., Neuhauser, M. L., Woodman, R., & Lichtenstein, A. H. (2014). Plasma phospholipid fatty acid biomarkers of dietary fat quality and endogenous metabolism predict coronary heart disease risk: a nested case-control study within the Women's Health Initiative Observational Study. *Journal of the American Heart Association*, 3(4).
- ²³ Canonico, M. (2014). Hormone therapy and hemostasis among postmenopausal women: a review. *Menopause*, 21(7), 753-762.
- ²⁴ Baker, M. E. (2013). What are the physiological estrogens?. *Steroids*, 78(3), 337-340.
- ²⁵ Bloemenkamp, K. W. M., Rosendaal, F. R., Helmerhorst, F. M., Koster, T., Bertina, R. M., & Vandenbroucke, J. P. (1998). Hemostatic effects of oral contraceptives in women who developed deep-vein thrombosis while on oral contraceptives. *Thrombosis and Haemostasis*, 80, 382-387.
- ²⁶ Tanis, B. C., & Rosendaal, F. R. (2003). Venous and arterial thrombosis during oral contraceptive use: risks and risk factors. *Seminars in Vascular Medicine*, 3, 69-84.
- ²⁷ Siegerink, B., Govers-Riemslog, J. W., Rosendaal, F. R., Ten Cate, H., & Alara, A. (2010). Intrinsic coagulation activation and the risk of arterial thrombosis in young women: results from the Risk of Arterial Thrombosis in relation to Oral contraceptives (RATIO) case-control study. *Circulation*, 122(18), 1854-1861.
- ²⁸ Anzej Doma, S., Vuënik, M., Bozic Mijovski, M., Peternel, P., Stegnar, M. (2013). Enhanced thrombin generation in women with a history of oral contraception-related venous thrombosis. *Thrombosis Research*, 132(5), 621-626.
- ²⁹ Rank, A., Nieuwland, R., Nikolajek, K., Rösner, S., Wallwiener, L. M., Hiller, E., & Toth, B. (2012). Hormone replacement therapy leads to increased plasma levels of platelet-derived microparticles in postmenopausal women. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 285(4), 1035-1041.
- ³⁰ Agouni, A., Andriantsitohaina, R., & Martinez, M. C. (2014). Microparticles as biomarkers of vascular dysfunction in metabolic syndrome and its individual components. *Current Vascular Pharmacology*, 12(3), 483-492.
- ³¹ Ghozlan, M. F., Osman, A. A., Mahmoud, H. M., & Eissa, D. G. (2015). Comprehensive study on laboratory biomarkers for prediction and diagnosis of deep venous thrombosis. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 26(3), 255-260.
- ³² Larson, M. C., Hillery, C. A., & Hogg, N. (2014). Circulating membrane-derived microvesicles in redox biology. *Free Radical Biology & Medicine*, 73, 214-228.
- ³³ De la Peña, A., Baños, G., Izaguirre, M., & Fernández, J. M. (1994). Comparative effect of synthetic alkanol-amino-estrogens; etolame, buolame and pentolame, on platelet aggregation. *Medical Science Research*, 22, 119-120.
- ³⁴ Stoorvogel, W. (2012). Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood*, 119, 646-648.
- ³⁵ Schara, K., Jansa, V., Sustar, V., Dolinar, D., Pavlic, J. I., Lokar, M., ... & Iglic, A. (2009). Mechanisms for the formation of membranous nanostructures in cell-to-cell communication. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 14(4), 636-656.
- ³⁶ Blum, A. (2009). The possible role of red blood cell microvesicles in atherosclerosis. *European Journal of Internal Medicine*, 20, 101-105.
- ³⁷ Conde-Vancells, J., Gonzalez, E., Lu, S. C., Mato, J. M., & Falcon-Perez, J. M. (2010). Overview of extracellular microvesicles in drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 6(5), 543-554.
- ³⁸ Dejouvencel, T., Doeuvre, L., Lacroix, R., Plawinski, L., Dignat-George, F., Linen, H. R., & Anglés-Cano, E. (2010). Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation. *Blood*, 115(10), 2048-2056.
- ³⁹ Leroyer, A. S., Isobe, H., Leeche, G., Castier, Y., Wassef, M., Mallat, Z., ... & Boulanger, C. M. (2007). Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(7), 772-777.

-
- ⁴⁰ Ramacciotti, E., Hawley, A. E., Farris, D. M., Ballard, N. E., Wroblewski, S. K., Myers, D. D., ... & Wakefield, T. W. (2009). Leukocyte and platelet-derived microparticles correlate with thrombus weight and tissue factor activity in an experimental mouse model of venous thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*, 101, 748-754.
- ⁴¹ Michelsen, A. E., Brodin, E., Brosstad, F., & Hansen, J. B. (2008). Increased level of platelet microparticles in survivors of myocardial infarction. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 68, 386-392.
- ⁴² Benameur, T., Tual-Chalot, S., Andriantsitohaina, R., & Martinez, M. C. (2010). PPARalpha is essential for microparticle-induced differentiation of mouse bone marrow-derived endothelial progenitor cells and angiogenesis. *PLOS One*, 5, e12392
- ⁴³ Morel, O., Morel, N., Jesel, L., Freyssinet, J. M., & Tot, F. (2011). Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Seminars in Immunopathology*, 33(5), 469-486
- ⁴⁴ Boulanger, C. M., Scoazec, A., Ebrahimian, T., Henry, P., Mathieu, E., Tedgui, A., & Mallat, Z. (2001). Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation*, 104(22), 2649-2652.
- ⁴⁵ Koga, H., Sugiyama, S., Kugiyama, K., Watanabe, K., Fukushima, H., Tanaka, T., ... & Ogawa, H. (2005). Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 45, 1622-1630.
- ⁴⁶ Bulut, D., Maier, K., Bulut-Streich, N., Börgel, J., Hanefeld, C., & Mügge, A. (2008). Circulating endothelial microparticles correlate inversely with endothelial function in patients with ischemic left ventricular dysfunction. *Journal of Cardiac Failure*, 14, 336-340.
- ⁴⁷ Nomura, S., Uehata, S., Saito, S., Osumi, K., Ozeki, Y., & Kimura, Y. (2003). Enzyme immunoassay detection of platelet-derived microparticles and RANTES in acute coronary syndrome. *Thrombosis and Haemostasis*, 89, 506-512.
- ⁴⁸ Lacroix, R., Sabatier, F., Mialhe, A., Basire, A., Pannell, R., Borghi, H., ... & Dignat-George, F. (2007). Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, 110(7), 2432-2439.
- ⁴⁹ Sims, P. J., & Wiedmer, T. (1995). Induction of cellular procoagulant activity by the membrane attack complex of complement. *Seminars in Cell Biology*, 6, 275-282.
- ⁵⁰ Diamant, M., Tushuizen, M. E., Abid-Hussein, M. N., Hau, C. M., Bong, A. N., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2008). Simvastatin-induced endothelial cell detachment and microparticle release are prenylation-dependent. *Thrombosis and Haemostasis*, 100, 489-497.
- ⁵¹ Diamant, M., Tushuizen, M. E., Abid-Hussein, M. N., Hau, C. M., Bong, A. N., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2008). Simvastatin-induced endothelial cell detachment and microparticle release are prenylation-dependent. *Thrombosis and Haemostasis*, 100, 489-497.
- ⁵² Doeuve, L., & Angles-Cano, E. (2009). Cell-derived microparticles unveil their fibrinolytic and proteolytic function. *Medecine Sciences*, 25, 37-44.
- ⁵³ Lacroix, R., Sabatier, F., Mialhe, A., Basire, A., Pannell, R., Borghi, H., ... & Dignat-George, F. (2007). Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, 110, 2432-2439.
- ⁵⁴ Mesri, M., & Altieri, D. C. (1999). Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 23111-23118
- ⁵⁵ Dalli, J., Norling, L. V., Renshaw, D., Cooper, D., Leung, K. Y., & Perretti, M. (2008). Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood*, 112, 2512-2519.
- ⁵⁶ Diamant, M., Tushuizen, M. E., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2004). Microparticles: new players in the field of vascular disease? *European Journal of Clinical Investigation*, 34, 392-401.
- ⁵⁷ Boulanger, C. M., Amabile, N., & Tedgui, A. (2006). Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension*, 48, 180-186.
- ⁵⁸ Nomura, S., Ozaki, Y., & Ikeda, Y. (2008). Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thrombosis Research*, 123, 8-23.
- ⁵⁹ Bernal-Mizrachi, L., Jy, W., Jiménez, J. J., Pastor, J., Mauro, L. M., Horstman, L. L., ... & Ahn, Y. S. (2003). High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *American Heart Journal*, 145, 962-970.

-
- ⁶⁰ Plawinski, L., & Angles-Cano, E. (2013). Membrane microvesicles: a circulating source for fibrinolysis, new antithrombotic messengers. *Haematologica*, 98, 75.
- ⁶¹ García-García, J. A., Reding-Bernal, A., & López-Alvarenga, J. C. (2013). Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investigación en Educación Médica*, 2(8), 217-224.
- ⁶² Flores-García, M., Fernández-González, J. M., León-Martínez, M., Hernández-Ortega, S., Hernández-López, J. R., Reyes-Munguía, D., ... & de la Peña-Díaz, A. (2021). Tyrame [N-(3-hydroxy-1:3:5(10)-estratrien-17 β -yl)-4-hydroxy-phenethylamine], antithrombotic aminoestrogen that decreases microvesicle formation. *Gaceta Médica de México*, 157(6), 588-593.
- ⁶³ Lovisolo, F., Carton, F., Gino, S., Migliario, M., & Renò, F. (2020). Platelet-rich plasma-derived microvesicles increased in vitro wound healing. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24(18), 9658-9664.
- ⁶⁴ Freyssinet, J. M., & Toti, F. (2010). Membrane microparticle determination: at least seeing what's being sized. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8, 311-314.
- ⁶⁵ Lacroix, R., Sabatier, F., Mialhe, A., Basire, A., Pannell, R., Borghi, H., ... & Dignat-George, F. (2007). Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, 110(7), 2432-2439.
- ⁶⁶ Elnager, A., Abdullah, W. Z., Hassan, R., Idris, Z., Wan Arfah, N., Sulaiman, S. A., & Mustafa, Z. (2014). In vitro whole blood clot lysis for fibrinolytic activity study using d-dimer and confocal microscopy. *Advances in Hematology*, 2014, 814684.
- ⁶⁷ Ding Y, Gui X, Chu X, Sun Y, Zhang S, Tong H, et al. MTH1 protects platelet mitochondria from oxidative damage and regulates platelet function and thrombosis. *Nat Commun* [Internet]. 2023;14(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-023-40600-7>
- ⁶⁸ De la Peña, A., Baños, G., Izaguirre, R., Mandoki, J. J., & Fernández, J. M. (1993). Comparative effect of synthetic aminoestrogens with estradiol on platelet aggregation. *Steroids*, 58(9), 407-409. [https://doi.org/10.1016/0039-128x\(93\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0039-128x(93)90079-3)
- ⁶⁹ de la Peña, A., Flores, M., Valente-Acosta, B., Quintanar-Trejo, L., Hernández-Méndez, C., Muñoz-Martínez, S., Gatica-Lavin, F., & Pinzón, E. (2009). Platelet aggregation in whole blood, a new approach for understanding the antiplatelet effect of N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -yl) butylamine (buame). *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 52, 50-53
- ⁷⁰ Schubert, P., Culibrk, L., Culibrk, B., Conway, E. M., Goodrich, R. P., & Devine, D. V. (2021). Releasates of riboflavin/UV-treated platelets: Microvesicles suppress cytokine-mediated endothelial cell migration/proliferation. *Transfusion*, 61(5), 1551-1561. <https://doi.org/10.1111/trf.16337>
- ⁷¹ Tucker, K. L., Sage, T., & Gibbins, J. M. (2012). Clot retraction. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 788, 101-107. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-307-3_8
- ⁷² Plawinski, L., Cras, A., Hernández Lopez, J. R., de la Peña, A., Van der Heyden, A., Belle, C., Toti, F., & Anglés-Cano, E. (2023). Distinguishing Plasmin-Generating Microvesicles: Tiny Messengers Involved in Fibrinolysis and Proteolysis. *International journal of molecular sciences*, 24(2), 1571. <https://doi.org/10.3390/ijms24021571>

